

令和元年6月12日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07271

研究課題名(和文) D-プシコース生産用新規希少糖生産酵素のX線結晶構造解析および安定化機構の解明

研究課題名(英文) X-ray structure analysis of the enzyme for rare sugar production and elucidation of the mechanism of its thermal stability

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：D-アルロース(D-プシコース)の生産に有用な新規希少糖生産酵素として報告された *Arthrobacter globiformis* 由来D-アルロース 3-エピメラーゼ(AgDAE)の構造を決定した。AgDAEの全体構造はL-リブロース3-エピメラーゼ(L-RE)の構造と良く似ており、L-リブロースに対して最大活性を示すことがわかったことから、AgDAEは、L-REファミリーに属する酵素と考えられた。安定性の高いAgDAEの特性は、各サブユニットのC末端側の $\alpha$ -ヘリックスが長く、四量体構造が剛直で安定になることにあった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規希少糖生産酵素として報告された *Arthrobacter globiformis* 由来D-アルロース 3-エピメラーゼ(AgDAE)は、既報のD-アルロース 3-エピメラーゼ(D-AE)と類似構造を示したが、これまでに報告されていたL-リブロース3-エピメラーゼ(L-RE)とよりよく似ていた。各サブユニットのC末端側の $\alpha$ -ヘリックスが長く、四量体構造の安定化に寄与していた。AgDAEはL-リブロースに対して最大活性を示すこともわかったが、既報のL-REとは異なりD-アルロースに対する活性が高く、D-アルロース生産に有用なL-REファミリーに属するユニークな特性を示す酵素であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The X-ray structure of ketose 3-epimerase from *Arthrobacter globiformis* M30, which was previously reported to be a D-allulose 3-epimerase (AgDAE), was determined. AgDAE formed a homotetramer and its overall structure was more similar to that of L-ribulose 3-epimerase (L-RE) than to the known structures of D-psicose (alternative name D-allulose) 3-epimerases (D-PEs or D-AEs), although AgDAE and L-RE have different substrate specificities. Both AgDAE and L-RE have long helices in the C-terminal region that would contribute to the stability of the homotetramer. AgDAE showed higher enzymatic activity for L-ribulose than D-allulose; however, AgDAE is stable and is a unique useful enzyme for the production of D-allulose from D-fructose.

研究分野：構造生物学

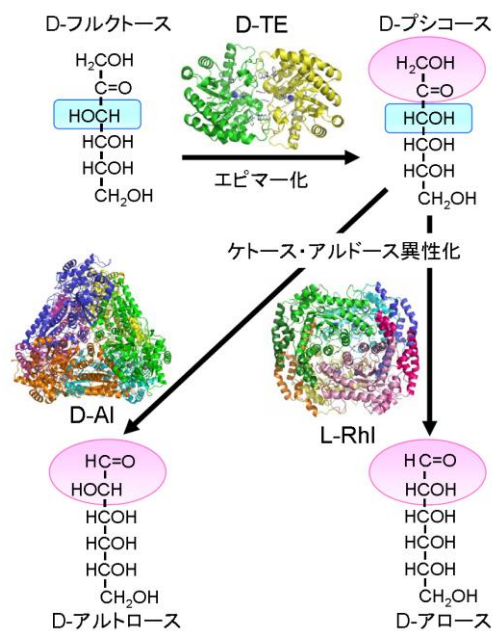
キーワード：X線結晶解析 希少糖 糖異性化酵素 D-アルロース D-アルロース 3-エピメラーゼ L-リブロース 3-エピメラーゼ *Arthrobacter globiformis* ヘキソキナーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

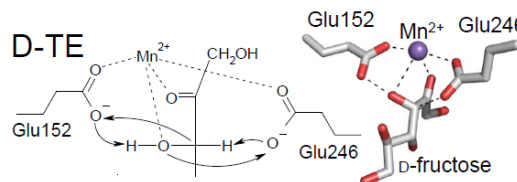
(1) 希少糖の生産

単糖には多くの不斉炭素があり、数多くの立体異性体が存在する。天然に多量に存在する D-グルコースや D-フルクトースに対し、多くの異性体の天然の存在量はごく微量であり、「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・酸化還元酵素を適宜利用して「希少糖」を生産するストラテジー（イズモリング）を考案し、世界に先駆けて希少糖研究を展開してきた。これまでの希少糖生産の代表的な酵素は、糖の 3 位をエピマー化する酵素として発見された D-タガトース 3-エピメラーゼ (D-TE) であり、D-フルクトースを希少糖 D-アルロース (別名 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-アルロースの生理活性として、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 D-アルロースは医薬・食品産業において注目されるようになった。2012 年には FDA (U. S. Food and Drug Administration) に認可され、その規模は世界的となり、さらなる生産効率の改善が必要とされた。また、D-アルロースに、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 D-アラビノースイソメラーゼ (D-AI) を作用させて D-アルトロースへ、L-ラムノースイソメラーゼ (L-RhI) を作用させて D-アロースへと変換させる、希少糖から希少糖への生産も取り組まれている (右上図)。特に D-アロースは癌抑制作用の報告例があることから、D-アロースの生産も注目されている。



(2) D-アルロースの生産が可能な D-タガトース 3-エピメラーゼ (D-TE) と D-アルロース生産用新規希少糖生産酵素

これまでに 3 種の酵素 (D-TE, D-AI, L-RhI) の X 線結晶解析による希少糖の基質認識・触媒反応機構を報告しているが、D-TE は基質を挟み込む 2 つの触媒残基ペアを持ち (右図)、基質の 3 位の炭素と酸素の間でプロトンが交換されエピマー化がおこる、C3-O3 proton-exchange 機構を提案してきた。



D-TE の本来の基質は D-タガトースであり、基質特異性の広さから D-フルクトースに作用して D-アルロースを生産することが可能になっている。D-TE より D-アルロースの生産が有力視される酵素 (安定性が高く、D-アルロースを本来の基質とする D-アルロース 3-エピメラーゼ (D-AE)) が放線菌から見つけれ、クローニングが行われた。D-AE を利用することにより、より効率的な D-アルロースの生産が期待された。発現が確認された新規希少糖生産酵素 D-AE は、これまでに報告されている D-TE ファミリーとの相同性は低く、その基質認識や触媒反応機構は既知の D-TE ファミリーと異なる可能性が大きいと考えられた。

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、新たに見出された D-アルロース生産用新規希少糖生産酵素の結晶解析を行い、希少糖生産酵素の構造生物学的研究の基盤確立、既存の希少糖生産酵素の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) *Arthrobacter globiformis* D-アルロース 3-エピメラーゼ (AgDAE) の X 線結晶解析

① 組換え AgDAE の発現プラスミドの再構築と結晶化  
構造解析が可能な分解能の AgDAE の結晶を得るため、C 末端に His タグをつけた組換え AgDAE の発現プラスミドを再構築し、十分な発現量があることを確認した。精製酵素を用いて結晶化スクリーニングを行い、結晶化条件の最適化を行った。

## ② AgDAE の構造解析

C 末端に His タグを有する AgDAE の結晶を用いて、X 線回折データを収集し、野生型酵素の構造を決定した。触媒残基の一つと予想された Glu240 と基質認識影響を及ぼすと考えられた Met110 の変異酵素を構築し、変異酵素の活性測定を行った。また、これらの変異酵素の結晶を作成し、基質との複合体構造の解析を試みた。

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。本研究期間では、第 2 期 第 5 回宇宙実験と第 3 期 第 2 回、の宇宙実験で AgDAE の結晶化実験に参加した。

## (2) イネ由来ヘキソキナーゼ 6 (OsHXK6) の基質複合体の X 線結晶解析

ヘキソキナーゼは D-グルコースなどのヘキソースをリン酸化する酵素であり、多くのヘキソキナーゼは Mg と ATP を触媒反応に必要とし、D-グルコースから D-グルコース 6 リン酸を生成する。これまでに、イネ (*Oryza sativa*) にも複数のヘキソキナーゼが存在し、希少糖 D-アロースで処理したイネが、ヘキソキナーゼ依存的に植物のジベレリン経路抑制に関与して成長促進を受けること、ヘキソキナーゼ 6 (*Oryza sativa* hexisokinase 6: OsHXK6) が希少糖 D-アロースを基質とすることが共同研究者の秋光教授らのグループにより報告されている。ジベレリンは植物の生長制御に関与する植物ホルモンの一種であり、D-アロースは D-グルコースの 3 位のエピマーで、希少糖の 1 つでもある。共同研究者らによって既にクローニングされ大量発現が可能となっていた *Oryza sativa* ヘキソキナーゼ 6 (OsHXK6) の X 線結晶解析を行った。

### ① OsHXK6 の結晶化および構造決定

研究協力者らのグループにより調製された、N 末端にチオレドキシニン-ヒスチジンタグ (Trx-His-tag) を持つ OsHXK6 の精製酵素を用いて、ATP アナログの AMPPNP、Mg、D-グルコース存在下で共結晶化を行った。また、タグ領域をプロテアーゼ処理により取り除いた OsHXK6 についても同様な条件で共結晶化を行った。それぞれ得られた結晶を用いてデータ収集を行い、シロイヌナズナ由来ヘキソキナーゼ (AtHXK1, PDBID: 4QS7) の構造モデルを用いた分子置換により OsHXK6 の構造を決定した。

## 4. 研究成果

### (1) *Arthrobacter globiformis* D-アルロース 3-エピメラーゼ (AgDAE) の X 線結晶解析

D-アルロース (D-プシコース) の生産に有用な新規希少糖生産酵素として報告された *Arthrobacter globiformis* 由来 D-アルロース 3-エピメラーゼ (AgDAE) の構造を決定し論文誌にて発表した (Yoshida et al., (2018), Acta crystallogr F 74(10), 669-6760)。これまでの希少糖生産に主要な酵素、*Pseudomonas cichorii* 由来 D-タガトース 3-エピメラーゼ (PcDTE) と単量体構造は非常によく似た構造を示していたが、二量体構造を形成する D-TE とは異なり、四量体構造を示した (図 1, 2)。この四量体構造はこれまでに報告されていた *Agrobacterium tumefaciens* と *Clostridium cellulolyticum* 由来の D-アルロース 3-エピメラーゼ (D-AE) の構造よりも、*Mesorhizobium loti* 由来 L-リブロース 3-エピメラーゼ (MILRE) の構造と良く似ていた。C 末端側の  $\alpha$  ヘリックス ( $\alpha 8$ ) が PcDTE や既報の D-AE よりも長く、二量体部分の  $\alpha 8$  は突き出している。二量体部分の突き出したヘリックスは四量体の安定化に寄与し、全体構造は剛直で安定な構造となることが示された。さらに、AgDAE は L-リブロースに対して最大活性を示すことがわかった。本酵素は、L-リブロース 3-エピメラーゼ (L-RE) ファミリーに属する酵素と考えられるが、D-アルロースに対する活性が低い L-RE の基質特異性とは異なり、D-アルロースに対する活性を十分に示す、D-アルロースの生産に有用な酵素であった。

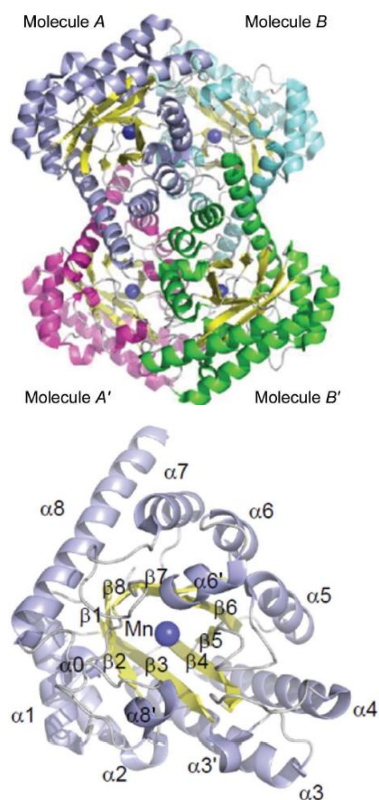


図 1 AgDAE の全体構造 (四量体) と単量体構造

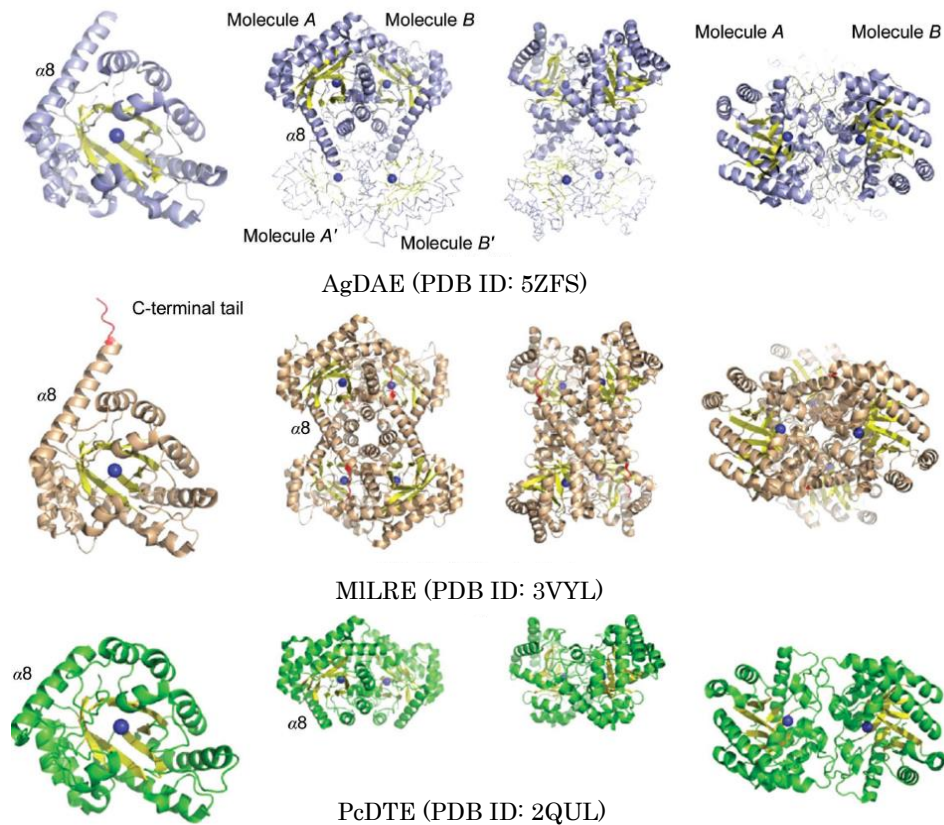


図2 AgDAE (四量体), MILRE (四量体), PcDTE (二量体) の構造比較  
 左から単量体の構造、全体構造の正面、側面、上面から見た構造。  
 AgDAE の全体構造では、二量体部分をリボンモデルとラインモデルで表示している。

これまでに D-アルロースの生産に有用な酵素として、D-タガトース 3-エピメラーゼ (D-TE) が報告されているが、D-TE も本来の基質は D-タガトースであり、その基質特異性の広さから D-アルロースの生産に用いる酵素として位置づけられてきた。安定性の高い AgDAE は MILRE と同様な構造をとりながらも、ユニークな基質特性を示している。現在、活性部位を中心に変異を導入した変異酵素についても研究を進めているが、ユニークな基質特異性は特定のアミノ酸残基の置換だけに起因しないと考えている。PcDTE との活性部位の比較により (図 3)、触媒残基の一つと予想された Glu240 と基質認識影響を及ぼすと考えられた Met110 の変異酵素を構築し、酵素活性を調べたところ、Glu240 を Gln に置換した Glu240Gln はほぼ失活したが、Met110 を Phe に置換した Met110Phe も活性が低下した。

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、複合体構造の解析を目指し、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ているが、目的を達成する高分解のデータおよび複合体構造はまだ得られていない。しかしながら、モザイシティが低下した良質な結晶が得られたため、電子密度が明瞭なデータが得られた。

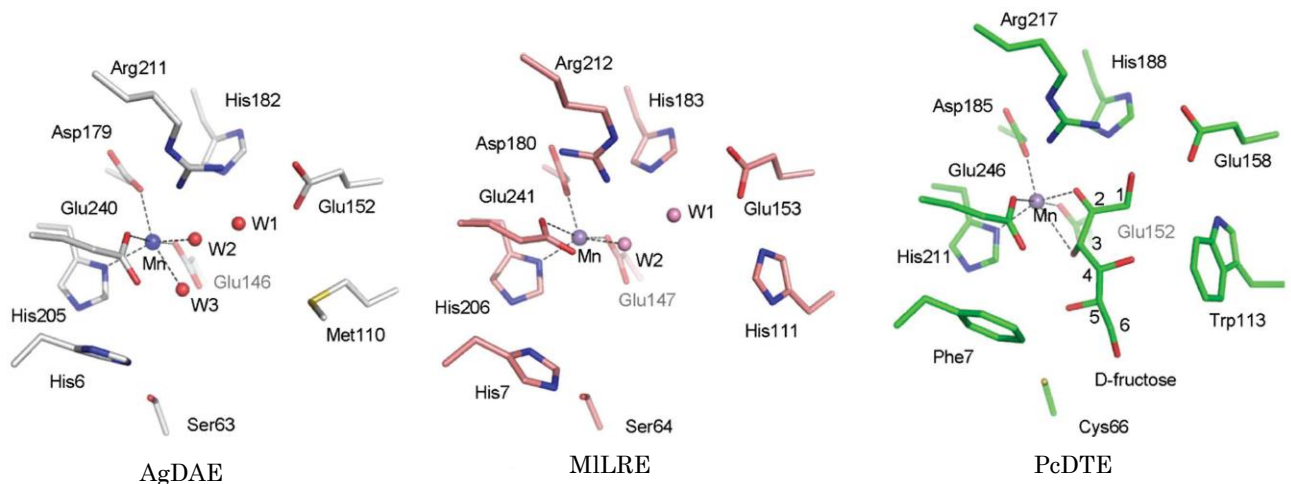


図3 AgDAE, MILRE, D-フルクトースが結合した PcDTE の活性部位の比較

(2) イネ由来ヘキソキナーゼ 6 (OsHXK6) の基質複合体の X 線結晶解析  
(秋光教授のグループとの共同研究)

AMPPNP と D-グルコースが結合したタグ付きの OsHXK6 の複合体構造を決定した。OsHXK6 の分子間に特別な相互作用は見られないが、結晶中では弱いながらも三量体を形成しているような不安定な多量体構造を示した (図 4)。N 末端側のタグ領域は電子密度が確認できず、タグの存在が不安定な多量体形成に影響を与えている可能性が考えられたことから、タグ領域を取り除いた OsHXK6 と AMPPNP、Mg、D-グルコース複合体構造を 2.84 Å 分解能で決定した。タグを取り除いたサンプルでも同様な不安定な三量体構造を示したことから、OsHXK6 は、条件下によっては、弱いながらも三量体を形成する可能性が考えられた。しかし、ヘキソキナーゼは単量体の構造が一般的に報告されていることから、OsHXK6 の不安定な三量体は結晶中でのみ見られた構造と考えている。OsHXK6 の単量体構造 (MolA) は、基質である D-グルコースが結合した AtHXK1 の構造と非常に良く似ており、閉じた構造を示した。ヘキソキナーゼは基質との結合により open 型から closed 型の構造をとることが報告されているが、D-グルコースが結合した OsHXK6 も、図 5. の淡い黄色で示した Thr202 と Lys203 を含む領域 (His102-Val1236) が基質に近づいた閉じた構造を示していた (図 5.)。

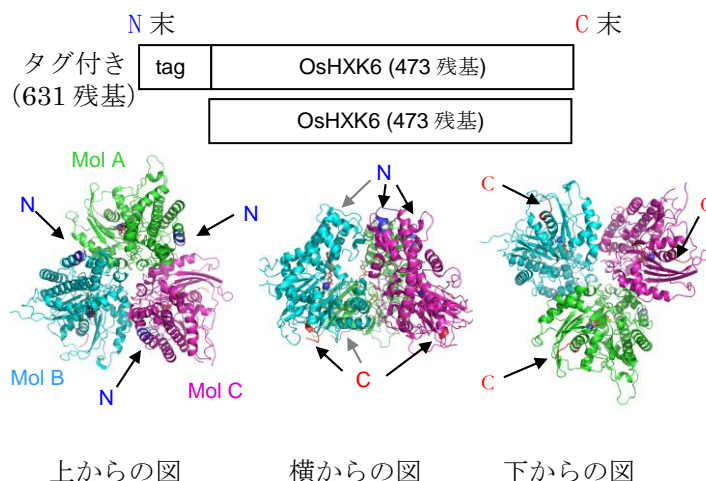


図 4 結晶化に用いられた OsHXK6 のコンストラクトと結晶中に見られた OsHXK6 の構造  
N 末端は青色、C 末端は赤色で表示

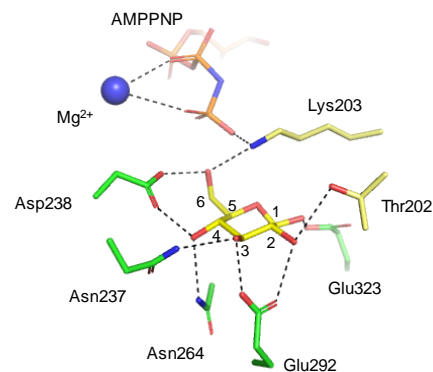
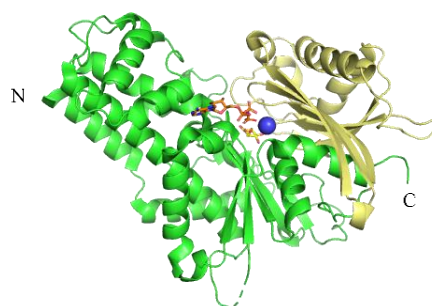


図 5 グルコース、AMPPNP、Mg が結合した OsHXK6 (PDBID:5ZQT, 閉じた構造) と、グルコースが結合した活性部位

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- (1) [Hiromi Yoshida](#), [Akihide Yoshihara](#), Pushpa Kiran Gullapalli, Kohei Ohtani, [Kazuya Akimitsu](#), [Ken Izumori](#) and [Shigehiro Kamitori](#), "X-ray structure of *Arthrobacter globiformis* M30 ketose 3-epimerase for the production of D-allulose from D-fructose.", *Acta crystallogr F* 74(10), 669-676, (2018), doi: 10.1107/S2053230X18011706
- (2) [Hiromi Yoshida](#), [Akihide Yoshihara](#), Tomohiko Ishii, [Ken Izumori](#) and [Shigehiro Kamitori](#), "X-ray structures of the *Pseudomonas cichorii* D-tagatose 3-epimerase mutant form C66S recognizing deoxy sugars as substrates.", *Appl Microbiol Biotechnol*, 100(24), 10403-10415, (2016), DOI: 10.1007/s00253-016-7673-7

[学会発表] (計 10 件)

- ① [吉田裕美](#), [吉原明秀](#), [加藤志郎](#), [望月 進](#), [秋光和也](#), [何森健](#), [神鳥成弘](#), 「*Methylomonas* sp. 由来 D-アルロース 3-エピメラーゼの発現と構造解析」2019 年度農芸化学学会大会, 2019 年 3 月 24 日, (東京)
- ② [Hiromi Yoshida](#), [Akihide Yoshihara](#), Pushpa kiran Gullapalli, Kouhei Ohtani, [Kazuya Akimitsu](#), [Ken Izumori](#) and [Shigehiro Kamitori](#), "X-ray structure of *Arthrobacter globiformis* M30 ketose 3-epimerase which is useful for D-allulose production", July 9, 2018, 43rd FEBS Congress (Prague, Czech Republic)
- ③ [吉田裕美](#), [松平一志](#), [望月 進](#), [何森健](#), [秋光和也](#), [神鳥成弘](#), 「希少糖 D-allose を基質

- とするイネ由来ヘキソキナーゼ6のX線結晶解析」2018年度農芸化学会大会, 2018年3月16日, (名古屋)
- ④ 吉田裕美, 松平一志, 望月 進, 何森健, 秋光和也, 神鳥成弘, 「希少糖 D-allose に作用するイネ由来ヘキソキナーゼ6のX線結晶構造解析」第17回日本蛋白質科学会年会, 2017年6月22日, (仙台)
  - ⑤ 吉田裕美, 吉原明秀, Pushpa Kiran Gullapalli, 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-アルロース 3-エピメラーゼの基質複合体構造解析」2017年度農芸化学会大会, 2017年3月19日, (京都)
  - ⑥ Hiromi Yoshida, Akihide Yoshihara, Pushpa kiran Gullapalli, Kouhei Ohtani, Kazuya Akimitsu, Ken Izumori and Shigehiro Kamitori, “Crystal structure of L-rhamnose isomerase from Arthrobacter globiformis”, November 26, 2016, Rare Sugar Congress 2016 (Kagawa, Japan)
  - ⑦ Shigehiro Kamitori, Hiromi Yoshida, Akihide Yoshihara, Kouhei Ohtani, Kazuya Akimitsu and Ken Izumori, “X-ray Structures of Enzymes for Production of Rare Sugars”, November 25, 2016, Rare Sugar Congress 2016 (Kagawa, Japan)
  - ⑧ Hiromi Yoshida, “Crystal Structures of the sugar epimerase for rare sugar production in complexes with deoxy sugars~ Crystal structures of Pseudomonas cichorii D-tagatose 3-epimerase C66S in complexes with deoxy sugars~”, October 21, 2016, International Symposium Space Science of High Quality Protein Crystallization Technology (SSPC) (Tokyo, Japan)
  - ⑨ 吉田裕美, 「希少糖生産関連酵素のX線結晶解析」日本農芸化学会中四国支部第45回講演会, 2016年6月11日, (香川)
  - ⑩ 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, 「微小重力環境で得られた希少糖生産酵素 L-rhamnose isomerase 変異酵素の結晶を用いたデオキシ希少糖複合体の構造」第16回日本蛋白質科学会年会, 2016年6月7日, (福岡)

[その他]

ホームページ等

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) 研究分担者

研究分担者氏名: 神鳥 成弘

ローマ字氏名: KAMITORI shigehiro

所属研究機関名: 香川大学

部局名: 総合生命科学研究センター

職名: 教授

研究者番号 (8桁): 00262246

研究分担者氏名: 吉原 明秀

ローマ字氏名: YOSHIHARA akihide

所属研究機関名: 香川大学

部局名: 国際希少糖研究教育機構

職名: 准教授

研究者番号 (8桁): 40548765

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名: 何森 健

ローマ字氏名: IZUMORI ken

研究協力者氏名: 秋光 和也

ローマ字氏名: (AKIMITSU kazuya)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。