

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成14年度博士課程進学

氏名 富田 武郎

指導教員 西山 真

### 論文題目 リンゴ酸脱水素酵素の補酵素特異性に関する構造生物学的研究

*Thermus* 属細菌は高温で生育する高度好熱菌である。本菌が生産する酵素は高い耐熱性を持つことから、本菌は利用価値の高い安定酵素の資源といえる。さらに、同菌の全タンパク質を対象とした構造生物学的研究もスタートしており、X線結晶構造解析によって決定されるタンパク質の立体構造情報を基にして、基質特異性の改変、高活性化など、産業利用に適した性質を有する酵素の創生が期待されている。

当研究室では、これまでに *Thermus flavus* AT-62 株よりTCAサイクルの最後の反応を担うリンゴ酸脱水素酵素(Malate Dehydrogenase, MDH)の遺伝子をクローン化し、同酵素の酵素学的諸性質を明らかにすると同時に、タンパク質工学的研究及びtMDH-NADH複合体のX線結晶構造解析を通して、高い熱安定性を持つメカニズムをはじめとする同酵素の構造-機能相関を明らかにしてきている。

MDHは、真核生物での細胞局在から細胞質MDH、ミトコンドリアMDH、葉緑体MDHに分類される。細胞質、ミトコンドリアMDHはNAD(H)依存酵素でありTCAサイクルの中で機能する一方で、葉緑体MDHはNADP(H)依存酵素であり光合成の過程のうち炭酸固定において機能していることが知られている。当研究室では以前にアミノ酸配列から細胞質型に分類される *T. flavus* 由来のMDH (tMDH)において、その補酵素特異性を決定すると推定されたループ領域のアミノ酸配列を葉緑体MDHのものに置換した変異体 EX7 (Glu41Gly/Ile42Ser/Pro43Gln/Gln44Arg/Ala45Ser/Met46Phe/Lys47Ala)を作製し、同酵素の補酵素特異性をNAD(H)からNADP(H)へほぼ完全に変換することに成功している。

本研究では、tMDHがNAD(H)とNADP(H)を識別する仕組みの詳細、ならびに補酵素特異性の変換が行われた構造的基盤を明らかにするため、tMDH-NADPH複合体およびEX7-NADPH複合体、そしてEX7-NADH複合体のX線結晶構造解析を行った。さらに、葉緑体MDHやEX7のNADP(H)依存性を決定付けているアミノ酸配列を他のNAD(H)依存酵素への適用することが可能かどうかを調べるため、乳酸脱水素酵素(Lactate Dehydrogenase, LDH)へそのアミノ酸配列を導入し補酵素特異性の変換について解析した。

## 1. tMDH-NADPH複合体における補酵素結合様式<sup>1</sup>

tMDHはNAD(H)を補酵素として利用する一方で、少し高濃度の添加を必要とするもののNADP(H)も補酵素として利用することができる。tMDHの補酵素特異性について更なる知見を得るためにtMDH-NADPH、tMDH-NADP<sup>+</sup>複合体の結晶構造解析を行った。100 mM Tris-HCl (pH8.0-9.0)、20-25% PEG 4000 の条件下において0.4 x 0.2 x 0.2 mmのサイズのtMDHの柱状結晶を得た。同結晶に1 mM NADPHまたは1 mM NADP<sup>+</sup>を一晩ソーキングした後、クライオ条件(-173 °C)において回折データの収集を行った。それぞれ1.65、2.08Å分解能のデータセットを収集し、tMDH-NADH複合体の立体構造をサーチモデルとして分子置換法により位相を決定し、構造を精密化した後、最終構造を得た。全体構造は既に構造が決定されているtMDH-NADHとほぼ同一であったが、予想外なことにNADP(H)は通常とは逆の方向、すなわちアデニン部分が活性中心の近くに、そしてニコチンアミド部分がtMDH-NADH複合体においてアデニン部分が結合していた部位に向けて結合していた(図1)。これは、NADP(H)が分子内に擬対称性をもつことが原因となっている。この逆位型複合体が結晶中のartifactか否かを確かめるため、結晶作製条件に近い高濃度のNADP<sup>+</sup>を用いて反応を行ったところNADP<sup>+</sup>に対して2.61 mMの*K<sub>i</sub>*で阻害が観察された。このことからNADP(H)は高濃度ではtMDHに逆位に結合し、阻害剤として働くことが示された。また、NAD<sup>+</sup>の場合もより高濃度域ではあるがtMDHが阻害されたことから、NAD(H)も逆位に結合し、阻害剤として働く可能性が示された。これは、今までに知られていなかった補酵素濃度による活性(代謝)調節の存在を示唆する新しい発見といえる。

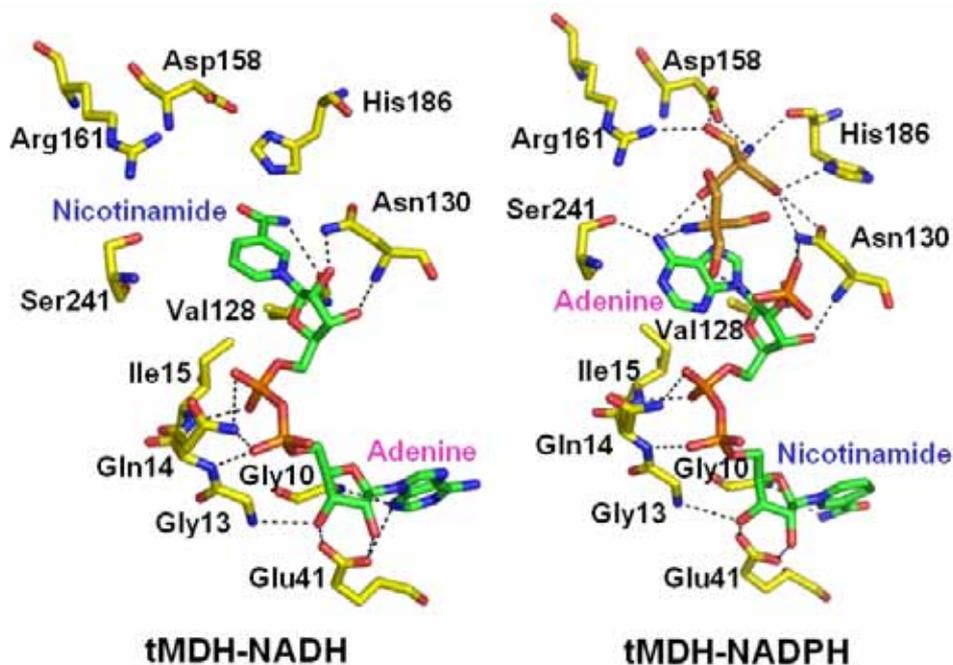


図1. tMDH-NADH 複合体と tMDH-NADPH 複合体の補酵素結合様式の比較

## 2. tMDH の補酵素特異性変換体 EX7 の補酵素特異性変換機構

100 mM Tris-HCl(pH8.0-9.0)、20-25% PEG4000、1 mM DTT の条件下において 0.30 x 0.15 x 0.15 mm のサイズの EX7 の柱状結晶を得た。得られた結晶に 1 mM NADPH または 1 mM NADH を一晩ソーキングした後、クライオ条件において回折データの収集を行った。それぞれ 2.00Å 分解能のデータセットを収集し、tMDH-NADH 複合体の立体構造をサーチモデルとして分子置換法により位相を決定し、構造を精密化した後、最終構造を得た。

EX7-NADPH 複合体中の中で、置換された Ser42 と Ser45 が NADPH の 2'-リン酸基と水素結合を形成していた。特に Ser42 は結合距離 2.5Å の短い水素結合を形成しており、部分的に共有結合性を持つと考えられた。さらに、Gly10 と Gly12 は水分子を介した水素結合により、2'-リン酸基を安定化していた。しかし、NADPH のアデニン部分の電子密度が観察されなかったことからこの部分が複合体中で揺らいでおり、酵素によって認識されていないと考えられた。その一方で、シュミレーションにおいて NADPH の 2'-リン酸基とイオン結合すると予想された Arg44 の側鎖は電子密度マップ中に電子密度が観察されなかった。しかしながら、同残基は NADP(H)依存 MDH(葉緑体 MDH)の間で保存されていることや、Arg44 をもたない変異体 EX3(Glu41Gly/Ile42Ser/Ala45Ser)が NADPH に対する親和性が大きく低下していることから、2'-リン酸基の安定化に寄与すると考えられた。そこで、実際に EX7 から Arg44 を野生型の Gln44 へ戻した変異体 EX6 を作製し、解析したところ EX7 に比べて NADPH に対する親和性が低下した。また、EX3 に Arg44 を導入した変異体 EX4 を作製し、解析したところ NADPH に対する親和性の上昇が見られた。このことから、結晶構造中では Arg44 の側鎖は様々なコンフォメーションを持ちながら、NADPH の 2'-リン酸基とイオン結合をしていると考えられた。これらの結果から、EX7 において NADPH の 2'-リン酸基は i) Glu41Gly による立体障害および電荷の反発の解消、ii) Ser42 による強い水素結合を含めた多数の水素結合、iii) Arg44 とのイオン結合、によって安定化されていると考えられた。一方、*Flaveria bidentis* 由来の葉緑体 MDH の NADPH との複合体の結晶構造が Carr らによって決定されている。この複合体において、NADPH の 2'-リン酸基は Ser81 と Ser84 と水素結合を形成し、安定化されていた。しかし、EX7-NADPH で見られた短い水素結合や

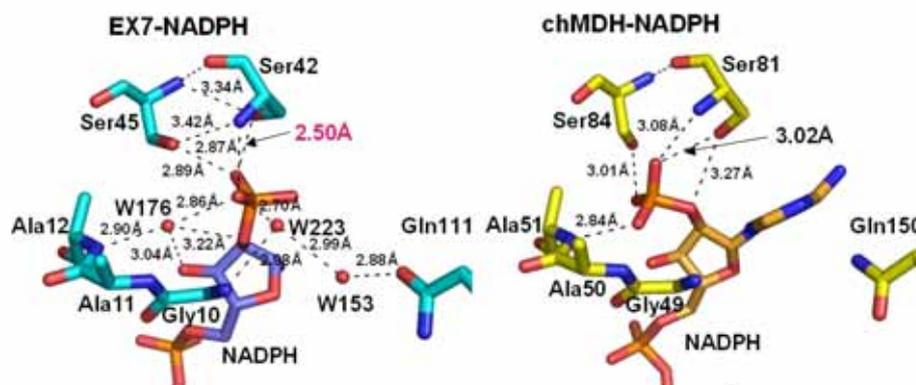


図 2. EX7-NADPH 複合体と葉緑体 MDH-NADPH 複合体の 2'-リン酸基結合サイトの比較

水分子を介した水素結合は見られず、その代わりにアデニン部分が認識されている(図 2)。これらのことから葉緑体 MDH では EX7 と異なり、2'-リン酸基に加え、アデニン部分も認識することで NADPH の安定化を行っていると考えられた。これらの結果、EX7 の NADPH の 2'-リン酸基を安定化する大まかな機構は Ser42、Arg44、Ser45 を中心としたアミノ酸残基が関わるという点で大まかには葉緑体 MDH のものと同様であるが、詳細な点においては両者は異なる機構で 2'-リン酸基を安定化していることが明らかとなった。

### 3. 葉緑体 MDH の補酵素特異性決定配列の *T. thermophilus* HB27 株由来 LDH への導入

EX7 と補酵素との複合体の結晶構造解析の結果から EX7 では葉緑体 MDH とは異なり、NADPH の 2'-リン酸のみを強力に認識し、アデニン部分の認識を必ずしも必要としないことが明らかとなった。そこで、葉緑体 MDH から EX7 へ導入された 7 アミノ酸からなるループ領域が別の NAD(H) 依存性酵素の補酵素特異性の変換にも適用できないかと考えた。幾つかの NAD(H) 依存性酵素の立体構造情報を検討し、ループを導入できる可能性があるものとして LDH およびグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) を選び、先のループ領域のアミノ酸配列を組み込んだそれぞれの酵素遺伝子 (LDH-EX7、GAPDH-EX7) を作製した。そのうち、GAPDH-EX7 はどのような検討を行っても不溶性タンパク質として大腸菌体内に蓄積したことから、以降は対象を LDH-EX7 に絞り研究を行った。野生型 LDH において、NADH は NADPH に比べて 130 倍も高い触媒効率を持つのに対して、LDH-EX7 は約 4 倍の触媒効率で NADPH の方をよく認識することがわかった。今回の LDH を用いた変異導入においては、MDH で見られたような完全な NADP(H) 型酵素への変換には至らなかったが、導入された変異の効果はこれまで LDH で試された変異のどれよりも優れており、補酵素特異性を NAD(H) から NADP(H) に変換するに当たり MDH の NADPH 認識機構の一部を導入することの有効性が示されたといえる。NAD(H) 依存性の *Bacillus stearothermophilus* 由来の LDH の立体構造をテンプレートとした分子シュミレーションにより LDH-NADH 複合体、LDH-EX7-NADPH 複合体の立体構造のモデルを作製したところ、LDH は MDH の場合と同様に Asp52 が NADH のアデニンリボースを認識しているのに対して、LDH-EX7 では Ser53 と NADPH の 2'-リン酸基が水素結合を形成していた。しかし、EX7 においての 2'-リン酸基の認識に重要であった Arg44 と Ser45 に対応する Arg55 と Ser56 は 2'-リン酸基と結合するには離れすぎた位置に存在しており、これらは 2'-リン酸基の認識には関与していない可能性が考えられた。更なる NADPH への特異性の向上を目指すには 2'-リン酸基に近接したアミノ酸残基を 2'-リン酸基とイオン結合、水素結合しうるアミノ酸残基を導入することが有効であると考えられた。

(参考文献)

1. Tomita, T., Fushinobu, S., Kuzuyama, T., and Nishiyama, M. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334**, 613-618.