

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 17 日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780106

研究課題名(和文)新規診断酵素開発を目指したフラビン酵素の立体構造と機能に関する研究

研究課題名(英文) Study for structure and function of a flavoenzyme designed to a novel diagnostic enzyme

研究代表者

中嶋 義隆 (NAKAJIMA, Yoshitaka)

摂南大学・理工学部・准教授

研究者番号：80372770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：A. oryzae由来D-グルコース脱水素酵素(GDH)は、FAD依存的にグルコースをグルコノ-1, 5-ラクトンへと酸化する酵素である。血糖値のモニタリングでよく利用されるD-グルコース酸化酵素(GOX)と異なり、GDHにおける還元型FADは、酸素に対する応答性が低いいため、GDHは血糖センサへの利用が期待されている。同じGMC酸化還元酵素ファミリーに属し、29%の配列相同性を示すGDHとGOXにおける酸素に対する応答性の違いやグルコースだけでなくキノースには弱い反応性を示すGDHの基質特異性が、両者のどのような分子構造の違いに由来するか興味があり、X線結晶学的手法を用いて研究した。

研究成果の概要(英文)：FAD-dependent D-glucose dehydrogenase [GDH, EC 1.1.99.10] from A. oryzae catalyzes a reaction from D-glucose to D-glucono-1, 5-lactone using FAD as a cofactor. During the oxidative half-reaction, the reduced FAD is re-oxidized by electron acceptors, for instance 2, 6-dichlorophenol-indophenol and p-benzoquinone. It is expected that GDH would be utilized as a diagnostic enzyme for a biosensor that monitors the blood glucose level of diabetic patients. On the other hand, FAD-dependent D-glucose oxidase [GOX, EC 1.1.3.4] from A. niger, which shows a sequence identity of 29% with the GDH, catalyzes the same reductive half-reaction but different oxidative half-reaction; the reduced FAD is re-oxidized by O₂. An oxygen reactivity of GDH is slower than that of GOX. To clarify the catalytic-reaction and substrate-binding mechanisms of GDH and how structural features govern the oxidative half-reaction between GDH and GOX, we investigated the GDH using X-ray crystallography.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：グルコース脱水素酵素 フラビン酵素

1. 研究開始当初の背景

FAD 依存型 D-グルコース脱水素酵素 (GDH, EC 1.1.99.10) は、グルコース-メタノール-コリン酸化還元酵素ファミリー (GMC 酸化還元酵素ファミリー) に属する糖タンパク質である。非共有結合的に酵素タンパク質に結合した FAD を補酵素として、D-グルコースから D-グルクロン-1, 5-ラクトンへの酸化反応を触媒する。この反応に伴って生じた還元型 FAD は、2, 6-ジクロロフェノールインドフェノール (DCPIP) や *p*-ベンゾキノンなどの電子受容体によって再酸化される。本酵素は 1937 年 Ogura と Nagahisa によって最初に報告され、1966 年に Bak と Sato によって酵素学的な研究が行われていたものの長らく注目されていなかった。

一方、1928 年に Müller によって *Aspergillus niger* と *Penicillium galucum* から発見された FAD 依存型グルコース酸化酵素 (GOX, EC 1.1.3.4) は、同じ GMC 酸化還元酵素ファミリーに属する二量体酵素である。FAD を補酵素として、GDH と同じ酸化反応を触媒する。しかしながら GDH と異なり、還元された FAD は酸素によって再酸化される。この酸素によって容易に再酸化されるという簡便さから、GOX とペルオキシダーゼを組み合わせ、糖尿病の診断に必要な尿糖検査の検査紙や尿糖値や血糖値の測定キットとして広く利用されている。そのため変異体酵素を用いた研究などその酵素学的性質についてよく研究されており、1993 年には Kalisz らによって *A. niger* 由来酵素の結晶構造が明らかにされている。

近年、臨床診断には迅速で正確かつ簡便な測定が求められている。GOX を利用した糖濃度測定用バイオセンサーの開発が進められているが、酸素と容易に反応する GOX では正確な濃度測定が難しい。一方、酸素との反応性が低い GDH はこの点で非常に有利であるため、近年再び注目されてきた。

2. 研究の目的

我々は、*A. oryzae* 由来 GDH の組換え酵素を用いた結晶化から、X 線結晶構造解析に適した結晶を作製することに成功した。GOX の構造 (PDB code: 1CF3) を用いた分子置換法から初期位相を決定し、1.5 Å 分解能で GDH の結晶構造 (図 1) を初めて明らかにした。GDH の構造は GOX の構造に極めてよく似ており、そのフォールディング様式はほとんど同じであった。特に FAD 結合部位の構造は、ほとんど一致する。一方、フラビン環周辺の活性部位の主鎖に若干の構造の違いが見られた。両者は、よく似た構造を持つにも関わらず、酸素への反応性が大きく異なっている。どのような立体構造の違いが、酸化酵素と脱水素酵素を決定づけているのか非常に興味がある。

還元的半反応においても、GDH は GOX と異なり、グルコースだけでなくキシロースに

対する弱い活性を示す。これら酸化的半反応や還元的半反応における GDH の反応機構と基質認識機構の詳細を明らかにするための研究をおこなった。

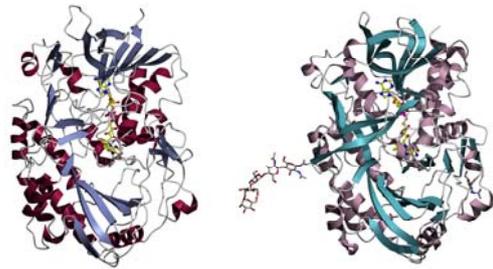


図 1. GDH と GOX のサブユニット構造
GDH (左) と GOX (右, PDB code: 1CF3)

3. 研究の方法

これまでの研究において、酸化型 GDH の結晶構造だけでなく、還元型 GDH、並びに還元型 GDH と基質 D-グルコースとの複合体 (還元型 GDH-基質複合体) の結晶構造を 1.65 と 1.80 Å 分解能で明らかにした。しかしながら、基質複合体における D-グルコースは、触媒反応が進行しえないと考えられる配向で活性部位に結合していた。そこで、2. の目的を達成するために、まず GDH と阻害剤である D-グルカールとの複合体結晶を作製し、この阻害剤複合体の結晶構造を明らかにすることで、実際の基質結合を模した構造から、本来、どのような基質の認識機構をもつのか明らかにする。

加えて、変異体の作製と反応速度論解析、その変異体の X 線結晶構造解析から、酸化的半反応の触媒メカニズムについて研究する。この変異体を用いた研究は、現在、継続中である。そこで、ここでは、グルコースを基質とした反応について、その詳細を報告する。

4. 研究成果

今回、*p*-ベンゾキノンによる再酸化型 GDH、酸化型 GDH と D-グルカールとの複合体 (酸化型 GDH-阻害剤複合体) および、還元型 GDH と D-グルカールとの複合体 (還元型 GDH-阻害剤複合体) を、それぞれ、1.20、1.80、1.40 Å 分解能で構造決定することに成功した。

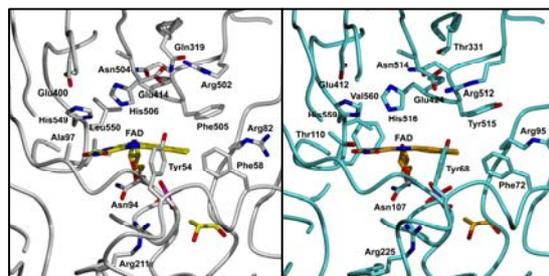


図 2. GDH と GOX の活性部位

GDH (左) と GOX (右) の活性部位を示す。活性部位に結合した FAD のイソアロキサジン環部分は、GDH で約 20°、GOX で約 10°平面構造から歪んでいる。

GDHとGOXの活性部位の比較から、GDHのFADのイソアロキサジン環周辺の残基の種類と配置は、GOXと非常によく似ていた(図2)。しかしながら、大きな違いとして、補酵素FADのコンホメーションの違いが挙げられる。電子密度図からGDHのイソアロキサジン環平面は、N5-N10を軸として折れ曲がったバタフライ型コンホメーションをとることが明らかとなった。報告されているGOXでも同様の傾向が見られるが、イソアロキサジン環平面の歪みは約 10° であるのに対して、GDHは約 20° と歪みが大きかった。また還元型GDHでもFADは同様の構造を持つことが見いだされた。今回、決定した再酸化型GDHの分子構造は、全体構造だけでなく、活性部位のFADのコンホメーションにいたるまで、酸化型GDHの分子構造とよく一致していた。即ち、GDHにおけるFADのイソアロキサジン環のコンホメーションは、触媒反応を通じて、バタフライ型コンホメーションを保持していると強く推定される。フラビン酵素において、このバタフライ型コンホメーションは、還元型酵素で見られるものの、酸化型酵素では、比較的珍しい構造である。我々は、酸化酵素と脱水素酵素の違いがこのFADのコンホメーションの違いにあるのではないかと推定した。このFADのイソアロキサジン環を歪ませるタンパク質部分、即ち、FAD周辺のループ構造が酸素に対する応答性の違いに寄与すると考えられる。

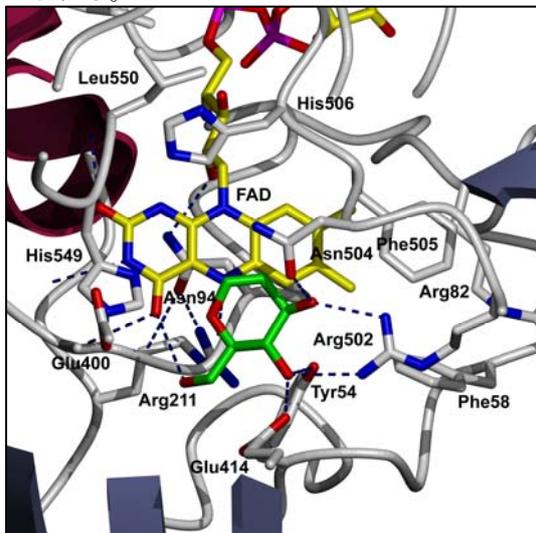


図3. 酸化型GDH-阻害剤複合体の活性部位
活性部位のリボン-スティック図、アミノ酸側鎖をCPKカラーでFADの炭素を黄色、阻害剤の炭素を緑で示した。

GDHの還元型半反応では、GOXで提唱されているように活性部位に結合したD-グルコース1位のOH基がFADの*re*面側に存在するHis506とHis549に認識され、これらが触媒塩基としてプロトンを引き抜くと同時に、1位の水素がFADへと転移することで、反応が進行すると考えられている。酸化型

GDH-阻害剤複合体並びに還元型GDH-阻害剤複合体の活性部位には、D-グルカルとみなされる電子密度図が確認できた。図3のように、活性部位FADのN5位の*re*面側直上にD-グルカールの1位炭素が存在し、3位OH基がGDHのArg502とAsn504側鎖、4位OH基は、同様にTyr54、Glu414とArg502側鎖と水素結合を形成できる距離に存在した。とりわけ、Glu414とArg502の側鎖コンホメーションが大きく変化し、阻害剤を認識していた。阻害剤の位置に基づいて、基質結合モデルを作製すると基質の1位OH基が2つのHisと水素結合を形成でき、さらに1位水素がFADへと転移できる距離にあることが判明した。即ち、このD-グルカールの結合様式は、還元型GDH-基質複合体におけるD-グルコースと異なり、反応が進行すると考えられる配向で結合している。

GDHは、GOXと異なり、キシロースに対しても弱い活性を示す。キシロースとグルコースを比較すると、キシロースは、グルコースの5位官能基を欠損した構造である。阻害剤複合体におけるD-グルカールの6位OH基は、イソアロキサジン環の4位カルボニル酸素と水素結合を形成するものの、タンパク質側鎖との相互作用は見つからなかった。つまり、基質の認識は、3位や4位のOH基の認識が主である。GOXで相当する残基として、Asp414とArg512が保存されている。GDHでは基質結合のない場合、Glu414とArg502は、Asn319と水素結合を形成している。これらが基質の結合に伴って、大きなコンホメーション変化が導かれることが判明した。実際、阻害剤複合体におけるD-グルカールの3位と4位のOHは、基質阻害剤におけるD-グルコースの4位と3位のOH基とそれぞれ同じ方向に向いていたものの、その位置は一致しない。GDHでは、このずれを埋めるように、Glu414とArg502のコンホメーションが変化し、化合物を活性部位へつなぎとめていた。一方、GOXにおいて、GDHのAsn319に相当する残基はThr331であるが、この残基は、基質認識に関与するであろうAsp414やArg512との水素結合を形成していない。また、炭素鎖が1つ短いAsp414は、GOXにおけるGlu414ほど多様なコンホメーションをとれるわけではない。以上のことから、GDHにおける水素結合ネットワークの組換えを伴う基質認識残基のフレキシブルなコンホメーション変化が、グルコースだけでなく、キシロースにも反応を示す原因のひとつに挙げられるのではないだろうか。

今回、決定された酸化型GDH-阻害剤複合体、ならびに還元型GDH-阻害剤複合体の活性部位構造において、酸化型GDHと大きく異なる点は、FADのイソアロキサジン環*re*面直上に存在するHis506のコンホメーションである。この残基は、His549とともにグルコース1位の酸化において、1位OH基と水素結合を形成し、このOH基からプロトン

を引き抜く触媒塩基として働くと言唱されている。酸化型 GDH や還元型 GDH や還元型 GDH-基質複合体における His506 のコンホメーションは、これまで構造が知られている GMC ファミリの酵素でよくみられたコンホメーションをとり、これは GOX における His516 のコンホメーションとよく一致していた。ところが、酸化型 GDH-阻害剤複合体では、His506 の電子密度図は、広い範囲に大きく広がっていた。これは、結晶中の分子のすべてが同じコンホメーションではなく、His506 が 2 つのコンホメーションのいずれかをとっていると考えられた。その割合を見積もるとおよそ 1:1 と考えられる。このうち、一方は、酸化型 GDH の His506 の配向とよく一致するが、他方は、側鎖の二面角を見る限り、エネルギー的に不利なコンホメーションである。つまり、His506 は阻害剤の結合で立体的に不利なコンホメーションを強いられていると言える。さらには、還元型 GDH-阻害剤複合体の His506 のコンホメーションは、そのほとんどが、エネルギー的に不利なコンホメーションであった。His506 が、このコンホメーションをとる理由は、His506 のプロトン化の影響ではないかと推定される。即ち、基質と反応したことでプロトン化された His506 と D-グルカール間の立体障害のためにこのようなコンホメーションをとらなければならなかったのであろう。詳細な検討が必要であるが、このような His506 のコンホメーション変化は、これまでの研究で報告されておらず、非常に興味ある結果である。

今後も、バイオセンサーに適した酵素の開発を目指して、さらなる研究を通じて、新たな知見を明らかにしてゆく。

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)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

中嶋 義隆, 西矢 芳昭, 川南 裕, 北村 雅夫, 芳本 忠, 伊藤 潔「*A. oryzae* 由来 D-グルコース脱水素酵素の基質認識」第 66 回日本生物工学会大会 2014/09/09~11 札幌コンベンションセンター

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.setsunan.ac.jp/~bio/labo/nakajima.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中嶋 義隆 (NAKAJIMA YOSHITAKA)

摂南大学・理工学部・准教授

研究者番号：80372770

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者