

Crystal structure and function of serine dehydrogenase from *Escherichia coli*

大腸菌由来セリン脱水素酵素の X 線結晶構造解析

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 山澤 龍治

[緒言]

セリン脱水素酵素 (SerDH: EC 1.1.1.276) は NADP^+ を補酵素としてセリンを 2-アミノマロン酸セミアルデヒドへ酸化する反応を触媒する酵素で、分子量 27 kDa のサブユニットから成る四量体酵素である。短鎖型脱水素/還元酵素 (SDR) ファミリーに属しており、本酵素の立体選択性を利用して、医薬品の中間体の合成を含む工業的応用を目的として研究されている。SDR ファミリーに分類される酵素は、非常に多様性に富み、酸化還元酵素だけでなく異性化酵素に分類されるものも存在する。一番多くの酵素が属している酸化還元酵素においても、ステロイドから脂肪族アルコールに至る様々な代謝過程の化合物を基質としており、それぞれの過程において立体特異的な酸化還元反応を触媒している。薬品生物工学研究室では、SDR 酵素の立体構造解析としては早い時期に 7 α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素の結晶構造解析を行い、最近では D-3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素 (HBDH) の結晶構造解析にも成功し、その立体特異的な基質認識機構を明らかにしてきた。SDR の多様な基質特異性の詳細を明らかにしていくことは、関連化合物の立体特異的変換や臨床検査における特異的測定のための酵素試薬を開発する上で非常に重要で、さらには創薬ターゲットとしての SDR の阻害剤開発にもつながる可能性がある。私は、D-3-ヒドロキシ酪酸に類似した構造を持つスレオニンやセリンを特異的に酸化する SDR 酵素の構造解析を行うことにより、酵素の基質認識ストラテジーを理解することにつながるのではないかと考え、HBDH と同様に SDR ファミリーに属する大腸菌由来 SerDH の X 線結晶構造解析を行い、基質認識機構を考察した。

[結果および考察]

第1章 SerDH の発現、精製、速度論的解析

野生型 SerDH は pKK223-3 を発現ベクターとし大腸菌 XL1-Blue で過剰発現を行い、陰イオン交換クロマトグラフィーと疎水性相互作用クロマトグラフィーでほぼ単一に精製した。大腸菌由来 SerDH は L-セリン (2S) だけでなく、D-セリン (2R)、D-スレオニン (2R, 3S)、L-アロスレオニン (2S, 3S) に高い活性を示した。それらの値は、L-セリンの比活性に対して、それぞれ 1.0、1.8、2.9 倍であった。一方、L-ヒドロキシ酪酸 (3S)、D-ヒドロキシ酪酸 (3R) には、わずかに活性を示したものの、L-スレオニン (2S, 3R) や D-アロスレオニン (2R, 3R) に対してはほとんど活性を検出することができなかった (Table 1)。本酵素は、2 位にアミノ基を有する基質に高い活性を示すが、2 位に関しては立体選択性を示さず、3 位が S 体である基質に対して立体選択性を有していたことから、これらの構造に対応する結合ポケットを有していると考えられる。

Table 1: 大腸菌由来 SerDH の基質特異性

Substrate (100 mM)	Specific activity (U/mg)
L-Serine	5.1
D-Serine	5.3
L-Threonine	0
D-Threonine	9.3
L-allo-Threonine	14
D-allo-Threonine	0.01
L-Hydroxybutyrate	0.58
1-Amino-2-propanol	0
2-Aminoethanol	0

次に示す化合物には活性は見られなかった。
Methanol, Ethanol, Propanol, 2-Propanol, 1-Butanol, 2-Butanol, 1, 2-Butanediol, 1, 3-Butanediol, 1, 4-Butanediol, 2, 3-Butanediol, D-Hydroxybutyrate, DL-Malonate

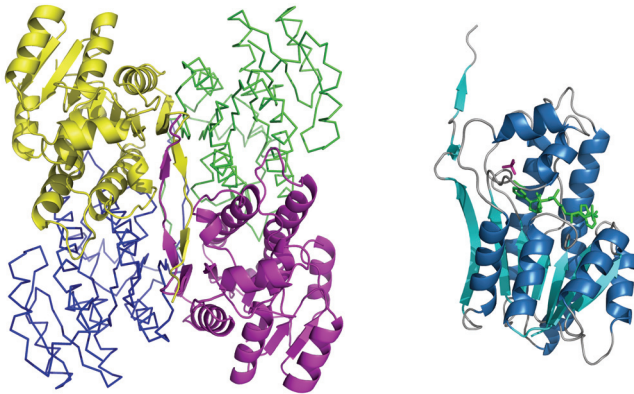


Fig. 1 SerDH-NADP⁺-Phosphate 三者複合体の結晶構造のリボンモデル図。(A) 四量体構造：サブユニット A、B、C、D を黄色、青、緑、マゼンタで表す。(B) サブユニット構造。スティックモデルはリン酸と NADP⁺で、マゼンタと緑で表す。

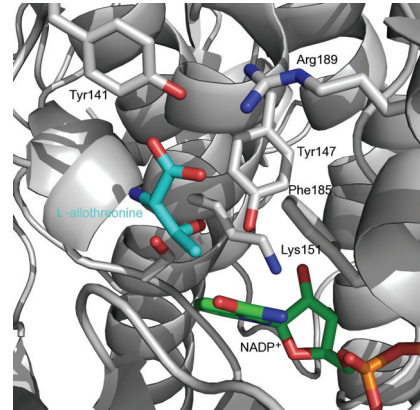


Fig. 2 SerDH と L-アロステロニンの結合シミュレーションモデル

第2章 SerDH の X 線結晶構造解析

リガンドフリー型と SerDH-NADP⁺ 複合体の結晶化条件のスクリーニングを行い、X 線結晶構造解析を行った結果、それぞれ 1.9 Å、2.7 Å 分解能の結晶構造を決定することに成功した。SDR ファミリーに共通している、NAD(P) 結合モチーフや Rossmann fold 構造、触媒四残基 (Asn106、Ser134、Tyr147、Lys151) の位置は大腸菌 SerDH においても保存されていた。リガンドフリー型の結晶構造において基質結合ループに相当する Gly181-Val205 と C 末端の Ala241-Gln248 は、はっきりとした電子密度図を得ることができず、構造を決定できなかったが、SerDH-NADP⁺ 複合体はクローズド型構造を形成しており、基質結合ループや C 末端領域の構造を決定することができた (Fig. 1)。さらにこの SerDH-NADP⁺ 複合体の活性中心には四面体型の電子密度図が見られ、結晶化条件に高濃度で含まれるリン酸イオンが結合しており、結果として SerDH-NADP⁺-phosphate 三者複合体であった。このクローズド型構造の活性中心に最も活性の高かった基質 L-アロステロニンを結合させたシミュレーションモデルを作成した (Fig. 2)。基質のカルボキシル基は Tyr141 と Arg189 と水素結合をなすことで認識され、Cβ 位のメチル基は Phe185 と NADP⁺のニコチンアミド環により形成された疎水性ポケットにより認識されると考えられる。SerDH の C 末端領域は Rossmann fold を主骨格とするサブユニットの構造から突出しており、対角に向かうサブユニットの活性中心付近まで伸びた構造をしていた。これは他の SDR 酵素に見られない SerDH 特有の構造であった。このクローズド型における C 末端領域の構造を詳しく見ると、C 末端領域には 2 個のβ-ストランドがあり、対角に向かい合うサブユニットの C 末端領域の 2 個のβ-ストランドとアンチパラレルβ-シートを形成しており、それらは対角に向かい合うサブユニットの基質結合ループと近い位置に存在していた。Fig. 3 にサブユニット D の C 末端部位の拡大図を示す。サブユニット D の Arg247 の側鎖と Gln248 の主鎖の NH 基が対角に向かい合うサブユニット A の基質結合ループと水素結合をしており、クローズド型構造の安定化に寄与していると考えられる。この相互作用はサブユニット B と C の間でも見られた。SDR 酵素は基質結合ループがオープン型からクローズド型へ構造変化するこ

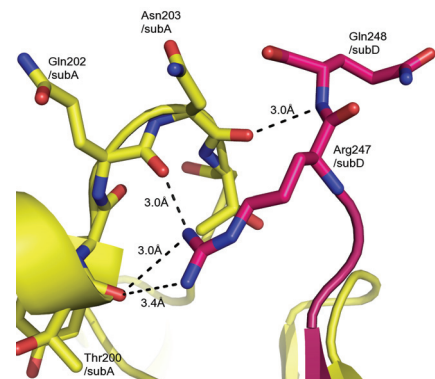


Fig. 3 C 末端領域と基質結合ループの相互作用サブユニット A と D を黄色とマゼンタで表す

とで触媒反応を開始する。SerDH はリガンドフリー型で C 末端領域も構造を決定できなかったことから、基質結合ループと同様、C 末端領域もオープン型からクローズ型に構造変化する際にβ-シート構造を形成すると考えられる。

第三章 部位特異的変異体を用いた SerDH の機能解析

基質とのシミュレーション結合モデルをもとに、基質の認識に関与する Tyr141、Phe185 および Arg189 の部位特異的変異体を作成し速度論的解析を行った。これら全ての変異体において活性が全く見られなかったことから Tyr141、Phe185 および Arg189 は基質認識もしくは触媒機能において重要な役割を持つと考えられる。

他の SDR 酵素には見られない SerDH に特有な C 末端領域の機能を解析するために、C 末端から順番に 1、2、7 個のアミノ酸残基を削った SerDH ΔC1、SerDH ΔC2、SerDH ΔC7 を作製した。

さらに対角のサブユニットの基質結合ループと水素結合をしていた Arg247 と Gln248 の部位特異的変異体を作成し速度論的解析を行った (Table 2)。SerDH ΔC2、SerDH ΔC7 に活性は無かったが、SerDH ΔC1 は野生型の 54%の活性を示した。このことは C 末端から 2 つ目のアミノ酸 Arg247 が活性に必須であることを示す。また、Arg247 の変異体である R247K と R248A の比活性は野生型と比べてそれぞれ 69%、20%であったことから、247 番目のアミノ酸の塩基性側鎖は SerDH の活性において重要であると考えられる。C 末端のアミノ酸 Gln248 の変異体 Q248A と Q248N の比活性はそれぞれ 80%、74%と大きくは低下しなかった。つまり 248 番目のアミノ酸残基に関しては、側鎖ではなく主鎖の NH と基質結合ループとの水素結合が重要であることを示している。また活性がある C 末端の変異体 (SerDH ΔC1、R247A、R247K、Q248A、Q248N) の k_{cat}/K_M の変化を見てみると、NADP⁺ に対しての k_{cat}/K_M より、基質に対しての k_{cat}/K_M が大きく低下していた。また基質に対しての k_{cat} の値は野生型と比べてあまり変化が見られないが、 K_M は最大 17 倍以上の増加が見られた。このことは C 末端領域が基質の親和性に影響していることを示す。基質の認識には基質結合ループにある Phe185 と Arg189 が必須であり、クローズド型構造を取る必要がある。基質結合ループに変異を導入していない C 末端領域の変異体が基質の親和性に大きく影響し、 k_{cat} に影響を与えないことから、基質の結合によりクローズド型構造への構造変化が誘導され、C 末端領域と基質結合ループの相互作用がクローズド型の安定化に重要であると考えられる。

[基礎となった学術論文]

1. Nakashima, K., Ito, K., Nakajima, Y., Yamazawa, R., Miyakawa, S., and Yoshimoto, T. (2009) Closed Complex of the D-3-Hydroxybutyrate Dehydrogenase Induced by an Enantiomeric Competitive Inhibitor. *J. Biochem.* **145**, 467-479.
2. Yamazawa, R., Nakajima, Y., Karin, M., Yoshimoto, T., and Ito, K. (2011) Crystal Structure of Serine Dehydrogenase from *Escherichia coli*: Important role of the C-terminal region for closed-complex formation. *J. Biochem.* In press

Table 2. Kinetic parameter

Enzyme	RA *	L-serine			NADP ⁺		
		K_M (mM)	k_{cat} (sec ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ sec ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat} (sec ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ sec ⁻¹)
Wild-type	109	49	3.9	0.080	0.51	4.3	8.4
H ₆ -SerDH	100	29	2.4	0.083	0.70	3.0	4.3
Y141A							
Y141F							
F185A							
F185L							
F185H							
F185W							
R189A							
R189K							
ΔC1	54	330	2.3	0.007	1.75	2.1	1.2
ΔC2							
ΔC7							
R247A	20	>500	-	-	-	-	-
R247K	69	127	2.0	0.016	1.4	3.1	2.2
Q248A	80	61	3.0	0.049	0.56	3.0	5.4
Q248N	74	62	2.3	0.037	0.47	2.4	5.1

* RA: relative activity