

立体特異的 2-ヒドロキシ酸脱水素酵素群の比較構造解析 Comparative structural analysis of stereospecific 2-hydroxyacid dehydrogenases

宮永顕正、中島将博、田口速男

東京理科大学理工学部応用生物科学科, 〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641

Hayao Taguchi,

Department of Applied Bioscience, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, Japan

1 はじめに

NAD(P)を補酵素とし、2-ケト酸と 2-ヒドロキシ酸間の酸化還元反応を触媒する NAD(P)依存性 2-ヒドロキシ酸脱水素酵素 (HydDH) 群は、立体特異性の相違により L-HydDH 群と D-HydDH 群に大別される。D-HydDH の多くは、D-乳酸脱水素酵素 (D-LDH) と共通の立体構造をそなえ、一つの大きなタンパク質ファミリーを形成しているが、申請者らはベンゾイルギ酸と D-マンデル酸間の酸化還元を効率よく触媒する 2 種の D-マンデル酸脱水素酵素 (D-ManDH) を *Enterococcus faecalis* IAM10071 株に見出した (D-ManDH1 と D-ManDH2)。これらの D-ManDH は、D-LDH と進化的に大きく隔たり、大腸菌のケトパントエイト還元酵素 (KPR) とともに、新規な D-HydDH ファミリーを形成していた。KPR と D-ManDH は、いずれも D-LDH ファミリーの既知の酵素に見られない特性として、C3 位に分岐鎖をもつ基質に対して高い触媒活性を示し、これがこの新規ファミリーの酵素群の特徴と考えられる。しかしながら、D-ManDH は補酵素特異性、基質特異性両面で KPR と大きく異なっており、この新規ファミリーのタンパク質が多様に分岐進化してきたことが示唆される。しかし、この新規ファミリー酵素の立体構造は KPR をのぞいてほとんどないのが現状である。そこで本研究では、これら D-ManDH の立体構造解析を目指した。

2 実験

D-ManDH1 および 2 を、NADH 存在下、非存在下で結晶化を試み、えられた結晶のデータを KEK の NW-12A で収集し、構造を解析した。

3 結果および考察

D-ManDH2 のアポ構造を 2.0 Å 分解能、R_{fac}/R_{free} = 18.5/22.4 で決定することに成功した。D-ManDH2 は、KPR と異なりホモ 2 量体構造であったが、3 次構造はきわめて類似していた (図 1)。ただし、N 末側の Rossmann-fold をもつ NAD 結合ドメインに相

違がみられ、D-ManDH2 には、β2-β3 ストランド間に、KPR にはない α2 ヘリックスの挿入がみられた。

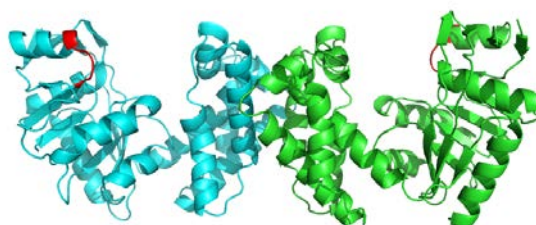


図 1 : D-ManDH の 2 量体構造

また、D-ManDH2 の NADH との 2 者複合体構造も、2.8 Å 分解能、R_{fac}/R_{free} = 24.1/30.5 まで精密化することができた。NADH 結合部位の構造 (図 2) から、D-ManDH2 が、KPR と異なり NADH に特異的であることを構造的に説明できる結果がえられた。すなわち、D-ManDH2 は、補酵素のアデニンヌクレオチド結合部位の構造が KPR と大きく異なり、この酵素に特異な Trp32 残基が補酵素のアデニン環とスタッキングし、やはり特異な Asp30 残基がアデニンリボースの水酸基と水素結合を形成する。NADPH では、アデニンリボースに結合したリン酸基が Asp30 側鎖と立体障害や静電的反撥を生じる。

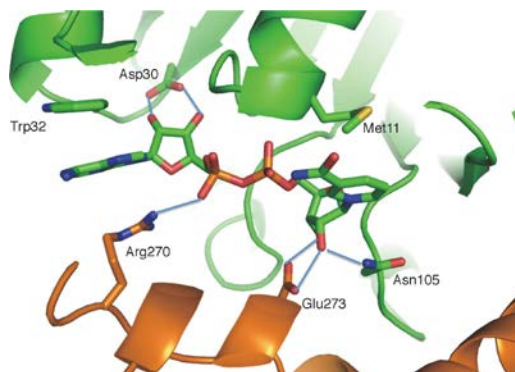


図 2 ManDH2 の補酵素結合部位

基質認識機構については、3者複合体構造が未だ得られておらず、現在なお複合体の結晶化条件を模索中である。ただし、2者複合体構造は、アポ構造よりも2つのドメイン間のクレフトが閉じており、活性中心の構造は3者複合体のものに近いと考えられるので、より信頼度の高い説明は可能となっている。また、現在 D-ManDH2 と基質特異性がやや異なる D-ManDH1 の X 線データも収集済みであり、この結果もあわせれば、さらに信頼性の高い説明が可能となることが期待できる。

4 まとめ

D-ManDH2 のアポ型、NADH との2者複合体型構造の解析に成功し、この酵素の KPR との構造的相違、補酵素認識機構の相違が明らかになった。基質認識機構についても、ある程度の説明が可能となったが、さらに解析が必要である。

参考文献

宮永顕正、藤澤伸介、古川那由太、荒井一人、中島将博、田口速男

The crystal structure of D-mandelate dehydrogenase reveals its distinct mechanisms of substrate and coenzyme recognition from 2-ketopantoate reductase 投稿準備中

成果

学会発表

藤澤伸介、宮永顕正、古川那由太、荒井一人、中島将博、田口速男 日本生化学会第86回大会(2012)

Enterococcus faecalis IAM10071 株由来 D 型マンデル酸脱水素酵素の構造解析と補酵素認識部位の改変

Structural analysis and redesign of the coenzyme specificity of a D-Mandelate dehydrogenase from *Enterococcus faecalis* IAM10071

* pf-acr2012@kek.jp