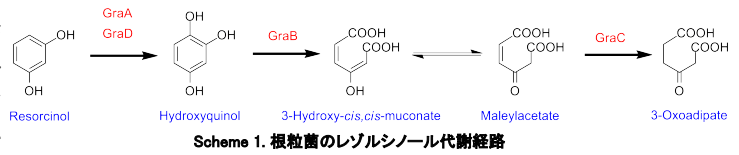


原子分子構造研究領域の研究紹介

先端ビームナノ科学センター 原子分子構造研究領域

レゾルシノール分解系酵素群の構造基盤研究

根粒菌 *Rhizobium* MTP-10005株のレゾルシノール代謝に関与する四種のタンパク質 [レゾルシノール水酸化酵素 (GraA, GraD)・ヒドロキシキノール1,2-二原子酸素添加酵素 (GraB)・マレイル酢酸還元酵素 (GraC)] の遺伝子が発見され、代謝経路がScheme 1 のように提案されている。本研究では、根粒菌の炭素源獲得に重要な役割を担っているレゾルシノール分解系酵素群を対象に、それらの相互関連性を総合的に理解することを目的として酵素の構造と機能・物性発現の関係について構造活性相関研究を行っている。



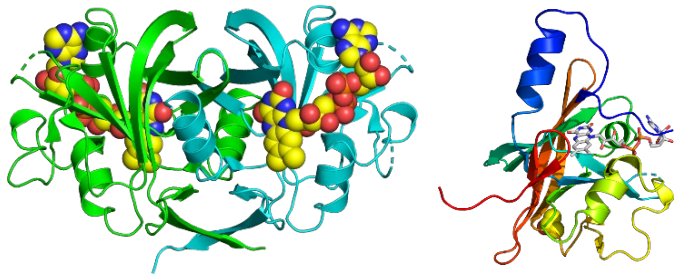
レゾルシノール水酸化酵素 (GraA, GraD)

レゾルシノール水酸化酵素は二成分系酵素で、酸素添加酵素コンポーネント (GraA) と還元酵素コンポーネント (GraD) の両者が伴って作用して酵素活性が発現される。

還元酵素コンポーネント (GraD)

分子置換法による位相決定を行い、分解能1.8 Å で構造を決定した。GraDはアミノ酸残基数179のサブユニット2個からなる二量体タンパク質で、各サブユニットにはFADを1分子ずつ結合している。

A鎖では、N末端ドメインがFADの上から覆いかぶさるような形で存在しているが、B鎖のN末端14残基の電子密度は見えない。



GraD-FAD複合体の二量体分子構造

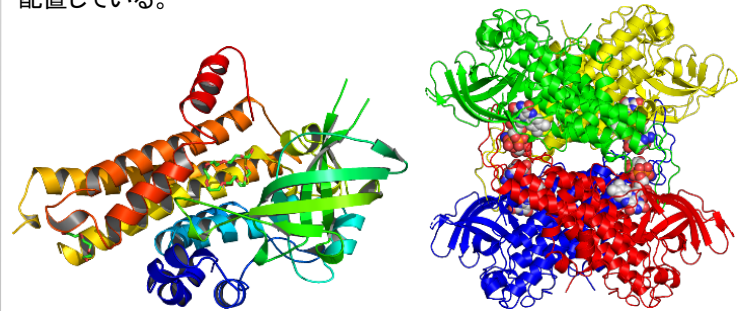
GraDのサブユニット構造

酸素添加酵素コンポーネント (GraA)

分子置換法による位相決定を行い、GraAのアポ体及びホロ体 (GraA-FAD複合体) の結晶構造を、それぞれ、分解能2.3 Å 及び3.2 Å で決定した。

GraAはアミノ酸残基数409のサブユニット4個からなる四量体タンパク質である。各サブユニットは、主にヘリックスからなるN末端ドメイン、中央ドメイン、長い α ヘリックス束からなるC末端ドメインの三つのドメインで形成されている。

ホロ体では、これら三つのドメインが囲む空間に補酵素FADが結合している。また、アポ体ではディスオーダーして見えなかった13残基のループ領域 (271-283) が、ホロ体ではFADを覆うように配置している。



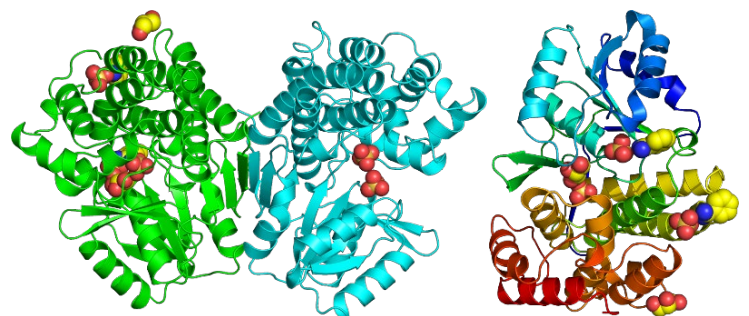
GraAのサブユニット構造 (アポ体)

GraAの四量体分子構造 (ホロ体)

マレイル酢酸還元酵素 (GraC)

水銀誘導体結晶を調製し、多波長異常分散法により位相を決定し、分解能1.5 Å で構造を決定した。GraCはアミノ酸残基数351のサブユニット2個からなる二量体タンパク質で、各サブユニットは α/β 構造のN末端ドメインとヘリックスが大部分を占めるC末端ドメインで形成されている。

2つのドメインの相対配置がサブユニット間で異なっている。ベンズアミジンやグリセロールが結合したA鎖ではClosed構造をとっており、これら両分子を結合していないB鎖はOpen構造をとっている。このことは、基質と補酵素が活性部位に結合したときにOpen構造からClosed構造へと構造変化することを示唆している



GraCの二量体分子構造

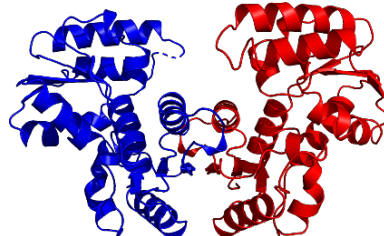
GraCのサブユニット構造

アスパラギン酸ラセマーゼの結晶構造解析

D-アミノ酸は生体内で重要な機能を担っており、アミノ酸ラセマーゼにより合成される。アミノ酸ラセマーゼはピリドキサルリン酸 (PLP) 依存型と非依存型に分類されるが、本研究では、PLP非依存型ラセマーゼである細菌由来アスパラギン酸ラセマーゼを対象に、その反応機構の解明と温度環境に対する適応戦略の解明を目的に結晶構造解析を行っている。

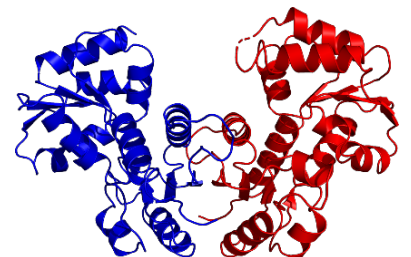
生育温度の異なる2種の最近由来アスパラギン酸ラセマーゼの結晶構造を分子置換法により決定し、構造比較を行った。

超好熱性古細菌 *Thermococcus litoralis* DSM 5473由来
アスパラギン酸ラセマーゼ (TIAspR)
生育温度: 約90°C



TIAspRの二量体分子構造

乳酸菌 *Lactobacillus sakei* NBRC 15893由来
アスパラギン酸ラセマーゼ (LsAspR)
生育温度: 4-30°C



LsAspRの二量体分子構造