

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 14 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440028

研究課題名(和文) 希少糖生産酵素群の基質複合体のX線構造に基づく包括的な触媒反応機構の解明

研究課題名(英文) The study on inclusive catalytic reaction mechanism of the enzymes used for rare sugar production on the basis of X-ray structures in complexes with rare sugars

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：天然に微量にしか存在しない「希少糖」の生産に関与する単糖異性化酵素について、X線結晶解析により基質複合体構造の決定、触媒反応機構の解明に関する研究を行った。L-リボースとL-リブロース間の異性化反応を触媒する、希少糖生産酵素 *Acinetobacter* sp. 由来L-リボースイソメラーゼ(L-RI)、*Cellulomonas parahominis* 由来L-RIの構造を決定し、それぞれの野生型および変異酵素における複数の基質複合体構造から、L-RIの糖環開環機構を含めた触媒反応機構を提唱し、L-RIのホモ四量体構造は酵素の分子構造の安定性に関与し、酵素活性には不可欠であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：X-ray structures of L-ribose isomerase from *Acinetobacter* sp. and *Cellulomonas parahominis* were determined. On the basis of the wild-type and mutant form structures in complexes with rare sugars, catalytic reaction mechanism of L-RI including ring-opening mechanism of sugar was proposed. Furthermore, mutant structure analysis supported the essentiality of tetramer formation of L-RI for its enzymatic activity.

研究分野：構造生物学、蛋白質工学

キーワード：X線結晶構造解析 単糖異性化酵素 希少糖 L-リボースイソメラーゼ D-タガトース 3-エピメラーゼ
触媒反応機構 酵素・基質複合体 微小重力環境タンパク質結晶化

1. 研究開始当初の背景

(1) 希少糖と希少糖生産酵素

単糖には多くの不斉炭素があり、6つの炭素からなる単糖にはアルドヘキソースで16種、ケトヘキソースで8種、計24種の立体異性体が存在する。この中には、天然に多量に存在するD-グルコースやD-フルクトースがある一方、その多くは天然には微量にしか存在が確認できない「希少糖」と呼ばれている。香川大学の何森教授らのグループは、種々の単糖異性化酵素、酸化還元酵素を用いて、「希少糖」を生産する戦略、「イズモリング」を考案した。特に、糖の3位をエピマー化(キラリティーを反転)する酵素として発見された *Pseudomonas cichorii* 由来 D-タガトース 3-エピメラーゼ(D-TE)は、D-フルクトースを希少糖 D-プシコースに異性化させることができる。大量生産が可能となったD-プシコースを用いた研究により、D-プシコースのインスリン分泌作用、糖代謝の改善効果などが見出され、希少糖は医薬・食品産業において注目されるようになった。さらに、D-プシコースに、基質特異性の広いケトース・アルドース異性化酵素である *Bacillus pallidus* 由来 D-アラビノースイソメラーゼ(D-AI)を作用させて希少糖 D-アルトロースへ、同じく基質特異性の広い *Pseudomonas stutzeri* 由来 L-ラムノースイソメラーゼ(L-RhI)を作用させて希少糖 D-アロースへと変換させることも可能となっている(図1)。

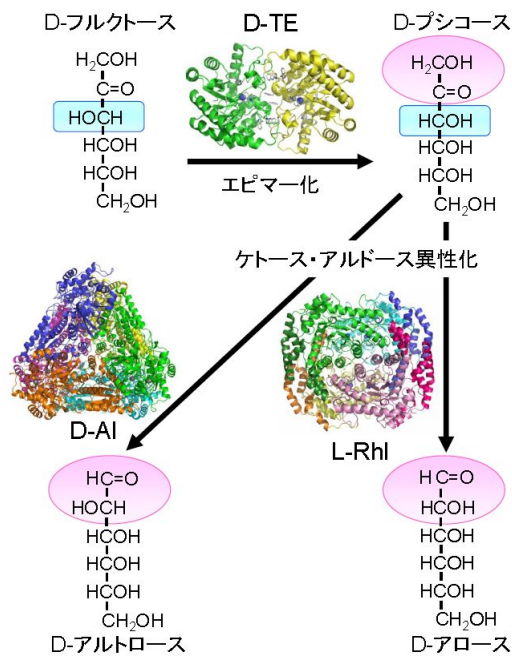


図1. 希少糖生産戦略の例

われわれは、これまでに上述の3種の希少糖生産酵素、D-TE、D-AI、L-RhIの基質複合体構造をX線結晶解析により決定し、それらの基質認識・触媒反応機構について報告を行ってきた。D-TEについては、基質に向かい合う

ように配置された Glu152 と Glu246 が酸塩基触媒として働き(図2)、基質の3位の炭素と酸素の間でプロトンを交換するという C3-O3 proton-exchange 機構を新たに提唱している。

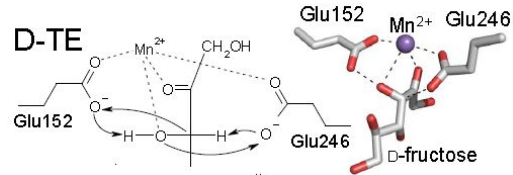


図2. D-TEの基質結合部位

これまでに、D-TEにおいては、線状の基質が結合した基質複合体構造しか得られていないが、通常、単糖は環状構造(糖環)として生体内で存在し、酵素は糖環を捕捉して、開環してから異性化反応を触媒すると考えられる。L-RhIについては、hydride-shift 機構に基づく構造が示され、アミノ酸を置換した変異体を用いて、反応の各ステップで止まったX線構造を得ることにより、糖環開環を含む反応機構の詳細について明らかにすることに成功している。D-TEも同様な手法を用いることにより、糖環の開環機構を解明することができると期待された。近年、D-TEは希少糖誘導体であるデオキシ希少糖を基質とする研究報告があり、D-TEを用いたデオキシ希少糖の生産の可能性が検討されるようになってきた。D-TEがどのようにデオキシ希少糖を認識するのか、D-TEとデオキシ希少糖との複合体構造も興味深い対象である。

(2) *Acinetobacter* sp. 由来 L-リボースイソメラーゼ (AcL-RI)

新規希少糖生産酵素として、*Acinetobacter* sp. 由来 L-リボースイソメラーゼ (AcL-RI) が注目されていた。L-RIは5単糖のL-リボースとL-リブロース間の可逆的な異性化反応を触媒する酵素であり(図3) L-リボースはL-ヌクレオシド類似体合成の前駆体、すなわち核酸の複製阻害剤として利用することができることから、抗菌剤や抗ウイルス剤、抗がん剤などの医薬品への利用が期待されている。

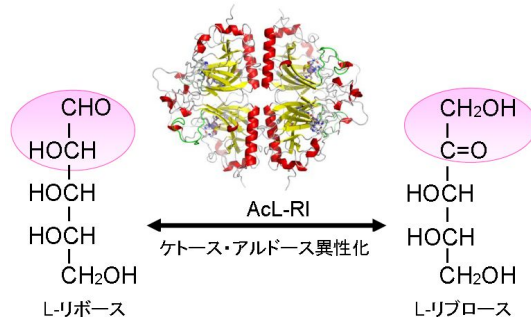


図3. AcL-RIの構造と触媒反応

先行研究において、AcL-RI セレノメチオニン置換体を用いることにより AcL-RI の構造決

定に成功したが、希少糖との複合体構造が得られていなかったことから、詳細な触媒反応機構については不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、天然に微量にしか存在しない「希少糖」の生産に関与する希少糖生産酵素について、これまで行ってきた基質複合体構造の X 線結晶解析研究をさらに深化させるとともに、希少糖誘導体であるデオキシ希少糖生産に向けた構造情報の取得、および新規希少糖生産酵素の構造生物学的研究を進展させていくことを目的に行った。

3. 研究の方法

(1) *Acinetobacter* sp. L-リボースイソメラーゼ (AcL-RI) の基質複合体の X 線結晶解析

AcL-RI の基質複合体の構造解析
野生型 AcL-RI の精製酵素を調製し、結晶化を行った。得られた結晶に用いて、基質 (L-リボース、L-リブロース) と阻害剤 (リビトール) のソーキング実験を行い、X 線回折データを収集した。野生型 AcL-RI とそれぞれのリガンドとの複合体の構造解析を行った。

変異酵素の評価と構造解析

2 つの触媒残基と予想された Glu113 と Glu204、基質複合体の構造から基質結合に関与すると考えられた Lys93, Lys11, E211, R243 に変異を導入した酵素 (K93A, K111A, E113A/H/Q, E204A/Q, E211A, R243A) を構築し、これらの変異酵素の活性測定を行った。E204Q に対しては、結晶を作成し、L-リボース、L-リブロースとの複合体構造解析を行った。

(2) *Cellulomonas parahominis* L-リボースイソメラーゼ (CpL-RI) の基質複合体の X 線結晶解析

由来する微生物が異なる L-リボースイソメラーゼとして、既にクローニングされ大量発現が可能となっていた *Cellulomonas parahominis* L-リボースイソメラーゼ (CpL-RI) の X 線結晶解析を行った。

CpL-RI の結晶化および構造決定

CpL-RI の精製酵素を調製し、結晶化を行った。得られた結晶からデータ収集を行い、AcL-RI の構造モデルを用いた分子置換により

CpL-RI の構造を決定した。

変異酵素の安定性の評価

CpL-RI も AcL-RI もホモ四量体を形成することから、ホモ四量体構造の分子構造の安定性と酵素活性の関係を調べるため、CpL-RI において分子間内に位置するアミノ酸残基に変異を導入し、四量体を形成しにくい/形成できない変異酵素を構築した。これらの変異酵素について、ゲル濾過による分子構造の多量体形成の確認と酵素活性の測定を行った。

(3) 微小重力環境を利用した希少糖生産酵素の結晶化およびその X 線結晶解析

希少糖生産酵素の詳細な触媒反応機構の理解を深めるため、良質な結晶を得て高分解能のデータ収集を行うことを目的に JAXA 宇宙実験、国際宇宙ステーション (ISS) を利用した微小重力環境下での結晶化実験に参加した。これまでに、第 1 期 第 6 回 JAXA 宇宙実験では、L-ラムノースイソメラーゼ (L-RhI) と野生型より分解能が向上している D-タガトース 3-エピメラーゼ (D-TE) の変異酵素 C66S の結晶化実験に参加している。本研究期間では、第 2 期 第 1 回宇宙実験で L-RhI と D-TE_C66S、AcL-RI の結晶化実験、第 2 期 第 2 回宇宙実験では、D-TE_C66S と AcL-RI、第 2 期 第 3 回宇宙実験では、野生型より分解能が向上している L-RhI の変異酵素 S329F と D-TE_C66S を用いた結晶化実験に参加した。

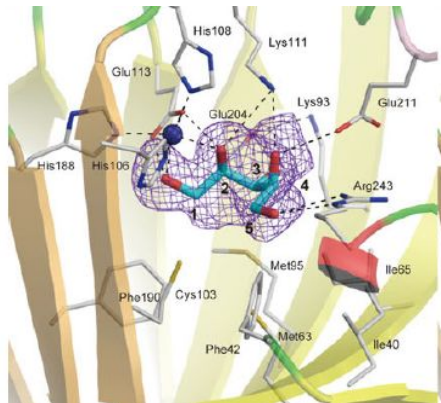
(4) *Pseudomonas cichorii* D-タガトース 3-エピメラーゼ (D-TE) の変異酵素を用いたデオキシ希少糖および糖アルコールとの基質複合体の X 線結晶解析

D-TE の基質となるデオキシ糖 (1-デオキシ D/L-タガトース, 6-デオキシ L-プシコース, 1-デオキシ 3-ケト D-ガラクトール) 四炭糖の L-エリスルロース、糖アルコール (グリセロール, D-タリトール) のソーキング実験を行い、X 線結晶解析によりこれらの複数の複合体構造を決定した。

4. 研究成果

(1) *Acinetobacter* sp. L-リボースイソメラーゼ (AcL-RI) の基質複合体の X 線結晶解析

野生型 AcL-RI ではL-リボース、L-リブロース、リビトールとの複合体構造が得られた。図4にはリビトールが結合した活性部位を示す。これより、触媒残基と予想された Glu113 と Glu204 の変異酵素(E113A/H/Q, E204A/Q)を作成して酵素活性を確認したところ、失活していた。



水色のスティックは結合したリビトール

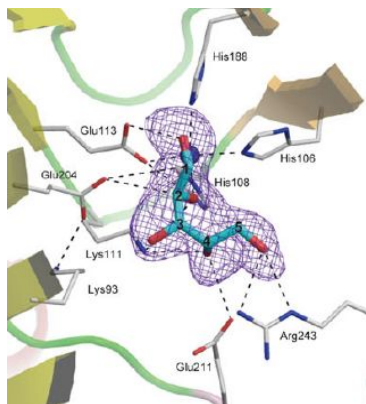


図4. リビトールが結合した AcL-RI の活性部位

野生型 AcL-RI/L-リボース、AcL-RI/L-リブロースの活性部位では、環状の糖が結合した構造が見られた(図5)。AcL-RI/リビトールと同様に、Lys93は触媒残基のGlu204と水素結合を形成している(図5. A, D)。一方、E204Q/L-リボース、E204Q/L-リブロースの複合体構造では、糖は開環し、Lys93はE204Qとは水素結合を形成することができず、基質のO3と水素結合を形成していた(図5. B, C)。また、環状の糖が結合した活性部位では、Arg243は基質と相互作用することはなく、Glu211も基質の一部とのみ水素結合をしていた。

基質結合に関与すると考えられた Lys93, Lys111, Glu211, Arg243 に変異を導入して変異酵素のうち、K93A, K111A は完全に酵素活性が失活したが、E211A, R243A は野生型に対してそれぞれ 11.1%, 10.5%の活性を維持していた。これらの結果から、Glu211 と Arg243 は基質認識のみに関与していると考えられた。

野生型および変異酵素の複数の基質複合体構造から、環状の糖が結合した複合体構造を

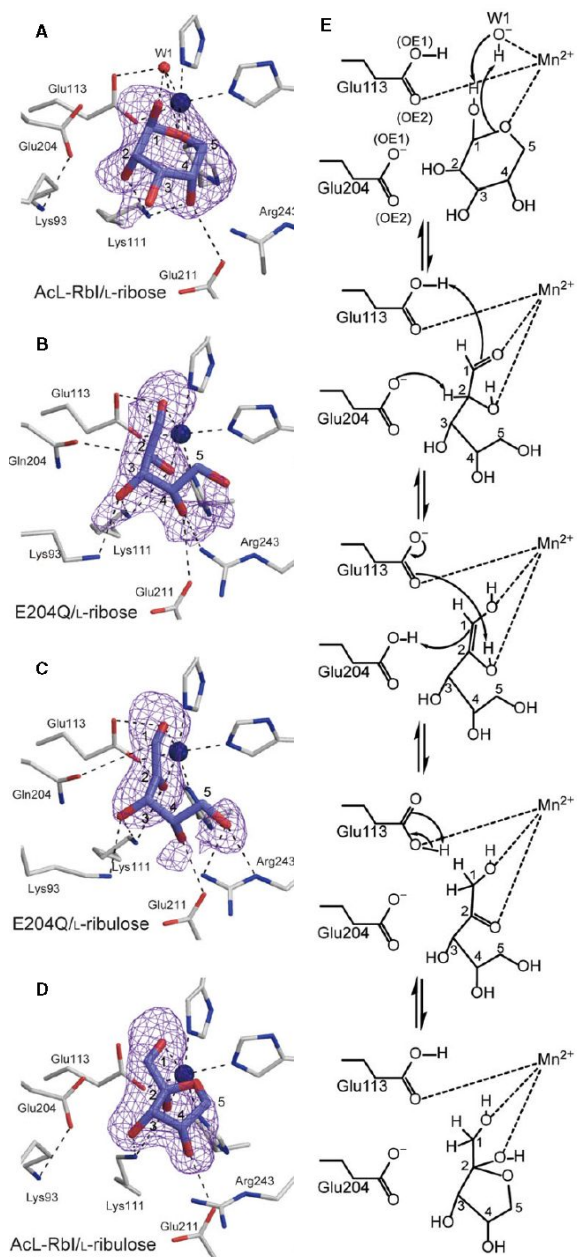


図5. AcL-RI の糖環開環機構を含む触媒反応機構

得ることができ、AcL-RI では、金属イオンと結合して活性化された触媒水が基質の O1 から O5 にプロトンを移動させることにより、糖が開環される糖環開環機構を含めた cis-ene diol の反応中間体を経る触媒反応機構を提唱し(図5)、論文誌に報告した(Yoshida et al., (2014), FEBS J., 281(14), 3150-3164)。

(2) *Cellulomonas parahominis* L-リボースイソメラーゼ (CpL-RI) の基質複合体の X 線結晶解析

希少糖研究センターとの共同研究により、由来する微生物が異なり、AcL-RI とは 75% のアミノ酸の相同性を持つ CpL-RI の構造決定および四量体構造の必要性について解析を行い、論文誌に投稿した(Terami et

al., (2015), Appl Microbiol Biotechnol., 99(15), 6303-6313). 変異酵素のゲル濾過において、四量体：二量体：単量体の割合で二量体の割合が増えた変異酵素については酵素活性が大幅に低下した。

これら2種類のL-リボースイソメラーゼの構造解析を通して、L-リボースイソメラーゼの糖環開環機構を含めた触媒反応機構を提唱し、本酵素のホモ四量体構造は酵素の分子構造の安定性に関与し、酵素活性には不可欠であることを明らかにした。

(3) 微小重力環境を利用した希少糖生産酵素の結晶化およびそのX線結晶解析

反応中間体における水素原子の電子密度が得られる超高分解能のデータ収集を目指して、国際宇宙ステーション (ISS) を利用した JAXA 宇宙実験の結晶化実験に参加したが、目的を達成する高分解のデータは得られなかった。しかしながら、第1期 第6回 JAXA 宇宙実験では、若干ではあるが分解能が向上したデータも得られ、第2期 第2回宇宙実験においては、微小重力空間で成長した D-TE_C66S の結晶を用いて希少糖誘導体であるデオキシ希少糖、1-デオキシ L-タガトースとの複合体構造 (1.73 分解能) を得ることができた。さらに、第2期 第2回宇宙実験では、L-Rhl_S329F の結晶が得られ、これまでの最高分解能を示す D-アロースとの複合体 (1.35 分解能)、1-デオキシ D-プシコース、1-デオキシ L-タガトース、6-デオキシ L-タロースとの複合体構造も得られた。長期的に複数回の実験を重ねることによって、良好な結果が徐々に得られてきている。

(4) *Pseudomonas cichorii* D-タガトース 3-エピメラーゼ (D-TE) の変異酵素を用いたデオキシ希少糖および糖アルコールとの基質複合体の X 線結晶解析

D-TE_C66S とデオキシ糖 (1-デオキシ D/L-タガトース, 6-デオキシ L-プシコース, 1-デオキシ 3-ケト D-ガラクトール) 四炭糖の L-エリスルロース、糖アルコール (グリセロール、D-タリトール) の複数の複合体構造が得られた。図6におけるデオキシ希少糖の多数の複合体構造を決定することによって、3 位にケト基をもつ 1-デオキシ 3-ケト D-ガラクトールは1つシフトした4位が認識されてエピマー化されることが複合体構造から示され、1-デオキシ D-タガトースの複合体では、基質となる方向に結合する A 型と逆向きに結合して基質とならない B 型が混在することが明らかになった。これは、1-デオキシ D-タガトースに対する酵素活性が低いという理由につながると考えられる。本研究により、D-TE のデオキシ希少糖の認識機構ならびにデオキシ希少糖が阻害効果を示す

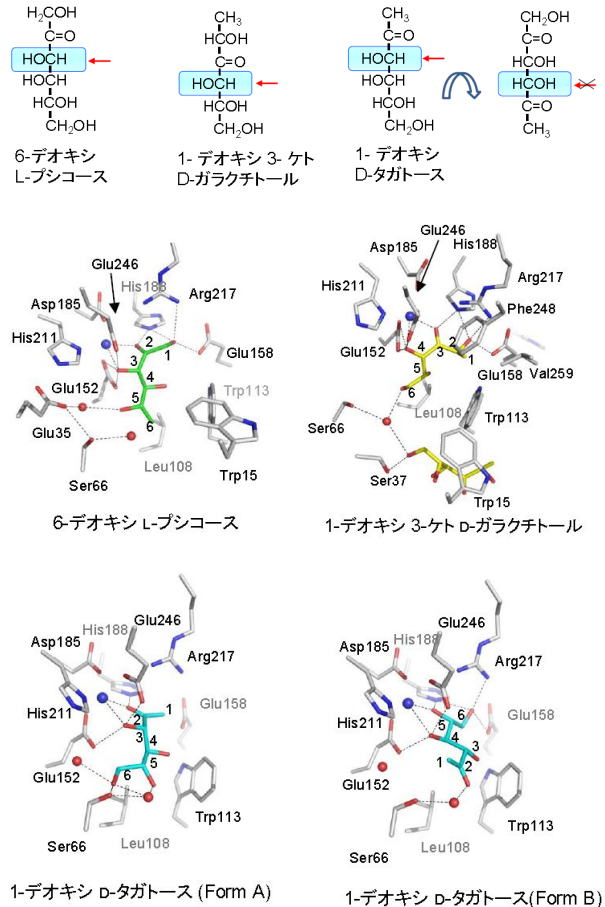


図6. デオキシ糖が結合した D-TE_C66S の活性部位

可能性をもつことが明らかとなった (論文投稿中)。今回、D-TE の糖の開環機構の解明には至らなかったが、D-TE_C66S の分子表面において、開環した糖と環状のままの糖が結合した複合体構造が得られ、特に活性部位近傍の疎水性領域が集中した領域の分子表面には開環した糖が結合していたことから、D-TE の糖の開環機構には基質結合部位に結合してから開環されるプロセスとは異なる機構がある可能性が考えられた。

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)

[雑誌論文](計 2 件)

(1) Yuji Terami, Hiromi Yoshida, Keiko Uechi, Kenji Morimoto, Goro Takata and Shigehiro Kamitori, "Essentiality of tetramer formation of *Cellulomonas parahominis* L-ribose isomerase involved in novel L-ribose metabolic pathway.", Appl Microbiol Biotechnol., 99(15), 6303-6313, (2015), 査読有
DOI: 10.1007/s00253-015-6417-4.

(2) Hiromi Yoshida, Akihide Yoshihara, Misa Teraoka, Yuji Terami, Goro Takata, Ken Izumori and Shigehiro Kamitori, "

X-ray structure of a novel L-ribose isomerase acting on a non-natural sugar L-ribose as its ideal substrate.", FEBS J., 281(14), 3150-3164, (2014), 査読有 DOI: 10.1111/febs.12850.

〔学会発表〕(計 9 件)

吉田裕美, 吉原明秀, 大谷耕平, 秋光和也, 何森健, 神鳥成弘, 「希少糖生産酵素 *Arthrobacter* 属由来 D-ブシコース 3-エピメラーゼの結晶化および X 線結晶解析」2016 年度農芸化学学会大会 2016 年 3 月 29 日, (札幌)

吉田裕美, 吉原明秀, 田仲広明, 伊中浩治, 古林直樹, 山田貢, 太田和敬, 何森健, 神鳥成弘, 「宇宙空間で得られた希少糖生産酵素 D-tagatose 3-epimerase 変異酵素の結晶とデオキシ希少糖との複合体構造」第 15 回日本蛋白質科学会年会, 2015 年 6 月 24 日, (徳島)

吉田裕美, 吉原明秀, 石井知彦, 何森健, 神鳥成弘, 「希少糖生産酵素 *Pseudomonas cichorii* D-タガトース 3-エピメラーゼとデオキシ希少糖との複合体の X 線結晶解析」第 56 回日本生化学会中国・四国支部例会, 2015 年 5 月 35 日, (松江)

吉田裕美, 吉原明秀, 石井知彦, 何森健, 神鳥成弘, 「希少糖生産酵素 *Pseudomonas cichorii* 由来 D-タガトース 3-エピメラーゼの変異酵素を用いた糖アルコールおよびデオキシ希少糖との複合体構造解析」2015 年度農芸化学学会大会, 2015 年 3 月 29 日 (岡山)

寺見優司, 上地敬子, 森本兼司, 吉田裕美, 神鳥成弘, 高田悟郎, 「*Cellulomonas parahominis* 由来 L-リボースイソメラーゼの基質複合体構造解析および四量体形成の必要性の解明」2015 年度農芸化学学会大会, 2015 年 3 月 27 日, (岡山)

Hiromi Yoshida, Akihide Yoshihara, Misa Teraoka, Yuji Terami, Goro Takata, Ken Izumori and Shigehiro Kamitori, "X-ray structure of L-ribose isomerase in complex with L-ribose and a deduced catalytic mechanism", September 2, 2014, FEBS-EMBO 2014 (Paris, France)

Yuji Terami, Hiromi Yoshida, Keiko Uechi, Goro Takata & Shigehiro Kamitori, "Crystal structure of L-ribose isomerase from *Cellulomonas parahominis* MB426", August 7, 2014, International Union of Crystallography 2014 (IUCr2014) (Montreal, Canada)

吉田裕美, 吉原明秀, 寺岡美沙, 林順司, 田仲広明, 伊中浩治, 太田和敬, 何森健, 神鳥成弘, 「宇宙空間を利用した希少糖生産酵素の結晶化」第 14 回日本蛋白質科学会年会, 2014 年 6 月 25 日, (横浜)

吉田裕美, 吉原明秀, 寺岡美沙, 何森健, 神鳥成弘, 「希少糖生産酵素 *Acinetobacter* sp. 由来 L-リボースイソメラーゼの X 線結晶構造解析」2014 年度農芸化学学会大会, 2014 年 3 月 28 日, (川崎)

〔その他〕

ホームページ

香川大学総合生命科学研究センター

分子構造解析研究部門ホームページ

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

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

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

(2) 研究分担者

神鳥 成弘 (KAMITORI SHIGEHIRO)

香川大学・総合生命科学研究センター
・教授

研究者番号: 00262246

吉原 明秀 (YOSHIHARA AKIHIDE)

香川大学・希少糖研究センター・助教
研究者番号: 40548765

(3) 連携研究者

何森 健 (IZUMORI KEN)

香川大学・農学部・名誉教授

研究者番号: 80035998