

耐熱性アスパルターゼの結晶構造解析と機能部位探索

京都大学 化学研究所 藤井 知実、畑 安雄

はじめに

アスパルターゼ (EC 4.3.1.1、L-アスパラギン酸アンモニア リアーゼ) は、L-アスパラギン酸の アミノ基を脱離させてフマル酸とアンモニウムイオンに分解する酵素である。この反応は可逆的であるため、反応性が高く生分解性に優れた化学物質として注目されるアスパラギン酸の産業的生産を目的としたバイオマスにも利用されている。アスパルターゼに関する研究の歴史は古く、その反応機構の解明のため、アミノ酸残基の化学修飾や部位特異的変異体実験など多くの生化学的な研究がなされて、触媒反応に関与する残基が幾つも推定されてきた。特に、大腸菌由来酵素では、基質であるL-アスパラギン酸と Mg^{2+} イオンなどの2価金属陽イオンによるアロステリックな活性化現象が観察されている¹⁻²⁾。ようやく最近になって、大腸菌アスパルターゼの結晶構造が分解能2.8

で解明され、その構造と過去の生化学的データとから反応に関与する残基がある程度絞りこまれた³⁾。しかしながらアスパルターゼの基質・基質類似物との複合体解析の報告はなく、また、他の類縁酵素での構造解析や部位特異的変異体実験などの間で一部矛盾する解釈が行われている。従って、アスパルターゼの活性部位・アロステリック制御部位などの機能部位や触媒反応機構については未だに不明の点が多い。一方、最近になって中等度好熱菌である *Bacillus* sp. YM55-1 由来のアスパルターゼが単離され、大腸菌由来酵素に比べ高活性で耐熱性があることがわかった⁴⁾。*Bacillus* YM55-1 アスパルターゼはアミノ酸残基数468のサブユニット4個からなる分子量51,627×4の四量体タンパク質である⁵⁾。*Bacillus* YM55-1 アスパルターゼは、大腸菌酵素のような基質や2価金属陽イオンによるアロステリックな活性化を示さないが、大腸菌酵素に比べ約4倍もの高活性能を有している。

我々のグループでは、この高活性・耐熱性アスパルターゼを対象として、アスパルターゼ反応機構における構造と機能の関係および本酵素の高活性・耐熱性の獲得機構について知見を得ることを目的として構造生物学的研究を行なってきた。今回は、X線結晶構造解析により分解能2.5で*Bacillus* YM55-1 アスパルターゼの立体構造を決定し類縁酵素と構造比較することで、アスパルターゼファミリーにおける各機能部位の探索を行い、各酵素の諸性質との関連と本酵素の高活性・耐熱性の獲得機構について考察を行った。

構造解析

10%(v/v) 2-propanol、25%(w/v) PEG4000を含む0.1M HEPES-Na 緩衝液 (pH 7.5) を沈殿剤溶液としたシッティングドロップ蒸気拡散法により30で結晶を得た。微量の重原子を含むと結晶性の改善が見られ、 $Sm(NO_3)_3$ を含む条件で得られた結晶を使用し室温で回折強度データを収集した。この結晶の空間群は $P2_12_12_1$ 、格子定数は $a=76.21$ 、 $b=140.5$ 、 $c=101.9$ であった。大腸菌由来酵素をモデルとした分子置換法により分解能3.0で解析を行った。当初、AMoRe及びX-PLORを使用した通常分子置換を行ったが、回折関数の計算では妥当と思われる解を与えるものの、並進関数で解を見つけることが

できなかった。結晶の V_m 値の見積もりと空間群から、非対称単位中に2つのサブユニットを含み、分子内2回軸と結晶学的2回軸 (c 軸) が一致していると推定された。そこで、X-PLOR で2量体での回転関数を決定し回転操作を行った後、4量体分子を形成したときに2回軸どうしが重なるように、分子内2回軸と結晶学的2回軸 (c 軸) を一致させ、4量体分子の中心が原点 ($x=y=z=0.0$) に一致するように並進移動させた。その後、2量体分子モデルを z 軸に沿って1ずつ並進させていき、分解能 10^{-4} での剛体近似精密化を行い R 値及び R_{free} 値を計算し、最小値を与える箇所を検索した。 c 軸のほぼ $1/4$ の箇所 ($z=26$) で最小値が得られ、この解に対して、溶媒平滑化と電子密度図の平均化および非結晶学的対称を考慮した制約を加えつつ、分子モデルの構築・修正・精密化を行った。

さらにより高分解能で精密化を行うために、 $MgCl_2$ を含む条件で得られた結晶を使用してクライオ実験を行った。高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所放射光研究施設のビームライン BL18B において、イメージングプレート (200mm × 400mm) を検出器とした巨大分子用ワイセンベルグカメラを使用して回折強度データの収集を行った。20%(v/v) PEG400 を含む沈殿剤溶液に約1分間浸した結晶を温度 100K の液体窒素気流中で瞬間冷却し測定した。この結晶の空間群は $P2_12_1$ 、格子定数は $a=74.90$ 、 $b=139.4$ 、 $c=100.2$ であり、分解能 2.5 Å で R_{merge} 10.2% の回折強度データを得ることができた。分子モデルの精密化は、プログラム X-PLOR 及び CNS を使用し、室温データモデルの剛体近似精密化後、分子力学的精密化、温度因子と位置精密化およびグラフィックスによる分子モデルの修正を繰り返した。最終的に分子モデルはタンパク質分子のアミノ酸残基 5~466 × 2 と水分子 213 個を含み、分解能 2.5 Å で、 R 値 22.1% (R_{free} 値 26.6%) まで収束した。

全体構造

Bacillus sp. YM55-1 由来アスパルターゼの各サブユニットは、5本のヘリックスと2本のストランドを含むN末端大ドメイン、主に5本の長いヘリックス束からなる中間ヘリックスドメイン、数個の短いヘリックスを含むC末端小ドメインの3つのドメインにより構成されている(図1)。4量体分子は、各サブユニットの中間ヘリックスドメインのヘリックス束が会合することで20本のヘリックス束を形成し、3つの分子内2回軸が存在する配置になっている。活性部位は、それぞれ異なる3つのサブユニット由来のN末端大ドメイン、C末端小ドメイン、中間ヘリックスドメインのループによって囲まれるクレフトに存在する。本アスパルターゼは、大腸菌由来アスパルターゼと49%、大腸菌由来フマラーゼと41%のアミノ酸配列の相同性がある。サブユニットの2次構造やフォールディング等の全体構造は両者に類似していた。しかしながら、ループ構造やドメイン間の相対的な方向さらには中間ドメインのヘリックスの湾曲の程度などの構造要素間の相対的な配置は、大腸菌由来アスパルターゼよりもむしろ大腸菌由来フマラーゼの方に類似していた(図2)。

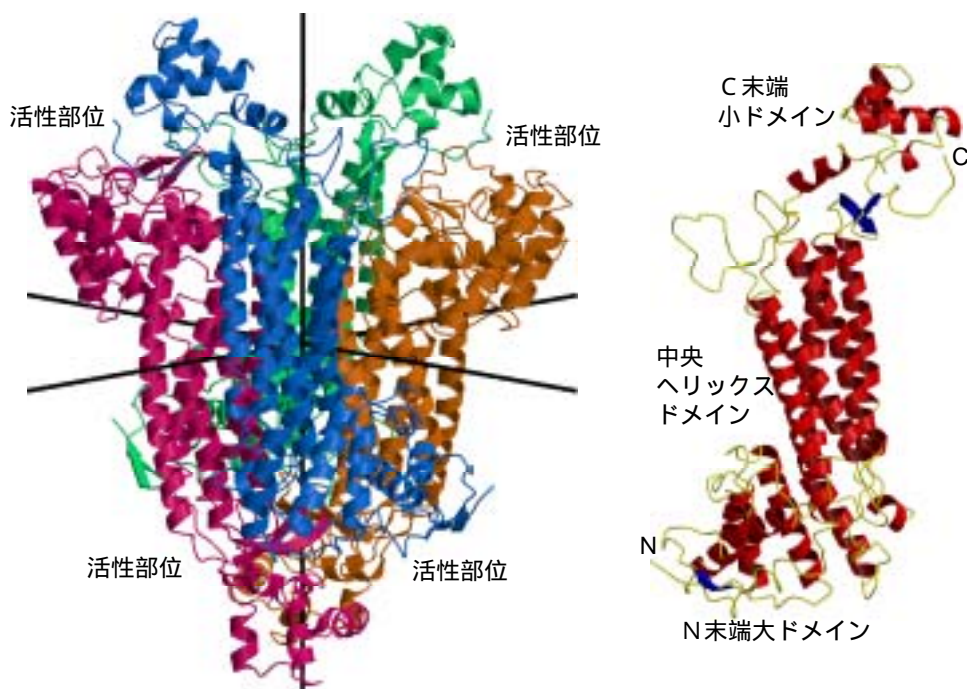


図1 . *Bacillus* YM55-1 アスパルターゼの全体構造 .(左) 4量体分子構造 . 各サブユニットで色分けしてある . 線は3つの分子内2回軸を表す .(右) サブユニット構造 . 2次構造により色分けしてある .

図2 . 類縁酵素間のサブユニットの重ね合わせ図 .(左) 青 : *Bacillus* YM55-1 アスパルターゼ、赤 : 大腸菌アスパルターゼ .(右) 青 : *Bacillus* YM55-1 アスパルターゼ、赤 : 大腸菌フマラーゼ .



局所構造比較

2つの類縁タンパク質分子どうしを比較して主鎖レベルでの構造の違いを判断する場合、全残基の対応するC 原子どうしを最小2乗法で重ね合わせてC 原子間距離をプロットし、その差が大きな箇所に着目するのが一般的な方法である。しかしながら、図2に示すように、*Bacillus* YM55-1 アスパルターゼと大腸菌アスパルターゼの間では2次構造及び各ドメインの相対的配置のずれが大きいため、通常行われるC 原子のサブユニット全体や各ドメインごとでの重ね合わせでは、本質的な構造差異を見いだすことが

困難であった。

そこで、主鎖構造の局所的な違いを見つけ出す方法を考案した。その方法とは、ある残基とその前後2残基ずつの合計5残基のC原子を最小2乗法で重ね合わせ、そのときの root mean square 距離の値をその残基の値としてプロットする、というものである(図3)。この方法では、ドメインや2次構造などの構造要素間の相対的な配置に依存せず、局所的な主鎖コンフォメーションの違いが本質的に存在している箇所でのみ値が大きくなり、効果的に検出可能と期待できる。棒を3残基とした場合は全体にノイズが多くなり、7残基棒の場合はピークが幅広く表示された。ヘリックスの1ターンが4残基弱であることや、ターン構造が3~4残基で構成されることを考えれば、棒を5残基とするのは妥当な数と思われる。*Bacillus* YM55-1 アスパルターゼ、大腸菌アスパルターゼ、大腸菌フマラーゼの3酵素間でこの手法を適用し、合計7箇所の本質的な構造差異領域を見つけることができた(図3と図4)。それぞれの酵素に特徴的な構造がこれらの領域に存在することが予想されるため、各構造差異領域領域と各酵素の諸性質の関連に着目し、アスパルターゼファミリーにおける各機能部位の同定を行った。

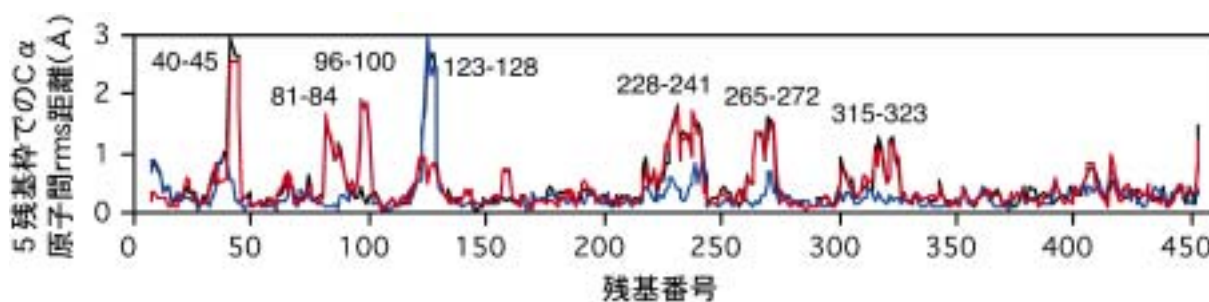
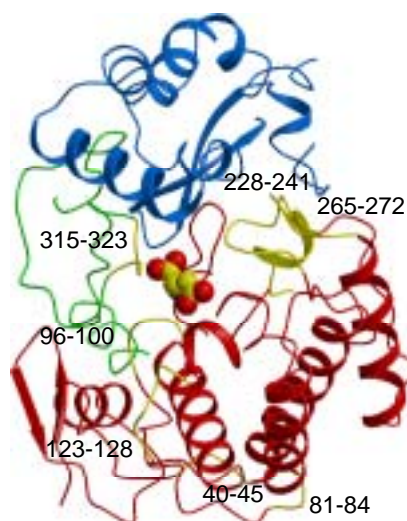


図3 . 5残基棒でのC原子間 rms 距離プロット図 . 黒線 : *Bacillus* YM55-1 アスパルターゼ 対 大腸菌アスパルターゼ、青線 : *Bacillus* YM55-1 アスパルターゼ 対 大腸菌フマラーゼ、赤線 : 大腸菌アスパルターゼ 対 大腸菌フマラーゼ . 残基番号範囲で構造差異領域を示す .

図4 . 活性部位クレフト構造と構造差異領域 . 赤・青・緑は各サブユニットを、黄色は構造差異領域 (残基番号で範囲を示す) . CPK モデルは推定基質結合モデル (L-アスパラギン酸) を表している .



活性部位の構造比較

酵素分子の活性部位の位置は、基質もしくは基質類似物との複合体結晶の構造解析、部位特異的変異体や化学修飾実験などにより同定された触媒残基もしくは基質結合残基がある場所、アミノ酸配列の相同性の高い領域が集中している箇所、などを総合的に判断して確認されることが多い。残念ながら、アスパルターゼについては、これまでに基質や基質類似物が結合した構造は報告されていない。また、部位特異的変異体実験で活性に影響を与えるアミノ酸残基はかなりの広範囲に渡って存在している。そこで、同族酵素のうち最もアスパルターゼとアミノ酸配列の相同性が高く、同等な大きさのL-リンゴ酸を基質とするフマラーゼにおいて、基質類似物複合体結晶構造で基質類似物であるクエン酸が結合している部位⁶⁾を活性部位と考えて以下の考察を行った(図5)。この箇所にはアスパルターゼファミリー全体でアミノ酸配列の相同性が高い4つの領域が集中している。活性部位における側鎖の配向も、*Bacillus* YM55-1 アスパルターゼは、大腸菌アスパルターゼよりも大腸菌フマラーゼとの方が類似していることがわかる。さらに、以下に述べる2点について詳細に検討した。

第一に、基質L-アスパラギン酸のカルボキシル基とカルボキシル基の認識箇所の検討である。一般的に、カルボキシル基の結合はArg残基かLys残基などの塩基性残基か、双極子モーメントによるヘリックスのN末端側と考えられる。*Bacillus* YM55-1 アスパルターゼでは、His188とLys324以外に活性部位内には塩基性残基は存在しない。Lys324は基質結合に重要との部位特異的変異体実験の結果⁷⁾があるため、その第一候補と考えられる。また、大腸菌フマラーゼでの基質類似物複合体でのクエン酸分子は3つのカルボキシル基で結合しているが、実際の基質の2つのカルボキシル基での結合をある程度反映しているはずであり、ヘリックス6(Thr141-Glu177)のN末端側がもう一方のカルボキシル基との結合箇所であると推定される。

第二に、基質L-アスパラギン酸のアミノ基の認識箇所である。構造差異領域96-100は、アスパルターゼとフマラーゼの間で構造が異なる唯一の領域であるため、基質のアミノ基と水酸基の違いを認識している箇所であると推定される。この箇所は、アスパルターゼ(-Q-G-G-A-G-T-S-)とフマラーゼ(-Q-T-G-S-G-T-Q-)でそれぞれ別のアミノ酸配列が完全に保存されている領域である。このような箇所はここ以外には存在しない。これらのことから、この領域の構造に着目してみると、大腸菌フマラーゼの基質類似物クエン酸との複合体構造ではSer98が水分子と水素結合している(図5)。この残基が、*Bacillus* YM55-1 アスパルターゼではAla99に置換されており、かつ、主鎖のコンフォメーションが異なっているため、Gly98の主鎖カルボニル酸素原子が結合水の方向を向いている。したがって、まさにこの結合水分子の位置こそが、アスパルターゼの基質であるL-アスパラギン酸のアミノ基と、フマラーゼの基質であるL-リンゴ酸の水酸基の違いを認識している箇所である、と推定できる。この水分子は、His188とAsn142に対応する残基に結合しており、かつ、これらの残基は丁度3等分の方向に配置されているので、アミノ基の3つの水素原子をGly98、His188、Asn142の3残基が認識していると考えられる。大腸菌アスパルターゼの場合は、活性部位残基の側鎖は他の2酵素に比べてかなり異なった配向をしているが、基質による誘導適合や活性化因子によるアロステリックな構造変化により、その配向が*Bacillus* YM55-1 アスパルターゼと同様のものとなれば、大腸菌アスパルターゼのGln191が*Bacillus* YM55-1 アスパルターゼのHis188と同様に基質L-アスパラギン酸のアミノ基の認識を担うことは可能であると考えら

れる。

この結合水の位置はヘリックス6のN末端よりもLys324の方にやや近いので、基質のカルボキシル基はLys324に、カルボキシル基はヘリックス6のN末端に、それぞれ結合すると仮定し、各相互作用を満足するようにL-アスパラギン酸の推定結合モデルを作成したのが、図6である。2つのカルボキシル基を逆に結合させようとしても立体障害のためにモデルをうまくはめることができないため、このような結合様式によって、L-アスパラギン酸のD-L異性体の区別をしていると思われる。また、構造差異領域315-323は、多くのアスパルターゼファミリーで温度因子が高く電子密度が観測されない場合もある箇所であり、フレキシブルなループ領域であると考えられる(図4)。しかしこの領域はアミノ酸配列の同族酵素間での相同性が高く、Ser318とSer319は完全に保存されている。また、2-クリスタリンの硫酸イオン複合体において、このループが活性部位を覆うように構造変化していることが観察されたこと⁸⁾から、この領域は全ファミリーに共通の反応機構に関与していると考えられる。

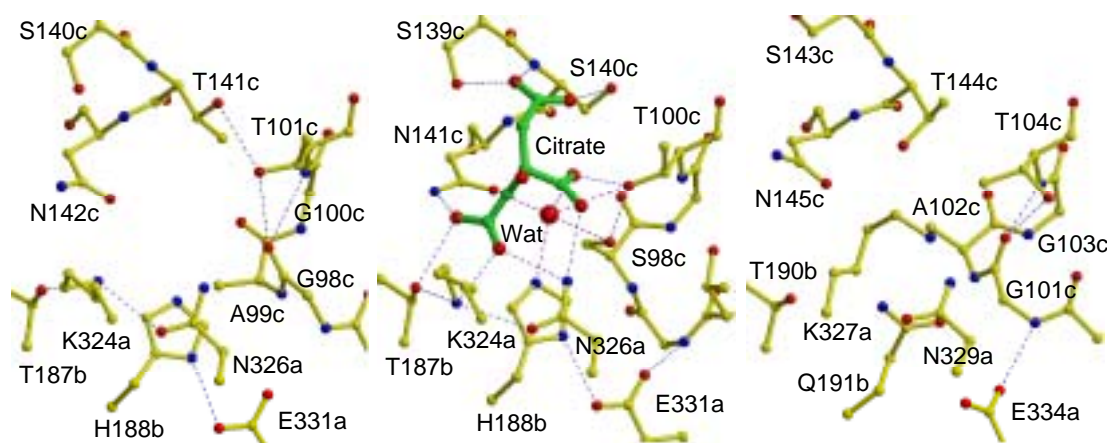
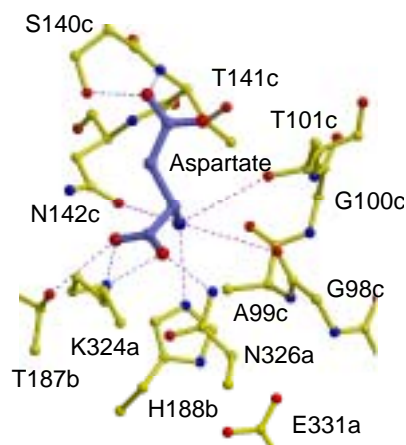


図5 . 活性部位の構造比較 . (左) *Bacillus* YM55-1 アスパルターゼ . (中) 大腸菌フマラーゼ . 緑 : クエン酸 . (右) 大腸菌アスパルターゼ .

図6 . *Bacillus* YM55-1 アスパルターゼの推定基質結合モデル . 青色 : L-アスパラギン酸 .



活性化因子結合推定部位の構造比較

構造差異領域123-128は、大腸菌フマラーゼにおいて基質分子(L-リンゴ酸)が活性部位とは異なった場所に結合している箇所に対応している(図7)。この箇所は活性部位

クレフトの入り口に位置しており(図4) 活性化因子の結合部位と推定されている⁶⁾。基質と相互作用している Arg 残基が大腸菌アスパルターゼでは Gln 残基に置換されているが、主鎖コンフォメーションは類似しているため、L-アスパラギン酸が結合することは不可能ではないと考えられる。一方、*Bacillus* YM55-1 アスパルターゼは、他の2酵素とは異なる主鎖構造をしており、Tyr126 部分が立体障害となって活性化因子が結合することは不可能であることがわかる(図7)。これらの構造の違いは、*Bacillus* YM55-1 アスパルターゼを除く2酵素では基質による活性化が観測されることに対応していると考えられる。

金属イオンによる活性化への関与が示唆される部位

構造差異領域 228-241 と 265-271 は、大腸菌アスパルターゼのみで構造が異なっている(図8)。このことは、大腸菌アスパルターゼのみで Mg^{2+} イオンなどの2価金属陽イオンによる活性化現象が報告されていることに対応すると考えられる。これらの領域は活性部位と隣り合っているが、その外側を形成している(図4)。大腸菌アスパルターゼでは、これらの領域は自身の4つのサブユニット間で構造的なずれが大きな箇所である。構造差異領域 265-272 は3酵素間でアミノ酸配列の相同性はほとんどないものの、構造差異領域 228-241 は相同性の高い領域である。*Bacillus* YM55-1 アスパルターゼと大腸菌フマラーゼの間ではこの領域の構造はよく似ている。この領域自身には、2価金属陽イオンの結合を示唆する明確な構造的特徴は見出せない。しかし、領域 231-244 の Ala234c と Asn145c の間に他の2酵素では水素結合の相互作用があるのに対し、大腸菌

図7. 大腸菌フマラーゼ(緑色)の活性化因子結合推定部位の比較. 濃緑色: L-リンゴ酸. (左) 大腸菌アスパルターゼ(赤色)との重ね合わせ. (右) *Bacillus* YM55-1 アスパルターゼ(青色)との重ね合わせ.

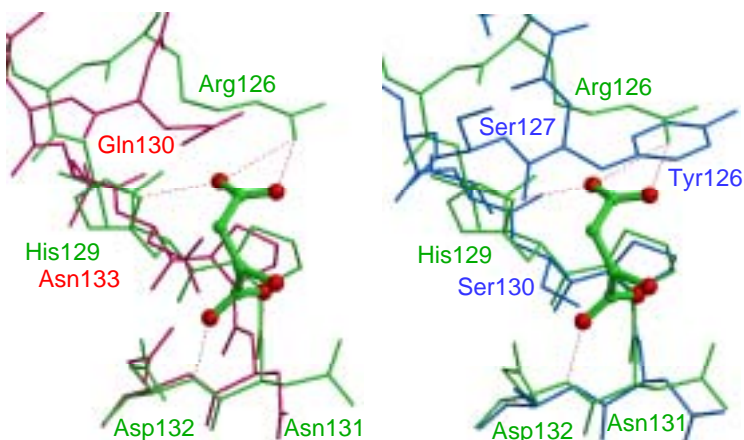
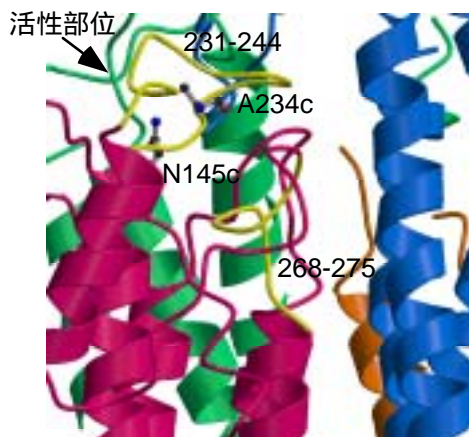


図8. 大腸菌アスパルターゼにおいて金属イオンによる活性化への関与が示唆される部位. 各サブユニットで色分けし、構造差異領域を黄色で示している. 領域 231-244 と領域 268-275 は、*Bacillus* YM55-1 アスパルターゼの領域 228-241 と領域 265-271 にそれぞれ対応している.



酵素では相互作用がない(図8)。従って、金属イオンの結合による影響を受けて構造差異領域228-241と265-271の構造が変化し、他の2酵素と同様の構造に変化することで、活性部位構造に影響を与えるのかもしれない。

耐熱性・高活性の要因

耐熱性獲得の主要因として考えられる構造的特徴として、*Bacillus* YM55-1 アスパルターゼでは大腸菌酵素に比べて水素結合とイオン性残基側鎖間の塩橋数が増加していることが挙げられる。特に、イオン性残基の総数は大腸菌酵素とほぼ同数であるにもかかわらず、サブユニット間での塩橋数は2倍に増加しており、本酵素ではイオン性残基の効果的な配置を採用して耐熱性を獲得していると考えられる。さらに、4つのサブユニットの4量体会合によって埋もれる表面の割合の増加、2次構造の伸長、そしてヘリックス端の余分なターンを削除するアミノ酸1~2残基の欠失(構造差異領域40-45と81-85の2箇所に対応)なども耐熱性の要因と考えられる。

Bacillus YM55-1 アスパルターゼが大腸菌アスパルターゼに比べて4倍もの高活性を持つ理由としては、1)活性部位クレフトが他酵素に比べて比較的狭く効率良く基質と相互作用可能であること、2)活性部位残基の側鎖配向が大腸菌フマラーゼの基質類似物複合体と同様であるので基質との相互作用の際の配向変化が不要であること、3)大腸菌フマラーゼにおける活性化因子結合推定部位が既に構造的に占有されていること、4)大腸菌アスパルターゼのような金属イオン結合推定部位がないためアロステリック変化が不要なこと、などが考えられる。

おわりに

本研究では、*Bacillus* YM55-1 アスパルターゼの結晶構造を決定し、類縁酵素間の局所的な構造比較によって各機能部位の探索と検討を行った。しかしながら、アスパルターゼの反応機構において基質のC3位置の水素原子を引き抜く塩基触媒と脱離したアンモニアにプロトンを与える酸触媒については、候補残基の推定は可能ではあるものの断定できるまでには至っていない。アスパルターゼは活性部位が3つのサブユニットで構成される複雑な構造を採っているため、今回解析した結晶構造を注意深く観察して部位特異的変異体の設計を計画し実験を行っていく必要があるだろう。今後は、基質および基質類似物との複合体結晶の調製と構造解析を行って、反応機構を解明していきたいと考えている。

謝辞

本研究は、鳥取大学 工学部の河田 康志 教授のグループとの共同研究により行われました。当研究室において大学院修士課程在学中に本研究に多大な貢献を捧げた酒井 久伸氏(現・放射光利用促進機構 高輝度光科学研究センター 研究員)に感謝致します。放射光実験において、高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 放射光研究施設 タンパク質結晶ビームラインのスタッフの皆様と坂部構造生物プロジェクトのご協力とご支援に深く感謝致します。

参考文献

1. Suzuki, S., Yamaguchi, J. & Tokushige, M. *Biochim. Biophys. Acta*, **321**, 369-381 (1973).
2. Karsten, W. E. & Viola, R. E. *Arch. Biochem. Biophys.* **287**, 60-67 (1991).
3. Shi, W., Dunbar, J., Jayasekera, M. M. K., Viola, R. E. & Farber, G. K. *Biochemistry*, **36**, 9136-9144 (1997).
4. Kawata, Y., Tamura, K., Yano, S., Mizobata, T., Nagai, J., Esaki, N., Soda, K., Tokushige, M. & Yumoto, N. *Arch. Biochem. Biophys.* **366**, 40-46 (1999).
5. Kawata, Y., Tamura, K., Kawamura, M., Ikei, K., Mizobata, T., Nagai, J., Fujita, M., Yano, S., Tokushige, M. & Yumoto, N. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1847-1857 (2000).
6. Weaver, T. & Banaszak, L. *Biochemistry*, **35**, 13955-13965 (1996).
7. Saribas, A. S., Schindler, J. F. & Viola, R. E. *J. Biol. Chem.* **269**, 6313-6319 (1994).
8. Sampaleanu, L. M., Vallee, F., Slingsby, C. & Howell, P. L. *Biochemistry*, **40**, 2732-2742 (2001).

Crystal Structure Analysis of Thermostable Aspartase and Exploration of Functional Sites

Institute for Chemical Research, Kyoto University
Tomomi Fujii and Yasuo Hata

The crystal structure of the thermostable aspartase from *Bacillus* sp. YM55-1 was solved by the molecular replacement method using the *E. coli* enzyme as a search model and refined up to 2.5 Å resolution. The overall folding of the present enzyme subunit is similar to those of *E. coli* aspartase and *E. coli* fumarase both of which belong to the same family with the present enzyme. The local structural comparison among these three enzymes revealed seven structurally different regions. Four of the regions were located around putative functional sites, suggesting the involvement of these regions into functions characteristic of the individual enzymes. Moreover, thermostability and high-activity of the *Bacillus* aspartase were discussed based on the structural comparison with related enzymes.