

# *Pseudomonas putida* のクレアチニナーゼの立体構造と触媒機構に関する研究

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 山下 絹代

## 【目的】

クレアチニンを資化する菌として常温菌 *Pseudomonas putida* が当研究室において分離され、クレアチニンがクレアチン、サルコシンを経てグリシンとホルムアルデヒドに代謝されることを見出した。クレアチニナーゼは、初発のクレアチニンからクレアチンへの加水分解による開環反応を可逆的に触媒する酵素で、環状アミドに作用する加水分解酵素の一つとして EC 3.5.2.10 に分類される。哺乳類はクレアチニン代謝系を持たないが、クレアチニンはクレアチンやクレアチンリン酸から非酵素的に生成される。腎糸球体で濾過されたクレアチニンは再吸収されずに尿中に排泄される。腎機能が低下して排泄量が下がると、これと相関して血中クレアチニン濃度が上昇するため、腎機能評価にクレアチニン量の測定が重要である。以前のクレアチニン測定では、アルカリ性溶液中でピクリン酸と橙赤色の化合物を生成することを利用した Jaffe 法が用いられてきた。しかし、非クレアチニン性物質とも反応し、特異性の点で大きな問題があるため、当研究室では、*P. putida* のクレアチニン代謝系を用いた酵素法による腎機能の臨床診断キットを開発した。これまで、クレアチニン代謝系に関与する様々な酵素の立体構造が報告されている。しかし、クレアチニナーゼの結晶構造は明らかではなかった。そこで、私は、クレアチニナーゼとその基質複合体、阻害剤複合体、及び変異体酵素の X 線結晶構造解析から、その基質認識機構や触媒機構の解明を目的として、研究を行った。

## 【結果及び考察】

### 第 1 章 *Pseudomonas putida* のクレアチニナーゼの X 線結晶構造解析

クレアチニナーゼの六量体構造を図 1 に示す。環状アミド化合物を加水分解する酵素の構造として 16 種類が報告されているが、本酵素はこれらのどれとも異なるユニークな構造を持つことが明らかとなった。

*P. putida* は常温菌であるが、本菌のクレアチニナーゼの至適温度は 75°C と高い耐熱性を示す。これまで様々な酵素で熱安定性のメカニズムが報告されており、例えば、サブユニット間でのジスルフィド結合の形成や自由度の少ないプロリン残基の関与などが挙げられる。本酵素は、隣接サブユニット間に特徴的な構造を持つ。一方のサブユニットの  $\beta 4$  ストランドと他方の  $\beta 5$  ストランドが逆平行  $\beta$  シートを形成している。この  $\beta 5$  ストランド (211-214 残基) を含む 204-222 番目までの 19 アミノ酸残基のうち 8 残基がプロリンである。これらプロリンによる  $\beta 5$  ストランド周辺構造の固定化が高次構造の形成とその安定化に重要であり、高い熱安定性の要因と考えられる。

基質複合体と阻害剤複合体の結晶構造はリガンドフリー型酵素と異なっており、Lys158-His178 のループ領域が、基質結合に伴ってオープン-クローズド型構造変化が生じると判明した。基質はタンパク質内部に閉じこめられ、反応が進行する。活性部位の阻害剤 1-メチ

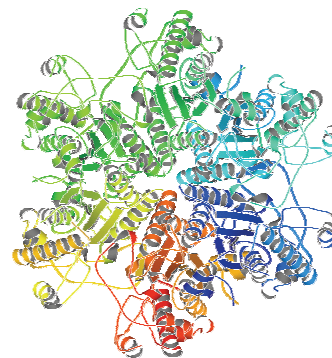


図 1. クレアチニナーゼの全体構造

ルグアニジンは金属イオンに配位しておらず、Ser78、Trp174、Asp175の主鎖とクレアチンと同じ水素結合を形成していた。ループ領域のクローズド型への構造変化は、基質と主鎖の水素結合によって導かれる。

Trp174、Trp154、Tyr121、Phe182、Tyr153、Gly119といった疎水性残基で構成される基質結合ポケットに二核金属イオンの活性中心が存在する。Mn活性型酵素では金属結合サイト2 (Metal2) に存在する  $Zn^{2+}$  に3つのアミノ酸残基 (His36、Asp45、Glu183) と1つの水分子 (Wat1) が配位していた。これら4つの配位子は  $Zn^{2+}$  からほぼ等距離にあり、正四面体構造を形成している。一方、金属結合サイト1 (Metal1) に存在する  $Mn^{2+}$  には、3つのアミノ酸残基 (Glu34、Asp45、His120) と2つの水分子 (Wat1 と Wat2) がピラミッド型に配位している。天然型酵素では金属結合サイトにいずれも  $Zn^{2+}$  が結合している。Metal2 サイトは共通した構造を持つ。一方、Metal1 サイトの  $Zn^{2+}$  は3つのアミノ酸残基とひとつの水分子 (Wat3) による歪んだ四面体構造が形成されており、Wat1 や Wat2 と  $Zn^{2+}$  間の距離は  $Mn^{2+}$  と比べて大きく離れていた。Mn活性型酵素で酵素活性が大きく上昇するのは、これら水分子が触媒機構で重要な役割を持つからと考えられる。

本酵素では基質結合に伴ってオープン-クローズド型構造変化が生じる。この構造変化は、基質-酵素間の親水性領域の相互作用だけでなく、疎水性領域も重要であると考えられる。基質認識機構における活性部位周辺の疎水性残基の役割についての研究を第2章で行った。また触媒機構を次のように提唱した。両方の金属イオンに配位する Wat1 の水酸化物イオンがクレアチニンのカルボニル炭素を求核攻撃し、反応中間体が生成する。次に  $Mn^{2+}$  に配位し且つ Glu122 と水素結合している Wat2 からプロトンが反応中間体へ供与され、炭素-窒素結合が切断されてクレアチンへと開環する。この触媒機構における Glu122 と Wat2 の役割について第3章で研究を行った。

## 第2章 クレアチニナーゼの基質認識機構の解明

Tyr121 は基質結合の際に誘導適合が観察された残基である。これを Ala へ置換した Y121A 変異体の活性は野生型酵素の 6.9%と大きく低下し、特に  $k_{cat}$  に対する影響が大きかった。これは Ala への置換によって、クローズド型構造でみられた Tyr121 と Asp175 間の疎水性相互作用がなくなったからと推定される。即ち、Tyr121 はクローズド型構造を安定化するのに重要な残基といえる。

Trp154 と Trp174 はクローズド型構造でファンデルワールス接触し、疎水性相互作用を形成する。これら Trp の Ala への置換は Phe への置換と比べて活性に大きな影響を与えた。W154A 変異体の活性は全く検出できず、W174A 変異体でもごくわずかに活性が認められる程度であった。一方、W154F や W174F 変異体では、野生型酵素の 0.3%、44%の  $k_{cat}/K_m$  値が算出された。W154A、W154F、W174F 変異体の結晶構造を決定した。Trp154 は基質結合ポケットを形成する残基の1つである。W154A 変異体で小さい Ala へ置換された結果、活性部位は溶媒に大きく露出していた。W154F 変異体では、非対称単位中の6つのうち3つのサブユニットで、Tyr153 や Phe182 と側鎖がスタックするよう Phe154 が大きくコンホメーション変化しており、これらは

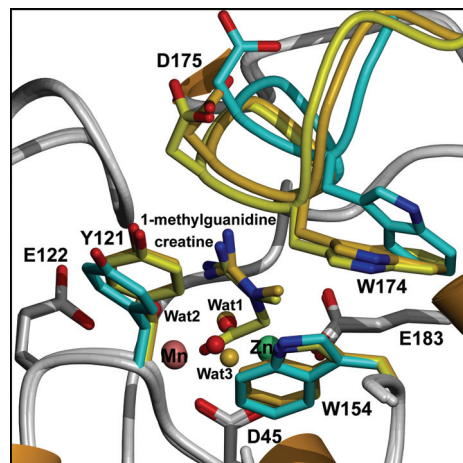


図2. 野生型酵素 (シアン) と基質複合体 (黄色)、阻害剤複合体 (オレンジ) の活性部位の重ね合わせ図

W154A 変異体のように活性部位が溶媒に大きく露出していた。このような構造を持つ変異体酵素では、活性はほとんど検出されないと考えられる。他のサブユニットでは Trp154 に相当する位置に Phe154 側鎖が存在するものの、クローズド構造を形成した時、Phe154-Trp174 間の距離が少し遠くなるため、これら残基による疎水性相互作用が小さくなると推定される。W174F 変異体の Phe174 は野生型酵素の Trp174 とよく似たコンホメーションを持つ。クローズド型構造の形成で Phe174 は Trp154 とファンデルワールス接触できるが、その接触面積は小さくなると推定される。

以上の結果から、オープン-クローズド型構造変化によって基質がタンパク質内部に取り込まれ、溶媒から隔離されることが重要であると言える。特に Trp154 は基質側面に位置し、酵素活性に必須な残基であると判明した。活性部位に蓋をするよう動くループ上の Trp174 は Trp154 と、また基質結合ポケットの Tyr121 はループ上の残基と疎水性相互作用を形成し、クローズド型構造を安定化し、基質を認識する重要な残基であると判明した。

### 第3章 クレアチニナーゼの触媒機構の解明

本章では E122Q 変異体の速度論定数の算出と X 線結晶構造解析を行った。

E122Q 変異体の比活性は天然型酵素の 0.1% であった。E122Q-基質複合体の結晶構造を明らかにしたところ、2 つの金属イオンのうち Metal1 サイトの金属が欠損していた。Glu122 は Metal1 を活性部位に強固に保持するために重要な残基であることが判明した。

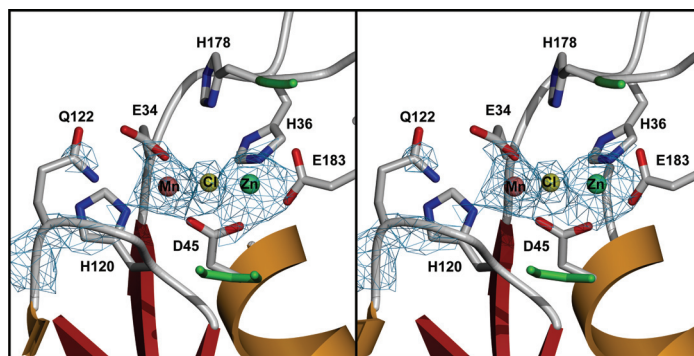


図 3. E122Q(Mn-Zn)変異体の活性部位と電子密度図(ステレオ図)

ZnCl<sub>2</sub> または MnCl<sub>2</sub> 存在下で作製した E122Q 変異体結晶の構造から、Metal1 サイトに金属イオンが結合していることが明らかとなった。MnCl<sub>2</sub> を添加して測定した E122Q(Mn-Zn)変異体の  $k_{cat}/K_m$  値は野生型酵素の 1.1% であった。Metal1 サイトから金属が欠損した野生型酵素(semi-apo 型)の活性は極めて低かったが、これに MnCl<sub>2</sub> を添加するとその活性が回復した。E122Q 変異体における活性の低下は金属の欠損ではなく、Glu122 の置換による影響であると結論づけられる。

野生型酵素の構造において、Glu122 の電子密度図は非常に明確であった。一方、E122Q (Mn-Zn) 変異体における Gln122 の電子密度図は不明瞭であった。さらに変異体では、Wat2 に相当する電子密度図は見つからなかった。E122Q 変異体における活性の低下は Wat2 の欠損に起因するところが大いと考えられる。第 1 章で提唱したように Wat2 が加水分解反応におけるプロトンドナーであると言える。

#### 【基礎となった学術論文】

1. Ito, K., Kanada, N., Inoue, T., Furukawa, K., Yamashita, K., Tanaka, N., Nakamura, K.T., Nishiya, Y., Sogabe, A., and Yoshimoto, T. (2002) Preliminary crystallographic studies of the creatinine amidohydrolase. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **58**, 2180-2181.
2. Yamashita, K., Nakajima, Y., Matsushita, H., Nishiya, Y., Yamazawa, R., Wu, Y.-F., Matsubara, F., Oyama, H., Ito, K., and Yoshimoto, T. (2010) Substitution of Glu122 by glutamine revealed the function of the second water molecule as a proton donor in the binuclear metal enzyme, creatininase. *J. Mol. Biol. in press*