

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570108
 研究課題名（和文） 立体構造に基づく臨床検査用酵素の機能改変と機能発現機構の解明
 研究課題名（英文） Protein engineering of the enzymes for clinical analysis based on their three dimensional structures
 研究代表者
 伊藤 潔（ITO KIYOSHI）
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科（薬学系）・准教授
 研究者番号：50201926

研究成果の概要：糖尿病治療時のケトン体の測定試薬として有用な D-3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素（HBDH）について、基質結合と触媒反応に重要なクローズド型構造を再現できるシステムを見だし、その結晶構造と構造変化に重要なアミノ酸残基を解明することができた。また、腎機能の指標として重要なクレアチニンを測定するためのキー酵素であるクレアチナーゼの基質認識に関わる2つの重要なトリプトファン残基の役割を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
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：タンパク質と酵素

1. 研究開始当初の背景

開始当初は、2種類の臨床検査用酵素「D-3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素（HBDH）」と「クレアチナーゼ」について、初めてそれらの立体構造を X線結晶構造解析法を用いて明らかにしたところで、さらに基質との詳細な相互作用を調べるために本研究課題に着手した。前者（HBDH）は、糖尿病治療時のケトン体の測定試薬であり、後者はクレアチニンの定量用検査試薬で、腎機能検査の目的で使用される酵素である。

HBDH は SDR（短鎖型脱水素酵素／還元酵素）ファミリーに属する酵素である。SDR ファミリーの酵素の構造の報告は毎年増加傾向に

あり、様々な基質に対応するきわめて多様性に富んだファミリーであることが確認される一方、酵素の基本骨格は非常によく似ていることが確立されている。SDR ファミリー酵素は、その基質が多様であるばかりでなく、触媒する反応も単純な酸化還元反応だけでなく、異性化等を含む多様なものである。生物が非常に便利に、様々な反応に利用してきた SDR 酵素であるので、細胞外で我々が検査試薬としての利用を含めた特定の分野において便利に利用できる可能性も秘めている。そのためには基質認識機構と反応機構の詳細を知る必要がある。HBDH のように単純な基質分子のアルコール／ケトンの酸化還元反

応を触媒する SDR 酵素については、基質結合に伴うループ部分の構造変化（オープン型-クローズド型のコンフォメーション変化）が知られており、この構造変化が反応のキーであるが、両コンフォメーションの変化を簡単に再現できるシステムは多くはなく、HBDH についてもクローズド型構造の詳細は不明であった。ただし、これまでの研究から、D-3-ヒドロキシ酪酸 (D3HB) に厳密な基質特異性を示し、L-3-ヒドロキシ酪酸 (L3HB) には作用せず、試した中では唯一、L-スレオニンにのみ、極めて低いながら活性を示すことが明らかとなっている。HBDH は、基質のカルボキシル基と 3 位メチル基を認識、固定して基質を結合することを、競合阻害剤であるカコジル酸との複合体の結晶構造から推定している。基質結合によって基質結合ループと呼ばれる領域が基質を覆うように閉じる変化（オープンクローズドの変化）が生じ、両端を固定された基質の 3 位水酸基は活性中心である Tyr155 の水酸基に配向され、厳密な立体特異性が確立されることを推定していた。

クレアチナーゼはヤッフエ法という化学的な測定法に替わり、急速に用いられるようになってきた酵素法の中心となる酵素である。ヤッフエ法は、安価で簡便なため広く用いられてきた方法であるが、特異性に問題があり、真のクレアチニン値よりも高い値が出るというデメリットがあるため酵素法を用いることが推奨されている。申請者らは 2 個の亜鉛イオンを含む金属酵素であるクレアチナーゼを、マンガンイオンを含む溶液で透析すると、活性が上昇すると同時に安定性が増すことを認めており、結晶構造解析の結果から一方の亜鉛イオンがマンガンイオンに置換されていることを明らかにした。しかしながら、クレアチナーゼの基質あるいは阻害剤との複合体の構造はまだ報告されておらず、クレアチニンに対する K_m 値が 50 mM とやや高い点などを改良していくためには基質認識機構の詳細を明らかにする必要がある。クレアチナーゼの立体構造については、ドイツのグループが我々とほぼ同時に報告したが、その他はクレアチニンの測定方法に関する文献が散見されるのみで、基質認識機構の詳細は不明であった。

2. 研究の目的

臨床検査試薬としての酵素を材料として、各酵素と基質あるいは阻害剤との複合体の結晶構造を解析して、酵素による生体成分の分子認識戦略を解明することを目的とする。

類似基質に作用して同種の反応を触媒する酵素の基質認識と反応機構を詳細に解析する。それぞれの酵素の基質認識機構を比較することで、生物が獲得してきた、ある特定化学構造の分子認識ストラテジー、特に大きな

多様性を示す SDR ファミリー酵素のストラテジーを明らかにできると考える。

臨床検査試薬としての酵素には、基質特異性が極めて重要である。HBDH、スレオニン脱水素酵素およびセリン脱水素酵素の基質認識機構における共通点、相違点を明らかにするための研究を行ない、酵素による生体成分の分子認識戦略を解明することで、高機能酵素試薬の創製のための基礎を築くのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

研究の目的を達成するため、主に 4 つの酵素「D-3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素 (HBDH)、スレオニン脱水素酵素 (ThrDH)、セリン脱水素酵素 (SerDH)、クレアチナーゼ」を材料として以下の実験を行った。

(1) HBDH について、これまでの研究から推定している基質の認識機構に重要な役割を果たす全てのアミノ酸残基の部位特異的変異体を作製し、酵素活性の測定から推定した基質認識機構が正しいことを確認する。

①カルボキシル基を認識するアミノ酸残基の同定と解析

カルボキシル基は、Lys152、His144、Gln94 によって認識されると考えられるので、K152R、K152A、K152E、H144A、Q94A、Q94E、Q94N の変異体を作製して各アミノ酸残基の役割を確認する。

②メチル基を認識するアミノ酸残基の同定と解析

メチル基認識は、2 つの Trp 残基 (Trp187、Trp257) を中心に Ala143、His144、Gly186 によって形成される疎水ポケットによって認識されると考えられるので、各 Trp 残基の Phe および Ala 変異体を作製する。他のアミノ酸残基については Ala への変異体、Ala143 については Phe、Ser への変異を試みる。

③基質によって誘導されるコンフォメーション変化に関わるアミノ酸残基の同定と解析

構造変化の際に蝶番の中心として機能すると推定した Thr190 および Leu215 について、T190A、T190S、T190C 等の変異体および L215A、L215V の変異体を作製して確認する。

(2) HBDH のクローズド型コンフォメーションの解明

①本来の基質である D-3-ヒドロキシ酪酸 (D3HB) との複合体結晶を作製するため、活性中心の Tyr155 を Phe に置換した酵素を作製して X 線結晶構造解析により複合体の構造を決定する。

②基質の立体異性体で、競合阻害剤である L-3-ヒドロキシ酪酸 (L3HB) との複合体結晶を作製し、その結晶構造を決定する。

③Thr190 および Leu215 の変異体についても

結晶構造解析を行い、L3HB 存在下と非存在下の構造を決定する。

(3) L-スレオニン脱水素酵素およびセリン脱水素酵素の遺伝子を大腸菌よりクローニングし、酵素の発現系を構築する。発現酵素を精製して結晶化、構造解析を試みる。

(4) クレアチニナーゼについて、基質結合に関わると推定している 2 つの Trp 残基 (Trp154 と Trp174) の部位特異的変異体、および PCR を利用したランダムな変異導入を行い、活性の評価と結晶構造解析を行う。さらに、変異体の結晶構造解析結果に基づき、新たな変異を導入し、高機能酵素の獲得を試みる。

4. 研究成果

(1) 部位特異的変異体の解析

すでに提唱している基質認識機構 (図 1) を証明するため、様々な部位特異的変異体の酵素活性を測定して速度論定数を算出した。Gln94、His144、Lys152 を Ala へ置換した変異体の酵素活性は著しく低下したが、K152R 変異体の活性は有意に保持されたことから、基質のカルボキシル基は、これらとの相互作用で認識されると考えられる。また、Trp187、Trp257 の Ala 変異体の酵素活性も著しく低下した。これらの Trp 残基は 3 位のメチル基を収納する疎水ポケットを形成する疎水性アミノ酸で、他の細菌由来 HBDH のアミノ酸配列上においても強く保存されていることから、提唱した機構が正しいことがわかった。

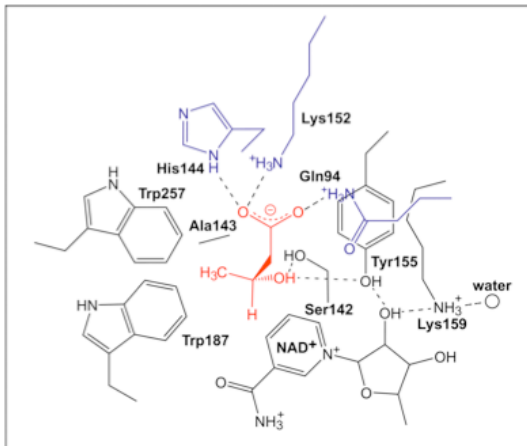


図 1. 提唱した基質認識機構

(2) クローズド型コンフォメーションの解明

クローズド型酵素の結晶構造を得るためにはカコジル酸に代わる基質/阻害剤の添加が必要であるが、D3HB 存在下では反応が進行してしまうため、基質の結合した結晶構造を得ることができない。本酵素は、基質として

D3HB に厳密な立体特異性を示すが、その鏡像異性体である L3HB も、D3HB に対する K_m 値に匹敵する K_i を有する競合阻害剤として働くことから、基質と同様の相互作用が生じていると考えられる。そこで、カコジル酸フリーの結晶下条件を検索し、L3HB と NAD⁺存在下で複合体結晶を作製した。得られた 3 者複合体の結晶構造は図 2 に示すようにクローズド型で、基質結合ループ部分の構造も明らかになった。すなわち、競合阻害剤である L3HB が HBDH のクローズド型構造を誘導したのである。



図 2. HBDH-NAD⁺-L3HB のクローズド型構造

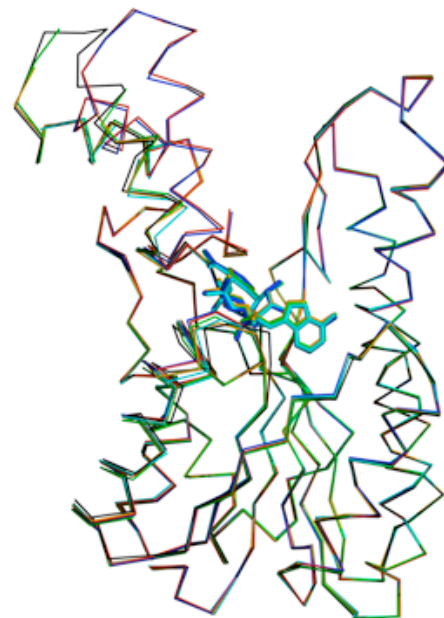


図 3. HBDH-NAD⁺の構造 (主にオープン型)

L3HB 非存在下、NAD⁺のみの 2 者複合体の構造は図 3 に示すように基本的にオープン型であり、安定なクローズド型構造の形成には

基質／阻害剤の結合が必要であることも示唆された。

基質／阻害剤の結合部位を比較したものを Fig. 4 に示すが、L3HB によって誘導されるクローズド構造では、動くヘリックス上の Gln196 が、基質／阻害剤のカルボキシル基と水素結合を形成していた。安定な三者複合体の形成には、この Gln196 が必要で、HBDH 配列間で厳密に保存されている。基質／阻害剤のヒドロキシル基と Tyr155 間の水素結合も形成されており、基質／阻害剤と酵素間にはいくらかのゆとりがあることが観察された。この基質結合ポケットのゆとりが酵素と L3HB の結合を可能にし、カコジルの結合も可能にしていると考えられる。しかしながら、カコジルの負電荷は Gln196 と相互作用できず、安定なクローズド型コンフォメーションを形成することができなかつたと考えられる。

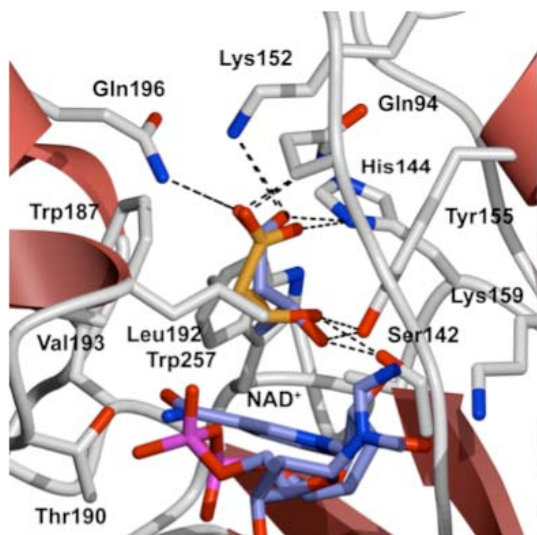


図4. L3HB (青) と D3HB (黄) の結合様式

基質結合ループのコンフォメーション変化の際にヒンジとして機能すると考えられた Thr190 と Leu215 の変異体についてその酵素活性を測定した。T190S 変異体の活性は野生型に対し有意に保持されたが、T190A 変異体では野生型の 0.1%にまで活性が減少した。さらに、L3HB と NAD+存在下で作成したそれぞれの結晶の構造を解析した結果、どちらの複合体結晶構造もサブユニットの基質結合部分の構造は不明瞭であったが、T190S 変異体は全てクローズド型であったのに対し、T190A 変異体はオープン型として存在していたことから、コンフォメーション変化における Thr190 の重要性を明らかにすることができた。NAD+ と Thr190 の水素結合を主とした相互作用が、酵素のオープン-クローズドコンフォメーション変化において重要な因子であると考えられる。

(3) ThrDH および SerDH の構造解析

両酵素ともに基質特異性を確認することができた。SerDH については結晶を得ることに成功し、現在放射光施設で収集したデータを元に構造解析を進めているところである。一方、ThrDH については、構造解析のための良好な結晶を得ることはできていないので、引き続き結晶化の努力をしている。

(4) クレアチニナーゼの基質結合に関わる2つのトリプトファン残基の役割

W154A 変異体の活性は検出できず、W154F、W174F 変異体の kcat/KM 値は野生型の約 0.3%、40%まで低下していた。特に Trp154 変異による活性の低下が顕著であった。

W154A、W174F 変異体構造を X 線結晶構造解析により決定した結果、Trp174 を含むループ領域がオープン-クローズド型の構造変化を起こすことが明らかとなった。W154A、W174A 変異体の構造は、オープン型であり、その全体構造はループ部分を除いて野生型の構造によく一致する (図5)。W154A 変異体では、基質結合ポケットの側面に大きな空洞が存在していた。そのため基質が固定できなくなり、疎水環境が崩れ酵素活性の低下が起きたものと推測される。また W174F 変異体では、基質が結合しクローズド型に構造変化した時、Phe 残基は基質結合ポケットを十分に覆うことができないと考えられる。したがって、活性部位の疎水的な環境が触媒反応に重要であると考えられた。

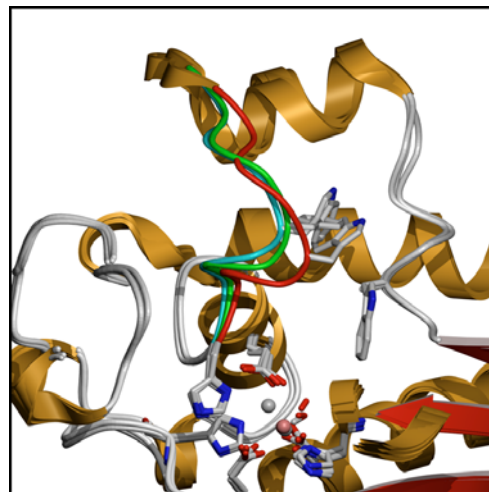


図5. クレアチニナーゼの基質結合部位の構造。中央のループ部分は、野生型 (赤色)、W154A 変異体 (水色)、W174F 変異体 (緑色)

腎機能検査試薬として、クレアチニナーゼは広く使用されている。今後は基質認識と触媒反応機構の解明、変異体酵素の反応速度論的解析を行い有用性の高い検査試薬の開発を目指す予定である。

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 3 件)

1. Kanako Nakashima, Kiyoshi Ito, Yoshitaka Nakajima, Ryuji Yamazawa, Syunsuke Miyakawa, and Tadashi Yoshimoto.
Closed Complex of the D-3-Hydroxybutyrate Dehydrogenase Induced by an Enantiomeric Competitive Inhibitor.
J. Biochem., (査読有) 145 (4), 467-479 (2009)
2. Yoshitaka Nakajima, Kiyoshi Ito, Tsubasa Toshima, Takashi Egawa, Heng Zheng, Hiroshi Oyama, Wu Yu-Fan, Eiji Takahashi, Kiyoshi Kyono, and Tadashi Yoshimoto
Dipeptidyl Aminopeptidase IV from *Stenotrophomonas maltophilia* Exhibited an Activity against Substrate Containing 4-Hydroxyproline Residue.
J. Bacteriol., (査読有) 190 (23), 7819-7829 (2008)
3. Yue Xu, Yoshitaka Nakajima, Kiyoshi Ito, Heng Zheng, Hiroshi Oyama, Ulrich Heiser, Torsten Hoffmann, Ulf-Torsten Gärtner, Hans-Ulrich Demuth, and Tadashi Yoshimoto
Novel Inhibitor for Prolyl Tripeptidyl Aminopeptidase from *Porphyromonas gingivalis* and Details of Substrate-Recognition Mechanism.
J. Mol. Biol., (査読有) 375 (3), 708-719 (2008)

[学会発表] (計 15 件)

1. 伊藤潔、他 6 名：D-3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素変異体の X 線結晶構造解析、日本薬学会第 129 年会、平成 21 年 3 月 26 日、京都市
2. 中島可奈子、伊藤潔、他 7 名：L-3-ヒドロキシ酪酸によって誘導された D-3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素のクローズド型構造、第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学会年会合同大会、平成 20 年 12 月 9 日、神戸市
3. 中嶋義隆、伊藤潔、他 7 名：クレアチニナーゼの触媒機構と基質認識に関与する 2 つの Trp 残基の役割、第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学会年会合同大会、平成 20 年 12 月 9 日、神戸市
4. 松下隼士、伊藤潔、他 5 名：クレアチニ

ナーゼ変異体の X 線結晶構造解析と基質結合、第 25 回日本薬学会九州支部大会、平成 20 年 12 月 7 日、延岡市

5. 宮川俊介、伊藤潔、他 5 名：D-3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素の部位特異的変異体を用いた基質結合機構の解析、第 15 回日本生物工学会九州支部大会、平成 20 年 12 月 6 日、熊本市
6. 山下絹代、伊藤潔、他 5 名：クレアチニナーゼの酵素活性に関与する Trp174 の役割、平成 20 年度日本農芸化学会西日本支部大会、平成 20 年 9 月 20 日、長崎市
7. 宮川俊介、伊藤潔、他 6 名：D-3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素の Thr190 変異体の構造解析、平成 20 年度日本農芸化学会西日本支部大会、平成 20 年 9 月 20 日、長崎市
8. 平尾理恵、伊藤潔、他 8 名：タンパク質工学的手法によるクレアチニナーゼの基質親和性改良、第 60 回日本生物工学会大会、平成 20 年 8 月 27 日、仙台市
9. 伊藤潔、他 4 名：D-3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素と L-3-ヒドロキシ酪酸との複合体構造、日本薬学会第 128 年会、平成 20 年 3 月 28 日、横浜市
10. 中島可奈子、伊藤潔、他 6 名：D-3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素の基質認識機構について、第 80 回日本生化学会大会・第 30 回日本分子生物学会年会合同大会、平成 19 年 12 月 11 日、横浜
11. 武吉智也、伊藤潔、他 4 名：Streptococcus 由来プリンヌクレオシドホスホリラーゼの構造と基質特異性、第 24 回日本薬学会九州支部大会、平成 19 年 12 月 9 日、福岡市
12. 中島可奈子、伊藤潔、他 4 名：D-3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素のクローズド型構造、第 14 回日本生物工学会九州支部大会、平成 19 年 12 月 1 日、長崎市
13. 山澤龍治、伊藤潔、他 4 名：大腸菌スレオニン脱水素酵素の基質特異性、第 14 回日本生物工学会九州支部大会、平成 19 年 12 月 1 日、長崎市
14. 伊藤潔、他 3 名：感染症予防治療薬の開発を目指した構造生物学、第 59 回日本生物工学会大会 シンポジウム (バイオテクノロジーへの応用的戦略を踏まえたタンパク質構造解析)、平成 19 年 9 月 26 日、東広島市
15. 伊藤潔、他 4 名：D-3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素の部位特異的変異体の解析、平成 19 年度日本生化学会九州支部例会、平成 19 年 5 月 20 日、宮崎市

[図書] (計 1 件)

芳本忠、伊藤潔、中嶋義隆：構造生物学 -

ポストゲノム時代のタンパク質研究- (倉光, 杉山編), pp.133-140 (腎機能を知るためのタンパク質), 共立出版 (2007)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 潔 (ITO KIYOSHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科 (薬学系)・准教授

研究者番号: 50201926

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

研究協力者

芳本 忠 (YOSHIMOTO TADASHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科 (薬学系)・教授

研究者番号: 60088870

中嶋義隆 (NAKAJIMA YOSHITAKA)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科 (薬学系)・助教

研究者番号: 80372770