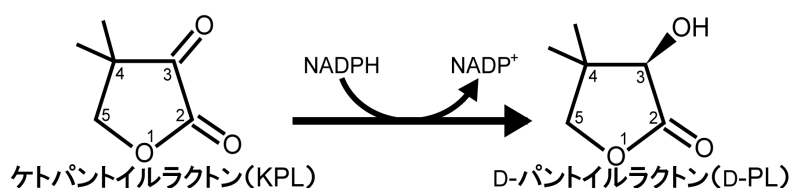


論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻
平成 19 年度博士課程 進学
氏名 山村 昭裕
指導教員名 田之倉 優

論文題目 D-パントイルラクトン合成酵素 CPR-C1 および CPR-C2 の X 線結晶構造解析

CPR (Conjugated polyketone reductase、共役ポリケトン還元酵素)-C1 および CPR-C2 は、ともに NADPH 依存的にケトパントイルラクトン (KPL) の 3 位のカルボニル酸素を不斉還元し、D-パントイルラクトン (D-PL) を生成する反応を触媒する。両酵素は、ほぼ同程度の KPL 還元活性を有していることが分かっている[1]。



CPR-C1 と CPR-C2 はそれぞれ 304、307 アミノ酸残基からなり、相互に 43% の配列相同性を有する。アミノ酸配列より共に Aldo-keto reductase (AKR) スーパーファミリーに属することが示唆されているが、AKR スーパーファミリーにおいてアミノ酸配列によって定義される既存のいずれのファミリーにも属さない。さらに、両酵素はメナジオン、*p*-ニトロベンズアルデヒド、3-アルデヒドピリジン、4-クロロアセト酢酸エチルといった、AKR スーパーファミリーに属する酵素の多くによって還元される非共役ケトンおよびアルデヒドを基質としない。一方で、KPL を立体選択的に還元する AKR スーパーファミリータンパク質は見つかっていないため、両酵素は他の AKR スーパーファミリータンパク質とは異なる基質認識機構を持っていると考えられる。

D-PL は、医薬品、化粧品の原料や、食品・飼料添加物などとして広く用いられている D-パントテン酸 (ビタミン B5)、D-パンテノール、D-パンテテインなどを化学合成する際の重要なキラルビルディングブロックであるため、両酵素の D-PL 工業生産への応用が期待されている。NAD(P)H 依存性

酵素を工業利用する際には、 NAD(P)^+ 依存性脱水素酵素による酵素反応と共役させて NAD(P)H を再生させる。とりわけギ酸脱水素酵素を用いた NADH 再生系は副産物を生じないため、グルコース脱水素酵素を用いた NADPH 再生系よりも工業利用に適しているが、**CPR-C1** と **CPR-C2** は NADH を補酵素としたときの活性が NADPH を補酵素としたときの 20 分の 1 にまで低下するため、 NADH 再生系を用いることができない。

CPR-C1 および **CPR-C2** が共通に有している NADPH を特異的に要求する機構、**KPL** を立体選択的に還元する機構を構造学的に解明することで、工業利用可能な NADH 依存性 **D-PL** 合成酵素改変体を作製するための基盤情報を得ることができる。そこで、本研究では **CPR-C1** および **CPR-C2** の X 線結晶構造解析、 NADPH 認識機構の解析および他の **AKR** スーパーファミリータンパク質との構造比較を行った。

1. apo 型 **CPR-C2** の X 線結晶構造解析

CPR-C2 の N 末端側に $6 \times \text{His}$ タグとそれを切断するための **thrombin** プロテアーゼ認識配列を組み込んだコンストラクトを作製した。大腸菌発現系で大量発現させ、**Ni** アフィニティークロマトグラフィーとゲルろ過により精製を行った。ゲルろ過の結果より、**CPR-C2** は溶液中で単量体であることが示唆された。 NADPH を含まない条件で結晶化を行ったところ、**PEG3350** を沈殿剤として用いた条件で $0.06 \times 0.06 \times 0.8 \text{ mm}$ の棒状の結晶が得られた。X 線回折実験は高エネルギー加速器研究機構放射光実験施設のビームライン **AR-NW12A** にて行い、最高分解能 1.7 \AA の X 線回折データを得た。結晶の空間群は $P2_12_12_1$ 、格子定数は $a = 55.02 \text{ \AA}$ 、 $b = 68.30 \text{ \AA}$ 、 $c = 68.93 \text{ \AA}$ であった。この X 線回折データを用い、**PDB ID 1VP5** をモデル分子とした分子置換法により apo 型 **CPR-C2** の X 線結晶構造を決定した(図 1)。



図 1. apo 型 **CPR-C2** の X 線結晶構造

2. NADPH 結合型 **CPR-C2** の X 線結晶構造解析

CPR-C2 を大腸菌発現系で大量発現させ、**Ni** アフィニティークロマトグラフィー精製後に **thrombin** により $6 \times \text{His}$ タグを切断し、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過により精製した。**CPR-C2** と NADPH をモル比 1:4 で混合した溶液を結晶化に用いたところ、**PEG3350** を沈殿剤として用いた条件で $0.3 \times 0.1 \times 0.02 \text{ mm}$ の板状の結晶が得られた。X 線回折実験は高エネルギー加速器研究機構放射光実験施設のビームライン **AR-NE3A** にて行い、最高分解能 1.8 \AA の X 線回折データを得た。結晶の空間群は $P2_1$ 、格子定数は $a = 46.21 \text{ \AA}$ 、 $b = 127.45 \text{ \AA}$ 、 $c = 46.44 \text{ \AA}$ 、 $\beta = 108.99^\circ$ であった。この X 線回折データを用い、分子置換法により NADPH 結合型 **CPR-C2** の X 線結晶構造を

決定した。

CPR-C2 の apo 型と NADPH 結合型とを構造比較したところ、CPR-C2 は NADPH 結合に伴い Thr25–Val38 の領域で構造が大きく変化し、その結果基質結合部位が生じることが分かった。この構造変化には、Thr27 と Lys28 による NADPH 認識が関与していた(図 2)。Thr27 の側鎖は、apo 型では基質結合ポケット内部を向いていたが、NADPH 結合型では NADPH のニコチンアミドモノヌクレオチドの 5'-リン酸基と水素結合を形成していた。その結果、後者では基質結合ポケットが open 状態となることが示された。Thr27 のアラニン置換体では活性が大きく低下したことから、Thr27 の側鎖による NADPH 認識が活性に重要であることが支持された。一方 NADPH 結合型 CPR-C2 では、Lys28 の側鎖のアミノ基と NADPH のアデノシンの 2'-リン酸基が静電的に相互作用していた。この Lys28 側鎖の存在が、CPR-C2 が NADPH を特異的に要求する一因になっていると考えられる。

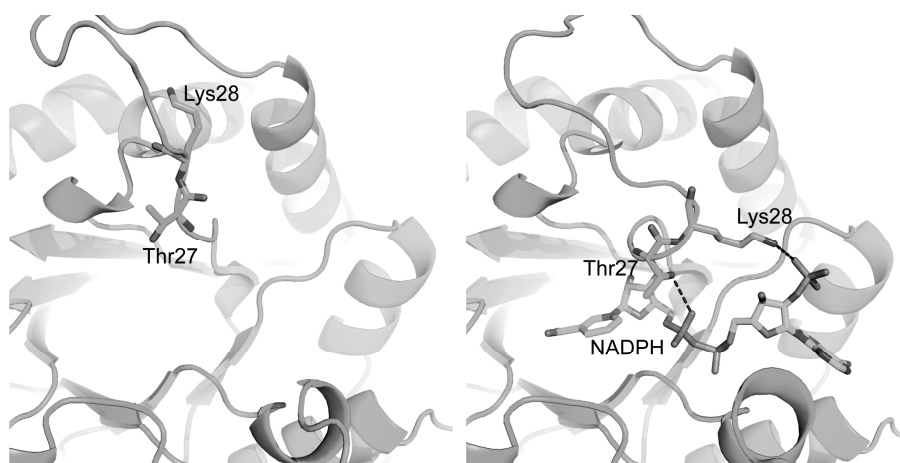


図 2. CPR-C2 の NADPH 結合部位 (左)apo 型 (右)NADPH 結合型

3. NADPH 結合型 CPR-C1 の X 線結晶構造解析

CPR-C1 の N 末端側に 6×His タグとそれを切断するための thrombin プロテアーゼ認識配列を組み込んだコンストラクトを作製した。大腸菌発現系で大量発現させ、Ni アフィニティークロマトグラフィー、thrombin による 6×His タグの切断、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過により精製を行った。ゲルろ過の結果より、CPR-C1 は溶液中で単量体であることが示唆された。NADPH を含まない条件では結晶が得られなかったため、CPR-C1 と NADPH をモル比 1:10 で混合した溶液を結晶化に用いたところ、PEG3350 を沈殿剤として用いた条件で 0.05 × 0.12 × 0.3 mm の棒状の結晶が得られた。X 線回折実験は高エネルギー加速器研究機構放射光実験施設のビームライン AR-NW12A にて行い、最高分解能 2.2 Å の X 線回折データを得た。結晶の空間群は $P2_1$ 、格子定数は $a = 59.07 \text{ \AA}$ 、 $b = 84.93 \text{ \AA}$ 、 $c = 136.16 \text{ \AA}$ 、 $\beta = 96.17^\circ$ であった。この X 線回折データを用い、分子置換法により NADPH 結合型 CPR-C1 の X 線結晶構造を決定した。得られた X 線結晶構造から、CPR-C1 も CPR-C2 と同様の機構で Thr25、Lys26 により NADPH を認識していることが示された。

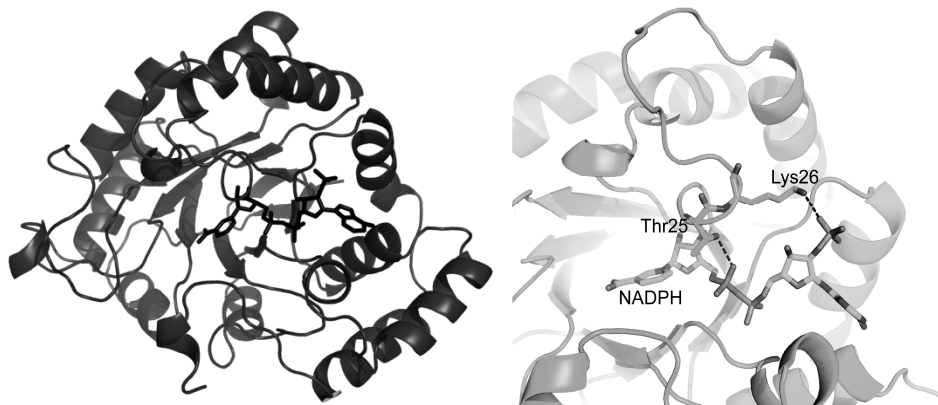


図 3. (左)CPR-C1 の全体構造 (右)CPR-C1 の NADPH 結合部位

4. CPR-C1 と CPR-C2 の基質結合部位

基質との複合体構造が決定されている AKR スーパーファミリータンパク質との構造重ね合わせにより、CPR-C1 および CPR-C2 の基質結合部位を類推した。その結果、CPR-C1 では Phe28、Phe126、Phe296、CPR-C2 では Lys30、Phe299、Phe300 が、疎水性に富む基質結合ポケットを形成していると推測された。このような疎水性に富む基質結合ポケットは、他の AKR スーパーファミリータンパク質でも見られた。また、KPL の 2 位のカルボニル酸素は CPR-C1 の Thr25、CPR-C2 の Thr27 の主鎖の N との水素結合により認識されていることが示唆された。この水素結合により KPL の結合の向きが制限されるため、結果的に KPL の立体選択的な還元が可能になっていると考えられる。この特徴は他の AKR スーパーファミリータンパク質では見られなかったため、CPR-C1 と CPR-C2 に特徴的な KPL の立体選択的な還元 of 構造要因であることが示唆された。

5. まとめ

本研究では、D-PL 合成酵素 CPR-C1 および CPR-C2 の X 線結晶構造を決定した。両酵素とも他の AKR スーパーファミリータンパク質に類似した全体構造を有していたが、Thr、Lys による NADPH 認識とそれに伴う Thr25-Val38 の構造変化は両酵素に特徴的なものであった。この特徴が、両酵素の高い NADPH 要求性と、KPL の立体選択的な還元 of 構造要因であることが明らかとなった。

本研究の結果から、両酵素を NADH 要求性に変換するために、CPR-C1 の Lys26 や CPR-C2 の Lys28 による NADPH のアデノシンの 2'-リン酸基認識がなくても、NADH との結合能が保持される変異体を構築する必要があることが示された。本研究で得られた知見は、高活性型 NADH 依存性 D-PL 合成酵素の創製に役立つと期待される。

参考文献

1. Hidalgo, A. R. *et al.* Isolation and primary structural analysis of two conjugated polyketone reductases from *Candida parapsilosis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 2785–2788 (2001).