

D-3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素の立体特異的基質認識機構の解明

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 中島 可奈子

【目的】

D-3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素 (HBDH: EC 1.1.1.30) は、短鎖型脱水素酵素/還元酵素 (SDR) ファミリーに属し、 NAD^+ を補酵素としてD-3-ヒドロキシ酪酸 (D-3-HB) のアセト酢酸への酸化反応を可逆的に触媒する酵素である。D-3-HB はアセト酢酸、アセトンと合わせてケトン体と呼ばれる。血中ケトン体濃度の急激な上昇は、1型糖尿病の重度の合併症であるケトアシドーシス (DKA) を引き起こす原因となるため、治療に際しケトン体量をモニターして予防することが推奨される。HBDHはそのための酵素試薬として利用できることから重要である。

SDR 酵素は多様性に富み、ステロイド、トロピノン、ソルビトールなど、構造が大きく異なる化合物それぞれに対応する酵素が存在している。いくつか知られている SDR 酵素の構造は、典型的なロスマンフォールドと特徴的な基質結合ループから構成されている。アミノ酸配列間の相同性は 15-30%と比較的低いが、立体構造は基質結合領域を除けば、非常に類似している。酸化還元酵素に分類される代表的な SDR 酵素の最も特徴的な性質は、基質結合の際に生じるコンフォメーション変化で、基質結合ループが基質を覆い隠すように大きく動くことで特異的な結合が完了し、触媒作用が進行すると考えられている。HBDHは他の SDR との相同性が 15%以下と低く、その立体構造も不明であった。ケトン体定量用酵素として本研究でクローン化した *Pseudomonas fragi* 由来の HBDH は、L-3-HB には全く活性を示さず D-3-HB に厳密な立体特異性を有していた。そこで、私は *P. fragi* 由来 HBDH を材料として、その立体特異的基質認識機構を構造生物学的解析および酵素学的解析によって解明することを目的とした。

【結果および考察】

第1章 D-3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素の結晶構造

簡便な定量法に適した HBDH としては、リン脂質要求性のない細菌由来の酵素が有利で、*P. fragi* 染色体 DNA より HBDH 遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現、精製したものを実験材料として用いた。種々の D-3-HB 類似化合物を用いて基質特異性を検討した結果、本酵素は、基質の β -ヒドロキシ酸構造と 3-メチル基の絶対配置に厳密な特異性を示し、D-3-HB のみを基質とすることがわかった。この機構を構造生物学的に理解することを目的として、X線結晶構造解析によりリガンドフリーHBDH とその NAD^+ 複合体の結晶構造を決定し

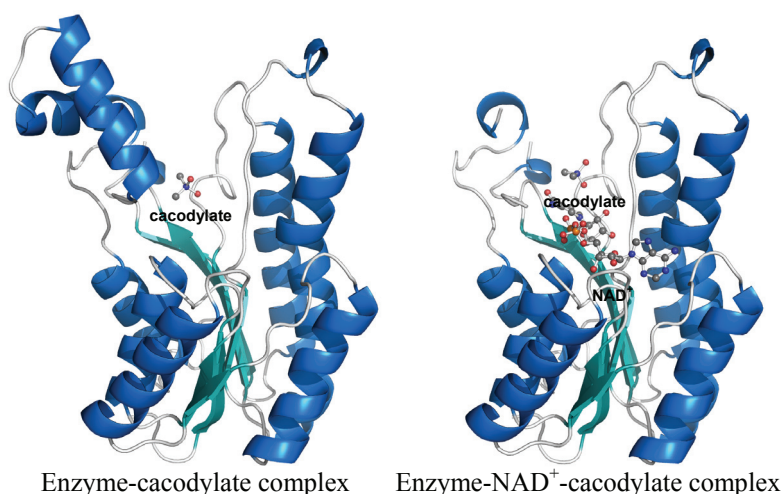


Fig. 1. HBDHのサブユニット構造

た。HBDHは四量体構造で、そのサブユニット構造をFig. 1に示す。決定した構造の活性部位には、結晶化緩衝液に含まれていたカコジル酸が結合していた。酵素-カコジル酸複合体の構造はオープン型で、そのNAD⁺複合体の構造は、クローズド型のコンフォメーションであったが、Pro191-Glu214から成る基質結合ループ領域の明確な電子密度は得られなかった。SDR酵素のループ領域は、NAD⁺非存在下では明確な電子密度が観察されず、NAD⁺複合体にのみ構造が確認できていることが多い。今回の実験で得た逆の結果は、後で競合阻害剤であることを証明したカコジル酸と、基質であるD-3-HBの構造上の違いにより、カコジル酸とループ領域との立体障害が起り、安定なクローズドコンフォメーションを形成できなかったためであると推定した。しかしながら、活性部位に結合したカコジル酸の位置をもとに、D-3-HBのモデルを構築することができ、基質のカルボキシル基と3-メチル基の両端がそれぞれ酵素との特異的な相互作用により固定されることで、3-ヒドロキシル基が活性中心のTyr155に配向するという基質認識機構を提唱した(Fig. 2)。このモデルにおいて、結合したD-3-HBの3-ヒドロキシル基のプロトンがTyr155によって引き抜かれ、3位の水素がNAD⁺のニコチンアミド環へヒドリド転移することで、立体特異的な脱水素反応が進行すると考えられ、L-3-HBでは3位の水素がニコチンアミド環と離れすぎるため脱水素反応が進行しないと説明することができる。

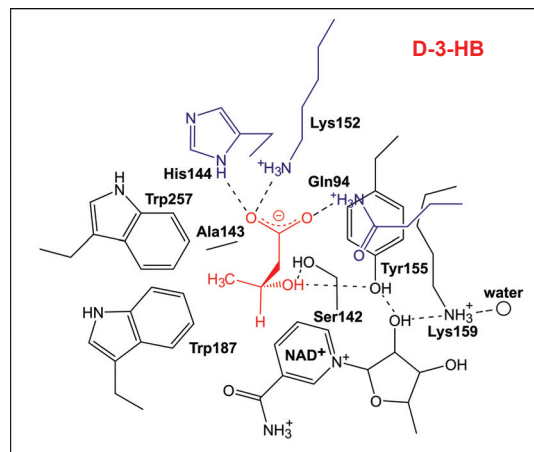


Fig. 2. 基質結合部位のモデル図

第2章 競合阻害剤であるL-3-HBはD-3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素のクローズド型構造を誘導する

第1章で提唱した基質認識機構を証明するため、まず、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、推定した通りこれらとの相互作用で認識されると考えられた。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、

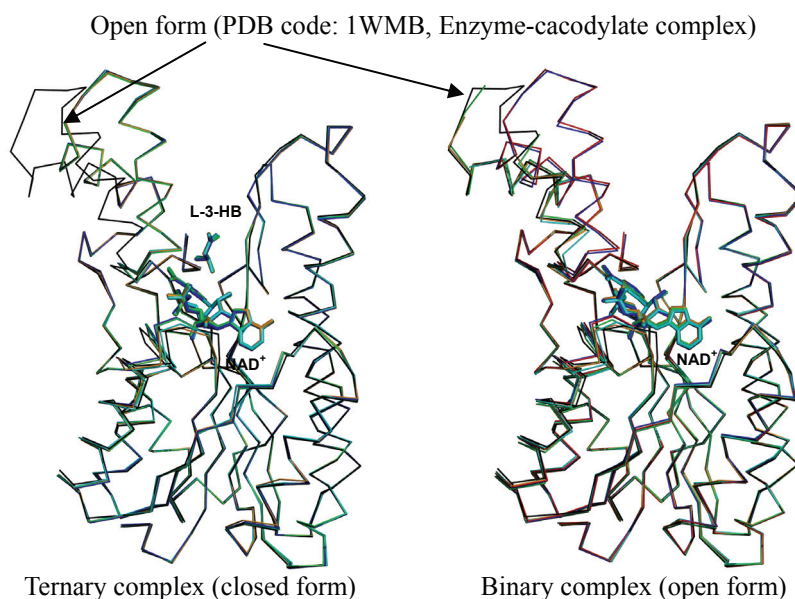


Fig. 3. オープン型とクローズド型構造

提唱した機構を支持していた。

クローズド型コンフォメーション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、D-3-HB 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、D-3-HB に厳密な立体特異性を示すが、その鏡像異性体である L-3-HB も、D-3-HB 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、L-3-HB と NAD^+ 存在下で複合体結晶を作製した。得られた結晶構造は Fig. 3 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 L-3-HB が HBDH のクローズド型構造を誘導したのである。基質/阻害剤の結合部位を比較したものを Fig. 4 に示すが、L-3-HB 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。このことは、Gln196 変異体の活性が著しく低下したことも一致する。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 L-3-HB の結合を可能にし、カコジル酸の結合も可能にしていると考えられる。しかしながら、カコジル酸の負電荷は 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ったと考えられる。

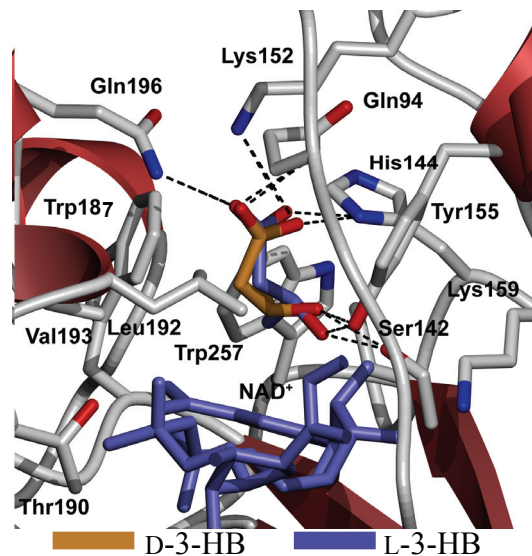


Fig. 4. 基質/阻害剤結合モデル

最後に、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 にも変異導入を行い、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、L-3-HB と NAD^+ 存在下で作製した結晶構造を解析した結果、どちらの複合体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。

【基礎となった学術論文】

1. Ito, K., Nakajima, Y., Ichihara, E., Ogawa, K., Katayama, N., Nakashima, K., Yoshimoto, T. *J. Mol. Biol.*, **355**, 722-733 (2006)
2. Nakashima, K., Ito, K., Nakajima, Y., Yamazawa, R., Miyakawa, S., Yoshimoto, T. *J. Biochem.*, in press (2009)