解説

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの
3次元構造：そのアロステリック阻害機構

大阪大学大学院工学研究科 甲斐 泰, 松村浩由

京都大学大学院生命科学研究所 泉井 桂

The first crystal structure of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) has been determined by X-ray diffraction methods at 2.8 Å resolution using *Escherichia coli* PEPC complexed with L-aspartate, an allosteric inhibitor of all known PEPCs. The four subunits are arranged in a "dimer-of-dimers" form. The location of the catalytic site is suggested to be near the C-terminal side of the β -barrel. The binding site for L-aspartate is located about 20 Å away from the catalytic site and four residues (Lys773, Arg832, Arg587 and Asn881) are involved in effector binding. Considering the catalytically essential Arg587 is in a highly conserved glycine-rich loop, which is characteristic of PEPC, it seems that L-aspartate causes inhibition by removing this glycine-rich loop from the catalytic site.

phosphoenolpyruvate carboxylase / crystal structure / allosteric inhibition / active site structure

1. はじめに

近年における大気中の二酸化炭素濃度の急速な上昇は地球温暖化の主要因の一つとされている。一方、近未来には地球規模の食糧危機が訪れると危惧されている。この2つの問題を考えるとき、大気中のCO₂濃度の削減とその有機資源としての再利用のための新しい科学・技術の開発が、あらゆる理学・工学分野の研究者の緊急課題となっている。

さて、自然界において炭酸固定とその有機資源への再生という二役を一貫したプロセスの中で果たしているものは、光合成生物（高等植物を含む）だけである。光合成生物は、大気中に拡散してしまった低濃度のCO₂を回収することができ、加えて、光合成植物が炭酸固定プロセスを駆動するために必要とするエネルギーは、無尽蔵とも言える太陽光から供給されている。このような観点から、地球上で唯一独立栄養を行う光合成生物を工学的に利用することはきわめて有効な手段と考えられる。

藻類から高等植物に至る光合成生物のCO₂固定の分子機構を解明することは、その炭酸固定能を増強し、

CO₂濃度の増加に歯止めをかけると同時に、固定した炭素資源を有用物質に高い効率で変換する生物を創出するための基礎を築く研究として、重要と考えられる。このような観点から我々は、C₄光合成やCAM光合成において主役を演じるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（PEPC）の3次元分子構造解析に取り組み、1999年に世界で初めて、大腸菌由来PEPCの分子構造をアロステリック阻害分子であるアスパラギン酸との複合体の形で決定することに成功した¹⁾。PEPCは、グルコース6-リン酸やアセチル-CoAなどの活性化因子が存在すると炭酸固定活性を示すが、L-アスパラギン酸やL-リンゴ酸などの活性阻害因子が存在すると活性を示さない。このことから、活性化因子や活性阻害因子が酵素と複合体を作ることによって、酵素の基質結合部位をはじめとする活性部位が構造制御を受け、活性が調節されていると考えることができる。そのため、種々の活性調節因子と酵素との相互作用や、その結果もたらされる構造や酵素活性の変化について詳しく研究し、酵素のアロステリック活性制御を明らかにすることは大変興味深い。本稿では、おもに、PEPCの3次元構造と、L-アスパラギン酸によってもたらされるアロ

Three-Dimensional Structure of Phosphoenolpyruvate Carboxylase: Its Allosteric Inhibition Mechanism

Yasushi KAI*, Hiroyoshi MATSUMURA* and Katsura IZUI**

* Graduate School of Engineering, Osaka University

** Graduate School of Biostudies, Kyoto University

ステリック阻害の分子機構について解説する。

2. PEPC の結晶構造解析

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC; EC4.1.1.31) は, Mg^{2+} を共触媒として, ホスホエノールピルビン酸 (PEP) に不可逆的に炭酸固定し, オキサロ酢酸 (OAA) と無機リン酸を生成する反応を触媒する。

PEPC は, すべての植物および多くのバクテリアに広く存在し, 種々の細胞内成分の合成やクエン酸回路の維持のために C_4 ジカルボン酸を供給するという補填的役割を担っている^{2)~4)}, 種々の生物から得られる PEPC は, 通常, 分子量 95 ~ 110 kDa の同じサブユニット 4 つから構成されている。PEPC の 1 次構造は, 大腸菌のものが 1984 年に初めて決定され⁵⁾, その後, トウモロコシ^{6)~7)}, シアノバクテリア⁸⁾, 超好熱菌⁹⁾ など 20 種以上について明らかにされている。大腸菌 PEPC の 1 次構造を植物のものと比較すると, 後者で N 末端にリン酸化を受ける余分な残基が伸びていることを除き, 両者の相同性は高い。したがって, 大腸菌 PEPC の 3 次元構造は植物の PEPC に直接当てはめると考えられる。

PEPC の X 線結晶解析は, 部位特異的変異による機能解析¹⁰⁾ とともに, 反応機構と制御の研究に不可欠と考えられる。しかしながら, その 3 次元構造の解析は, 1989 年に結晶化に関する最初の予備的な結果¹¹⁾ が報告されたあと, 高純度の酵素を大量に得ることの困難さ, 結晶化過程での多形現象, 得られた結晶の不安定性などの障害によって, 研究の進展がはばまれた。最終的には, 効率の良い調製法の確立^{12)~13)}, 結晶化溶液に含まれる沈殿剤や添加剤の改良¹⁾, および放射光の利用によって, これらの障害を克服することができた。

大腸菌 PEPC の単結晶は, ポリエチレングリコール 300 を沈殿剤とするハンギングドロップ蒸気拡散法によって得られた。斜方晶系, 空間群 $I222$, 単位格子定数は, $a = 117.6, b = 248.4, c = 82.7 \text{ \AA}$ であった。単位格子の非対称単位中にモノマー分子 1 個が含まれるため, 4 量体 PEPC の分子対称は D_2 となる。

結晶構造の解析は, 3 種の水銀誘導体を用いた多重同型置換法によって行った。回折強度の測定は, 筑波フोटンファクトリーで坂部カメラを用いて行った。イメージデータの処理以降分子構造モデルの作成とその精

密化に至るプロセスについてはここでは省略するが¹⁾, 最終的には, $2.8 \text{ \AA}$ 分解能の X 線回折強度データを用いて, 結晶学的信頼度因子 (R) が 21.9 % の結晶構造が得られた。

3. PEPC の 4 量体構造

図 1 に大腸菌 PEPC の全体構造を示した。4 つの同じサブユニットは結晶学的 222 対称で関連づけられている。4 つのモノマーのうち左右の 2 つのモノマー間は上下のモノマー間に比べ, かなり密接なサブユニット間接触を形成している。これらのサブユニット間の接触面積を, プログラム GRASP¹⁴⁾ を用いブロー半径を $1.4 \text{ \AA}$ として計算したところ, それぞれ $1,610 \text{ \AA}^2, 520 \text{ \AA}^2$ となった。また, 4 量体分子 PEPC の中央には, 空隙が見られる。以上から, 4 量体分子 PEPC は 2 量体の 2 量体と書き表すことができる。部位特異的変異によるこれまでの研究から, 保存されている Arg-438 残基は, 酵素の 4 量体構造を維持するために必須であることが知られていた。Arg-438 残基を Cys 残基に置き換えると, ネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) (図 2) で示されるように, 4 量体分子が部分的に 2 量体に解離する結果をもたらす。X 線構造解析終了後, Arg-438 の位置を探したところ, 接触の少ない上下のサブユニットの境界に見つかった。Arg-438 を介してのサブユニット間相互作用は, この塩基性残基と隣接サブユニットの Glu-433 との間の塩橋である。このことから, Arg-438 を Cys に置き換えることにより 4 量体酵素が 2

図 1 大腸菌 PEPC の全体構造
同じモノマーサブユニット 4 つが結晶学的 222 対称によって関係づけられている。隣接するサブユニット間の接触は, 左右のサブユニット間で強く, 上下で弱い。4 量体分子は 2 量体の 2 量体と考えることができる。

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの3次元構造：そのアロステリック阻害機構

図2 大腸菌PEPCの野生型と変異型 (R438C) のネイティブPAGE

Arg-438をCysに置き換えると、PEPCが2量体に解離することから、Arg-438はPEPCの4量体構造の保持に重要であることがわかる。

つの2量体に解離することが、良く説明できる。

4. PEPCモノマーの構造

大腸菌PEPCの4量体構造を形成するモノマーサブユニットの構造を図3に一对の分子投影で示した。構造の特徴は、1個の8本鎖βバレルと多数のαヘリックスである。バレルを形成する8本のβ鎖以外にはβ鎖は見られない。β鎖の数が限られているのに比べ、全部で40個ものαヘリックスが存在する。αヘリックスには合計576残基が含まれ、これはポリペプチド鎖の65%に相当するが、一方β鎖には5%に相当する40残基しか含まれない。αヘリックスの多くはβバレルのC末端側にかたまって存在し、N末端側にはほとんど見られない(図3(b))。負のエフェクター分子³⁾であるアスパラギン酸は、バレルのC末端側のαヘリックスの間に見出された(図3(b))

5. アロステリック阻害分子アスパラギン酸結合部位の構造

L-アスパラギン酸はPEPCのアロステリックエフェクター分子の1つで、触媒活性の阻害を引き起こす。この負のエフェクターは、4つのアミノ酸残基、Lys-773, Arg-832, Arg-587, およびAsn-881, によってPEPCに保持されている。Lys-773はこれまで報告されているすべてのPEPCのアミノ酸配列に保存されている2つのリジン残基のうちの1つである。Lys-773をアラニンに置き換えると、酵素活性は完全に失われ、変異タンパク質の蓄積が顕著に減少する¹⁰⁾。Lys-773は長い側鎖をいっぱい伸ばしてアスパラギン酸の側鎖のカルボキシル基と塩橋を作っている。また、すべてのPEPCに高度

図3 大腸菌PEPCのモノマーの分子構造

(a) 分子中央の8本鎖βバレルのC末端側からの投影図。
(b) βバレル側面からの投影図。β鎖とアロステリック阻害分子アスパラギン酸は黒く塗りつぶして示した。

に保存されている¹⁵⁾ Arg-832も、同じカルボキシル基と塩橋を作っている。一方、Arg-587は、すべてのPEPCに保存されている特異な配列GRGGXXGRGG (XX = TV, SI, あるいはSV)¹⁵⁾中の2番目のアルギニンである。6つのグリシン残基を含むこのループは、この配列中の2つのアルギニン残基に大きな自由度を提供している。Arg-587はアスパラギン酸のカルボキシル基と塩橋を作っている。Arg-587をセリンに置き換えると、オキサロ酢酸を生成する触媒活性が実質上失われる¹⁶⁾。Arg-587とアスパラギン酸の間の塩橋の形成は、活性に必須のアルギニンが阻害的エフェクター分子によって

図4 N末端側から見た大腸菌PEPCのモノマー分子
N末端の延長線上にチャンネルが見られ、その底にアロステリック阻害分子アスパラギン酸が結合している。

トラップされたことを強く示唆している。そのため、酵素の活性部位は、特異なアミノ酸配列をもつ柔軟なループ上に保持されたArg-587の長く柔軟な側鎖の届く範囲に限られる、と言えよう。アスパラギン酸の結合に関与する4番目の残基はAsn-881であるが、この残基もすべてのPEPCに完全に保存されている¹⁵⁾。酵素の末端近くの残基が阻害剤の認識あるいは結合に関与することは非常に興味深い。

図4はPEPCモノマーのN末端側から分子を投影したものである。N末端近くには、入り口付近に弱い酸性残基、底の部分に強い塩基性残基をもつチャンネルが存在する。チャンネルをとおり、アスパラギン酸をその底に見ることができる。植物、例えばトウモロコシでは、N末端にさらに26残基主鎖が伸びており、大腸菌PEPCのN末端から数えて12番目の残基は、リン酸化により活性制御を受けるセリンである。このセリン残基がリン酸化されたり⁴⁾、¹⁷⁾アスパラギン酸に置き換えられたり⁴⁾、¹⁸⁾した場合、高等植物PEPCのL-アスパラギン酸やL-リンゴ酸への感受性が減少することが知られているが、このセリンがチャンネルの入り口近傍に位置することを考えると、よく説明できる。

6. 予想される活性部位

PEPCには、保存されているヒスチジン残基がわずかに2つ、His-138とHis-579、しかない。これらのヒスチジン残基の部位特異的変異の研究から、これらの残基は触媒活性に必須であることが明らかにされた¹⁹⁾、²⁰⁾。2つの保存性ヒスチジン残基と触媒活性に重要な他の

図5 大腸菌PEPCの活性部位の構造
βバレルのC末端側には、活性に関与する多くの残基と、活性残基を含む2つの柔軟なループが存在する。アロステリック阻害分子アスパラギン酸はループの一方を活性部位から離れた位置に固定することによって、活性を阻害する。

残基や阻害的エフェクターであるアスパラギン酸の位置を、図5に示した。これらの残基とアスパラギン酸はβバレルのC末端側に集中している。2つのヒスチジンおよびアスパラギン酸のα炭素間の距離は17 Åから18 Åの範囲にある。His-579のあとには、特異なアミノ酸配列GRGGSIGRGGが存在するが、この配列中には、酵素触媒反応に重要な2つのアルギニン残基が含まれている（前述）。しかし、不活性型であるこのPEPCの構造では、Arg-587はアスパラギン酸のほうに伸びており、活性に必須の2つのヒスチジンからは遠ざかっている。このように、アスパラギン酸はこのループを触媒部位から離れたところに固定しその動きを制限している。しかし、グリシンに富んだこのループが本来十分柔軟であることも予想される。

結晶構造中に同定できなかったアミノ酸残基は、N末端の3残基以外には図5に点線で示されているLys-702からGly-708までの7残基のみであった。そのため、この見えていないループは酵素の活性部位である可能性が非常に高い。ループの配列の中にあるArg-703はすべてのPEPCに完全に保存されており、Lys-702やArg-704もLysかArgとして良く保存されている。これら3つの連続する塩基性残基は、ループを柔軟にする

Ala-701 または Ser-701 と Gly-707, Gly-708 に挟まれている。PEPC のアスパラギン酸複合体では、このループは構造を固定するための配位子をもたず、主鎖がゆらいているために結晶構造中に見ることができないと考えられる。

このループの触媒活性での重要性は、いくつかの観測結果から明らかである。まず、PEPC をトリプシンによって処理すると、Arg-703 のカルボキシル側 1 カ所で開裂し、酵素は容易に不活性化される（泉井ら、未発表結果）。次に、Arg-703 あるいは Arg-703 と Arg-704 の両方を Gly に置き換えると、 K_{cat} 値がそれぞれ 5 分の 1 と 20 分の 1 になる。Lys-702, Arg-703, および Arg-704 の 3 つの活性残基を種々変異させると、炭酸水素イオンに対する K_m 値のみが顕著に増加することから¹⁾、これら 3 つの塩基性残基は炭酸水素イオンの結合に関与することが示唆される。さらにこれら変異酵素の中には、好ましくない副反応、つまり炭酸水素イオン依存性ホスホエノールピルビン酸加水分解が見られる^{4), 19)}。

したがって、このループおよび Arg-581 と Arg-587 を含むもう 1 つのループが、それらの活性残基を用いて基質分子を活性部位に固定し、反応中間体が周辺の水によって攻撃されるのを防ぐ蓋を形成していると考えることができる。図 5 は β パレルの軸に沿って C 末端側から投影した分子を示している。見えていない（点線で示した）ループは β パレルの C 末端側にあり、その間に、活性に関与する 2 つのヒスチジン、PEPC の機能

に必須の Arg-396²¹⁾、炭酸水素イオンに関連する Lys-546²²⁾、さらに保存されているアルギニン残基、Arg-581 と Arg-713、が存在する。したがって、PEPC の活性部位は β パレルの C 末端側周辺の領域と考えられる。

しかし、PEPC の酵素機能に関する詳細な分子機構を確定するためには、PEPC と基質類似物、 Mg^{2+} 、およびアロステリックエフェクター²³⁾とを複合体化して得られる、活性型酵素の 3 次元構造解析を待たなければならない。その第一段階として、 Mg^{2+} の代わりに Mn^{2+} が結合した大腸菌 PEPC の結晶構造を解析し、活性中心となる金属の位置を明らかにした（図 6）金属イオンは β パレルの C 末端側に位置し、2 つの酸性残基、Glu-506 と Asp-543 が配位している。この活性中心の構造は、PEP を基質とするピルビン酸キナーゼ（PK）と非常に似通っていることから、PK の PEP 複合体の構造をもとにして、PEPC の PEP 結合モデルを検討した。このモデルでは、PEP のカルボキシル酸素とリン酸基の酸素が金属に配位し、リン酸基周辺には 3 つの塩基性残基アルギニンがリン酸酸素とイオン対を形成する環境を作っており、PEP 結合モデルとして妥当なものである²⁴⁾。

7. おわりに

PEPC はアロステリック酵素であり、種々のエフェクター分子によって活性制御を受ける。エフェクター分子は、酵素の特定の部位に結合してその構造変化をもたらす。その結果、酵素の基質分子に対する親和性が変化して、酵素は活性型にも不活性型にもなると考えられている。この意味から、アロステリック酵素と種々のエフェクター分子との複合体の構造を明らかにすることは、酵素活性のアロステリック制御機構を研究する上で非常に興味深い。

今回構造解析した大腸菌由来の PEPC は阻害分子であるアスパラギン酸が結合した不活性型のものである。阻害分子アスパラギン酸は、PEPC に例外なく見られるグリシンの多い特異なループを固定することによって、そのループ上にある活性必須残基、ヒスチジン 1 つとアルギニン 2 つの動きを抑えていると考えられる。さらに、不活性型 PEPC では主鎖を電子密度図で追えないループが 1 つだけ存在し、そのループ上には 3 つの連続する塩基性残基が見出された。この塩基性残基は、その後の部位特異的変異の研究から炭酸水素イオンの親和性に関与することが明らかとなったことから、炭酸水素イオンが存在しない場合、このループは揺らいでいて、特定の構造をもち得ないものと考えられる。

このように、PEPC の 3 次元構造が決定され、活性残

図 6 大腸菌 PEPC の金属結合部位
 Mn^{2+} はカゴ型電子密度で示した。金属イオンは活性部位の中央に位置し、酸性残基、Glu-506 と Asp-543 が配位している。

基の相互配置が明らかとなるにしたがって、PEPC分子が酵素機能を発現するためにきわめて合目的的に作られていることが理解されるようになってきた。現在、PEPCと活性中心金属の複合体に、さらに基質PEP類似体が結合したものや、 C_4 植物であるトウモロコシ由来のPEPCの構造解析を進めている。PEPCの活性型構造の詳細が明らかとなれば、PEPCの炭酸固定の分子機構もさらに深く理解することができるであろう。ひいては、 C_4 光合成代謝サイクルの効率化を図って、より有効な炭酸固定の代謝系を構築するための基礎的知見を得ることも夢ではないと思われる。

文 献

- 1) Kai, Y., Matsumura, H., Inoue, T., Terada, K., Nagara, Y., Yoshinaga, T., Kihira, A., Tsumura, K. and Izui, K. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 823-828.
- 2) Utter, M. F. and Kolenbrander, H. M. (1972) *The Enzymes*, 3rd edn Vol. 6 (Boyer, P. D. ed.) 117-168, Academic, New York.
- 3) O'Leary, M. H. (1982) *Annu. Rev. Plant Physiol.* **33**, 297-315.
- 4) Chollet, R., Vidal, J. and O'Leary, M. H. (1996) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 273-298.
- 5) Fujita, N., Miwa, T., Ishijima, S., Izui, K. and Katsuki, H. (1984) *J. Biochem. (Tokyo)* **95**, 909-916.
- 6) Izui, K., Ishijima, S., Yamaguchi, Y., Katagiri, F., Murata, T., Shigesada, K., Sugiyama, T. and Katsuki, H. (1986) *Nucl. Acids Res.* **14**, 1615-1628.
- 7) Yanagisawa, S., Izui, K., Yamaguchi, Y., Shigesada, K. and Katsuki, H. (1988) *FEBS Lett.* **229**, 107-110.
- 8) Katagiri, F., Kodaki, T., Fujita, N., Izui, K. and Katsuki, H. (1985) *Anacystis nidulans. Gene* **38**, 265-269.
- 9) Nakamura, T., Yoshioka, I., Takahashi, M., Toh, H. and Izui, K. (1995) *J. Biochem. (Tokyo)* **118**, 319-324.
- 10) Yano, M. and Izui, K. (1997) *Eur. J. Biochem.* **247**, 74-81.
- 11) Inoue, M., Hayashi, M., Sugimoto, M., Harada, S., Kai, Y. and Kasai, N. (1989) *J. Mol. Biol.* **208**, 509-510.
- 12) Izui, K., Fujita, N. and Katsuki, H. (1982) *J. Biochem. (Tokyo)* **92**, 423-432.
- 13) Terada, K., Fujita, N., Katsuki, H. and Izui, K. (1995) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 735-737.
- 14) Nicholls, A., Sharp, K. A. and Honig, B. (1991) *Proteins* **11**, 281-296.
- 15) Toh, H., Kawamura, T. and Izui, K. (1994) *Plant, Cell and Environment* **17**, 31-43.
- 16) Yano, M., Terada, K., Umiji, K. and Izui, K. (1995) *J. Biochem. (Tokyo)* **117**, 1196-1200.
- 17) Terada, K., Kai, T., Okuno, S., Fujisawa, H. and Izui, K. (1990) *FEBS Lett.* **259**, 241-244.
- 18) Ueno, Y., Hata, S. and Izui, K. (1997) *FEBS Lett.* **417**, 57-60.
- 19) Terada, K. and Izui, K. (1991) *Eur. J. Biochem.* **202**, 797-803.
- 20) Terada, K., Murata, T. and Izui, K. (1991) *J. Biochem. (Tokyo)* **109**, 49-54.
- 21) Gao, Y. and Woo, K. C. (1996) *FEBS Lett.* **392**, 285-288.
- 22) Gao, Y. and Woo, K. C. (1995) *FEBS Lett.* **375**, 95-98.
- 23) Izui, K., Taguchi, M., Morikawa, M. and Katsuki, H. (1981) *J. Biochem. (Tokyo)* **90**, 1321-1331.
- 24) Matsumura, H., Terada, M., Shirakawa, S., Inoue, T., Yoshinaga, T., Izui, K. and Kai, Y. (1999) *FEBS Lett.* **458**, 93-96.

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの3次元構造：そのアロステリック阻害機構

甲斐 泰

甲斐 泰(かい やすし)

大阪大学大学院工学研究科物質化学専攻 教授

1969年大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻修士課程修了, 工学博士.

研究内容: X線回折法を用いた有機金属触媒錯体の構造化学から発展して, 現在はおもに金属活性中心を有するタンパク質, 酵素の構造化学を行っており, 炭酸固定酵素の研究には特に力を入れている.

連絡先: 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1 E-mail: kai@chem.eng.osaka-u.ac.jp

松村浩由(まつむら ひろよし)

大阪大学大学院工学研究科物質化学専攻 助手

2000年同専攻博士後期課程修了, 工学博士.

研究内容: カルシウム結合タンパク質や炭酸固定酵素のX線結晶構造解析の研究を進めている.

連絡先: 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1 E-mail: matsuzou@chem.eng.osaka-u.ac.jp

泉井 桂(いずい かつら)

京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学専攻 教授

1966年京都大学大学院理学研究科化学専攻修士課程修了, 理学博士.

研究内容: 植物および微生物の炭酸固定酵素の構造と機能の遺伝子操作による解析, C_4 光合成の炭酸固定酵素のリン酸化による活性調節機構とリン酸化に至るシグナル伝達過程の解析.

連絡先: 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町 E-mail: izui@kais.kyoto-u.ac.jp