

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 4 日現在

機関番号：16201
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23770122
 研究課題名（和文） 新規単糖異性化反応機構の解明を目指した希少糖生産酵素群の X 線結晶解析
 研究課題名（英文） X-ray structure analysis of rare sugar producible enzymes aiming for elucidation of novel isomerization mechanism
 研究代表者
 吉田 裕美（YOSHIDA HIROMI）
 香川大学・総合生命科学研究センター・准教授
 研究者番号：10313305

研究成果の概要（和文）：本研究では、天然には微量にしか存在しない糖、「希少糖」の生産に利用される単糖異性化酵素（希少糖生産酵素）として、他のタンパク質と相同性のない新規希少糖生産酵素、土壌菌 *Acinetobacter* sp. 由来 L-リボースイソメラーゼ（L-RI）の立体構造解析を行った。L-RI は希少糖 L-リボースと L-リブロース間の可逆的な異性化反応を触媒する酵素であり、これらを基質とする酵素は極めて少なく、希少糖生産には極めて有用な酵素である。構造解析の結果、L-RI は二量体を形成し、その単量体の構造は大腸菌 0157:H7 に由来する D-リキソースイソメラーゼの構造と類似性が見られた。L-RI の活性部位には金属イオンが 1 つ結合し、3 つの His 残基が結合に関与していた。触媒反応には 2 つの Glu が触媒残基として関わっていると考えられた

研究成果の概要（英文）：X-ray structure of a novel isomerase, L-ribose isomerase from *Acinetobacter* sp. (L-RI) was determined. L-RI can catalyze reversible isomerization between L-ribose and L-ribulose, and is a plausible enzyme for rare sugar production. In the structure analysis, L-RI showed the dimer formation. The monomer structure of L-RI is similar to that of D-lyxose isomerase from *Escherichia coli* 0157:H7. L-RI retains a metal ion in the active site with three histidines. Two glutamates are putative catalytic residues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：構造生物科学、タンパク質工学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物科学

キーワード：X 線結晶解析、単糖異性化酵素、L-ラムノースイソメラーゼ、D-タガトースエピメラーゼ、D-アラビノースイソメラーゼ、L-リボースイソメラーゼ、希少糖、放射光、部位特異的変異

1. 研究開始当初の背景

(1) 希少糖と希少糖生産酵素

単糖の構造中には不斉炭素が多くあり、炭素原子 6 つからなる 6 単糖では 24 種もの立体異性体が存在する。しかしながら、天然に存在する単糖はかぎられ、6 単糖であれば D-グルコース、D-フルクトース、D-ガラクトース、D-マンノースのみが多量に存在し、その他の

ものはごく微量にしか存在が確認できない「希少糖」と呼ばれている。香川大学の何森教授らのグループは、種々の単糖異性化酵素を用いて、天然に豊富に存在する D-グルコースおよび D-フルクトースから「希少糖」を大量に生産する技術開発に成功し、現在では、数多くの種類の希少糖が比較的安価で市販されるようになり、希少糖を用いた研究が可能となっている。

希少糖生産ストラテジーの代表的生産では、D-フルクトースの3位をエピマー化（不斉炭素のキラリティーを反転）するエピメラーゼを用いてD-プシコースを生産する。次に、ケトース・アルドースの異性化を行うイソメラーゼを作用させる。イソメラーゼの種類によってD-アロースとD-アルトロースが生じる。このように、エピメラーゼとイソメラーゼを順次作用させて、24種の立体異性体が生産できる。何森教授らは、それぞれの段階で反応効率のよい酵素を自然界より発見し、希少糖生産酵素として用いている。希少糖生産酵素として、*Pseudomonas cichorii* 由来D-タガトース 3-エピメラーゼ（D-TE）、*Pseudomonas stutzeri* 由来 L-ラムノースイソメラーゼ（L-RhI）、*Bacillus pallidus* 由来D-アラビノースイソメラーゼ（D-AI）があるが、これらの酵素の触媒反応機構は全く不明であった。われわれは、これまでに上記の3つの酵素の立体構造をX線結晶解析により決定し、その触媒反応機構について研究を行い報告してきた。D-TEについては、基質複合体のX線構造から、基質の3位の炭素と酸素の間でプロトンが交換するというC3-O3 proton-exchange機構を新たに提唱した。また、一般に、単糖のケトース・アルドース異性化反応を触媒するイソメラーゼについては、1つの塩基を必要とするhydride-shift機構と2つの塩基を必要とするcis-enediol機構のいずれかの機構が、これまでに提唱されている。われわれは、基質あるいは阻害剤複合体の構造解析により、L-RhIはhydride-shift機構に基づき、D-AIはcis-enediol機構に基づくことを示した。さらに、L-RhIについては、環状構造の基質が酵素に結合→開環→異性化→再び環状構造を形成→酵素から離脱、までの各ステップで反応が止まる変異酵素を用いた研究に着手し、新規な糖環開環機構を提唱してきた。

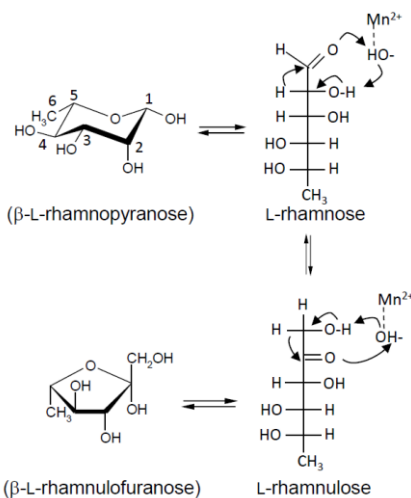


図1. L-ラムノースとL-ラムニュロース間の可逆的な異性化反応を触媒するL-RhI

L-RhIはL-ラムノースとL-ラムニュロース間の可逆的な異性化反応を触媒する酵素であるが、それぞれの基質は水溶液中では、ほとんどが環状構造（ピラノース環あるいはフラノース環）をとると考えられている。本酵素は異性化反応を触媒する前に、環状構造の基質を認識して糖環を開環すると考えられる（図1）。

(2) *Acinetobacter* sp. 由来L-リボースイソメラーゼ（L-RI）

近年、希少糖研究センターでは新規希少糖生産酵素として*Acinetobacter* sp. 由来L-リボースイソメラーゼ（L-RI）に注目している。L-RIは5単糖のL-リボースとL-リブロース間の可逆的な異性化反応を触媒する酵素である。両基質とも希少糖であり、これらを基質とする酵素は極めて少なく、L-RIは、希少糖5単糖生産には極めて有用な酵素である。L-RIは、相同性の高い1次構造を持つタンパク質が見つからない極めてユニークな酵素であり、その立体構造は、これまでの単糖異性化酵素にない全く新規なものであると考えられる。さらに、L-RIには、hydride-shift機構およびcis-enediol機構に見られる保存されているアミノ酸が確認できないことから、全く新規な機構によりケトース・アルドース異性化反応を触媒している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、天然には微量にしか存在しない糖、「希少糖」の生産に利用される単糖異性化酵素（希少糖生産酵素）として、他のタンパク質と相同性がなく、新規な立体構造・触媒反応機構を有していると予想される*Acinetobacter* sp. L-リボースイソメラーゼ（L-RI）の立体構造の決定、新規単糖異性化反応の解明を目指すとともに、これまでに構造を決定してきた希少糖生産酵素の糖環開環機構を含めた触媒反応機構の解明に関する構造生物学的研究を展開することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Acinetobacter* sp. L-リボースイソメラーゼ（L-RI）のX線結晶解析

① L-RIの大量発現・精製の効率化
L-RIの精製効率を良くするため、N末端へHisタグを付加し、高発現で酵素活性も維持される酵素を調製した。

② L-RIの構造決定
Hisタグを付けたL-RIのセレノメチオニン置

換体を調製し、精製酵素を用いて結晶化を行った。得られた結晶を使用して多波長異常分散法による位相決定を行い、L-RhI の立体構造を決定した。

(2) *P. stutzeri* L-ラムノースイソメラーゼ (L-RhI) の糖環開環機構の解明

① L-RhI の基質認識部位の改変

既に構造を決定している L-RhI の活性部位の構造情報をもとに、基質認識への影響を及ぼすと考えられる残基 His101 に着目し、Asn 置換した変異酵素 H101N の構築を行った。

② 変異酵素 H101N の評価と構造解析

L-RhI の変異酵素 H101N の酵素活性を測定し、酵素活性が低下していることを確認した。活性が低下した変異酵素 H101N の結晶を作成し、基質である L-ラムノースを抗凍結剤として X線回折データを収集し、構造決定を行った。

4. 研究成果

(1) *Acinetobacter* sp. L-リボースイソメラーゼ (L-RI) の X線結晶解析

セレノメチオニン置換体を用いることで、L-RI の初期位相が得られ、立体構造を決定することができた。L-RI は二量体を形成することができ(図 2)、その単量体の構造は大腸菌 O157:H7 に由来する D-リキソースイソメラーゼの構造と類似性が見られた(図 3)。

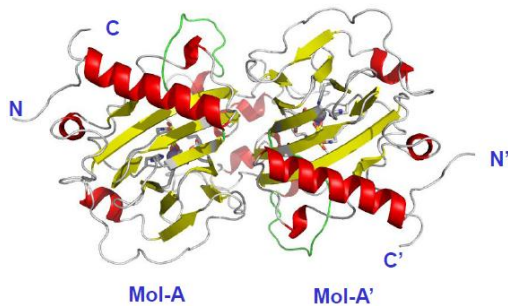


図 2. 二量体を形成する L-RI

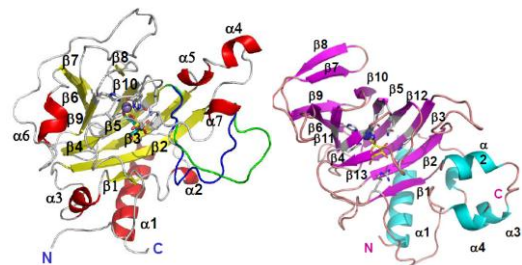


図 3. L-RI (左) と大腸菌 O157:H7 由来 D-リキソースイソメラーゼ (右、PDBID:3MPB) の単量体構造の比較

両者のアミノ酸配列の相同性は 18%程度であったが、活性部位の近傍は非常によく保存

され、L-RI の活性部位にも金属イオンが1つ結合しており、3つの His 残基 (His117, 119, 199) が結合に関与していた。また、触媒反応には2つの触媒残基 Glu125 と Glu215 が関わっていると考えられた(図 4)。

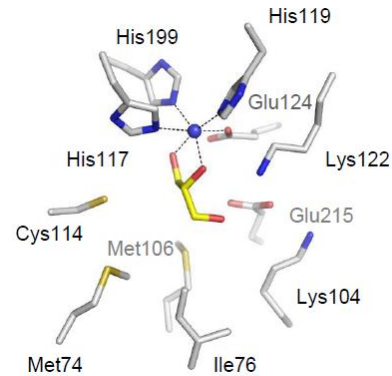


図 4. グリセロールが結合した L-RI の活性部位

(2) *P. stutzeri* L-ラムノースイソメラーゼ (L-RhI) の糖環開環機構の解明

希少糖生産酵素の一つとして、既に構造決定を報告してきた *Pseudomonas stutzeri* 由来 L-ラムノースイソメラーゼ (L-RhI) において、基質との複合体構造を決定すると、野生型では基質の L-ラムノースが常に開環した構造を取っていた(図 5)。L-RhI の活性部位近傍に変異を導入した酵素を構築し、構造解析を続けた結果、これまでに酵素活性を完全に失った変異酵素 D327N において、5員環の L-ラムヌロフラノースが結合した構造を得ることができていた。

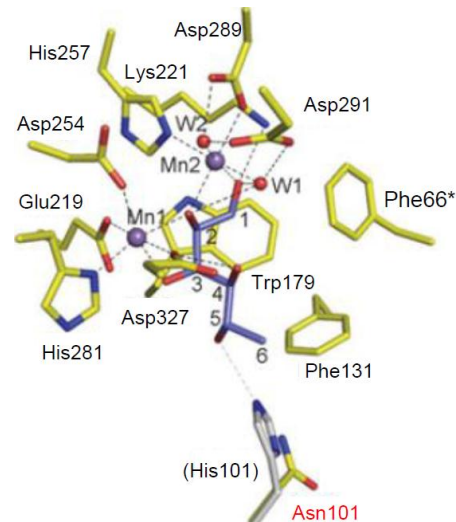


図 5. 開環した L-ラムノースが結合した L-RhI の活性部位

変異酵素の構造解析を続けるなかで、酵素活

性が完全に失われているものではなく、若干の酵素活性を維持している変異酵素 H101N の X 線結晶構造解析を行うことにより、6 員環の L-ラムノピラノースが結合した構造解析に成功した (図 6)。

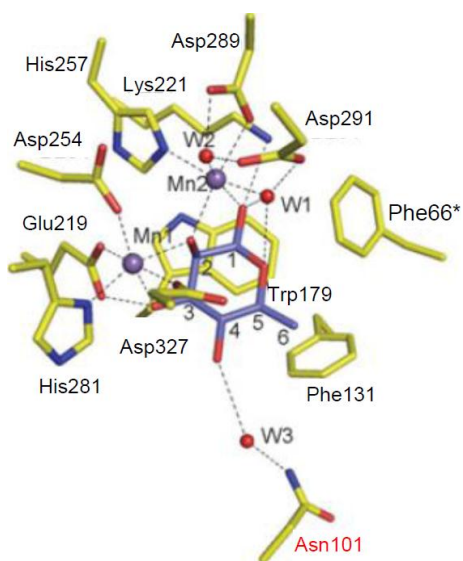


図 6. 6 員環の L-ラムノピラノースが結合した変異酵素 H101N

これにより、基質は 5 員環と 6 員環構造が認識され、その糖環の開環には触媒となる水分子 (図 6 の W1) が関与していることが示唆され、これらの結果をまとめた予想される L-RhI の糖環開環機構を含めた触媒反応機構を報告した (図 7) (Yoshida *et al.*, (2013) FEBS Open Bio. 3, 35-40)。

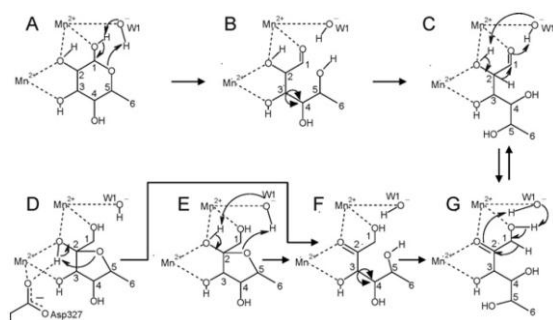


図 7. 予想された L-RhI の糖環開環機構を含む触媒反応機構

(3) その他の希少糖関連研究

① 最近、希少糖研センターにより *Pseudomonas cichorii* 由来 D-タガトース 3-エピメラーゼ (D-TE) はデオキシ希少糖を基質とすることができるという報告があり、今後の希少糖生産酵素の構造解析の展開となる D-TE とデオキシ希少糖との複合体構造に着手した。1-デオキシ 3-ケト-D-ガラクト

ールとの複合体構造が得られ、構造解析を報した。(第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月)

② 京都薬科大学の上西教授らのグループにより合成された D-グルコースと希少糖 D-プシコースから構成される 2 糖の結晶構造を決定し、結晶構造データを報告した (Kamitori *et al.*, (2011) Carbohydr Res, 346(9), 1182-1185)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Hiromi Yoshida, Akihide Yoshihara, Misa Teraoka, Satoshi Yamashita, Ken Izumori and Shigehiro Kamitori, "Structure of L-rhamnose isomerase in complex with L-rhamnopyranose demonstrates the sugar-ring opening mechanism and the role of a substrate sub-binding site", FEBS Open Bio. 3, 35-40, (2013), 査読有
DOI: 10.1016/j.fob.2012.11.008

(2) Hiromi Yoshida, Misa Teraoka, Akihide Yoshihara, Ken Izumori and Shigehiro Kamitori, "Overexpression, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of L-ribose isomerase from *Acinetobacter* sp. strain DL-28. Acta crystallogr F 67(10), 1281-1284, (2011), 査読有
DOI: 10.1107/S1744309111030351

(3) Shigehiro Kamitori, Atsushi Ueda, Yasuhiro Tahara, Hiromi Yoshida, Tomohiko Ishii and Jun'ichi Uenishi, "Crystal structures of rare disaccharides, α -D-glucopyranosyl β -D-psicofuranoside, and α -D-galactopyranosyl β -D-psicofuranoside" Carbohydr Res, 346(9), 1182-1185, (2011), 査読有
DOI: 10.1016/j.carres.2011.04.003

[学会発表] (計 6 件)

① 吉田裕美, 茅原静香, 吉原明秀, 寺岡美沙, 石井知彦, 何森健, 神鳥成弘, 「X 線構造解析による *Pseudomonas cichorii* D-タガトース 3-エピメラーゼにおける 1-deoxy 3-keto-D-galactitol の認識機構に関する研究」第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 15 日, (福岡)

② Hiromi Yoshida, Misa Teraoka, Akihide

Yoshihara, Ken Izumori and Shigehiro Kamitori, “X-ray structure of L-ribose isomerase in complex with L-ribose and a deduced catalytic mechanism”, September 5, 2012, 22nd IUBMB 37th FEBS Congress (Sevilla, Spain)

③吉田裕美, 寺岡美沙, 何森健, 神鳥成弘, 「糖環開環機構の解明を目指した *Pseudomonas stutzeri* 由来 L-ラムノースイソメラーゼ変異酵素の構造解析」2012年度農芸化学会大会, 2012年3月25日, (京都)

④Hiromi Yoshida, Mitsugu Yamada, Kosei Takeda, Takeyori Nishitani, Yuya Ohyama, Masatsugu Yamaji, Tomohiko Ishii, Goro Takada, Ken Izumori and Shigehiro Kamitori, “X-ray structures of the enzymes used for rare sugar production and their catalytic reaction mechanisms”, November 9, 2011, Rare Sugar Congress 2011 (Takamatsu, Japan)

⑤ Hiromi Yoshida, Misa Teraoka, Ken Izumori and Shigehiro Kamitori, “Structure analysis of mutant L-rhamnose isomerase from *Pseudomonas stutzeri* to elucidate the ring opening mechanism”, November 11, 2011, Rare Sugar Congress 2011 (Takamatsu, Japan)

⑥Hiromi Yoshida, Misa Teraoka, Akihide Yoshihara, Ken Izumori and Shigehiro Kamitori, “Crystal structure of a rare sugar producible enzyme L-ribose isomerase from *Acinetobacter* sp”, June 5, 2011, 36th FEBS Congress (Torino, Italy)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kagawa-u.ac.jp/~xraylab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 裕美 (YOSHIDA HIROMI)

香川大学・総合生命科学研究センター

・准教授

研究者番号：10313305