

グルタチオン非異存型ホルムアルデヒド脱水素酵素の 補酵素認識機構

昭和大学・薬学部・日下部吉男、田中信忠、中村和郎

Mechanism of coenzyme recognition
by glutathione-independent formaldehyde dehydrogenase

Yoshio Kusakabe, Nobutada Tanaka, Kazuo T. Nakamura
School of Pharmaceutical Sciences, Showa University

Formaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida* (PFDH) is a member of the zinc-containing medium-chain alcohol dehydrogenase family. The pyridine nucleotide NAD(H) in PFDH is tightly but not covalently bound to the protein and acts as a cofactor. The structural basis of the tightly bound cofactor of PFDH was unknown. The crystal structure of PFDH has been solved by the multiwavelength anomalous diffraction method using intrinsic zinc ions and has been refined at a 1.65 Å resolution. The present structure analysis reveals that the insertion loop specifically found among the glutathione-independent form aldehyde dehydrogenases is responsible for the tight cofactor binding of these enzymes.

1. はじめに

薬学分野における酵素の立体構造情報の応用と言え、誰もが最初に思い付くのが、酵素阻害剤あるいは酵素製剤の医薬品への応用である。本稿では、そのような酵素の派手な応用例ではなく、一見地味ではあるが、人々の健康を維持するために必須の臨床検査分析で用いられる酵素の一つに着目し、立体構造と機能に関し紹介したい。臨床検査試薬用酵素の立体構造解析は、基質特異性のコントロール(より厳密にしたり、より広範囲な選択性にしたり)や安定性を高めることに繋がると期待できる。

腎臓の機能が低下すると、血清中のクレアチニン濃度が異常に高くなることから、腎機能の指標として、クレアチニン量が測定される。クレアチニン量の測定には、Jaffe法が用いられてきたが、共存物による干渉等の問題があることから、近年、急速に酵素法に置き換わりつつある。著者らの共同研究者である、芳本忠教授、伊藤潔助教授(長崎大学・薬学部)のグループでは、クレアチニンの定量に用いられる酵素群を有するクレアチニン分解菌として *Pseudomonas putida* を見出し、クレアチンアミドヒドロラーゼ(クレアチナーゼ) [1]、クレアチンアミジノヒドロラーゼ(クレアチナー

ゼ) [2]、サルコシン脱水素酵素[3]、ホルムアルデヒド脱水素酵素[4]を単離・精製・クローニングし、性質を明らかにしている(図1)。本稿では、これらの酵素群の中で、興味深い特徴を有する、ホルムアルデヒド脱水素酵素に関し紹介したい。

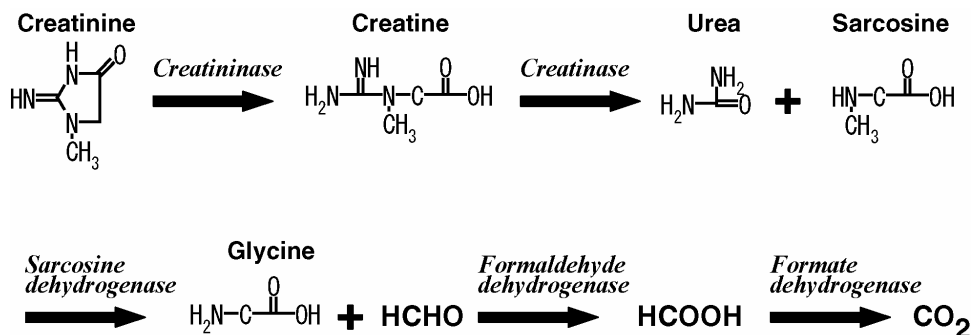


図1: *Pseudomonas putida*のクレアチニン代謝経路。

2. *Pseudomonas putida*由来ホルムアルデヒド脱水素酵素

アルコールの代謝により生じるアルデヒドは、生体において有害な化合物であるため、アルデヒド脱水素酵素により速やかに代謝されなければならない。*Pseudomonas putida*由来のホルムアルデヒド脱水素酵素(PFDH)は、各サブユニットが398アミノ酸残基からなるホモ4量体酵素で、NADを補酵素とし、亜鉛含有中鎖型アルコール脱水素酵素ファミリーに属することが明らかにされている[4, 5]。一般に広く存在するホルムアルデヒド脱水素酵素は反応にグルタチオンを必要とするのに対し、本酵素はグルタチオン非依存的にアルデヒドの酸化・還元を触媒する特徴的な酵素である[4, 5]。

本酵素の触媒する反応に関しては、2分子のアルデヒドからアルコールとカルボン酸がそれぞれ1分子ずつ生成するdismutation反応を触媒する酵素であることがわかっている(図2)[6]。また、類縁の脱水素酵素の場合と異なり、本酵素に結合した補酵

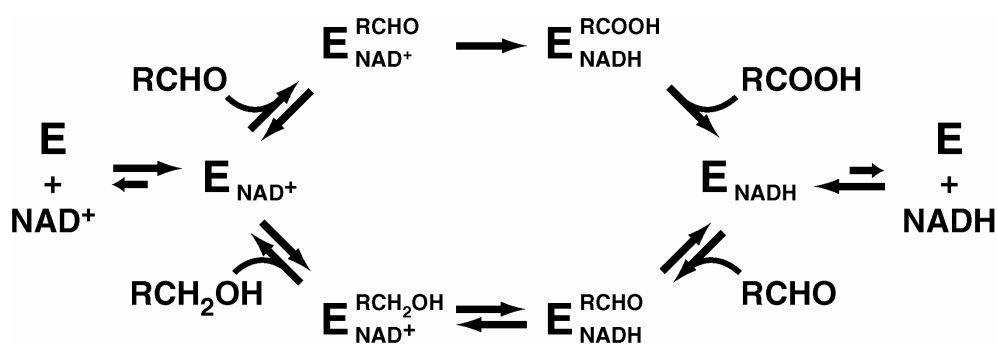


図2: PFDHの反応機構モデル

素は、生理的pHでは、ほとんど解離しないことが知られている。このようにNADを強く結合した蛋白は、ニコチンプロテインと呼ばれている[7]。グルタチオン非依存的なアルデヒドの酸化還元反応機構や、本酵素が補酵素と強く結合している理由を解明するため、我々は、PFDHの結晶化を行い[8]、含有亜鉛を利用した多波長異常散乱法を用いて立体構造を解明した[9]。

3. 結晶構造解析

0.1M Tris (pH 8.0), 1.8M 硫酸アンモニウム, 10%(v/v) Dioxaneを沈殿剤溶液としたハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った[8]。この結晶の空間群は $P3_112$ 、格子定数は $a = 85.74 \text{ \AA}$, $b = 85.74 \text{ \AA}$, $c = 190.9 \text{ \AA}$ であり、非対称単位中には2つのサブユニット(テトラマーの半分)が含まれていた。

当初、既報の種々のアルコール脱水素酵素類をモデル分子とし、分子置換法による位相決定を試みた。回転関数の計算では尤もらしい解が得られたものの、並進関数で有意な解を見つけることが出来なかった。そこで、重原子同型置換法による位相決定を行うため、数十種類の重原子誘導体結晶を調製し、回折実験を行った。しかし、有効な誘導体を得ることができなかった。分子置換法、重原子同型置換法による位相決定が難航したことから、位相決定の戦略を多波長異常散乱法に切り替えた。Se-Met置換蛋白質の発現・精製を行うのと並行し、PFDHには内因性の亜鉛イオン(サブユニットあたり2つ)が含まれているので、それを利用したMAD法による位相決定を試みた。結果的には、結晶化に必要な量のSe-Met置換蛋白質が得られる前に、含有亜鉛を利用したMAD法において位相決定に成功し、分解能 1.65 \AA で精密化を行った($R = 0.171$, $R_{\text{free}} = 0.206$) [9]。

4. サブユニットの構造

PFDHの各々のサブユニットは、類縁のアルコール脱水素酵素類と同様に、触媒ドメインと補酵素結合ドメインの2つのドメインによって構成されており、サブユニットの中央部のくぼみが活性部位のクレフトである(図3)。触媒ドメインは、1-170, 338-398のアミノ酸残基からなっている。このドメインのコアの部分は主として β -strandにより構成され、5本の α -helixが、コアの外側を取り囲んでいる。補酵素結合ドメインは、171-337のアミノ酸残基により構成され、 $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ ユニットの2回繰り返しから成る典型的な補酵素結合モチーフである、Rossmann foldを形成している。注目すべき特徴として、PFDHには、補酵素結合ドメインに2本の長いループがある。一つは βD と αE の間に存在し、もう一つは βE と αF の間に存在している。類縁蛋白質であるウマ肝臓由来アルコール脱水素酵素(LADH)の場合、補酵素結合ドメインにこれらのループに相当する長いループは無い。

補酵素である NAD 分子は、各サブユニットの活性部位クレフトの底に1分子結合しており、他のサブユニットのアミノ酸残基とは相互作用していない。酵素と補酵素の結合比は、明らかに 1:1 である。従って、各々のサブユニットに独立な活性部位があり、テトラマーにおいては、合計 4 箇所の活性部位があることになる。

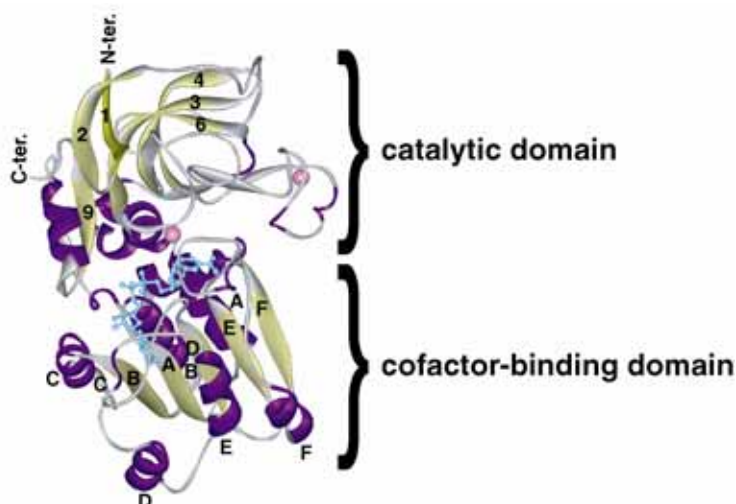


図 3: PFDH のサブユニットの構造。

NAD (水色) を ball-and-stick モデル、Zn (ピンク) を space-filling モデルで表している。

5. テトラマーの全体構造

PFDH のテトラマー中の 4 サブユニット (黄、緑、青、赤) は、 222 の対称によって関係付けられている (図 4)。テトラマー全体の大きさは、約 $85 \text{ \AA} \times 85 \text{ \AA} \times 65 \text{ \AA}$ 程度である。結晶中では、非対称単位中の 2 つのサブユニットが $[210]$ 方向の結晶学的な 2 回回転軸によって関係づけられている。PFDH のテトラマーは、ダイマーのダイマー (黄と緑から成るダイマーと青と赤から成るダイマー) とみなすことができる。ダイマーを構成するサブユニット間の相互作用は、類縁の LADH (こちらはダイマーとして存在する) において見られる相互作用に類似している。テトラマーを形成する、ダイマー同士の相互作用は、活性部位クレフトの反対側の分子表面で行われている。従って、テトラマーとして機能する場合でも、全ての活性部位のクレフトが分子表面に露出しており、基質のアクセスが可能である。

6. 金属結合様式

PFDH には、各サブユニットあたり、2 つの亜鉛イオンが配位結合している。一方は catalytic zinc と呼ばれており、PFDH のサブユニット内の 2 つのドメイン間のクレフトの奥に存在している。この亜鉛イオンは、触媒ドメイン内の 3 つの蛋白質側鎖に結合している。それらは、Cys46, His67, Asp169 である。そして、水分子が結合することにより、4 面体の配位となっている。配位子の元素が異なる (酸素、窒素、硫黄) ことから亜鉛 - 配位子間距離が異なるため、4 面体配位のジオメトリーは多少ゆがん

でいる。もう一方の亜鉛イオンは structural zinc と呼ばれており、触媒ドメインの突起部分に存在している。この亜鉛イオンは、触媒ドメインの4つの蛋白質側鎖に結合している。それらは、Cys97, Cys100, Cys103, Cys111 である。catalytic zinc の場合と異なり、structural zinc の場合、配位子が全てシステイン残基の硫黄原子であるため亜鉛 - 配位子間距離はほぼ等しく (約 2.3 Å) 理想的な4面体配位のジオメトリーをとっている。

7. 補酵素結合様式

PFDH による触媒反応には、NAD が必須である。この NAD は、元々酵素に結合しているため、精製した酵素に NAD を添加せずに活性測定を行っても、酵素活性が有る。NAD 分子自身のコンフォメーションと補酵素結合ドメインへの結合様式は、ADH ファミリー間において、良く保存されている。PFDH に結合している NAD のアデニン環およびニコチンアミド環のリボースに対する配向は、アデニン環、ニコチンアミド環、共に *anti* である。ニコチンアミド環が *anti* のコンフォメーションをとっていることから、ヒドリド転移の立体特異性は A-face (*pro-R*) であるといえる。リボースのパッカリングは、アデニン環、ニコチンアミド環、共に C2'-*endo* である。

NAD と PFDH の最も興味深い相互作用は、NAD のアデニン環と PFDH の補酵素結合ドメインのβDとαEの間の長いループ中にある主鎖や側鎖との強固な水素結合ネットワークである。この相互作用は、これまで立体構造が報告されている類縁の酵素では見られないもので、今回の解析の構造解析の結果、初めて明らかになったものである。次のセクションで詳しく紹介する。

8. ニコチノプロテインにおける補酵素認識機構

PFDH における強固な補酵素結合の要因を立体構造の観点から説明付けるため、TOP サーバー [10] を用いた構造類似サーチを行った。その結果、様々な ADH が PFDH の類似構造を有するものとしてヒットした。それらの中で、4 量体酵素である *C. deijerinchii* 由来 ADH (CADH [11]) が、比較的立体構造の類似性が高く、サブユニットあたり 279 個の構造的に同価な Cα 原子の RMSD が 1.72 Å であった。2 量体酵素である LADH [12] も同様に類似性が高く、265 個の構造的に同価な Cα 原子の RMSD が 1.76 Å であった。CADH も LADH も、PFDH とは異なり、反応終了後 NAD が解離するタイプの、通常の水素酵素である。ここでは、類縁酵素中で最も研究がなされている LADH を構造比較の対象として議論する。PFDH と LADH のサブユニットの構造を比較してみると (図 5、左) アミノ酸配列の相同性が 19% しかないにも関わらず、2 次構造のトポロジーが互いに非常に良く似ている。構造の差は、ループ領域のみ見られる。最も注目すべき点は、PFDH にのみ見られる、βD と αE の間の長いループ (黄) が、NAD のアデニン環部分を覆っているという点である。その部分を拡

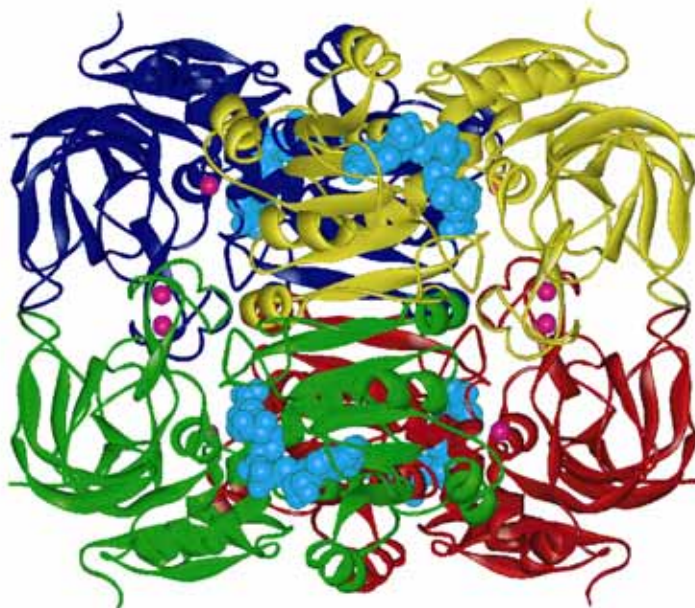


図4： PFDH のテトラマーの構造。

各サブユニットを別々の色（黄、緑、青、赤）のリボン図で表示し、NAD（水色）と Zn（ピンク）を space-filling モデルで表している。

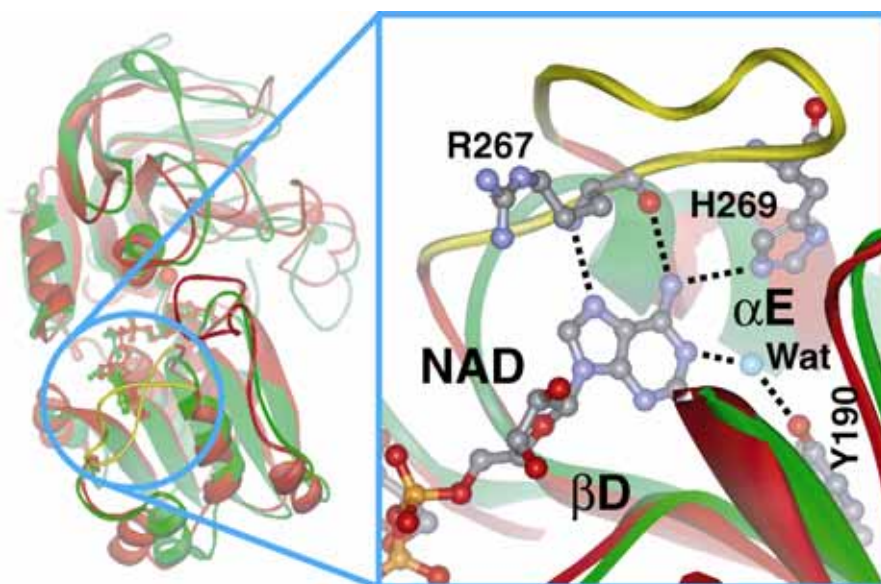


図5： PFDH（赤）と LADH（緑）のサブユニットの構造比較。

左の図の で囲った部分を右側に拡大表示している。PFDH の挿入ループを黄色で表している。

大してみると(図5、右) アデニン環と PFDH に特有の挿入ループ(黄)との間に強固な水素結合ネットワークが存在している。LADH においては、PFDH のような挿入ループはなく、該当する部分は短いターンになっている(図5、右、緑)ため、酵素と NAD のアデニン環との間に、PFDH において見られるような水素結合ネットワークは存在しない。各々のサブユニットの van der Waals 図を描いてみると、LADH においてはアデニン環が溶媒に露出しているのに対し、PFDH においてはアデニン環が挿入ループによって完全に溶媒から蔽われていることが分かる[9]。従って、反応終了後 NAD が解離する酵素である LADH には存在せず、NAD が常に結合している PFDH にのみ存在する挿入ループが、PFDH における強固な補酵素結合の要因であると考えられる。

また、類縁酵素間の1次構造の比較からも、 β D と α E の間の挿入ループの補酵素結合性への関与が示唆される。まず、PFDH と CADH や LADH 等の反応終了後 NAD が解離するタイプの通常の脱水素酵素のアミノ酸配列を比較してみると、後者の場合は、いずれも β D と α E の間は数残基程度しかなく、短いターンしか形成できない。一方、PFDH と近縁で、NAD が常に結合している formaldehyde dismutase 類のアミノ酸配列を比較してみると、若干長さや配列が異なるものの、PFDH の β D と α E の間の挿入ループに相当するループが、「ニコチンプロテイン」と呼ばれる近縁蛋白質間では保存されている[9]。

ここで述べた立体構造比較(図5)および1次構造の比較から、PFDH および近縁の formaldehyde dismutase 類に共通して存在する β D と α E の間の挿入ループが、強固な補酵素結合の要因であると結論付けることができる。挿入ループの役割を検討するため、今後、挿入ループの欠失変異体の機能解析、構造解析を行う必要がある。

9. おわりに

本稿では、PFDH の補酵素認識機構に的を絞り、簡単に紹介した。基質認識機構や反応機構に関しては、まだまだ行うべき実験が多くある。既にいくつかの阻害剤との複合体の構造解析は終わっているが、基質とかなり構造が異なる阻害剤であるため、より基質に類似した化合物との複合体の構造解析を行いたいと考えている。

クレアチニン分解経路の酵素群(図1)の立体構造解析の標的としては、我々が PFDH の立体構造を決定したことにより、残るは、第一段階のクレアチナーゼのみとなった。我々は、昨年、クレアチナーゼの結晶化に成功し[13]、重原子同型置換法により既にクレアチナーゼの立体構造を決定済みである(投稿中)。全く新規の面白い構造を有する酵素なので、別の機会に紹介させて頂きたいと考えている。

10 . 謝辞

本研究は、長崎大学薬学部の芳本忠教授、伊藤潔助教授らとの共同研究である。MAD 法による位相決定に関しては、PF および SPring-8 のタンパクビームラインのスタッフの方々に多くの有益な助言をいただいた。この場を借りて御礼申し上げます。

参考文献

- [1] Rikitake, K., Oka, I., Ando, M., Yoshimoto, T., and Tsuru, D. *J. Biochem.* **86**, 1109-1117 (1979).
- [2] Yoshimoto, T., Oka, I., and Tsuru, D. *Arch. Biochem. Biophys.* **177**, 508-515 (1976).
- [3] Oka, I., Yoshimoto, T., Rikitake, K., Ogushi, S., and Tsuru, D. *Agric. Biol. Chem.* **43**, 1197-1203 (1979).
- [4] Ogushi, S., Ando, M., and Tsuru, D. *J. Biochem.* **96**, 1587-1591 (1984).
- [5] Ito, K., Takahashi, M., Yoshimoto, T., and Tsuru, D. *J. Bacteriol.* **176**, 2483-2491 (1994).
- [6] Oppenheimer, N.J., Henehan, G.T.M., Heute-Perez, J.A., and Ito, K. In *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 6* (Weiner, H. et al. eds), pp 417-423, Plenum Press, New York (1996).
- [7] Piersma, S.R., de Vries, S., and Duine, J.A. In *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 6* (Weiner, H. et al. eds), pp 4425-434, Plenum Press, New York (1996).
- [8] Kusakabe, Y., Tanaka, N., Ito, K., Yoshimoto, T., and Nakamura, K.T. *Protein Peptide Lett.* **8**, 237-240 (2001).
- [9] Tanaka, N., Kusakabe, Y., Ito, K., Yoshimoto, T., and Nakamura, K.T. *J. Mol. Biol.* **324**, 519-533 (2002).
- [10] Lu, G. *J. Appl. Crystallogr.* **33**, 176-183 (2000).
- [11] Korkin, Y., Kalb(Gilboa), A.J., Perez, M., Bogin, O., Burstein, Y., and Frolow, F. *J. Mol. Biol.* **278**, 967-981 (1998).
- [12] Al-Karadaghi, S., Zeppezauer, E.S., Hovmoller, S., Petratos, K., Terry, H., and Wilson, K.S. *Acta Crystallogr D***50**, 793-807 (1994).
- [13] Ito K, Kanada N, Inoue T, Furukawa K, Yamashita K, Tanaka N, Nakamura KT, Nishiya Y, Sogabe A, and Yoshimoto T. *Acta Crystallogr D***58**, 2180-2181 (2002).