最近の研究から

1つの酵素が2つの反応を触媒するしくみ

東京大学大学院理学系研究科 西増弘志

東京大学大学院農学生命科学研究科 伏信進矢, 若木高善

Hiroshi NISHIMASU, Shinya FUSHINOBU and Takayoshi WAKAGI: Molecular Mechanism by which One Enzyme Catalyzes Two Reactions

Unlike ordinary enzymes, fructose-1,6-bisphosphate (FBP) aldolase/phosphatase (FBPA/P) catalyzes two distinct reactions : (1) the aldol condensation of dihydroxyacetone phosphate (DHAP) and glyceraldehyde-3-phosphate to FBP, and (2) the dephosphorylation of FBP to fructose-6-phosphate. We solved the crystal structures of FBPA/P in complex with DHAP (its aldolase form) and FBP (its phosphatase form). The crystal structures revealed that FBPA/P exhibits the dual activities through a dramatic conformational change in the active-site architecture. Our findings expand the conventional concept that one enzyme catalyzes one reaction.

1. はじめに

酵素は特異的な生化学反応を触媒し、その基質・反応特異性から基質と酵素の関係は“鍵と鍵穴”に例えられる。酵素のなかには二機能性酵素と呼ばれるものがあるが、それらは基質特異性がゆるく類似化合物を基質として利用できる酵素や、異なる反応を触媒する別個のドメインからなる酵素である。したがって、これまでの生化学の常識では“1つの酵素は1つの反応を触媒する”と考えられてきた。この常識に反して、フルクトース-1,6-ビスリン酸 (FBP) アルドラーゼ/ホスファターゼ (FBPA/P) に関する最近の研究^{1),2)}により、FBPA/Pは基質に応じて酵素活性部位の構造を変化させ2つの異なる反応を触媒することが明らかとなった。

2. FBPA/Pは2つの反応を触媒する

FBPA/Pはジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) とグリセルアルデヒド3-リン酸 (G3P) からFBPへのアルドラーゼ縮合反応、および、FBPからフルクトース6-リン酸 (F6P) への脱リン酸化反応という2つの異なる化学反応を触媒する³⁾ (図1)。FBPA/Pは2つの異なる反応を触媒することが知られている唯一の酵素であり、その二機能性は古細菌の糖代謝研究の過程で偶然に発見された。真正細菌や真核生物の糖新生経路ではFBPアルドラーゼによりDHAPとG3PからFBPが合成された後、FBPホスファターゼ (FBPaseとも略称される) によりFBPはF6Pと無機リン酸へと加水分解される (図1)。一方で、古細菌の細胞抽出液中にFBPアルドラーゼやFBPホスファターゼの酵素活性は検出されるにもかかわらず、古細菌のゲノムには既知のFBPアルドラーゼやFBPホスファターゼの相同遺

伝子は存在しないことから、古細菌の糖新生経路には新規のFBPアルドラーゼやFBPホスファターゼが関与していることが示唆されていた。2002年に、FBPA/Pは古細菌や好熱性細菌の糖新生経路に関与するクラスV FBPホスファターゼとして初めて同定された。⁴⁾ クラスV FBPホスファターゼは真正細菌や真核生物に由来する既知のFBPホスファターゼ (クラスI~クラスIV) とはアミノ酸配列の相同性をもたない新規の酵素だった。2004年、筆者らは、クラスV FBPホスファターゼ (好酸好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* に由来する ST0318 タンパク質) の結晶構造をFBPとの複合体として決定し、その反応機構を明らかにした。⁵⁾ もちろん当時はクラスV FBPホスファターゼが別の機能

図1 FBPA/Pが触媒する2つの反応。(Two successive reactions catalyzed by FBPA/P.)

をもつとは夢にも思っていなかった. その6年後の2010年, 古細菌の細胞抽出液から未知のFBP アルドラーゼを精製する過程で, 酵素活性測定の実験酵素として用いたクラスV FBP ホスファターゼがFBP アルドラーゼ活性を示すことが偶然に発見された.³⁾ 驚くべきことに, クラスV FBP ホスファターゼはアルドラーゼ活性とホスファターゼ活性の両方をもつ二機能性酵素FBPA/Pだったのである. ウサギ筋FBP アルドラーゼなどのクラスI FBP アルドラーゼでは酵素活性部位のLys残基が第1の基質であるDHAPとシッフ塩基を形成することが触媒反応に必須であることが知られている. FBPA/Pにおいても保存されたLys残基(ST0318のLys232)とDHAPとの間のシッフ塩基形成がアルドラーゼ反応に必須であることから, FBPA/PはクラスI FBP アルドラーゼと類似の反応機構でアルドラーゼ反応を触媒することが示唆された.³⁾ しかし, 筆者らが過去に報告していたST0318-FBP複合体構造において, Lys232は酵素活性部位に結合したFBP分子から遠くに位置しており, FBPA/Pが同一の酵素活性部位で2つの反応を触媒するのかどうか, また, もしそうだとしたらどのような分子機構によって2つの反応を触媒しているのかは不明だった.

3. FBPA/P-FBP 複合体 (ホスファターゼ型) の結晶構造

まず, 過去に決定していたST0318-FBP複合体 (FBPA/Pのホスファターゼ型) について述べる.⁵⁾ 大腸菌で発現させ精製したST0318をFBP存在下で共結晶化し, SeMet置換体を用いた多波長異常分散法により, ST0318-FBP複合体のX線結晶構造を1.8 Å分解能で決定した(図2). 結晶は空間群 $I422$ に属し, 格子定数は $a = b = 111.8$ Å, $c = 153.2$ Åだった. X線回折データはSPRING-8 BL40B2で収集した. ゲルろ過の結果からST0318はオクタマーをとることが示唆された. これと一致して, 非対称単位中には1分子のST0318が含まれており, 結晶学的対称によって関連づけられる8分子のST0318は点群 422 で環状のテトラマーが2つ重なったオクタマー構造を形成していた(図2A左). 2つのプロトマーの間にFBPと4つの Mg^{2+} ($Mg1 \sim Mg4$) が結合していた. ほかのタンパク質と配列相同性をもたないことから予想されたように, ST0318は, 2枚の β シートを α ヘリックスが取り囲んだ新規なフォールドをもっており(図2B左), 既知のFBPアルドラーゼやFBPホスファターゼとはまったく異なる全体構造をとっていた(図3). 環状のF6Pが結合する既知のFBPホスファターゼとは異なり, ST0318にはFBPが直鎖状で結合していた(図2C左). FBPの6位リン酸基はHis19, Tyr91, Gly104, Tyr348, および, となりのプロトマーのGln242', His243'と水素結合を形成していた. 一方で, FBPの1位リン酸基は主に4つの Mg^{2+} によって認識されており,

Mg^{2+} はAsp12, His19, Asp53, Asp54, Gln95, Asp132, Asp233, Asp234, および, 水分子と配位結合していた. さらに, FBPのヒドロキシ基は複数の水素結合により認識されていた. これらのことから, ST0318は直鎖状FBPを基質として脱リン酸化することが示唆された. 変異体解析の結果, $Mg2 \sim Mg4$ は脱リン酸化反応に必須であること, $Mg4$ に配位結合したAsp12が塩基触媒としてはたらくこと, および, $Mg2$ と $Mg3$ に配位結合した水分子がFBPの1位リン酸基に求核攻撃することが示唆された. 野生型ST0318をFBPと共結晶化したにもかかわらず, 結晶構造中でFBPは加水分解されていなかった. これは, 結晶構造中でFBPの1位リン酸基のジオメトリーがゆがんでいるためであり, この酵素の至適温度(> 80 °C)ではゆがみが解消され反応が進行すると推測された. FBPは溶液中で環状と直鎖状との平衡状態にあり, ほとんどは環状として存在する. したがって, なぜST0318は直鎖状FBPを基質として利用するのかはこの時点では不明だった. しかし, ST0318がFBPA/Pであることがわかった今となつては, ST0318がアルドラーゼ反応とホスファターゼ反応を連続的に触媒するためであると解釈できる.

4. FBPA/P-DHAP 複合体 (アルドラーゼ型) の結晶構造

次に, ST0318-DHAP複合体 (FBPA/Pのアルドラーゼ型) について述べる.¹⁾ ST0318がアルドラーゼ活性をもつかどうかは確認されていなかったのので, ST0318のアルドラーゼ活性を測定した. その結果, ST0318はアルドラーゼ活性とホスファターゼ活性の両方をもつFBPA/Pであることが確認された. FBPA/Pが触媒するアルドラーゼ反応の分子機構を解明するために, ST0318をDHAPの存在下で共結晶化し, ST0318-DHAP複合体のX線結晶構造を1.5 Å分解能で決定した(図2). 結晶は空間群 $I422$ に属し, 格子定数は $a = b = 112.5$ Å, $c = 153.6$ Åだった. X線回折データはPF-AR NW12Aにて収集した. アルドラーゼ型もホスファターゼ型と同様のオクタマー構造をとっており, DHAPはFBPと同様に2つのプロトマーの間に結合していた(図2A右). このことから, FBPA/Pはアルドラーゼ反応とホスファターゼ反応を同一の酵素活性部位で触媒していることが示唆された. 後に述べる3つのループ領域を除いて, アルドラーゼ型の構造はホスファターゼ型の構造とよく似ていた(図2B右). 予想されたように, DHAPはLys232とシッフ塩基を形成しており, 今回決定したアルドラーゼ型の構造はクラスI FBPアルドラーゼにおいても報告されているアルドラーゼ縮合反応中間体をとらえていることが明らかとなった. ホスファターゼ型の構造ではFBPの1位リン酸基は4つの Mg^{2+} ($Mg1 \sim Mg4$) と結合していた一方で, アルドラーゼ型の構造ではDHAPのリン酸基は3つの Mg^{2+} ($Mg1 \sim Mg3$) と結合し

図2 ST0318の結晶構造. (Crystal structures of ST0318.) (A) ST0318のオクタマー構造. (B) ST0318のプロトマー構造. (C) ST0318の酵素活性部位. ST0318-FBP複合体 (PDB ID 1UMG) を左に, ST0318-DHAP複合体 (PDB ID 3R1M) を右に示した. ディスオーダー領域を点線で, マグネシウムイオンを球でそれぞれ示した.

図3 FBPA/P, クラスI FBP ホスファターゼ, クラスI FBP アルドラーゼの全体構造. (Overall structures of FBPA/P, FBP phosphatase and FBP aldolase.) ST0318-DHAP 複合体 (PDB ID 3R1M), ブタ腎臓FBP ホスファターゼ-F6P 複合体 (PDB ID 1EYI), ウサギ筋FBP アルドラーゼ-DHAP 複合体 (PDB ID 2QUT) を示した. マグネシウムイオンを球で示した. 図はCueMol (<http://www.cuemol.org/>) を用いて作製した.

ていた. DHAPの3位のヒドロキシ基はAsp287, Arg266, Gln242'との水素結合により認識されていた(図2C右).

5. FBPA/Pの酵素活性部位は変形する

アルドラーゼ型とホスファターゼ型の構造比較から, ST0318は酵素活性部位の3つのループ領域(ホスファターゼループ(残基97~110), アルドラーゼループ(残基219~233), C末端ループ(残基346~361))の立体構造をたくみに変形させることにより異なる基質結合部位を形成していることが明らかになった(図2B, C). ホスファターゼ型の構造では, ホスファターゼループとC末端ループがFBPと相互作用する一方で, アルドラーゼループは酵素活性部位から遠くに位置しておりFBPとは相互作用していなかった. ホスファターゼループはふたのように酵素活性部位を覆い, ホスファターゼループ上のGly104とAsn105はFBPと水素結合を形成していた. C末端ループ上のTyr348もFBPと水素結合を形成し, C末端ループ上のGlu374はホスファターゼループ上のVal106と水素結合を形成していた. それに対して, アルドラーゼ型の構造では, ホスファターゼループとC末端ループは酵素活性部位から遠くに位置しDHAPとは相互作用せず, アルドラーゼループが酵素活性部位に近づきアルドラーゼループ上のTyr229とLys232がDHAPと相互作用していた.

ホスファターゼ型でAsp233はMg3とMg4に結合していたが, アルドラーゼ型ではAsp233は反転しArg221と相互作用していた(図2C). さらに, ホスファターゼ型で水を介してMg4と相互作用していたGlu347もアルドラーゼ型では遠くに移動していた. このため, アルドラーゼ型ではホスファターゼ活性に必要なMg4が結合できなくなっていた. このことから, ホスファターゼ型に結合したFBPと異なり, アルドラーゼ型に結合したDHAPは脱リ

ン酸化されることが説明できた. アルドラーゼ型ではLys232の主鎖カルボニル基がAsp233の側鎖の代わりにMg3と結合し, さらに, Lys232の主鎖アミド基がMg4の代わりにDHAPのリン酸基と相互作用していた.

3つのループ領域の温度因子は比較的高く, さらに, その一部はディスオーダーしていたことから, ループ領域はフレキシブルであることが示唆された. しかし, ループ領域はフレキシブルであるだけでなく, 特異的な分子内相互作用により特定の立体構造をとっていた(図2C). ホスファターゼ型の構造では, ホスファターゼループ上のPhe102の側鎖は, となりのプロトマーのAla122'とHis243'の側鎖に挟まれるように相互作用していた. アルドラーゼループ上のLys232の側鎖はPro111の主鎖カルボニル基とGlu220の側鎖によって活性部位から離れた位置で固定されていた. アルドラーゼループ上のTyr229はTyr174と相互作用し, Tyr174はLeu224とGlu345とファンデルワールス相互作用と水素結合を形成していた. それに対して, アルドラーゼ型の構造では, ホスファターゼループ上のPhe102はThr68, Glu72, Trp175の側鎖が形成する疎水的なくぼみにびたりと収容され, さらに, Gly104の主鎖カルボニル基がThr68の側鎖と水素結合することによりホスファターゼループは活性部位から離れた位置で固定されていた. アルドラーゼ型でもTyr174はLeu224とGlu345と相互作用していたが, Glu345はArg221と新たな相互作用を形成していた. アルドラーゼ型においてアルドラーゼループの一部はヘリックス構造をとり, アルドラーゼ反応の酵素活性部位の形成に寄与していた.

6. FBPA/Pの反応機構

ST0318-DHAP複合体とウサギ筋FBPアルドラーゼ-DHAP複合体(PDB ID 2QUT)の構造比較から, FBPA/PはクラスI FBPアルドラーゼと類似した反応機構でアル

図4 FBPA/PとFBPアルドラーゼの酵素活性部位の比較。(Active sites of FBPA/P and FBP aldolase.) ST0318-DHAP複合体(PDB ID 3R1M)とウサギ筋FBPアルドラーゼ(PDB ID 2QUT)を示した。

ドラーゼ縮合反応を触媒することが示唆された。ST0318とウサギ筋FBPアルドラーゼはまったく異なる全体構造をもつが、DHAPとシッフ塩基中間体はよく似た構造をとっていた(図4)。クラスI FBPアルドラーゼの研究から、アルドラーゼ縮合反応は、脱水反応、カルバニオン形成反応、C3-C4結合形成反応、水和反応、の4つのステップからなり、ウサギ筋FBPアルドラーゼではGlu187が酸塩基触媒としてはたらくことが示唆されていた。ST0318のTyr229はウサギ筋FBPアルドラーゼのGlu187と同様の位置に存在し、Tyr229のヒドロキシ基はLys232、DHAPのC2原子とC3原子、および、(重ね合わせたホスファターゼ型の構造における)FBPのO4原子の近傍に位置していた(図4, 5)。Tyr229はFBPA/Pにおいて高度に保存されており、Y229F変異体はアルドラーゼ活性を失い、ホスファターゼ活性のみを示した。したがって、Tyr229がアルドラーゼ縮合反応における酸塩基触媒であると考えられた。

アルドラーゼ型とホスファターゼ型との構造比較から、第2の基質であるG3Pの認識機構も推測できた(図5)。アルドラーゼ型に結合したDHAPのとなりにはG3Pが結合するのに適した空間があり、Tyr229およびAsp287と水素結合している2つの水分子は、ホスファターゼ型に結合したFBPの4位および5位のヒドロキシ基と同様の位置に存在していた。さらに、ホスファターゼ型でFBPの6位リン酸基を認識している残基(His19, Tyr91, Gln242', His243')はアルドラーゼ型でも同様の位置にあった。したがって、G3Pのリン酸基はFBPの6位リン酸基と同様に認識され、G3Pのカルボニル基とヒドロキシ基はTyr229とAsp287により認識されることが示唆された。

DHAPとG3Pとが縮合しFBPが生成したのちシッフ塩基中間体は加水分解され、アルドラーゼループが酵素活性部位から離れ、Asp233が反転することで脱リン酸化反応に必須なMg4が酵素に結合すると考えられた。さらに、ホ

図5 G3P認識機構。(Mechanism of G3P recognition.) ST0318-FBP複合体(PDB ID 1UMG)とST0318-DHAP複合体(PDB ID 3R1M)を重ね合わせた。

スファターゼループとC末端ループが酵素活性部位に近づきFBPと相互作用することで、FBPの脱リン酸化反応が進行すると考えられた。FBPの1位リン酸基を求核攻撃する水分子は、アルドラーゼ型の構造においてMg2とMg3の間にすでに結合しており、アルドラーゼ反応により生成した直鎖状FBPは酵素から離れることなく連続的に脱リン酸化されると考えられた。

7. *Thermoproteus neutrophilus* FBPA/Pの結晶構造

2010年にFBPA/Pを発見したFuchs博士らの研究グループからもFBPA/Pの結晶構造が報告された²⁾。奇遇なことに、筆者らの論文と彼らの論文は同時に公開されたのだが、筆者らもFuchs博士らもその日までお互いの論文の存在を知らなかったので非常に驚いた。彼らは好熱性古細菌*T. neutrophilus*に由来するFBPA/P(Tneu0133タンパ

ク質)の結晶構造(1.5 Å分解能)を決定し,さらに,結晶に基質をソーキングすることによりDHAP複合体(1.3 Å分解能),FBP複合体(1.4 Å分解能),F6P複合体(1.7 Å分解能)の結晶構造を決定していた.興味深いことに,Tneu0133もST0318と同様の条件で結晶化しており,空間群も同じI422で格子定数も近かった.筆者らはST0318単体の結晶は得られなかったことから基質結合によるループ領域の安定化が結晶化に重要なのだろうと考えていたので,Tneu0133が基質の存在しない条件で結晶化し,さらに,単体の結晶に基質をソーキングすることにより結晶中でも構造変化が起こりうるというのは意外だった.生物種や結晶化手法が異なるにもかかわらず,DHAP複合体,FBP複合体ともに同様の構造をとっており,FBPA/Pの複雑精緻な分子機構は確かなものであることが示された.Tneu0133単体の構造には2つのMg²⁺(Mg1とMg2)が結合しており,DHAP結合によりアルドラーゼループが酵素活性部位に近づくことでMg3の結合部位(DHAPのリン酸基とLys232の主鎖カルボニル基)が形成されることが示された.したがって,基質結合に伴う3つのループ領域の構造変化によりMg²⁺が段階的に結合し,アルドラーゼ反応とホスファターゼ反応が連続的に触媒されると考えられた.

8. おわりに

FBPA/Pの研究によって,1つの酵素が2つの反応を触媒する分子機構が明らかとなった.FBPA/Pは膨大に存在する酵素のなかの唯一の例外なのだろうか?筆者らは,複数の反応を触媒する未知の酵素がほかにも存在しているのではないかと考えている.FBPA/Pの発見もまったくの偶然によるものであり,意図してこのような酵素を発見するのは簡単ではないが,今後新たな二機能性酵素が発見されることが期待される.常識をくつがえすような発見のきっかけはまだまだ意外なところどころがっているのかもしれない.

文 献

- 1) S. Fushinobu, H. Nishimasu, D. Hattori, H.J. Song and T. Wakagi: *Nature* **478**, 538 (2011).
- 2) J. Du, R. F. Say, W. Lu, G. Fuchs and O. Einsle: *Nature* **478**, 534 (2011).

- 3) R. F. Say and G. Fuchs: *Nature* **464**, 1077 (2010).
- 4) N. Rashid, H. Imanaka, T. Kanai, T. Fukui, H. Atomi and T. Imanaka: *J. Biol. Chem.* **277**, 30649 (2002).
- 5) H. Nishimasu, S. Fushinobu, H. Shoun and T. Wakagi: *Structure* **12**, 949 (2004).

プロフィール

西増弘志 Hiroshi NISHIMASU
 東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻
 Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo
 〒113-0032 東京都文京区弥生 2-11-16
 2-11-16 Yayoi, Bunkyo, Tokyo 113-0032, Japan
 e-mail: nisimasu@biochem.s.u-tokyo.ac.jp
 最終学歴: 東京大学大学院農学生命科学研究科, 博士課程 (2007年修了)
 専門分野: 構造生命科学
 現在の研究テーマ: RNAサイレンシング
 趣味: ボクシング

伏信進矢 Shinya FUSHINOBU
 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻
 Department of Biotechnology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1
 1-1-1 Yayoi, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan
 e-mail: asfushi@ecc.mail.u-tokyo.ac.jp
 最終学歴: 東京大学大学院農学生命科学研究科, 博士課程中退 農学博士 (1999年)
 専門分野: 酵素学, 構造生物学
 現在の研究テーマ: 酵素の構造と機能. 主に糖およびリン酸にかかわる酵素.
 趣味: ボクシング観戦 (休止中), ポピュラー音楽

若木高善 Takayoshi WAKAGI
 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻
 Department of Biotechnology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1
 1-1-1 Yayoi, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan
 e-mail: atwakag@ecc.mail.u-tokyo.ac.jp
 最終学歴: 東京大学大学院農学系研究科博士課程, 農学博士 (1982年)
 専門分野: 酵素学, タンパク質科学, 極限環境微生物学
 現在の研究テーマ: 超好熱菌酵素のタンパク質科学