

ホモセリン脱水素酵素の触媒反応機構

及び

セリンヒドロキシメチル基転移酵素の基質認識機構

(Catalytic Mechanism of Homoserine Dehydrogenase

and

Substrate Recognition Mechanism of
Serine Hydroxymethyltransferase)

平成 30 年度

赤井翔太

(Shota Akai)

目次

Summary	1
要旨.....	3
序論.....	5
第一部 ホモセリン脱水素酵素の触媒反応機構	7
1 背景.....	7
1.1 NAD(P) ⁺ 依存型脱水素酵素	7
1.2 ホモセリン脱水素酵素 (HSD)	7
1.3 HSD における基質 NAD(P) ⁺	10
1.4 HSD の反応機構.....	11
1.5 高度好熱菌 <i>Thermus thermophilus</i> HB8 由来ホモセリン脱水素酵素 (<i>Tt</i> HSD) .	12
2. 実験.....	15
2.1 <i>Tt</i> HSD の作製	15
2.1.1 K99A、K195A 変異体の作製.....	15
2.2 K99A、K195A 変異体の活性.....	15
2.3 <i>Tt</i> HSD の結晶化.....	16
2.3.1 基質非結合型 <i>Tt</i> HSD の結晶化	16
2.3.2 WT_L-Hse_NADPH 三元複合体の結晶化.....	16
2.3.3 K99A、K195A_L-Hse_NADP ⁺ 三元複合体の結晶化.....	17
2.3.4 WT_L-Asa_NADP ⁺ 三元複合体の結晶化.....	17
2.4 X 線結晶構造解析	18
2.4.1 X 線結晶構造解析の原理.....	18
2.4.2 位相問題について.....	20
2.4.3 構造精密化.....	20
2.5 <i>Tt</i> HSD 結晶の回折強度測定	21
3 結果・考察.....	23
3.1 WT_L-Hse_NADPH 三元複合体	23
3.1.1 WT_L-Hse_NADPH 三元複合体の全体構造	23
3.1.2 基質結合による open/closed 構造変化.....	25
3.1.3 他種由来の HSD-基質複合体との比較	26
3.1.4 NADPH 結合様式	27
3.1.5 L-Hse 結合様式.....	28
3.2 K99A、K195A_L-Hse_NADP ⁺ 三元複合体	30
3.2.1 K99A、K195A 変異体の L-Hse_NADP ⁺ 結合型三元複合体結晶構造	30
3.2.2 K99A 三元複合体で観察されるシスペプチド	32

3.3 WT_L-Asa_NADP ⁺ 三元複合体	34
3.3.1 WT_L-Asa_NADP ⁺ 三元複合体結晶構造	34
3.4 <i>Tt</i> HSD の触媒反応機構	35
4. まとめ	39
第二部 セリンヒドロキシメチル基転移酵素の基質認識機構	40
1 背景	40
1.1 PLP 酵素	40
1.2 セリンヒドロキシメチル基転移酵素 (serine hydroxymethyltransferase; SHMT)	41
1.3 高度好熱菌由来セリンヒドロキシメチル基転移酵素 (<i>Tt</i> SHMT)	42
1.4 時間分割 X 線結晶構造解析	44
2 実験	46
2.1 <i>Tt</i> SHMT の培養・精製	46
2.1.1 形質転換・大量培養	46
2.1.2 精製	46
2.2 <i>Tt</i> SHMT の溶液状態での吸収スペクトルの測定	47
2.3 <i>Tt</i> SHMT の結晶化	48
2.3.1 ハンギングドロップ蒸気拡散法	48
2.3.2 マイクロシーディング	48
2.4 <i>Tt</i> SHMT 結晶の X 線結晶構造解析	50
2.4.1 比較対照とする結晶構造の解析	50
2.4.2 時間分割的 X 線結晶構造解析	51
2.4.3 X 線回折測定と構造精密化	52
2.5 <i>Tt</i> SHMT 結晶の顕微分光測定	55
3 結果・考察	56
3.1 <i>Tt</i> SHMT の溶液状態での吸収スペクトル	56
3.1.1 <i>Tt</i> SHMT に L-Ser と THF を加えた場合の吸収スペクトル	56
3.1.2 <i>Tt</i> SHMT に Gly と THF を加えた場合の吸収スペクトル	57
3.2 基質非結合型 <i>Tt</i> SHMT	58
3.2.1 基質非結合型 <i>Tt</i> SHMT 結晶の全体構造	58
3.2.2 基質非結合型 <i>Tt</i> SHMT 結晶の吸収スペクトル	58
3.2.3 サブユニット A とサブユニット B の構造の違い	59
3.2.4 PLP の認識機構	60
3.3 THF 結合型 <i>Tt</i> SHMT	62
3.3.1 THF 結合型 <i>Tt</i> SHMT の結晶構造	62
3.3.2 THF 結合型 <i>Tt</i> SHMT 結晶の吸収スペクトル	62

3.3.3 THF の結合様式.....	63
3.4 Gly_5-ホルミルテトラヒドロ葉酸 (5-CHO-THF) 結合型 <i>T</i> SHMT	65
3.4.1 基質アナログとして用いられる 5-ホルミルテトラヒドロ葉酸 (5-CHO-THF)	65
3.4.2 Gly_5-ホルミル THF (5-CHO-THF) 結合型 <i>T</i> SHMT の結晶構造.....	66
3.4.2.1 Gly_5-CHO-THF 結合型 <i>T</i> SHMT 結晶の吸収スペクトル.....	66
3.5 時間分割的 X 線結晶構造解析	71
3.5.1 <i>T</i> SHMT 結晶の pH 変化に対する耐久性.....	71
3.5.2 L-Ser と THF をソーキングした <i>T</i> SHMT 複合体 (pH 5.6)	72
3.5.2.1 L-Ser と THF をソーキングした <i>T</i> SHMT 複合体 (pH 5.6) の結晶構造	72
3.5.2.2 L-Ser と THF をソーキングした <i>T</i> SHMT 複合体 (pH 5.6) 結晶の吸収スペク トル	73
3.5.2.3 L-Ser の結合様式.....	73
3.5.2.4 Gly の結合様式	75
3.5.2.5 THF と 5,10-CH ₂ -THF の結合様式の比較.....	76
3.5.2.6 L-Ser と Gly の結合様式の比較.....	77
3.5.3 L-Ser と THF をソーキングした <i>T</i> SHMT 複合体 (pH 5.0)	78
3.5.4 L-Ser と THF をソーキングした <i>T</i> SHMT 複合体 (pH 11.0)	79
3.5.5 L-Ser と THF をソーキングした <i>T</i> SHMT 複合体 (pH 10.0)	80
3.5.6 時間分割的 X 線結晶構造解析のまとめ.....	81
3.6 SHMT の触媒反応機構についての考察.....	82
3.6.1 SHMT の反応スキーム	82
3.6.2 His122 側鎖から PLP の N1 原子への水素結合ネットワーク	85
4. まとめ	87
結語.....	88
参考文献	90
補遺.....	98

略語

5,10-CH₂-THF : 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸

5-CHO-THF : 5-ホルミルテトラヒドロ葉酸

CAPS : 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid

C-NAD : 5-β-D-ribofuranosyl nicotinamide adenine dinucleotide

EDTA : エチレンジアミン四酢酸

FAD : フラビンアデニンジヌクレオチド

HSD : ホモセリン脱水素酵素

L-Asa : L-アスパラギン酸-4-セミアルデヒド

L-Hse : L-ホモセリン

NAD⁺ : 酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

NADA : 3-アミノピリジンアデニンジヌクレオチド

NADH : 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

NADP⁺ : 酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

NADPH : 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

PCR : ポリメラーゼ連鎖反応

PDB : Protein data bank

PLP : ピリドキサール 5'-リン酸

r.m.s.d. : root mean square deviation

SFX : シリアルフェムト秒 X 線結晶構造解析

SHMT : セリンヒドロキシメチル基転移酵素

THF : テトラヒドロ葉酸

Tris : トリスヒドロキシメチルアミノメタン

XFEL : X 線自由電子レーザー

Summary

Homoserine dehydrogenase from *Thermus thermophilus* (*Tt*HSD) is a key enzyme in the aspartate pathway that catalyzes the reversible conversion of L-aspartate- β -semialdehyde (L-Asa) to L-homoserine (L-Hse) with NAD(P)H. In the forward reaction, L-Asa and NAD(P)H are used as the substrates, and in the reverse reaction, L-Hse and NAD(P)⁺ are used. To elucidate the catalytic mechanism of this enzyme, I have tried to obtain the crystallographic structure of *Tt*HSD. I determined the crystal structures of *Tt*HSD complexed with L-Hse (L-Asa) and NADPH (NADP⁺), and Lys99Ala (K99A) and Lys195Ala (K195A) mutant *Tt*HSDs, which have no enzymatic activity in the reverse reaction, complexed with L-Hse and NADP⁺ at 2.00, 2.00, 1.87, and 1.93 Å resolutions, respectively. Binding of L-Hse and NADPH induced the conformational changes of *Tt*HSD from an open to a closed form: The mobile loop containing Glu180 approached to fix L-Hse and NADPH, and both Lys99 and Lys195 could make hydrogen bonds with the hydroxy group of L-Hse. The ternary complex of *Tt*HSDs in the closed form mimicked a Michaelis complex better than the previously reported open form structures from other species. In the ternary complex of WT_L-Asa_NADP⁺, the binding mode of NADP⁺ is different from NADPH in the ternary complex of WT_L-Hse_NADPH. There is another L-Asa in the NADP⁺ binding position, so NADP⁺ can not bind to HSD in the correct form. It is considered that the substrate inhibition of L-Asa is observed because of the excess amount of L-Asa in the crystallographic experiment. In the crystal structure of K99A, the productive geometry of the ternary complex was almost preserved with one new water molecule taking over the hydrogen bonds associated with Lys99, while the positions of Lys195 and L-Hse were significantly retained with those of the WT enzyme. These results propose new possibilities that Lys99 is the acid-base catalytic residue of HSDs.

Serine hydroxymethyltransferase from *Thermus thermophilus* is a pyridoxal 5'-phosphate requiring enzyme that catalyzes the reversible reaction of the conversion of L-serine (L-Ser) and tetrahydrofolate (THF) to glycine (Gly) and 5,10-methylene tetrahydrofolate (5,10-CH₂-THF). To obtain the intermediate in the catalytic mechanism of SHMT, I tried to time-resolved X-ray crystallography. The crystal structures of *Tt*SHMT with L-Ser and THF in some pH values, and Gly and 5-formyltetrahydrofolate-THF were determined as 1.02-1.45 Å resolutions. THF or 5,10-CH₂-THF bound SHMT structures were first obtained, and these structures are essential for structure based drug design. Furthermore, formaldehyde bound *Tt*SHMT structure was obtained. This result suggests that the catalytic mechanism

of SHMT passes Retro-aldol reaction, and formaldehyde is generated as an intermediate. From these crystal structures, the acid-base catalytic residues were expected, and Glu53 and His122 were especially significant residues in the catalytic mechanism.

要旨

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来ホモセリン脱水素酵素 (*Tt*HSD) は、アスパラギン酸経路の分岐点に存在し、L-ホモセリン (L-Hse) と NAD(P)⁺を基質として、L-アスパラギン酸-4-セミアルデヒド (L-Asa) と NAD(P)H を生じる反応を可逆的に触媒する。正反応では L-Asa と NAD(P)H を基質とし、逆反応では L-Hse と NAD(P)⁺を基質とする。筆者はこの酵素の触媒反応機構を解明することを目的として、*Tt*HSD の結晶構造解析に取り組んできた。そして、WT 及び Lys99Ala(K99A)、Lys195A(K195A)変異体の計 3 種類において、L-Hse と NADP(H)が結合した三元複合体の結晶構造、また、WT については L-Asa_NADP⁺複合体の結晶構造を、それぞれ 2.00 Å、1.87 Å、1.93 Å、2.00 Å の分解能で決定した。

L-Hse(L-Asa)_NADP(H)複合体は、基質非結合型の構造と比べ、活性部位を閉じるように変化していた。他の種由来の HSD では、基質の結合による構造変化は報告されておらず、本研究によって初めて明らかとなったものであり、既報の構造と比べ酵素基質複合体をよりよく模倣した構造であると考えられる。

さらに、L-Asa_NADP⁺複合体は他の NADP(H)結合型 HSD と比べ、NADP⁺の結合様式が異なっていた。NADP⁺結合部位に、活性部位に結合するものとは異なる L-Asa が結合しており、これが原因で、NADP⁺が正しい配向に結合しなかったのだと考えられる。HSD については L-Asa による基質阻害が報告されており、過剰量の L-Asa を実験に使用したために、立体構造で阻害構造が観測できたのだと考えられる。

K99A と K195A では、L-Hse と NAD(P)⁺を基質とする逆反応における活性は検出できなかった。K195A と WT の L-Hse_NADP(H)複合体における活性部位を比較したところ、K195A 三元複合体の結晶構造では、Lys195 の側鎖がなくなったことによって生じた空間を埋めるように、Lys99 や L-Hse のコンフォメーションが変化していた。このような活性部位におけるコンフォメーションの変化が原因で、L-Hse は活性発現可能な配向をとることができず、K195A では活性が失われたのだと考えられる。つまり、Lys195 は L-Hse を活性発現可能な位置に固定する役割があることが予想される。

K99A と WT の活性部位を比較したが大きな構造変化はなかった。それにも関わらず、K99A では活性がなくなっているため、Lys99 がこれまで報告されていない新しい酸塩基触媒残基である可能性が示唆された。

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来セリンヒドロキシメチル基転移酵素 (*Tt*SHMT) は、ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) を補酵素として、L-セリン (L-Ser) をグリシン (Gly) に変換すると同時にテトラヒドロ葉酸 (THF) を 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸 (5,10-CH₂-THF) に変換する反応を可逆的に触媒する。筆者は SHMT の触媒反応機構を解明することを目的として、時分割 X 線結晶構造解析を行い、反応中間体の獲得を目指した。その結果、L-Ser や THF、もしくは Gly や 5-ホルミルテト

ラヒドロ葉酸が結合した結晶を 1.02-1.45 Å の分解能で決定した。THF や 5,10-CH₂-THF が結合した *Tt*SHMT の結晶構造の獲得に初めて成功し、これらの構造は、立体構造に立脚した薬剤開発の助けとなる。また、ホルムアルデヒドが結合した *Tt*SHMT の結晶構造の獲得にも成功した。このことにより、ホルムアルデヒドを反応中間体とするレトロアルドール反応を経由して SHMT の反応機構が進行することが示唆された。これらの結晶構造から、酸塩基触媒残基が推定され、特に、Glu53 と His122 は必須の残基であることが示唆された。

序論

生体内において、酵素は生体触媒として生化学反応の速度を上げるものであり、生命活動に必須の物質である。酵素は反応物と生成物を分ける自由エネルギー障壁を下げることにより、反応速度を大きくする。そして活性部位、すなわち実際に触媒作用を現す部分の官能基の並びにより、さまざまな機構でこの能力を実現する¹。酵素は工学分野及び創薬分野において大いに注目を集めており、食品工業、化学工業、臨床分析など広範な分野において使用されているほか、環境分野や医療分野とも深くかかわっており、多くの用途に使われている²。また、酵素の特異的阻害剤は創薬ターゲットとして研究されており、例えば菌類が持つ酵素に対して、阻害剤となるような化合物は、抗菌薬となる可能性を持っている。このように、今や酵素は我々の生活に必要なものとなっており、それをさらに効率的に有効活用するためには、触媒反応機構の解明、ひいては三次元的な立体構造の決定が必須である。創薬研究において、酵素の立体構造、特に基質が結合したものが解明されているならば、その構造に基づいた合理的なドラッグデザインが可能となる。酵素の基質認識機構に関する知見が獲得されれば、活性部位におけるアミノ酸残基の立体配置（活性触媒に存在するアミノ酸残基との疎水的及び親水的相互作用）に基づき、特異的な阻害剤の開発が可能になる。酵素の三次元的な立体構造を決定する手法として、現在もっとも広範に扱われている手法は X 線結晶構造解析である。近年、コンピュータの発展に伴い、X 線結晶構造解析という分野は飛躍的に発展しており、2018 年 11 月 16 日現在において、蛋白質構造データバンク (Protein data bank; PDB) に登録されているものの中で、最高分解能はクラムビンと鉄硫黄タンパク質の 0.48 Å である^{3,4}。高分解能で結晶構造を決定することにより座標の誤差は小さくなり、活性部位における基質の水素結合環境、すなわち酵素の基質認識機構の詳細を解明することができる。しかしながら、X 線結晶構造解析によって決定した三次元構造は、止まった状態の静的な構造しか獲得し得ない。そこで結晶学者達が動的な構造情報を求め、時分割結晶構造解析を目指すことは自明の理であり、触媒反応機構を丸ごと追跡することは、結晶構造解析の一つの到達点でもある。これまでの時分割結晶構造解析では、ミリ秒からマイクロ秒の時間分解能を実現できる白色ラウエ法が適用されてきた。さらに、近年ではパルス幅が 10 フェムト秒オーダーの X 線自由電子レーザー (XFEL) を利用した時分割手法が発展しており、多くの成功例が報告されている。

筆者はホモセリン脱水素酵素 (HSD) とセリンヒドロキシメチル基転移酵素 (SHMT) という 2 種類の酵素について X 線結晶構造解析を行い、酵素基質複合体の結晶構造を解明した。これらの酵素は水溶性であり、HSD はヒトには存在しないが、SHMT はヒトに存在する。そしてこの両方共が創薬研究のターゲットとして広く研究されており、立体構造に即した阻害剤開発のために、高分解能の基質結合型結晶構造が求められている。HSD の詳細については第一部において述べる。HSD は菌類に存在する一方哺乳類に存在しないことから、ヒトに副作用を及ぼさない抗菌薬のターゲットとして注目され

ている。そして、HSDにおいては、2種類ある基質のうち、1つは基質そのもの、もう1つは生成物を基質アナログとして使うことで、反応が進行しない酵素-基質三元複合体の獲得に成功した。これにより、詳細な基質認識機構が明らかとなり、特に立体構造に立脚した阻害剤研究へ大きく貢献した。また、活性部位に存在する残基の変異体を作製し、これも同様に結晶構造解析を行うことにより、触媒反応中で酸塩基触媒残基として働くであろう Lys 残基の推定に成功した。

さらに、SHMTにおいては、HSDの結晶構造解析を行う上で身につけた技術と知識を基に、HSDではその触媒反応機構上、反応中間体の獲得が不可能であった時分割X線結晶構造解析に挑戦した。SHMTの詳細については第二部において述べる。SHMTは癌治療や、マラリア治療に対するターゲット蛋白質として注目を集めており、立体構造に立脚した阻害剤開発のために、高分解能で酵素基質複合体の結晶構造の獲得が求められている。また、HSDが一段階で反応が終了するのに対し、SHMTは多段階で反応が終了する。さらには、キノノイド中間体という比較的安定な中間体が存在することから、時分割実験においてその構造を捉えやすい。そこで、pHジャンプによる時分割実験を試みた。その結果、時分割測定を成功させることはできなかったものの、その研究過程において、多くの酵素基質複合体の結晶構造を高分解能で決定し、触媒反応機構の解明に向けて有用な知見を与えた。

第一部 ホモセリン脱水素酵素の触媒反応機構

1 背景

1.1 NAD(P)⁺依存型脱水素酵素

脱水素酵素は、酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺) やフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) などを補因子として基質から水素を引き抜き酸化する酵素である。酵素は、その反応特異性により、分類分けがされ、大分類、中分類、小分類、小分類の中の通し番号の順に4つの番号が与えられる。それをEC分類番号と呼ぶ¹。EC.1.1.1.-に分類される酵素はCH-OH結合を電子供与体とし、NAD⁺または酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸 (NADP⁺) を電子受容体とする脱水素酵素である。これらの酵素の反応機構において、アルコールが酸化され、カルボニル化合物となるときの、アルコールから2つの水素原子が取り除かれる。ひとつはNAD(P)⁺のニコチンアミド環のC4原子に直接転移し、もうひとつはプロトンとして遊離する^{5,6}。一般的にC4原子に転移する際は、ヒドリドイオン (H⁻) として転移すると考えられている。また、水素の転移は立体選択的であり、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (リン酸) (NAD(P)H) から水素が転移する際、*pro-S*水素が転移するものと *pro-R*水素が転移するものがある⁷。

1.2 ホモセリン脱水素酵素 (HSD)

ホモセリン脱水素酵素 (HSD、EC番号: 1.1.1.3) は、NAD(P)⁺依存性の脱水素酵素であり、L-ホモセリン (L-Hse) からL-アスパラギン酸-4-セミアルデヒド (L-Asa) を生成する反応を、可逆的に触媒する。哺乳類が食事により摂取しなければならないL-アミノ酸を必須アミノ酸という。必須アミノ酸は、微生物や植物にのみ存在する代謝経路によって、哺乳類と共通の代謝中間体から合成されるため、非必須アミノ酸の合成に比べて複雑である¹。そのような必須アミノ酸のうち、L-リシン、L-トレオニン、L-メチオニンはいずれもL-アスパラギン酸から生合成される (図 1.1)。第一段階のアスパラギン酸キナーゼによる4-アスパルチルリン酸生成と、第二段階のアスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼによるL-アスパラギン酸-4-セミアルデヒド生成は、これら3つの必須アミノ酸の生合成に共通のステップである。その後、7段階の反応を経てL-リシンは生合成される。一方、L-トレオニンとL-メチオニンは、HSDによる、NADHもしくはNADPHを用いたL-Asaの還元反応によって生合成されるL-Hseを経て生合成される⁸。つまり、L-HseはL-トレオニン、L-メチオニンへと向かう代謝経路における分岐段階となっている。さらに、L-トレオニンは6段階の反応を経ることでL-イソロイシンへと変換される。これらの事実により、L-Hseは代謝経路における重要な中間体物質であるといえる。このことからHSDは、生合成経路を直接利用する産出方法の研究で、L-リシンを大量生産するために、L-リシンにアロステリック阻害を示すように人

工的に変異させた HSD も報告されている⁹。

近年、AIDS のような免疫不全患者の増加や、多くの抗真菌剤に対する耐性菌の増加により、いわゆる免疫学的弱者における真菌感染症が劇的に増加しており¹⁰、抗真菌剤を対象とした研究に注目が集まっている。また、栄養不良および衛生環境の悪い発展途上国を中心に、赤痢菌をはじめとした、粘膜病原細菌による感染症が今なお猛威をふるっており、特に赤痢菌による細菌性赤痢は、発展途上国における乳幼児の死亡原因の 1 つである。国際的視野からも重要な感染症とされ、先進国における抗真菌薬同様、これらを予防・治療する新規抗生物質の開発が求められている。前段で述べた、L-アスパラギン酸から L-トレオニン、L-メチオニン、L-リシンを合成する生合成経路は、哺乳類には存在せず、HSD も哺乳類には存在しない。したがって、HSD の阻害剤は、ヒトに副作用を及ぼさない有力な抗真菌・抗細菌薬に応用できる可能性があるため、本酵素に対する強力かつ特異的な阻害剤開発を目的とした様々な研究がなされている¹¹⁻¹³。

これまでに、抗真菌薬への応用につながる成功例として、アミノ酸アナログである (S)-2-アミノ-4-オキソ-5-ヒドロキシペンタン酸は、皮膚や粘膜の表在性感染症であり、炎症などを引き起こすカンジダ症の原因となる *Candida albicans* に対し、HSD を阻害することによって殺菌効果を発揮することが報告されている^{11,14}。一方、細菌に関しては、抗細菌薬になり得る、人体に影響の少ない阻害剤の報告はまだない。本酵素に対する強力な阻害剤の開発のためには、その立体構造に立脚した反応機構の解明が必須である。

HSD は多くの種について結晶構造解析が行われており、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pyrococcus horikoshii*、*Sulfolobus tokodaii* 由来 HSD について、基質、もしくは基質アナログが結合した結晶構造が報告されている¹⁵⁻¹⁷。そして、*S. cerevisiae* 由来 HSD ではその結晶構造から Lys223 が酸塩基触媒残基として働くと報告されている¹⁵。しかしながら、これら 3 種類の結晶構造について全て L-Hse (*S. tokodaii* 由来 HSD では L-cystein(L-Cys)) の結合様式が異なり、正確な基質の認識機構は明らかにされていない。

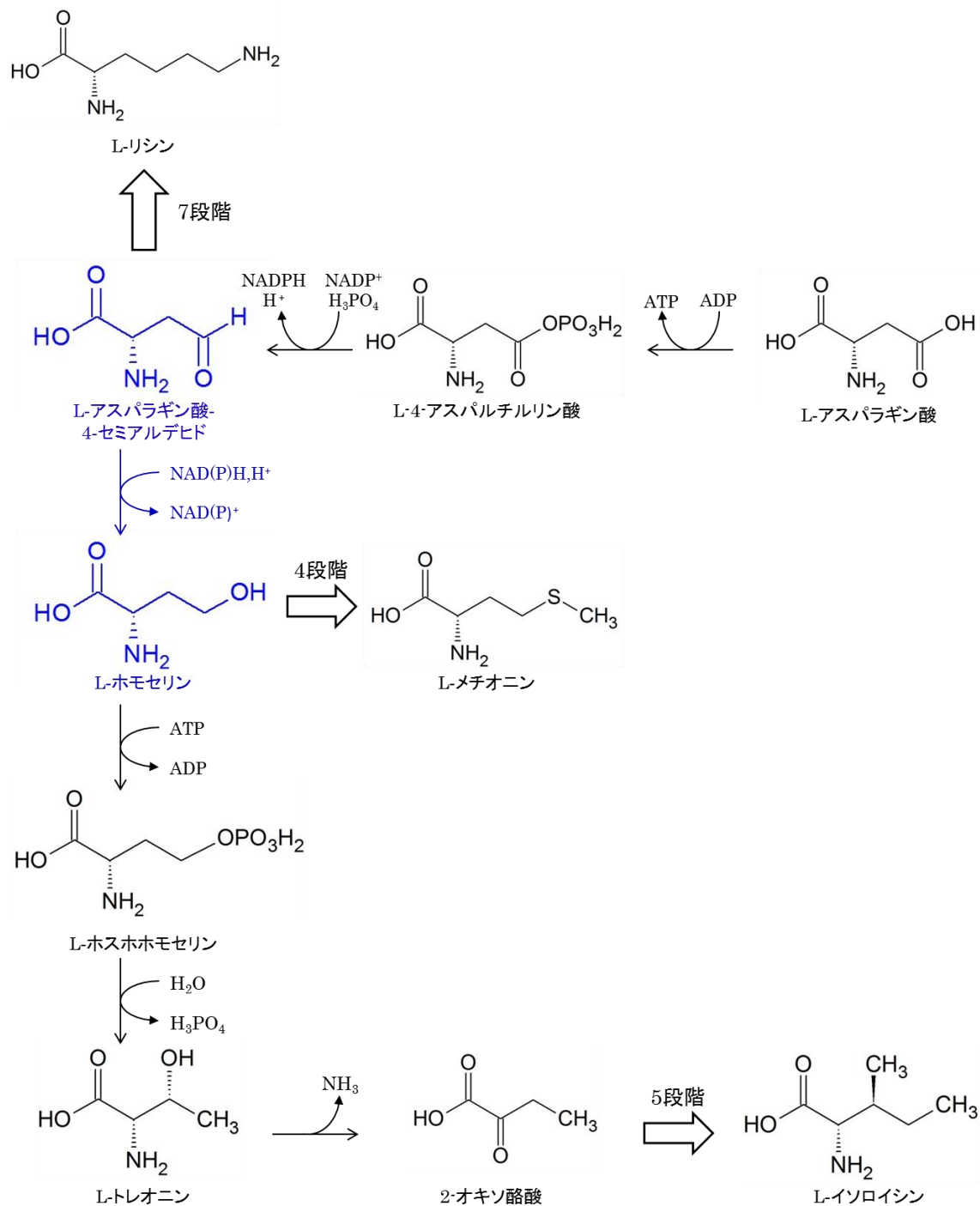


図 1.1 トレオニン、メチオニン、リシン生合成経路

L-アスパラギン酸から L-アスパラギン酸-4-セミアルデヒドを経て L-リシンは生合成される。さらに、HSD による NAD(P)H を用いた L-アスパラギン酸-4-セミアルデヒドの還元反応によって、生合成される L-ホモセリンを中間体とし、L-メチオニンと L-トレオニンが合成される。

1.3 HSD における基質 NAD(P)⁺

HSD が基質とする NAD⁺は、様々な脱水素酵素に関与する基質の一つで、ニコチンアミドモノヌクレオチドとアデニル酸の二つの部位からなる構造をしている。NAD⁺が作用して酸化還元反応が起こると、基質である L-Hse の 2 個の水素原子のうち 1 つがニコチンアミドの 4 位の炭素に付加して NADH となり、もう一方の水素はプロトンとなる。また、NADP⁺が作用した酸化還元反応でも同様の反応が起こる。

以下の図 1.2 では NAD(P)⁺の構造を、図 1.3 においてニコチンアミドモノヌクレオチド部位の酸化還元反応における変化を記載した。反応機構については、1.4 項に詳しく記載する。

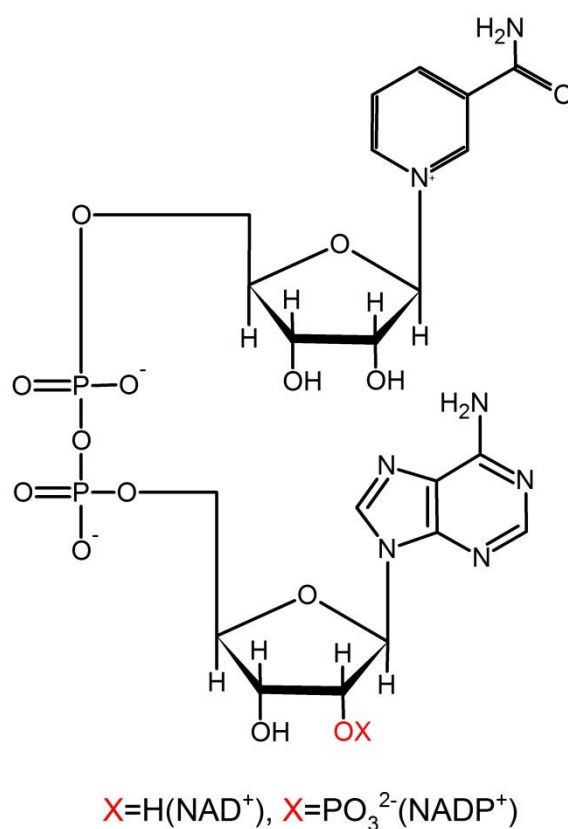


図 1.2 NAD(P)⁺の構造

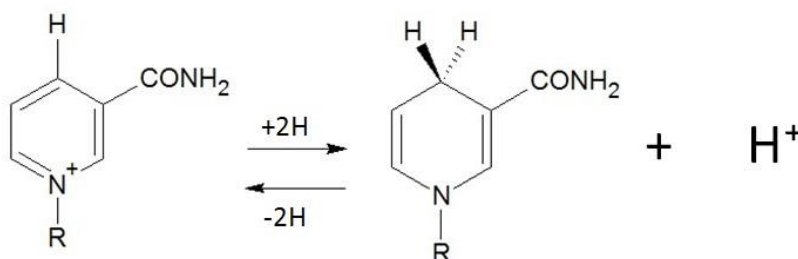


図 1.3 ニコチンアミドの変化

1.4 HSD の反応機構

S. cerevisiae 由来 HSD で、部位特異的変異体酵素による活性測定から、Asp219 と Lys223 が重要な役割を持つことが報告されている。また、NADA (3-アミノピリジンアデニンジヌクレオチド) と L-Hse の三元複合体構造の解析がなされており、この結果より、図 1.4 に示されるような反応機構が提案されている¹⁵。これは、酸塩基触媒として Lys 残基が機能する反応機構である。NAD(P)H のニコチンアミド部位の 4 位のヒドリドイオン(H⁻)が L-Asa の γ 位に転移し、基質認識部位における塩基(Lys)の ζ アミノ基のプロトン(H⁺)が L-Asa のアルデヒド基に転移する。この脱離反応は、H⁺ の移動が先に起こる場合 (E1cB 機構)、H⁻ の移動が先に起こる場合 (E1 機構)、および両方が協奏的に起こる場合 (E2 機構) が考えられる。

また、*Arabidopsis thaliana* 由来の HSD では、Mg²⁺によって活性化することが報告されている¹⁸。一方で、結晶構造の分かっている酵母由来ホモセリン脱水素酵素に含まれる Na⁺は構造の安定化の役割を果たしていると報告されている¹⁵。

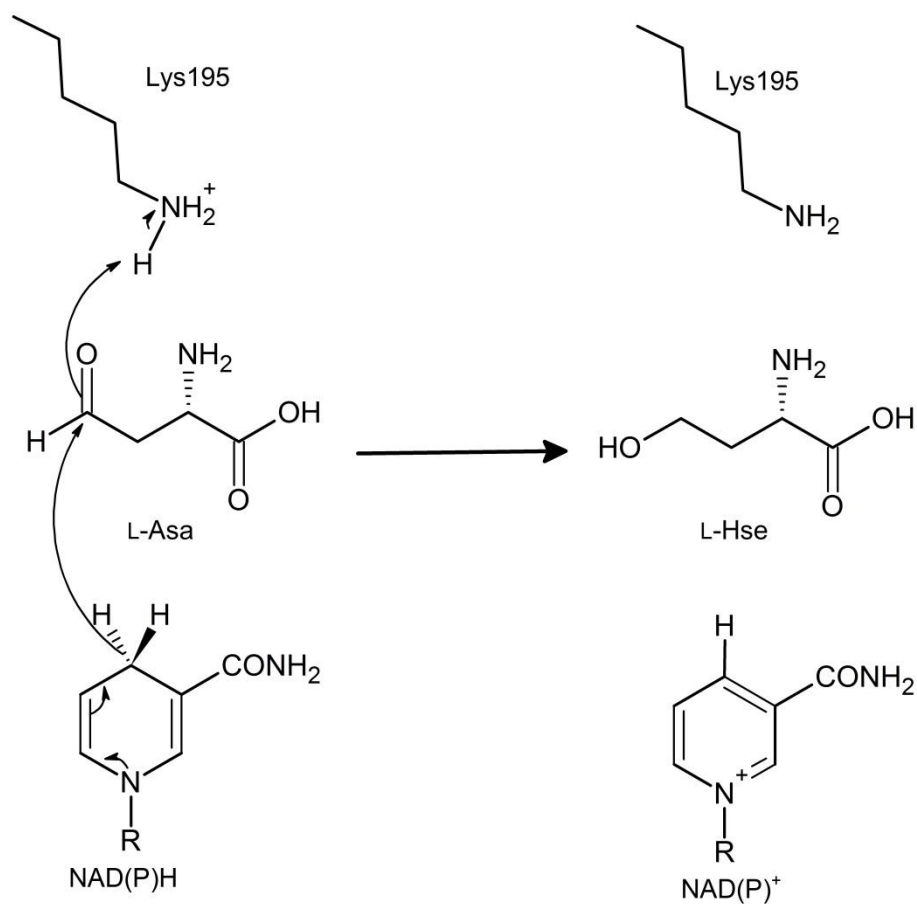


図 1.4 提案されている HSD の反応機構

1.5 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来ホモセリン脱水素酵素 (*Tt*HSD)

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 は、85 °C まで生育可能なバクテリアであり、伊豆の峰温泉から発見・単離された¹⁹。さらに、本菌は遺伝子操作系が確立した細菌の中で最も高温で生育し、本菌由来のタンパク質は熱安定性が高く、*Escherichia coli* を発現系とした組み換えタンパク質の大量発現・精製、そしてその結晶化も容易であることが知られている。1995 年から本菌をモデル生物として、*T. thermophilus* 細胞内に存在する、低分子・高分子すべての生体分子の機能を立体構造に基づいて解析し、最終的に一つの細胞全体の生命現象を、原子レベルで総合的に理解しようとする試み、いわゆる『丸ごと一匹プロジェクト』が実施され、現在までに 400 種類以上のタンパク質の立体構造が決定されている。しかし、HSD においては、基質非結合型の立体構造については PDB に登録されている(PDB ID : 2EJW)が、NAD(P)⁺が結合した立体構造は報告されていない。NAD(P)⁺結合型の立体構造が解明されれば、より特異性の高い阻害化合物の設計が可能となり、HSD を分子標的とする新しい抗生物質の開発に貢献できると考えられる。

高度好熱菌 *T. thermophiles* HB8 由来ホモセリン脱水素酵素 (*Tt*HSD) は、アミノ酸残基数がモノマーあたり 332、分子量 35492 Da のタンパク質である。図 1.5 に他種由来のものの中で、基質複合体 (基質アナログ) の結晶構造が報告されている HSD (*S. cerevisiae*, *P. horikoshii*, *S. tokodaii* 由来 HSD) とのアミノ酸配列の相同性を示す。結晶構造中で活性部位に存在する Lys99、Glu180、Asp191、Lys195 が完全に保存されており、触媒反応機構中で重要な役割を示すことが予想される。*S. cerevisiae* 由来 HSD において、これらに相当するアミノ酸残基を別の残基へ変異させると触媒活性が著しく失われ、また、結晶構造から *Tt*HSD の Lys195 に相当する *S. cerevisiae* 由来 HSD の Lys223 は酸塩基触媒残基として働くことが示唆されている¹⁵。

本研究室の森川によって、*Tt*HSD の最適温度・最適 pH は基質である NAD⁺、NADP⁺ によって異なり、NAD⁺ の場合は最適温度 60°C 前後、最適 pH は 9.5 付近、NADP⁺ を用いた場合は最適温度が 70°C 付近、最適 pH が 10.0 付近であることが明らかになっている²⁰。*Tt*HSD について、基質非結合型の構造は、本研究室の森によって、すでに 1.4 Å の構造解析が行われており、NAD⁺ アナログである C-NAD⁺ を用いた C-NAD⁺_L-Hse 複合体についても、2.39 Å の構造解析がされている²¹。しかし、C-NAD⁺_L-Hse 複合体については L-Hse の結合様式は明らかになったが、C-NAD⁺ については電子密度が不明瞭であったため、その結合部位を特定するには至らなかった。すなわち、*Tt*HSD において、2 種類の基質 (基質アナログ) が結合し、ミカエリス複合体を模した三元複合体構造は決定されていない。本研究では、より詳細な反応機構を解明し、酸塩基触媒残基を特定する為、*Tt*HSD_L-Hse_NADPH 三元複合体の構造解析を目標とした。

また、本研究室の森川が行った活性測定実験によって、L-Hse と NAD(P)⁺ を基質と

する逆反応において、活性測定から NADP⁺を用いたほうがミカエリス定数 K_m 値は低く、低濃度でも酵素は最大活性まで到達することが分かっている。また、 k_{cat} 値を見ると、NAD⁺を用いたほうが高く、単位時間あたりに起こる反応回数は多くなることが分かっている。 k_{cat}/K_m を見ると、NADP⁺のほうが大きく、NADP⁺のほうが触媒効率は良くなることが分かっている²⁰ (表 1.1)。

表 1.1 ミカエリス定数 K_m 、触媒定数 k_{cat} 、触媒効率 k_{cat}/K_m

substrate	variable sub	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)
L-Hse	NAD ⁺	3.51	36.6	1.04×10^4
L-Hse	NADP ⁺	0.178	9.61	5.39×10^4

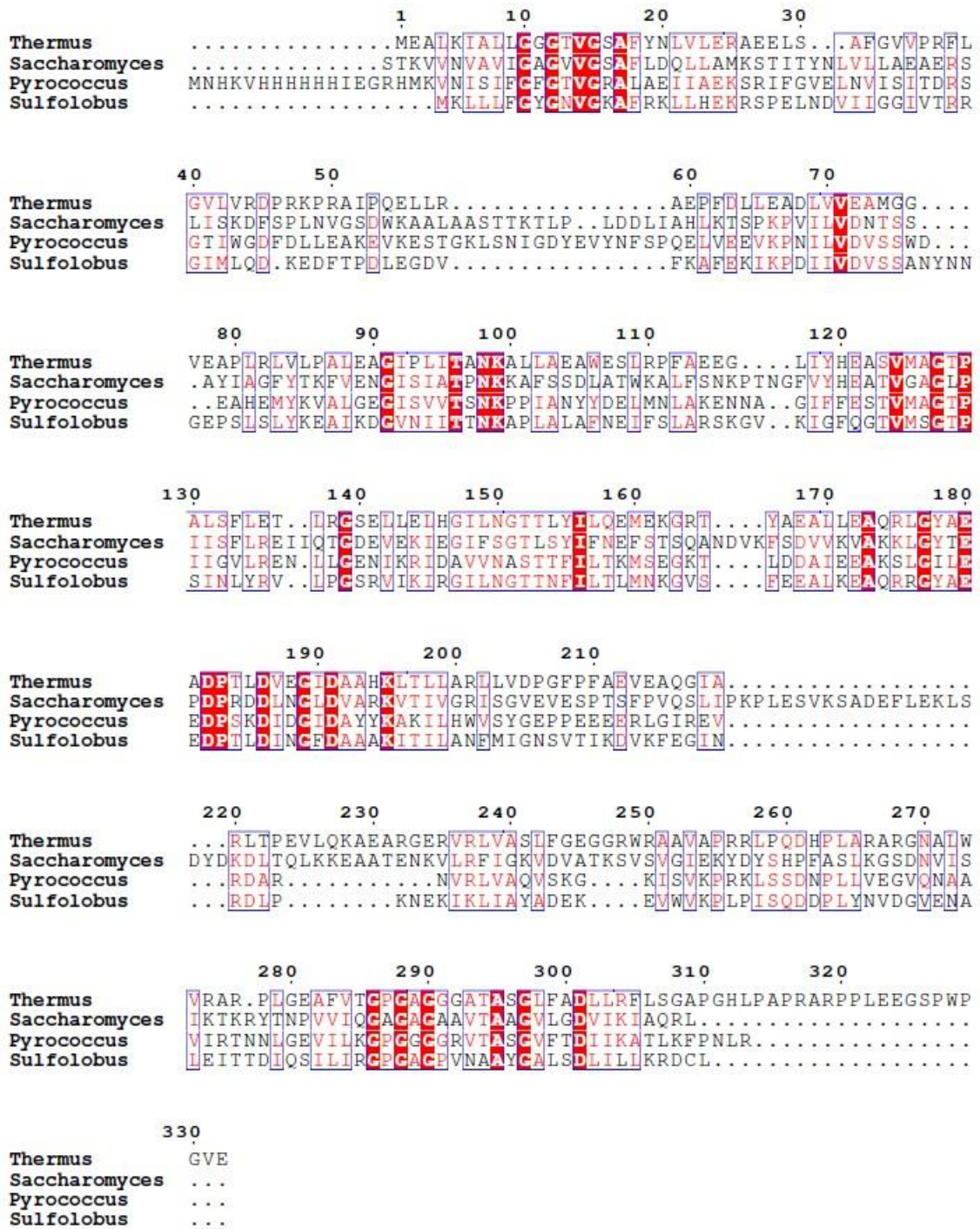


図 1.5 HSD のアミノ酸配列の相同性

T. thermophilus, *S. cerevisiae*, *P. horikoshii*, *S. tokodaii* 由来 HSD のアミノ酸配列の相同性を示す。完全に保存されているアミノ酸残基は赤背景及び白字、類似しているアミノ酸残基は赤字で示す。

2. 実験

2.1 *Tt*HSD の作製

野生型 (Wild-type(WT)) の *Tt*HSD は大阪医科大学生化学教室 生城 浩子講師に精製して頂いたサンプルを用いて、本研究を行った。本研究室の森の C-NAD⁺-L-Hse 複合体の結晶構造において、L-Hse のヒドロキシ基が Lys99 と Lys195 の両方のアミノ基と水素結合を形成しており、これら 2 つの残基が *Tt*HSD の活性発現に極めて密接にかかわっていることが考えられる。この 2 つの Lys 残基はすべての HSD に保存されており²¹、さらに、*S. cerevisiae* や *Staphylococcus aureus* 由来 HSD において、これらの Lys 残基を他の残基に特異的に変異させると、酵素活性が消失することが報告されている^{15,22}。そこで、これらの Lys 残基の機能を解明するために、Lys99 を Ala に変異させた K99A、Lys195 を Ala に変異させた K195A の 2 種類の変異体を、部位特異的変異導入法によって作製した。

2.1.1 K99A、K195A 変異体の作製

変異導入を行うため、Lys 残基を Ala 残基に変異させるように設計した、それぞれ 25 塩基の長さのプライマーを購入した。このプライマーと、Agilent Technologies 社の QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit を用いて PCR を行い、K99A と K195A のプラスミドを作製した。

このプラスミドで Rosetta 2 大腸菌を形質転換し、培養した。続いて、培養によって得られた菌体を超音波破碎し、70℃で 10 分間熱処理を行った。そして、この溶液を遠心(13000 rpm、30 min、4℃)し上清を陰イオン交換樹脂充填カラム(HiPrep_DEAE_FF 16/10)にかけ、その後硫酸分画を行い、最後に疎水性樹脂充填カラム(HiPrep_Butyl_FF 16/10)を用いて精製した。

2.2 K99A、K195A 変異体の活性

NAD⁺は、波長 340 nm で吸収を示さないが、NADH は吸収を示す。このことを利用して、*Tt*HSD に基質を加えた時の波長 340 nm での吸光度の増減で、活性の有無を調べることができる。K99A、K195A とともに、50 mM CAPS(pH 10.0)、室温(25℃)の条件下で、L-Hse と NAD⁺を加えても波長 340 nm で吸光度は変化せず、このことから、この 2 種類の変異体では逆反応において活性はないことがわかった。

2.3 *Tt*HSD の結晶化

*Tt*HSD の結晶化は、気液平衡を利用したハンギングドロップ蒸気拡散法を用いた。ハンギングドロップ蒸気拡散法とは、カバーガラス上に、タンパク質溶液と緩衝溶液や塩などを含む沈殿剤溶液を混合したドロップを吊るし、さらに沈殿剤溶液を共存させて密閉状態にし、2つの溶液間の気液平衡を利用して結晶化を行う方法である（図 2.1）。

この方法において、ドロップはできるだけ球状に近い形状にすることが望ましいため、カバーガラスはシリコンによりコーティングした。

また、タンパク質を結晶化する際に、予め基質溶液と一緒に混ぜて結晶化することで基質複合体を作る、共結晶化という方法を用いることで、L-Hse 結合型 *Tt*HSD 結晶を調製した。

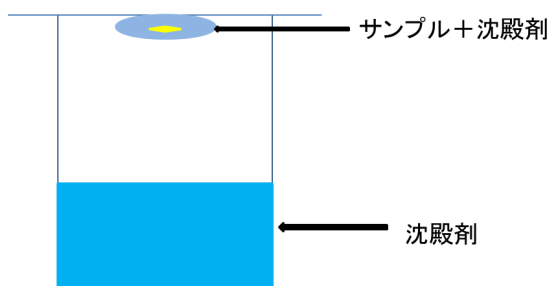


図 2.1 ハンギングドロップ蒸気拡散法

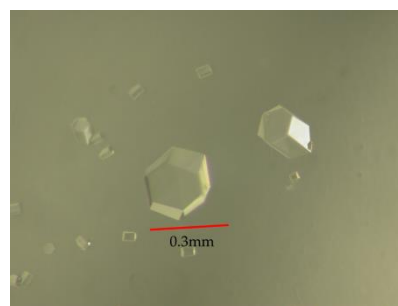


図 2.2 *Tt*HSD の結晶

2.3.1 基質非結合型 *Tt*HSD の結晶化

基質非結合型 *Tt*HSD は 23°C の条件下において、2 μ L のタンパク質溶液（5 mg/mL *Tt*HSD, 5 mM Tris-HCl (pH 7.5)）と 2 μ L の沈殿剤溶液（3.3~4.0 M ギ酸ナトリウム, 50 mM CAPS (pH 10.0)）を混合して結晶化を行った。

2.3.2 WT_L-Hse_NADPH 三元複合体の結晶化

WT_L-Hse_NADPH の結晶化では、まず、タンパク質溶液として、*Tt*HSD と L-Hse を混合したものを用いることで、WT_L-Hse 二元複合体の結晶化を行った。タンパク質溶液として、5 mg/mL WT、14 mM L-Hse、5 mM Tris·HCl (pH 7.5) を混合したものを用い、沈殿剤として 3.2 M~4.0 M ギ酸ナトリウム、50 mM CAPS (pH 10.0) を使用し、室温(25°C)で、図 2.2 に示すような六角柱状の結晶が、非常に再現良く析出した。獲得した WT_L-Hse 二元複合体の結晶を、沈殿剤溶液に、*Tt*HSD に対し過剰量である、15 mM L-Hse と 15 mM NADPH を加えたものに 4 時間ソーキングすることで、WT_L-Hse_NADPH 三元複合体の結晶を作製した。L-Hse と NADP⁺を用いた場合は結晶内で反応が進行してしまうことが予想されるため、それを防ぐために、L-Hse と NADPH を用いた。

2.3.3 K99A、K195A_L-Hse_NADP⁺三元複合体の結晶化

K99A、K195A の結晶化も、上述した WT のものと同様に、L-Hse と共結晶化後ソーキングを行うことで三元複合体の結晶を作製した。結晶化やソーキングの際に用いた試薬の濃度も同様であり、まず、タンパク質溶液として、5 mg/mL K99A（もしくは K195A）、15 mM L-Hse、5 mM Tris·HCl (pH 7.5)を混合したものを、沈殿剤として 3.2 M~4.0 M ギ酸ナトリウム、50 mM CAPS (pH 10.0)を使用し、共結晶化を行うことで、K99A (K195A) _L-Hse 二元複合体を調製した。獲得した K99A (K195A) _L-Hse 二元複合体の結晶を、*Tt*HSD に対し過剰量である 15 mM L-Hse と 15 mM NADP⁺を含む溶液にソーキングすることで、K99A (K195A) _L-Hse_NADP⁺三元複合体の結晶を作製した。WT における三元複合体では、結晶中で酵素反応が進行しないように NADPH を用いたが、K99A、K195A では活性がなくなっているため、本来ならば反応が進行する組み合わせである、L-Hse と NADP⁺が結合した三元複合体の獲得を目指した。ソーキング時間は、K99A では 4 時間、K195A では 1 時間の条件で行った。

2.3.4 WT_L-Asa_NADP⁺三元複合体の結晶化

さらに、HSD の正反応の基質に該当する L-Asa 結合型の結晶構造の獲得も試みた。L-Asa はその不安定さ故に、これが HSD に結合した結晶構造は未だ報告されていない。そのため、正反応の触媒反応機構を考察するために、L-Asa 結合型三元複合体の獲得を目指した。

L-Asa は大阪市立大学大学院有機反応化学研究室 白杵 克之助准教授に合成していただいた。上述した三元複合体と同様に、まず、タンパク質溶液として、5 mg/mL WT、15 mM L-Asa、5 mM Tris·HCl (pH 7.5)を混合したものを、沈殿剤として 3.2 M~4.0 M ギ酸ナトリウム、50 mM CAPS (pH 10.0)を使用し、共結晶化を行うことで、WT_L-Asa 二元複合体を調製した。獲得した WT_L-Asa 二元複合体の結晶を、沈殿剤溶液に *Tt*HSD に対し過剰量である 180 mM NADP⁺と、20%(v/v)となるようにグリセロールを加えたものをソーキング溶液として用い、24 時間ソーキングを行うことで、WT_L-Asa_NADP⁺三元複合体の結晶を調製した。

2.4 X線結晶構造解析

2.4.1 X線結晶構造解析の原理

1個の原子にX線があたると、そのほとんどは透過するが、一部は電子によって散乱される。その散乱の強さは次に示す原子散乱因子に比例する。

$$f(\mathbf{s}) = \int \rho_0(\mathbf{r}) \exp(2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{r}) dv \quad (1)$$

ここで $\rho_0(\mathbf{r})$ は静止状態の原子中の位置 \mathbf{r} における電子密度であり、積分は全空間について行う。 \mathbf{s} は散乱ベクトルである。

結晶中では単位格子が三次元的に繰り返して並んでいるため、ある特定の原子に注目すると、その原子は周期的に分布している。そして、どのような傾きの結晶面に対しても、それと平行でかつその原子が繰り返し配列しているような一連の結晶面が等間隔で存在する。そこにX線が入射し、結晶面によりX線が反射されるとき、ブラッグの条件である次式を満たさないと散乱X線は観測されない。

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad n = 1, 2, 3, \dots \quad (2)$$

d は結晶面の面間隔であり、 λ は入射X線の波長である。図2.1に示すように結晶面に対してX線は角度 θ で入射し、角度 θ で反射すると考えられる。X線は波長の短い光であり、平行に並んだ結晶面からの反射波通過距離が異なるため、それらが干渉して互いに打ち消しあわず、強め合うようにするには、光路差が波長の整数倍でなければならない。図2.1で示すように2つの結晶面での光路差は赤で示した $2d \sin \theta$ となる。これからブラッグの条件である(2)式が導かれる。

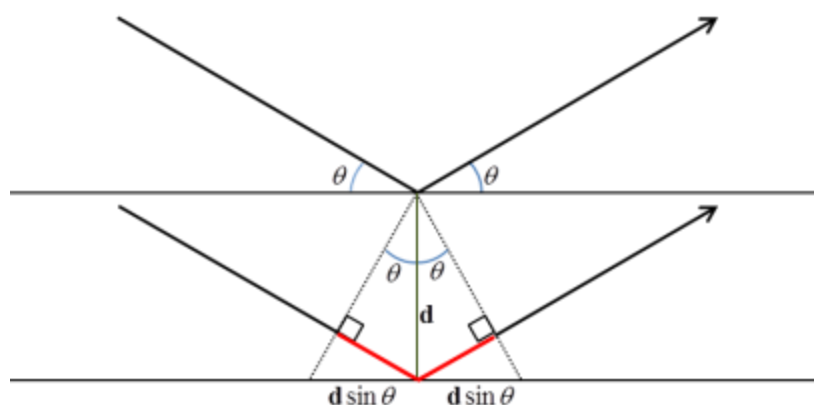


図 2.3 光路差 $2d \sin \theta$

そして、すべての反射を一次反射とみなして取り扱うために(1)式を次のように変形する。

$$2\frac{d}{n}\sin\theta = \lambda \quad n = 1,2,3,\dots \quad (3)$$

また、単位格子の原点を O とし、そのまわりでそれぞれの辺に沿ったベクトル \mathbf{a} 、 \mathbf{b} 、 \mathbf{c} を、基本実格子ベクトルという。この実格子ベクトルに対して、基本逆格子ベクトル \mathbf{a}^* 、 \mathbf{b}^* 、 \mathbf{c}^* が次式で定義される。

$$\mathbf{a}^* = \frac{\mathbf{b} \times \mathbf{c}}{V}, \quad \mathbf{b}^* = \frac{\mathbf{c} \times \mathbf{a}}{V}, \quad \mathbf{c}^* = \frac{\mathbf{a} \times \mathbf{b}}{V} \quad (4)$$

V は単位格子体積である。

また、反射指数 h 、 k 、 l に対応させて、逆格子ベクトル \mathbf{k} を次のように定義する。

$$\mathbf{k} = h\mathbf{a}^* + k\mathbf{b}^* + l\mathbf{c}^* \quad (5)$$

そして、X線結晶構造解析の基本式として以下の3式が挙げられる。

$$\text{回折 X 線強度} : I(\mathbf{k}) = K^2 |F(\mathbf{k})|^2 \quad (6)$$

$$\text{結晶構造因子} : F(\mathbf{k}) = \int \rho(\mathbf{r}) \exp(2\pi i \mathbf{k} \cdot \mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (7)$$

$$\text{電子密度} : \rho(\mathbf{r}) = \int F(\mathbf{k}) \exp(-2\pi i \mathbf{k} \cdot \mathbf{r}) d\mathbf{k} \quad (8)$$

式(6)に示すように、逆格子ベクトル \mathbf{k} について、その回折 X 線強度 $I(\mathbf{k})$ は結晶構造因子 $F(\mathbf{k})$ の絶対値の2乗に比例する。 K は、実験条件によって回折強度の測定値が変わるため、それを補正するスケール因子である。結晶構造因子 $F(\mathbf{k})$ は、式(7)に示すように単位格子中の電子密度 $\rho(\mathbf{r})$ をフーリエ変換したものである。逆に構造因子を逆フーリエ変換したものが電子密度となる。したがって、回折 X 線強度データをもとに構造因子が求めれば、式(8)から結晶中の電子密度が得られることになる。

(7)、(8)式について結晶中の原子座標(x 、 y 、 z)を用いて考えてみると、これは、実格子ベクトル \mathbf{a} 、 \mathbf{b} 、 \mathbf{c} を単位とした分率座標であり、 j 番目の原子位置 \mathbf{r}_j については次式のように書ける。

$$\mathbf{r}_j = x_j \mathbf{a} + y_j \mathbf{b} + z_j \mathbf{c} \quad (9)$$

これと(5)式より

$$\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}_j = hx_j + ky_j + lz_j \quad (10)$$

となり、構造因子の式(7)は

$$F(hkl) = \sum_j f_j \exp\{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)\} \quad (11)$$

と表すことができる。また、同様に考えることで(8)式は

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l} F(hkl) \exp\{-2\pi i(hx + ky + lz)\} \quad (12)$$

と表すことができる。この右辺の各項をフーリエ級数といい、それを足し合わせて電子密度を計算することをフーリエ合成という。

2.4.2 位相問題について

前項で示したように、構造因子 $F(hkl)$ がわかれば電子密度を求めることができるが、実験的に回折 X 線強度から求めることができるものは、構造因子の振幅 $|F(hkl)|$ である。そして、 $F(hkl)$ は

$$F(hkl) = |F(hkl)| \exp\{i\alpha(hkl)\} \quad (13)$$

と表される。 α は位相角であり、実験的に求めることは容易ではない。つまり、電子密度を計算するためには、この位相を求める必要があり、これを位相問題という。位相問題を解決するためにはさまざまな方法があるが、本研究では分子置換法を用いた。分子置換法とは既知の構造（サーチ分子）を基に、未知の構造（ターゲット分子）の単位胞内の分子配置を決定する方法である。

本研究では、*CCP4 Program Suite*²³ に含まれるプログラム *MOLREP*²⁴ を用いた。また、初期位相を決定するためのサーチ分子は当研究室で決定された、*THSD* の WT_L-Hse 二元複合体の結晶構造（PDB ID: 5XDF）を用いた。

2.4.3 構造精密化

分子置換法により初期構造モデルが得られると、各反射の強度およびその標準偏差を用いて精密化を行う。そして、測定データと計算値がうまく合うように、最小二乗法を用いて精密化をしていく。本研究では *CCP4 Program Suite*²³ に含まれるプログラム *REFMAC5*²⁵ を用いた精密化、プログラム *Coot*²⁶ を用いたモデルの修正を繰り返すことで、構造の精密化を行った。また、精密化の際に信頼度因子である R 因子、および R_{free} 因子を指標とした。 R 因子とは、「観測された構造因子振幅と計算された構造因子振幅の差の和」を「観測された構造因子振幅の和」で割ったものであり、観測および計算された構造因子振幅が一致するにつれ、 R 因子は小さくなる。また、 R_{free} 因子とは少数の反射（典型的には 5%）をランダムに選び、精密化に用いるデータから除いたものを使って計算した R 因子のことである。このことにより、 R_{free} 因子は構築したモデルのバイアスを含まないため、その減少はモデルの改良に関する偏りの少なさの見積もりとなる²⁷⁻³¹。

2.5 THSD 結晶の回折強度測定

X線は良好な回折像を得るため、非常に小さな領域に絞って照射される。そして、その領域には多くの熱が発生し、また X 線の高いエネルギーにより、タンパク質の化学結合が切断されラジカルが発生する。これらはタンパク質結晶にダメージを与え、観測データの精度は低下する。今回の測定では、この熱を逃がし結晶内におけるラジカルの移動を抑制するために、Flash-cooling 法を用いた³²。Flash-cooling 法とは、結晶をクライオループと呼ばれるナイロン製のループですくい、低温窒素気流中にマウントさせ直接冷却し測定する方法である。このときの低温窒素気流によって、結晶の周りにある結晶化溶液が凍結し、析出した氷によってデータの精度が低下しないように、測定時のリザーバー溶液には、結晶化溶液の凍結を防ぐ凍結保護物質を混合し、不凍液にした。今回、すべての測定において一般的に不凍液として用いられるグリセロールを 1 μL と、結晶化の際に使用したリザーバー溶液 4 μL を混合して用いた。WT_L-Asa_NADP+三元複合体結晶では、ソーキングの段階からこの処理を行ったが、他の結晶では測定直前に施した。すべてのデータ処理は *HKL2000*³³ で行った。

WT の基質非結合型、L-Hse_NADPH 三元複合体、L-Asa_NADP+三元複合体、K99A の L-Hse_NADP+三元複合体、K195A の L-Hse_NADP+三元複合体の合計 5 種類の結晶について X 線回折強度測定を行った。高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory BL12NW 及び、高輝度光科学研究センター SPring-8 BL38B1 にて波長 1 \AA で測定を行い、1.83~2.00 \AA の分解能で X 線回折データ収集に成功した。表 2.1 に収集結果及び解析結果を示す。

表 2.1 X 線回折データ収集結果及び解析結果

	WT unliganded	WT L-Hse_NADPH	WT L-Asa_NADP ⁺	K99A L-Hse_NADP ⁺	K195A L-Hse_NADP ⁺
PDB entry	6A0R	6A0S		6A0T	6A0U
Data collection					
Beamline	Photon Factory NW12A	SPring-8 BL38B1	SPring-8 BL38B1	Photon Factory NW12A	Photon Factory NW12A
Wavelength(Å)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Space group	<i>P</i> ₃ ² <i>2</i> ₁	<i>P</i> ₃ ² <i>2</i> ₁	<i>P</i> ₃ ² <i>2</i> ₁	<i>P</i> ₃ ² <i>2</i> ₁	<i>P</i> ₃ ² <i>2</i> ₁
Unit cell parameters	<i>a</i> = <i>b</i> =119.2 <i>c</i> =144.5	<i>a</i> = <i>b</i> =119.7 <i>c</i> =144.7	<i>a</i> = <i>b</i> =119.1 <i>c</i> =145.7	<i>a</i> = <i>b</i> =121.4 <i>c</i> =145.1	<i>a</i> = <i>b</i> =119.7 <i>c</i> =143.7
Resolution range(Å)	50-1.83 (1.86-1.83)	50-2.00 (2.07-2.00)	50-2.00 (2.07-2.00)	50-1.87 (1.90-1.87)	50-1.93 (1.96-1.93)
Total No. of reflections	878131	670273	672124	858390	751234
No. of unique reflections	104929	81148	79740	102476	89383
Multiplicity	8.4(8.4)	8.3(8.2)	8.4(8.6)	8.4(8.4)	8.4(8.4)
Completeness(%)	100(100)	99.9(100)	98.3(97.7)	100(100)	99.9(100)
<i>R</i> _{merge}	0.114(0.359)	0.090(0.343)	0.064(0.335)	0.073(0.366)	0.101(0.363)
<i>I</i> / <i>σ</i> (<i>I</i>)	48.7(7.0)	49.0(6.1)	53.3(6.2)	43.4(7.1)	49.8(7.5)
Refinement					
Resolution range(Å)	20-1.83	20-2.00	20-2.00	20-1.87	20-1.93
<i>R</i>	14.8	15.9	16.3	13.7	17.2
<i>R</i> _{free}	17.7	20.0	20.2	16.7	21.1
No. of atoms	6155	5871	5750	6426	5935
No. of water molecules	759	536	492	910	525
No. of ligands	Na ⁺ ions, 2 formate, 17 CAPS, 2 glycerol, 2 UNL, 1	Na ⁺ ions, 2 NADPH, 2 HSE, 2 formate, 13 CAPS, 1 glycerol, 1	Na ⁺ ions, 2 NADP ⁺ , 2 ASA, 2 formate, 7 glycerol, 3	Na ⁺ ions, 2 NADP ⁺ , 2 HSE, 2 formate, 10 CAPS, 1 glycerol, 5	Na ⁺ ions, 2 NADP ⁺ , 2 HSE, 2 formate, 15 CAPS, 1 glycerol, 2 UNL, 1
B-factor(Å ²)					
Protein	27.1	38.0	38.9	22.5	30.3
Na ⁺ ion	14.9	24.2	24.5	12.4	18.9
Water	40.9	47.0	51.8	38.6	42.0
NADP ⁺	-	-	50.5	17.4	36.7
NADPH	-	43.6	-	-	-
HSE	-	36.6	-	13.8	34.1
ASA	-	-	47.8	-	-
formate	36.9	50.5	51.1	34.6	44.1
CAPS	53.8	53.5	-	36.1	52.9
glycerol	38.0	52.5	45.2	39.7	43.8
UNL	28.8	-	-	-	43.6
R.m.s.d.					
Bond lengths(Å)	0.029	0.026	0.023	0.027	0.027
Bond angles(°)	2.5	2.3	2.2	2.6	2.4
Ramachandran plot					
Preffered regions(%)	95.56	95.42	96.78	96.83	95.78
Allowed regions(%)	3.58	3.92	3.06	2.99	3.55
Outliers(%)	0.85	0.65	0.16	0.18	0.68

0内は、最外殻における数値を表す。*R*_{merge} とは、等価反射間の一致具合を示す指標である。反射 *h* について、対称操作で関係づけられる反射が *N*組あるとした時に、

$$R_{merge} = \frac{\sum_h \sum_{i=1}^N |I(h)i - \bar{I}(h)|}{\sum_h \sum_{i=1}^N I(h)i}$$

と表される^{30,31}。

3 結果・考察

3.1 WT_L-Hse_NADPH 三元複合体

3.1.1 WT_L-Hse_NADPH 三元複合体の全体構造

WT 三元複合体では、逆反応の基質の組み合わせである L-Hse と NADP⁺ではなく、基質である L-Hse と生成物である NADPH を使用することで、触媒反応が進行しない WT 三元複合体の獲得をめざし、疑似的なミカエリス複合体構造の獲得を目的とした。そして、WT_L-Hse_NADPH 三元複合体の結晶構造は 2.00 Å の分解能で決定に成功し、これはすでに構造が決定されている基質複合体である *S. cerevisiae* 由来 HSD (2.6 Å)、*P. horikoshii* 由来 HSD (2.43 Å)、*S. tokodaii* 由来 HSD (2.1 Å) の分解能よりも高く、より詳細な酵素-基質相互作用を明らかにすることが可能になる。WT_L-Hse_NADPH 三元複合体の結晶構造を図 3.1 に示す。結晶構造では、非対称単位内に二つの同一のサブユニットからなる二量体が、一つ存在する。活性部位は、それぞれのサブユニットに一つずつ存在しており、L-Hse と NADPH のモデルをアサインすることができた。この時、モデルをアサインした際の電子密度マップの差フーリエとモデルの B-factor を考慮し、L-Hse のモデルは 100% の占有率、NADPH のモデルは 80% の占有率とした。

*Tt*HSD のサブユニット構造を図 3.1(b) に示す。*Tt*HSD のサブユニットは、3 つのドメインに分けられ、4 つの α ヘリックスと、5 つの β ストランドから構成され、ヌクレオチド結合モチーフとして著名な α/β Rossmann fold^{34,35} を含むヌクレオチド結合ドメイン (残基番号 1-119、288-309)、2 つの α ヘリックスと、ダイマーを形成しているもう一方のサブユニットと共に、β シートを形成する 2 つの β ストランドによって構成される二量体化ドメイン (残基番号 121-140、261-287)、2 つの α ヘリックスと 4 つの β ストランドによって構成される、ホモセリン結合ドメイン (残基番号 141-260) の 3 つのドメインから構成される。また、C 末端にはヌクレオチド結合ドメインからホモセリン結合ドメインへと延びる flexible tale (残基番号 310-332) が存在する。

そして、基質である L-Hse と NADPH のニコチンアミドリボースの一部は、ホモセリン結合ドメインとヌクレオチド結合ドメインによって構成される深くくぼみの内部深く、NADPH のアデノシン部位は酵素の表面に存在していた。

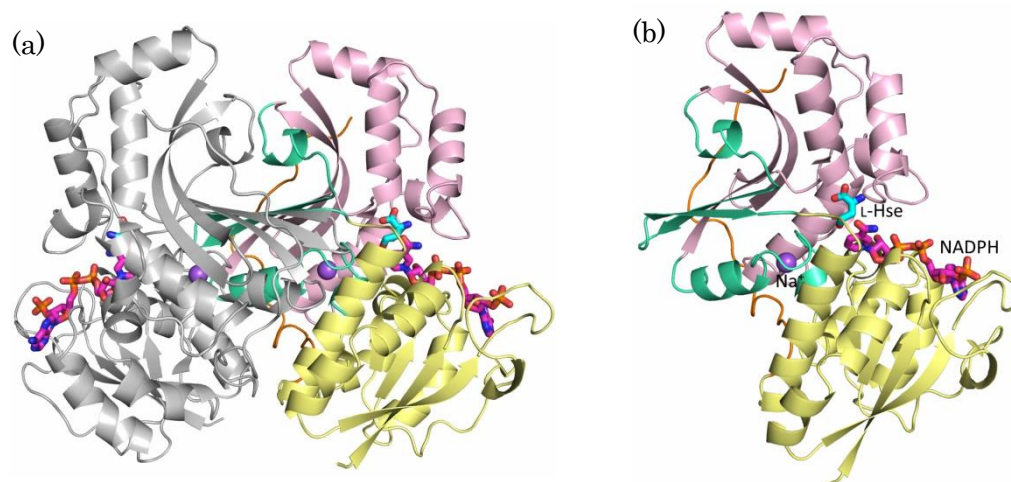


図 3.1 WT 三元複合体の全体構造

ヌクレオチド結合ドメインは黄色、ホモセリン結合ドメインはピンク、二量体化ドメインはライトグリーン、flexible tale はオレンジ色、ナトリウムイオンは紫色の球で示した。L-Hse はシアンのスティックモデル、NADPH はマゼンタのスティックモデルで示した。
 (a)WT_L-Hse_NADPH 三元複合体の全体構造を示す。(b)WT_L-Hse_NADPH 三元複合体のサブユニット構造を示す。

3.1.2 基質結合による open/closed 構造変化

全体構造において、Thr165-Pro183 のループ部分を除き、L-Hse や NADPH が結合することによる、大きな構造変化は確認できず、基質非結合型と 1-164、184-331 残基で重ね合わせを行ったところ、r.m.s.d.は 0.18 Å となった。それに対し、ホモセリン結合ドメインに存在する Thr165-Pro183 のループ部分が、大きく構造を変化しており、Ala181 の Ca において最大 5.2 Å 移動していた (図 3.2)。これによって、活性部位が閉じた構造 (closed 型) となり、構造変化を起こさず、活性部位が開いたままの構造 (open 型) と比べ、活性中心を溶媒から保護していた。特に、Glu180 は活性部位の外側から内側に構造変化しており、L-Hse のアミノ基や NADPH のニコチンアミドリボースのヒドロキシ基と新たに水素結合を形成していた。これらの水素結合が鍵となって closed 型への構造変化が起きているのだと考えられる。同様に、Tyr178 の主鎖の酸素原子は L-Hse のアミノ基と水素結合を形成していた。

このようなコンフォメーション変化は酵素-基質-補因子複合体の形成や、酵素活性に極めて重要な役割を担っていることが考えられる。また、*S. cerevisiae* 由来 HSD では変異体の活性測定実験において活性が失われることから、*Tt*HSD の Glu180 に相当する Glu 残基が活性発現に重要な役割を果たすことが示唆されている¹⁵。open/closed のコンフォメーション変化は、他の NAD(P)⁺依存性酵素でも見られ、リンゴ酸脱水素酵素、乳酸脱水素酵素、アルコール脱水素酵素においても基質や補因子が結合することにより、open 型から closed 型へとコンフォメーション変化することが報告されている³⁶⁻³⁸。

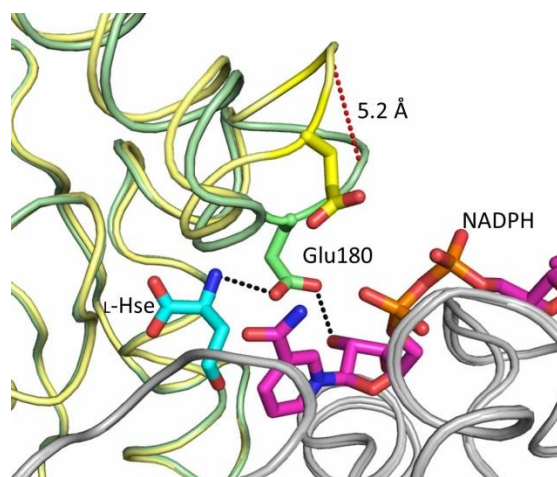


図 3.2 基質非結合型と三元複合体の重ね合わせ図

WT 基質非結合型のホモセリン結合ドメインを黄色、WT_L-Hse_NADPH 三元複合体のホモセリン結合ドメインを緑色、その他のドメインを灰色で示す。L-Hse をシアンのスティックモデル、NADPH をマゼンタのスティックモデルで示す。黒色の破線で三元複合体における Glu180 と L-Hse や NADPH との水素結合、赤色の破線で Ala181 における Ca 間の距離を示す。

3.1.3 他種由来の HSD-基質複合体との比較

これまでに *S. cerevisiae*、*P. horikoshii*、*S. tokodaii* 由来の HSD について、すでに酵素-基質（基質アナログ）複合体の結晶構造が報告されている¹⁵⁻¹⁷。*S. cerevisiae* では HSD_L-Hse_NADA（NAD アナログ）複合体、*P. horikoshii* では Lys57Ala mutant_L-Hse_NADPH 複合体、*S. tokodaii* では HSD_L-Cys_NAD⁺複合体の構造が決定されている。*S. tokodaii* 由来 HSD と *Tt*HSD の WT_L-Hse_NADPH 三元複合体構造を比較したところ、その活性部位において大きな違いはなく、*S. tokodaii* 由来 HSD では、L-Cys の硫黄原子と NAD⁺の C4 原子との間に共有結合を形成しているにもかかわらず、それらの認識には大きな差異は見られなかった。しかし *S. cerevisiae* 由来 HSD や *P. horikoshii* 由来 HSD の三元複合体と *Tt*HSD の三元複合体を比較したところ、L-Hse の結合様式が大きく異なっており、さらに基質が結合しているにもかかわらず、活性部位は開いた open 構造のままであった。

S. cerevisiae 由来 HSD と *P. horikoshii* 由来 HSD はソーキングによって open 型の HSD に基質を結合させている。このため、結晶のパッキングが原因となり、基質が結合しても closed 型になれず、またそれにより基質が正しい配向で結合できなかった可能性がある。*P. horikoshii* 由来 HSD (PDB ID: 4XB2) と *S. cerevisiae* 由来 HSD (PDB ID: 1EBU) の三元複合体構造では、対称単位に存在する別の HSD 分子が、closed 型へと構造変化を起こす時に動くループ部分と、多くの水素結合を形成していた。これらの水素結合の影響により、open 型から closed 型へのコンフォメーション変化を起こすことができなかったのだと考えられる。*P. horikoshii* 由来 HSD の NADPH との二元複合体結晶の構造 (PDB ID: 4XB1) は前述した三元複合体構造とは異なる結晶系であるが、この二元複合体構造では、結晶化の際に使用された (4S)-2-methyl-2,4-pentanediol が L-Hse 結合サイトに結合していた。この分子が Glu 残基のカルボキシ基と NADPH との水素結合を妨げ、closed 型への構造変化を阻害したのだと考えられる。

また、*S. cerevisiae* 由来 HSD と L-Hse の接触面積を *CCP4 Program Suite* 内の *areaimol* を利用して計算したところ、107.5 Å²であった²³。それに対し、*Tt*HSD と L-Hse の接触面積は 151.7 Å²であり、closed 型となることで酵素と L-Hse の間の接触面積が広くなることが確認された。接触面積が広くなることで、L-Hse と酵素の親和性を上げていることが予想される。

3.1.4 NADPH 結合様式

WT_L-Hse_NADPH 三元複合体における NADPH の結合様式を図 3.3 に示す。NADPH のニコチンアミド部位は、*Th*HSD の活性部位にある深くぼみ内部、アデノシン部位は、*Th*HSD の表面に存在していた。リン酸基は、Arg44 や Arg50 の側鎖、また Arg44 の主鎖と水素結合を形成していた。ニコチンアミド部位の酸素は、Gly290 の主鎖の窒素、ニコチンアミド部位の窒素は、Gly177 の主鎖の酸素と水素結合を形成していた。二リン酸部位は、ヌクレオチド結合ドメインとして著名な Rossmann fold 中に存在する、Thr13 や Val14 の主鎖の窒素原子と水素結合を形成していた。

表 1.1 で示したように、NAD⁺よりも NADP⁺のほうが K_m は低い。これは、NADP⁺ のリン酸基が Arg50 や Arg44 と水素結合を形成しており、これらの水素結合によって、酵素との親和性がより高くなっているためだと考えられる。

*Th*HSD の結晶構造では、興味深いことに Thr294 の側鎖のヒドロキシ基が NADPH のニコチンアミド環の *pro-R* 面から近接し、Thr294 の O γ 1 原子はニコチンアミド環の C4 原子と 2.8 Å の距離に存在していた。この Thr 残基は、*S. cerevisiae* 由来 HSD¹⁵、*P. horikoshii* 由来 HSD¹⁶ や他の種由来の HSD (PDB ID: 3DO5, 3ING, 3JSA, 3MTJ, 4PG4)、さらにはアルコール脱水素酵素 (PDB ID: 4DWV, 1CDO, 4W6Z) で観察された。この Thr 残基はヒドリドイオンのドナーとアクセプターの距離を調整し、ヒドリド転移を起こりやすくする役割を持つ可能性がある。

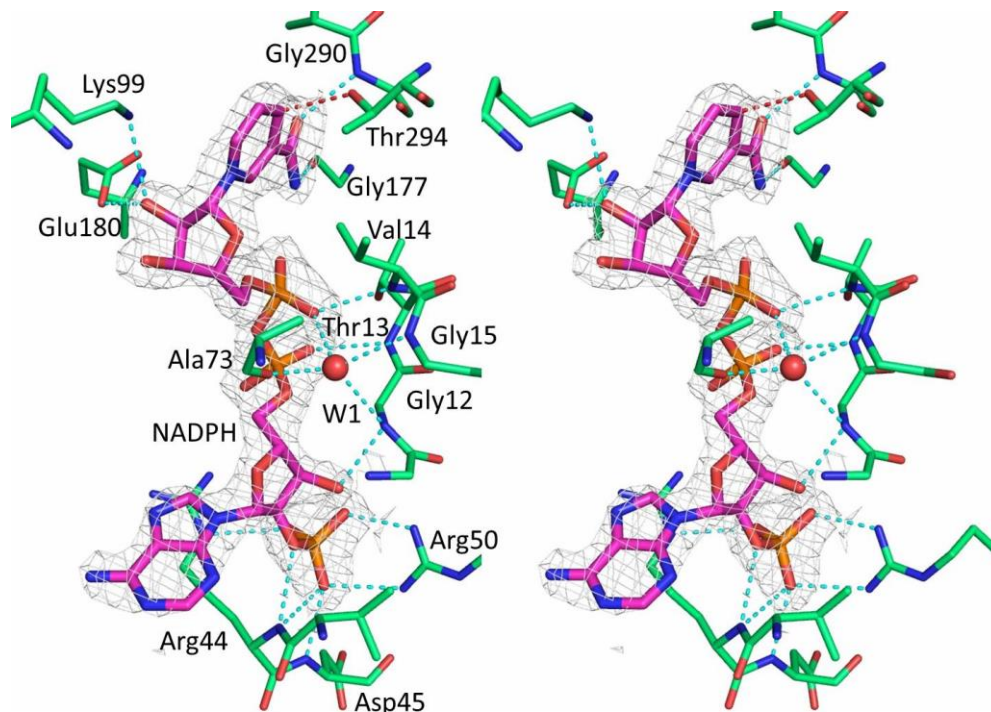


図 3.3 NADPH の結合様式

NADPH の結合様式をステレオ図で示す。シヤンの破線は水素結合を示す。赤色の破線は Thr294 と NADPH の C4 原子との相互作用を示す。

3.1.5 L-Hse 結合様式

WT_L-Hse_NADPH 三元複合体の結晶構造において、L-Hse は活性部位の奥深くに存在し、溶媒領域から遮断されていた。また、活性部位に存在する多くの残基と水素結合を形成していた (図 3.4)。L-Hse のカルボキシ基は Gly151 や Thr152 の主鎖の窒素原子、Thr152 の側鎖の O γ 1 や Lys195 の側鎖の N ζ と水素結合を形成していた。L-Hse のアミノ基は、Glu180 や Asp186 の側鎖カルボキシ基、Tyr178 の主鎖の酸素原子と水素結合を形成していた。L-Hse のヒドロキシ基は Lys99 や Lys195 の側鎖の N ζ 、水分子 (W2) と水素結合を形成していた。W2 は、さらに Ala122 の主鎖の酸素原子及び、Ala126 の主鎖の窒素原子と水素結合を形成していた。興味深いことに、Asp191 の側鎖カルボキシ基は、L-Hse のヒドロキシ基と水素結合を形成している Lys99 と Lys195 の両方の側鎖の N ζ に対して塩橋を形成していた。

*Tt*HSD の三元複合体構造において、NADPH のニコチンアミド環の C4 原子と L-Hse の C γ 原子が近接しており、また触媒反応に適した配向であった。L-Hse の C β 、C γ 、O δ で作られる面は、ニコチンアミド環の C3、C4、C5 と平行に近い配向となっており、それらの距離は C β -C3 間が 3.8 Å、C γ -C4 間が 3.3 Å、O δ -C5 間が 3.4 Å であった。乳酸脱水素酵素³⁹、カルボニル還元酵素⁴⁰、ウロン酸脱水素酵素⁴¹、DpkA⁴²の構造でも、このように、基質とニコチンアミド環が平行に近いコンフォメーションをとっていた。2つの基質の π 軌道が重なることにより、Michaelis 複合体を安定化している可能性がある。

また、L-Hse の C γ 原子には NADPH のニコチンアミド環の *pro*-4S 水素が近接する配向となっており、*pro*-4S 水素がヒドリド転移を行うことが示唆された。これは *S. cerevisiae* 由来 HSD でも結晶構造と速度論的同位体効果から、*pro*-4S 水素がヒドリド転移を行うことが示されており^{15,43}、本研究の結果と一致した。

*Tt*HSD と *S. cerevisiae* 由来 HSD や *P. horikoshii* 由来 HSD では、活性部位に結合している L-Hse の配向やその水素結合環境が大きく異なっていた。*S. cerevisiae* 由来 HSD (PDB ID: 1EBU) では Glu208 (*Tt*HSD: Glu180) と Asp219 (*Tt*HSD: Asp191) のみが、L-Hse と水素結合距離に存在していた。Lys117 (*Tt*HSD: Lys99) と Lys223 (*Tt*HSD: Lys195) の側鎖の N ζ は、L-Hse のヒドロキシ基との距離がそれぞれ 4.8 Å と 3.8 Å と遠く、これらが水素結合を形成しているとは考えにくい構造となっていた。

それに対して、*P. horikoshii* 由来 HSD の構造 (PDB: ID 4XB2) では、*Tt*HSD と同様に、L-Hse のヒドロキシ基は Lys116 (*Tt*HSD: Lys99) と Lys215 (*Tt*HSD: Lys195) の両方と水素結合を形成していた。しかし、L-Hse のカルボキシ基とアミノ基の認識機構は大きく異なっていた。L-Hse のカルボキシ基は Asn170 (*Tt*HSD: Asn150) や Asp206 (*Tt*HSD: Asp206) と相互作用ができるようなコンフォメーションをとっていた。また、L-Hse のアミノ基は、*Tt*HSD では Glu180 や Asp186 に強固に認識されているのに対し、*P. horikoshii* 由来 HSD では直接アミノ酸残基と相互作用を形成してい

なかった。

S. tokodaii 由来 HSD において、HSD_L-Cys_NAD⁺複合体では *Tt*HSD と同様に closed 型の構造をとっており、*Tt*HSD の基質認識機構と非常によく似ていた。*Tt*HSD の構造で Glu180 が L-Hse のアミノ基と NADPH のリボース環のヒドロキシ基を認識しているのと同様に、*S. tokodaii* 由来 HSD では Glu185 が L-Cys のアミノ基と NAD⁺ のリボース基を認識していた。

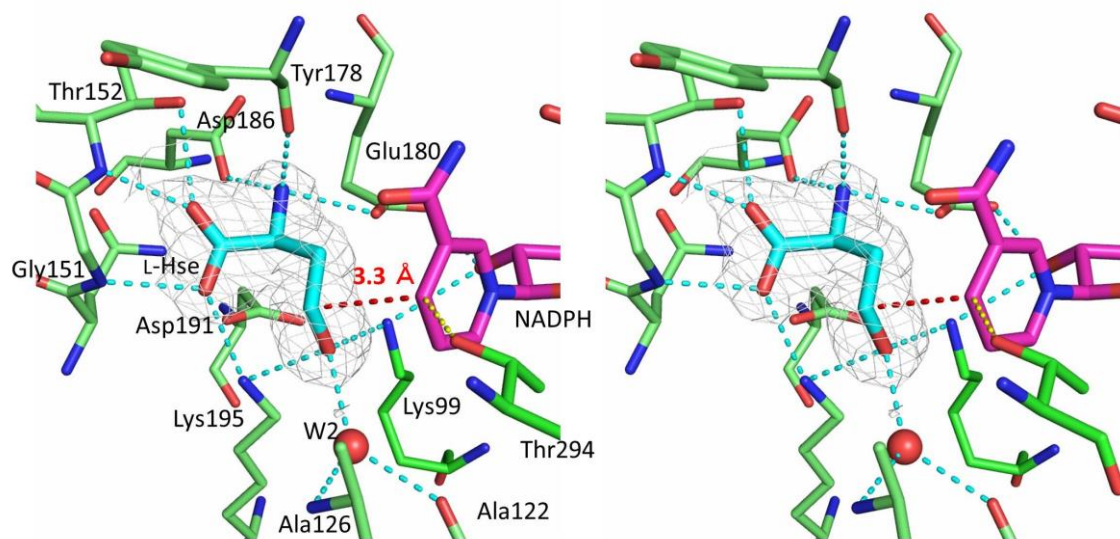


図 3.4 L-Hse の結合様式

L-Hse をシアンのスティックモデル、NADPH をマゼンタのスティックモデルで示す。シアンの破線は水素結合、黄色の破線は Thr294 と NADPH の C4 原子との相互作用、赤の破線は触媒反応中でヒドリド転移が起こる L-Hse の C_γ原子と NADPH の C4 原子と 2 点間の距離を示す。

3.2 K99A、K195A_L-Hse_NADP⁺三元複合体

3.2.1 K99A、K195A 変異体の L-Hse_NADP⁺結合型三元複合体結晶構造

*Tt*HSD の三元複合体構造において、L-Hse のヒドロキシ基と 2 つの Lys 残基 (Lys99、Lys195) は水素結合を形成していた。これら 2 つの残基は HSD に完全に保存されており、活性発現に必須の残基であることが予想される。そこでこれら 2 つの残基の役割を調べるために、Lys99 を Ala に変異した K99A と、Lys195 を Ala に変異した K195A の 2 種類の変異体について X 線結晶構造解析を行った。

逆反応の活性測定を行ったところ、K99A と K195A の両方で活性は確認できなかった。このため、WT では反応が進行しないように L-Hse と NADPH を用いていたが、K99A と K195A については、反応が進行する組み合わせである L-Hse と NADP⁺を使用して、三元複合体の結晶構造の獲得を目指し、K99A では 1.87 Å、K195A では 1.93 Å の分解能で構造を決定した。決定した構造と WT 三元複合体結晶について 331 の C α 原子で重ね合わせを行ったところ、r.m.s.d. は K99A では 0.35 Å、K195A では 0.17 Å となり、これら 3 つの全体構造は類似していることがわかった。

WT、K99A、K195A のそれぞれの三元複合体についての重ね合わせ図を図 3.5 に示す。K99A 三元複合体の構造において、Lys99 の側鎖がなくなり、周囲の残基との相互作用も消失したにもかかわらず、L-Hse や NADP⁺ と周囲の残基の相互作用などは、WT_L-Hse_NADPH 三元複合体と比べ、大きな変化はなかった。Lys99 の N ζ が存在していた箇所には、その代わりに新たに水分子 (W3) が存在しており、WT_L-Hse_NADPH 三元複合体における Lys99 の N ζ と同様に、L-Hse のヒドロキシ基、ニコチンアミドリボースのヒドロキシ基、Asp191 のカルボキシ基と水素結合を形成していた。K99A_L-Hse_NAD⁺三元複合体構造と *Wlid-type*_L-Hse_NADPH 三元複合体構造を比較しても、大きな構造の変化がないにもかかわらず、K99A では活性が失われているため、Lys99 は酸塩基触媒残基として働くことが示唆された。

それに対して、K195A 三元複合体の結晶構造では、Lys195 の側鎖がなくなったことによって生じた空間を埋めるように、Lys99 や L-Hse のコンフォメーションが変化していた。特に、Lys99 は大きくコンフォメーションを変化させ、ニコチンアミドリボースとのヒドロキシ基との水素結合も無くなっていた。このような活性部位におけるコンフォメーションの変化が原因で、L-Hse は活性発現可能な配向をとることができず、K195A では活性が失われたのだと考えられる。つまり、Lys195 は L-Hse をヒドリド転移に適した位置に固定する役割があると考えられる。

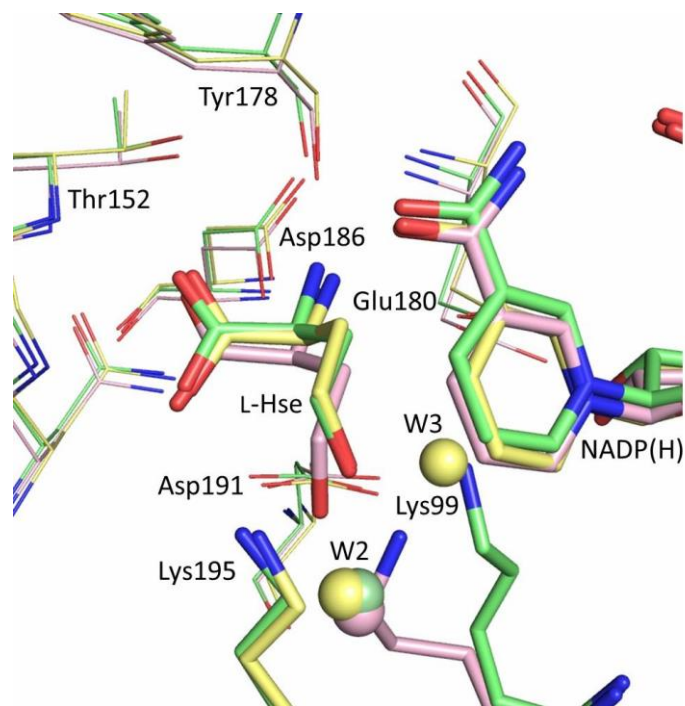


図 3.5 WT、K99A、K195A 三元複合体の重ね合わせ図

緑色の構造は WT_L-Hse_NADPH 三元複合体、黄色の構造は K99A_L-Hse_NADP⁺ 三元複合体、ピンク色の構造は K195A_L-Hse_NADP⁺ 三元複合体を示す。

3.2.2 K99A 三元複合体で観察されるシスペプチド

K99A 三元複合体の結晶構造は他の結晶と比べ、格子定数がやや異なっており、*a, b* 軸が 1.7~2.2 Å 程度長くなっていた。さらに、ダイマーを形成している 2 つのモノマーのそれぞれで、Gly151~Ala179 までの残基が、WT よりも 0.7 Å ほど外側に広がっている。これは、K99A と他の 2 種類の構造を比べると、やや r.m.s.d.が高くなっていることにも表れている。

K99A のサブユニット B では、他の三元複合体構造と異なり、Pro61 の手前のペプチドがシス化しており、それに伴い Arg58~Asp63 までの残基が大きくコンフォメーションを変化させていた。シス型ペプチドは、隣接側鎖間の立体障害により、トランス型構造に比べ約 8 kJmol⁻¹ 不安定であるため、ペプチド結合は通常トランス型をとる。しかし、Pro 残基の直前のペプチド結合では、この立体障害は小さいため、タンパク中のプロリン残基のペプチド結合の約 10%はシス型であることが知られている¹。

K99A の結晶構造では、図 3.6 に示すように、Pro61 の手前の残基である Glu60 が、NADP⁺のアデニン環と、水 (W4) を介して相互作用をしており、この相互作用によって、シス型のペプチドが安定化されていると考えられる。K99A_L-Hse 二元複合体の結晶構造では、トランス型になっていることから、NADP⁺の結合による影響であることは明らかである。これらの変化は活性中心から距離のある箇所が発生しており、活性中心の基質と側鎖の相対配置には関わっていないことから、酸塩基触媒反応には関与していないと考えられる。

本研究では K99A 三元複合体において、トランス型の結晶構造も得られている。しかし、何が原因で、シス型やトランス型になるかは、現在のところ不明である。さらに、なぜ K99A だけがシス型構造をとり得るのかはわからない。もしかすると、WT や K195A でもシス型構造になり得るが、偶然トランス型構造が得られたのかもしれない。また、シス型ペプチドになったことによって結晶格子が大きくなったのか、結晶格子が大きくなることによってシス型ペプチドをとることができるようになったのか、そのどちらであるかは不明である。

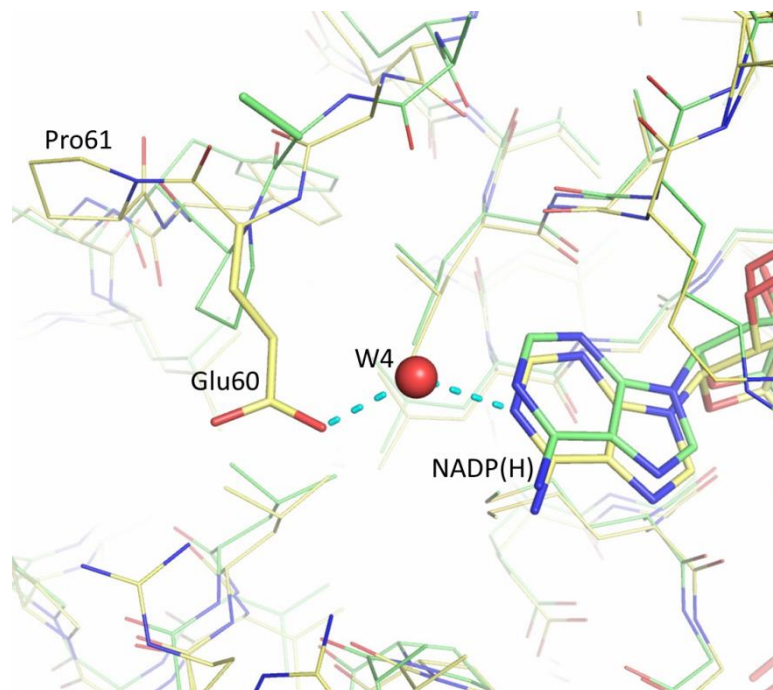


図 3.6 Glu60 のコンフォメーション変化

WT_L-Hse_NADPH 三元複合体の構造を緑色、K99A_L-Hse_NADP⁺三元複合体の構造を黄色のモデルで示す。水分子を赤色の球で示す。シアン色の破線で水素結合を示す。

3.3 WT_L-Asa_NADP⁺三元複合体

3.3.1 WT_L-Asa_NADP⁺三元複合体結晶構造

WT_L-Hse_NADPH 三元複合体の結晶構造において、L-Hse のヒドロキシ基は、Lys99、Lys195 の N ζ 、さらには水分子 (W2) と合計 3 つの水素結合を形成していた。しかし、正反応の基質である L-Asa はヒドロキシ基ではなく、アルデヒド基である。このため、この酸素原子は L-Hse の場合とは異なり、通常、2 つの水素結合しか形成できず、L-Asa は L-Hse とは異なる水素結合環境下に存在する可能性が高い。そこで HSD の正反応における触媒反応機構の知見を獲得するために、L-Asa との三元複合体の結晶構造解析も行った。WT_L-Asa_NADP⁺三元複合体の結晶は 2.0 Å の分解能で構造決定した。

WT_L-Hse_NADPH 三元複合体の結晶構造と 331 の C α 原子で重ね合わせを行ったところ、r.m.s.d.は 0.40 Å であった。

また、活性部位では、WT_L-Asa_NADP⁺三元複合体の結晶構造は NADP⁺の結合様式が大きく異なっていた。ニコチンアミド環とそれに続くリボース環のコンフォメーションが全く異なっており (図 3.7)、ニコチンアミド環の窒素原子は Thr294 の O γ 1 と、酸素原子は Gly290 の主鎖の窒素原子と水素結合を形成していた。また、ニコチンアミドリボースのヒドロキシ基は Ala181 の主鎖の窒素原子と水素結合を形成していた。

これは、L-Hse と同じ活性部位に結合するものとは異なる 2 つ目の L-Asa が NADP⁺のリボース環が本来認識されるべき箇所に結合しており、この L-Asa が NADP⁺の結合を阻害しているために、異なった結合様式になっているのだと考えられる。本研究室の水田の研究によって L-Asa 濃度が高濃度になれば *Th*HSD の活性が低下することが報告されており⁴⁴、ソーキング溶液中に存在する高濃度の L-Asa の影響により、結晶構造では L-Asa に阻害された構造となったのだと考えられる。L-Asa による基質阻害は *S. cerevisiae* 由来 HSD でも報告されており⁴³、HSD に特有の機能である可能性がある。

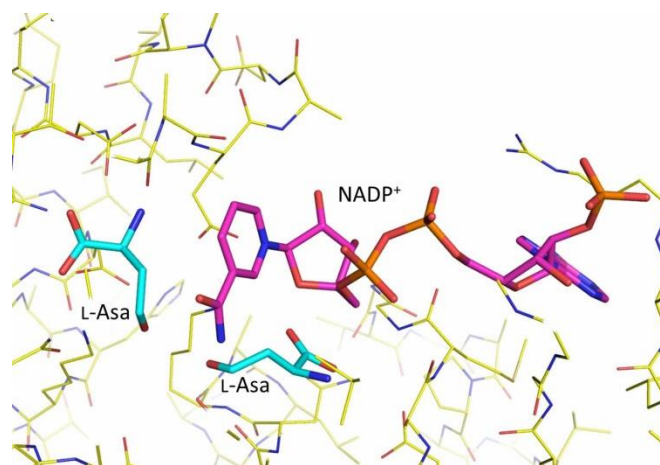


図 3.7 WT_L-Asa_NADP⁺三元複合体の活性部位

L-Asa をシアンのスティックモデル、NADP⁺をマゼンタのスティックモデルで示す。

3.4 *Tt*HSD の触媒反応機構

本研究の結果から、次の触媒反応メカニズムが提案できる。まず、L-Hse と NADP⁺ が *Tt*HSD に結合すると、Thr165~Pro183 までのループが活性部位を閉じ、L-Hse と NADP⁺ をバルク領域から守るように動くことで closed 型になる。それと同時に Glu180 のカルボキシ基は L-Hse や NADP⁺ と水素結合を形成する。この水素結合によって、L-Hse と NADP⁺ を活性部位に安定化させ、NADP⁺ のニコチンアミド環の C4 原子と L-Hse の C_γ 原子の距離を 3.3 Å まで近接させることにより、L-Hse から NADP⁺ へヒドリド転移を起こしやすいコンフォメーションに固定する。そして、Lys99 が酸塩基触媒残基として働き、L-Hse の C_γ 原子から NADPH の C4 原子へヒドリドイオンが転移し、L-Asa と NADPH へ変換される (図 3.8)。

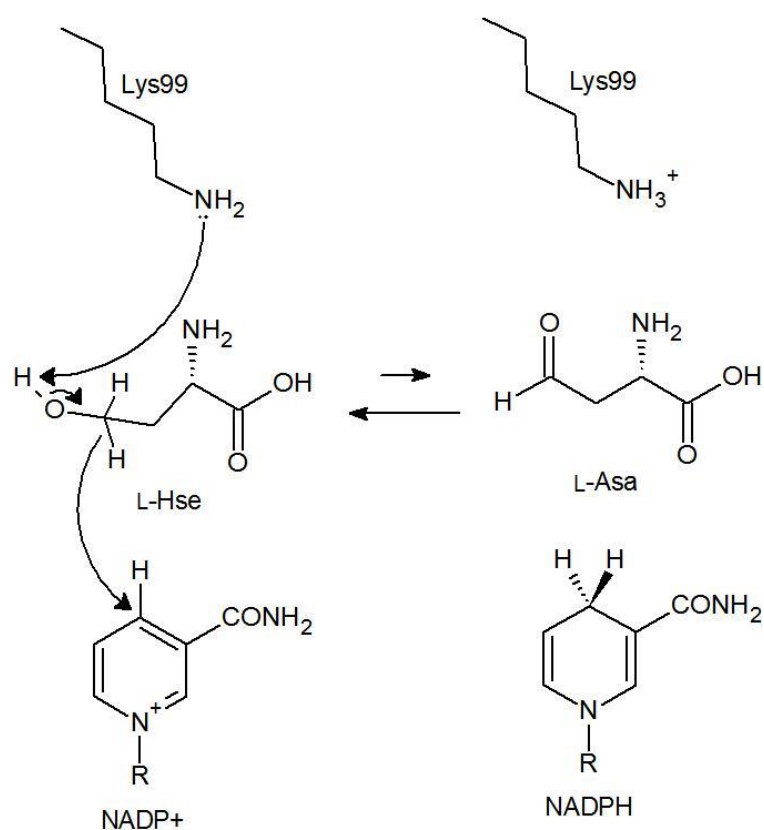


図 3.8 予想される HSD の触媒反応機構

L-Hse の O δ と Lys99 の N ζ が形成する水素結合は、ニコチンアミド環と平行になるようなコンフォメーションをとっており、それに対し L-Hse の O δ と Lys99 の N ζ の水素結合はニコチンアミド環に対し垂直になるようなコンフォメーションをとっていた (図 3.9)。アルコール脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、短鎖型脱水素酵素、アルド-ケト還元酵素といった NAD(P)⁺依存型の酸化還元酵素において、Ser、His、Tyr 残基が酸塩基触媒残基として働くと報告されている^{40,45-47}。そして、これらの酵素において酸塩基触媒残基と基質との水素結合は *Tt*HSD のものと非常によく似ており、ニコチンアミド環と平行になるようなコンフォメーションをとっている。逆に、筆者の知る限りでは、Lys195 のように基質との水素結合がニコチンアミド環と垂直になるような NAD(P)⁺依存型酸化還元酵素は報告されていない。よって他の酵素における基質と酸塩基触媒残基の水素結合を考慮すると、Lys195 ではなく Lys99 が酸塩基触媒残基として働く可能性が高いことが考えられる。

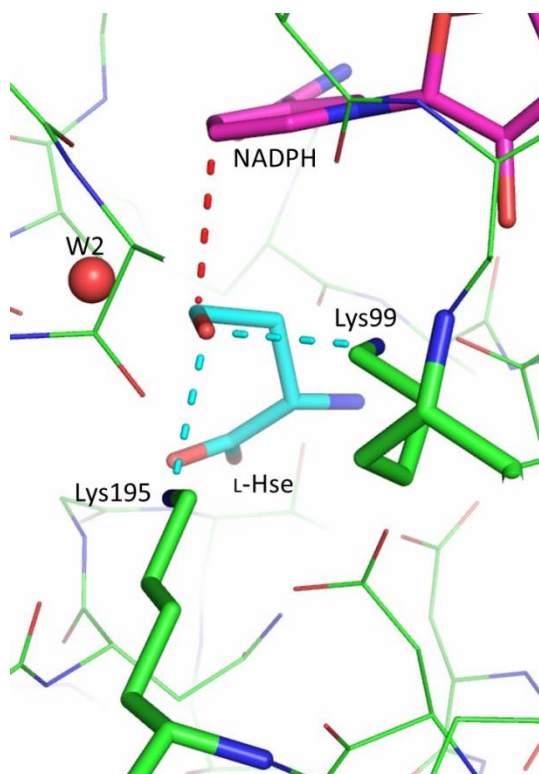


図 3.9 WT_L-Hse_NADPH 三元複合体における Lys99 と Lys195 の水素結合

L-Hse をシアンスティックモデル、NADPH をマゼンタスティックモデル、水分子を赤色の球で示す。シアンの破線で水素結合、赤色の破線で L-Hse の C γ 原子と NADPH の C4 原子間を示す。

また、活性中心とバルク領域を結ぶプロトンパスを考えると Lys99 が酸塩基触媒残基に適していることが理解できる。Lys99 は Lys195 と比べバルク領域と近い位置に存在しており、2 種類のプロトンパスが考えられる。1 つ目のプロトンパスは Lys99 の N ζ から直接 Glu180 のカルボキシ基へプロトンが輸送され、そこからバルク水へ渡っていくというルートである。もう一つのルートは Lys99 の N ζ から NAD(P)⁺ のニコチンアミドリボースのヒドロキシ基を介し、Glu180 のカルボキシ基へ輸送され、バルク水へ排出される。このように基質である NAD(P)⁺ のヒドロキシ基を介するプロトンパスは、アルコール脱水素酵素や短鎖型脱水素酵素でも提案されている^{48,49}。

S. aureus 由来 HSD に関する研究では、*Tt*HSD の Lys99 に相当する Lys 残基は *Tt*HSD の Asp191 に相当する Asp 残基の安定化と触媒反応中で生成物の解離を補助する可能性があることを示唆されている²²。*S. cerevisiae* 由来 HSD や *P. horikoshii* 由来 HSD の open 型の構造において、*Tt*HSD の Asp191 に相当する Asp 残基はバルク水と直接水素結合を形成し、バルクと活性中心間においてプロトンパスの役割を担うことができる。しかし、*Tt*HSD の closed 型の構造では、Asp191 は活性中心の奥深くに存在し、バルク水と相互作用はしていなかった。このため、少なくとも closed 型の構造において、Asp191 が直接プロトンパスに関与しているとは考えられない。よって、Lys195 がバルクとプロトンパスを形成しているとは考えにくい。

さらに、*S. tokodaii* 由来 HSD の closed 型構造において、L-Cys と NAD⁺ が共有結合を形成しているにもかかわらず、活性部位における水素結合ネットワークは *Tt*HSD と非常によく似ている。このため、*S. tokodaii* 由来 HSD は *Tt*HSD と同じプロトンパスや触媒反応メカニズムを持つことが予想される。また、*S. cerevisiae* 由来 HSD や *S. aureus* 由来 HSD は Lys99 に相当する Lys 残基を Ala に変異させると活性が失われることが報告されており^{15,22}、この Lys 残基は他の種由来の HSD において完全に保存されている。このため、他の HSD において水溶液中で closed 型となり、上記で提案した Lys99 を触媒残基とする反応機構を持つ可能性がある。

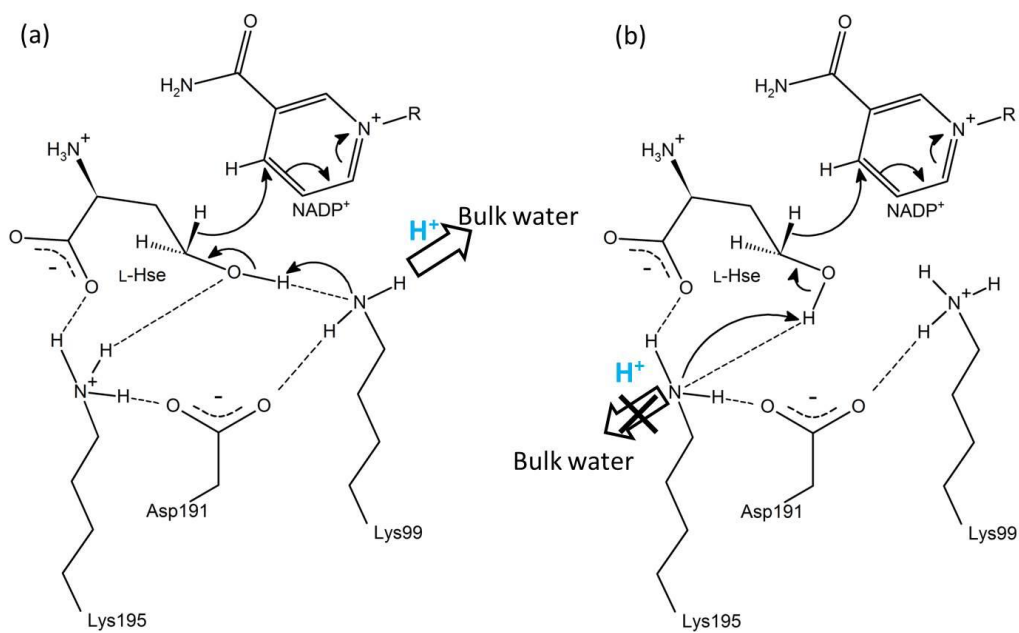


図 3.10 予想されるプロトンパス

(a) Lys99 が酸塩基触媒残基であると仮定した場合のプロトンパスを示す。L-Hse のヒドロキシ基から引き抜かれたプロトンは Lys99 から Glu180 の側鎖カルボキシ基、もしくは NADP⁺ のリボースのヒドロキシ基を介して、容易にバルク水へと輸送される。(b) Lys195 が酸塩基触媒残基であると仮定した場合、Lys195 は活性部位の内部深くに存在しているため容易にバルク水へと輸送できない。

4. まとめ

基質結合型 *Tt*HSD の結晶構造を 1.87~2.00 Å の分解能で決定した。この分解能は、現在報告されている基質結合型の HSD よりも高い分解能である。基質非結合型の結晶構造と基質結合型の結晶構造を比較すると、基質の結合によって活性部位が open 型から closed 型へと変化することがわかった。この構造変化は Glu180 と基質との水素結合が鍵となって引き起こされる。さらに、獲得した WT_L-Hse_NADPH の三元複合体結晶において、L-Hse と NADPH の距離はファンデルワールス距離と比べ、非常に近接しており、特に L-Hse の C γ とニコチンアミド環の C4 原子の距離は 3.3 Å であった。このように基質が近接していることは、活性部位の基質と補因子を不安定化されるが、ヒドリド転移には適した配向になる。つまり、反応の初期段階を不安定化し、逆に遷移状態を安定化している。このことにより、酵素中での反応速度を速くしていることが予想される。この機構が成り立つためには、基質と補因子の間に生じる不安定性よりも、酵素とミカエリス複合体をとることで、酵素と基質や補因子との間に生じる安定性の方が大きくなる必要がある。そして、決定した *Tt*HSD の closed 型三元複合体結晶構造により、酵素と基質や補因子がどのように水素結合を形成し、安定化しているかを明らかにすることができた。さらに、結晶構造の結果から、Lys99 と Lys195 が活性発現に必須の残基であることが示された。また、変異体の結晶構造から、Lys195 は触媒反応機構中で、L-Hse のヒドロキシ基を反応が進行しやすい位置に固定する役割があることがわかった。さらに、これらの Lys 残基のうち、プロトンパスの観点から、Lys99 がより酸塩基触媒残基にふさわしいことが示唆された。

第二部 セリンヒドロキシメチル基転移酵素の基質認識機構

1 背景

1.1 PLP 酵素

ピリドキサール 5'-リン酸 (pyridoxal 5'-phosphate; PLP) はビタミン B6 の活性型であり (図 1.1)、140 種以上存在する PLP 酵素は、PLP を補酵素としてアミノ基転移、脱炭酸、ラセミ化などさまざまな酵素反応を触媒することで、アミノ酸代謝、糖代謝、神経伝達物質代謝などに関与している⁵⁰。PLP 酵素において、PLP はほとんどの場合、特定の Lys 残基と Schiff 塩基を形成し、アルジミン (internal aldimine) の状態で存在している。ここに基質であるアミノ酸 (あるいはアミン) が入るとイミノ基交換反応が起こり、基質アミノ酸 (アミン) と Schiff 塩基を作り、PLP のアルジミン (external aldimine) が形成する。この Schiff 塩基のイミノ基は、ピリジン環と共役しており、そのため超共役を起こし、C α 周りの結合から電子がピリジン環へと引き寄せられる。これにより C α 周りの結合が活性化され、さまざまな酵素反応が進行していく⁵¹。PLP を補酵素として用いた時の反応は多くの場合、その反応途中にキノノイド中間体という反応中間体を含む。それぞれの酵素における触媒反応メカニズムの中で、キノノイド中間体は重要な役割を担い、また、470-510 nm 付近に特異的な吸収波長を持つという特徴がある⁵²。PLP はその反応過程で、キノノイド中間体以外にも、internal aldimine (415-425 nm)、gem-diamine (434 nm)、external aldimine (420-430 nm) と特異的な吸収極大波長を示すことが知られており、吸収スペクトル変化を指標としてその進行過程を追跡することが可能である^{52,53} (図 1.2)。

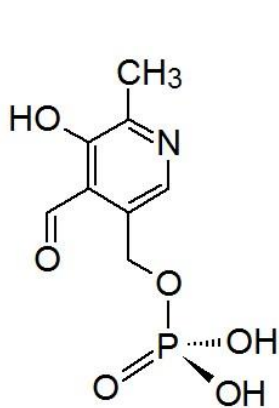


図 1.1 補酵素 PLP

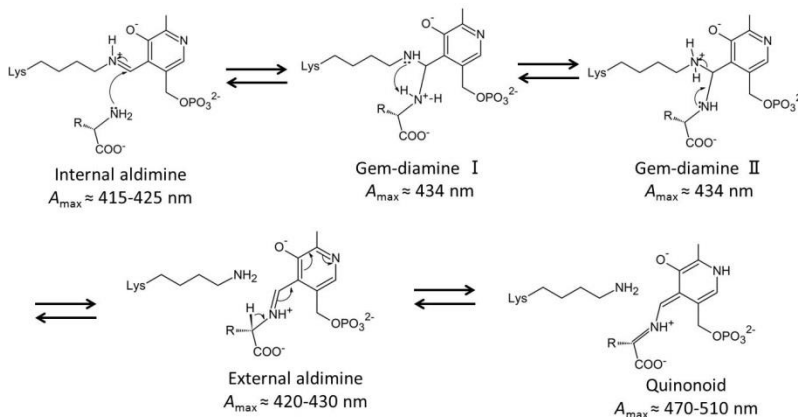


図 1.2 PLP の吸収極大波長の変化

1.2 セリンヒドロキシメチル基転移酵素 (serine hydroxymethyltransferase; SHMT)

セリンヒドロキシメチル基転移酵素 (SHMT、EC 番号：2.1.2.1) は PLP 酵素の一つで Fold type I に属し、L-セリン (L-Ser) とテトラヒドロ葉酸 (THF) を、グリシン (Gly) と 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸 (5,10-CH₂-THF) に変換する反応を、可逆的に触媒する^{54,55} (図 1.3)。この反応は L-Ser から THF に炭素基が 1 つ転移する反応であり、生体内における主要な炭素基転移反応の一つである。また、この反応により生産される 5,10-CH₂-THF は、DNA 合成に関わるプリン・チミジル酸、神経伝達物質に関わるコリン、そして必須アミノ酸であるメチオニンなどの生合成にとって重要な中間体である¹ (図 1.4)。

さらに、5,10-CH₂-THF が合成される反応は、生体内において様々な葉酸誘導体が合成される際の開始反応でもある¹。この代謝系では 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素によって 5,10-CH₂-THF が 5-メチルテトラヒドロ葉酸へ変換される。また、5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸脱水素酵素により、5,10-CH₂-THF は 5,10-メテニルテトラヒドロ葉酸に変換され、そして 5,10-メテニルテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼにより、10-ホルミルテトラヒドロ葉酸を生産する⁵⁶。これらの葉酸誘導体は、核酸やアミノ酸の生合成やビタミンの代謝において重要な物質である^{57,58}。

さらに、SHMT は抗マラリア剤のターゲットとしても研究されている。複数の SHMT 阻害剤は、熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* 由来 SHMT に対してナノモル単位の IC₅₀ (50%阻害濃度) 及び EC₅₀ (50%効果濃度) を示すことが報告されており、また、三日熱マラリア原虫 *Plasmodium vivax* において、2.3–2.6 Å の分解能で阻害剤複合体の結晶構造が決定されている^{59,60}。立体構造に立脚したドラッグデザインのためには、より高分解能での酵素基質複合体の獲得が必須である。触媒反応機構を解明し、さらに反応中間体が結合した立体構造が獲得できれば、より特異的なドラッグデザインも可能となる。

また、セリン/グリシン経路の活性化は、多くの癌の特徴であることが知られており⁶¹⁻⁶³、SHMT はその経路の中心に位置する。また、肺癌細胞中におけるチミジル酸合成には、SHMT の活性が必須であることが報告されている⁶⁴。このため、SHMT は癌における化学療法の標的となっており、ヒト由来 SHMT は 2.65 Å の分解能で基質非結合型の結晶構造が報告されている⁶⁵。また、抗癌剤として知られているペメトレキセドが SHMT の活性を阻害する⁶⁶、さらに、肺の癌細胞において siRNA を用いて SHMT 遺伝子の発現をノックダウン (抑制) すると細胞死をもたらすという知見がある⁶⁷。

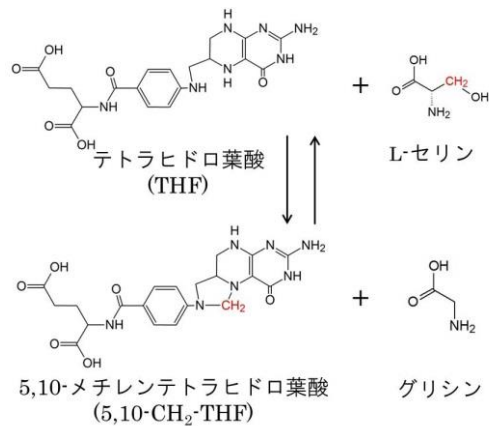


図 1.3 SHMT が触媒する反応

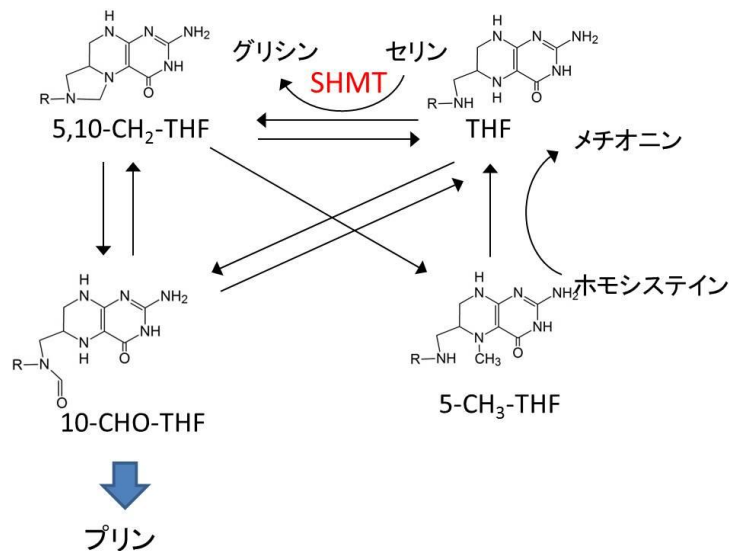


図 1.4 THF による代謝

THF: テトラヒドロ葉酸、5,10-CH₂-THF: 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸、10-CHO-THF: 10-ホルミルテトラヒドロ葉酸、5-CH₃-THF: 5-メチルテトラヒドロ葉酸

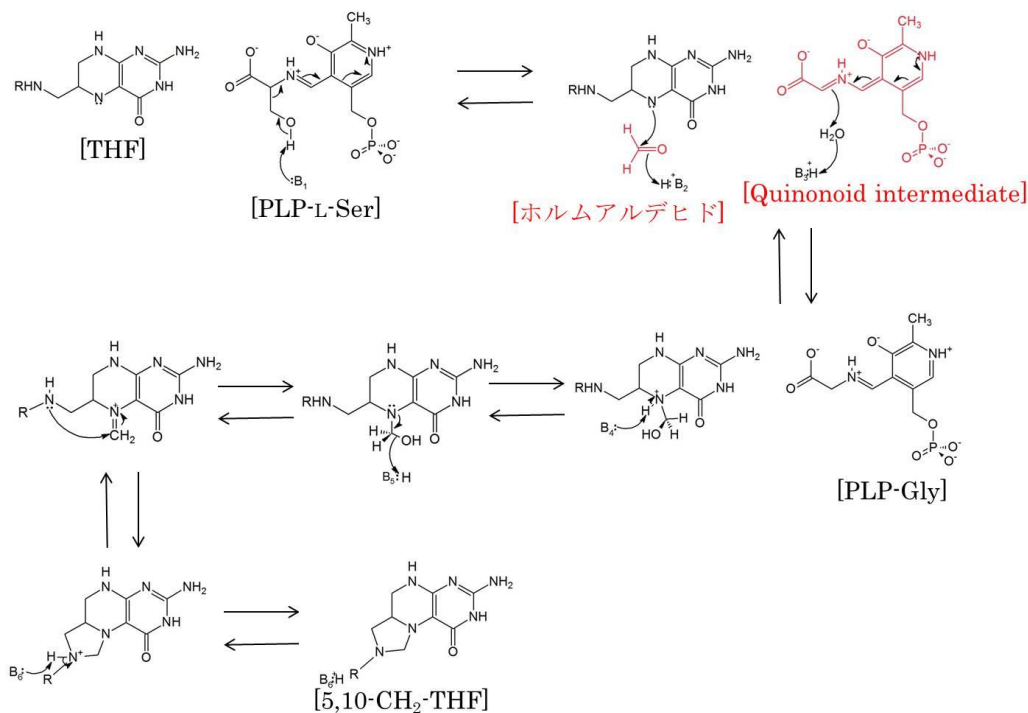
1.3 高度好熱菌由来セリンヒドロキシメチル基転移酵素 (*Ts*SHMT)

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来セリンヒドロキシメチル基転移酵素 (*Ts*SHMT) は、ホモダイマー構造であり、モノマーあたりのアミノ酸残基数は 407 残基、分子量は 44618 Da である。また、PDB には基質非結合型 *Ts*SHMT の結晶構造が 1.15 Å の分解能で登録されている (PDB ID: 2DKJ)。アミノ酸配列を比較すると、PDB に登録されているものの中では、*Bacillus stearothermophilus* 由来 SHMT が 68%

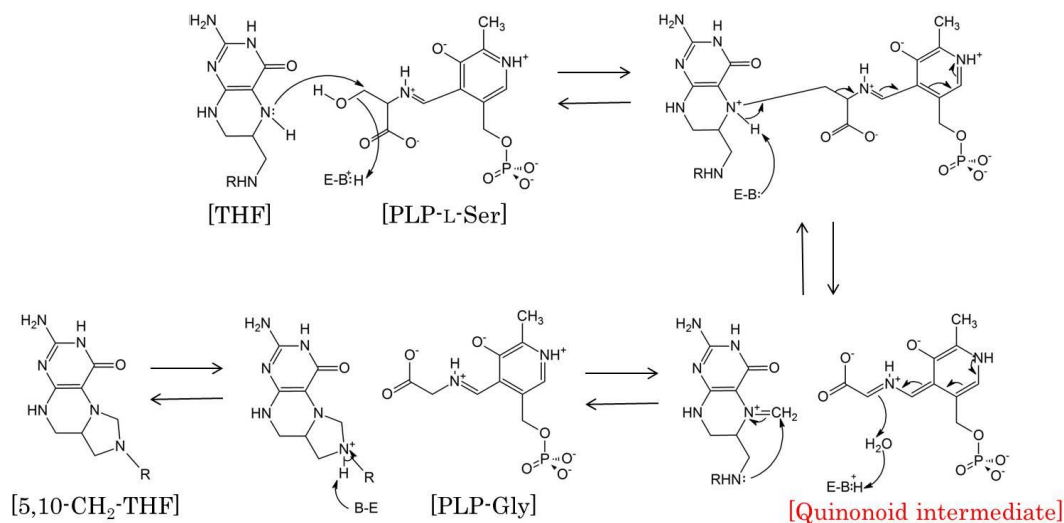
と高い相同性を示し、さらにヒト由来 SHMT も 44% と比較的高い相同性を示した。

THMT について基質アナログである 5-メチルテトラヒドロ葉酸と L-Ser や Gly との複合体構造が、本研究室の湯川、主馬野によって報告されている^{68,69}。また、SHMT の触媒反応機構は、Scheme 1.1 に示したレトロアルドール反応を介して反応が進行していくもの（レトロアルドールの反応機構）と、Scheme 1.2 に示した、THF の N5 原子が直接 L-Ser の C β を求核攻撃して反応が進行していく機構（直接置換の反応機構）が提案されている。このうち、ヒツジの肝臓由来 SHMT では、レトロアルドールの反応機構を支持し、変異体実験の結果から活性部位に存在する Glu74 は活性発現に必要なコンフォメーション変化に必須であり、Tyr82 はキノノイド中間体の安定化に間接的に寄与しているという知見がある⁷⁰。しかし、これまで反応中間体が結合した SHMT の結晶構造は報告されておらず、酸塩基触媒残基の決定にも至っていない。また、本来の基質である THF や 5,10-CH₂-THF が結合した構造は、本研究室を含め、未だ報告されていない。そこで、SHMT を含めた PLP 酵素における、PLP の補酵素としての機能の解明、さらには酸塩基触媒残基を含めた SHMT の触媒反応機構の詳細を解明することを目的として、時間分割的な X 線結晶構造解析を行い、反応中間体の獲得を試みた。

レトロアルドールの反応機構において、PLP がキノノイド中間体という比較的安定な中間体構造をとるとき、ホルムアルデヒドも反応中間体として存在する。このため、特にキノノイド中間体およびホルムアルデヒドが結合した結晶構造の獲得を目指した。この時、同時に結晶の吸収スペクトルを測定することで、構造情報の他に反応の進行過程を決定する根拠とした。



Scheme 1.1 レトロアルドール開裂の触媒反応機構



Scheme 1.2 直接置換の触媒反応機構

1.4 時間分割 X 線結晶構造解析

通常、X 線結晶構造解析では一枚の写真のような静的な構造情報しか獲得できない。しかしながら、酵素の触媒反応は連続して続いていくため、静的な構造情報だけでは酵素反応を完全に理解することは難しい。触媒反応の理解を深めるためには、動的な構造情報が必要となる。そこで、これまで多くの結晶構造学者たちが時間分割結晶構造解析を試みており、1990 年代後半から 2000 年代初頭にかけて白色ラウエ法を用いた時分割測定が着目された。白色ラウエ法では、ミリ秒のオーダーという非常に短い露光時間で測定が可能であり、このことからタンパク質結晶の時間分割 X 線結晶構造解析への応用が行われた。その一例として、トリプシン結晶において、pH ジャンプによって加水分解反応を開始させ、反応機構を追跡したという報告がある⁷¹。しかし、ラウエ法の技術的条件は厳しい。露光中、結晶は高い完全性と安定性を維持しなければならない。また、回折パターンは非常に高い分解能をもつ媒体に記録されなければならない、種々の次数の回折を分離することは困難であることが多い⁷²。

近年、X 線自由電子レーザー (X-ray Free Electron Laser; XFEL) を利用した X 線結晶構造解析が、目覚ましい発展を遂げている。XFEL は、波長が X 線領域の非常に高強度の光であり、タンパク質の結晶構造解析においては、シリアルフェムト秒 X 線結晶構造解析 (Serial Femtosecond Crystallography; SFX) などに使われている。XFEL はその強すぎる光のために、光が照射されると試料が即座に崩壊する。そのため、SFX では次々に新たな結晶を導入する方法で実験を行う。微結晶を溶液などに懸濁させ、インジェクターから連続的に XFEL 照射領域に結晶を送り、多数の異なる配向の微結晶

から回折データを得ることにより、構造解析を行っている⁷³ (図 1.5)。

光応答性のタンパク質に関して、ポンププローブ法を併用して時分割結晶構造解析を行っている例が存在する。ポンププローブ法とは、励起光 (ポンプ光) により物質を励起させ、それを測定光 (プローブ光) により測定する手法である。SFX と併用する場合には、プローブ光は XFEL となる。ポンププローブ法と SFX 法を併用した例として、光活動性黄色タンパク質 r 3 に可視光をポンプ光として照射し、時間経過後に XFEL を照射することで、X 線回折データを収集し、反応中間体の構造を取得した例がある⁷⁴。また、他にミオグロピンやロドプシンなどについても時分割実験に成功したという報告がある^{75,76}。ポンププローブ法と SFX 法を組み合わせたこの手法は、非常に画期的なものであるが、光を照射することで反応を開始させるという特性上、光励起性のタンパク質にしか適用できないという問題点がある。

さらに、SFX 法において、リボスイッチの結晶とリガンドをインジェクターにて瞬時に混合することで、リガンド結合型リボスイッチの結晶構造の獲得に成功したという報告がある⁷⁷。これは、上述したポンププローブ法とは異なる手法の、SFX 法を利用した時分割的な X 線結晶構造解析であり、単純に結晶とリガンドを瞬時に混合しているため、光励起性ではないタンパク質においても適用可能である。時分割測定を行うためには、結晶全体で遷移状態への変化を同期させる必要があるが、SFX 法を使用することにより、微結晶での X 線回折測定が可能となるため、リガンドが結晶内部へ浸透する時間が短くなり、結晶全体での反応状態を揃えることができる。

そこで筆者は SFX 法の利用を視野に入れた、時分割的な X 線結晶構造解析とその条件検討を行った。

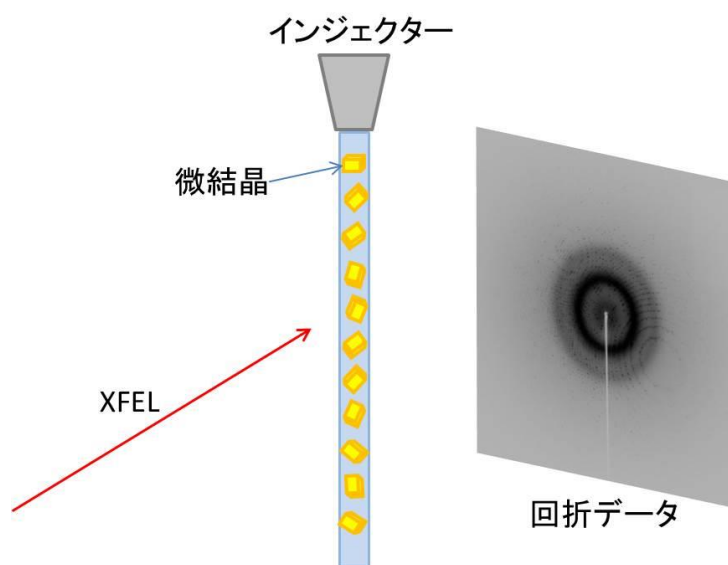


図 1.5 SFX の概念図

2 実験

2.1 *T. thermophilus* の培養・精製

2.1.1 形質転換・大量培養

理研 DNA バンクより入手した *T. thermophilus* HB8 SHMT 遺伝子(TTHA1524)を、pET-11a ベクター (Novagen 社) に組み込んだタンパク質過剰発現用プラスミドを用いて、大腸菌株 BL21(DE3)pLysS を形質転換した。形質転換体の複数コロニーを抗生物質アンピシリンおよびクロラムフェニコールを含む LB 寒天プレート上で選択し、液体培地中、37°Cにおいて前培養、本培養を行い、イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside ; IPTG) を用いてタンパク質発現を誘導し、さらに 37°C、3 時間の振盪培養ののち、遠心分離によって集菌した。

2.1.2 精製

凍結した菌体を解凍し、Buffer A を用いて溶解させた。この溶解液を、レベル 5、50% パルス、1/2 チップ (BRANSON SONIFIER 450) で 3 分間×3 回超音波破碎した。破碎後、湯浴 (70°C) で 10 分間熱処理を行い、13,000 rpm で 30 分間遠心した。

その後、サンプルを陰イオン交換カラムにかけた。陰イオン交換カラムは DEAE Toyopearlpack 650M (東ソー株式会社) を使用した。Buffer A で平衡化したカラムにサンプルを充填し、Buffer A と Buffer B で NaCl 濃度が 0~0.5 M の勾配を持つようにしてカラムに流し溶出させた。陰イオン交換カラムで精製したサンプルに濃度が 30% となるように硫酸アンモニウムを添加した。このときに溶液の pH が 7.4 となるように水酸化カリウムで調整しながら添加した。

その後、疎水性カラムによって精製した。疎水性カラムには Butyl Toyopearlpack 650M (東ソー株式会社) を使用した。Buffer C で平衡化したカラムにサンプルを充填し、次に Buffer C と Buffer D で硫酸アンモニウム濃度の勾配が 30~0% となるようにして溶出させた。

ヒドロキシアパタイトカラムで精製する前に、脱塩カラムによってサンプル中に含まれる硫酸アンモニウムを除去した。脱塩カラムは HiPrep 26/10 Desalting (GE Healthcare) を用いた。Buffer には Buffer E を使用した。

その後、ヒドロキシアパタイトカラムによって精製した。ヒドロキシアパタイトアラムとして CHT10- I (Bio-Rad) を使用した。Buffer E で平衡化したカラムにサンプルを充填し、次に Buffer E と Buffer F でリン酸ナトリウムの濃度勾配が 10~200 mM となるようにして溶出させた。

そして、カラム HiPrep 26/10 Desalting を使用してサンプルの溶媒交換を行った。Buffer には Buffer G を使用した。

最後に限外濾過膜を用いてサンプルの濃度が 20 mg/mL となるように濃縮し、最終精製サンプルとした。

使用試薬

- Buffer A 20 mM リン酸カリウム(pH 7.4)、0.1 mM EDTA、20 μ M PLP
Buffer B 20 mM リン酸カリウム(pH 7.4)、0.1 mM EDTA、20 μ M PLP、0.5 M NaCl
Buffer C 20 mM リン酸カリウム(pH 7.4)、0.1 mM EDTA、30% 硫酸アンモニウム
Buffer D 20 mM リン酸カリウム(pH 7.4)、0.1 mM EDTA
Buffer E 10 mM リン酸ナトリウム(pH 7.0)
Buffer F 200 mM リン酸ナトリウム(pH 7.0)
Buffer G 20 mM Tris-HCl(pH 8.0)、150 mM NaCl

2.2 *T*%SHMT の溶液状態での吸収スペクトルの測定

1.1 節で示したように SHMT のような PLP 酵素は、その反応過程に多くの反応中間体を持ち、またそれらは特異的な吸収極大波長を持つことが知られている。今回、結晶の吸収スペクトルを測定することで、反応の進行状態を推測した。そして、結晶での吸収スペクトルと比較するために、溶液条件でも吸収スペクトルを測定した (Shimadzu UV-2600)。測定は次の条件について行った。

- A. 0.2 mg/mL *T*%SHMT (2.8 M ギ酸ナトリウム、50 mM CAPS(pH 10.0))
B. A に対して L-Ser を 20 mM になるように添加
C. B に対して THF を 250 μ M になるように添加
D. 0.2 mg/mL *T*%SHMT (2.8 M ギ酸ナトリウム、50 mM CAPS(pH 10.0)) に対して Gly を 20 mM になるように添加
E. D に対して THF を 250 μ M になるように添加

2.3 *Tt*SHMT の結晶化

2.3.1 ハンギングドロップ蒸気拡散法

ハンギングドロップ蒸気拡散法の詳細な説明は、第一部 2.3 節に述べているため省略する。

タンパク質溶液には 20 mg/mL *Tt*SHMT、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、沈殿剤溶液には 0.6 M 硫酸リチウム、0.1 M クエン酸ナトリウム (pH 5.6)、0.6 M 硫酸アンモニウム、20 μ M PLP を使用した。タンパク質溶液と沈殿剤溶液を 3 μ L : 3 μ L の割合で混合することで、図 2.2 に示すような結晶を獲得した。

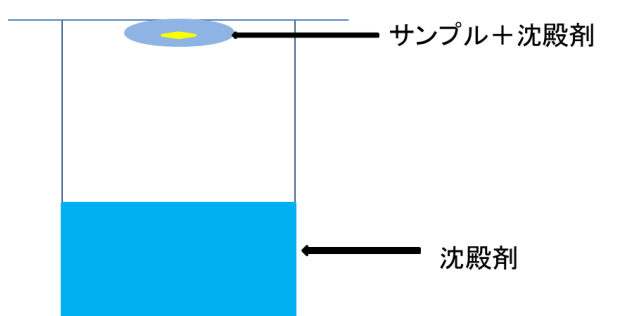


図 2.1 ハンギングドロップ蒸気拡散法

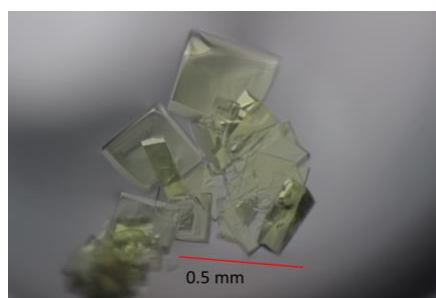


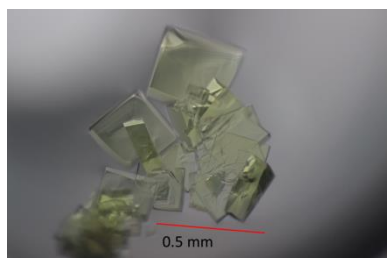
図 2.2 *Tt*SHMT の結晶

2.3.2 マイクロシーディング

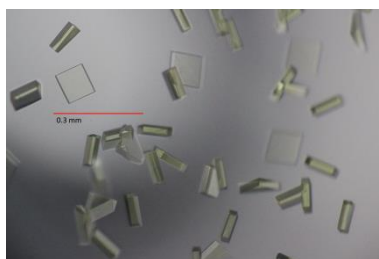
マイクロシーディング法はクラスター結晶しか得られない場合や、結晶化しにくいサンプルに対して有効な手段である。通常の結晶化では、核形成は自然に起こるのに対し、マイクロシーディング法では、あらかじめ結晶核を与えることで、良質な結晶形成を促すことができる。*Tt*SHMT の結晶化では図 2.2 に示すような結晶を獲得することができた。しかし、クラスター化しており、さらにはかなり結晶が厚いことが問題である。時間分割の測定において、ソーキングを開始する際に、基質が結晶に浸透する時間は可能な限り速い方が好ましい。酵素の反応速度が、基質の結晶への浸透速度と比べ、それほど変わらない場合、結晶が厚すぎると結晶表面と結晶内部での酵素の反応開始時間がずれてしまい、時分割解析が難しくなる。つまり、結晶全体の反応過程を揃えるためには、厚い結晶よりも、薄い結晶の方が適している。

*Tt*SHMT の結晶を 100 μ L の結晶化溶液に入れ、結晶をすりつぶし、均一の溶液になるまで攪拌した。この溶液をストック溶液として、希釈したシーディング溶液を調製した。このシーディング溶液、*Tt*SHMT のタンパク質溶液と沈殿剤溶液を 1 μ L : 3 μ L : 3 μ L の割合で混合し、ハンギングドロップ蒸気拡散法による結晶化を行った。図 2.3 にマイクロシーディングを行った際の一例を挙げる。この結果では、10000 倍に希釈したシーディング溶液を使用した場合が、最も大きな単結晶を得ることができた。しかし、

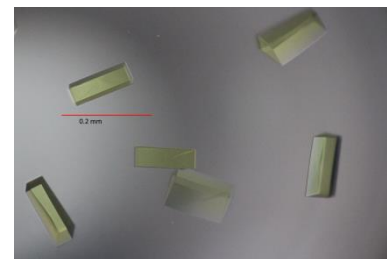
前述したように、結晶が薄い方が実験に適しているため、100 倍程度の希釈率で析出した大きさの結晶を使用した。



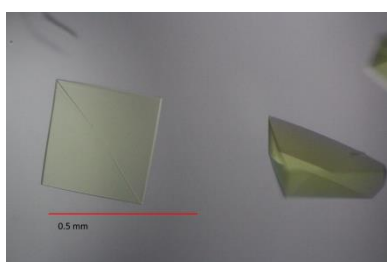
(a) 種結晶



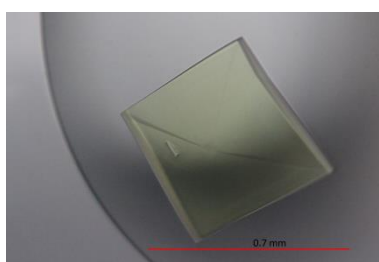
(b) 希釈率 10 倍



(c) 希釈率 100 倍



(d) 希釈率 1000 倍



(e) 希釈率 10000 倍

図 2.3 *TlSHMT* 結晶におけるマイクロシーディングの効果

2.4 *Tt*SHMT 結晶の X 線結晶構造解析

2.4.1 比較対照とする結晶構造の解析

時間分割的な X 線結晶構造解析を行う際に、比較対照とする 3 種類の結晶構造を決定した。基質結合型、THF 結合型、Gly と THF アナログである 5-ホルミルテトラヒドロ葉酸 (5-CHO-THF) 結合型の 3 種類である。

基質非結合型の構造は、時分割的な構造と比較するために必須の構造である。*Tt*SHMT の結晶構造では、活性中心の L-Ser 結合部位に沈殿剤として使用している硫酸イオンが強く結合してしまい、L-Ser をソーキングによって結合させても、硫酸イオンが抜けず、L-Ser が完全には結合しないことがあることが問題となっていた。さらに、硫酸イオンの硫黄原子に由来する、高い電子密度とその形状から、時間分割的な X 線結晶構造解析を行う上で、これの混在は、反応中間体の分離を非常に困難にすることが予想された。そのため、沈殿剤溶液から硫酸リチウムと硫酸アンモニウムを除去し、代わりに 2.8 M 酢酸ナトリウム、もしくは 2.8 M ギ酸ナトリウムを加えた溶液に、*Tt*SHMT 結晶を 30 分間ソーキングすることで、L-Ser 結合部位から硫酸イオンの解離を促した。この結晶を高輝度光科学センター SPring-8 BL26B1 にて測定を行い、1.22 Å の分解能で構造を決定した。

E. coli や *B. stearothermophilus* 由来の SHMT について、5-ホルミルテトラヒドロ葉酸を基質アナログとして使用した、5-ホルミルテトラ葉酸結合型 SHMT の結晶構造が報告されているが^{78,79}、本来の基質である THF や、生成物である 5,10-CH₂-THF が結合した結晶構造は未だ報告されておらず、PDB にも登録されていない。そこで、時分割的な結晶構造解析を行う上での参照構造として利用する意味でも、THF 結合型の *Tt*SHMT 結晶の獲得を目指した。0.05 M CAPS (pH 10.0)、20 μM PLP、2.8 M ギ酸ナトリウムの溶液に、30 mM となるように THF を溶かしたものをソーキング溶液として使用し、4°C の条件下で 3 時間ソーキングを行った。調製した結晶を高輝度光科学研究センター SPring-8 BL26B2 にて測定を行い、1.02 Å の分解能で構造を決定した。図 2.4 に回折斑点を示す。

Gly_5-CHO-THF 結合型の実験条件を示す。ソーキング溶液として、Gly と 5-CHO-THF をそれぞれ 500 mM と 30 mM となるように、0.1 M Tris-HCl (pH 9.0)、20 μM PLP、2.8 M ギ酸ナトリウムを含む溶液に溶かした。20°C のインキュベーター内で 4 時間 30 分ソーキングを行った。調製した結晶を高輝度光科学センター SPring-8 BL26B1 にて測定を行い、1.17 Å の分解能で構造を決定した。

2.4.2 時間分割的 X 線結晶構造解析

SHMT の正反応における至適 pH は 7~8 の中性付近であることが報告されている⁸⁰⁻⁸²。このため、時間分割的な X 線結晶構造解析を行う際に、pH を反応のトリガーとすることを考えた。具体的には、*Tt*SHMT 結晶に、THF と L-Ser を同時にソーキング法によって加える。この際に、緩衝液の pH が至適よりも酸性、もしくは塩基性のものを用いることにより、活性部位に存在する酸触媒、もしくは塩基触媒残基のプロトン化状態を変化させることで、結晶内で反応を停止させ、酵素-基質複合体の獲得を目指した。そして、その反応が停止した酵素-基質複合体の結晶を、至適 pH に近づけた条件でソーキングすることにより、反応が開始される。すなわち、至適 pH に近づけた時点をも 0 秒として、そこから一定時間（数秒～）経過後に結晶を凍結させ、反応を停止させることで時間分割的な X 線結晶構造解析が可能となる。

この方法で時間分割的な X 線結晶構造解析を行うためには、まず、結晶構造中で反応が進行せずに止まった状態となるような pH を探し出すことが必要となる。このため、結晶化条件の pH である 5.6 をはじめ、5.0、11.0、10.0 の計 4 種類の条件下において、THF と L-Ser を結合させた *Tt*SHMT の結晶構造解析を行った。

pH 5.6 での実験条件を示す。ソーキング溶液として、L-Ser と THF をそれぞれ 500 mM と 30 mM となるように、0.1 M クエン酸ナトリウム (pH 5.6)、20 μ M PLP、2.8 M 酢酸ナトリウムを含む溶液に溶かした。20°C のインキュベーター内で 5 時間ソーキングを行った。調製した結晶を高輝度光科学センター SPring-8 BL26B1 にて測定を行い、1.13 Å の分解能で構造を決定した。

pH 5.0 での実験条件を示す。ソーキング溶液として、L-Ser と THF をそれぞれ 500 mM と 30 mM となるように、0.1 M クエン酸ナトリウム (pH 5.0)、20 μ M PLP、2.8 M ギ酸ナトリウムを含む溶液に溶かした。20°C のインキュベーター内で 3 時間ソーキングを行った。調製した結晶を高輝度光科学センター SPring-8 BL26B2 にて測定を行い、1.05 Å の分解能で構造を決定した。

pH 11.0 での実験条件を示す。ソーキング溶液として、L-Ser と THF をそれぞれ 500 mM と 30 mM となるように、0.05 M CAPS (pH 11.0)、20 μ M PLP、2.8 M ギ酸ナトリウムを含む溶液に溶かした。20°C のインキュベーター内で 3 時間ソーキングを行った。調製した結晶を高輝度光科学センター SPring-8 BL26B2 にて測定を行い、1.10 Å の分解能で構造を決定した。

pH 10.0 での実験条件を示す。ソーキング溶液として、L-Ser と THF をそれぞれ 500 mM と 30 mM となるように、50 mM CAPS (pH 10.0)、20 μ M PLP、2.8 M ギ酸ナトリウムを含む溶液に溶かした。20°C のインキュベーター内で 4 時間ソーキングを行った。調製した結晶を実験室系の Rigaku FR-X にて測定を行い、1.45 Å の分解能で構造を決定した。

2.4.3 X 線回折測定と構造精密化

*Tt*SHMT 結晶の抗凍結置換処理には、0.1 M クエン酸ナトリウム (pH 5.6)、20 μ M PLP、2.8 M 酢酸ナトリウム (もしくは 2.8 M ギ酸ナトリウム) とグリセリールを 2 : 1 の割合で混合したものを用いた。また、データの処理は *HKL2000*³³ もしくは *XDS*⁸³ で行った。初期位相の決定には分子置換法を用い、*CCP4 Program Suite*²³ に含まれるプログラム *MOLREP*²⁴ を使用した。初期位相を決定するためのサーチ分子は当研究室で決定された、*Tt*SHMT_L-Ser_5-メチルテトラヒドロ葉酸の結晶構造を用いた⁶⁸。そして、*CCP4 Program Suite*²³ に含まれるプログラム *REFMAC5*²⁵ を用いた精密化、プログラム *Coot*²⁶ を用いたモデルの修正を繰り返すことで、構造の精密化を行った。表 2.1 に回折データ収集結果と解析結果を示す。

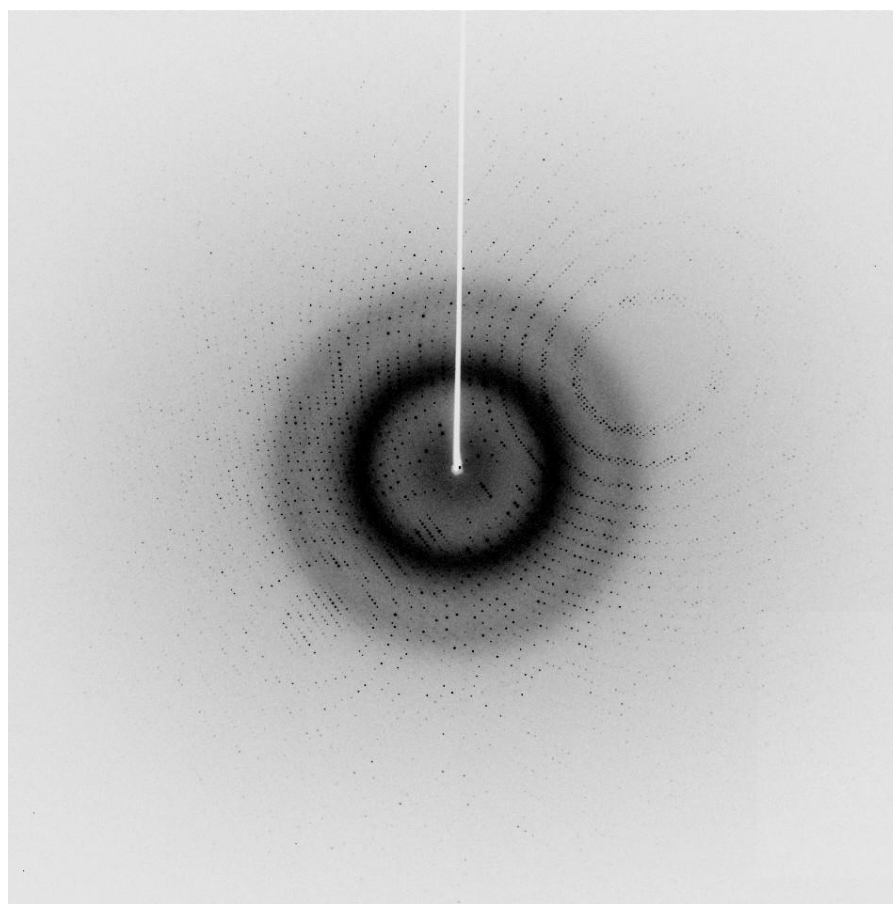


図 2.4 SPring-8 で得られた回折斑点 (THF 結合型)

表 2.1 X 線回折データ収集結果及び解析結果

	基質非結合	THF結合 pH 10.0	FFO、Gly結合 pH 9.0
Data collection			
Beamline	SPring-8 BL26B1	SPring-8 BL26B2	SPring-8 BL26B2
Wavelength(Å)	0.9	0.9	0.9
Space group	$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$
Unit cell parameters			
a (Å)	57.9	58.1	57.9
b (Å)	82.6	83.0	83.3
c (Å)	93.8	94.0	93.5
β (°)	91.7	91.3	91.5
Resolution range(Å)	50.0-1.22 (1.24-1.22)	50-1.02 (1.08-1.02)	50-1.17 (1.24-1.17)
Total No. of reflections	962334	1829096	1118447
No. of unique reflections	259070	447232	296788
Multiplicity	3.7(2.9)	4.1(3.8)	3.8(3.7)
Completeness(%)	98.9(96.6)	99.1(95.6)	99.8(99.5)
R_{merge} (%)	6.1(31.0)	5.8(41.0)	16(43.1)
$I/\sigma(I)$	23(2.1)	13(3.0)	5.2(2.3)
Refinement			
Resolution range(Å)	50-1.22	50-1.02	50-1.17
R (%)	10.9	10.3	11.7
R_{free} (%)	13.3	11.7	14.1
No. of atoms	7146	7564	7387
No. of water molecules	710	980	845
No. of ligands	Na ⁺ ion, 5 PLP, 2 acetate, 4 glycerol, 2	Na ⁺ ion, 4 PLP, 2 THF, 1 formate, 3 glycerol, 2 CAPS, 1	Na ⁺ ion, 4 PLP, 1 PLP_Gly, 1 Gly, 1 5F-THF, 2 glycerol, 1
B-factor(Å²)			
Protein	14.6	9.2	11.7
Na ⁺ ion	22.6	15.4	22.5
Water	27.2	22.5	26.3
PLP	10.6	5.3	9.6
Ser	-	-	-
Gly	-	-	9.1
PLP_Ser	-	-	-
PLP_Gly	-	-	10.0
THF	-	9.3	-
5F-THF	-	-	12.8
5,10M-THF	-	-	-
formaldehyde	-	-	-
formate	-	10.4	-
acetate	21.0	-	-
CAPS	-	10.3	-
glycerol	23.3	16.0	25.3
R.m.s.d.			
Bond lengths(Å)	0.029	0.026	0.028
Bond angles(°)	2.4	2.2	2.3
Ramachandran plot			
Preferred regions(%)	97.25	96.76	96.62
Allowed regions(%)	2.2	2.68	2.84
Outliers(%)	0.55	0.56	0.54

	pH変化			
	THF, Ser結合 pH 5.6	THF, Ser結合 pH 5.0	THF, Ser結合 pH 11.0	THF, Ser結合 pH 10.0
Data collection				
Beamline	SPring-8 BL26B1	SPring-8 BL26B1	SPring-8 BL26B1	Rigaku FR-X
Wavelength(Å)	0.9	0.9	0.9	1.542
Space group	<i>P</i> ₂ ₁	<i>P</i> ₂ ₁	<i>P</i> ₂ ₁	<i>P</i> ₂ ₁
Unit cell parameters				
<i>a</i> (Å)	57.9	57.8	58.0	58.0
<i>b</i> (Å)	82.7	82.3	83.2	83.1
<i>c</i> (Å)	93.7	94.0	93.7	93.2
β (°)	91.6	91.6	91.6	91.5
Resolution range(Å)	50.0-1.13 (1.15-1.13)	50.0-1.05 (1.11-1.05)	50.0-1.10 (1.17-1.10)	50.0-1.45 (1.48-1.45)
Total No. of reflections	2081505	1519185	1378609	1092549
No. of unique reflections	324454	405997	358589	156108
Multiplicity	6.4(6.6)	3.7(3.2)	3.8(3.9)	7.0(6.5)
Completeness(%)	98.8(97.7)	99.4(98.0)	99.7(99.7)	100(100)
<i>R</i> _{merge} (%)	6.4(58.2)	6.1(39.3)	5.4(46.0)	5.4(40.0)
<i>I</i> σ (<i>I</i>)	21(2.2)	11(2.5)	13(2.8)	75(13)
Refinement				
Resolution range(Å)	50-1.13	50-1.05	50-1.10	50.0-1.45
<i>R</i> (%)	10.6	10.6	11.1	14.9
<i>R</i> _{free} (%)	12.5	12.1	12.9	17.2
No. of atoms	7334	7501	7269	7232
No. of water molecules	778	862	816	801
No. of ligands	Na ⁺ ion, 4 PLP, 1 PLP_Ser, 1 PLP_Gly, 1 Ser, 1 THF, 1 5,10M-THF, 1 acetate, 2 glycerol, 2	Na ⁺ ion, 3 PLP, 2 PLP_Ser, 1 PLP_Gly, 1 Ser, 1 THF, 1 5,10M-THF, 1 formate, 3 glycerol, 1	Na ⁺ ion, 4 PLP, 1 PLP_Ser, 1 Ser, 1 glycerol, 1	Na ⁺ ion, 3 PLP, 1 PLP_Gly, 1 Ser, 1 THF, 1 5,10M-THF, 1 formaldehyde, 1 formate, 3 CAPS, 1
<i>B</i>-factor(Å²)				
Protein	11.5	11.9	12.0	16.2
Na ⁺ ion	22.0	23.2	22.4	29.9
Water	24.9	26.2	25.8	29.2
PLP	9.4	8.4	10.7	18.6
Ser	15.0	14.8	12.7	29.0
Gly	-	-	-	-
PLP_Ser	7.4	6.8	7.9	-
PLP_Gly	18.6	9.9	-	14.7
THF	22.3	20.5	-	27.5
5F-THF	-	-	-	-
5,10M-THF	12.8	11.5	-	17.3
formaldehyde	-	-	-	15.4
formate	-	18.1	-	24.4
acetate	23.8	-	-	-
CAPS	-	-	-	26.4
glycerol	21.6	29.3	19.7	-
R.m.s.d.				
Bond lengths(Å)	0.025	0.027	0.027	0.027
Bond angles(°)	2.2	2.4	2.3	2.6
Ramachandran plot				
Preferred regions(%)	97.1	97.46	96.96	96.92
Allowed regions(%)	2.19	2.11	2.35	2.41
Outliers(%)	0.68	0.42	0.69	0.67

5F-THF : 5-ホルミルテトラヒドロ葉酸、5,10M-THF : 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸

2.5 *T*SHMT 結晶の顕微分光測定

*T*SHMT 結晶は高輝度光科学センターSPring-8にて、X線回折測定後に顕微分光測定を行った。光源は白色光源、分光器は iHR-320 (HORIBA) を使用した。この測定においても、X線回折測定時と同様に、結晶からの溶媒蒸発を防ぐため、窒素気流中で行った。

3 結果・考察

3.1 *Tt*SHMT の溶液状態での吸収スペクトル

3.1.1 *Tt*SHMT に L-Ser と THF を加えた場合の吸収スペクトル

*Tt*SHMT に L-Ser と THF を加えた時の吸収スペクトルを図 3.1 に示す。*Tt*SHMT のみの条件、それに L-Ser を加えた条件、さらにそれに THF を加えた条件を示す。*Tt*SHMT のみの条件では、430 nm に internal aldimine のピークが確認された。また、これと L-Ser を加えた吸収スペクトルを比較したところ、internal aldimine が external aldimine へと変化していることが予想されるが、430 nm のピーク的位置に変化はなかった。このことから、*Tt*SHMT において、internal aldimine と external aldimine は同じ位置に吸収極大波長を示し、同じモル吸光係数を持つことが予想される。しかし、L-Ser が水溶液中で *Tt*SHMT と結合しない、すなわち external aldimine を形成せずに internal aldimine のままで存在する可能性も否定できない。そのため、基質結合型結晶を決定し、L-Ser が *Tt*SHMT に結合するのかを構造化学的に証明する必要が出てきた。また、*Tt*SHMT に L-Ser と THF を加えた条件と、L-Ser のみを加えた条件を比較したところ、430 nm の吸収に大きな変化はなかったが、350 nm よりも短波長側に大きな吸収が確認できた。これは THF に由来する吸収極大である。

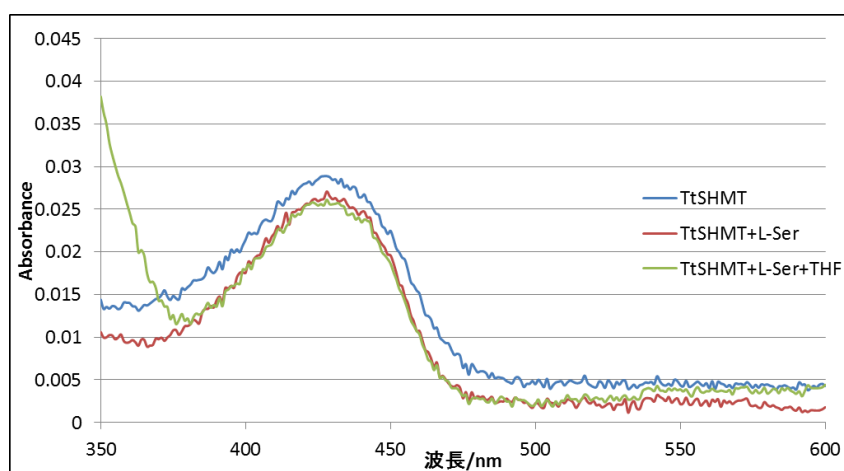


図 3.1 *Tt*SHMT に L-Ser と THF を加えた時の吸収スペクトル

青：0.2 mg/mL *Tt*SHMT (2.8 M ギ酸ナトリウム、50 mM CAPS(pH 10.0))

赤：青色で示したものに対して L-Ser を 20 mM になるように添加したもの

緑：赤色で示したものに対して THF を 250 μ M になるように添加したもの

3.1.2 TtSHMT に Gly と THF を加えた場合の吸収スペクトル

TtSHMT に Gly と THF を加えた場合の吸収スペクトルを図 3.2 に示す。TtSHMT に Gly を加えた場合、430 nm に external aldimine の吸収が確認されたが、496 nm にキノノイド中間体の吸収が確認された。このことから、Gly が結合して PLP とシッフ塩基結合を形成する場合、一部はキノノイド中間体で存在することが確認された。さらに、これに THF を加えた場合、430 nm の吸収は確認されなくなったが、492 nm にキノノイド中間体の吸収が確認された。ウサギ由来の SHMT についても溶液条件下において同様の実験が行われているが、SHMT に Gly と THF を加えると TtSHMT と同じく、498 nm にキノノイド中間体の吸収が確認されることが報告されている⁸⁴。

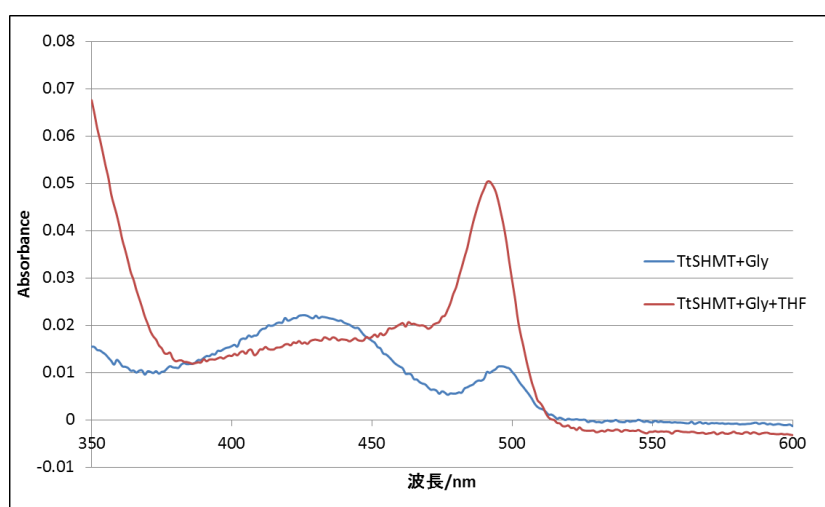


図 3.2 TtSHMT に Gly と THF を加えた場合の吸収スペクトル

赤: 0.2 mg/mL TtSHMT (2.8 M ギ酸ナトリウム、50 mM CAPS (pH 10.0)) に対して Gly を 20 mM になるように添加したもの

青: 赤色で示したものに対して THF を 250 μ M になるように添加したもの

3.2 基質非結合型 *Tt*SHMT

3.2.1 基質非結合型 *Tt*SHMT 結晶の全体構造

*Tt*SHMT はホモダイマー構造であり、非対称単位中にダイマーを形成する 2 つの同一のサブユニットが存在していた。また、そのサブユニットは、N 末端ドメイン (6-64)、PLP 結合ドメイン (65-274)、C 末端ドメイン (275-407) の 3 つに分かれる。活性部位は 2 つのモノマーの境界に存在しており、補酵素である PLP は両方のサブユニットと相互作用をしていた (図 3.3)。

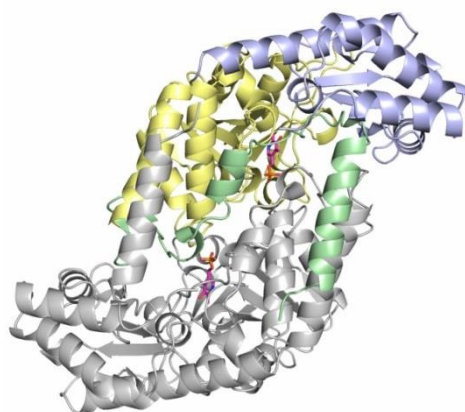


図 3.3 基質非結合型 *Tt*SHMT の全体構造

サブユニット B は灰色で示す。N 末端ドメインは緑色、PLP 結合ドメインを黄色、C 末端ドメインは青色で示す。PLP はマゼンタのスティックモデルで示す。

3.2.2 基質非結合型 *Tt*SHMT 結晶の吸収スペクトル

X 線回折データ収集後、基質非結合型 *Tt*SHMT 結晶の吸収スペクトルを測定した。その結果を図 3.4 に示す。結晶が厚すぎたため、測定光が十分結晶を透過できず、バックグラウンドの上昇がみられ、またノイズも大きかった。430 nm に吸収が確認されたが、これは Lys226 と PLP が Schiff 塩基を形成して internal aldimine の状態で存在していることを示し、図 3.1 で示した溶液状態での吸収スペクトルとよく似ていた。

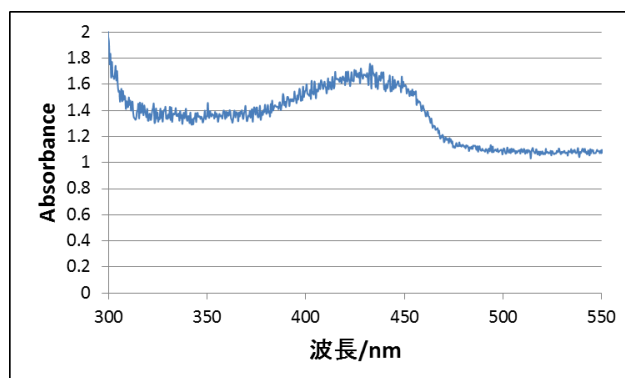


図 3.4 基質非結合型 *Tt*SHMT 結晶の吸収スペクトル

3.2.3 サブユニット A とサブユニット B の構造の違い

*Tt*SHMT のダイマーを形成する 2 つのサブユニット (サブユニット A、サブユニット B) を用いて、Ca 原子について重ね合わせを行ったところ、r.m.s.d. は 0.66 \AA となり、Pro320 では 3.1 \AA もの差があった。サブユニット A とサブユニット B では、N 末端ドメインにずれが生じ、サブユニット B はサブユニット A よりも活性部位を閉じる方向へ動いていた (図 3.5)。また、サブユニット B ではずれが生じている箇所は電子密度に乱れが見られ、主鎖の B-factor が 40 \AA^2 以上と高くなっている箇所もあり、高い柔軟性が存在することを示した。それに対しサブユニット A ではそのような電子密度の乱れは観察されず、主鎖の B-factor も 10 \AA^2 程度となっていた。このように、2 つのサブユニット間で構造に変化が見られたのは、クリスタルパッキングが原因であると予想される。サブユニット A では単位胞に存在する別の *Tt*SHMT 分子と Arg319 や Pro320 を中心として、直接、あるいは水を介して間接的に、多くの水素結合を形成していた。これによって、サブユニット A は、サブユニット B よりも活性部位を開く方向へ固定され、逆にサブユニット B は固定されていないため、高い柔軟性を示すのだと考えられる。

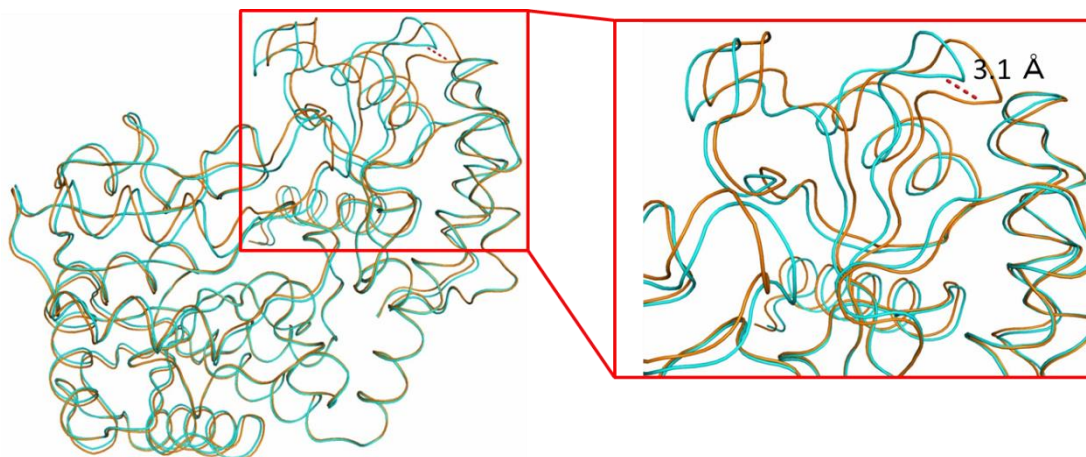


図 3.5 サブユニット A とサブユニット B の重ね合わせ

サブユニット A を緑色、サブユニット B をシアンで示す。また、Pro320 の Ca 間の距離を赤色の破線で示す。

3.2.4 PLP の認識機構

活性部位において、PLP は Lys226 と Schiff 塩基を形成し、internal aldimine の状態で存在していた。この構造において、PLP のピリジン環部分は、明らかに平面から崩れ歪んでいた (図 3.6)。この歪みは Lys226 との Schiff 塩基結合や、周囲のアミノ酸との相互作用が原因であることが予想され、獲得した internal aldimine の全てで確認できた。PLP 酵素に関して、ピリジン環がこのような歪むという報告はなく、1.22 Å という高分解能で構造決定に成功したために、明らかになったことだと考えられる。

補酵素 PLP は多くの残基によって認識されていた (図 3.7)。特に PLP のリン酸基は、直接的には Gly94、Ser95、Gly258 の主鎖の窒素原子、Tyr51 の側鎖ヒドロキシ基、Ser95 の側鎖ヒドロキシ基、また水分子 W1 を介して Gly258 の主鎖の酸素原子、Arg232 の側鎖グアニジニウム基と、W2 を介して Gly257 の主鎖の窒素原子、Gly258 の主鎖の酸素原子、His92 の側鎖イミダゾール基と、さらに W3 を介して Glu53 の側鎖カルボキシ基、His122 の側鎖イミダゾール基と水素結合を形成していた。また、PLP の O3 原子は Ser172 の側鎖ヒドロキシ基や、PLP と Schiff 塩基結合を形成している Lys226 の側鎖のアミノ基と水素結合を形成していた。そして、PLP のピリジン環の N1 原子は Asp197 の側鎖カルボキシ基と水素結合を形成していた。これは Fold type I の PLP 酵素に共通する特徴である⁵¹。

また L-Ser 結合部位では、硫酸イオンが解離していたが、代わりに酢酸イオンが結合していた。依然として L-Ser 結合部位に触媒反応に関与しない分子が結合したままであるが、酢酸イオンは硫酸イオンよりも電子数が少ないため、電子密度マップの強度が小さく、多少酢酸イオンが混在していたとしても、反応中間体を分離可能であることが期待できた。

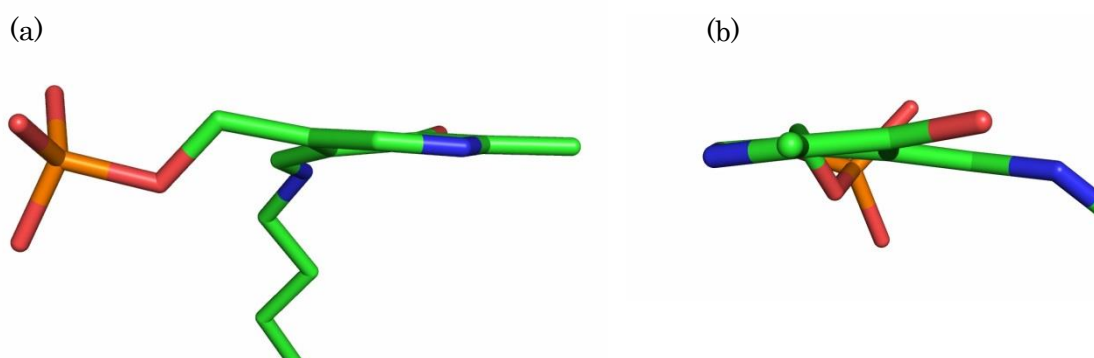


図 3.6 internal aldimine 構造で確認された PLP の歪み

(a) PLP のピリジン環平面を側面から見た図。(b) PLP をピリジン環の C2-C5 軸から見た図。

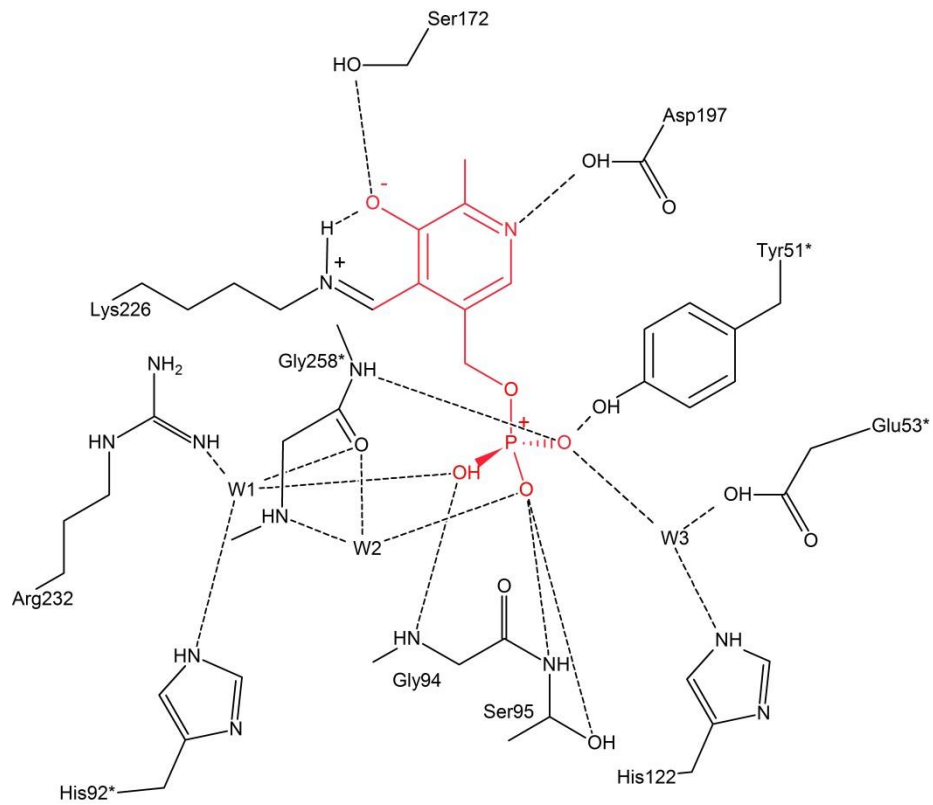


図 3.7 internal aldimine 型の PLP 結合様式

PLP を赤色で示す。*はもう一方のサブユニットに属する残基を示す。

3.3 THF 結合型 *T*SHMT

3.3.1 THF 結合型 *T*SHMT の結晶構造

構造解析の結果、活性部位に THF が結合した構造を獲得することができた。しかし、THF はサブユニット B にのみ結合しており、サブユニット A には結合していなかった。その詳細については 3.3.3 節にて述べる。

3.3.2 THF 結合型 *T*SHMT 結晶の吸収スペクトル

X 線回折データ収集後、THF 結合型 *T*SHMT 結晶の吸収スペクトルを測定した。その結果を図 3.8 に示す。420 nm と 440 nm に 2 つのピークが確認された。これは、Lys226 と PLP が Schiff 塩基を形成して internal aldimine の状態で存在しており、サブユニット A とサブユニット B でその環境に違いが見られ、それが吸収スペクトルのずれにつながったと考えられる。

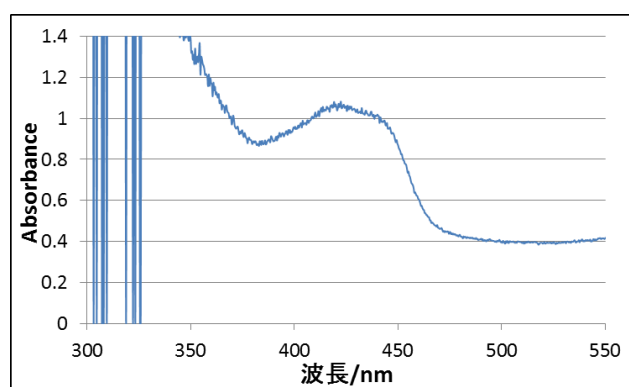


図 3.8 THF 結合型 *T*SHMT 結晶の吸収スペクトル

3.3.3 THF の結合様式

THF の結合様式を図 3.9 に示す。テトラヒドロプテリン環の N1 原子は Asn342 の側鎖アミド基の窒素原子、N8 原子は Asn342 の側鎖アミド基の酸素原子、N3 原子は Gly121 の主鎖の酸素原子、O4 原子は Leu123 の主鎖の窒素原子、N2 原子は Leu117 や Gly121 の主鎖の酸素原子、また水分子 (W4) を介して Ala118 の主鎖の酸素原子や、Ala343 の主鎖の酸素原子、O4 原子と N5 原子は、さらに水分子 (W5) を介して Glu53 の側鎖カルボキシ基や His122 の側鎖イミダゾール基と水素結合を形成していた。そして、N10 原子は Glu53 の側鎖カルボキシ基と水素結合を形成していた。また THF の中心部分に存在するフェニル環は Tyr60 と π - π スタッキング相互作用を形成していた。フェニル環とグルタミン酸部分の間に存在するケトン酸素は水分子を介して Ser127 の側鎖ヒドロキシ基と水素結合を形成していた。また、グルタミン酸部分は *Tt*SHMT の表面部分に存在しており、酵素との相互作用は少なく、O ϵ 1 が Arg352 の主鎖の窒素原子と水素結合を形成しているのみであった。

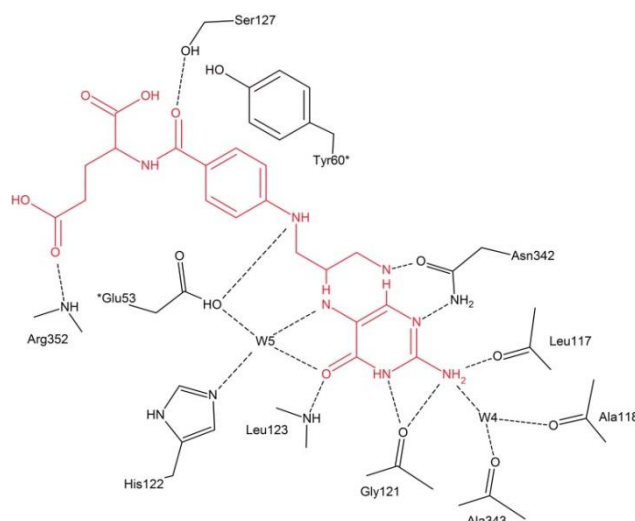


図 3.9 THF の結合様式

THF を赤色で示す。*はもう一方のサブユニットに属する残基を示す。

THF 結合型 *Tt*SHMT と基質非結合型 *Tt*SHMT の重ね合わせ図を図 3.10 に示す。THF が結合したサブユニット B において 401 残基の C α 原子で重ね合わせを行ったところ、r.m.s.d.は 0.36 Å となった。全体構造としてほとんど変化はなかったが、THF 結合型 *Tt*SHMT では Ala343–Ser355 によって構成されるループ部分が活性部位を閉じるように変化しており、最も大きな変化箇所は Pro320 の C α 原子において確認され、2.1 Å の差があった。以下、このコンフォメーションを closed 型と呼ぶ。このループ部分は 3.2.3 節で述べたサブユニット AB 間の構造の違いが現れている箇所でもあり、THF 結合型では B-factor の低下が見られ、電子密度の乱れも観察されなかった。THF の結合が closed 型となるように誘引し、また閉じた後の構造を安定化していることが考えられる。THF のテトラヒドロプテリン環と 2 つの水素結合を形成している Asn342 が鍵となってこのような構造変化が起きていると考えられる。

また、THF 結合型 *Tt*SHMT のサブユニット A とサブユニット B を比較したところ、サブユニット A は開いたままの構造であった。以下、このコンフォメーションを open 型と呼ぶ。サブユニット A で THF が結合しなかったことは、クリスタルパッキングが原因であることが予想される。closed 型になるときに、活性部位を閉じるようにコンフォメーション変化する箇所は、サブユニット A では、3.2 節で述べたように対称単位に存在する別の *Tt*SHMT 分子と相互作用している。このため、これが原因で THF が活性部位に結合したとしても活性部位が開いたままで固定されてしまい閉じることができず、THF も *Tt*SHMT に結合した状態で安定化されないのだと考えられる。

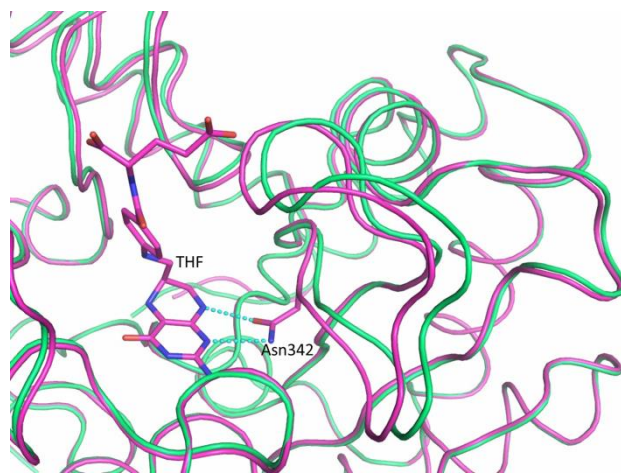


図 3.10 THF 結合型 *Tt*SHMT と基質非結合型 *Tt*SHMT の重ね合わせ

THF 結合型 *Tt*SHMT をマゼンタ、基質非結合型 *Tt*SHMT を緑色で示す。THF と Asn342 をマゼンタのスティックモデルで示す。THF のテトラヒドロプテリン環と Asn342 との水素結合をシアン破線で示す。

3.4 Gly_5-ホルミルテトラヒドロ葉酸 (5-CHO-THF) 結合型 *Tt*SHMT

3.4.1 基質アナログとして用いられる 5-ホルミルテトラヒドロ葉酸 (5-CHO-THF)

5-ホルミルテトラヒドロ葉酸 (5-CHO-THF) は SHMT の結晶構造学的研究において、しばしば基質の THF に対する構造アナログとして用いられる。これまでに、5-CHO-THF 結合型の結晶構造として、*E. coli*、*Mus musculus*、*P. vivax*、*B. stearothersophilus* 由来の SHMT の構造が PDB に登録されており^{78,79,85,86}、それらの最高分解能は *E. coli* と *P. vivax* 由来のもの 2.4 Å である。5-CHO-THF は、SHMT の触媒反応機構中で生じると考えられている反応中間体の一つ (5-ヒドロキシメチルテトラヒドロ葉酸) と、非常によく似た構造をとっており (図 3.11)、このため 5-CHO-THF 結合型 SHMT の結晶構造は、触媒反応機構を考察する上での一助となることが期待できた。そこで、Gly_5-CHO-THF 結合型 *Tt*SHMT の結晶構造の獲得を目指した。

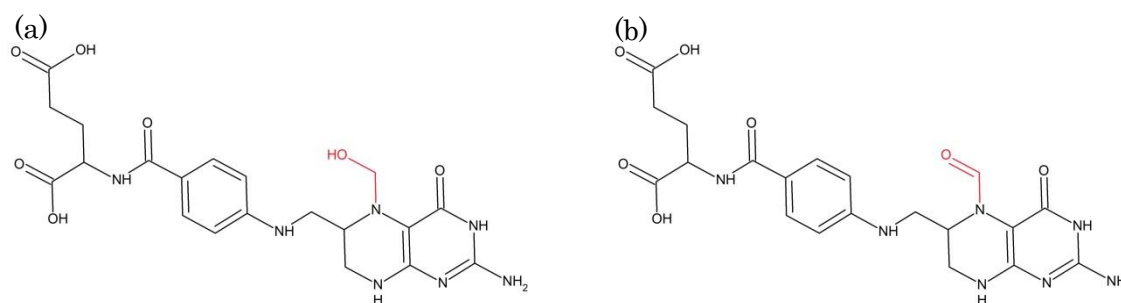


図 3.11 予想される反応中間体の構造と 5-CHO-THF の構造

(a)反応機構中で生じると考えられている反応中間体 (5-ヒドロキシメチルテトラヒドロ葉酸) の構造。(b)5-CHO-THF の構造

3.4.2 Gly_5-ホルミル THF (5-CHO-THF) 結合型 TzSHMT の結晶構造

構造解析の結果、THF 結合型の結晶構造とは異なり、非対称単位に存在する 2 つのサブユニットそれぞれに Gly と 5-CHO-THF のモデルを構築することができた。しかし、サブユニット A と B で、それらの結合様式は大きく異なっていた。

3.4.2.1 Gly_5-CHO-THF 結合型 TzSHMT 結晶の吸収スペクトル

X 線回折データ収集後、Gly_5-CHO-THF 結合型 TzSHMT 結晶の吸収スペクトルを測定した。その結果を図 3.12 に示す。500 nm にキノノイド中間体の吸収、347 nm に gem-diamine 中間体の吸収が確認された。また、440 nm にわずかに internal aldimine の吸収が確認でき、構造解析ではアサインできなかったものの、構造中でもわずかに internal aldimine の状態で存在していることが予想される。また、472 nm に吸収が確認されたが、これが何に由来するものかは不明である。図 3.2 に示した溶液条件で Gly と 5-CHO-THF を加えた場合においても同じ位置にピークが確認された。

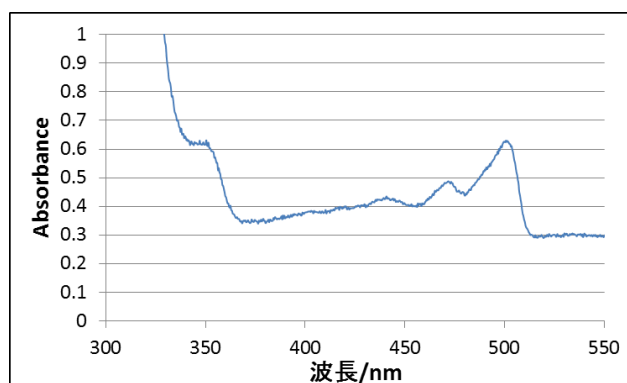


図 3.12 Gly_5-CHO-THF 結合型 TzSHMT 結晶の吸収スペクトル

3.4.2.2 サブユニット B における活性部位の構造

サブユニット B は THF 結合型の構造と非常によく似ており、closed 型となっていた。活性部位の構造を図 3.13 に示す。Gly は PLP と Schiff 塩基を形成し、external aldimine (PLP_Gly) の状態で存在していた。また、5-CHO-THF は THF と非常によく似た結合様式であったが、興味深いことにホルミル基は 2 つのコンフォメーションをとっていた。片方のコンフォメーション (コンフォメーション I) は、Glu53 の側鎖カルボキシ基と水素結合を形成し、さらに水分子 (W6) を介して、Glu53 の側鎖カルボキシ基や His122 の側鎖イミダゾール基、PLP のリン酸基と相互作用を形成していた。それに対

し、もう一方のコンフォメーション（コンフォメーションⅡ）では、Glu53の側鎖カルボキシ基との水素結合を避けるように、Gly_PLPのイミン窒素と水素結合を形成していた。W6も5-CHO-THFとの水素結合を避け、新たにGly_PLPのイミン窒素と水素結合を形成し、またその他の水素結合は保持していた。Gly_PLPのイミン窒素は水素を1つ持っているが、この水素は5-CHO-THFのホルミル基と水素結合を形成していることが予想される。すなわち、W6の水素原子によってW6とGly_PLPのイミン窒素は水素結合を形成している。このことから、W6はコンフォメーションⅠとコンフォメーションⅡの両方でプロトン化し、 H_3O^+ として存在していることが示唆された（図3.14）。また、電子密度とB-factorを考慮し、コンフォメーションⅠの占有率は60%、コンフォメーションⅡの占有率は40%でモデルをアサインした。このようなコンフォメーション変化が生じた理由として、Glu53側鎖のプロトン化状態が考えられる。ホルミル基がGlu53の側鎖カルボキシ基と水素結合を形成するためには、Glu53の側鎖がプロトン化していなければならない。もし、Glu53が脱プロトン化した状態であるならばホルミル基と反発を起こし、これらの距離は遠くなるはずである。すなわち、ホルミル基とGlu53のカルボキシ基が水素結合を形成しているコンフォメーションⅠでは、Glu53の側鎖はプロトン化しており、逆にコンフォメーションⅡではGlu53の側鎖は脱プロトン化していることが予想される。また、各々の占有率は6:4の比で、脱プロトン化の平衡点5:5に極めて近く、ソーキング溶液に用いた緩衝液のpHは9.0であるため、Glu53のpKaは9付近であることが予想される。しかし、Glu53側鎖のpKaは通常4.07である¹。Glu53の側鎖のカルボキシ基はPLPのリン酸基と水を介した相互作用を形成しており、pH 9.0ではリン酸基は-2価に帯電していると予想され、この2個の負電荷の影響でGlu53の側鎖のpKaが上昇したことが考えられる。また、同様にW6のpKaも上昇し、pH 9.0でプロトン化していると考えられる。また、SHMTの正反応における至適pHは7~8の中性付近であることが報告されている⁸⁰⁻⁸²。このため、本来の反応条件下であれば、Glu53はプロトン化しており、反応中間体はコンフォメーションⅠに近い構造をとることが予想される。

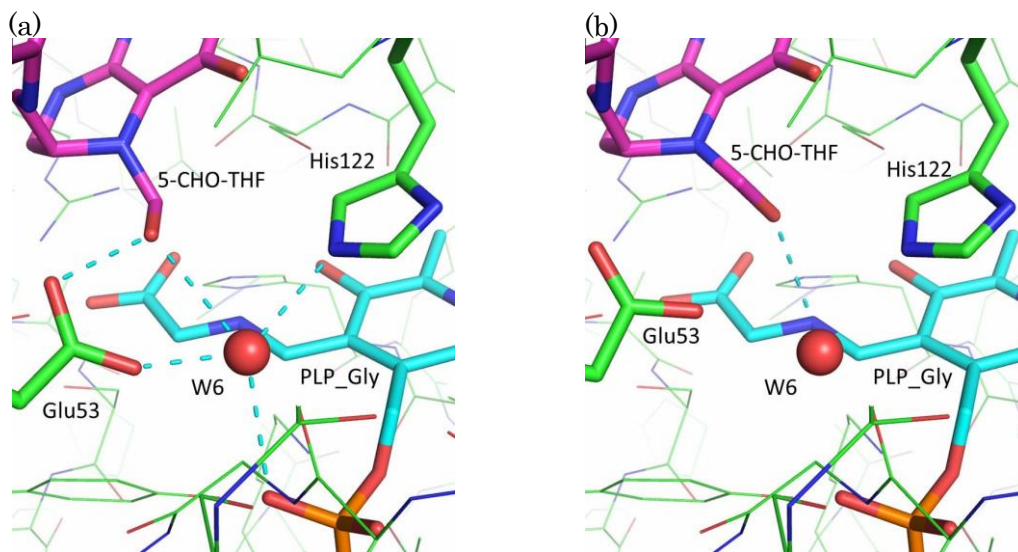


図 3.13 サブユニット B における活性部位の構造

Glu53 を緑のスティックモデル、5-CHO-THF をマゼンタのスティックモデル、PLP_Gly をシアン色のスティックモデルで示す。水分子を赤色の球で示す。水素結合をシアンの破線で示す。(a)コンフォメーション I の結合様式。(b)コンフォメーション II の結合様式

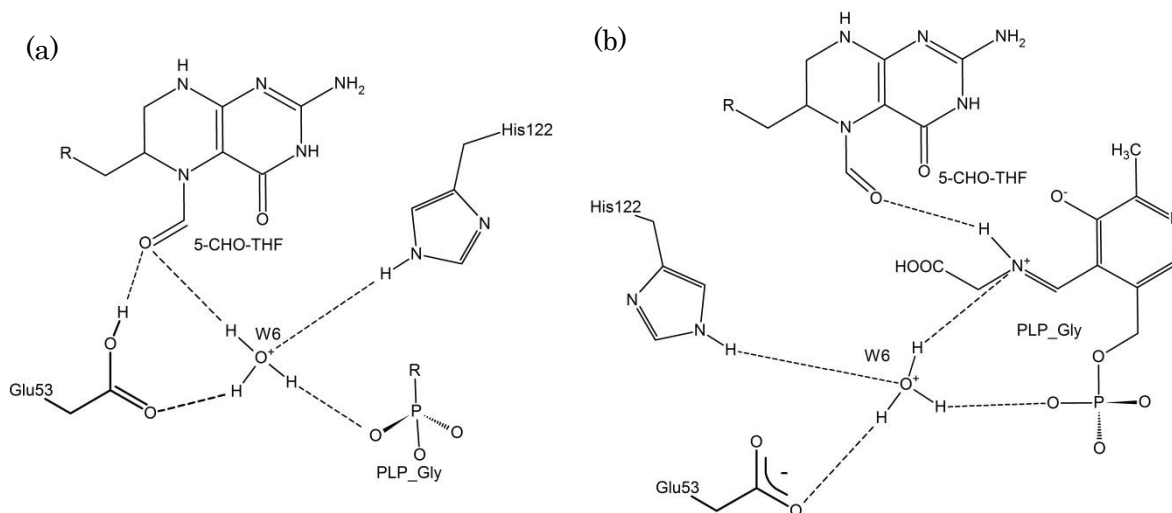


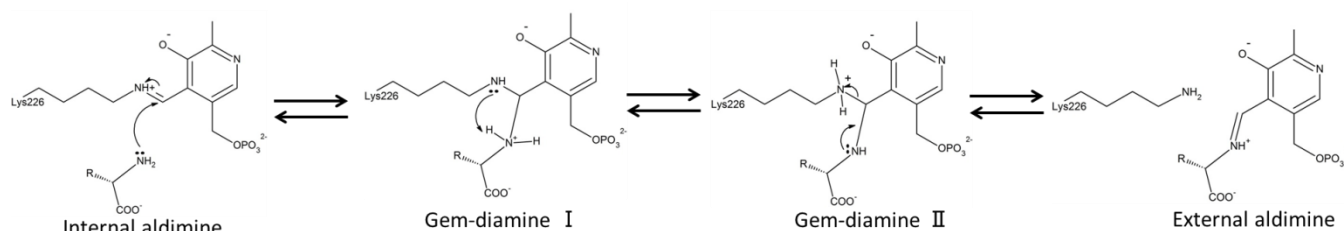
図 3.14 想定されるサブユニット B における水素結合環境

(a)コンフォメーション I の水素結合環境。Glu53 はプロトン化している。(b)コンフォメーション II の水素結合環境。Glu53 は脱プロトン化している。

3.4.2.3 サブユニット A における活性部位の構造

サブユニット A では、Gly と 5-CHO-THF は活性部位に結合していたものの、その結合様式はサブユニット B と比べて大きく異なっていた。活性部位の構造を図 3.15 に示す。Gly は PLP と Lys226 のアミノ基と共に gem-diamine 中間体を形成していた。また、5-CHO-THF はサブユニット B におけるコンフォメーション II に似た結合様式であったが、やや異なっており、また末端のグルタミン酸部分の電子密度が不明瞭であり、この箇所のモデルを構築することができず、その占有率も 70%であった。さらに、サブユニット B では 5-CHO-THF が結合することで、3.3 節で示したような活性部位が閉じる closed 型になっていたが、サブユニット A では 5-CHO-THF が結合しているにもかかわらず、活性部位は開いたままの open 型の構造であった。3.3 節で述べたように、クリスタルパッキングの影響によりサブユニット A では closed 型構造をとることはできない。しかし、ソーキング溶液に *Tt*SHMT に対して大過剰の 5-CHO-THF が用いられたことが原因で、活性部位に結合したと考えられる。また、5-CHO-THF のホルミル基酸素は、gem-diamine 中間体を形成している Gly のアミノ基と水素結合を形成しており、この水素結合の影響により、酵素の 5-CHO-THF に対する親和性は、THF に対する親和性よりも高くなっている可能性がある。

サブユニット A では、Gly は Lys226 や PLP と gem-diamine 中間体を形成している。この gem-diamine 中間体は PLP が Lys226 とシッフ塩基結合を形成する internal aldimine 状態と、PLP が Gly とシッフ塩基結合を形成する external aldimine 状態の中間体である (Scheme 3.1)。また、gem-diamine 中間体は基質アミノ酸側の窒素がプロトン化しているもの (gem-diamine I) と Lys226 側の窒素がプロトン化しているもの (gem-diamine II) があるが、そのどちらであるかを X 線結晶構造解析で判断することはできない。そして、なぜサブユニット A では gem-diamine の構造となり、サブユニット B では external aldimine の構造となったのかは、不明である。ネズミおよびウサギ由来 SHMT の結晶構造において、*Tt*SHMT と同様に片方のサブユニットのみ gem-diamine の構造をとることが報告されており^{84,85}、*Tt*SHMT において、2 つのサブユニット間に非対称性が存在し、これが原因で違いが現れている可能性がある。



Scheme 3.1 internal aldimine から external aldimine への反応

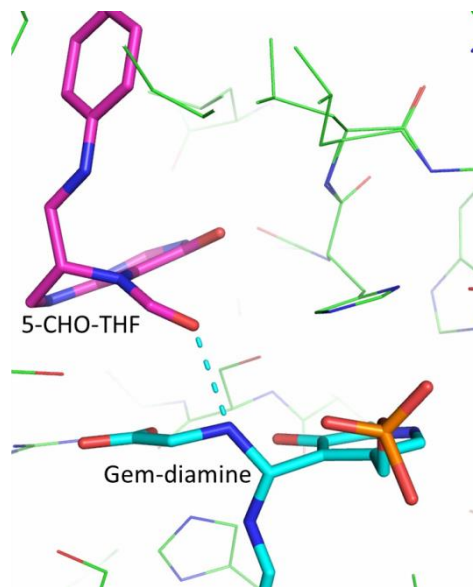


図 3.15 サブユニット A における活性部位の構造

5-CHO-THF をマゼンタのスティックモデル、gem-diamine をシアンのスティックモデルで示す。また、水素結合をシアンの破線で示す。

3.5 時間分割的 X 線結晶構造解析

3.5.1 *Tt*SHMT 結晶の pH 変化に対する耐久性

*Tt*SHMT は pH 5.6 の緩衝液を含む結晶化溶液を使用して、結晶化が行われている。そこで、酵素活性の至適領域から外れた pH 条件下において、基質ソーキングを行うことにより、*Tt*SHMT に基質が結合しているが触媒反応が進行しない構造、つまりミカエリス複合体の獲得を目指した。まず、*Tt*SHMT 結晶が、どれだけの酸性条件下、塩基性条件下に耐えうるかが可能なかを調べた。酸性条件下において、*Tt*SHMT 結晶を pH 3.0、4.0、5.0 に調製した結晶化 buffer へ移動した。この時、使用した緩衝液は全て 0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液であった。その結果、pH 3.0 の条件下では、移動させた直後に結晶が粉々に崩れ、さらに pH 4.0 では図 3.16 に示すように、PLP に由来する黄色が消失してしまった。酸性条件下において補酵素 PLP が脱離してしまい、アポ化したことが原因だと考えられる。pH 5.0 の条件下ではこのような外見上の変化はなかった。

また、塩基性の条件下においては、pH 11.0 の条件下でも *Tt*SHMT 結晶に外見上の変化はなかった。この時、緩衝液として、0.05 M CAPS を用いた。

以上より、pH 5.0 と pH 11.0 を限度として *Tt*SHMT 結晶に THF と L-Ser を同時にソーキングすることで、反応が進行していない、*Tt*SHMT-基質複合体の結晶構造の獲得を試みた。

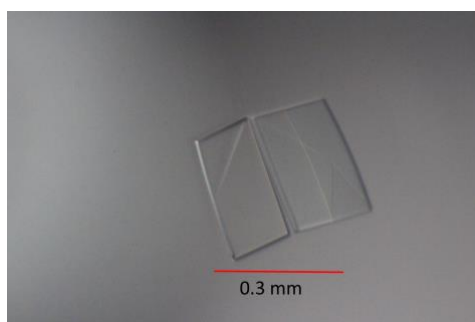


図 3.16 pH 4.0 での *Tt*SHMT 結晶の様子

3.5.2 L-Ser と THF をソーキングした *Tt*SHMT 複合体 (pH 5.6)

3.5.2.1 L-Ser と THF をソーキングした *Tt*SHMT 複合体 (pH 5.6) の結晶構造

構造解析の結果、複合体結晶の活性部位において、THF、5,10-CH₂-THF、L-Ser、Gly の混在を示す電子密度が認められた (図 3.17)。すなわち、THF と L-Ser をソーキングしたことにより触媒反応が進行し、生成物が生じ、基質と生成物が混在した構造となっていた。反応中間体の構造は確認されなかった。生成物の混在は、反応が完全に終了し平衡状態にまで達したか、その解離過程にエネルギーギャップが存在し、解離が遅いことを示唆している。

基質や生成物は酵素中に 2 箇所存在する活性中心のうち、一方のサブユニット B のみ結合していた。サブユニット A では活性部位に L-Ser が結合していたが、PLP とシッフ塩基を結合せず、反応可能な配向にはなっていなかった。理由は不明であるが、クリスタルパッキングが原因の可能性はある。

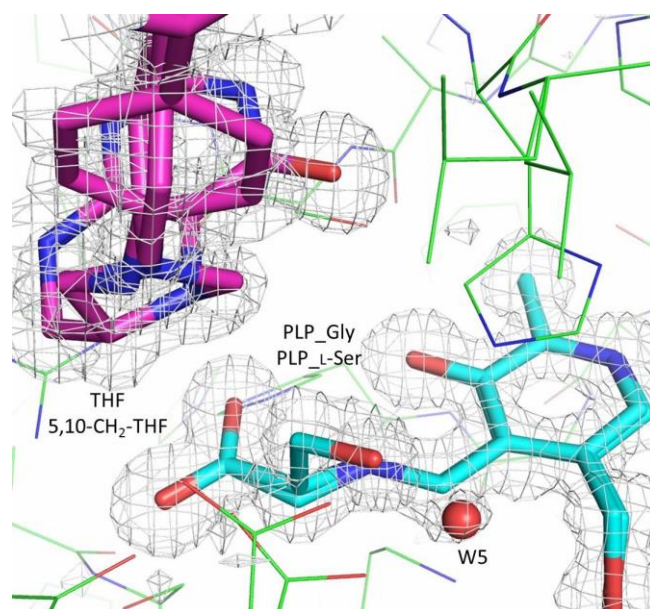


図 3.17 pH 5.6 における活性部位の電子密度図

PLP_Gly、PLP_L-Ser、THF、5,10-CH₂-THF、W5 の *Fit* オミットマップを 3σ のマップレベルで示す。PLP_Gly 及び PLP_L-Ser をシアンのスティックモデル、THF および 5,10-CH₂-THF をマゼンタのスティックモデルで示す。

3.5.2.2 L-Ser と THF をソーキングした *Tt*SHMT 複合体 (pH 5.6) 結晶の吸収スペクトル

X線回折データ収集後、*Tt*SHMT 複合体 (pH 5.6) 結晶の吸収スペクトルを測定した。その結果を図 3.18 に示す。491 nm にキノノイド中間体の生成を示す吸収ピークが検出された。このため、アサインした PLP_Gly は、一部がキノノイド中間体の状態で存在していることが予想される。また、430 nm にピークが確認された。これは、サブユニット A に存在する internal aldimine のピークと、サブユニット B に存在する external aldimine のピークが重なったものだと考えられる。

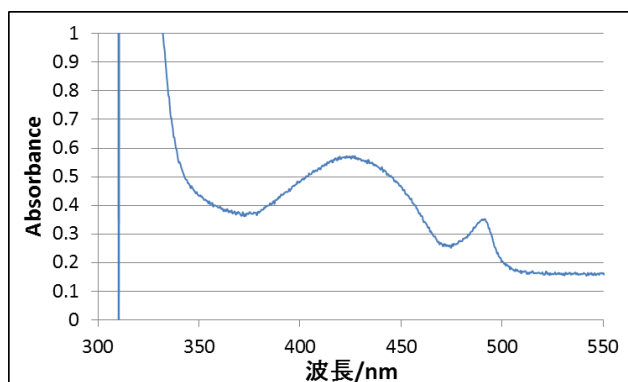


図 3.18 *Tt*SHMT 複合体 (pH 5.6) 結晶の吸収スペクトル

3.5.2.3 L-Ser の結合様式

L-Ser は活性部位に存在する PLP とシッフ塩基を形成し、external aldimine の状態 (PLP_L-Ser) で存在しており、また活性中心に存在する多くの残基によって認識されていた (図 3.19)。L-Ser のヒドロキシ基は Glu53 の側鎖のカルボキシ基や His122 の側鎖のイミダゾール基と水素結合を形成していた。

そして、L-Ser のカルボキシ基の片方の酸素原子は、His200 の側鎖イミダゾール基及び Arg358 の側鎖グアニウム基と合計 2 つの水素結合を形成していた。これに対し、もう一つの酸素原子は、Tyr61 の側鎖ヒドロキシ基や Arg358 の側鎖グアニウム基、さらには Ser31 の側鎖ヒドロキシ基と水素結合可能な距離であった。Ser31 の側鎖ヒドロキシ基は、基質である L-Ser のカルボキシ基が形成する面に対し、垂直方向から相互作用を形成していた。このことから、Ser31 の側鎖ヒドロキシ基は、L-Ser のカルボキシ基の酸素原子の sp² 軌道ではなく、sp³ 軌道に相互作用している可能性が示唆される。つまり、L-Ser のカルボキシ基の酸素原子がプロトン化し、3 本の水素結合を形成している可能性がある。PLP 酵素において、基質アミノ酸の C α の周りの結合のうち、イミン-ピリジン環によって形成される平面に垂直な結合が、優先的に切断されるという機構が Dunathan によって提唱されている⁸⁷。*Tt*SHMT の結晶構造中では L-Ser の C α

—C β 間の結合が垂直になっており、この結合が切断されるという反応機構を裏付ける結果であった。L-Ser のカルボキシ基がプロトン化されることにより、水素結合の数を増やすことで、カルボキシ基を固定する。それによって L-Ser のヒドロキシ基は、イミン-ピリジン環によって形成される平面に対して垂直になるようなコンフォメーションをとり、C α —C β 間の結合が切断されやすくしているのだと考えられる。

また、Arg358 は L-Ser のカルボキシ基と向かい合うように 2 本の水素結合を形成しており、L-Ser の認識に大きく関与していることが容易に予想される。E. coli や、ヒツジの肝臓由来 SHMT の変異体実験によって、この Arg 残基が基質カルボキシ基の認識に必須の残基であることが報告されている^{88,89}。

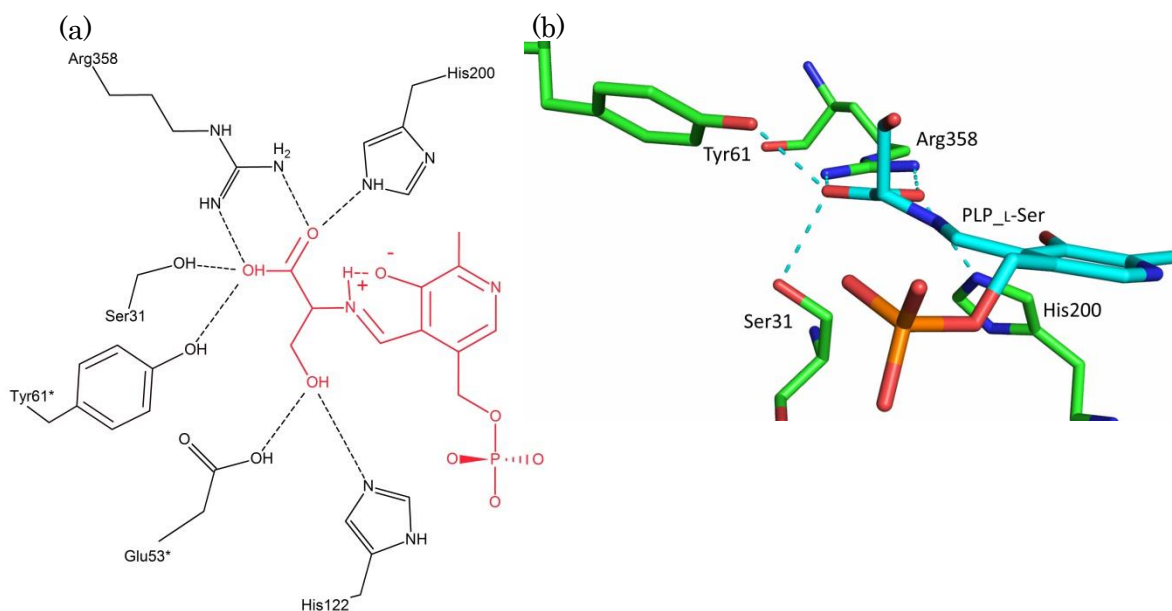


図 3.19 L-Ser の結合様式

(a)L-Ser の認識機構を二次元図で示す。PLP_L-Ser を赤色で示す。*はもう一方のサブユニットに属する残基を示す。(b)L-Ser のカルボキシ基の認識機構を示す。PLP_L-Ser をシアンのスティックモデル、Ser31、Tyr61、His200、Arg358 を緑色のスティックモデルで示す。水素結合をシヤンの破線で示す。

3.5.2.4 Gly の結合様式

Gly の結合様式は L-Ser の結合様式と非常によく似ており、L-Ser のヒドロキシメチル基が Gly には存在しないこと以外は、その認識機構に大きな違いはなかった。図 3.20 に PLP_Gly の結合様式を示す。しかし、L-Ser のヒドロキシメチル基がなくなったことによって生じたスペースに、新たに水分子 (W5) が存在していた。この水分子は、基質非結合型 *Tk*SHMT の結晶構造中で確認された W3 と近い位置に存在しており、その水素結合環境もよく似ていた。この W5 は W3 と同じく PLP のリン酸基、Glu53 の側鎖のカルボキシ基、His122 の側鎖のイミダゾール基と水素結合を形成していた。しかし、興味深いことに W5 は PLP_Gly の C4'原子と 2.7 Å とファンデルワールス距離よりも近い位置に存在していた。仮に C4'原子と W5 が水素結合を形成しているならば、C4'原子の電気陰性度は低くなっているはずである。しかし、それを行う要因は不明である。

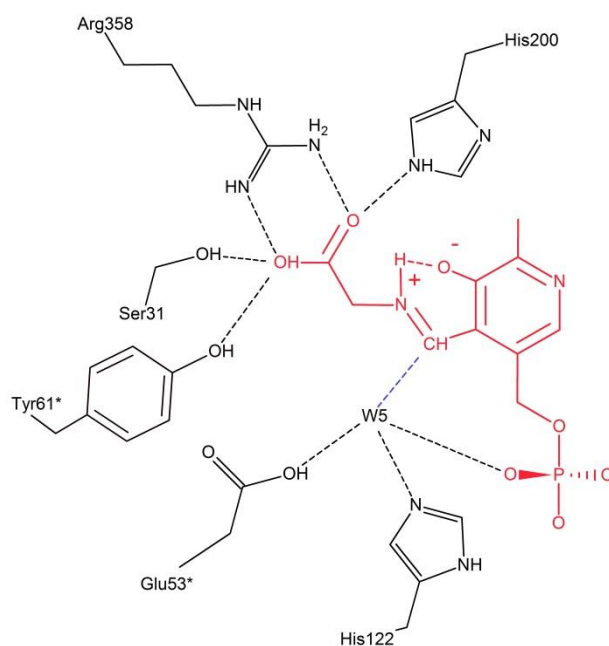


図 3.20 Gly 結合様式

PLP_Gly を赤色で示す。*はもう一方のサブユニットに属する残基を示す。PLP_Gly の C4'原子と W5 の相互作用を青色の破線で示す。

3.5.2.5 THF と 5,10-CH₂-THF の結合様式の比較

基質である THF と生成物である 5,10-CH₂-THF では、その結合様式に違いが確認できた (図 3.21)。5,10-CH₂-THF では、その中心に存在するベンゼン環部分が、新たに形成した五員環と平行になるように、ベンゼン環の C1-C6 軸の周りにおよそ 90° 回転しており、それに伴い Leu123 の側鎖も接触を避けるように、そのコンフォメーションを変化させていた。さらに、THF では Tyr60 の側鎖と π - π 相互作用を形成していたが、5,10-CH₂-THF ではそれが失われていた。また、Tyr60 の側鎖との距離が 3.0 Å 程度にまで近接していることから、5,10-CH₂-THF 結合型の構造は、THF 結合型の構造よりも不安定であり、5,10-CH₂-THF は THF と比べ、SHMT との親和性が低くなることが予想される。

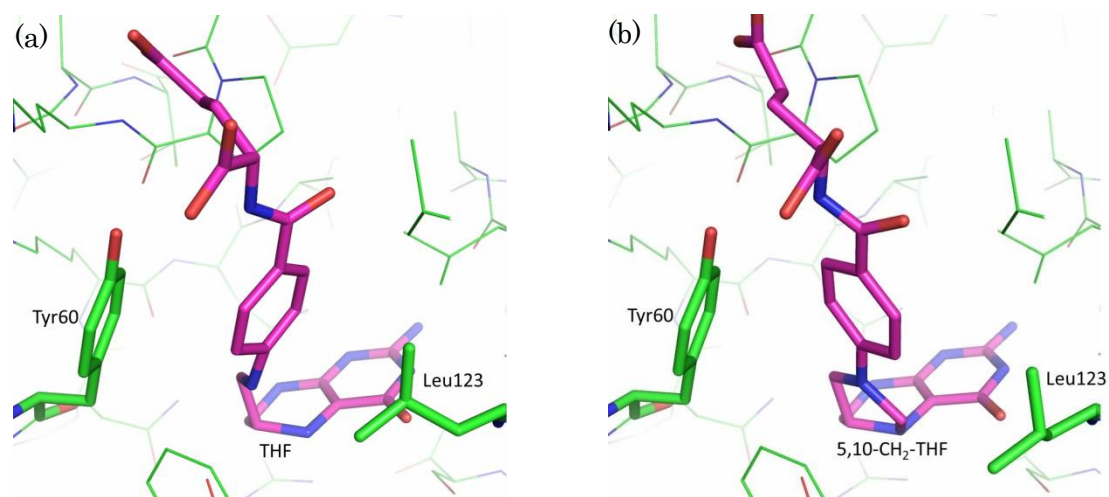


図 3.21 THF と 5,10-CH₂-THF の結合様式の比較

Tyr60 と Leu123 を緑のスティックモデル、THF と 5,10-CH₂-THF をマゼンタのスティックモデルで示す。(a)THF の結合様式。THF のベンゼン環部分と Tyr60 が π - π 相互作用を形成している。(b)5,10-CH₂-THF の結合様式。ベンゼン環部分が C1-C6 軸の周りに 90° 回転したことで π - π 相互作用はなくなっている。

3.5.2.6 L-Ser と Gly の結合様式の比較

L-Ser と Gly も混在した状態で存在しており、それに伴い Glu53 が異なる 2 つのコンフォメーションをとっていた (図 3.22)。L-Ser が結合している構造では、L-Ser のヒドロキシ基と、Glu53 の側鎖カルボキシ基や His122 の側鎖イミダゾール基が水素結合を形成していた。それに対し、Gly 結合型では新たに現れた水分子 (W6) や、THF (5,10-CH₂-THF) の N10 原子と水素結合を形成するように、Glu53 が 1.0 Å 程度、THF (5,10-CH₂-THF) へ近づいていた。Glu53 は L-Ser が活性部位に存在する場合は、そのヒドロキシ基との水素結合を優先し、反応が進行し Gly となった場合には 5,10-CH₂-THF との水素結合を優先することが推測できる。このことから、Glu53 は THF の N10 原子に対して酸塩基触媒残基として働く可能性が示唆される。

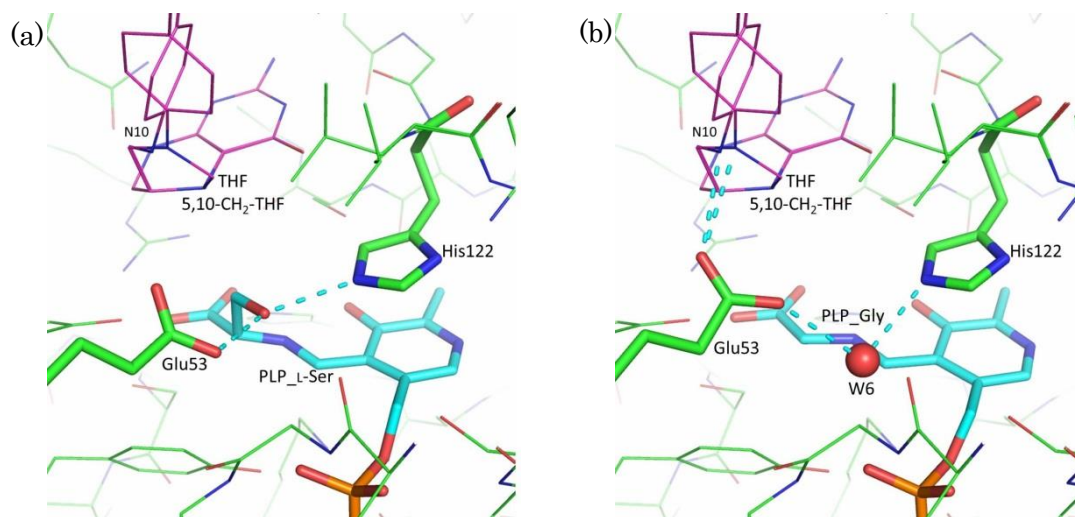


図 3.22 L-Ser と Gly の結合様式の比較

Glu53 と His122 を緑のスティックモデル、PLP_L-Ser と PLP_Gly をシアン色のスティックモデルで示す。水分子を赤色の球で示す。水素結合をシアンの破線で示す。(a)L-Ser の結合様式。(b)Gly の結合様式

3.5.3 L-Ser と THF をソーキングした *Tt*SHMT 複合体 (pH 5.0)

3.5.3.1 L-Ser と THF をソーキングした *Tt*SHMT 複合体 (pH 5.0) の結晶構造

構造解析の結果、pH 5.6 の条件下と同じく、基質と生成物が混在した構造となっており、結晶内での触媒反応の進行が示唆された。また、反応中間体の構造は確認できなかった。また、L-Ser が活性部位に結合せずに、PLP が internal aldimine の状態で存在している構造を 30% の占有率でモデルを構築した。

pH 5.6 の条件下で獲得した構造と比較すると、3.5.2 節で THF と 5,10-CH₂-THF の結合様式の違いを述べたが、pH 5.0 での構造は、5,10-CH₂-THF が結合様式を変化させず、Tyr60 との π - π スタッキングを維持したままの構造がおおよそ 20% の占有率で獲得できた。

3.5.3.2 L-Ser と THF をソーキングした *Tt*SHMT 複合体 (pH 5.0) 結晶の吸収スペクトル

X線回折データ収集後、*Tt*SHMT 複合体 (pH 5.0) 結晶の吸収スペクトルを測定した。その結果を図 3.23 に示す。420 nm と 440 nm にピークが確認されたが、これは、internal aldimine のピークと external aldimine のピークが重なったもの、もしくはサブユニット A とサブユニット B の違いに由来するものだと考えられる。

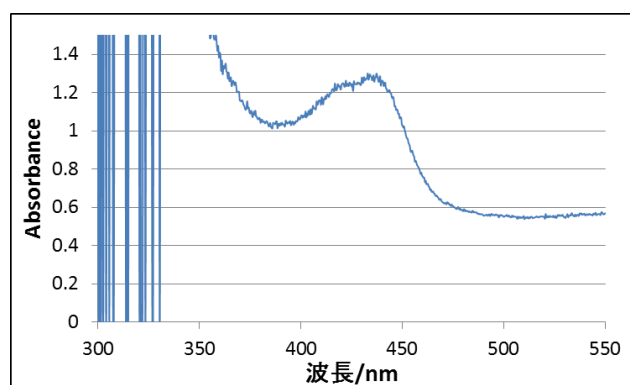


図 3.23 *Tt*SHMT 複合体 (pH 5.0) 結晶の吸収スペクトル

3.5.3.3 L-Ser と THF をソーキングした *Tt*SHMT 複合体 (pH 5.6) 結晶との比較

3.5.2.2 節で示したように、pH 5.6 の結晶では、キノノイド中間体の吸収スペクトルが確認できた。しかし、pH 5.0 の結晶ではこれは確認できなかった。このような違いが出たことは、ソーキング時間が問題であると予想できる。pH 5.0 では THF と L-Ser を 3 時間ソーキングしたのに対し、pH 5.6 では 5 時間ソーキングを行っている。長時間ソーキングを行ったために、反応が完全に終了し、平衡状態に達したことで THF と Gly が結晶中で共存してしまい、キノノイド中間体となったのだと考えられる。実際に、pH 5.6 の条件下で 3 時間ソーキングを行った結晶では、pH 5.0 のものと同じ顕微分光の結果が得られた。

3.5.4 L-Ser と THF をソーキングした *Tt*SHMT 複合体 (pH 11.0)

3.5.4.1 L-Ser と THF をソーキングした *Tt*SHMT 複合体 (pH 11.0) の結晶構造

pH 5.0 という酸性条件下では L-Ser と THF を同時にソーキングすると反応が完全に進行してしまい、反応開始前の酵素基質複合体の獲得もできなかった。そこで次に塩基性 pH におけるソーキング実験を行った。

構造解析の結果、L-Ser が結合した構造を獲得することができた。L-Ser は、サブユニット B において完全に PLP と Schiff 塩基結合を形成し、external aldimine の状態で存在していた。しかし、THF (5,10-CH₂-THF、もしくは反応中間体) の電子密度は不明瞭であり、そのモデルを構築することはできなかった。また、THF が結合することによって構造変化するループ部分も、それに伴い、電子密度に乱れが見られ、B-factor も高くなっていた。pH 11.0 という高い pH 条件下において、THF の認識に関与するいずれかの残基が脱プロトン化したことが原因で、THF との親和性が下がった、もしくは THF が分解されてしまったことが予想される。このため、pH をさらに酵素活性の至適である中性に近づけ、結晶中のサブユニット B において THF が 100% の占有率でモデルを構築できるような条件で L-Ser と THF のソーキングを行った。

3.5.4.2 L-Ser と THF をソーキングした *Tt*SHMT 複合体 (pH 11.0) 結晶の吸収スペクトル

X線回折データ収集後、*Tt*SHMT 複合体 (pH 11.0) 結晶の吸収スペクトルを測定した。その結果を図 3.24 に示す。420 nm と 440 nm にピークが確認されたが、これは、internal aldimine のピークと external aldimine のピーク、もしくはサブユニット A とサブユニット B の違いに由来するものだと考えられる。また、わずかに 491 nm にキノノイド中間体と考えられる吸収が確認された。結晶構造ではアサインできなかったが、結晶中でわずかに存在する THF が結合している分子内で反応が進行し、キノノイド中間体が存在していることが考えられる。図 3.2 に示した *Tt*SHMT に Gly と THF を加えた場合の、溶液状態での吸収スペクトルでも同様の位置にピークが確認された。

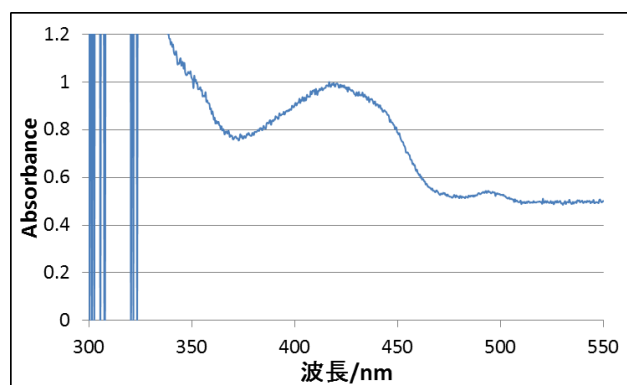


図 3.24 *Tt*SHMT 複合体 (pH 11.0) 結晶の吸収スペクトル

3.5.5 L-Ser と THF をソーキングした *Tt*SHMT 複合体 (pH 10.0)

3.5.5.1 L-Ser と THF をソーキングした *Tt*SHMT 複合体 (pH 10.0) の結晶構造

pH 11.0 のソーキング条件下では、THF が *Tt*SHMT に結合した結晶構造が得られなかったため、さらに pH を中性に近づけた pH 10.0 の条件下で、L-Ser と THF のソーキングを行った。

全体構造としては、3.5.2 節において pH 5.6 の条件でソーキングを行った構造と比べ、大きな差異はなかった。しかし、活性中心では、L-Ser の C α -C β 間の電子密度分布に途切れが確認され、酵素反応の進行が示唆された。この途切れた電子密度に、水分子やソーキング溶液に使用した塩、反応中間体として存在する可能性があるホルムアルデヒドをそれぞれアサインし、構造の精密化を試みた。精密化後の周囲の環境、差電子密度、B-factor も含め総合的に判断すると、この電子密度はホルムアルデヒドに対応する可能性が最も高かった (図 3.25)。この結果は SHMT の反応機構として、ホルムアルデヒドを反応中間体とする機構の妥当性を示すものである。この機構は *E. coli* 由来 SHMT

でも提唱されている^{78,90}。

結晶構造中では生成物である 5,10-CH₂-THF も混在した構造となっているため、反応が完全に停止したわけではないが、酵素反応の非至適 pH の条件下で基質ソーキングを行ったことにより、一部反応が触媒反応途中で停止し、反応中間体構造の獲得に成功したと考えられる。

想定される反応機構において、酸触媒がホルムアルデヒドの酸素原子にプロトンを供与するが、この結晶においては pH を至適条件よりも高い 10.0 としたことにより、酸触媒が脱プロトン化した状態にあることが推測される。これにより反応が次段階へ進む際のエネルギーギャップが大きくなり、脱プロトン化状態の占有率が増大したと考えられる。このため、結晶内でのホルムアルデヒドの占有率も増大し、構造を獲得できたのだと推測される。

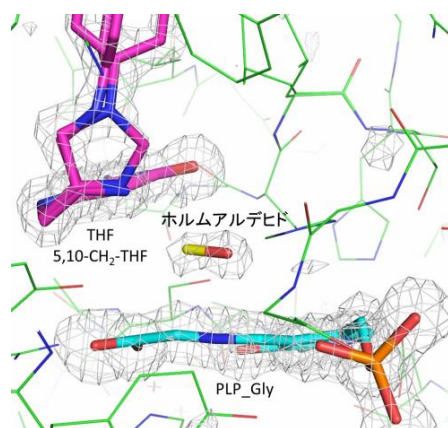


図 3.25 ホルムアルデヒドの電子密度マップ

ホルムアルデヒド、PLP_Gly、THF、5,10-CH₂-THF の *Fit-Fc* オミットマップを 3 σ のマップレベルで示す。ホルムアルデヒドを黄色のスティックモデル、PLP_Gly をシアン色のスティックモデル、THF と 5,10-CH₂-THF をマゼンタのスティックモデルで示す。

3.5.6 時間分割的 X 線結晶構造解析のまとめ

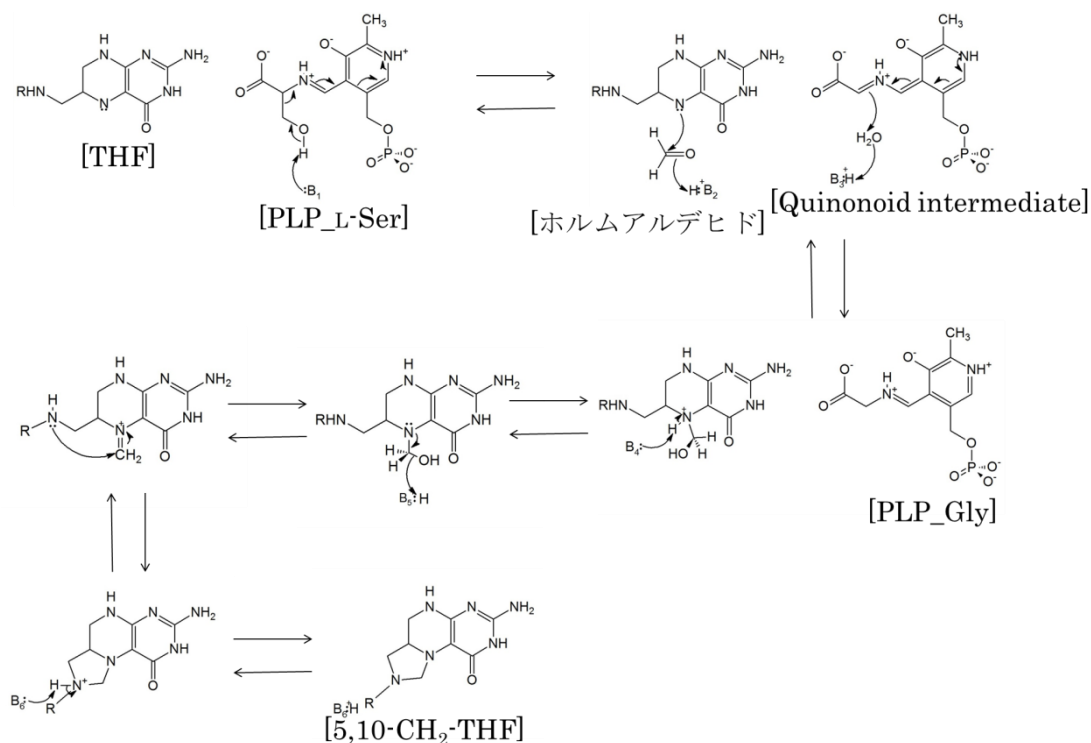
至適 pH から外れた酸性、塩基性条件下 (pH 5.0、pH10.0) において、生成物である 5,10-CH₂-THF が活性部位に結合しており、反応が完全に終了していた。すなわち、この pH において反応が進行せずに停止した構造、すなわちミカエリス複合体を獲得することはできなかった。また、pH 11.0 においては活性部位での THF の電子密度が不明瞭であり、モデルを構築することはできなかった。つまり、設定した実験条件において、pH ジャンプによって時間分割的な X 線結晶構造解析を行うという手法は適用できない。しかしながら、pH 10.0 の条件において、本研究の目標とした、反応中間体が活性部位に結合した構造を獲得することができた。反応中間体であるホルムアルデヒドが結合した構造の決定により、触媒反応機構に対して新たな知見を与えた。さらに、基質

である THF や生成物である 5,10-CH₂-THF が結合した構造を初めて決定した。このことは、立体構造を基にした薬剤開発に大きな発展をもたらすだろう。

3.6 SHMT の触媒反応機構についての考察

3.6.1 SHMT の反応スキーム

SHMT の触媒反応機構は、直接置換の反応機構とレトロアルドールの反応機構が提案されている。しかし、反応中間体が結合した結晶構造など、そのどちらで進行するのか証明する根拠はない。レトロアルドールの反応機構では、ホルムアルデヒドを反応中間体として経由し、反応が進行する。今回、ホルムアルデヒドを含む *Tt*SHMT の結晶を獲得した。このため、レトロアルドールの反応機構で進行することを構造化学的に裏付けた。しかし、*P. vivax* および *Hydrogenobacter thermophilus* 由来 SHMT などにはアルドラーゼ活性を示すことが知られている^{91,92}。もし、*Tt*SHMT もアルドラーゼ活性を示すなら、獲得したホルムアルデヒドは L-Ser がアルドラーゼ反応により生じたホルムアルデヒドの可能性もある。この場合、獲得したホルムアルデヒドを含む構造は、触媒反応機構がレトロアルドールの反応機構だという根拠にはならない。しかし、獲得した結晶構造から触媒反応機構をレトロアルドールの反応機構だと考えると、酸塩基触媒残基の同定が可能である。レトロアルドールの反応機構では、B1 から B6 の 6 種類の酸塩基触媒残基が関与するが、これらについて推測される残基を次に示す。



Scheme 3.2 推定される SHMT の触媒反応機構 (レトロアルドール)

B1 は酵素反応の初期段階で、基質である L-Ser のヒドロキシ基からプロトンを引き抜く塩基触媒として働く残基である。TtSHMT の活性部位において、図 3.20(a)に示したように、L-Ser のヒドロキシ基は、Glu53 の側鎖カルボキシ基及び His122 の側鎖イミダゾール基と水素結合を形成している。つまり、この 2 つの残基のうちいずれかが B1 として働くことが予想される。

しかし、ヒツジ肝臓由来 SHMT で行われた変異体実験の結果では、Glu53 に相当する Glu 残基を Gln へ変異させても L-Thr へのアルドラーゼ活性は失われなかったことから、この Glu 残基は L-Ser のヒドロキシ基からプロトンを引き抜く役割を持たないことが報告されている⁷⁰。また、3.4 節で述べたように、TtSHMT_Gly_5-CHO-THF の結晶構造では、緩衝液の pH が 9.0 という条件下において、Glu53 は 5-CHO-THF のホルミル基と 60%の割合で水素結合を形成しており、Glu53 の pKa が 9 付近まで上昇している可能性が示唆された。このため、Glu53 は触媒反応中でもプロトン化していることが予測され、プロトンを引き抜く B1 には適さないことが予想される。このため、His122 が B1 として働くことが考えられ、また、これを否定する根拠もない。

B2 は酵素反応の第 2 段階で、ホルムアルデヒドの酸素原子にプロトンを供与する酸触媒として働く残基である。TtSHMT の活性部位において、3.5.5 節に示したように、ホルムアルデヒドの酸素原子は、Glu53 の側鎖カルボキシ基や His122 の側鎖イミダゾール基の Nεと水素結合を形成している。このことから、Glu53 か His122 のいずれかが B2 として働くことが予想される。しかし、His122 は B1 として働くことが示唆された。一般的には、同一の残基が酸（塩基）触媒として働いた直後に塩基（酸）触媒として働くことは考えづらい。また、上述したように Glu53 は触媒反応条件下においてプロトン化していることが予想され、Glu53 が B2 として働くことが考えられる。

B3 は酵素反応の第 2 段階で、キノノイド中間体の Cα原子へ、プロトンを供与する酸触媒として働く残基である。筆者がこれまでに獲得した結晶構造の中で、この Cα原子と直接、あるいは間接的に水素結合を形成している残基はない。この原子との配向と距離を考慮すると、B3 として働く可能性がある残基は Tyr61 (3.4 Å) と Lys226 (4.6 Å) である。しかし、ヒツジ肝臓由来 SHMT において、Tyr61 に相当する Tyr 残基を Phe に変異させた実験において、活性測定を行ったところ、活性の顕著な減少は見られず、そのためこの Tyr 残基は触媒作用において重要な働きを持たないことが示唆されている⁷⁰。また、*B. stearothermophilus* 由来 SHMT において、internal aldimine 状態の時に、PLP とシッフ塩基を形成する Lys 残基 (TtSHMT : Lys226) が Cα原子からプロトンを引き抜くことが示唆されている⁹³。このため、TtSHMT においても Lys226 が B3 として働く可能性がある。

B4は酵素反応の第3段階で、ヒドロキシメチル基が付加した THF の N5 原子からプロトンを引き抜く塩基触媒として働く残基である。しかし、この THF の反応中間体を模したアナログである、5-CHO-THF と Gly が結合した結晶構造において、3.4 節に示したように N5 原子と直接、あるいは間接的に水素結合を形成し、プロトンを引き抜くことができるアミノ酸残基は存在しない。近接している残基は Glu53 の側鎖カルボキシ基 (3.9 Å) や Tyr61 の側鎖ヒドロキシ基 (4.1 Å) であり、本来の反応条件中では、これらのうちいずれかが B4 として働く可能性がある。

B5は酵素反応の第4段階で、THF に付加したヒドロキシメチル基の酸素原子へプロトンを付加する酸触媒として働く残基である。この THF の反応中間体を模したアナログである、5-CHO-THF と Gly が結合した結晶構造において、3.4 節に示したように、5-CHO-THF は2つのコンフォメーションをとるが、本来の反応機構中ではコンフォメーション I の状態で予想される。このコンフォメーションにおいて、ヒドロキシメチル基の酸素原子は、直接的には Glu53 の側鎖のカルボキシ基と水素結合を形成し、水分子を介して His122 の側鎖のイミダゾール基や PLP のリン酸基と相互作用を形成している。このことから、Glu53 か His122 が B5 として働くことが予想される。

B6は酵素反応の最終段階で、N10 原子からプロトンを引き抜く塩基触媒残基として働く残基である。3.5 節に示したように、pH 5.6 の条件下において THF と L-Ser を同時にソーキングした構造中で、THF (5,10-CH₂-THF) の N10 原子と Glu53 の側鎖のカルボキシ基のみが水素結合を形成していた。このため、Glu53 が B6 として働くことが予想される。

以上のことをまとめると、結晶構造から SHMT の触媒反応機構は、ホルムアルデヒドを反応中間体とするレトロアルドールの反応機構で進行することを示唆した。そして、その中で酸塩基触媒として働く6つの残基は、B1は His122、B2は Glu53、B6は Glu53 である可能性が高いが、B3、B4、B5 に関しては、獲得した結晶構造からはどの残基であるかを判断することは難しい。時分割測定に成功し、完全に触媒反応機構をトレースできれば、決定できるであろう。

3.6.2 His122 側鎖から PLP の N1 原子への水素結合ネットワーク

*Tt*SHMT の活性部位において、図 3.22(a)に示したように、基質である L-Ser のヒドロキシ基は、Glu53 の側鎖カルボキシ基や His122 の側鎖イミダゾール基の Nεと水素結合を形成している。さらに、His122 の Nδは Thr124 の側鎖のヒドロキシ基と水素結合を形成し、そこからさらに、Asn98 の側鎖のアミノ基、Asp197 のカルボキシ基を介して PLP のピリジン環の N1 原子と相互作用を形成している。すなわち、His122 という酸塩基触媒残基の可能性のある残基が、PLP の N1 原子まで水素結合ネットワークを形成している (図 3.26)。

また、His122 から PLP の N1 原子の間に存在する残基 (Thr、Asn、Asp) は他の多くの種由来の SHMT に保存されており、*Burkholderia cenocepacia*、*E. coli*、*Geobacillus stearothermophilus*、*Homo sapiens*、*Mus musculus*、*Oryctolagus cuniculus*、*P. vivax*、など多くの種由来の SHMT で完全に保存されており、*Methanocaldococcus jannaschii*、*Medicago truncatula* 由来 SHMT では Thr 残基の代わりに Ser 残基が存在していた。すなわち、水素結合ネットワークという意味では、筆者が確認したすべての SHMT について保存されていた。

さらに、PLP のピリジン環の N1 原子と水素結合を形成している Asp197 であるが、この Asp 残基は SHMT だけでなく、Fold type I の PLP 酵素に保存されている⁹⁴。また、ヒツジ肝臓由来 SHMT において、この Asp 残基を Asn に変異させると活性がなくなるという報告がある⁹⁵。このため、この水素結合ネットワークが触媒反応機構に大きく関与している可能性が示唆される。

SHMT と同じ Fold type I に分類される PLP 酵素であるアスパラギン酸アミノ基転移酵素において、PLP の N1 原子とバルク水を結ぶ、Asp222、His143、Thr139、His189 の側鎖によって構成される水素結合ネットワークが存在する。PLP が酵素に結合すると、バルク水からこの水素結合ネットワークを介して PLP の N1 原子をプロトン化し、PLP を活性化するという機構が提案されている⁹⁶。*Tt*SHMT においても、類似した活性化機構が考えられる。His122 の持つプロトンが PLP の N1 原子まで渡されていく機構である。これにより、His122 が脱プロトン化することで、His122 の側鎖イミダゾール基が脱プロトン化され、塩基触媒として働くようになるという機構が考えられる。

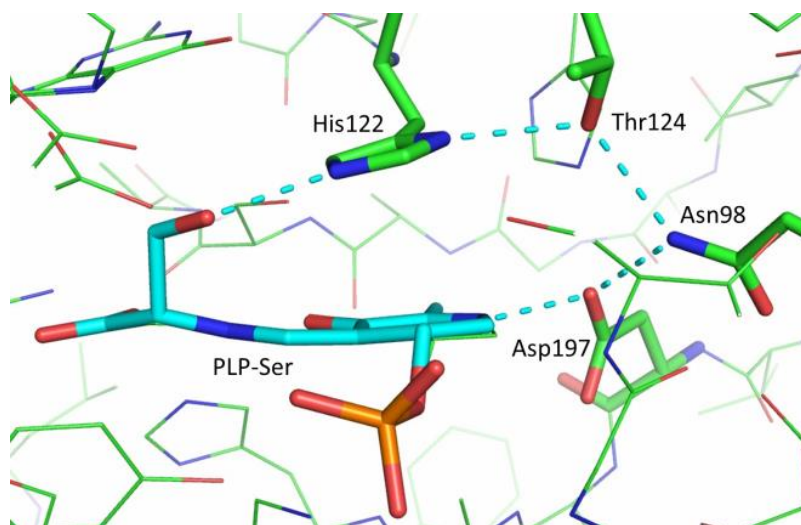


図 3.26 PLP の N1 原子からつながる水素結合ネットワーク

Asn98、His122、Thr124、Asp197 を緑のスティックモデル、PLP_L-Ser をシアンスティックモデルで示す。水素結合をシアンの破線で示す。

4. まとめ

現在 PDB に登録されている SHMT の中での最高分解能である、1.15 Å よりも高い分解能 (最高 1.02 Å) で *T*SHMT の結晶構造の決定に成功した。また、初めて SHMT に基質である THF や、生成物である 5,10-CH₂-THF が結合した結晶構造の獲得に成功し、また、それらの結合様式に違いが現れることが観察できた。さらに、本研究の目標としていた、反応中間体であるホルムアルデヒドが活性部位に結合している結晶構造の獲得に成功し、ホルムアルデヒドを反応中間体として触媒反応機構が進行することを強く示唆した。基質や生成物の結合様式と、活性部位に存在するアミノ酸残基の相互作用を解明したことにより、基質や生成物の認識に関わる残基を同定し、さらには触媒反応機構中で酸塩基触媒残基として働く残基を推定することに成功した。その中で、特に Glu53 と His122 は反応機構中で、中心として働く残基であることが予想される。しかし、B3、B4、B5 と未だ完全に特定できない酸塩基触媒残基が残っており、時分割 X 線結晶構造解析によって、完全に触媒反応機構をトレースできればこれは解決するであろう。

結語

HSD と SHMT という 2 種類の酵素について X 線結晶構造解析を行い、その両方の酵素基質複合体の獲得に成功した。そして、HSD については、酵素基質複合体の結晶構造を獲得し、触媒反応機構中で酸塩基触媒残基として働く Lys 残基の推定も行った。これは、立体構造を基にした薬剤開発に対して大きく貢献し、より効果的で効率的なドラッグデザインが可能となるだろう。

さらに、SHMT に関しては、基質である THF や生成物である 5,10-CH₂-THF 結合型の立体構造を初めて解明した。また、反応中間体であるホルムアルデヒドが結合した構造の獲得にも成功し、触媒反応機構及び基質認識機構の解明に大きく貢献した。

以上、2 種類の酵素において結晶構造を決定した。HSD においては Lys99 と Lys195 のどちらが酸塩基触媒残基であるかの完璧な根拠、SHMT においては時分割 X 線結晶構造解析中での時間分解能の向上という点で問題点が残っているものの、これらの酵素基質複合体構造の解明は、酵素化学、特に薬学的分野において大きな貢献となる。

謝辞

本研究は公益財団法人光科学研究センター(JASRI) SPring-8、BL26B1 及び BL26B2 において、課題番号 2017A2694、2018A2697 から得られたデータを使用している。

本研究を行うにあたり、タンパク質精製など多岐にわたってご指導いただきました大阪医科大学 生化学教室 生城 浩子 講師、矢野 貴人 教授、化学教室 林 秀行 教授、L-Asa の合成にご協力頂いた大阪市立大学大学院生体物質学研究室 臼杵 克之助 准教授、データ測定に際しご協力頂いた高エネルギー加速器研究機構 構造生物学研究センターの皆様、高輝度光科学研究センターSPring-8 のビームラインスタッフ馬場 清喜 博士、水野 伸宏 博士、奥村 英夫 博士に深く感謝いたします。

また、このような研究の機会を与えて下さり、終始ご指導いただきました宮原 郁子 准教授、神谷 信夫 教授、並びに構造生物化学研究室的の皆様にも深く感謝いたします。

参考文献

- 1 Voet, D., Voet, J. & Pratt, C. ヴォート基礎生化学第3版. (2013).
- 2 Toraya, T., Kitazume, T., Yoshimura, T., Sera, T. & Kamachi, T. 酵素－化学と工学. (2012).
- 3 Schmidt, A., Teeter, M., Weckert, E. & Lamzin, V. S. Crystal structure of small protein crambin at 0.48 Å resolution. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications* **67**, 424-428, doi:10.1107/s1744309110052607 (2011).
- 4 Hirano, Y., Takeda, K. & Miki, K. Charge-density analysis of an iron-sulfur protein at an ultra-high resolution of 0.48 Å. *Nature* **534**, 281-284, doi:10.1038/nature18001 (2016).
- 5 Fisher, H. F., Conn, E. E., Vennesland, B. & Westheimer, F. H. THE ENZYMATIC TRANSFER OF HYDROGEN .1. THE REACTION CATALYZED BY ALCOHOL DEHYDROGENASE. *Journal of Biological Chemistry* **202**, 687-697 (1953).
- 6 Pullman, M. E., Sanpietro, A. & Colowick, S. P. ON THE STRUCTURE OF REDUCED DIPHOSPHOPYRIDINE NUCLEOTIDE. *Journal of Biological Chemistry* **206**, 129-141 (1954).
- 7 Alan, F. タンパク質の構造と機構. (2005).
- 8 Shames, S. L., Ash, D. E., Wedler, F. C. & Villafranca, J. J. Interaction of aspartate and aspartate-derived antimetabolites with the enzymes of the threonine biosynthetic-pathway of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **259**, 5331-5339 (1984).
- 9 Chen, Z., Rappert, S. & Zeng, A. P. Rational Design of Allosteric Regulation of Homoserine Dehydrogenase by a Nonnatural Inhibitor L-Lysine. *Acs Synthetic Biology* **4**, 126-131, doi:10.1021/sb400133g (2015).
- 10 Sternberg, S. THE EMERGING FUNGAL THREAT. *Science* **266**, 1632-1634, doi:10.1126/science.7702654 (1994).
- 11 Yamaki, H. *et al.* The mechanism of antifungal action of (S)-2-amino-4-oxo-5-hydroxypentanoic acid, RI-331 - the inhibition of homoserine dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **168**, 837-843, doi:10.1016/0006-291x(90)92397-i (1990).
- 12 Jacques, S. L. *et al.* Enzyme-assisted suicide: Molecular basis for the antifungal activity of 5-hydroxy-4-oxonorvaline by potent inhibition of homoserine dehydrogenase. *Chemistry & Biology* **10**, 989-995, doi:10.1016/j.chembiol.2003.09.015 (2003).
- 13 Ejim, L. *et al.* New phenolic inhibitors of yeast homoserine dehydrogenase.

- Bioorganic & Medicinal Chemistry* **12**, 3825-3830, doi:10.1016/j.bmc.2004.05.009 (2004).
- 14 Yamaguchi, H. *et al.* RI-331, a new antifungal antibiotic. *Annals of the New York Academy of Sciences* **544**, 188-190 (1988).
- 15 DeLaBarre, B., Thompson, P. R., Wright, G. D. & Berghuis, A. M. Crystal structures of homoserine dehydrogenase suggest a novel catalytic mechanism for oxidoreductases. *Nature Structural Biology* **7**, 238-244 (2000).
- 16 Hayashi, J. *et al.* Crystal Structures of a Hyperthermophilic Archaeal Homoserine Dehydrogenase Suggest a Novel Cofactor Binding Mode for Oxidoreductases. *Scientific Reports* **5**, 11674, doi:10.1038/srep11674 (2015).
- 17 Ogata, K. *et al.* Inhibition of homoserine dehydrogenase by formation of a cysteine-NAD covalent complex. *Scientific Reports* **8**, 5749, doi:10.1038/s41598-018-24063-1 (2018).
- 18 Paris, S., Viemon, C., Curien, G. & Dumas, R. Mechanism of control of *Arabidopsis thaliana* aspartate kinase-homoserine dehydrogenase by threonine. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 5361-5366, doi:10.1074/jbc.M207379200 (2003).
- 19 Sakaki, Y. A new lipid-containing phage infecting acidophilic thermophilic bacteria. *Journal of Virology* **15**, 1449-1453 (1974).
- 20 森川太一郎 高度好熱菌由来ホモセリン脱水素酵素の結晶学的研究. 大阪市立大学大学院理学研究科修士論文 (2004).
- 21 森まり萌 ホモセリン脱水素酵素の結晶学的研究. 大阪市立大学大学院理学研究科修士論文 (2011).
- 22 Navratna, V., Reddy, G. & Gopal, B. Structural basis for the catalytic mechanism of homoserine dehydrogenase. *Acta Crystallographica Section D-Structural Biology* **71**, 1216-1225, doi:10.1107/s1399004715004617 (2015).
- 23 Winn, M. D. *et al.* Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **67**, 235-242, doi:10.1107/s0907444910045749 (2011).
- 24 Vagin, A. & Teplyakov, A. Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **66**, 22-25, doi:10.1107/s0907444909042589 (2010).
- 25 Murshudov, G. N. *et al.* REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **67**, 355-367, doi:10.1107/s0907444911001314 (2011).
- 26 Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **66**, 486-501,

- doi:10.1107/s0907444910007493 (2010).
- 27 大橋裕二 X線結晶構造解析. (2005).
- 28 David, B. 生命系のためのX線解析入門. (2004).
- 29 平山令明 化学・薬学のためのX線解析入門. (2006).
- 30 大場茂, 植松秀裕 X線結晶構造解析入門. (2014).
- 31 Bernhard, R. *Biomolecular Crystallography: Principles, Practice and Application to Structural Biology*. (2009).
- 32 Halle, B. Biomolecular cryocrystallography: Structural changes during flash-cooling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 4793-4798, doi:10.1073/pnas.0308315101 (2004).
- 33 Otwinowski, Z. & Minor, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Macromolecular Crystallography, Pt A* **276**, 307-326, doi:10.1016/s0076-6879(97)76066-x (1997).
- 34 Rossmann, M. G. & Argos, P. The taxonomy of binding-sites in proteins. *Molecular and Cellular Biochemistry* **21**, 161-182 (1978).
- 35 Lesk, A. M. NAD-binding domains of dehydrogenases. *Current Opinion in Structural Biology* **5**, 775-783, doi:10.1016/0959-440x(95)80010-7 (1995).
- 36 Clarke, A. R., Atkinson, T. & Holbrook, J. J. From analysis to synthesis - new ligand-binding sites on the lactate-dehydrogenase framework .1. *Trends in Biochemical Sciences* **14**, 101-105, doi:10.1016/0968-0004(89)90131-x (1989).
- 37 Cortes, A. *et al.* Charge balance in the alpha-hydroxyacid dehydrogenase vacuole - an acid test. *Protein Science* **1**, 892-901, doi:10.1002/pro.5560010707 (1992).
- 38 Colby, T. D., Bahnson, B. J., Chin, J. K., Klinman, J. P. & Goldstein, B. M. Active site modifications in a double mutant of liver alcohol dehydrogenase: Structural studies of two enzyme-ligand complexes. *Biochemistry* **37**, 9295-9304, doi:10.1021/bi973184b (1998).
- 39 Cameron, A. *et al.* Identification and activity of a series ofazole-based compounds with lactate dehydrogenase-directed anti-malarial activity. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 31429-31439, doi:10.1074/jbc.M402433200 (2004).
- 40 Tanaka, N. *et al.* Crystal structure of the ternary complex of mouse lung carbonyl reductase at 1.8 angstrom resolution: The structural origin of coenzyme specificity in the short-chain dehydrogenase/reductase family. *Structure* **4**, 33-45, doi:10.1016/s0969-2126(96)00007-x (1996).
- 41 Parkkinen, T. *et al.* Crystal Structure of Uronate Dehydrogenase from *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 27294-27300, doi:10.1074/jbc.M111.254854 (2011).

- 42 Goto, M. *et al.* Crystal structures of Delta(1)-piperideine-2-carboxylate/Delta(1)-pyrroline-2-carboxylate reductase belonging to a new family of NAD(P)H-dependent oxidoreductases - Conformational change, substrate recognition, and stereochemistry of the reaction. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 40875-40884, doi:10.1074/jbc.M507399200 (2005).
- 43 Jacques, S. L., Ejim, L. J. & Wright, G. D. Homoserine dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*: kinetic mechanism and stereochemistry of hydride transfer. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1544**, 42-54, doi:10.1016/s0167-4838(00)00202-8 (2001).
- 44 水田啓文 基質複合体構造に基づくホモセリン脱水素酵素の反応機構解明. 大阪市立大学大学院理学研究科修士論文 (2018).
- 45 Plapp, B. V. & Ramaswamy, S. Atomic-Resolution Structures of Horse Liver Alcohol Dehydrogenase with NAD(+) and Fluoroalcohols Define Strained Michaelis Complexes. *Biochemistry* **51**, 4035-4048, doi:10.1021/bi300378n (2012).
- 46 Chapman, A. D. M., Cortes, A., Dafforn, T. R., Clarke, A. R. & Brady, R. L. Structural basis of substrate specificity in malate dehydrogenases: Crystal structure of a ternary complex of porcine cytoplasmic malate dehydrogenase, alpha-ketomalonate and tetrahydroNAD. *Journal of Molecular Biology* **285**, 703-712, doi:10.1006/jmbi.1998.2357 (1999).
- 47 Faucher, F. *et al.* Mouse 17 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C21) binds steroids differently from other aldo-keto reductases: Identification and characterization of amino acid residues critical for substrate binding. *Journal of Molecular Biology* **369**, 525-540, doi:10.1016/j.jmb.2007.03.058 (2007).
- 48 Plapp, B. V. Conformational changes and catalysis by alcohol dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **493**, 3-12, doi:10.1016/j.abb.2009.07.001 (2010).
- 49 Filling, C. *et al.* Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 25677-25684, doi:10.1074/jbc.M202160200 (2002).
- 50 Percudani, R. & Peracchi, A. A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes. *Embo Reports* **4**, 850-854, doi:10.1038/sj.embor.embor914 (2003).
- 51 林秀行 ピリドキサル酵素の反応機構. *生化学* **86**, 214-231 (2014).
- 52 Mozzarelli, A. & Bettati, S. Exploring the pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes. *Chemical Record* **6**, 275-287, doi:10.1002/tcr.20094 (2006).
- 53 Angelaccio, S. *et al.* SERINE HYDROXYMETHYLTRANSFERASE - ORIGIN OF SUBSTRATE-SPECIFICITY. *Biochemistry* **31**, 155-162, doi:10.1021/bi00116a023

- (1992).
- 54 Schirch, L. SERINE HYDROXYMETHYLTRANSFERASE. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* **53**, 83-112 (1982).
- 55 Schirch, V. & Szebenyi, D. M. E. Serine hydroxymethyltransferase revisited. *Current Opinion in Chemical Biology* **9**, 482-487, doi:10.1016/j.cbpa.2005.08.017 (2005).
- 56 Cossins, E. A. & Chen, L. F. Folates and one-carbon metabolism in plants and fungi. *Phytochemistry* **45**, 437-452, doi:10.1016/s0031-9422(96)00833-3 (1997).
- 57 Hanson, A. D. & Roje, S. One-carbon metabolism in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 119-137, doi:10.1146/annurev.arplant.52.1.119 (2001).
- 58 Christensen, K. E. & MacKenzie, R. E. Mitochondrial one-carbon metabolism is adapted to the specific needs of yeast, plants and mammals. *Bioessays* **28**, 595-605, doi:10.1002/bies.20420 (2006).
- 59 Schwertz, G. *et al.* Antimalarial Inhibitors Targeting Serine Hydroxymethyltransferase (SHMT) with in Vivo Efficacy and Analysis of their Binding Mode Based on X-ray Cocrystal Structures. *Journal of Medicinal Chemistry* **60**, 4840-4860, doi:10.1021/acs.jmedchem.7b00008 (2017).
- 60 Witschel, M. C. *et al.* Inhibitors of Plasmodial Serine Hydroxymethyltransferase (SHMT): Cocrystal Structures of Pyrazolopyrans with Potent Blood- and Liver-Stage Activities. *Journal of Medicinal Chemistry* **58**, 3117-3130, doi:10.1021/jm501987h (2015).
- 61 Amelio, I., Cutruzzola, F., Antonov, A., Agostini, M. & Melino, G. Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends in Biochemical Sciences* **39**, 191-198, doi:10.1016/j.tibs.2014.02.004 (2014).
- 62 Jain, M. *et al.* Metabolite Profiling Identifies a Key Role for Glycine in Rapid Cancer Cell Proliferation. *Science* **336**, 1040-1044, doi:10.1126/science.1218595 (2012).
- 63 Labuschagne, C. F., van den Broek, N. J. F., Mackay, G. M., Vousden, K. H. & Maddocks, O. D. K. Serine, but Not Glycine, Supports One-Carbon Metabolism and Proliferation of Cancer Cells. *Cell Reports* **7**, 1248-1258, doi:10.1016/j.celrep.2014.04.045 (2014).
- 64 Giardina, G. *et al.* The catalytic activity of serine hydroxymethyltransferase is essential for denovo nuclear dTMP synthesis in lung cancer cells. *Febs Journal* **285**, 3238-3253, doi:10.1111/febs.14610 (2018).
- 65 Renwick, S. B., Snell, K. & Baumann, U. The crystal structure of human cytosolic serine hydroxymethyltransferase: a target for cancer chemotherapy. *Structure* **6**,

- 1105-1116, doi:10.1016/s0969-2126(98)00112-9 (1998).
- 66 Daidone, F. *et al.* In silico and in vitro validation of serine hydroxymethyltransferase as a chemotherapeutic target of the antifolate drug pemetrexed. *European Journal of Medicinal Chemistry* **46**, 1616-1621, doi:10.1016/j.ejmech.2011.02.009 (2011).
- 67 Paone, A. *et al.* SHMT1 knockdown induces apoptosis in lung cancer cells by causing uracil misincorporation. *Cell Death & Disease* **5**, doi:10.1038/cddis.2014.482 (2014).
- 68 湯川直樹 基質アナログ結合型の結晶構造から解明されたセリンヒドロキシメチル基転移酵素の反応機構. 大阪市立大学大学院理学研究科修士論文 (2014).
- 69 主馬野祐希 基質複合体の構造に基づく Fold-type I PLP 酵素の反応制御機構の解明. 大阪市立大学大学院理学研究科修士論文 (2016).
- 70 Rao, J. V. K., Prakash, V., Rao, N. A. & Savithri, H. S. The role of Glu74 and Tyr82 in the reaction catalyzed by sheep liver cytosolic serine hydroxymethyltransferase. *European Journal of Biochemistry* **267**, 5967-5976, doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01667.x (2000).
- 71 Singer, P. T., Smalas, A., Carty, R. P., Mangel, W. F. & Sweet, R. M. THE HYDROLYTIC WATER MOLECULE IN TRYPSIN, REVEALED BY TIME-RESOLVED LAUE CRYSTALLOGRAPHY. *Science* **259**, 669-673, doi:10.1126/science.8430314 (1993).
- 72 Blow, D. 生命系のための X 線解析入門. (2004).
- 73 南後恵理子, 中根崇智, 岩田想 SACLA におけるシリアルフェムト秒結晶構造解析の現状と展望. *日本結晶学会誌* **59**, 12-17 (2017).
- 74 Tenboer, J. *et al.* Time-resolved serial crystallography captures high-resolution intermediates of photoactive yellow protein. *Science* **346**, 1242-1246, doi:10.1126/science.1259357 (2014).
- 75 Barends, T. R. M. *et al.* Direct observation of ultrafast collective motions in CO myoglobin upon ligand dissociation. *Science* **350**, 445-450, doi:10.1126/science.aac5492 (2015).
- 76 Nango, E. *et al.* A three-dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin. *Science* **354**, 1552-1557, doi:10.1126/science.aah3497 (2016).
- 77 Stagno, J. R. *et al.* Structures of riboswitch RNA reaction states by mix-and-inject XFEL serial crystallography. *Nature* **541**, 242-+, doi:10.1038/nature20599 (2017).
- 78 Scarsdale, J. N., Radaev, S., Kazanina, G., Schirch, V. & Wright, H. T. Crystal structure at 2.4 angstrom resolution of E-coli serine hydroxymethyltransferase in complex with glycine substrate and 5-formyl tetrahydrofolate. *Journal of Molecular Biology* **296**, 155-168, doi:10.1006/jmbi.1999.3453 (2000).
- 79 Pai, V. R. *et al.* Structural and functional studies of *Bacillus stearothermophilus*

- serine hydroxymethyltransferase: the role of Asn(341), Tyr(60) and Phe(351) in tetrahydrofolate binding. *Biochemical Journal* **418**, 635-642, doi:10.1042/bj20081739 (2009).
- 80 Jiang, W., Xia, B. Z. & Liu, Z. D. A serine hydroxymethyltransferase from marine bacterium *Shewanella* algae: Isolation, purification, characterization and L-serine production. *Microbiological Research* **168**, 477-484, doi:10.1016/j.micres.2013.04.002 (2013).
- 81 Zhao, G. H. *et al.* Preparation of optically active beta-hydroxy-alpha-amino acid by immobilized *Escherichia coli* cells with serine hydroxymethyl transferase activity. *Amino Acids* **40**, 215-220, doi:10.1007/s00726-010-0637-9 (2011).
- 82 Fujioka, M. PURIFICATION AND PROPERTIES OF SERINE HYDROXYMETHYLASE FROM SOLUBLE AND MITOCHONDRIAL FRACTIONS OF RABBIT LIVER. *Biochimica Et Biophysica Acta* **185**, 338-&, doi:10.1016/0005-2744(69)90427-6 (1969).
- 83 Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **66**, 125-132, doi:10.1107/s0907444909047337 (2010).
- 84 Di Salvo, M. L. *et al.* Structure-Based Mechanism for Early PLP-Mediated Steps of Rabbit Cytosolic Serine Hydroxymethyltransferase Reaction. *Biomed Research International*, doi:10.1155/2013/458571 (2013).
- 85 Szebenyi, D. M. E., Liu, X. W., Kriksunov, I. A., Stover, P. J. & Thiel, D. J. Structure of a murine cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase quinonoid ternary complex: Evidence for asymmetric obligate dimers. *Biochemistry* **39**, 13313-13323, doi:10.1021/bi000635a (2000).
- 86 Chitnumsub, P. *et al.* Structures of *Plasmodium vivax* serine hydroxymethyltransferase: implications for ligand-binding specificity and functional control. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **70**, 3177-3186, doi:10.1107/s1399004714023128 (2014).
- 87 Dunathan, H. C. CONFORMATION AND REACTION SPECIFICITY IN PYRIDOXAL PHOSPHATE ENZYMES. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **55**, 712-&, doi:10.1073/pnas.55.4.712 (1966).
- 88 Fratte, S. D., Iurescia, S., Angelaccio, S., Bossa, F. & Schirch, V. THE FUNCTION OF ARGININE-363 AS THE SUBSTRATE CARBOXYL-BINDING SITE IN *ESCHERICHIA-COLI* SERINE HYDROXYMETHYLTRANSFERASE. *European Journal of Biochemistry* **225**, 395-401, doi:10.1111/j.1432-1033.1994.00395.x (1994).
- 89 Jagath, J. R., Rao, N. A. & Savithri, H. S. Role of Arg-401 of cytosolic serine

- hydroxymethyltransferase in subunit assembly and interaction with the substrate carboxy group. *Biochemical Journal* **327**, 877-882, doi:10.1042/bj3270877 (1997).
- 90 Matthews, R. G. & Drummond, J. T. PROVIDING ONE-CARBON UNITS FOR BIOLOGICAL METHYLATIONS - MECHANISTIC STUDIES ON SERINE HYDROXYMETHYLTRANSFERASE, METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE, AND METHYLTETRAHYDROFOLATE-HOMOCYSTEINE METHYLTRANSFERASE. *Chemical Reviews* **90**, 1275-1290, doi:10.1021/cr00105a010 (1990).
- 91 Sopitthummakhun, K., Maenpuen, S., Yuthavong, Y., Leartsakulpanich, U. & Chaiyen, P. Serine hydroxymethyltransferase from *Plasmodium vivax* is different in substrate specificity from its homologues. *Febs Journal* **276**, 4023-4036, doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07111.x (2009).
- 92 Chiba, Y. *et al.* Mechanism for folate-independent aldolase reaction catalyzed by serine hydroxymethyltransferase. *Febs Journal* **279**, 504-514, doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08443.x (2012).
- 93 Rao, N. A., Ambili, M., Jala, V. R., Subramanya, H. S. & Savithri, H. S. Structure-function relationship in serine hydroxymethyltransferase. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* **1647**, 24-29, doi:10.1016/s1570-9639(03)00043-8 (2003).
- 94 Grishin, N. V., Phillips, M. A. & Goldsmith, E. J. MODELING OF THE SPATIAL STRUCTURE OF EUKARYOTIC ORNITHINE DECARBOXYLASES. *Protein Science* **4**, 1291-1304, doi:10.1002/pro.5560040705 (1995).
- 95 Jala, V. R., Rao, N. A. & Savithri, H. S. Identification of amino acid residues, essential for maintaining the tetrameric structure of sheep liver cytosolic serine hydroxymethyltransferase, by targeted mutagenesis. *Biochemical Journal* **369**, 469-476, doi:10.1042/bj20021160 (2003).
- 96 Dajnowicz, S. *et al.* Direct evidence that an extended hydrogen-bonding network influences activation of pyridoxal 5-phosphate in aspartate aminotransferase. *Journal of Biological Chemistry* **292**, 5970-5980, doi:10.1074/jbc.M116.774588 (2017).

補遺

L-Ser を反応トリガーとした時間分割的 X 線結晶構造解析

pH ジャンプ以外の時分割 X 線結晶構造解析手法として、DNA polymerase や ADP-ribose pyrophosphatase といった金属イオンを補因子とする酵素では、金属イオンをタンパク質結晶にソーキングさせることで反応を開始させ、時分割 X 線結晶構造解析を行ったという報告がある^{1,2}。これを *Tt*SHMT に適用し、直接タンパク質結晶に基質をソーキングさせることで、時間分割的な X 線結晶構造解析を試みた。*P. vivax* 由来 SHMT において、その触媒反応は、基質の結合の順番が決まっていない、ランダム機構であることが報告されている³。このため、より分子量の小さい基質である L-Ser を反応トリガーとした。実験手法としては、まず、*Tt*SHMT 結晶にソーキングによって THF を結合させ、後に L-Ser をソーキングすることにより、反応を開始させた。つまり、L-Ser をソーキングした時点を 0 秒として、そこから一定時間（数秒～）経過後に結晶を凍結させ、反応を停止させることで時間分割的な X 線結晶構造解析を行った。

A1 実験

THF 結合型 *Tt*SHMT 結晶に、L-Ser をソーキングしてから 75 秒経過した後に凍結させたものと、570 秒経過した後に凍結させたものの 2 種類について X 線結晶構造解析を行った。この時、4°C という低温条件下においてソーキングを行うことで、反応速度が遅くなるように調節した。

L-Ser を 75 秒ソーキングしたものと、570 秒ソーキングしたものでは、L-Ser のソーキング時間以外に実験条件の違いはない。その実験条件を示す。4°C の低温状態で *Tt*SHMT の結晶に THF をソーキングした。THF ソーキング溶液として、THF を 30 mM となるように、50 mM CAPS (pH 10.0)、20 μ M PLP、2.8 M ギ酸ナトリウムを含む溶液に溶かした。これにより獲得した THF 結合型 *Tt*SHMT の結晶に、さらに L-Ser を 75 秒、もしくは 570 秒ソーキングした。L-Ser のソーキングも 4°C に調節されたグローブボックス内で行った。L-Ser ソーキング溶液として L-Ser 濃度が 470 mM となるように、50 mM CAPS (pH 10.0)、20 μ M PLP、2.8 M ギ酸ナトリウムを含む溶液に溶かした。調製した結晶を高輝度光科学センター SPring-8 BL26B2 にて測定を行い、75 秒ソーキングしたものでは 0.98 Å、570 秒ソーキングしたものでは 1.08 Å の分解能で構造を決定した。表 A1.1 に統計値と解析結果を示す

表 A1.1 統計値と解析結果

	時間分割的	
	THF 後Ser75sec pH 10.0	THF 後Ser570sec pH 10.0
Data collection	SPring-8	SPring-8
Beamline	BL26B2	BL26B2
Wavelength(Å)	0.9	0.9
Space group	$P2_1$	$P2_1$
Unit cell parameters		
a (Å)	58.1	58
b (Å)	83.1	83
c (Å)	93.9	93.7
β (°)	91.3	91.4
Resolution range(Å)	50.0-0.98 (1.04-0.98)	50.0-1.08 (1.15-1.08)
Total No. of reflections	2075997	1562862
No. of unique reflections	507691	377850
Multiplicity	4.1(3.9)	4.1(4.0)
Completeness(%)	99.8(99.5)	99.9(99.7)
R_{merge} (%)	9.5(49.6)	5.9(55.1)
$I/\sigma(I)$	8.4(2.4)	13(2.3)
Refinement		
Resolution range(Å)	50-0.98	50-1.08
R (%)	10.9	11
R_{free} (%)	12.2	12.8
No. of atoms	7489	7287
No. of water molecules	877	767
No. of ligands	Na ⁺ ion, 4 PLP, 2 PLP_Gly, 1 Ser, 1 THF, 1 formate, 3 glycerol, 1	Na ⁺ ion, 5 PLP, 1 PLP_Ser, 1 Ser, 1 THF, 1 5,10M-THF, 1 glycerol, 1
B -factor(Å ²)		
Protein	9.5	11.1
Na ⁺ ion	14.8	19.9
Water	23.0	23.9
PLP	5.4	7.7
Ser	13.5	14.1
Gly	-	-
PLP_Ser	-	7.5
PLP_Gly	8.0	-
THF	10.6	18.2
5F-THF	-	-
5,10M-THF	-	16.7
formaldehyde	-	-
formate	10.5	-
acetate	-	-
CAPS	-	-
glycerol	21.6	26.2
R.m.s.d.		
Bond lengths(Å)	0.028	0.026
Bond angles(°)	2.4	2.3
Ramachandran plot		
Preffered regions(%)	96.98	96.99
Allowed regions(%)	2.59	2.46
Outliers(%)	0.43	0.55

5F-THF : 5-ホルミルテトラヒドロ葉酸、5,10M-THF : 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸

A2 結果・考察

A2.1 L-Ser を反応トリガーとした時間分割的 X 線結晶構造解析

3.5 節に述べたように、すでに目標としていた反応中間体結合型の結晶構造は獲得している。しかし、時間分割的な X 線結晶構造解析には成功しておらず、もしこれが成功すれば触媒反応機構の理解がより深まり、酸塩基触媒残基の同定も可能となる。

そこで L-Ser を反応トリガーとすることで、時間分割的 X 線結晶構造解析を試みた。まず、*Tt*SHMT 結晶にソーキングによって THF を結合させ、後に L-Ser をソーキングすることにより、反応を開始させた。L-Ser をソーキングした時点を 0 秒として、一定時間経過後に凍結し、反応を停止させることで時間分割的な X 線結晶構造解析を行った。また、上述の実験で pH 10.0 の条件において反応中間体であるホルムアルデヒドが結合したモデルを構築できたことから、この実験においても pH 10.0 の条件で行った。

A2.1.1 L-Ser を 75 sec ソーキングした *Tt*SHMT

A2.1.1.1 L-Ser を 75 sec ソーキングした *Tt*SHMT の結晶構造

構造解析の結果、その活性中心では、PLP_Gly のモデルを 30%の占有率で構築することができた (図 A2.1)。しかし、L-Ser が完全には結合せず、70%の占有率で internal aldimine のモデルを構築した。また、THF は 100%の占有率でモデルを構築した。結晶内に完全に L-Ser が浸透していないために、70%が internal aldimine の状態で存在していることが予想される。また、L-Ser のヒドロキシメチル基のモデルを構築できなかったが、これは反応が進行し、結晶中で複数の反応中間体が存在するが、その占有率が低すぎるためにモデルを構築できないことが理由だと考えられる。

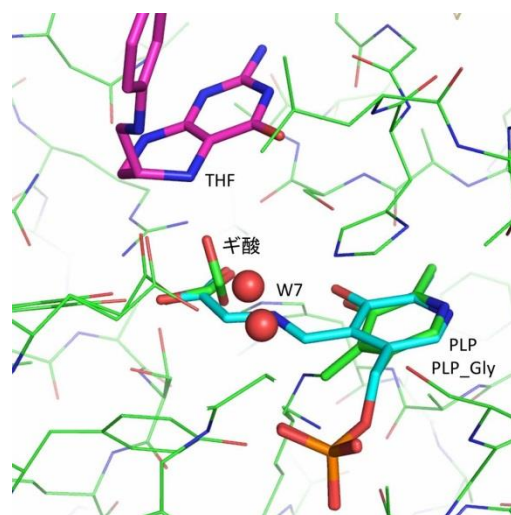


図 A2.1 L-Ser を 75 sec ソーキングした *Tt*SHMT の結晶構造

THF をマゼンタのスティックモデル、PLP_Gly をシアン色のスティックモデル、PLP とギ酸を緑色のスティックモデルで示す。

A2.1.1.2 L-Ser を 75 sec ソーキングした *T*%SHMT 結晶の吸収スペクトル

X線回折データ収集後、L-Ser を 75 sec ソーキングした *T*%SHMT 結晶の吸収スペクトルを測定した。その結果を図 A2.2 に示す。420 nm と 440 nm にピークが確認されたが、これは、internal aldimine のピークと external aldimine のピークだと考えられる。また、わずかに 491 nm にキノノイド中間体と考えられる吸収が確認された。図 3.2 に示した *T*%SHMT に Gly と THF を加えた場合の、溶液状態での吸収スペクトルでもよく似た位置にピークが確認された。

このため、Gly_PLP はわずかにキノノイド中間体の状態で存在していることが考えられる。

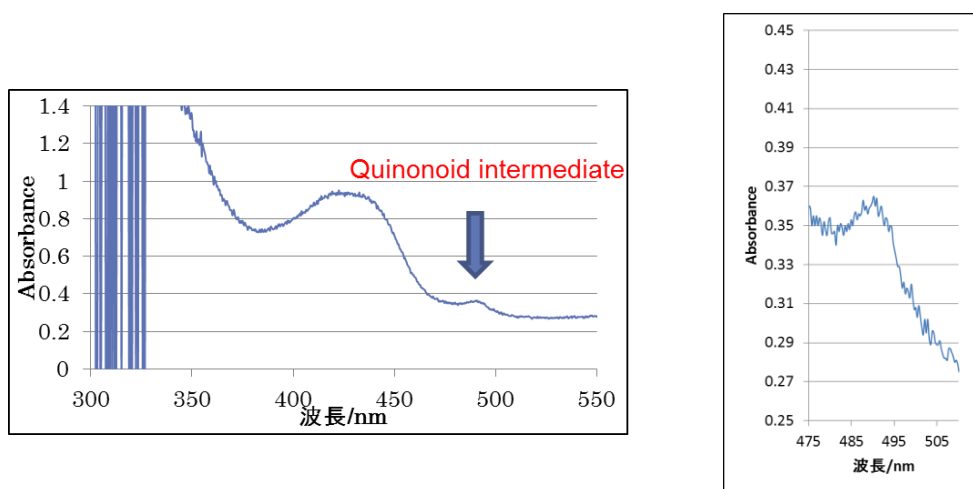


図 A2.2 L-Ser を 75 sec ソーキングした結晶の吸収スペクトル

A2.1.2 L-Ser を 570 sec ソーキングした *Tt*SHMT

A2.1.2.1 L-Ser を 570 sec ソーキングした *Tt*SHMT の結晶構造

構造解析の結果、その活性中心では L-Ser は 100%の占有率で PLP とシッフ塩基を形成し、external aldimine として存在しているモデルを構築することができた。それに対し、THF は生成物である 5,10-CH₂-THF と混在した構造であり、それぞれ 20%と 60%の占有率でアサインした。THF と 5,10-CH₂-THF の占有率を足し合わせても 100%にはならないが、これは反応が完全に終了し、*Tt*SHMT から脱離したものが 20%存在することが予想される。また、5,10-CH₂-THF が 60%存在しているのに対し、L-Ser のモデルを 100%アサインしている。つまり、結晶構造中では生成物である 5,10-CH₂-THF と、基質である L-Ser が結合した構造が 60%の占有率で存在することを意味する。L-Ser がソーキング溶液に大過剰含まれているため、反応が終了し 5,10-CH₂-THF が解離する前に、Gly と L-Ser の交換が発生していることが予想される。これは、*Tt*SHMT が酵素基質複合体を形成する際に、基質の結合順序が決まっておらず、ランダム Bi Bi 機構で反応が進行することを示している。

また、この構造中でも反応中間体のモデルを構築することができなかった。80%の THF が反応を終了してしまったために、反応中間体を分離できなかったことが予想される。

A2.1.2.2 L-Ser を 570 sec ソーキングした *Tt*SHMT 結晶の吸収スペクトル

X線回折データ収集後、L-Ser を 570 sec ソーキングした *Tt*SHMT 結晶の吸収スペクトルを測定した。その結果を図 A2.3 に示す。420 nm と 440 nm にピークが確認されたが、これは、internal aldimine のピークと external aldimine のピークだと考えられる。

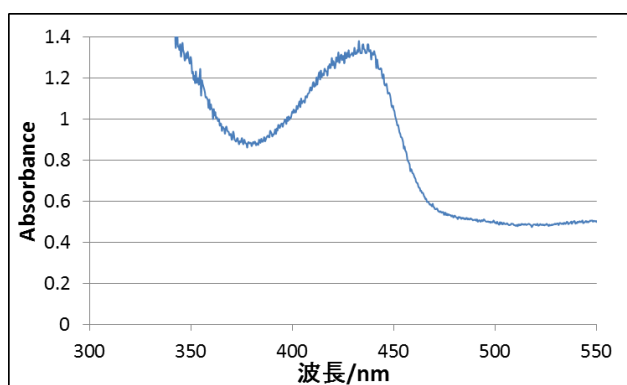


図 A2.3 L-Ser を 570 sec ソーキングした *Tt*SHMT 結晶の吸収スペクトル

A2.1.3 L-Ser を反応トリガーとした時間分割的 X 線結晶構造解析のまとめ

75 sec ソーキングした構造では生成物である 5,10-CH₂-THF が結合していなかったのに対し、570 sec ソーキングした構造では 5,10-CH₂-THF が 60%の占有率で結合しており、さらに 20%は反応が完全に終了し T₂SHMT から解離していた。このことから、L-Ser が活性部位に結合して反応が進行していく過程を捉えたことに成功していると言える。しかし、結晶の吸収スペクトルではキノノイド中間体の存在を確認できたものの、結晶構造中で THF 側の反応中間体構造を捉えることはできなかった。結晶中で反応過程が揃っておらず、反応中間体の占有率が少なすぎるのが原因であると予想できる。これを解決することができれば、時間分解能の向上が見込まれ、反応中間体構造の分離も可能になるだろう。

A2.2 時間分割 X 線結晶構造解析の課題

A2.2.1 不純物の混在

THF を *Tt*SHMT の結晶に長時間ソーキングすると、たびたび、THF が副反応を起こし、不純物として *Tt*SHMT に結合してしまうことがあった (図 A2.4)。この不純物は THF と同様に *Tt*SHMT に認識されるため、THF の結合を阻害することが問題となっていた。この不純物の電子密度は、THF の N5 原子から 2 つほど原子が伸びたようなものとなっており、その先端部分は Glu53 の側鎖のカルボキシ基と相互作用するような位置に存在していた。このため先端部分は、これと水素結合できるような、電気陰性度の大きい原子であることが予想される。この電子密度によく合致する分子を検討したところ、5-CHO-THF が不純物として存在する可能性が示唆され、図 3.27 でも 5-CHO-THF をモデルとしている。しかし、電子密度以外に根拠はなく、別の分子である可能性もある。また、THF がソーキング溶液に含まれる何らかの分子と反応して、不純物が生じるはずであるが、これが何と反応しているかは不明である。ギ酸イオン、もしくは酢酸イオンが反応している可能性が考えられたが、これらをソーキング溶液から排除しても、変わらず不純物は存在した。このため、クエン酸イオンか THF、もしくはこれらの分解物が原因となって 5-CHO-THF 様の不純物が生じたのだと考えられる。

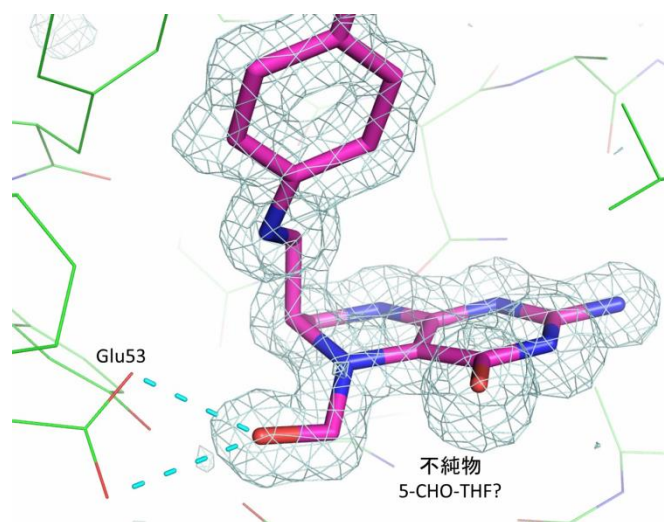


図 A2.4 確認された不純物

THF と L-Ser を 37 時間ソーキングしたときに見られた構造。不純物をマゼンタのスティックモデルで示す。不純物の *For-Fc* オミットマップを 3σ のマップレベルで示す。Glu53 との相互作用をシアンの破線で示す。

A2.2.2 時間分解能の向上

L-Ser を反応トリガーとした時間分割的な X 線結晶構造解析において、反応中間体のモデルを構築することはできなかった。触媒反応速度が速すぎるために、反応中間体を捉えることができない可能性がある。また、現在 50~100 μm 程度の厚さの板状結晶を用いて実験を行っているが、ソーキングをする際に結晶の表面と中心付近において、L-Ser の結晶への浸透速度が、触媒反応速度に対して十分速くないことにより、結晶表面付近と中心付近で反応状態に差が見られたために、反応中間状態を獲得することができなかったのだと考えられる。これを防ぐために、①触媒反応速度を下げる、②L-Ser の結晶への浸透速度を上昇させる、といった方法が考えられる。まず、①触媒反応速度を下げる手法であるが、pH 10.0、4°C の条件下で行っても触媒反応速度は依然として速いままであった。pH 11.0 の条件下では、3.5.3 節に示したように THF が T β SHMT 結晶に結合しなかったため、pH をさらに上げることで、至適条件から外すことは難しいことが考えられる。また、4°C よりもさらに低温状態にすると、触媒反応速度は下がるはずである。すなわち、酸性の pH 条件下で実験を行う、もしくは温度を 4°C よりもさらに低温状態にすることにより、触媒反応速度が下がる可能性はある。次に、②L-Ser の結晶への浸透速度を上昇させる (L-Ser の T β SHMT への結合速度を上昇させる) 方法であるが、単純にソーキングの際の L-Ser 濃度を上げる、T β SHMT 結晶を薄くする、といったことが考えられる。さらに、活性部位に存在する L-Ser 結合部位には、基質ソーキングの際に使用したギ酸イオン (酢酸イオン) が結合しており、これが L-Ser の結合を阻害している可能性が極めて高い。3.1 節に記したように、通常の結晶化条件では L-Ser 結合部位に硫酸イオンが結合してしまうため、それを排除するために 2.8 M という高濃度のギ酸ナトリウムや酢酸ナトリウムをソーキング溶液に使用している。そして、硫酸イオンを追い出す代わりに、ギ酸イオンや酢酸イオンが活性部位に結合してしまっている。濃度の調節や、別の塩をソーキング溶液に使用することで、活性部位から陰イオンが抜け、T β SHMT 結晶への L-Ser の結合速度が上昇することが期待できる。そして、結晶内で反応が一様に進行すれば反応中間体構造の分離が可能となる。

参考文献

- 1 Nakamura, T., Zhao, Y., Yamagata, Y., Hua, Y. J. & Yang, W. Watching DNA polymerase ϵ make a phosphodiester bond. *Nature* **487**, 196-U177, doi:10.1038/nature11181 (2012).
- 2 Furuike, Y., Akita, Y., Miyahara, I. & Kamiya, N. ADP-Ribose Pyrophosphatase Reaction in Crystalline State Conducted by Consecutive Binding of Two Manganese(II) Ions as Cofactors. *Biochemistry* **55**, 1801-1812, doi:10.1021/acs.biochem.5b00886 (2016).
- 3 Maenpuen, S., Amornwatcharapong, W., Krasatong, P., Sucharitakul, J., Palfey, B. A., Yuthavong, Y., Chitnumsub, P., Leartsakulpanich, U., and Chaiyen, P. (2015) Kinetic Mechanism and the Rate-limiting Step of Plasmodium vivax Serine Hydroxymethyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 8656-8665