

香川大学 ¹総合生命科学研究センター, ²希少糖研究センター, ³工学部

¹ Life Science Research Center, ² Rare Sugar Research Center, ³ Faculty of Engineering, Kagawa University

$$\begin{array}{c} \text{R}_1 \\ | \\ \text{C}=\text{O} \\ | \\ \text{R}_2 \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{R}_1 \\ | \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ | \\ \text{R}_2 \end{array}$$

L-Rhamnose isomerase from *Pseudomonas stutzeri* (L-Rhl) catalyzes the reversible isomerization of not only L-rhamnose to L-rhamnulose but also D-psicose to D-allose.

茅原静佳 S. Kayahara
工学研究科修士1年生
2011.4 -

立体構造解析に基づくD-タガトース 3-エピメラーゼの反応機構

吉田裕美¹, 吉原明秀², 石井知彦³, 何森 健², 神鳥成弘¹

香川大学 ¹総合生命科学研究センター, ²希少糖研究センター, ³工学部

STUDY ON CATALYTIC REACTION MECHANISM OF D-TAGATOSE 3-EPIMERASE BASED ON X-RAY STRUCTURES

Hiromi Yoshida¹, Akihide Yoshihara², Tomohiko Ishii³, Ken Izumori², Shigehiro Kamitori¹

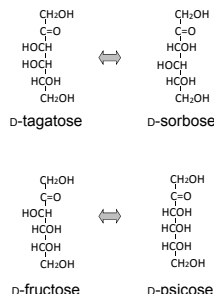
¹Life Science Research Center, ²Rare Sugar Research Center, ³Faculty of Engineering, Kagawa University

D-タガトース 3-エピメラーゼ D-Tagatose 3-epimerase

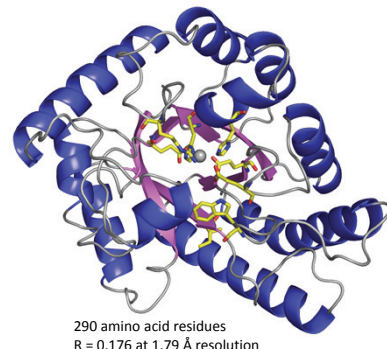
1994年, D-タガトースの3位のエピマー化を触媒する土壌菌 *Pseudomonas cichorii* 由来D-タガトース3-エピメラーゼ (*PcD-TE*) が香川大学希少糖研究センターにより発見された。それまで, リン酸化された単糖のエピメラーゼは見つかっていましたが, フリーの単糖に作用するエピメラーゼの報告はなかった。さらに, *PcD-TE* は, D-タガトースだけでなく, D-フルクトース (D-タガトースの4位エピマー) にも作用しD-プシコースを生成できることがわかった。この*PcD-TE*の発見によって希少糖生産は飛躍的に進展した。

In 1994, *Pseudomonas cichorii* D-tagatose 3-epimerase (*PcD-TE*, 290 amino acid residues, 32,615 Da) was found as the first epimerase for a free monosaccharide as a substrate by Rare Sugar Research Center, Kagawa University, and it was also reported to have an ability to catalyze epimerization of not only D-tagatose to D-sorbose, but also D-fructose to D-psicose. This enzyme was the first breakthrough for rare sugar production.

Epimerization catalyzed by *PcD-TE*



Subunit structure of *PcD-TE*

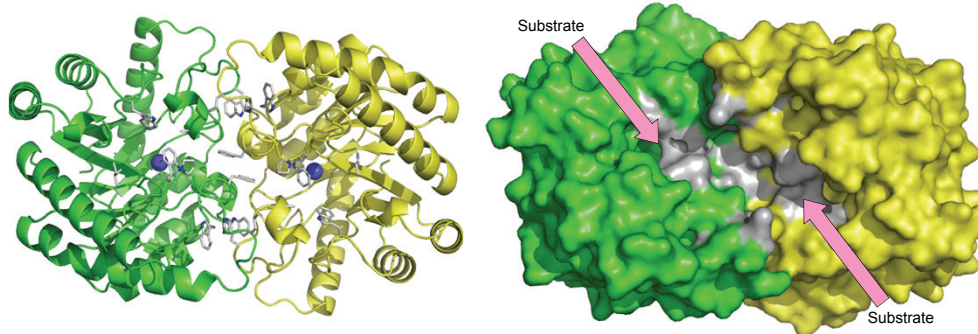


立体構造 X-ray structure of *PcD-TE*

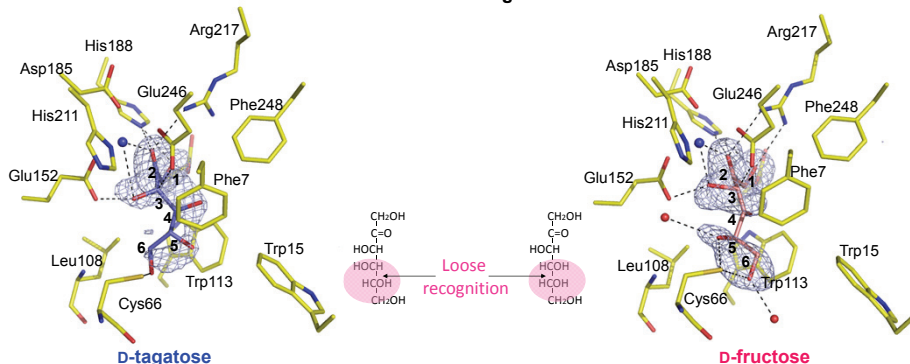
*PcD-TE*は, 2量体を形成する。その界面は疎水性の溝になっており, 基質は, まず, この溝に捕えられて, 活性部位へと送られる。*PcD-TE*は, 活性部位にMn²⁺を持ち, Glu152, Asp185, His211, Glu246と配位結合を形成している。残り二つの配位座に, 基質であるD-タガトースの2位カルボニル酸素 (O2) と3位の水酸基 (O3) が配位結合を形成している。His188 とArg217が都合よくO1, O2と水素結合を形成し, 基質の1, 2, 3位は, かなり厳密に認識されている。それに対して, 基質の4, 5, 6位付近は疎水性アミノ酸残基が配置されており, 水素結合による認識はない。このことが, 4, 5, 6位の基質認識を甘くしている原因であり, その結果, *PcD-TE*はD-タガトースとD-フルクトースの双方を基質とすることができると考えられる。

The biological unit of *PcD-TE* is a homo-dimer, forming the hydrophobic groove reaching the active sites, which a accessible surface for substrate binding. *PcD-TE* requires the metal ion, Mn²⁺, for its catalytic activity, which is coordinated with Glu152, Asp185, His211, and O2/O3 of a substrate. His188 and Arg217 make hydrogen bonds with O1 and O2 of a substrate, strictly recognizing 1-, 2- and 3- positions of a substrate. On the other hand, there are few specific interactions between substrates and the enzyme at the 4-, 5- and 6-positions, suggesting that *PcD-TE* loosely recognizes substrates at these positions. This may be a reason why *PcD-TE* can also efficiently catalyze the epimerizations of D-tagatose and D-fructose.

Biological unit of dimer of *PcD-TE*



Active site structures with bound D-tagatose and D-fructose.

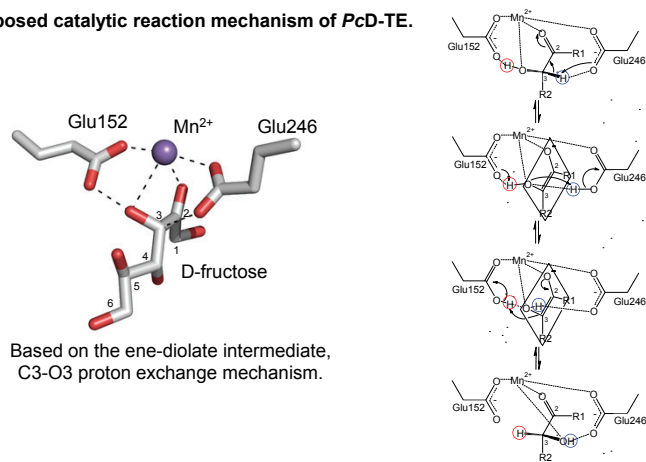


予想される触媒反応機構 Proposed catalytic reaction mechanism

*PcD-TE*においては, 基質をはさむように向かい合った2つのグルタミン酸, Glu152とGlu246が酸-塩基触媒として働くことが予想される。まず, Glu246がC3位のプロトンを引き抜く。それにともない基質は平面構造を持ったcis-エネジオレート反応中間体になり, O3位のプロトンがGlu152に引き抜かれると同時にGlu246からプロトンがO3に移る。最後にGlu152がC3をプロトン化して反応が終わる。結果的にC3とO3上にあったプロトンが交換されたことになるというC3-O3 proton-exchange機構が考えられる。

In the catalytic reaction of *PcD-TE*, two Glu residues facing each other at the Mn²⁺ binding site are expected to act as acid/base catalysts. Upon substrate binding, Glu246 removes a proton from C3 to produce a cis-enediolate intermediate with a plane structure of O2-C2-C3-O3 that is stabilized by Mn²⁺. Subsequently, proton transfer possibly occurs from Glu246 to O3 and from O3 to Glu252 at the same time. Finally, Glu152 protonates C3. Consequently, protons of C3 and O3 are exchanged through the catalytic reaction.

Proposed catalytic reaction mechanism of *PcD-TE*.



立体構造解析に基づくL-ラムノースイソメラーゼの反応機構

吉田裕美¹, 吉原明秀², 石井知彦³, 何森 健², 神鳥成弘¹

香川大学 ¹総合生命科学研究センター, ²希少糖研究センター, ³工学部

STUDY ON CATALYTIC REACTION MECHANISM OF L-RHAMNOSE ISOMERASE BASED ON X-RAY STRUCTURES

Hiromi Yoshida¹, Akihito Yoshihara², Tomohiko Ishii³, Ken Izumori², Shigehiro Kamitori¹

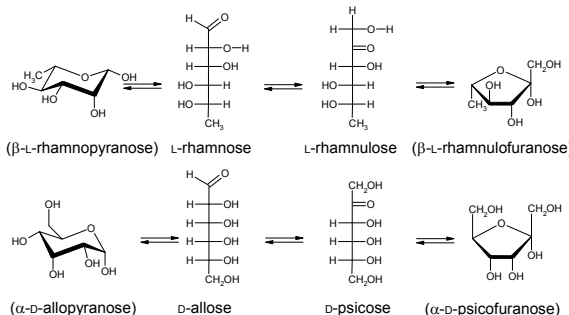
¹Life Science Research Center, ²Rare Sugar Research Center, ³Faculty of Engineering, Kagawa University

L-ラムノースイソメラーゼ L-Rhamnose isomerase

L-ラムノースイソメラーゼは、L-ラムノース(アルドース)とL-ラムヌース(ケトース)との間の異性化反応を可逆的に触媒する酵素である。土壌菌*Pseudomonas stutzeri*由来L-ラムノースイソメラーゼ(*PsL-Rhl*)は、L-ラムノースの他、D-アロース⇌D-ブシコースの異性化反応も触媒することからD-ブシコースからD-アロースの生産に使われている。

L-Rhamnose isomerase catalyzes the reversible isomerization of L-rhamnose (aldose) to L-rhamnulose (ketose). *Pseudomonas stutzeri* L-Rhamnose isomerase (*PsL-Rhl*) is capable of the isomerization between D-allose and D-psicose, and it has been attracting much attention regarding the industrial production of rare sugar, D-allose from D-psicose.

Isoimerization reaction catalyzed by *PsL-Rhl*



Subunit structure of *PsL-Rhl*



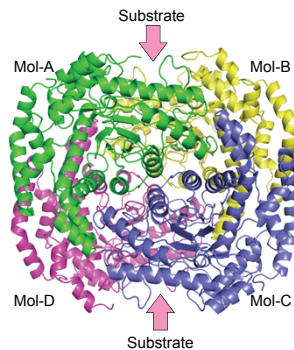
430 amino acid residues
R = 0.163 at 1.60 Å resolution

立体構造 X-ray structure of *PsL-Rhl*

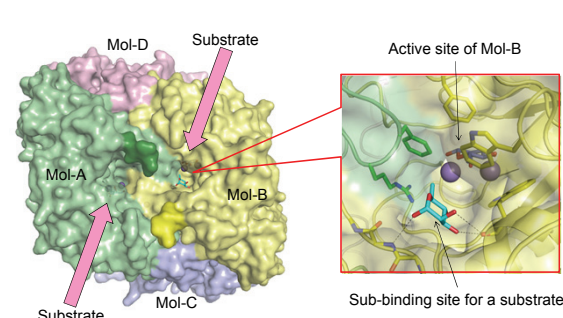
PsL-Rhl は、4量体を形成する。Mol-AとMol-B、およびMol-CとMol-Dの界面は深い溝になっていて、基質は、まず、この溝に捕えられて活性部位へと送られる。*PsL-Rhl*の活性部位には2つMn²⁺が存在し、これらはアミノ酸残基、水分子、基質により6配位8面体構造をとっている。基質のO1, O2, O3は、金属イオンと配位結合するとともに、周囲のアミノ酸残基と水素結合を形成しており、酵素により厳密に認識されている。L-ラムノースのO4はAsp327と、O5はHis101と水素結合している。一方、D-ブシコースのO4はHis101と、O5はAsp327と、それぞれ水素結合を形成している。*PsL-Rhl*は、基質の4, 5位のキラリティーの反転に対して、His101とAsp327が逆に働いて基質を認識することができ、このことが、D-ブシコース/D-アロースを基質とできる要因となっている。

The *PsL-Rhl* forms a homo-tetramer composed of four molecules (Mol-A, Mol-B, Mol-C and Mol-D). The pairs of Mol-A/Mol-B and Mol-C/Mol-D form an accessible surface for substrate-binding, on the opposite side to each other. *PsL-Rhl* requires two metal ions (Mn²⁺) for its catalytic activity, which are coordinated in a distorted octahedral form with six coordination bonds from the enzyme, water, and a substrate. O1, O2, and O3 of a substrate coordinate to the metal ions, and form many hydrogen bonds with the enzyme, helping to fix the substrate in the appropriate conformation for the catalytic reaction. O4 and O5 of L-rhamnose make a hydrogen bond with Asp327 and His101, respectively, while O4 and O5 of D-psicose with His101 and Asp327, respectively. This means that *PsL-Rhl* can recognize substrates with different configurations of C4 and C5, by using His101 and Asp327, and *vice versa*.

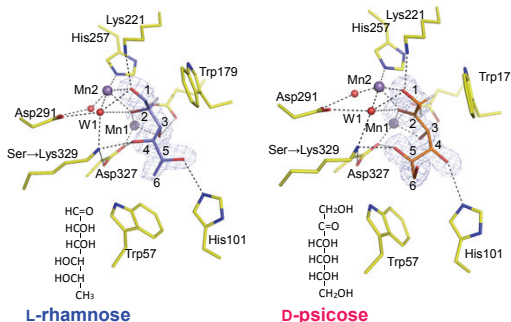
Biological unit of tetramer of *PsL-Rhl*



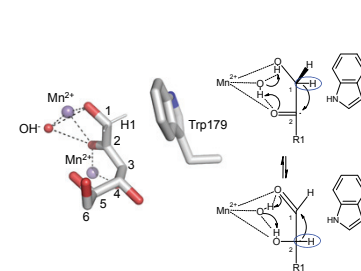
Accessible surface for substrate-binding by Mol-A/Mol-B



Active site structures with bound L-rhamnose and D-psicose



Hydride-shift mechanism



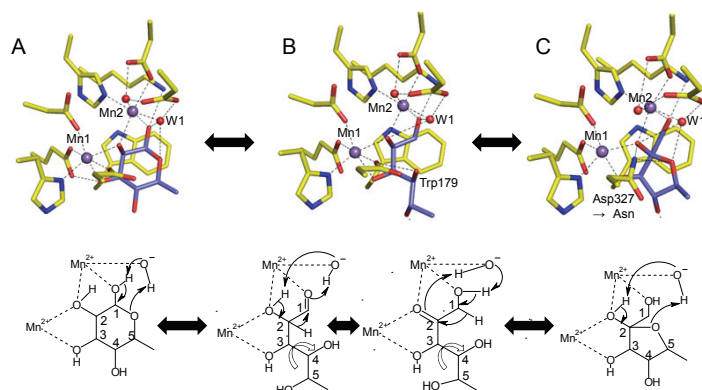
予想される糖開環を含めた触媒反応機構

Proposed catalytic reaction mechanism including sugar-ring opening

変異酵素を用いて、反応の各ステップで止まった X線構造を得ることにより、糖開環を含む反応機構の詳細について明らかにした。まず、6員環構造をもつ基質(L-ラムノピラノース)が酵素の活性部位に結合して、基質のO1, O2, O3が金属イオンと配位結合する(A)。金属イオンに配位している水分子(W1)が酸塩基触媒となり、6員環が開く。基質のC3-C4結合まわりのtorsion角が回転し、基質と酵素との間で水素結合が形成され、基質が固定される。ふたたびW1が酸塩基触媒となりプロトンをもO2からO1に移し、C2からC1へhydride(水素イオン)が移動する。この際、移動するhydride(H2あるいはH1)はTrp179によってカバーされている(B)。2位にカルボニル基が移動した基質は、O5がC2を求核的にアタックすることによりケトースを生成、酵素から離れていく。

Using mutant *PsL-Rhls*, the complete catalytic reaction mechanism including sugar-ring opening could be deduced. β-L-rhamnopyranose forms the metal-coordination with O1, O2 and O3, and a catalytic water molecule (W1) transfers a proton from O1 to O5 to open the pyranose-ring (A). The conformation of the linear substrate changes with the rotation around C3-C4, and the hydride-shift from C2 to C1 occurs with the transfer of a proton from O2 to O1 assisted by a catalytic water molecule (W1) (B). After the isomerization to L-rhamnulose, O5 nucleophilically attacks C2 to form β-L-rhamnufuranose, being released from the enzyme (C).

Complete catalytic reaction mechanism including sugar-ring opening of *PsL-Rhl*



立体構造解析に基づくD-アラビノースイソメラーゼの反応機構

武田耕青^{1,2}, 吉田裕美¹, 何森 健², 神鳥成弘¹

香川大学 ¹総合生命科学研究センター, ²希少糖研究センター

STUDY ON CATALYTIC REACTION MECHANISM OF D-ARABINOSE ISOMERASE BASED ON X-RAY STRUCTURES

Kosei Takeda^{1,2}, Hiromi Yoshida¹, Ken Izumori², Shigehiro Kamitori¹

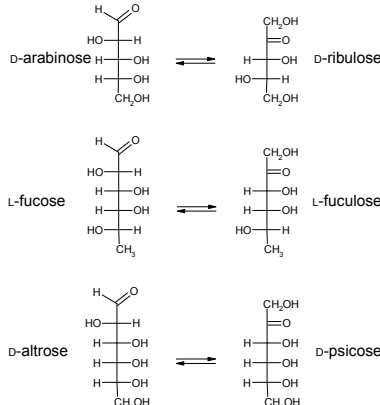
¹Life Science Research Center, ²Rare Sugar Research Center, Kagawa University

D-アラビノースイソメラーゼ D-Arabinose isomerase

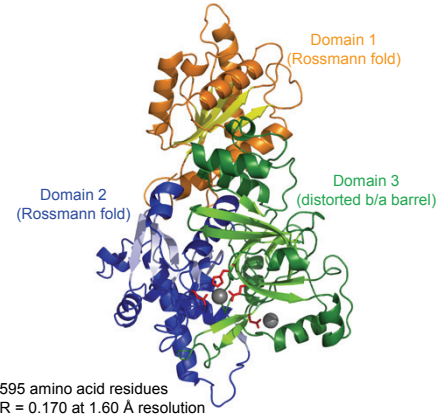
D-アラビノースイソメラーゼは、D-アラビノース(アルドース)とD-ラムスロース(ケトース)との間の異性化反応を可逆的に触媒する酵素であり、L-フコースにも作用することから、L-フコースイソメラーゼとも呼ばれている。*Bacillus pallidus*由来D-アラビノースイソメラーゼ(BpD-AI)は、D-アラビノースの他、D-アルトロース⇄D-プシコースの異性化反応も触媒することからD-プシコースからD-アルトロースの生産への応用が期待されている。

D-Arabinose isomerase catalyzes the isomerization of D-arabinose (aldose) to D-ribulose (ketose). It is also called L-fucose isomerase due to the capability of the isomerization between L-fucose and L-fuculose. *Bacillus pallidus* (BpD-AI) can catalyze the isomerization of D-altrose to D-psicose, as well as D-arabinose to D-ribulose and L-fucose to L-fuculose, and it has been attracting much attention regarding the industrial production of rare sugar, D-altrose from D-psicose.

Isoimerization reaction catalyzed by BpD-AI



Subunit structure of BpD-AI

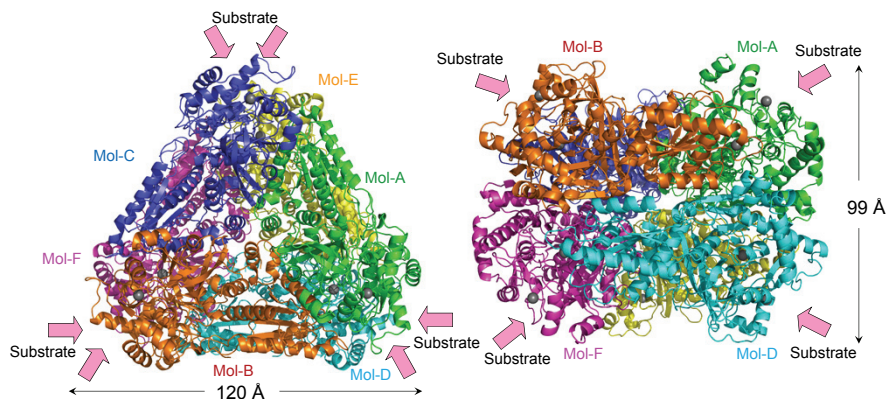


立体構造および反応機構 X-ray structure catalytic reaction mechanism of BpD-AI

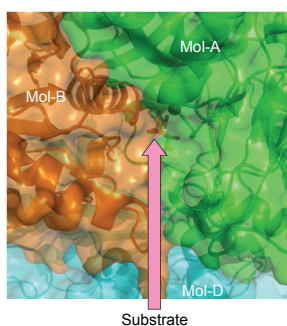
BpD-AIは、一辺120 Å高さ99 Åの三角柱形の6量体を形成する。活性部位は6つあり、3分子の界面(例えばMol-A/Mol-B/Mol-D)に位置する。BpD-AIは、活性部位にMn²⁺を持ち、Glu342, Asp366, His532, および基質の1, 2位水酸基(O1とO2)と配位結合を形成している。Gln307, Asp366, Asn531は、基質のO1, O2, O4, O5と水素結合を形成し、基質をかなり厳密に認識している。L-フシトール複合体のX線結晶解析の結果から、D-アルトロースが結合した状態をモデリングすることができる。D-アルトロースの1位から5位水酸基は、L-フシトールと同じ構造で酵素に結合し、6位の-CH₂OH基は、Tyr444, Trp95, Pro121によって形成されている疎水領域に位置することが予想される。このモデルは、D-アルトロースあるいはD-プシコースが基質としてBpD-AIに結合できることを示している。

BpD-AI forms a homo-hexamer with a triangular prismatic shape, 120 Å in length and 99 Å in height, having six active sites. One active site is located at the interface between Mol-A, Mol-B, and Mol-D. BpD-AI requires the metal ion, Mn²⁺, for its catalytic activity, which is coordinated with Glu342, Asp366, His532, and O1/O2 of a substrate. Gln307, Asp366 and Asn531 make hydrogen bonds with O1, O2, O4, and O5 of a substrate, strictly recognizing 1-, 2-, 4-, 5- positions of a substrate. A model of the enzyme bound to D-altrose could be deduced from the X-ray structure of the complex with L-fucitol. O1 to O5 of D-altrose form the same interactions with the enzyme as the bound L-fucitol, and C6 and O6 of D-altrose could be located at the hydrophobic space surrounded by Tyr444, Trp95 and Pro121, giving a plausible model for the enzyme recognizing D-altrose.

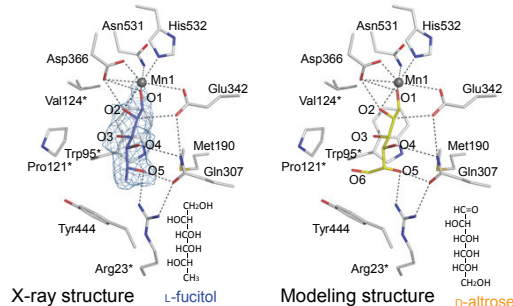
Biological unit of hexamer of BpD-AI



Accessible surface for substrate-binding at the interface of Mol-A/Mol-B/Mol-D



Active site structures with bound L-fucitol (inhibitor), and D-altrose.

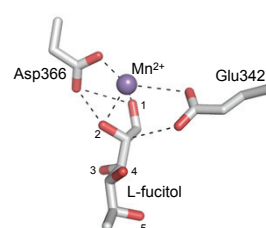


予想される触媒反応機構 Proposed catalytic reaction mechanism

BpD-AIにおいては、基質をはさむように向かい合ったグルタミン酸(Glu342)とアスパラギン酸(Asp366)が酸-塩基触媒として働くことが予想される。まず、Glu342がC2のプロトンを引き抜き、Asp366がO1にプロトンを与え、基質は平面構造を持ったcis-エンジオール反応中間体となる。次に、Asp366がO2からプロトンを引き抜き、Glu342がC1にプロトンを与えてケトースを生成する。

In the catalytic reaction of BpD-AI, Glu342 and Asp366 facing each other at the Mn²⁺ binding site are expected to act as acid/base catalysts. Upon substrate binding, Glu342 removes a proton from C2 and Asp366 gives a proton to O1, producing a ene-diol intermediate with the planar structure O1-C1-C2-O2 that is stabilized by Mn²⁺. Then, a proton transfers from O2 to Asp366, and Glu342 protonates C1, to produce a ketose.

Catalytic reaction mechanism of BpD-AI



BpD-AI most likely adopts the ene-diol mechanism.

