

X 線構造解析に基づく超好熱性古細菌由来アスパラギン酸ラセマーゼの 反応機構の解明

大滝証、中野陽介、飯塚怜、荒川孝俊、尾高雅文、養王田正文

東京農工大学大学院 工学府 生命工学専攻

email;akashi78@cc.tuat.ac.jp

D-アミノ酸は様々な生体内に存在し、機能している。これら D-アミノ酸の生合成を担っているアミノ酸ラセマーゼは、その反応機構によりピリドキサルリン酸依存型と非依存型に分類される。これらアミノ酸ラセマーゼのうち、ピリドキサルリン酸 (PLP) 非依存型の反応機構は解明されていない。これまでに、我々は超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来 PLP 非依存型アスパラギン酸ラセマーゼ (PhAspR) について X 線結晶解析を行い、2 つの Cys 残基を活性中心とする反応機構モデルを提唱している。今回、我々はより詳細な反応機構に関する知見を得るために PhAspR の阻害剤を同定し、その阻害剤との複合体の構造を X 線結晶解析により決定した。

クエン酸は PhAspR の基質である L-アスパラギン酸 (L-Asp) と D-アスパラギン酸 (D-Asp) の構造を含んでおり、PhAspR の阻害剤として働くと考えられた (図 1)。そこで、PhAspR の基質である L-アスパラギン酸とクエン酸を混在させ活性測定を行ない、その阻害効果について検討を行なった。活性測定の結果、 K_i 値は 7.4 mM と弱いながらもクエン酸は競合的に活性を阻害することが明らかとなった。

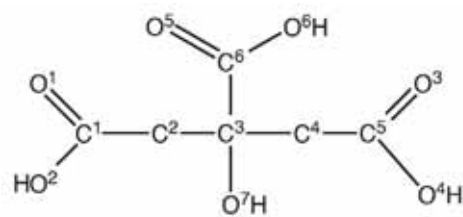


図 1. クエン酸の化学構造式

次にこのクエン酸との複合体の X 線結晶解析を行った。複合体の結晶化は、触媒残基の 1 つである Cys82 を Ala に置換した不活性型 PhAspR とクエン酸との共結晶化法にて行い、2.0 Å 分解能で構造を決定した。得られた構造において活性部位には阻害剤であるクエン酸の電子密度が明瞭に確認された (図 2)。活性部位に結合したクエン酸の構造は、PhAspR の基質である L-Asp と D-Asp が混在した擬似的な基質複合体であることを示していた。

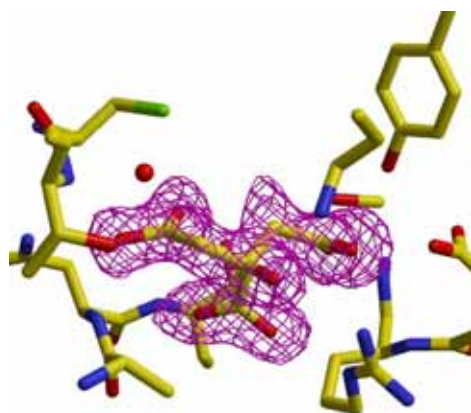


図 2. 活性部位に結合したクエン酸
に対する電子密度図

得られた構造は、阻害剤の結合に伴い活性部位近傍の構造が劇的に変化しており、活性部位は完全にふさがった Close 型の構造をしていた(図 3)。これにより、触媒残基である Cys194 を含むループ領域が阻害剤の方へ動いており、活性型の構造へと変化していると考えられた。

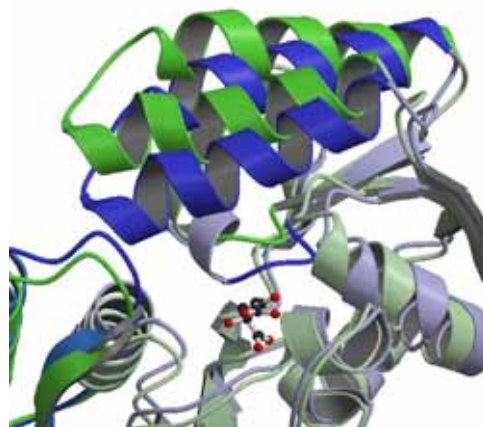


図 3.野生型 PhAspR (緑)と複合体(青)の活性部位近傍の構造の重ね合せ図

活性部位に結合したクエン酸はアミノ酸ラセマーゼ間で保存された残基と相互作用しており、PhAspR の L-/D-Asp の基質認識に関する知見が得られた (図 4)。特に Arg48、Lys164 は基質であるアスパラギン酸の主鎖骨格のアミノ基、カルボニル基を認識していると考えられ、これら 2 つの残基は L-/D-Asp の両基質に対して重要であると考えられる。これは、これら 2 つの残基を他のアミノ酸に置換した変異体では活性が劇的に低下することから、生化学的にも裏付けられている。

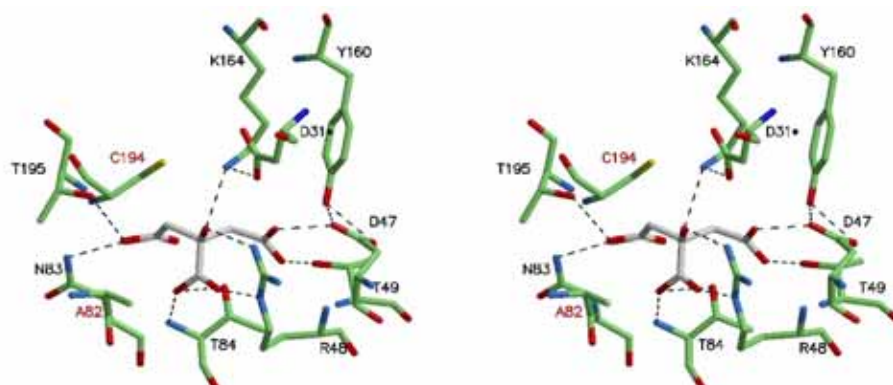


図 4. 阻害剤複合体の活性部位の構造 (ステレオ図)。結合したクエン酸をグレーで、水素結合を点線で示した。クエン酸の左側が D-Asp、右側が L-Asp 結合様式を示すと考えられる。

また、活性部位に結合したクエン酸の構造から PhAspR の反応機構について興味深い知見が得られた。得られた構造から、活性部位に結合した L-、D-Asp はいずれの場合においても、Ca原子のプロトンは触媒残基である Cys194 の方を向いていると考えられた。そのため、L-、D-Asp のいずれの基質においても、Ca原子からプロトンを引き抜くのは常に Cys194 であり、もう 1 つの触媒残基である Cys82 が逆側からプロトンを付加することでラセミ化が行われると考えられた。これは基質に応じて触媒残基である Cys 残基の役割が異なるという従来提唱されている反応機構とは異なる可能性を示唆していた。