

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770113

研究課題名（和文） D-アスパラギン酸の合成と分解に関わる酵素の構造と機能

研究課題名（英文） Structure and function of enzymes involved with the synthesis or the degradation of D-aspartate.

研究代表者

後藤 勝 (GOTO MASARU)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：80379289

研究成果の概要（和文）：高等動物の神経内分泌系において、D-アスパラギン酸はホルモン物質の合成や分泌の調整という重要な役割を担っている。PLP 依存性アスパラギン酸ラセマーゼと FAD 依存性 D-アスパラギン酸オキシダーゼは、それぞれ D-アスパラギン酸の合成と分解に関わる酵素として知られている。これら 2 種類の酵素の基質特異性を明らかにするため、我々はアカガイ由来のアスパラギン酸ラセマーゼと酵母由来の D-アスパラギン酸オキシダーゼの野生型酵素の立体構造をそれぞれ 2.15 Å および 2.00 Å 分解能で決定した。

研究成果の概要（英文）：In the mammalian neuroendocrine system, D-aspartate plays important roles in the regulation of the synthesis and secretion of hormones. PLP-dependent aspartate racemase and FAD-dependent D-aspartate oxidase are the enzymes known to be responsible for the synthesis or the degradation of D-aspartate, respectively. To understand the substrate specificity of these two enzymes we have determined the structures of the following two wild-type enzymes: aspartate racemase from *Scapharca broughtonii* and D-aspartate oxidase from Yeast *Cryptococcus humicola* at 2.15 and 2.00 Å resolution, respectively.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：酵素

## 1. 研究開始当初の背景

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。研究開始当初には、*Science* 誌に D-アミノ酸がバクテリアの定常期における細胞壁の再構築に関わっており、D-アミノ酸の合成は環境の変化に適応するためのバクテリアの共通戦略なのではないかという報告がなされて

おり、D-アミノ酸はいまだにホットな話題であることがうかがえる (Hubert L., et al. (2009) *Science* **325**, 1552-1555)。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。D-アスパラギン酸が、脳内で最初に見つかったのは、マダコやモンゴウイカなどの軟体動物や、ホヤやクルマエビなどの水棲生物であったが、近年では、節足動物、ニワトリ、ヒトなどでも高濃度で見出されている。しかしながら、この D-アスパラギン酸の生理作用の機序はまだ未解明であり、今後の研究の進展が望まれている。

## 2. 研究の目的

D-アスパラギン酸の生成、代謝に関わる PLP 依存性 D-アスパラギン酸ラセマーゼ (AspR) と、FAD 依存性 D-アスパラギン酸オキシダーゼ (DDO) の X 線結晶構造解析を行い、基質認識機構、および、反応のメカニズムを明らかにすることを目的としている。両酵素ともに、D-アスパラギン酸を主な基質として認識するが、それらのアミノ酸配列の相同性はほとんどない。収斂進化によって、それぞれが異なる方法で、D-アスパラギン酸を認識し、触媒反応を行っているため、両酵素の立体構造を決定し、分子レベルでこれらを比較研究することは、生物がいかにして、D-アスパラギン酸を利用するために工夫してきたかを理解するうえで重要であると考えている。

### AspR

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 AspR があり、大きく分けて二種類が知られている。一方は二つのシステインを活性触媒残基として有している細菌、および、古細菌由来の酵素であり、もう一方は、ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) を補酵素として用いる動物由来の酵素である。本研究では、後者の PLP 依存性 AspR を研究対象としている。

本研究の対象である PLP 依存性 AspR と、D-セリンの合成に関与する分裂酵母由来の PLP 依存性セリンラセマーゼとのアミノ酸配列の相同性は 36.6% である。このような高い相同性にもかかわらず、アカガイ由来 AspR 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。そのため、このア

カガイ由来 AspR の X 線結晶構造解析を行い、立体構造を決定し、これらの特徴を原子レベルで明らかにしたい。

### DDO

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 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 DDO の立体構造を決定して、D-アスパラギン酸オキシダーゼの研究を分子・原子レベルで議論できるようにする必要がある。

## 3. 研究の方法

### AspR

研究開始当時すでに結晶化に成功しており、分裂酵母由来セリンラセマーゼを初期モデルとする分子置換により Open 型のネイティブ構造を決定することができている。そのため、研究期間内に、質のよい X 線を提供する放射光施設を利用することにより分解能の向上を目指し、原子レベルで AspR の基質特異性および、触媒メカニズムの解明を試みる。さらに、活性化因子である AMP との複合体の構造、および阻害因子である ATP との複合体の構造を決定して、その活性調節機構を明らかにする。また、基質もしくは基質アナログとの複合体の結晶化条件を見出して、Closed 型の立体構造を決定しアスパラギン酸ラセマーゼの基質認識機構を明らかにする。

### DDO

研究開始当時、結晶化条件の初期スクリーニングにおいて、微結晶を得る条件または候補となる条件を発見しているため、結晶化条件の最適化、X 線回折強度データ測定、位相の決定を行い、立体構造を決定する。ネイティブ構造と基質アナログ複合体との構造の比較、および詳細が研究されている D-アミノ酸オキシダーゼとの比較から、D-アスパラギン酸オキシダーゼの基質認識機構を明らかにする。

#### 4. 研究成果

##### AspR

放射光施設の利用により、AspRのネイティブ結晶から空間群 $C2$ 、格子定数 $a = 94.12$ 、 $b = 80.71$ 、 $c = 87.91$  Å、 $\beta = 116.22$  °で $2.15$  Å分解能のデータセットを得ることに成功した。そのデータをもちいて、酵母由来セリンラセマーゼの立体構造を初期モデルとしたAspRの構造の構築を行い、CNSによる精密化後 $R = 22.0\%$ 、 $R_{\text{free}} = 26.8\%$ のモデルを取得した。ネイティブAspRの最終モデルは、サブユニット二つからなるダイマー構造をしており、それぞれ327アミノ酸残基および一つのPLPで構成されている。サブユニットは小ドメインと大ドメインから成っており、補酵素のPLPはそのドメインインターフェースにあるLys63の側鎖とシップ塩基で結合している。補酵素のPLPのN1窒素原子は、Cys321残基の側鎖と水素結合しており、プロトン化はされていないと考えられるため、酸性アミノ酸残基と水素結合してプロトンの授受をおこなうことでピリミジン環を電子溜として用いるPLP依存性酵素のFold type Iの酵素とは異なり、アミノ基転移反応を触媒するのに適しておらず、Fold type IIの酵素によくあるように脱水反応やラセミ化反応を触媒する環境にあると言える。

分裂酵母由来セリンラセマーゼとサブユニット構造を比較したところ、ネイティブAspRは、基質などのリガンドが結合していないにもかかわらずOpen型よりもよりClosed型に近いコンホメーションをとっていた。しかし、分裂酵母セリンラセマーゼのClosed型と比べるとネイティブAspRは、活性部位を閉じ切っていないようであったため、その原因を探したところ、同種の酵素である分裂酵母、マウスおよびヒトのセリンラセマーゼ、セリンデヒドラターゼには保存されていない短い配列がアカガイAspRにはあり、そこに含まれる小ドメインのプロリン残基と大ドメインのフェニルアラニン残基がスタッキングすることで、それ以上Closed型にならないようにしていることがわかった。つまり、このネイティブAspRのOpen型とClosed型の中間のコンホメーションをとっていることには、触媒反応を行うための工夫であると考えられる。その工夫は、この中間的なコンホメーションだと、基質のアスパラギン酸の側鎖のカルボキシル基の認識に関わっているのではないかと考えているArg140が、その機能を発揮するための絶妙な位置にいないかということである。このことは、一般的なOpen型構造だと、Arg140は活性部位から遠すぎて基質の認識に関われないことから、AspRは、結晶状態ではなく水溶液状態でもこのような中間的なコンホメーションをとっていることを示唆している。

ネイティブ結晶に活性化因子であるAMPおよび阻害因子であるATPをソーキングしてX線回折強度データ収集を行い、AspRとAMPとの複合体およびATPとの複合体のデータセットを得ることができた。AMP複合体およびATP複合体の構築した立体構造から、AMPとATPはサブユニットインターフェースの同じ位置に結合していることが分かった。この位置は、分裂酵母由来セリンラセマーゼの活性化因子であるATPの結合部位と同様の場所である。AspRにAMPもしくはATPが結合すると、分裂酵母セリンラセマーゼにATPが結合したときと同様に、サブユニット間の相対的な配置が変化することがわかった。また、AspRにATPが結合した場合は、残基番号134-145のアミノ酸残基からなる $\alpha$ -ヘリックスの電子密度が確認できなくなるため、酵素の一部のゆらぎが大きくなり不安定になることが、ATPによる酵素活性の阻害に結び付くと考えられる。今後、詳細な検討を行い、AspRの活性化機構と阻害機構を解明する。

##### DDO

結晶化条件の最適化により、研究開始当時では微結晶だったところから $0.2 \times 0.6 \times 0.1$  mm<sup>3</sup>程度の大きさの柱状結晶にまで成長させることができ、放射光施設を用いたX線回折強度データ測定により、約 $2.0$  Å分解能のデータセットを得ることに成功した。水銀や白金の誘導体を用いた重原子同型置換法によって位相の決定を行い、DDOのネイティブ構造の構築を行った。

このネイティブ構造より、酵母DDOが、酵母D-アミノ酸オキシダーゼ(DAO)の2量体構造およびブタDAOの2量体構造とも異なる4量体構造をとる原因となる二つのループを特定することができた。ネイティブDDOの全体構造から、4量体のためのサブユニット相互作用が上述の2種のDAOのそれと比べて著しき小さいことがわかり、このことが酵母DDOは水溶液中でその濃度が低い場合に、触媒活性が低下することの原因であることが示唆された。

また、それら2種のDAOとの活性部位の比較によって、D-アスパラギン酸の $\alpha$ -カルボキシル基および $\alpha$ -アミノ基の認識に関わる残基は、酵母、ブタおよびヒト由来DAOでも保存されているArg317とTyr245およびGly344であることを確認した。さらに、酸性アミノ酸であるD-アスパラギン酸の側鎖のカルボキシル基を認識する残基の候補をHis56とArg243と推定した。今後は、基質もしくは基質アナログとの複合体の結晶を作成し、DDOの基質認識機構を明らかにしていく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計2件)

- ① 後藤 勝、笠原 由理枝、大河 内里美、阿部 勝正、高橋 祥司、山田 良平、解良 芳夫、広津 建、D-アスパラギン酸オキシダーゼの立体構造、第84回日本生化学会大会、2011年9月23日、京都府
- ② 後藤 勝、吉村 基希、阿部 勝正、高橋 祥司、解良 芳夫、山田 良平、広津 建、アカガイ由来PLP依存性アスパラギン酸ラセマーゼの構造解析、日本結晶学会平成22年度年会、2010年12月5日、大阪府

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 勝 (GOTO MASARU)  
東邦大学・理学部・講師  
研究者番号：80379289

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし