

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770085
 研究課題名（和文）
 希少糖生産酵素の構造・機能解析と生産効率の向上を目指した分子設計
 研究課題名（英文） Crystal structure analysis of rare sugar producible enzymes for their effective production by protein engineering
 研究代表者
 吉田 裕美（YOSHIDA HIROMI）
 香川大学・総合生命科学研究センター・准教授
 研究者番号：10313305

研究成果の概要：天然には微量にしか存在しない「希少糖」は糖としての食品分野への応用だけでなく医療分野においても希少糖の利用価値が期待されている。本研究は「希少糖」の生産に利用される酵素のより効率的な生産を目指した分子設計に有用な情報を得ることを目的に、希少糖生産酵素の構造・機能解析を行った。本研究において、*Pseudomonas stutzeri* 由来 L-ラムノースイソメラーゼについては変異酵素を触媒機構に関する詳細な情報が得られ、*Pseudomonas cichorii* 由来 D-タガトース 3-エピメラーゼと *Bacillus pallidus* 由来 D-アラビノースイソメラーゼの構造を新たに決定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

研究分野：タンパク質工学、構造生物学

科研費の分科・細目：生物学、構造生物化学

キーワード：X線結晶解析、糖異性化酵素、L-ラムノースイソメラーゼ、D-タガトースエピメラーゼ、D-アラビノースイソメラーゼ、希少糖、放射光、部位特異的変異

1. 研究開始当初の背景

(1) ラムノースイソメラーゼ (L-rhamnose isomerase: L-RhI) は金属イオン存在下でL-ラムノースからL-ラムヌロースへの異性化を可逆的に触媒する酵素であり、数種の微生物においてその存在が確認されていた。*Pseudomonas stutzeri* 由来 L-RhI (*P. stutzeri* L-RhI) はL-ラムノースとL-ラムヌロース間の異性化だけではなく、D-プシコ

ースやD-アロースをはじめ、天然には微量にしか存在しない糖、「希少糖」の異性化反応をも触媒するなど、幅広い基質特異性を示す酵素として位置づけられていた。

(2) 希少糖の生産に関する研究は、香川大学の農学部において、また同大学医学部の協力体制のもと、希少糖の生理活性を探索する研究が展開されていた。希少糖の興味深い生理活性として、これまでにD-アロースの虚血保

護作用、D-ブシコースのインシュリン分泌作用や動脈硬化防止作用などが見出され、糖としての食品分野への応用だけではなく医療分野においても希少糖の利用価値が期待されている。希少糖研究センターでは希少糖の大量生産を目指し、自然界に大量に存在する「天然型単糖」から種々の希少糖を生産するプロセスを開発した。そのプロセスの中で、実用化されているのは *Pseudomonas cichorii* 由来 D-タガトース-3-エピメラーゼ (D-tagatose-3-epimerase: D-TE) を使って自然界に多く存在する D-フラクトースを希少糖 D-ブシコースに変換し、次に *P. stutzeri* L-RhI により D-ブシコースから D-アロースに変換するプロセスである。希少糖の生産に関わるこれらの酵素 L-RhI と D-TE の大腸菌での大量発現系が確立され、キャラクター化が進められてきた一方、両酵素の三次元構造は決定されておらず、*P. stutzeri* L-RhI の基質特異性の広さについて構造情報をもとにした機能・構造の相関関係が明らかにされていなかった。本研究の申請直前に *P. stutzeri* L-RhI の結晶化および構造決定に成功し、希少糖生産酵素の構造・機能解析研究を着手するにいたった。

2. 研究の目的

(1) これまでの研究の成果ならびに *P. stutzeri* L-RhI の X線結晶解析の結果をもとに、より効率的な希少糖の生産を目指した変異酵素の分子設計、蛋白質工学的アプローチによる改変を行い、さらに、他の希少糖生産に関与する希少糖生産酵素の X線結晶解析を進め、多くの希少糖生産に有用な構造情報を得ることを目的とした。

(2) L-RhI としての構造解析の報告は大腸菌 L-RhI と *P. stutzeri* L-RhI の 2 酵素のみであり、数々の研究報告がされてきた D-キシロースイソメラーゼ (D-xylose isomerase: D-XI) と多くの点で類似性が見られているが、L-RhI の糖の開環メカニズムは D-XI の開環メカニズムとは異なる可能性が示唆されている。L-RhI の応用を目指したアプローチだけではなく、本酵素機能のメカニズムの解明を進めていく上でも、金属イオンを取り除いた不活性型酵素や種々のリガンドと金属イオン種の異なる複合体など、幅を広げた L-RhI の構造解析を行ない、開環メカニズムの解明の手がかりとなる研究を行う。

3. 研究の方法

(1) *P. stutzeri* L-RhI 変異酵素の作製

① 基質認識部位の改変

構造を決定した *P. stutzeri* L-RhI の解析結果をもとに、基質認識へ影響を及ぼす残基として Ser329 に着目し、これを Phe 残基 (*E. coli* L-RhI 型)、Lys 残基 (*A. missouriensis* D-XI 型)、側鎖の影響を考慮したその他の疎水性残基に置換した変異酵素を作製した。

② 触媒残基の改変

L-RhI の金属イオンの結合に関与する残基、または触媒機構に関与する残基を改変した変異酵素を作成した。

(2) *P. stutzeri* L-RhI 変異酵素の評価
構築した変異酵素の活性測定を行うことによって変異残基の活性への影響を調べ、基質複合体の X線結晶解析を行うことにより、構造機能解析の評価を行った。

(3) 新たな希少糖生産酵素の構造解析
Pseudomonas cichorii 由来 D-tagatose-3-epimerase (D-TE) と *Bacillus pallidus* 由来 D-arabinose isomerase (D-AI) の結晶化と構造解析を行った。

4. 研究成果

(1) Ser329 に関する変異酵素
構造解析結果をもとに、活性部位近傍で基質認識に関与すると考えられるアミノ酸残基 Ser329 に着目し、Phe、Lys、Leu に置換した変異酵素を作製し、活性測定および X線結晶解析を行った。Ser329 は触媒反応機構に直接関与する残基ではなかったが、これらの置換残基は L-ラムノースに対する酵素活性を低下させた。しかし、Ser329Lys では D-アロースに対する活性の低下は抑えられ、構造解析からは Lys 残基は D-アロースと新たな相互作用を形成し、基質を安定に保持していることが示された。Ser329 は側鎖の種類によって基質特異性に影響を与える重要な位置にある残基であると考えられた。

Ser329 変異酵素 (Ser329Phe, Ser329Leu, Ser329Lys) の基質複合体の結晶解析を進めていくなかで、分解能が向上したデータが得られた。分解能が向上した変異酵素の解析を進めることにより、これまでの分解能の野生型酵素では見えなかった C 末端領域の電子密度が得られた。L-RhI の C 末端領域は柔軟に動いて隣の分子の活性部位に蓋をする、もしくは自分自身の分子の活性部位に蓋をする可能性が示唆された。*P. stutzeri* L-RhI における C 末端領域は基質結合に伴って活性部位に近づき、酵素・基質複合体を安定化させていることが予想された。この C 末端領域が金属イオン依存性 *P. stutzeri* L-RhI の触媒反応機構に影響を及ぼすかは不明であるが、C 末端領域の有無を調べることにより L-RhI

の安定性を含めた総合的な理解ができると考えている。

(2) 糖環の開環機構に関与する変異酵素の構築

分解能が向上した Ser329Phe の基質複合体構造において、これまでには見られなかった基質である糖が環状構造をとっていると考えられる電子密度が見られた。この結果をもとに、糖環の開環機構に関わるアミノ酸残基を推定し、新たな変異酵素を構築したところ、酵素活性を失い、環状構造の基質が活性部位にとどまる基質複合体構造が得られた。

L-RhI の基質の開環機構に関わる報告例はこれまでにないことから、この変異酵素の詳細な解析を続けることにより、L-RhI の基質開環機構を解明できるのではないかと考えている。

(3) 新たな希少糖生産酵素の構造解析

希少糖生産酵素の触媒反応機構を広く理解するためには、その他の希少糖生産酵素の構造情報の蓄積も必要である。新たな希少糖生産酵素の結晶化と構造解析を進めた。

① D-TE

P. cichorii D-TE は天然に大量に存在する D-フルクトースから希少糖 D-ブシコースを生産する希少糖生産酵素として実用化されている。昨年度は、D-TE の X 線結晶解析を行い、活性部位に金属イオンが 1 つ含まれる金属イオンを含む希少糖生産酵素であることを明らかにした。基質となる D-タガトースおよび D-フルクトースが結合した複合体構造を報告し、*P. cichorii* D-TE が D-フルクトースをも認識する活性部位の構造を詳細に示した (Yoshida *et al.*, (2007) *J. Mol. Biol.*, 374(2), 443-453)。また、基質認識に影響を及ぼすと考えられた残基を置換した変異酵素を構築することにより、Cys66 が D-タガトースの基質認識に重要であることを報告した (XXIV International Carbohydrate Symposium, Oslo, 2008)。

② D-AI

希少糖生産酵素の触媒反応機構をより詳細に調べるため、新たな希少糖生産酵素としてマンガン存在下で活性が向上する *Bacillus pallidus* D-AI の結晶化および構造解析を行った。結晶化については論文にて報告し

(Takeda *et al.*, (2008) *Acta Crystallogr F* 64(10), 589-592)、構造解析については学会において発表した (XXI Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, Osaka, 2008)

(4) 希少糖の結晶化と構造決定 D-altrose

希少糖生産酵素を多角的に理解することを目的に、*B. pallidus* D-AI の基質ともなる希少糖 D-altrose の結晶化および構造解析を行った。結晶構造データについては既に Cambridge Structural Database に登録し報告した (Watanabe *et al.*, (2009) *Acta Crystallogr E* 65, o280)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Yuji Watanabe, Hiromi Yoshida, Kosei Takeda, Tomohiko Ishii and Shigehiro Kamitori, “ β -D-Altrose”, *Acta Crystallogr E* 65, o280, (2009), 査読有
- ② Kosei Takeda, Hiromi Yoshida, Goro Takada, Ken Izumori and Shigehiro Kamitori, “Overexpression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystal analysis of *Bacillus pallidus* D-arabinose isomerase”, *Acta Crystallogr F* 64(10), 589-592, (2008), 査読有
- ③ Hiromi Yoshida, Mitsugu Yamada, Takeyori Nishitani, Goro Takada, Ken Izumori and Shigehiro Kamitori, “Crystal structures of D-tagatose 3-epimerase from *Pseudomonas cichorii* and its complexes with D-tagatose and D-fructose. *J. Mol. Biol.*, 374(2), 443-453, (2007), 査読有
- ④ Hiromi Yoshida, Mitsugu Yamada, Takeyori Nishitani, Goro Takada, Ken Izumori and Shigehiro Kamitori, (2007). “Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of D-tagatose 3-epimerase from *Pseudomonas cichorii*.” *Acta Crystallogr. F* 63, 123-125, (2007), 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① 吉田裕美, 武田耕青, 何森健, 神鳥成弘, 「変異酵素の結晶解析に基づく *Pseudomonas stutzeri* 由来 L-ラムノースイソメラーゼにおける C 末端領域の役割」2009 年度農芸化学学会大会, 2009 年 3 月 29 日, (福岡)
- ② Hiromi Yoshida, Mitsugu Yamada, Goro Takada, Ken Izumori and Shigehiro Kamitori, “Crystal structure of rare sugar producing enzyme, *Pseudomonas*

- stutzeri* L-rhamnose isomerase and its catalytic mechanism”, February 13, 2009, 38th National Seminar on Crystallography (Mysore, India)
- ③ 吉田裕美, 渡部優史, 武田耕青, 石井知彦, 何森健, 神鳥成弘, 「*Pseudomonas stutzeri* L-ラムノースイソメラーゼの触媒反応機構に關与するアミノ酸残基改変型酵素のX線結晶構造解析」第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会, 2008年12月11日(神戸)
- ④ Kosei Takeda, Hiromi Yoshida, Kenji Morimoto, Goro Takada, Ken Izumori and Shigehiro Kamitori, “X-ray structure of D-arabinose isomerase from *Bacillus pallidus*”, November 21, 2008, Rare Sugar Congress 2008 (Takamatsu, Japan)
- ⑤ Yuji Watanabe, Kosei Takeda, Hiromi Yoshida, Tomohiko Ishii, Goro Takada, Ken Izumori and Shigehiro Kamitori, “Crystal structures of rare sugars”, November 21, 2008, Rare Sugar Congress 2008 (Takamatsu, Japan)
- ⑥ Kosei Takeda, Hiromi Yoshida, Goro Takada, Ken Izumori and Shigehiro Kamitori, “Crystallization and preliminary X-ray analysis of D-arabinose isomerase from *Bacillus pallidus*”, August 28-29, 2008, XXI Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (Osaka, Japan)
- ⑦ Hiromi Yoshida, Kosei Takeda, Goro Takada, Ken Izumori and Shigehiro Kamitori, “The role of Cys66 of D-tagatose 3-epimerase from *Pseudomonas cichorii* on the basis of the crystal structure and its site-directed mutagenesis study”, July 29, 2008, XXIV International Carbohydrate Symposium (Oslo, Norway)
- ⑧ 吉田裕美, 武田耕青, 高田悟郎, 何森健, 神鳥成弘, 「X線結晶解析に基づく *Pseudomonas stutzeri* 由来L-ラムノースイソメラーゼにおけるSer329の基質認識への影響」2008年度農芸化学会大会, 2008年3月28日, (名古屋)
- ⑨ 吉田裕美, 武田耕青, 高田悟郎, 何森健, 神鳥成弘, 「*Pseudomonas stutzeri* L-ラムノースイソメラーゼ変異酵素S329Fの構造解析と基質結合様式」第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会, 2007年12月11日(横浜)
- ⑩ 吉田裕美, 武田耕青, 高田悟郎, 何森健, 神鳥成弘, 「土壌菌D-タガトースエピメラーゼの構造と触媒反応機構」2007年度酵素・補酵素研究会, 2007年11月9日(倉敷)
- ⑪ Kosei Takeda, Hiromi Yoshida, Goro Takada, Ken Izumori Tomohiko Ishii and Shigehiro Kamitori, “Substrate-recognition mechanism of *Pseudomonas stutzeri* L-rhamnose isomerase based on X-ray structures and site-directed mutagenesis”, September 11, 2007, 2nd International Symposium on Diffraction Structural Biology, (Tokyo, Japan)
- ⑫ Hiromi Yoshida, Masatsugu Yamaji, Mitsugu Yamada, Goro Takada, Ken Izumori Tomohiko Ishii and Shigehiro Kamitori, “The Role of Metal Ion on Active Site in *Pseudomonas stutzeri* L-Rhamnose Isomerase”, July 7-9, 2007, 32nd FEBS Congress Molecular Machine, (Vienna, Austria)

[その他]

ホームページ

<http://www.med.kagawa-u.ac.jp/~xraylab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 裕美 (YOSHIDA HIROMI)

香川大学・総合生命科学研究センター・准教授

研究者番号: 10313305