

光学活性アミノ酸の生産に有用な

D-threo-3-hydroxyaspartate dehydratase の X 線結晶構造解析

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 微生物生理学 松本 悠

1. 目的

D-threo-3-hydroxyaspartate dehydratase (D-THA DH) は *Delftia* sp. HT23 株に見出されたピリドキサーール 5'-リン酸 (PLP) 依存性の新規酵素である。本酵素は分子内に 2 個の不斉炭素を持つ 3-hydroxyaspartate の 4 種の光学異性体のうち、D-THA と L-EHA に対して高い特異性を示す (Fig. 1)。この性質を利用して、DL-THA と DL-EHA からそれぞれ L-THA と D-EHA が高収率で取得できる。L-THA は神経生理学分野において重要であり、また高価であることから、本酵素は物質生産面で有用である。しかし、反応機構は解明されていない。これまでに、我々は本酵素が活性発現に 2 価金属を要求すること、出芽酵母やニワトリで同定された真核生物の D-serine dehydratase と 30% 程度のアミノ酸配列相同性を持つことを明らかにした。今回、より詳細な反応機構に関する知見を得るために D-THA DH の X 線結晶構造解析を行った。

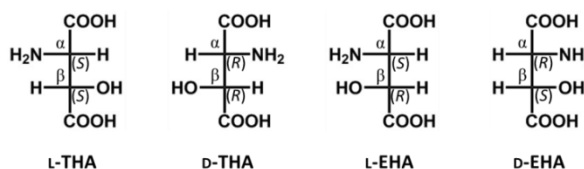


Fig. 1 3-Hydroxyaspartate stereoisomers

2. 方法

Rhodococcus erythropolis を用いた発現系より精製した組換え D-THA DH を用いて、ハンギングドロップ蒸気拡散法による結晶化条件の最適化を行った。その結果、0.1 M Tris-HCl (pH 8.5), 0.2 M MgCl₂, 10-14% PEG 3350 のリザーバー溶液を用い、20°C にて良質な単結晶を得た。シンクロトロン放射光を利用して X 線回折データを収集し、単波長異常分散法によって構造解析を行った。D-EHA は K_i 値が 0.11 mM と本酵素を競合的に阻害する。D-EHA との共結晶化により、阻害剤複合体結晶を作製し、結晶構造を解明した。さらに H351A 変異を導入した低活性型酵素と D-THA, L-EHA との共結晶化により、基質複合体を形成させ、結晶構造を解明した。

3. 結果と考察

いずれの単結晶も良好な回折パターンを示し、1.5-1.9 Å 分解能で構造を決定した。得られた構造において D-THA DH は活性中心に 1 個の Mg²⁺ を有し、His351 と Cys353 が配位していた。阻害剤 D-EHA との複合体構造中で、β位の OH 基と Mg²⁺ は 5.5 Å 離れていた。一方、基質 L-EHA との複合体構造中では、β位の OH 基は Mg²⁺ と 2.3 Å の距離に存在していた。また基質 D-THA との共結晶中では、2-アミノマレイン酸に相当する電子密度が確認された。これは D-THA の OH 基が H₂O として脱離した後の反応中間体と考えられる。脱離した H₂O は Mg²⁺ と 2.3 Å の距離に存在していた。すなわち、D-THA/L-EHA の両基質とも OH 基は酵素に配位した Mg²⁺ と近い距離にあると推定される。さらに阻害剤複合体との比較から、OH 基と Mg²⁺ の近接が酵素反応に必要であり、Mg²⁺ は OH 基の脱離を促進する役割を担っていると示唆される。本研究は 3-hydroxyaspartate 分解酵素の立体構造及び反応機構を明らかにした初めての例である。