

D-アスパラギン酸関連酵素の結晶構造解析 Crystal structure of the enzymes relating to D-aspartate

後藤 勝^{1*}

¹ 東邦大学理学部, 〒274-8510 千葉県船橋市三山 2-2-1

Masaru Goto¹

¹ Faculty of Science, Toho University, 2-2-1 Miyama, Funabashi, Chiba, 274-8510, Japan

1 はじめに

過去の研究では、生体を構成するアミノ酸は L 体のみと考えられていたが、近年の分析機器の性能の向上により、さまざまな生物において D-アミノ酸が検出されるようになってきた。最近では、D-アミノ酸は、微生物だけでなく、植物や高等動物にも存在していることが明らかとなり、その多様な生理機能や生合成経路に関する研究が進められている。D-アミノ酸の中でも酸性アミノ酸である D-アスパラギン酸は、D-アラニンおよび D-セリンと同様に、高等動物の組織や細胞において最も普遍的に検出されている遊離 D-アミノ酸の一種であり、神経伝達や内分泌成分にも関連付けられている。

生理的に重要であり、分子レベルでの研究が進行中の D-アスパラギン酸を合成する酵素の候補の一つに、D-アスパラギン酸濃度の高いところに局在していることで知られるアスパラギン酸ラセマーゼ (AspR)がある。本研究では、(1)D-アスパラギン酸を基質とするが、D-セリンを基質としない、(2)2 価金属による活性化、および EDTA 処理による不活性化を受けない、(3)AMP により活性化され、ATP によって阻害される、という他にない興味深い特徴を備えているアカガイ由来の PLP 依存性アスパラギン酸ラセマーゼ (sbAspR)を研究対象として、X 線結晶構造解析を行った。

D-アスパラギン酸の合成を AspR が担っている一方で、D-アスパラギン酸の分解・代謝を行う酵素がある。その一つが、主に動物臓器のペルオキシソームに存在する FAD 依存性の D-アスパラギン酸オキシダーゼ (DDO)であり、D-アスパラギン酸を基質として、酸化的脱アミノ反応を触媒して、オキサロ酢酸とアンモニアを生成する。この酵素は、AspR が D-、および、L-アスパラギン酸に活性があるのとは異なり、D-アスパラギン酸のみを基質とする。この酵素と同種の反応を触媒する FAD 依存性で中性および塩基性の D-アミノ酸を基質とする D-アミノ酸オキシダーゼは、古くから研究され、反応機構の詳細も議論されているが、DDO の研究は遅れているといえる。そこで、動物由来の酵素よりも取り扱い

やすいと考えられる酵母由来の D-アスパラギン酸オキシダーゼ (chDDO)の立体構造を決定することを目的とした。

2 実験

結晶化にもちいた sbAspR および chDDO は、大腸菌をもちいた大量発現系により調製した。測定にもちいた全ての結晶は、4°C、12°Cもしくは室温にてハンギングドロップ蒸気拡散法により PEG を主な沈殿剤とするリザーバーに対して平衡化することで得た。sbAspR と活性化剤の AMP もしくは阻害剤の ATP との複合体結晶は、ネイティブ結晶をそれぞれの化合物を含むリザーバー溶液に浸すことによって作成した。chDDO と基質 D-アスパラギン酸との複合体結晶は、ネイティブ結晶を基質含有リザーバーに浸すことで手に入れた。

ほとんど全ての X 線回折データセットは、入射波長 1.0 もしくは 0.98 Å、1 枚当たりの振動角 0.5°、露光時間 2-5 秒の条件で測定した。

sbAspR の位相は、分裂酵母由来のセリンラセマーゼをスタートモデルにした分子置換法により決定した。chDDO の位相は、水銀誘導体および鉛誘導体をもちいた重原子同形置換法により決定した。

3 結果および考察

sbAspR のネイティブ構造、sbAspR と AMP との複合体構造、および sbAspR と ATP との複合体の構造を、それぞれ 2.15 Å、2.05 Å、および 2.20 Å 分解能で決定することに成功した。

sbAspR は PLP 依存性酵素の Fold type II に属しており、その構造はそのグループに特徴的な大小ドメインで構成されている (図 1)。AMP および ATP は、ホモ 2 量体の sbAspR のサブユニット境界面の同じ部位に結合しており、この酵素の活性または阻害機構は、リン酸基 1 個分というわずかな違いで制御されていることがわかった。

chDDO については、ネイティブ構造、基質 D-アスパラギン酸との複合体構造、R243M 変異体の構造、および R243M 変異体と基質 D-アスパラギン酸の複合体構造を、それぞれ 2.00 Å、2.35 Å、2.30 Å、および 2.00 Å 分解能で決定した。

chDDO は、既知の D-アミノ酸オキシダーゼがホモ 2 量体を形成しているのとは異なり、ホモ 4 両体を形成している。chDDO の立体構造から、その 4 両体の組み合わせは、2 量体が二つ結合したものではない新規の組み合わせであることがわかった(図 2)。基質との複合体の解析結果から、基質 D-アスパラギン酸の α -カルボキシル基は、Tyr245 残基および Arg317 残基の側鎖で認識され、 α -アミノ基は Gly344 残基の主鎖で認識されていた。これらの残基は、既知の D-アミノ酸オキシダーゼにおいても保存されている。基質の β -カルボキシル基の認識には、His56 残基および Arg243 残基が関わっていることがわかった。変異体の解析結果より、基質 β -カルボキシル基の電荷の打ち消し効果を担っているのは His56 残基であり、Arg243 残基は活性部位の構築と基質の取り込みおよび生成物の排除に関わっていることが示唆された。

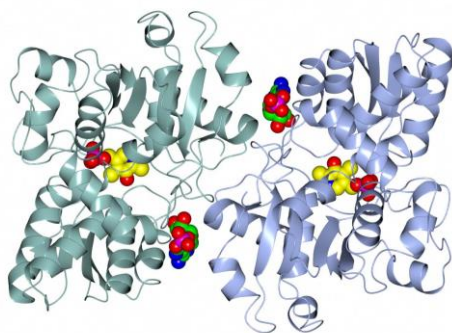


図 1 : sbAspR の全体構造

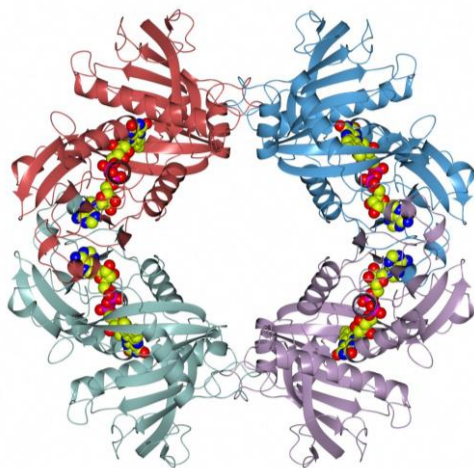


図 2 : chDDO の全体構造

参考文献

- [1] S. Takahashi, T. Takahashi, Y. Kera, R. Matsunaga, H. Shibuya, R.H. Yamada, *J. Biochem.* **135**, 533 (2004).
- [2] K. Abe, S. Takahashi, Y. Muroki, Y. Kera, R.H. Yamada, *J. Biochem.* **139**, 235 (2006).