

酸性多糖の代謝に関わる還元酵素の立体構造に基づく補酵素特異性 変換とそのバイオ燃料生産への応用

橋本 渉

京都大学大学院 農学研究科

研究の目的

持続可能な循環型社会の構築のため、石油などの化石燃料の代替エネルギーとしてバイオ燃料が世界中で注目されている。特に、国土の狭い日本においては、海藻などの海洋性バイオマスの利活用が国主導で推奨されている。褐藻類に多量に含まれるアルギン酸やフコイダンは、バイオ燃料の原料となる酸性多糖として期待されており¹⁾、当研究室でも細菌を用いたアルギン酸からのバイオエタノール生産を行っている²⁾。ウロン酸を含む酸性多糖の代謝には、NADH 或いは NADPH 依存性の還元酵素が必須である。これらの還元酵素は short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) ファミリーに分類され、共通の基本骨格 ($\alpha/\beta/\alpha$ の三層構造) をもつ。一方、微生物による高効率な物質生産には、細胞内の適正な補酵素バランスが重要である。また、NADPH は NADH よりも 10 倍高価であるため、NADPH 特異性酵素に NADH 利用能を付加することは産業的にも意義深い。しかし、NADH と NADPH との構造類似性 (アデニル酸リボース 2'位: リン酸基の有無) にもかかわらず、酸化還元酵素における高活性を保持した補酵素特異性の変換例は少ない。そこで、本研究では、酸性多糖 (アルギン酸、フコイダン、及びペクチン) の代謝に関わる各細菌還元酵素の立体構造を解析し、その補酵素特異性に関わる構造要因を明らかにする。その成果に基づいて、酸化還元酵素の補酵素特異性変換に関する基盤技術を確立し、微生物法或いは酵素法による各物質生産系の高効率化に資する。

方法

酸性多糖の代謝に機能する各還元酵素と補酵素との複合体の結晶化条件を、96 穴プレートを用いた多検体スクリーニングにより確立した。X 線回折データの収集には、放射光施設 SPring-8 を利用した。回折データのプロセスには、HKL2000 プログラムを用いた。アポ型構造をサーチモデルとした分子置換法により Molrep プログラムで位相を決定し、Refmac5 プログラムを用いて構造精密化した。これにより、各酵素と補酵素との複合体の立体構造を明らかにした。

決定した立体構造より、補酵素認識に関わる構造要因を明らかにし、タンパク質工学的的手法により、補酵素特異性を変換した。

結果

(1) アルギン酸代謝還元酵素

アルギン酸資化性 *Sphingomonas* 属細菌 A1 株には、その代謝に関わる二種類の還元酵素 (NADPH 特異性 A1-R と NADH 特異性 A1-R') が存在する。両酵素は一次構造上高い同一性 (64%) を示すが、補酵素特異性が異なる。A1-R'/NAD⁺複合体の立体構造を決定し、A1-R/NADP⁺複合体の構造と比較した³⁾。その結果、補酵素のアデニル酸リボース 2'位結合部位で、空間的及び電荷の差異が認められた [(空間容積) A1-R, 44.0 Å³; A1-R', 1.15 Å³, (電荷) A1-R, 正; A1-R', 負]。

この二つの構造的差違に起因する残基は、いずれも長短二本のループに含まれていた (図 1)。ループをそれぞれ交換した変異体を作製し、それらの速度パラメーターを決定した結果、得られた A1-R 及び A1-R' 変異体では、各々補酵素特異性が互いに交換されていた。さらに A1-R' 変異体の NADPH に対する k_{cat}/K_m は、野生型 A1-R の NADPH に対する k_{cat}/K_m よりも 2 倍高い値を示した。

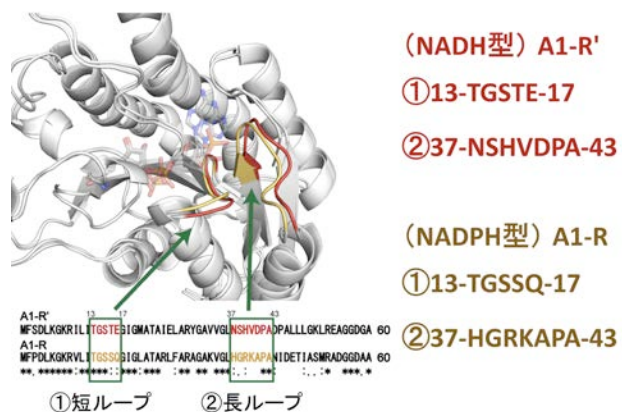


図 1. 補酵素認識に関わる二本のループ

(2) フコイダン代謝還元酵素

酸性多糖であるフコイダンにはグルクロン酸が含まれ、その代謝にはグルクロン酸から生じる α -ケト酸に作用する還元酵素が必要である⁴⁾。そこで、連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 由来 NADH 特異性の還元酵素 (DhuD) の立体構造を決定し、本酵素と補酵素との複合体の結晶化を試みた。複合体の結晶が調製できなかったが、DhuD は、アルギン酸代謝還元酵素 (NADPH 特異性 A1-R と NADH 特異性 A1-R') と類似の基本骨格 ($\alpha/\beta/\alpha$ の三層構造) をもつため (図 2 左)、それらの補酵素結合部位を比較した⁵⁾。その結果、DhuD は A1-R' と類似の二本のループ構造をもつことが分かり [(空間容積) DhuD, 1.05 Å³, (電荷) DhuD, 負]、NADH 特異性に関わる構造要因が保存されていることが示された。

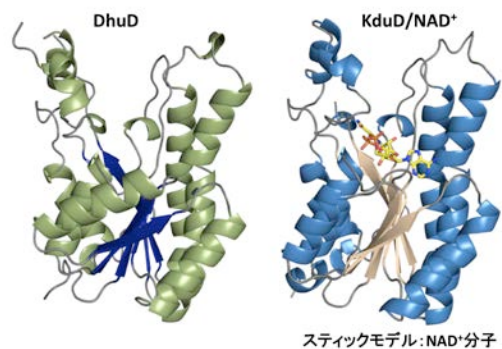


図 2. DhuD と KduD の立体構

(3) ペクチン代謝還元酵素

酸性多糖ペクチンの代謝に関わる還元酵素 (KduD) は、NADH と NADPH の両補酵

素を利用できる。そこで、ペクチン資化性細菌 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 由来 KduD と補酵素(NAD⁺)との複合体の立体構造を決定した⁵⁾(図2右)。補酵素のアデニル酸リボース 2'位結合部位について、その周辺環境の空間容積を比較すると、KduD は A1-R と A1-R'における該当空間の中間程度の容積 (15.9 Å³) を示すことが分かった。さらに、pH 7.0 における KduD のアデニル酸リボース 2'位結合部位の分子表面電荷はほとんど帯電していなかった。

結論

酸性多糖に含まれるウロン酸から生じる α -ケト酸を還元する SDR ファミリーに焦点を当て、異なる補酵素特異性を示す還元酵素の構造機能相関を解析することにより、補酵素特異性を決定する構造要因(空間容積と表面電荷)を明らかにし(図3)、補酵素特異性の変換法を確立した。

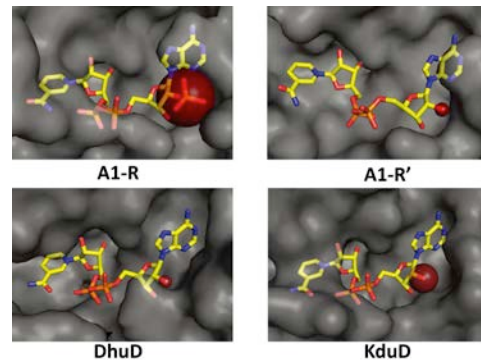


図3. 還元酵素の補酵素結合部位

文献

- 1) Stokstad, E. (2012) Biofuels. Engineered superbugs boost hopes of turning seaweed into fuel. *Science* **335**: 273.
- 2) Takeda, H., Yoneyama, F., Kawai, S., Hashimoto, W., and Murata, K. (2011) Bioethanol production from marine biomass alginate by metabolically engineered bacteria. *Energy Environ. Sci.* **4**: 2575-2581.
- 3) Takase, R., Mikami, B., Kawai, S., Murata, K., and Hashimoto, W. (2014) Structure-based conversion of the coenzyme requirement of a short-chain dehydrogenase/reductase involved in bacterial alginate metabolism. *J. Biol. Chem.* **289**: 33198-33214.
- 4) Maruyama, Y., Oiki, S., Takase, R., Mikami, B., Murata, K., and Hashimoto, W. (2015) Metabolic fate of unsaturated glucuronic/iduronic acids from glycosaminoglycans: Molecular identification and structure determination of streptococcal isomerase and dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **290**: 6281-6292.
- 5) Takase, R., Maruyama, Y., Oiki, S., Mikami, B., Murata, K., and Hashimoto, W. (2016) Structural determinants in bacterial 2-keto-3-deoxy-D-gluconate dehydrogenase KduD for dual-coenzyme specificity. *Proteins* **84**: 934-947.