

## アミノ酸代謝関連酵素の分子基盤と機能開発



名古屋大学大学院生命農学研究科 教授 吉村 徹

## はじめに

生体内においてアミノ酸は脱アミノ、脱炭酸、ラセミ化など様々な反応を受けるが、その多くはビタミン B<sub>6</sub> の補酵素型であるピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) を補酵素とする酵素によって触媒される。PLP はリジン残基との間に分子内シッフ塩基を形成して酵素タンパク質と結合している。基質アミノ酸が存在すれば PLP はアルジミン転移反応によって、基質アミノ基と分子外シッフ塩基を形成する (図1)。続いていずれかの C $\alpha$  結合が切断される。例えばラセマーゼやトランスアミナーゼ反応では C $\alpha$ -H 結合が切断され  $\alpha$ -水素はプロトンとして脱離し、その結果 C $\alpha$  上にマイナスチャージが生じる。PLP はこのマイナスチャージを非局在化することでこのアニオン性中間体を安定化する。これが PLP の電子溜め機能であり、PLP 酵素反応の核となっている。筆者は PLP 酵素を中心に様々なアミノ酸代謝関連酵素、特に D-アミノ酸代謝に関わる酵素の反応機構、生理的役割や応用などについて研究してきた。

## 1. PLP に依存するアミノ酸代謝関連酵素の構造と機能

## 1-1. アミノ基転移反応の立体化学

アミノ酸とケト酸の間のアミノ基転移を触媒するトランスアミナーゼ反応は、基質のアミノ基を PLP に転移して、ピリドキサミン 5'-リン酸 (PMP) と生成物ケト酸を生じる半反応と、PMP から基質ケト酸にアミノ基を転移して生成物アミノ酸を生じる逆方向の半反応からなる (図1)。前半の半反応ではアミノ酸と PLP の複合体から  $\alpha$ -水素がプロトンとして引き抜かれ、複合体の  $\pi$ -電子平面上を PLP の C4' に転移して PMP を生じる。後半の半反応ではその逆反応が進行して PMP から基質ケト酸にアミノ基が転移し、新たなアミノ酸が生成するとともに酵素は元の PLP 型酵素に復帰する。本来のトランスアミナーゼに加え、多くの PLP 酵素は副反応としてこの反応を触媒する。基質と PLP が形成する複合体の  $\pi$ -電子平面上で進行する基質  $\alpha$ -水素の転移反応は、どちらかの面上で特異的に起こる場合と、両面で起こる場合の3通りが考えられる。この水素転移の立体化学は  $\alpha$ -水素の引き抜きや転移を触媒する酵素残基と PLP の位置関係を反映するが、筆者がこの研究を開始した時点では、この立体化学が決定されていた PLP 酵素は全て *si* 面上での水素転移を触媒するものであった。筆者は C4' 位を立体特異的にトリチウム化した PMP を用いる簡便な方法を確立してこの立体化学を系統的に解析した。その結果、D-アミノ酸トランスアミナーゼなどは *re* 面上で、アラニンラセマーゼ (AlaR) は両面で、この水素転移を触媒することが明らかになった。

## 1-2. AlaR の反応機構

ラセミ化反応でアミノ酸が立体反転する場合は、 $\alpha$ -水素がプロトンとして引き抜かれ生成したアニオン性中間体の C $\alpha$  に、

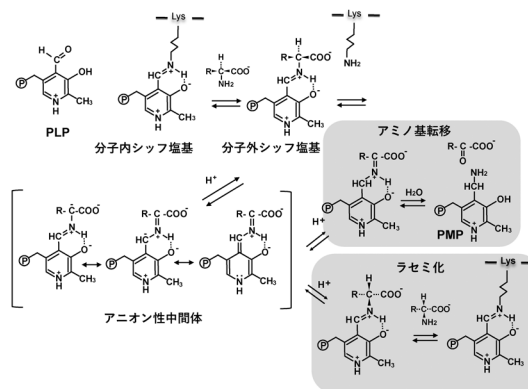


図1 アミノ基転移とラセミ化の機構

プロトン引き抜きとは逆の側からプロトンが付加する。この反応には単一の触媒基が D, L-両アミノ酸からのプロトン引き抜きと中間体 C $\alpha$  へのプロトン付加を触媒する単塩基機構と、D, L-それぞれの基質に対して別の残基がプロトンの授受を行う二塩基機構が考えられる。PLP に依存するアミノ酸ラセマーゼの反応がこのどちらの機構で進行するのかは、長らく議論の対象となってきた。筆者らは好熱菌、*Geobacillus stearothermophilus* の AlaR を用いてこの機構の解明を試みた。結晶構造からはこの触媒基の候補として、PLP 結合性 Lys39、および PLP を挟んで Lys39 の反対側に位置する Tyr265' と His166 が推定された。そこでこれら残基の部位特異的変異、K39A 変異酵素のメチルアミンによるケミカルレスキューとその際の基質・溶媒同位体効果の解析、さらには反応中間体アナログである  $\epsilon$ -ピリドキシル L-および D-Ala を結合した酵素の X 線結晶構造解析などを行った。その結果、Lys39 が D-Ala の  $\alpha$ -水素引き抜きと D-Ala を生成するためにアニオン性中間体へプロトンが付加する触媒基であることを明らかにした。さらに同酵素が副反応として触媒するアミノ基転移反応の分光学的解析から、Tyr265' が L-Ala に対応して  $\alpha$ -水素の引き抜きと付加を行う触媒基であることを検証し、AlaR 反応が二塩基機構で進行することを立証した。

## 2. 真核生物における D-アミノ酸代謝関連酵素と D-アミノ酸の機能

## 2-1. セリンラセマーゼ (SerR)

筆者らが D-AAT や AlaR など細菌の D-アミノ酸代謝酵素の研究を続ける中、ヒトを含む真核生物にも様々な D-アミノ酸が存在し、多様な生理機能を担うことが明らかとなってきた。中でも哺乳動物の脳などに存在する D-Ser は、記憶や学習など脳の高次機能と関連する N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) レセプターのコアゴニストとして機能しており、そのため D-Ser の挙動が統合失調症や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) など

様々な神経疾患と関わるということが報告されている。真核生物の D-Ser は真核細胞型 SerR によって生合成されるが、細菌の AlaR や SerR の構造が知られていたにもかかわらずこの酵素は容易には同定されなかった。これは PLP 酵素が進化的・構造的に異なる 7 つの Fold-type (ファミリー) からなり、細菌の AlaR や SerR が Fold-type III に属するのに対し、哺乳動物の SerR が Fold-type II に属しているためである。すなわち両 SerR は構造が異なるタンパク質が収斂進化の結果同じ機能を獲得した結果であり、細菌の AlaR や SerR の情報は哺乳動物 SerR の同定には役立たなかった。筆者らは分裂酵母の Fold-type II 型 SerR の結晶構造解析を行うとともに、同酵素反応では PLP 結合リジン残基と PLP を挟んでこれと対峙するセリン残基が、それぞれ L-Ser、D-Ser の  $\alpha$ -水素の授受を触媒することを明らかにした。すなわち Fold-type II 型 SerR は、進化的には異なる細菌の AlaR と同様、二塩基機構でラセミ化を触媒する。

ところで Fold-type II 型 SerR はセリンのラセミ化とともに L-および D-Ser の分解 (デヒドラターゼ) 反応も触媒し、ピルビン酸とアンモニアを生成する。この分解反応の生理的意義は定かではないが、D-Ser 濃度の恒常性維持に働く可能性が推測されている。SR のラセミ化反応の触媒効率は L-Ser と D-Ser で大差がないのに対して、L-Ser に対するデヒドラターゼ反応の効率は D-Ser に対する効率より 10 倍程度高い。そのため D-Ser は一旦 L-Ser に転換された後にデヒドラターゼ反応を受けるといった可能性も指摘されていた。筆者らは  $\alpha$ -水素を重水素化した L-D-Ser を用いた基質同位体効果、重水中で反応を行った際の溶媒同位体効果の解析などにより、SerR は L-Ser に転換することなく直接 D-Ser の分解を触媒するものと結論した。また Thr の 4 つのジアステレオマーを基質とした Thr デヒドラターゼ反応において、マウス SerR が L-Thr と D-*allo*-Thr に対して高い活性を示したのに対して、D-Thr と L-*allo*-Thr にはほとんど反応しなかったことから、SerR は基質の  $\alpha$  位炭素ではなく  $\beta$  位炭素の立体化学を認識している可能性を示した。

筆者らはまた SR が基質との反応中にその PLP 結合リジン残基がデヒドラターゼ反応の中間体である  $\alpha$ -アミノアクリル酸によって修飾されてリジノアラニン残基に転換されること、そのリジノアラニン残基のアミノ基がリジンの  $\epsilon$ -アミノ基を代替して活性を維持することを見出した。マウス SR ではこの修飾により酵素活性は大幅に低下したが、デヒドラターゼ反応における D-Ser に対する  $K_m$  値が野生型酵素の 1% 程度まで低下したため、生理的条件に近い 1 mM 濃度での D-Ser デヒドラターゼ活性は野生型酵素の場合よりも上昇した。

### 2.2. Fold-type III 型 D-セリンデヒドラターゼ

筆者らは出芽酵母、*Saccharomyces cerevisiae* に PLP に依存する Fold-type III 型の新奇 D-セリンデヒドラターゼ (Dsd1p) を見出した。Dsd1p は哺乳動物を除く脊椎動物、菌類などの下等真核生物と一部の細菌に存在する。本酵素は *E. coli* などの細菌に存在する Fold-type II 型の同名酵素とは進化的に異なり、

反応に亜鉛を必要とするなど PLP 酵素としてはユニークな特性を有する。筆者らは Dsd1p について、PLP のピリジン環窒素と相互作用するチロシン残基 (Tyr203) の役割といった酵素化学的な研究を行うとともに、同酵素の高い基質特異性を利用した D-Ser の酵素定量法を構築した。また体内 D-Ser 濃度の変化が ALS の進行に及ぼす影響を検証することを目的に、ポリエチレングリコール修飾により免疫原性を低下させた Dsd1p を作成し、ALS モデルマウスへの投与などを行った。

### 2.3. 発生・分化における D-アミノ酸の役割

マウス小脳では幼若期に D-Ser 濃度が高く、組織の発達とともに減少する。またカイコでは孵化、幼虫時の脱皮、蛹化や羽化に際して一過的に体内 D-Ser 濃度が増加する。同様の現象はエビの脱皮時などにも見出されている。このように発生・分化において D-アミノ酸が何らかの役割を担う可能性があるがその詳細は明らかではない。筆者らはカイコや細胞性粘菌 *Dicthyostelium discoideum*、食用キノコなどを用いてこの問題の解明を試みた。その過程で、*D. discoideum* では D-Ser が cAMP シグナリングを介した細胞分化に影響すること、ブナシメジでは子実体形成時に D-2-アミノ-3, 4-ジヒドロキシ酪酸が蓄積することなどを明らかにした。

### おわりに

上述のように、筆者は PLP 酵素を中心にアミノ酸代謝関連酵素の構造機能相関、あるいは PLP 酵素が関わる D-アミノ酸の代謝や機能に関する研究を行ってきた。酵素学はすでに成熟した研究分野であるように思われているが、構造機能相関の解析が進んでいる PLP 酵素においてすらまだ酵素を自由にデザインすることはできない。また生命現象の解明にはその現象に関わる酵素の理解が不可欠である。基礎、応用の両面において酵素研究にはなお多くの課題が残されているものと考えている。

**謝辞** 本受賞に際しまして、学生時代からここまで、常にご指導・ご鞭撻を賜りました京都大学名誉教授の左右田健次先生に心より感謝申し上げます。本稿に記した研究は、京都大学の江崎信芳先生 (現名誉教授)、谷澤克行先生 (現大阪大学名誉教授)、田中英彦先生 (現岡山大学名誉教授)、栗原達夫先生 (京都大学教授)、三原久明先生 (現立命館大学)、名古屋大学の伊藤智和先生、邊見久先生、九州大学の大島敏久先生 (現名誉教授)、大阪医科大学の鏡山博行先生 (現名誉教授)、林秀行先生、大阪市立大学の広津建先生 (現名誉教授)、宮原郁子先生、後藤勝先生 (現東邦大学)、大阪大学の倉光成紀先生 (現名誉教授)、奈良女子大学の植野洋志先生 (現竜谷大学)、Northeastern University の James. M. Manning 先生をはじめとする多くの先生方、そして京都大学と名古屋大学の院生・学生の方々と共同によってなされたものです。お世話になりました皆様に心より感謝申し上げます。最後に、本賞へのご推薦をいただきました筑波大学の小林達彦先生、ならびにご支援を賜りました学会関係者の方々に厚く御礼申し上げます。