

酸化還元酵素の構造-機能相関解明とそれに基づく
プロテイン・エンジニアリングの効率化

摂南大学大学院

理工学研究科 生命科学専攻 博士後期課程

下澤 勇弥

【目次】

第1章	序論	1
1-1	酵素の産業利用	1
1-2	プロテイン・エンジニアリングによる酵素の機能改変	1
1-3	本研究の目的	4
	参考文献	11
第2章	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 由来リンゴ酸デヒドロゲナーゼの 結晶構造解析による反応サイクルの解明	14
2-1	背景	14
2-2	材料と方法	15
2-3	結果と考察	18
2-4	まとめ	30
	参考文献	33
第3章	リンゴ酸デヒドロゲナーゼおよび乳酸デヒドロゲナーゼの 基質選択における構造変化の役割	35
3-1	背景	35
3-2	材料と方法	36
3-3	結果と考察	39
3-4	まとめ	50
	参考文献	53
第4章	構造変化の制御による <i>Geobacillus stearothermophilus</i> 由来 リンゴ酸デヒドロゲナーゼの低温適正化	55
4-1	背景	55
4-2	材料と方法	56
4-3	結果と考察	59
4-4	まとめ	69
	参考文献	71
第5章	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 由来リンゴ酸デヒドロゲナーゼの C 末端残基欠失による酵素特性への影響	72
5-1	背景	72

5-2	材料と方法	73
5-3	結果と考察	75
5-4	まとめ	83
	参考文献	85
第6章	総括	86
	論文目録	89
	謝辞	91

【略語一覧】

2-Mercaptoethanol	• • • • •	2-ME
2-Methyl-2,4-pentanediol	• • • • •	MPD
<i>Bacillus anthracis</i> 由来 MDH	• • • • •	ba-MDH
D-フルクトース 1,6-ビスリン酸	• • • • •	FBP
Dicarboxylate	• • • • •	DC
<i>Geobacillus kaustophilus</i> 由来グリシンオキシダーゼ	• • • • •	Gox
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 由来 LDH	• • • • •	gs-LDH
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 由来 MDH	• • • • •	gs-MDH
Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside	• • • • •	IPTG
<i>Lactobacillus casei</i> 由来 LDH	• • • • •	lc-LDH
Luria Bertani	• • • • •	LB
Molecular Operating Environment	• • • • •	MOE
Molecular dynamics/分子動力学	• • • • •	MD
Monocarboxylate	• • • • •	MC
NAD ⁺ /NADH 依存性 L-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	• • • • •	MDH
NAD ⁺ /NADH 依存性 L-乳酸デヒドロゲナーゼ	• • • • •	LDH
Polyethylene glycol	• • • • •	PEG

Protein Data Bank	• • • • •	PDB
Root Mean Square Deviation	• • • • •	RMSD
<i>Thermus flavus</i> 由来 MDH	• • • • •	tf-MDH
<i>Thermus thermophilus</i> 由来 LDH	• • • • •	tt-LDH
Tris-hydrogen chloride	• • • • •	Tris-HCl
X-ray detector software	• • • • •	XDS
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ	• • • • •	AST
アデノシン 5'-ジホスホリボース	• • • • •	APR
オキサロ酢酸	• • • • •	OAA
ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド	• • • • •	NAD ⁺ /NADH
ピルビン酸	• • • • •	PYR
ブタ (ミトコンドリア) 由来 MDH	• • • • •	pm-MDH
プロテイン・エンジニアリング	• • • • •	PE

第1章 序論

1-1 酵素の産業利用

酵素は、常温常圧の穏やかな条件で反応を進めることができ、化学反応と比べて高い基質特異性を有している。酵素のこのような特徴を利用して、現在では食品製造、洗剤成分、衣料加工、医薬品、臨床検査など様々な分野と用途で生活に浸透し、人々の暮らしや健康の質の向上に貢献している。初めて産業利用を目的として酵素が活用されたのが食品分野である。子牛の胃液から抽出されたレンネットを用いて乳製品の加工が行われていたが、1980年代にはレンネットに含まれるプロテアーゼであるキモシンが、牛乳に含まれるκ-カゼインを加水分解することで凝集させることが明らかになり、大腸菌 *Escherichia coli* を宿主としたウシ由来の遺伝子組み換えキモシンを用いたチーズ製造が開始された [1-2]。

医療分野においては、1890年代に麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来のジアスターゼ（アミラーゼ）が消化促進剤として販売された。その後、1960年代からは酵素反応を利用した臨床検査薬の開発が盛んに行われ、西洋わさび由来のペルオキシダーゼ（EC:1.11.1.17）を用いた組織免疫染色法[3]やウリカーゼとカタラーゼを組み合わせた尿酸測定[4]など血清や尿中の物質を特異的に定量可能な酵素法による診断薬が販売された。以上のように、酵素法は従来の化学法と比べて酵素の高い基質特異性を利用した高い正確性を有しており、近年では主要な定量法としてより優れた酵素法が開発が行われている。

1-2 プロテイン・エンジニアリングを用いた機能改変

産業利用酵素は、優れた代謝回転数、安定性、基質親和性および基質特異性などの特性が求められる。高い代謝回転数は、試薬中の酵素添加量を減少させることができるため、酵素だけではなく補酵素などの原材料コストの削減につながる。また、酵素反応時間の短縮により、化合物製造の効率化や検査分野では検査結果をより迅速に明示できる重要な

要素である。安定性の高い酵素は、製造過程における pH や温度の変化に対しても安定した触媒反応を発揮できる。また、製品の長期保存により失活しにくいため、酵素法の正確な定量性を長期にわたり保証できる。基質特異性は、正確な検査の実施において最も重要な要素である。血清や尿などの夾雑物を含む検体において、目的物質の類似体に対する反応が検査結果の過大な評価や思わぬ副産物を生むリスクがある。そのため、目的物質のみに反応する優れた基質特異性は、多くの産業利用酵素において最も求められる特性である。また、高い基質親和性を持つ酵素は、検体中の目的物質濃度が微量であったとしても安定した反応ができるため、特に検査薬や酵素センサ用途において測定感度向上にも繋がる。

以上の特性を兼ね備えた理想的な酵素を得る手段として、現在ではプロテイン・エンジニアリング (PE) による酵素開発が行われている。PE は、候補となる酵素を天然からのスクリーニングやデータベースなどから探索し、その酵素のアミノ酸配列や立体構造などの情報を基に、遺伝子組み換え技術を用いてアミノ酸変異を導入することで、特性の付与や機能の向上を図る手法である。PE の一例として、耐熱性酵素の低温適正化が挙げられる。2001 年に Suzuki らは、超好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の 3-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (EC:1.1.1.85) を用いたランダム変異体のスクリーニングにより低温における代謝回転数が大幅に向上した変異体を見出した[5]。しかし、得られた変異体は、活性部位ポケットの変異により熱安定性の低下も同時に観察された。このように、酵素の代謝回転数と安定性はトレードオフの関係とされており、複数の特性をバランスよく兼ね備えた酵素の開発には立体構造と機能の相関関係の深い理解が必須となる。

PE による代表的な成功例として、1988 年に Wilks らがニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺/NADH) 依存性 L-乳酸デヒドロゲナーゼ (EC:1.1.1.27; LDH) を用いた基質特異性の改変を報告した[6]。LDH は、L-乳酸からピルビン酸 (PYR) への可逆反応を触媒し、PYR などの α -ケト酸を基質とする α -ケト酸デヒドロゲナーゼファミリーに属する酸化還元酵素である (図 1-1)。また、同ファミリーの近縁酵素には NAD⁺を補酵素として L-リ

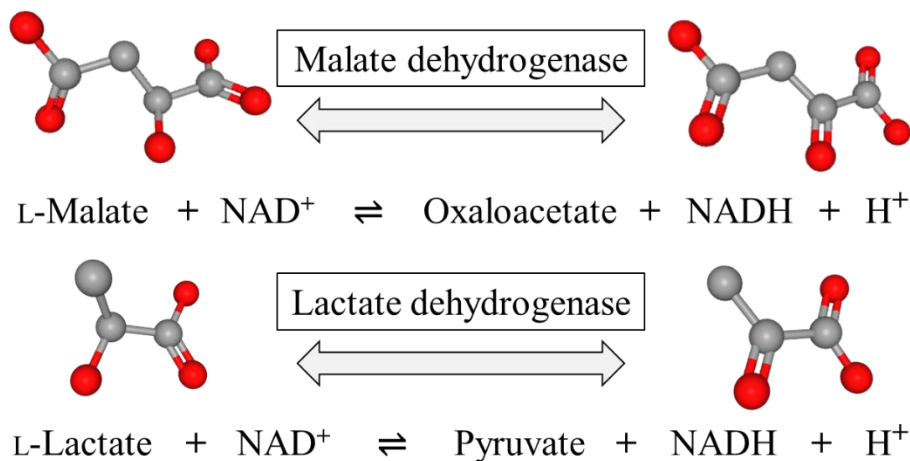


図 1-1 MDH および LDH の反応式および基質の分子構造. 各基質をボール&スティックモデル (酸素原子はレッド, 炭素原子はグレー, 水素原子は省略) で示す.

リンゴ酸からオキサロ酢酸 (OAA) への可逆反応を触媒するリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (EC:1.1.1.37; MDH) が存在する. MDH と LDH は, 活性部位に「特異性残基」と呼ばれる R 残基と Q 残基がそれぞれ保存されており, Wilks らは中等度好熱菌 *Geobacillus stearothermophilus* 由来の LDH (gs-LDH) の Q を R に置換することで, OAA に高い反応性を示す gs-LDH 変異体 (gs-LDH_Q102R) を見出した. その後, gs-LDH_Q102R は肝臓の逸脱酵素であるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) の追隨酵素として AST 検査薬への適用が検討された. しかし, gs-LDH_Q102R の PYR に対する反応性は完全に消失しておらず, 基質特異性の課題から検査薬への利用は断念された. このように, PE による基質特異性の改変は, 産業利用酵素の開発において最も難易度が高い課題である.

さらに, 酵素の基質特異性は, 鍵と鍵穴の関係に例えられ厳密な反応がよく知られているが, 中には基質アナログに対しても反応を示す低基質特異性の酵素も存在する. 例えば, クレアチニン測定用酵素であるサルコシンオキシダーゼは, サルコシン以外に L-Pro に対してもわずかに反応し, 大澤らによってこの低基質特異性がクレアチニン測定に影響を与えることが報告された [7-8]. また, 前述の LDH は, PYR よりも大きい OAA やフェニルピルビン酸等の多くの α -ケト酸に反応性を示し, 臨床検査では夾雑物との副反応によ

り見かけ上測定値が高く見積もられることが留意される。このように、基質特異性は酵素によって差異があり、それぞれ異なる基質認識機構を有しているため完全な理解は難しい。また、基質認識に関する研究は、主に基質とのコンプレックス構造における相互作用や活性中心の空間などの静的解析が議論の中心になっている。しかし、ほとんどの酵素は、基質認識機構を説明する構造的要因が明らかにされていない。

1-3 本研究の目的

基質特異性を制御する構造的要因の理解に向けて、代表的な臨床検査薬用酵素である MDH に着目した。表 1-1 に示す通り、*G. stearothermophilus* 由来 MDH (gs-MDH) は gs-LDH_Q102R よりも OAA に対する優れた基質親和性と PYR に対して全く反応性を示さない高基質特異性を併せ持つ [9]。また、アロステリック酵素である LDH は、アロステリックエフェクターとして D-フルクトース 1,6-ビスリン酸 (FBP) を試薬に添加する必要があるが、MDH はアロステリックエフェクターを要求しない。以上の理由から、MDH は血清中の AST や重炭酸イオンの酵素的測定法やさらには食品成分である L-リンゴ酸、酢酸およびクエン酸などの定量試薬にも利用されている (図 1-2) [10-14]。

血清 AST は肝機能の指標とされており、AST 測定法では第一反応として AST による OAA 生産反応が行われ、この OAA を基質として MDH による第二反応が行われる (図 1-2A)。MDH の反応速度は、AST の OAA 生産速度に依存するため、MDH 反応で減少する

表 1-1 gs-LDH_Q102R および gs-MDH の比較

Enzyme	K_m for oxaloacetate (μM)	Substrate specificity (pyruvate/oxaloacetate) (k_{cat} , %)	Allosteric effector
gs-LDH_Q102R	19	1.2	existence
gs-MDH	5.0	not detected	none

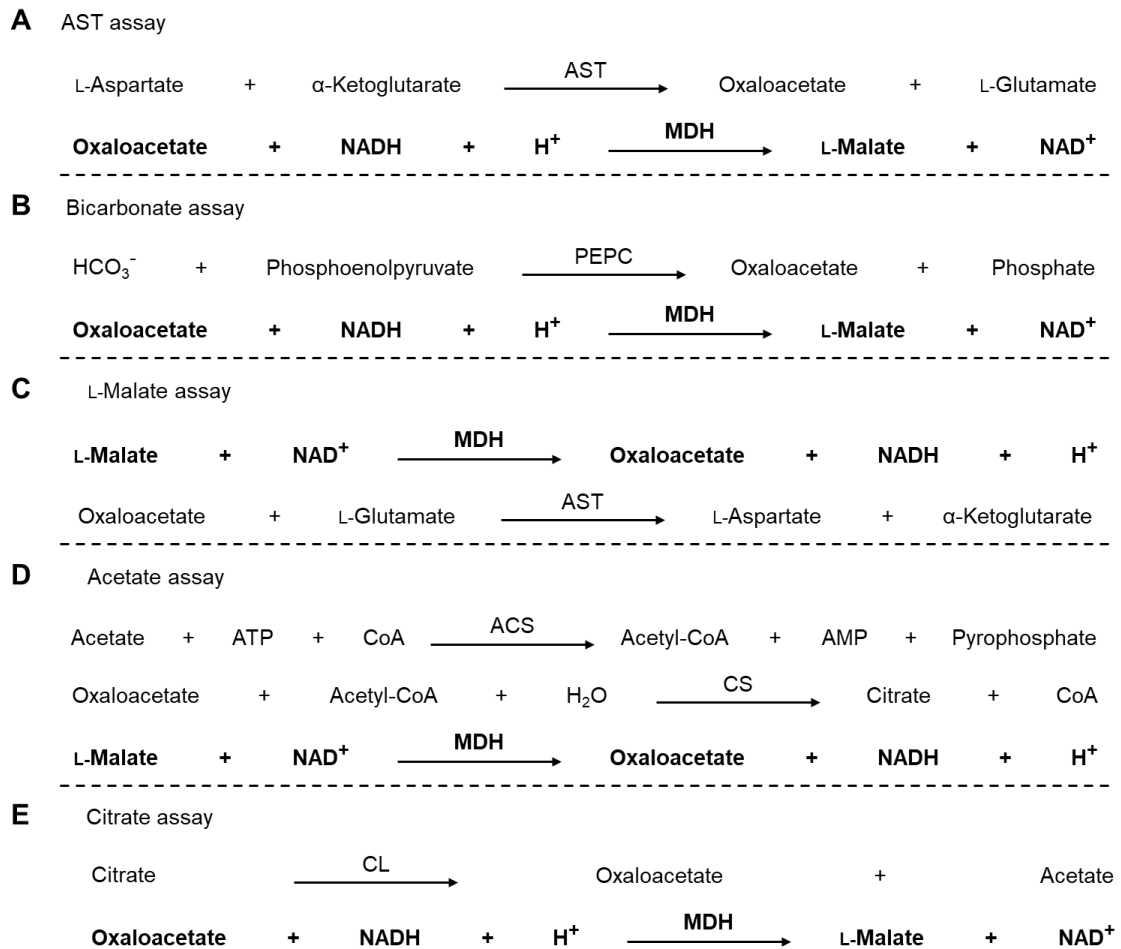


図 1-2 MDH を用いた各測定法の原理. MDH 反応を太字で示す. PEPC : ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ, ACS : アセチル-CoA シンターゼ, CS : クエン酸シンターゼ, CL : クエン酸リアーゼ. A. AST 測定. B. 重炭酸イオン測定. C. L-リンゴ酸測定. D. 酢酸測定. E. クエン酸測定.

NADH の極大吸収波長 340 nm から、血清中の AST 濃度を定量できる。また、重炭酸イオン測定では、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) により生産される OAA を AST 測定と同様に定量し、生体の酸塩基平衡状態の評価を行っている (図 1-2B)。L-リンゴ酸測定は、MDH を用いて食品中の L-リンゴ酸を直接定量する (図 1-2C)。酢酸測定では、酢酸からクエン酸への反応系に必要な OAA を MDH 反応により供給し、その NADH の吸光度変化から、酢酸を定量している (図 1-2D)。クエン酸測定では、クエン酸リアーゼによりク

エン酸が OAA に変換され、これを MDH で定量する (図 1-2E) . このように、高基質特異性の MDH は、夾雑物が多い血清や食品の定量試薬として広く利用されている.

現在、市販の検査薬用酵素として、ブタ (ミトコンドリア) , 中等度好熱菌 *G. stearothermophilus* および超好熱菌 *T. flavus* 由来の 3 種類の MDH (それぞれ pm-, gs-および tf-MDH) が利用されている. その中でも, gs-MDH は OAA に対する基質親和性が極めて高く, さらに超好熱菌と同等の熱安定性や凍結乾燥状態での試薬としての高い保存性を有している (表 1-2) . さらに本研究に先立ち, gs-MDH の基質親和性の臨床検査における影響を, 他の市販 MDH と比較した[9]. その結果, AST 測定では第一反応により生成される OAA 濃度が低い反応初期においても, gs-MDH は反応速度が低下することなく直線的な NADH の減少を示し, 他の MDH より低い濃度で高い AST 量を定量できることが示された (図 1-3A および B) . また, 重炭酸イオン測定において, pm-MDH や tf-MDH は試薬中濃度が 10 U/ml であっても活性が低かった一方で, gs-MDH は 5 U/ml でも第一反応を完全に追従できており AST 測定と同様に直線的な NADH の減少を示した (図 1-3C および D) .したがって, gs-MDH の高い基質親和性は, pm-MDH や tf-MDH よりも優れた測定感度を実現することが示唆された (図 1-3) . しかし, pm-MDH や tf-MDH の結晶構造は決定されている一方で, gs-MDH では優れた特性を利用した測定法への応用研究が中心となっており, 結晶構造解析による機能解析や PE による機能向上はこれまで行われてこなかった.

表 1-2 市販 MDH の酵素特性比較

Enzyme	K_m for oxaloacetate (μM)	Optimal temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Optimal pH	Thermal stability ($^{\circ}\text{C}$)	Stability (powder) (year)	Remaining activity in AST assay reagent after 7 d at 40°C (%)
gs-MDH	5.0	70	8.0	≤ 70	5	94
pm-MDH	33	50	8.0	≤ 30	nt	nd
tf-MDH	68	90	8.0	≤ 70	nt	85

nt: not tested, nd: not detected.

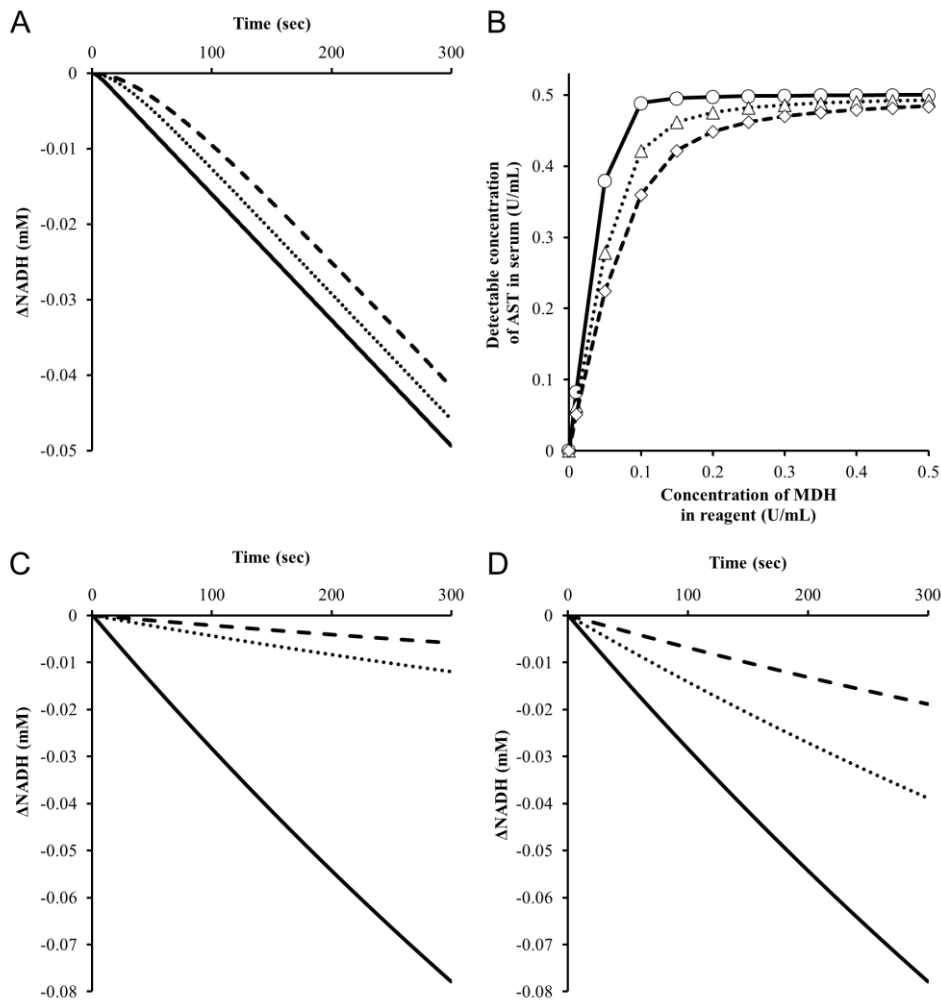


図 1-3 検査シミュレーション. gs-MDH, pm-MDH および tf-MDH を用いた検査薬の反応シミュレーション結果を、それぞれ実線、点線および破線で示す. シミュレーションは、30°C, pH7.5 における各 MDH の酵素特性を基に、反応時間を 5 min として算出した. A. AST 測定における NADH 消費量の比較. MDH 反応による NADH の減少量は、0.1 sec ごとに算出した. シミュレーションは、MDH 0.1 U/mL を含む検査試薬が 270 μ L, AST 0.1 U/mL を含む検体が 30 μ L の条件で実行した. B. AST 測定における検出限界 AST 濃度の比較. 試薬中の各 MDH 濃度における、追従可能な血中 AST 量をプロットした. C および D. 重炭酸イオン測定における NADH 消費量の比較. MDH 反応による NADH の減少量は、0.1 sec ごとに算出した. シミュレーションは、検査試薬 270 μ L と希釈サンプル (検体 2 μ L : 水 160 μ L) を混合する条件で実行した. 試薬中の PEPC および MDH 量は、それぞれ 1 U/mL および 5 U/ml (C) または 50 U/mL (D) とした. 検体中の重炭酸イオン濃度は、30 mM とした.

MDH と LDH の関連研究として、これまでに、様々な生物種を対象にした塩基配列

やアミノ酸配列の系統樹解析や酵素基質複合体構造の比較が行われてきた (表 1-3) [15-20]. 1983 年に Steinbuchel らは, 10 種の α -ケト酸に対して広く反応する LDH の低基質特異性を報告し, 1988 年に前述の PE による gs-LDH の MDH 化が報告された. 2014 年には, Boucher らがマラリア原虫等の apicomplexa 門の MDH と LDH を対象にした研究で, 両酵素の結晶構造に基づく活性中心の変異体を作製したが, LDH の変異体は基質特異性がシフトしたものの, MDH の変異体は OAA 活性の減少のみが観察された. さらに, Boucher らは塩基配列に基づく系統樹解析から OAA と PYR の両方の基質に反応する祖先酵素を予測したが, それらの酵素基質複合体構造からでは MDH の基質認識は説明できなかった. 2018 年には Frazão らが, α -ケト酸の一種で L-メチオニン前駆体である 2,4-ジヒドロキシブチル酸の工業生産を目的に LDH の基質結合様式を再現した MDH 変異体による基質特異性の改変を報告した. しかし, 目的化合物への反応性に加えて同程度の OAA 活性とわずかな PYR 活性も観察された. このように, いずれの研究においても, MDH と LDH のアミノ酸残基の保存性や活性部位周辺の相互作用の違いを明らかにしているものの, 高基質特異性の構造的な原因究明には至っていない. これらは, 酵素基質複合体構造に基づく機能改変の限界を示す顕著な事例であり, MDH と LDH の反応機構は共通しているとの従来の酵素学的見解からは説明が困難である.

表 1-3 MDH および LDH の代表的な関連研究

Years/Author	Engineered protein	Organism
1983, Alexander Steinbuchel, <i>et. al.</i>	LDH	<i>Alcaligenes eutrophus</i>
1988, Helen M. Wilks, <i>et. al.</i>	LDH	<i>G. stearothermophilus</i>
2014, Jeffrey I. Boucher, <i>et. al.</i>	LDH	<i>Apicomplexan</i>
2018, Cláudio J.R. Frazão, <i>et. al.</i>	MDH	<i>Escherichia coli</i>
2019, Kimichi Suzuki, <i>et. al.</i>	LDH	Rabbit muscle
2019, Donghoon Lee, <i>et. al.</i>	MDH	<i>Metallosphaera sedula</i>

MDH の触媒反応は, Ordered bi-bi 反応により進行し, NADH が第一基質として活性中心に結合した後, 第二基質として OAA が結合する [21]. この OAA の結合により, 活性部に存在する可動ループ (gs-MDH では, 84~96 番目の残基) と呼ばれる領域のコンフォメーションが変化することが知られており, MDH は可動ループのコンフォメーションに従って open と closed の 2 つの構造を示す [18]. Open から closed 構造への構造変化は, LDH でも報告されている. 前述の基質特異性に関する研究は, すべて結晶構造解析やドッキング・シミュレーションにより得られた closed 構造 (=酵素基質複合体構造) を基に議論されてきた. しかし, closed 構造の前段階である可動ループの構造変化と基質特異性を関連づけた研究はこれまでに報告されていない.

本研究では, gs-MDH の結晶構造解析と構造分析により構造変化機構と基質認識機構の解明を試みた. さらに, gs-MDH の反応サイクルに基づいた合理的な機能改変により測定用酵素としての有用性向上を試みた.

第 2 章では, gs-MDH の apo 構造から closed 構造に至るまでの詳細な結晶構造の取得を目指して, 様々な条件での結晶化を実施した. その結果, MDH の各反応段階に対応した 4 種の結晶構造の決定に成功し, MDH の詳細な構造変化機構が解明された.

第 3 章では, 構造変化の観点から MDH と LDH の構造比較を行い基質特異性の違いの構造的な要因を調べた. その結果, MDH の構造変化に関連した 4 つの基質認識の要素:

- (1) 活性部位における正電荷ポケット
- (2) 触媒残基の switching
- (3) 構造変化における可動ループの柔軟性
- (4) Closed 構造における活性部位空間

が高基質特異性を実現することが明らかになった.

第 4 章では, MDH の詳細な反応サイクルに基づく合理的な変異デザインにより, gs-MDH の低温適正化を試みた. その結果, 熱安定性と低温での高活性を両立した変異体の開

発に成功した。

第5章では、本研究で決定された gs-MDH の結晶構造を基に、C 末端領域の機能解析を試みた。コンピューターシミュレーションにより提案された変異体は gs-MDH の基質阻害を顕著に低下させ、変異体の結晶構造は基質阻害機構の理解に寄与する活性部位空間の変化を示した。

第6章では、本研究の総括を示した。

本研究は、酵素の基質認識機構の理解に対し、酵素基質複合体における活性部位と基質の相互作用に重きを置く従来の考え方を払拭し、apo 構造から酵素基質複合体構造までの一連の分析の重要性を実証した初めての知見である。また、apo 構造と酵素基質複合体構造の役割の違いに着目し、特定のステップ・構造のみを改変させた変異デザインは、PE による機能改変の幅を広げる新たな手法として期待できる。

参考文献

1. Harris, T. J. R. *et al.* Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA coding for calf preprochymosin. *Nucleic Acids Res.* **10**, 2177–2187 (1982).
2. Emtage, J. S. *et al.* Synthesis of calf prochymosin (prorennin) in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 3671–3675 (1983).
3. Avrameas, S. & Guilbert, B. Enzyme-immunoassay for the measurement of antigens using peroxidase conjugates. *Biochimie* **54**, 837–842 (1972).
4. Kageyama, N. A direct colorimetric determination of uric acid in serum and urine with uricase-catalase system. *Clin. Chim. Acta* **31**, 421-426 (1971).
5. Suzuki, T., Yasugi, M., Arisaka, F., Yamagishi, A. & Oshima, T. Adaptation of a thermophilic enzyme, 3-isopropylmalate dehydrogenase, to low temperatures. *Protein Eng.* **14**, 85-91 (2001).
6. Wilks, H. M. *et al.* A specific, highly active malate dehydrogenase by redesign of a lactate dehydrogenase framework. *Science.* **242**, 1541-1544 (1988).
7. Nishiya, Y., Nakano, S., Kawamura, K. & Abe, Y. Monomeric sarcosine oxidase acts on both L- and D-substrates. *Int. J Anal Bio-Sci.* **35**, 426-430 (2012).
8. Nishiya, Y. & Kishimoto, T. Alteration of L-proline oxidase activity of sarcosine oxidase and a structural interpretation. *Int. J Anal Bio-Sci.* **33**, 161-166 (2010).
9. Shimozawa, Y. & Nishiya, Y. Malate dehydrogenase of *Geobacillus stearothermophilus*: A practically feasible enzyme for clinical and food analysis. *Int. J. Anal. Bio-Sci.* **7**, 59-67 (2019).
10. Wilkinson, J. H., Baron, D. N., Moss, D. W. & Walker, P. G. Standardization of clinical enzyme assays: a reference method for aspartate and alanine transaminases. *J. Clin. Pathol.* **25**, 940-944 (1972).
11. Peled, N. An enzymic bicarbonate reagent that is free of pyruvate interference. *Clinical chemistry.*

- 27, 199-200 (1981).
12. Chemnitz, G. C. & Schmid, R. D. L-malate determination in wines and fruit juices by flow injection analysis adaptation of a coupled dehydrogenase/transferase system. *Anal. Lett.* **22**, 2897-2913 (1989).
 13. Guynn, R. W. & Veech, R. L. Enzymatic Determination of Acetate. *Methods Enzymol.* **35**, 302-307 (1975).
 14. Moellering, H. & Gruber, W. Determination of citrate with citrate lyase. *Anal. Biochem.* **17**, 369-376 (1966).
 15. STEINBÜCHEL, A. & SCHLEGEL, H. G. NAD-Linked L(+)-Lactate Dehydrogenase from the Strict Aerobe *Alcaligenes eutrophus*. *Eur. J. Biochem.* **130**, 321 -328 (1983).
 16. Goward, C. R. & Nicholls, D. J. Malate dehydrogenase: A model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Science.* **3** 1883-1888 (1994).
 17. Boucher, J. I., Jacobowitz, J. R., Beckett, B. C., Classen, S. & Theobald, D. L. An atomic-resolution view of neofunctionalization in the evolution of apicomplexan lactate dehydrogenases. *eLife.* **3**, e02304 (2014).
 18. Frazão, C. J. R., Topham, C. M., Malbert, Y., François, J. M. & Walther, T. Rational engineering of a malate dehydrogenase for microbial production of 2,4-dihydroxybutyric acid via homoserine pathway. *Biochem. J.* **475**, 3887-3901 (2018).
 19. Suzuki, K., Maeda, S. & Morokuma, K. Roles of Closed- and Open-Loop Conformations in Large-Scale Structural Transitions of l -Lactate Dehydrogenase. *ACS Omega.* **4**, 1178–1184 (2019).
 20. Lee, D., Hong, J. & Kim, K. J. Crystal structure and biochemical characterization of malate dehydrogenase from *Metallosphaera sedula*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **509**, 833-838 (2019).

21. Heyde, E. & Ainsworth, S. Kinetic studies on the mechanism of the malate dehydrogenase reaction. *J. Biol. Chem.* **243**, 2413-2423 (1968).

第2章 *Geobacillus stearothermophilus* 由来リンゴ酸デヒドロゲナー

ゼの結晶構造解析による反応サイクルの解明

2-1 背景

第1章で述べたように, PEにおいて基質特異性の改変は最も難易度が高く, 酵素の立体構造と基質特異性の関係の理解が重要な課題となっている. MDHは, シンプルな反応を触媒することに加えて, OAAに対して高い基質特異性を有しており, 基質特異性の構造-機能相関の基礎的理解において優れたモデルである. しかし, MDHの可動ループが基質からどのような影響を受けて構造変化に至るのかについては, 未だ構造的に説明されていない. 一方, MDHの触媒機構については, 詳しく明らかになっている. MDHの活性部位には, 3つのR残基 (gs-MDHでは, R86, R92およびR155) が保存されており, その内のR86およびR92は可動ループ上に, R155は基質結合ポケット内にそれぞれ位置している [1]. 補酵素であるNADHと基質であるOAAが活性部位に結合したclosed構造において, R86およびR155は, OAAの β -カルボキシ基および α -カルボキシ基とそれぞれ静電結合を形成し, 触媒反応時におけるOAAの配向を安定化する役割を持つ (図2-1). また, R92はOAAの α -ケト基と相互作用し, 触媒残基であるH残基 (H179) との遷移状態を安定化することが知られている [2]. H179は, 活性部位の触媒ループ (178~182番目の残基) と呼ばれるループ上に存在し, D152とプロトン・リレーのペアを形成する [3]. H179の H^+ およびNADHの H が, α -ケト基に供給されることでOAAを還元し, その後生成物が放出されることで触媒反応が完了する.

市販MDHの中でも, pm-MDHやtf-MDHは, 既に結晶構造が決定されている. しかし, gs-MDHは, 熱安定性, 基質親和性の面から, 市販MDHの中で最も有用性が高いにもかかわらず, 結晶構造等の構造情報が明らかになっていない. 第2章では, MDHのホモロジーモデルと他の市販MDHとの構造比較による酵素特性の違いを分析した. また, 分子レベ

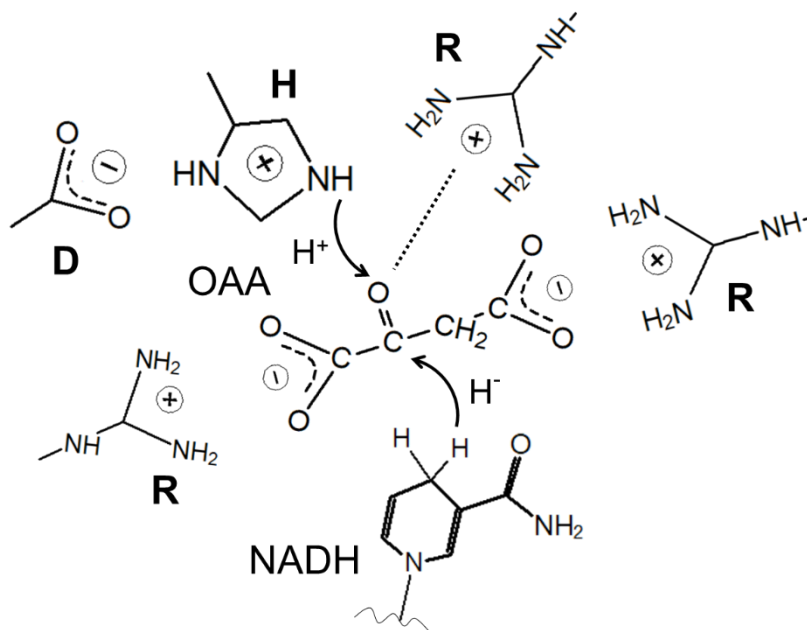


図 2-1. MDH の触媒機構の模式図. 各アミノ酸残基が有する電荷は, +および-の記号で示した. R による遷移状態の安定化作用を破線で示し, α -ケト基への H^+ およびの H^- の移動を実線で示した.

ルでの構造分析と反応サイクルの網羅的理解を目的に, gs-MDH の様々な条件による結晶構造解析を行い, 可動ループの構造変化機構の解明を試みた.

2-2 材料と方法

全ての化合物は, Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan) もしくは Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) から入手した.

gs-MDH のホモロジーモデリング

MDH のアミノ酸配列のホモロジー検索およびマルチプルアライメントは, Molecular Operating Environment (MOE) software (Chemical Computing Group Inc, Montreal, Quebec, Canada, 2019) および GENETYX software を用いてそれぞれ行った. gs-MDH の open

および closed 構造の立体構造モデルは, *Bacillus anthracis* 由来 MDH [ba-MDH; Protein Data Bank (PDB) ID: 3TL2] および *Chloroflexus aurantiacus* 由来 MDH (PDB ID: 1UXI) の結晶構造を基にそれぞれ予測した. 立体構造の重ね合わせ, Root Mean Square Deviation (RMSD : C α 原子間) の算出, 結合エネルギーの予測は, MOE software を用いて実施した.

gs-MDH の酵素発現および精製

gs-MDH 遺伝子 (DDBJ/EMBL/GenBank accession number: LC100138) 発現ベクターは, pET-28a(+) の NdeI/BamHI site (GenScript, Inc., Piscataway, NJ, USA) に導入したものを合成した. gs-MDH の組み換え菌は, gs-MDH 発現ベクターで, *E. coli* BL21(DE3) pLysS 株を形質転換することで取得した. 組み換え菌の培養は, Luria Bertani (LB) 液体培地を用いて 37°C で行った. 培養液の OD₆₀₀ が 0.6 に達した時点で終濃度が 0.1 mM になるように isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加した後, 培養温度 25°C で 18 時間培養し gs-MDH の発現を誘導した. 発現誘導後, 組み換え菌を 4,900 g で 15 分間の遠心分離で集菌し, 沈殿を buffer A [20 mM Tris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris) -HCl, 150 mM NaCl, 1 mM 2-mercaptoethanol (2-ME), pH 7.8] で懸濁した. 氷上での超音波破碎を行った後, 15,000 g で 30 分間の遠心分離により破碎上清を回収した. 破碎上清の核酸は, 2% (w/v) streptomycin sulfate で取り除き, その後 buffer A に対する透析によりタンパク質溶液を取得した. タンパク質溶液を, buffer B (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM 2-ME, pH 7.8) で平衡化した Ni 含有 HiTrap Chelating HP column (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ, USA) に添加した. その後, buffer C (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 M imidazole, 1 mM 2-ME, pH 7.8) を用いて結合タンパク質を溶出させた. 溶出画分の NaCl および imidazole を, 20 mM Tris-HCl (pH 7.8) に対する透析で取り除いた後, 透析サンプルを HiTrap Q HP anion exchange chromatography column (GE Healthcare) に添加し, buffer D (20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 1 mM 2-ME, pH 7.8) を用いて溶出させた. buffer E (20 mM Tris-HCl, 1 mM 2-ME, pH 7.8) で平衡化さ

せた Superdex 200 prep (GE Healthcare) を用いたサイズ排除クロマトグラフィーにより gs-MDH の精製酵素を取得した。精製タンパク質の純度は, Extra PAGE One Precast Gel (Nacalai Tesque) を用いた Sodium dodecyl sulfate -polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) により確認した。タンパク質濃度は, Bradford 法 [4] により定量した。

gs-MDH の結晶化

gs-MDH の結晶は, 3 種の異なる条件で取得した (crystal 1–3) 。Crystal 1 は, 7 mg/mL gs-MDH を含むタンパク質溶液を用いて, リザーバー 1 [0.1 M 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (pH 7.5), 10% (w/v) polyethylene glycol (PEG) 6000 および 5% (w/v) 2-methyl-2,4-pentanediol (MPD)] に対する 20°C でのハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化させた。Crystal 2 は, crystal 1 を 2 mM OAA および 2 mM NAD⁺を含むクライオプロテクトに浸漬させる soaking 法により取得した。Crystal 3 は, 10 mg/mL gs-MDH, 2 mM OAA および 2 mM NAD⁺を含むタンパク質溶液を用いて, リザーバー 2 [0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) および 16% (w/v) PEG 2000 monomethyl ether] に対する 20°C でのハンギングドロップ蒸気拡散法により共結晶化させた。

gs-MDH の X 線結晶構造解析

各結晶は, 15% (w/v) MPD を含む各リザーバーに浸漬後, -180°C の N₂ ガスで瞬間冷凍した。回折データの indexing および integration は, x-ray detector software (XDS) により行った [5]。Scaling および merging は, AIMLESS program で行った [6]。Crystal 1 の初期位相は, gs-MDH の open 構造のホモロジーモデルを基にした分子置換法により MOLREP [7] で決定した。精密化は, COOT [8] および REFMAC [9] を使用したモデル構築サイクルにより完了した。

2-3 結果と考察

gs-MDH ホモロジーモデルと他のMDHの結晶構造の比較

gs-MDHの構造情報の取得のため、まずMOE softwareを用いたホモロジーモデリングを行った(図2-2)。gs-MDHのopenおよびclosed構造のテンプレート構造として、*Ba. anthracis* (PDB ID: 3TL2, sequence identity 85%)および*Ch. aurantiacus* (PDB ID: 1UXI, sequence identity 58%)由来MDHの結晶構造を使用した。両構造のエネルギー最安定化計算の後、全体および可動ループ領域のRMSD値は、それぞれ1.3 Åおよび3.4 Åであった(図2-3A)。可動ループ領域における高いRMSD値を示したことから、可動ループ領域のコンフォメーションが異なるopenおよびclosed構造が確認された。

得られたgs-MDHのホモロジーモデルと常温菌由来であるba-MDHの結晶構造を基に、両酵素の熱安定性の違いについて比較した。gs-MDHのopen構造モデルは、198の水素結合、22の静電結合および5の疎水結合を有しており、それらの合計相互作用エネルギーは、-1124.93 kcal/molであった(表2-1)。一方、ba-MDHのopen構造は、208の水素結合、13の静電結合および3の疎水結合を有しており、合計相互作用エネルギーは-867.75 kcal/molであった。静電結合は、水素結合や疎水結合と比べて結合力が極めて強いことから、gs-MDHは、

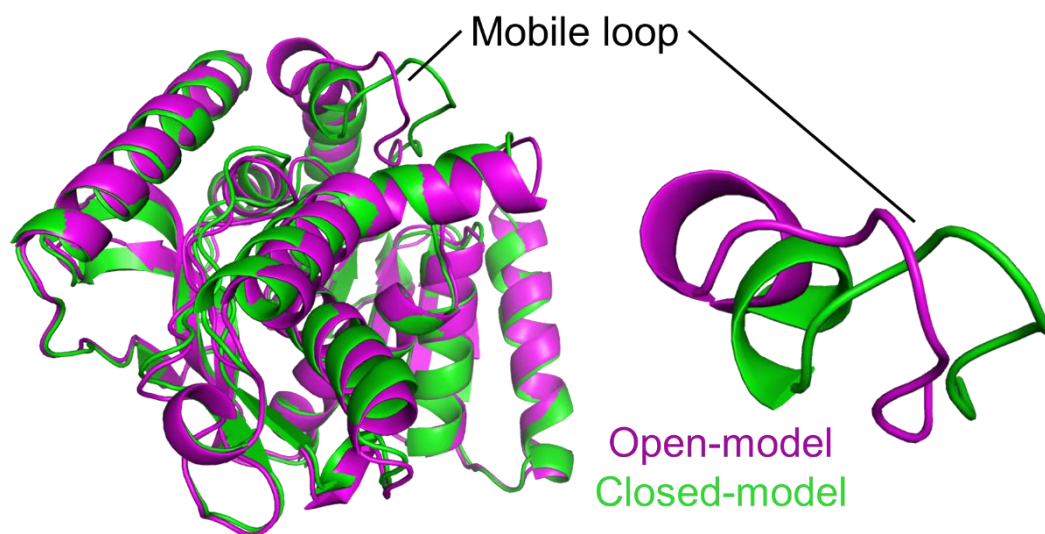


図 2-2. gs-MDH ホモロジーモデルの全体構造および可動ループのコンフォメーション。Open および closed 構造のモデルは、パープルおよびグリーンでそれぞれ示した。

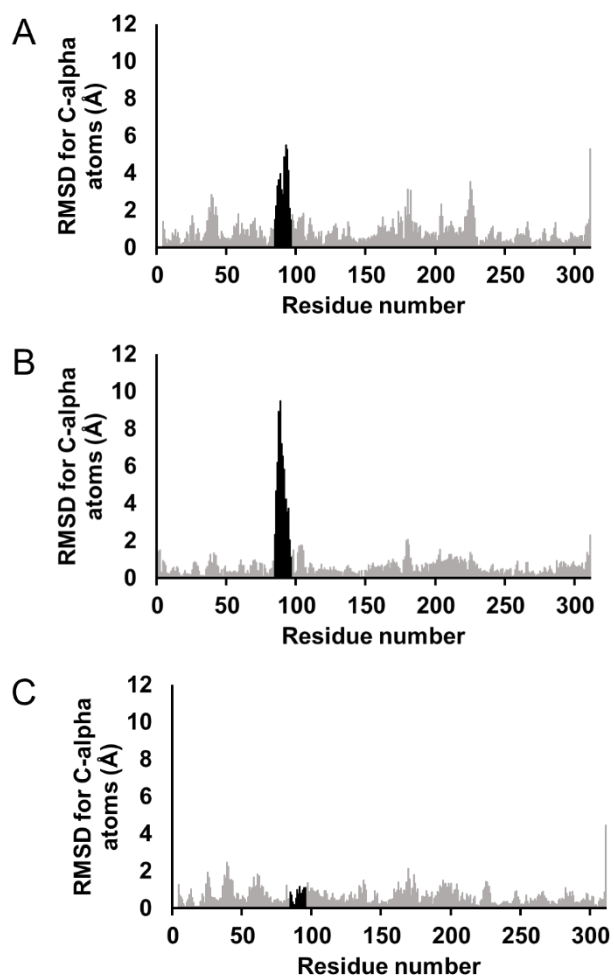


図 2-3. gs-MDH のホモロジーモデルおよび結晶構造の RMSD 値. 可動ループおよび触媒ループはブラック, その他の領域はグレーで示した. A. ホモロジーモデル open 構造 vs ホモロジーモデル closed 構造. B. ホモロジーモデル open 構造 vs apo-form. C. ホモロジーモデル closed 構造 vs closed-form.

表 2-1. 各 MDH の結合数と合計相互作用エネルギー

	Number of interactions			Total interaction energy (kcal/mol)
	H	I	A	
Homology model of gs-MDH open-form	198	22	5	-1124.93
ba-MDH (3TL2)	208	13	3	-867.75
pm-MDH (1MLD)	253	11	8	-1009.41
tf-MDH (1BMD)	273	9	9	-1004.98

H, I および A は, それぞれ水素結合, 静電結合および CH- π 結合を示している.

ba-MDHより多くの静電結合数によって安定な分子構造を実現しており、両酵素の熱安定性の違いへの寄与を示唆している。さらに、市販MDHであるpm-MDHおよびtf-MDHについても、同様に相互作用を比較した。常温酵素であるpm-MDHは、253の水素結合、11の静電結合および8の疎水結合を有しており、合計相互作用エネルギーは、-1009.41 kcal/molであった。pm-MDHの静電結合数は、ba-MDHと比べて少ない一方で、水素結合数は顕著に多かったことから、比較的結合力が低い結合を多く持つことで、常温での高い活性と安定性を両立していることが推察された。tf-MDHは、多くの水素結合数を有していたが、超好熱菌由来でありながら合計相互作用エネルギーが、中等度好熱菌由来のgs-MDHよりも低い値であった。したがって、tf-MDHは、gs-MDHと異なる手段で高い熱安定性を獲得していることが示唆された。

X線結晶構造解析によるgs-MDHの立体構造の決定

gs-MDHの可動ループの構造変化における、原子レベルでの詳細な構造分析のためにX線結晶構造解析を試みた。特に、基質結合による可動ループとの相互作用やコンフォメーションの違いを観察するために、基質や補酵素の条件に加えて、それらリガンドの複合化条件も検討した。gs-MDHの結晶化条件の最適化の結果、apo条件の結晶に加えて、apo結晶をリガンドを含む溶液に浸漬させるsoaking法および、gs-MDHとリガンドを混合しリザーバー溶液に対して平衡化させるco-crystallization法により得られた各結晶の構造決定に成功した(表2-2)。各結晶は、1.95~2.20 Åの分解能で構造が決定された(表2-3)。

gs-MDHのすべての結晶構造は、非対称単位が溶液中でのgs-MDHの四量体構造に対応する4つのサブユニットから構成されていた(図2-4)。Apo結晶の構造(apo-form)は、可動ループのコンフォメーションがopen構造を示した(図2-5A)。Apo結晶のsoakingにより得られた構造(OAA/open-form)は、四量体の各サブユニットの活性部位それぞれにOAAおよびNAD⁺が結合しており、可動ループのコンフォメーションはopen構造であった(図

表 2-2. gs-MDH の各結晶における結合リガンドと可動ループのコンフォメーション

Crystal	Ligand adding	Bound molecule	Mobile loop	Structure name
1		None	Open	Apo-form
2	Soaking	OAA/NAD ⁺	Open	OAA/open-form
3	Co-crystallization	APR	Open	APR/open-form
		OAA/APR	Closed	Closed-form

APR : adenosine 5'-diphosphoribose

2-5B) .OAA および NAD⁺ との co-crystallization により得られた結晶では, NAD⁺ を用いて結晶化を行ったが, ニコチンアミド基が加水分解されたアデノシン 5'-ジホスホリボース (APR) が各サブユニットの活性部位に結合していた (図 2-5C および D) . また, 四量体構造の内, 3 つのサブユニット (APR/open-form) の可動ループが open 構造のコンフォメーションをとり, 残りの 1 つのサブユニット (closed-form) の可動ループが closed 構造のコンフォメーションを形成していた.

NAD⁺ のニコチンアミド基の分解により, OAA の α -ケト基への H の遷移については議論することはできないが, *Methylobacterium extorquens* 由来の MDH の結晶構造 [10] において, APR と NAD⁺ で可動ループのコンフォメーションに差異がないことが報告されていることから, 可動ループの構造変化の分析において, NAD⁺ が結合した gs-MDH の構造として議論が可能であると判断した. また, ニコチンアミド基の分解は, NAD⁺ を使用した結晶構造でのみ観察されており, MDH の酵素反応としても報告例がない. したがって, 結晶化に使用されたりザーバー溶液中での非酵素的な分解であると考えられる.

gs-MDH の結晶構造とホモロジーモデルの比較

ホモロジーモデリングによる gs-MDH の構造予測の精度を確認するため, open および closed 構造のモデルと対応する apo-form および closed-form の結晶構造を比較した. ホ

表 2-3. データコレクションおよび精密化統計

	Crystal 1	Crystal 2	Crystal 3
Data collection			
X-ray source	BL38B1	BL26B1	BL26B1
Wavelength (Å)	1.0000	1.0000	1.0000
Space group	$P2_12_12_1$	$P12_11$	$P2_12_12_1$
Unit cell parameters			
a, b, c (Å)	81.68, 108.7, 146.6	63.16, 82.24, 119.48	83.33, 103.2, 150.8
α, β, γ (°)	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 93.42, 90.00	90.00, 90.00, 90.00
Resolution range (Å) ^a	50.0-1.95 (1.98-1.95)	50.0-2.20 (2.26-2.20)	49.16-2.20 (2.25-2.20)
R_{merge} (%) ^{a,b}	7.9 (59.6)	19.8 (53.5)	11.1 (44.1)
Completeness (%) ^a	99.7 (99.2)	99.0 (99.6)	100 (100)
Total reflections	1,129,027	284,578	1,839,722
Unique reflections	95,978	62,889	66,776
$CC_{1/2}$ (%) ^a	99.8 (83.5)	96.6 (91.3)	99.9 (99.0)
$I/\sigma(I)$ ^a	11.2 (3.2)	4.0 (1.6)	21.8 (8.1)
Refinement			
Resolution range (Å) ^a	44.62-1.95 (2.00-1.95)	39.4-2.20 (2.26-2.20)	49.2-2.20 (2.26-2.20)
Number of reflections	95,909	62,624	66,701
$R_{\text{cryst}}/R_{\text{free}}$ (%) ^{a,c,d}	20.6 (32.3)/25.5 (35.7)	22.4 (5.9)/28.5 (11.1)	18.0 (20.8)/23.0 (26.0)
RMSD bond length (Å)	0.008	0.009	0.007
RMSD bond angle (degree)	1.515	1.694	1.469
Number of atoms			
Protein	9,290	9,332	9,375
Water	268	34	250
Ligand	-	212	153
Average B-factor (Å ²)			
Overall	42.2	46.1	52.4
Protein	42.3	46.1	52.4
Ligand	-	45.6	57.1
Water	39.6	60.7	48.2
Ramachandran plot (%) ^e			
Favored	97.4	94.9	97.2
Allowed	2.2	4.1	2.5

^a Values in parentheses are for the highest resolution shell.

^b $R_{\text{merge}} = \sum_{\text{hkl}} \sum_i |I_{\text{hkl},j} - \langle I_{\text{hkl}} \rangle| / \sum_{\text{hkl}} \sum_i I_{\text{hkl},j}$, where $I_{\text{hkl},j}$ is the intensity of observation $I_{\text{hkl},j}$ and $\langle I_{\text{hkl}} \rangle$ is the average of symmetry-related observations of a unique reflection.

^c $R_{\text{cryst}} = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$, where F_o and F_c are observed and calculated structure factor amplitudes, respectively.

^d R_{free} was calculated using a randomly-selected 5% of the dataset that was omitted from all stages of refinement.

^eRamachandran plots were prepared for all residues other than Gly and Pro.

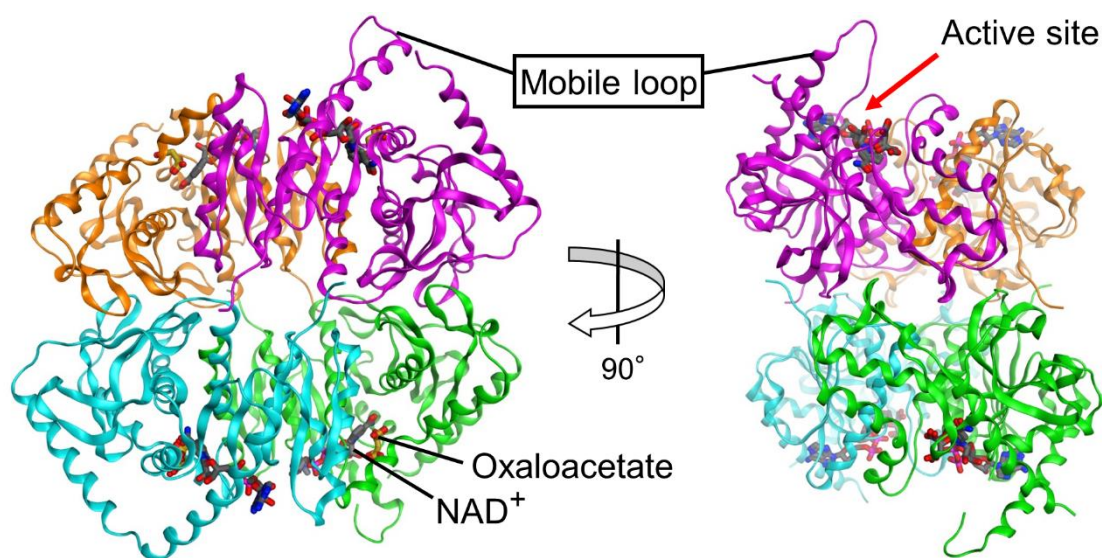


図 2-4. OAA/open-form の結晶構造. 結晶構造は、サブユニット毎に色分けし、主鎖およびリガンド分子は、それぞれリボンおよびスティックモデルで示した。

モロロジーモデル open 構造と apo-form 間の全体構造および可動ループ領域の RMSD 値は 1.3 Å および 3.4 Å であった (図 2-3B) . 両酵素の全体の主鎖構造は、高いモデリングの精度が確認された一方で、可動ループ領域では、モデルより開いたコンフォメーションをとっていた (図 2-6A) . ホモロジーモデル open 構造のテンプレート構造である ba-MDH (PDB ID : 3TL2) は、結晶化条件に thiocyanate ion や 1,2-ethanediol などの負電化合物が含まれており、活性部位にそれら化合物が結合することで、可動ループが closed 構造のような閉じたコンフォメーションを形成している. したがって、ba-MDH の結晶構造では、可動ループ上の R 残基と負電荷化合物の相互作用により、closed 構造様のコンフォメーションになっており、これが gs-MDH のホモロジーモデル open 構造と apo-form の可動ループの違いに影響したと考えられる. また、ba-MDH の可動ループのコンフォメーション変化は OAA とは全く分子構造が異なる負電荷化合物の結合により生じるため、MDH における構造変化は基質の構造よりも電荷による影響が強いことが推察される.

次に、ホモロジーモデルの closed 構造と closed-form の結晶構造を比較した. 両構造間における全体構造および可動ループ領域の RMSD 値 (図 2-3C) は、それぞれ 0.85 Å お

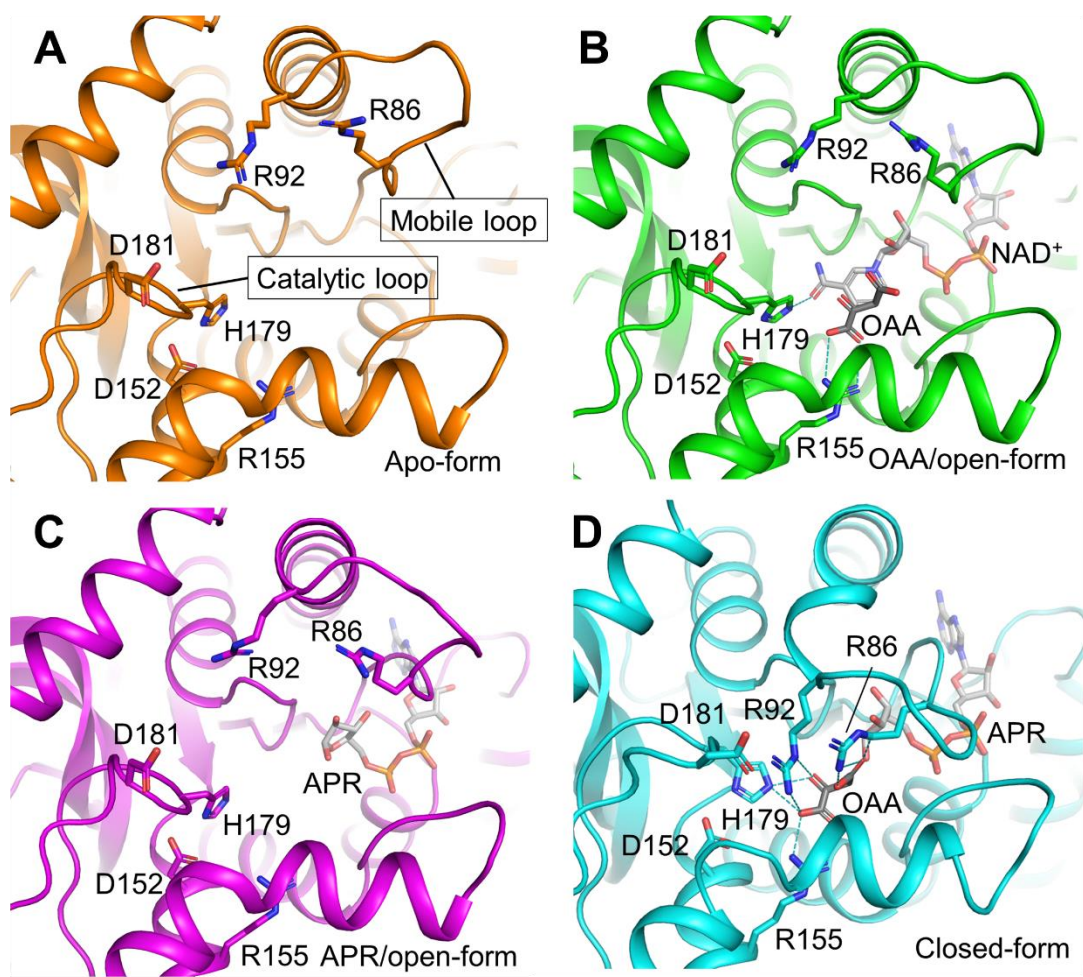


図 2-5. gs-MDH の活性部位構造. 基質および補酵素は、それぞれグレーおよびライトグレーで示した. 静電結合および水素結合は、破線で示した.

および 0.80 \AA を示し, gs-MDH の closed 構造の高いモデリング精度が確認された (図 2-6B) .

gs-MDH の 4 種の結晶構造に基づいた反応サイクル

MDH の反応は、補酵素および基質の結合による closed 構造への構造変化を経て、OAA の還元後に再び反応可能な open 構造へ戻るサイクルを形成している [11]. また、補酵素の結合では、可動ループのコンフォメーションが変化しないことが報告されている [10]. この反応サイクルにおいて、リガンドの結合様式や可動ループのコンフォメーションが異なる様々な結晶構造が報告されている [12-16] が、それぞれの構造は生物種が異なり断片

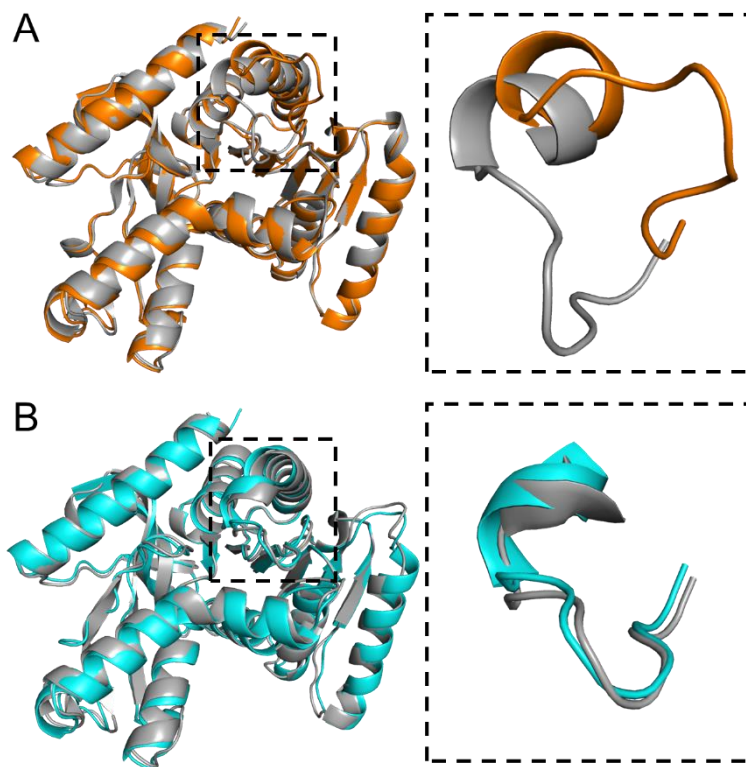


図 2-6. gs-MDH のホモロジーモデルおよび結晶構造の比較. A. ホモロジーモデルの open 構造 (グレー) および apo-form (オレンジ) の全体構造および可動ループの重ね合わせ構造. B. ホモロジーモデルの closed 構造 (グレー) および closed-form (シアン) の全体構造および可動ループの重ね合わせ構造.

的であったため、アミノ酸配列等の違いから反応サイクルの網羅的な解析は困難であった。本研究で gs-MDH を用いた 4 種の結晶構造の決定に成功したことで、反応サイクルを 4 つのステップに分割したより詳細な構造分析が可能となった (図 2-7)。特に OAA/open-form の構造決定は、可動ループのコンフォメーションが異なった closed-form との比較による構造変化の詳細な分析が期待できる。したがって、各結晶構造を、反応サイクルにおける以下の構造にそれぞれ割り当てた。Apo-form は、リガンドフリーの状態であることから、反応サイクルにおける最初の状態 : state 1 に対応する。APR/open-form は補酵素のみが結合していることから、state 1 に補酵素が結合した構造 : state 2 に対応する。OAA/open-form は、open 構造でありながら OAA が結合していることから、state 2 にさらに OAA が結合した状態 : state

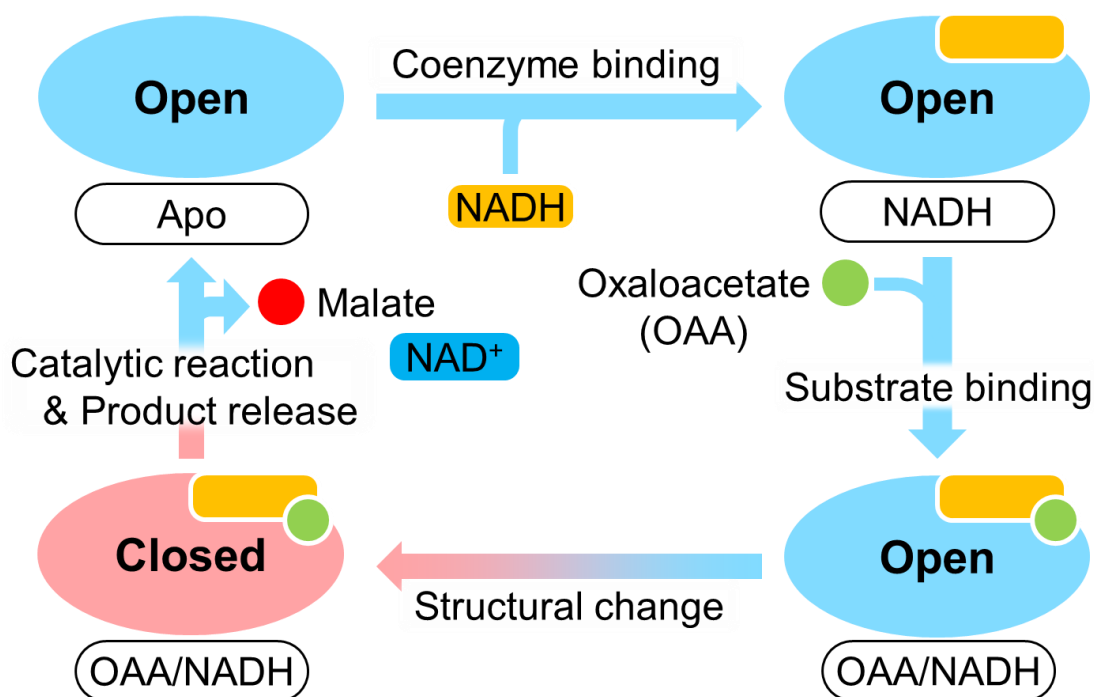


図 2-7. MDH の反応サイクルの概略図.

3 に対応する. 最後に, リガンドが結合した可動ループが closed 構造を示す closed-form が触媒反応状態: state 4 に対応する.

活性部位の正電荷ポケット

Apo-form の活性部位には, 補酵素や基質が結合する深い溝が存在し, 保存された 3 つの R 残基 (R86, R92 および R155), 触媒残基の H179 および K215 などのアミノ酸残基により正電荷のポケットが形成されていた (図 2-8). したがって, R86 および R92 が存在する可動ループと R155, H179 および K215 が存在する基質結合ポケット間の正電荷同士の反発が, 可動ループのコンフォメーションを open 構造で維持する役割が示唆された. また, gs-MDH は, dicarboxylate (DC) である OAA に対して特異的に反応し, monocarboxylate (MC) である PYR に対して反応性を示さないことから, OAA の強い負電荷による正電荷ポケットの中和が, 構造変化の開始点となると推察される. これらの洞察は, 他の MDH の結晶構造

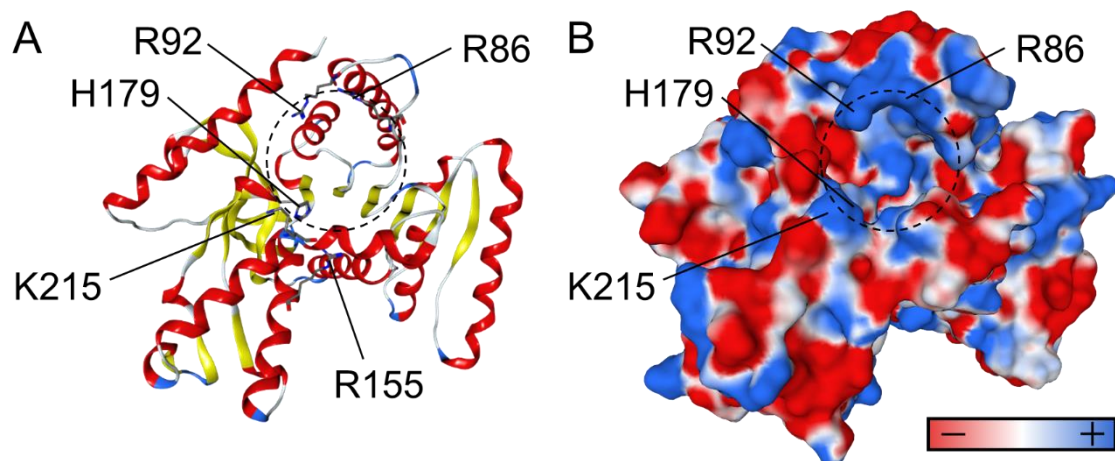


図 2-8. gs-MDH の apo-form の全体構造および表面電荷分布. 基質結合部位は、破線で示した. A. Apo-form の全体構造. B. Apo-form の表面電荷分布. 正電荷および負電荷の分布は、それぞれブルーおよびレッドで示した.

分析の結果も説明できており、基質の電荷が MDH における基質認識の要素の 1 つであることを示唆している.

Coenzyme-binding および substrate-binding step

gs-MDH における coenzyme-binding の影響を調べるため、apo-form および APR/open-form の構造を比較した. 両構造の全体構造および可動ループの RMSD 値は、それぞれ 0.49 Å および 2.0 Å であった (図 2-9A). したがって、他の MDH で報告されているように、gs-MDH においても補酵素の有無で局所的な構造の違いは観察されなかった.

次に、substrate-binding の影響を調べるため、APR/open-form および OAA/open-form の構造を比較した. 本ステップにおいても、両構造間で低い RMSD 値を示し、coenzyme-binding step と同様に局所的な構造の違いは観察されなかった (図 2-9B). また、OAA/open-form において、OAA は、R86 もしくは R92 ではなく R155 と静電結合を形成していたことから、open 構造では基質結合に関わる R 残基の内 R155 との結合が最も安定であることが示唆された (図 2-5B). したがって、substrate-binding step において OAA は初めに R155 と静電結

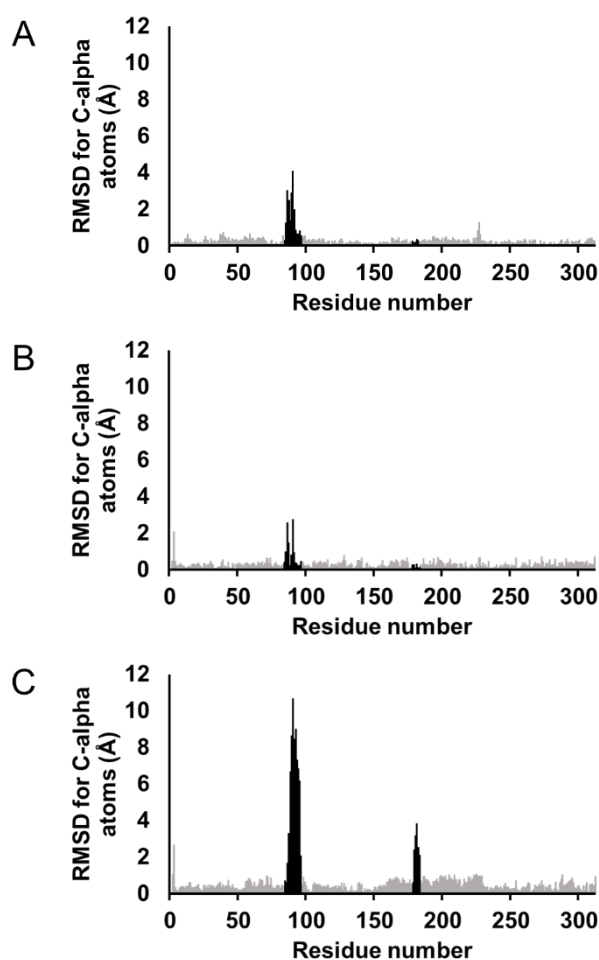


図 2-9. gs-MDH 結晶構造の RMSD 値. 可動ループおよび触媒ループはブラック, その他の領域はグレーで示した. A. apo-form vs APR/open-form. B. APR/open-form vs OAA/open-form. C. OAA/open-form vs closed-form.

合を形成した後, 可動ループの構造変化を経て他の R 残基と相互作用すると推察された.

可動ループのコンフォメーション変化による活性部位の相互作用の変化

可動ループのコンフォメーションの違いによる影響を調べるため, OAA/open-form および closed-form の構造を比較した. 両構造において, OAA の α -カルボキシ基は, R155 との静電結合により活性部位に固定されていた (図 2-10). また, OAA/open-form において, OAA の β -カルボキシ基は, 可動ループとの相互作用がないため様々な配向をとっていた

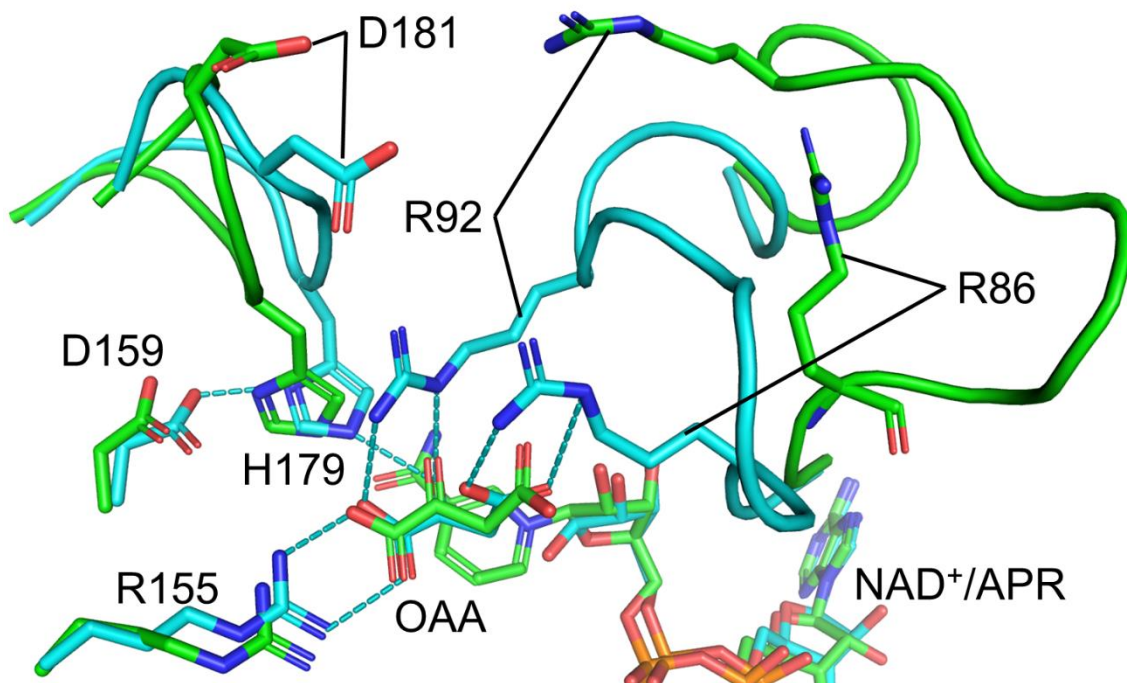


図 2-10. OAA/open-form (グリーン) および closed-form (シアン) の活性部位の比較. 静電結合および水素結合は破線で示した.

(図 2-11) . 一方, closed-form では, OAA の β -カルボキシ基および α -ケト基は, 可動ループの R86 および R92 と相互作用を形成し, 触媒反応が可能な配向になっていた. したがって, 可動ループの構造変化による OAA との相互作用の形成は, OAA の配向の固定による触媒反応の安定な進行に重要であることが構造的に示された.

OAA/open-form および closed-form 間の RMSD 値は, 可動ループおよび触媒ループにおいて, それぞれ 5.5 Å および 2.4 Å を示し, 可動ループに加えて触媒ループのコンフォメーション変化も観察された (図 2-9C) . OAA/open-form は, 触媒残基である H179 と OAA 間の相互作用は観察されなかった. 一方, closed-form は, 触媒ループのコンフォメーション変化および H179 側鎖の配向変化 (switching) により, H179 はプロトン・リレーのペアである D159 や OAA の α -ケト基と 2.7 Å および 2.8 Å の距離で水素結合を形成していた (図 2-10) . これは, H179 の switching により触媒反応に必要な相互作用が形成されることを示している. また, H179 の switching は OAA/open-form ではなく, 可動ループが構造変化した後

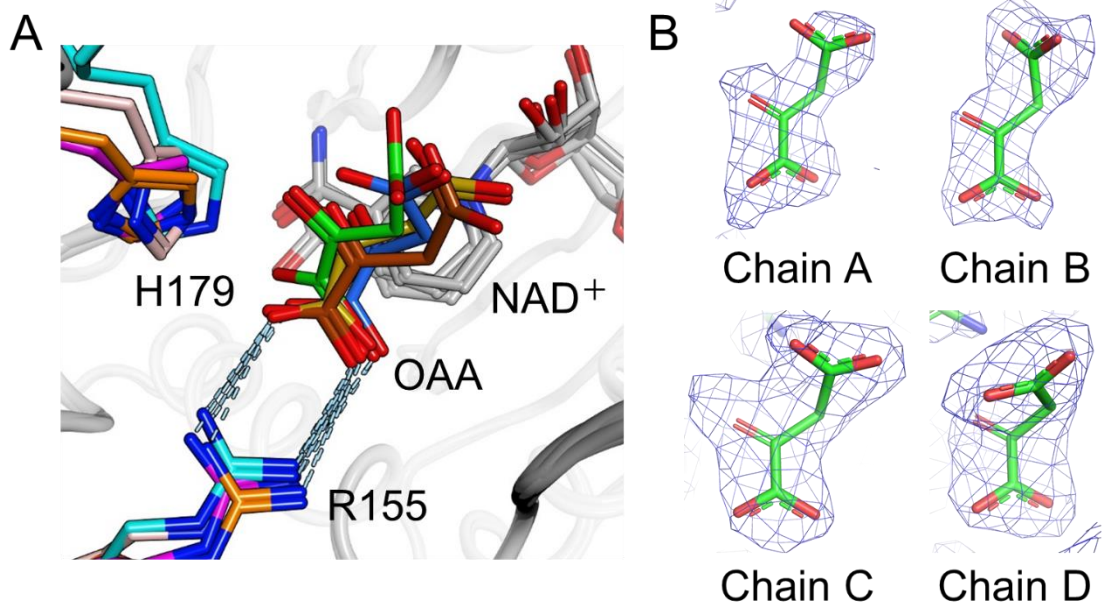


図 2-11. OAA/open-form における各サブユニットの OAA のコンフォメーション. A. OAA/open-form の各サブユニットの重ね合わせ構造. アミノ酸残基および OAA は、サブユニットごとに色分けし、静電結合は破線で示した. B. OAA/open-form の各 OAA の 2σ レベルにおける $2F_o-F_c$ マップ. OAA およびその電子密度は、それぞれグリーンおよびブルーで示した.

の closed-form で観察されたことから、switching は可動ループの構造変化により誘導されることが示唆された. 以上の結果は、可動ループとの相互作用が可能な基質のみが、可動ループのコンフォメーション変化および触媒ループの活性化を誘導することを示している. この H179 の switching は、MC などの負電荷が弱い基質アナログとの反応を防ぐ、基質特異性に優れた特性である.

2-4 まとめ

第 2 章では、可動ループの構造変化機構および反応サイクルの解明を目的に、gs-MDH の X 線結晶構造解析と構造比較を行った. その結果、gs-MDH の 4 種の結晶構造の決定に成功し、それらの構造から、apo-form から closed-form に至る詳細な構造変化機構と gs-MDH の高基質特異性に寄与するコンフォメーションの変化が明らかになった (図 2-12).

Proposed catalytic cycle of malate dehydrogenase from *Geobacillus stearothermophilus* (gs-MDH) based on structural analysis

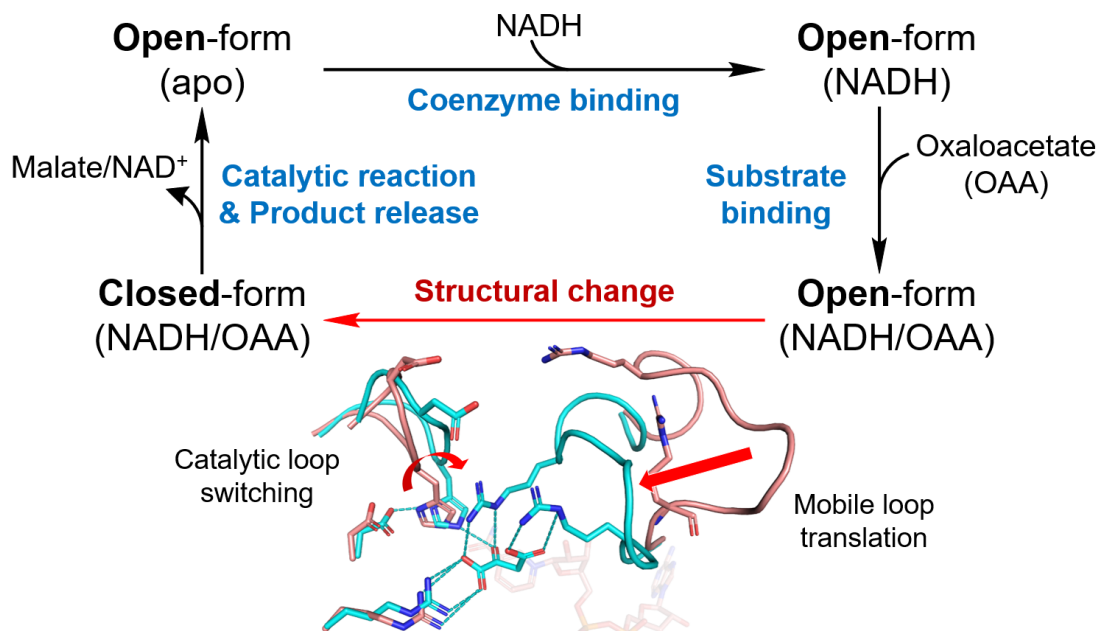


図 2-12. gs-MDH の反応サイクルの概略図および基質結合による活性部位のコンフォメーション変化.

Coenzyme-binding step において, apo 構造への補酵素の結合は, 活性部位に対する影響がほとんどなく, 全体構造は大きく変化しない. 次の substrate-binding step では, gs-MDH とのファースト・コンタクトとして, OAA の α -カルボキシ基が基質結合ポケットの R155 との静電結合により活性部位に固定される. その後, OAA の β -カルボキシ基は可動ループの R86 と静電結合を形成し, OAA を介した R86 および R155 の架橋が可動ループのコンフォメーション変化のドライビング・フォースとなる. その結果, structural-change step において, 触媒反応を実現する可動ループの構造変化に伴った H179 の switching および R86 との静電結合による OAA の β -カルボキシ基の安定化が行われる.

以上の gs-MDH の反応サイクルにおいて, apo 構造における正電荷ポケットおよび可動ループの構造変化に伴った H179 の switching は, カルボキシ基に依存した負電荷の強度による基質選択に重要な役割を果たし, 基質選択の要素として gs-MDH の高基質特異性

への寄与が明らかになった。このような基質の電荷を利用した基質認識は、 α -ケト酸デヒドロゲナーゼファミリーだけでなく多く酵素に共通の選択機構として、基質特異性の分子レベルでの理解に寄与すると考えられる。

参考文献

1. Chapman, A. D. M., Cortés, A., Dafforn, T. R., Clarke, A. R. & Brady, R. L. Structural basis of substrate specificity in malate dehydrogenases: Crystal structure of a ternary complex of porcine cytoplasmic malate dehydrogenase, α -ketomalonate and tetrahydro NAD. *J. Mol. Biol.* **285**, 703–712 (1999).
2. Minárik, P., Tomaásková, N., Kollárová, M. & Antalík, M. Malate Dehydrogenases - Structure and function. *Gen. Physiol. Biophys.* **21**, 257–265 (2002).
3. Goward, C. R. & Nicholls, D. J. Malate dehydrogenase: A model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Science.* **3** 1883-1888 (1994).
4. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
5. Kabsch, W. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 133-144 (2010).
6. Evans, P. R. & Murshudov, G. N. How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **69**, 1204-1214 (2013).
7. Vagin, A. & Teplyakov, A. MOLREP: An Automated Program for Molecular Replacement. *J. Appl. Crystallogr.* **30**, 1022-1025 (1997).
8. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 486-501 (2010).
9. Murshudov, G. N. *et al.* REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **67**, 355-367 (2011).
10. González, J. M., Marti-Arbona, R., Chen, J. C. H., Broom-Peltz, B. & Unkefer, C. J. Conformational changes on substrate binding revealed by structures of *Methylobacterium*

extorquens malate dehydrogenase. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* **74**, 610–616 (2018).

11. Alldread, R. M. *et al.* Catalytic-rate improvement of a thermostable malate dehydrogenase by a subtle alteration in cofactor binding. *Biochem. J.* **305**, 539–548 (1995).
12. Birktoft, J. J., Rhodes, G. & Banaszak, L. J. Refined Crystal Structure of Cytoplasmic Malate Dehydrogenase at 2.5-Å Resolution. *Biochemistry* **28**, 6065–6081 (1989).
13. Kelly, C. A., Nishiyama, M., Ohnishi, Y., Beppu, T. & Birktoft, J. J. Determinants of Protein Thermostability Observed in the 1.9-Å Crystal Structure of Malate Dehydrogenase from the Thermophilic Bacterium *Thermus flavus*. *Biochemistry* **32**, 3913–3922 (1993).
14. Hall, M. D. & Banaszak, L. J. Crystal Structure of a ternary complex of *Escherichia coli* malate dehydrogenase citrate and NAD at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **232**, 213–222 (1993).
15. Richard, S. B., Madern, D., Garcin, E. & Zaccai, G. Halophilic adaptation: Novel solvent protein interactions observed in the 2.9 and 2.6 Å Resolution structures of the wild type and a mutant of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui*. *Biochemistry* **39**, 992–1000 (2000).
16. Roderick, S. L. & Banaszak, L. J. The three-dimensional structure of porcine heart mitochondrial malate dehydrogenase at 3.0-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **261**, 9461–9464 (1986).

第3章 リンゴ酸デヒドロゲナーゼおよび乳酸デヒドロゲナーゼの 基質選択における構造変化の役割

3-1 背景

第2章では gs-MDH を用いた諸条件での結晶構造解析により, gs-MDH の反応サイクルにおける各反応段階に対応した4種類の結晶構造の決定に成功した. さらに, それらの結晶構造の比較により, gs-MDH の apo 酵素から closed 構造に至るまでの詳細な構造変化機構が解明された. その結果, gs-MDH の基質特異性に関与する基質選択の要素が示唆された. 一つ目は, 活性部位に保存された正電荷アミノ酸により形成される正電荷ポケットである. 正電荷ポケットは, 可動ループと基質結合ポケット間での反発作用を生み, 可動ループを open 構造に保つ働きと, 正電荷の反発を中和可能な DC を選択する二つの働きを兼ね備えることが示唆された. 二つ目は, 触媒残基 (H179) の switching である. Switching は, 可動ループの構造変化に付随していたことから, 構造変化による基質選択と合わせて gs-MDH の基質特異性をさらに高める働きがある. これらの要素により, gs-MDH は構造変化を巧みに制御し優れた基質特異性を獲得していることが示唆された.

第1章で述べたように, MDH と LDH は近縁酵素でありながら基質特異性が異なり, 同菌種由来である gs-MDH と gs-LDH 間においても OAA や PYR に対する反応特性の違いは顕著である. gs-MDH の野生型は OAA に対して極めて高い基質特異性を有するのに対し, gs-LDH の野生型では本来の基質である PYR に加えて, OAA に対する反応性も有している (表 1-1). この基質特異性の違いについて, これまでは closed 構造における基質結合の適応性から考察が成された. しかしながら, MDH と LDH の基質特異性の差異は十分に説明できなかつた. 一方, 可動ループの構造変化という動的視点からの基質特異性の分析や基質選択の要素については報告されていない.

第3章では, バクテリア由来の MDH と LDH の一次構造の相同性から, 同一生物

種間および異なる生物種間における両酵素の進化速度の違いを考察した。また、gs-MDH と gs-LDH の基質認識の要素について、立体構造、変異解析および分子動力学解析により比較し、両酵素の構造変化の差異と基質特異性との関係を考察した。

3-2 材料と方法

MDH およびLDH のマルチプルアライメント

マルチプルアライメントは、*G. stearothermophilus*, *G. kaustophilus*, *Ba. subtilis*, *Ba. Anthracis*, *Brevibacillus brevis*, *Halobacillus halophilus*, *Sulfobacillus acidophilus*, *Thermobacillus composti*, *Corynebacterium glutamicum*, *Parageobacillus thermoglucosidasius*, *Bifidobacterium longuim*, *Lactobacillus casei*, *T. thermophilus* および *Ch. aurantiacus* 由来の MDH および LDH のアミノ酸配列を基に GENETYX software を用いて行った。

gs-MDH およびLDH の立体構造分析

gs-MDH および LDH の分子表面の電荷分布および立体構造の重ね合わせは、MOE software を用いて行った。gs-LDH の可動ループの Segment Matching 法によるモデリングは、MOE software の Loop Modeler program を用いて実行した。

gs-MDH およびgs-LDH の発現ベクターの構築

gs-MDH_SWP 変異体, gs-LDH_WT (DDBJ/EMBL/GenBank accession number: M14788.1) および gs-LDH_SWP 変異体の発現ベクターは、pET-28a(+)の NdeI/BamHI site (GenScript, Inc., Piscataway, NJ, USA) に導入したものを合成した。gs-MDH の R86 および R92 変異体の発現ベクターは、KOD -plus- (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) を使用した inverse PCR 法により構築した。PCR に使用した DNA primer set は、表 3-1 に示す。

表 3-1. gs-MDH 変異体の構築に使用した DNA primer set.

Primer		Sequence
gs-MDH	Forward	5'- <u>CAG</u> AAACCGGGTATGAGCCGCGATGATCTG -3'
_R86Q	Reverse	5'- GGCAATGCCCGCGGTGATAACCACAATATC -3'
gs-MDH	Forward	5'- <u>GTG</u> AAACCGGGTATGAGCCGCGATGATCTG -3'
_R86V	Reverse	5'- GGCAATGCCCGCGGTGATAACCACAATATC -3'
gs-MDH	Forward	5'- <u>CAG</u> GATGATCTGGTGACCACCAACCAG -3'
_R92Q	Reverse	5'- GCTCATACCCGGTTTACGGGCAATG -3'
gs-MDH	Forward	5'- <u>GCG</u> GATGATCTGGTGACCACCAACCAG -3'
_R92A	Reverse	5'- GCTCATACCCGGTTTACGGGCAATG -3'

変異コドンは下線で示した.

***gs-MDH* および *gs-LDH* の酵素発現および精製**

gs-MDH および *gs-LDH* の組み換え菌は, 各発現ベクターで *E. coli* BL21(DE3) 株を形質転換することで取得した. 組み換え菌の培養は, LB 液体培地を用いて 37°C で 20 時間行った. 培養液の OD₆₀₀ が 0.6 に達した時点で終濃度が 0.1 mM になるように IPTG を添加しタンパク質の発現を誘導した. タンパク質溶液を, buffer F (20 mM potassium phosphate, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.4) で平衡化した His GraviTrap™ column (GE Healthcare) に添加し, 500 mM imidazole を含む buffer F を用いて結合タンパク質を溶出させた. 溶出画分の NaCl および imidazole を, 20 mM potassium phosphate (pH 7.4) で平衡化した HiTrap Desalting column (GE Healthcare) で取り除き, *gs-MDH* の精製酵素を取得した. 精製タンパク質の純度は, Extra PAGE One Precast Gel (Nacalai Tesque) を用いた SDS-PAGE により確認した. タンパク質濃度は, Bradford 法 [1] により定量した.

酵素特性評価

gs-MDH の酵素活性は、反応液 A [0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), 0.5 mM OAA および 0.2 mM NADH] を用いて 30°C で測定した. gs-LDH の酵素活性は、反応液 B [0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.0), 10 mM PYR, 0.2 mM NADH および 5 mM FBP] を用いて 30°C で測定した. 初期反応速度は、反応液 1000 μ L に精製酵素 50 μ L を添加して測定した. gs-MDH および gs-LDH の基質の還元反応による NADH の減少量は、340 nm における NADH のモル吸光係数 ($6300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) を用いて算出した. 1 分間に 1 μ mol の NADH を消費する酵素量を 1 U と定義した. gs-MDH の速度定数は、0.005~0.5 mM OAA もしくは 2.0~10 mM PYR を含む反応液 A に対して Michaelis–Menten 式 (式 1) もしくは基質阻害を含む Michaelis–Menten 式 (式 2) を基に決定した [2]. gs-LDH の速度定数は、2.0~10 mM OAA もしくは 2.0~10 mM PYR を含む反応液 B に対して Michaelis–Menten 式 (式 1) を基に決定した. すべての酵素活性は、 $n=3$ の独立した実験から平均化した.

$$\text{式 1)} \quad v = V_{\max}[S]/([S] + K_m)$$

$$\text{式 2)} \quad v = V_{\max}[S]/([S] + K_m + [S]^2/K_i)$$

v および V_{\max} は、それぞれ反応速度および最大反応速度を示し、 $[S]$, K_m および K_i は、それぞれ基質濃度、50% V_{\max} を与える最大濃度の半分の基質濃度および阻害定数を表す.

gs-MDH および LDH の分子動力学解析

分子構造の解析前処理として、MOE software の Quick Prep program を用いてテンプレート構造となる立体構造のプロトンおよび電荷の付加を行った. シミュレーションは、MOE software の Molecular dynamics (MD) program を用いて実行した. シミュレーションの力場は Amber10:EHT を使用し、温度条件は 303 K に設定した. シミュレーションにおける RMSD 値の変化は、各酵素の可動ループに対して算出した. Open 構造の MD シミュレーションは、apo 型の gs-MDH (PDB ID : 7BY8) , *L. casei* LDH (PDB ID: 2ZQZ; lc-LDH) , *T.*

thermophilus LDH (tt-LDH; PDB ID : 4A73) の各結晶構造および可動ループのモデリングを行った gs-LDH の構造モデルを基にそれぞれ実施した. Closed 構造の MD シミュレーションは, gs-MDH (PDB ID: 7BYC) および gs-LDH (PDB ID: 1LDN) の各結晶構造を基にそれぞれ実施した. リガンド非存在下の MD シミュレーションは, 各 closed 構造に対し Quick Prep program の実行後, リガンドを削除した構造を用いてそれぞれ実施した.

3-3 結果と考察

MDH/LDH family におけるアミノ酸配列のマトリックス解析

MDH と LDH は, MDH, LDH like MDH および LDH の superfamily に分類される [3]. LDH like MDH は, 塩基配列に基づいた系統樹解析により MDH の集団から枝分かれした MDH 群が分類される. 2014 年に Jeffrey らは, マラリア原虫 (*Plasmodium*) などが含まれる apicomplexan 門の MDH および LDH の塩基配列に基づく系統樹解析から, 系統樹の分岐点に存在する塩基配列を予測した [3]. 予測された apicomplexan における祖先酵素は, OAA および PYR に同程度の反応性を示し LDH like MDH として位置づけられた. このように, MDH と LDH の塩基配列やアミノ酸配列の相同性から, superfamily に基づいた進化過程を推察できる.

そこで, MDH および LDH の両方のアミノ酸配列が明らかになっているグラム陽性菌および光合成細菌を対象に, 両酵素のマトリックス解析を行った (図 3-1) [4]. 各 MDH の superfamily は, *Co. glutamicum* 由来を除き全て LDH like MDH として報告されている [5]. 図 3-1 において, MDH 間 (ブラック領域) では, 相同性が 21.5 から 87.0%を示し, アミノ酸配列が多様に変化していた. 一方, LDH 間 (グレー領域) では, 相同性が 47.6 から 69.0%を示し, 全体に高い相同性を有していた. また, MDH と LDH 間では, 相同性の平均が 31.7%, 顕著に相同性が低い Cgl を除いた場合でも相同性の平均が 33.5%を示し, 同酵素間の相同性と比較して低い水準であった.

(%)

	MDH (Gst)	MDH (Bsu)	MDH (Hha)	MDH (Cgl)	MDH (Cau)	LDH (Gst)	LDH (Bsu)	LDH (Hha)	LDH (Cgl)	LDH (Cau)
MDH (Gst)		87.0	83.2	21.5	57.7	<u>36.0</u>	35.2	33.5	35.0	31.5
MDH (Bsu)	87.0		80.7	22.9	56.0	35.9	<u>35.8</u>	33.8	33.5	33.2
MDH (Hha)	83.2	80.7		nh	54.5	35.4	35.1	<u>33.9</u>	33.9	33.0
MDH (Cgl)	21.5	22.9	nh		nh	26.7	19.3	20.8	nh	23.2
MDH (Cau)	57.7	56.0	54.5	nh		30.6	32.5	28.5	31.3	<u>32.1</u>
LDH (Gst)	<u>36.0</u>	35.1	35.4	19.1	30.6		69.0	65.0	60.3	47.6
LDH (Bsu)	35.2	<u>35.8</u>	34.9	19.3	32.5	69.0		64.6	58.1	45.0
LDH (Hha)	33.5	33.8	<u>33.9</u>	20.8	28.5	65.0	64.6		56.3	48.6
LDH (Cgl)	35.0	33.7	33.9	nh	31.3	60.3	58.1	56.3		45.9
LDH (Cau)	31.5	33.2	33.0	23.2	<u>32.1</u>	47.6	45.0	48.6	45.9	

図 3-1. バクテリア由来 MDH および LDH のアミノ酸配列のマトリックス解析. nh: no homology. MDH 間および LDH 間の比較は、それぞれブラックおよびグレーの領域で示した. 同生物種間の MDH と LDH の相同性は、下線で示した. マトリックス解析は、*G. stearothermophilus* (Gst) , *Ba. subtilis* (Bsu) , *H. halophilus* (Hha) , *Co. glutamicum* (Cgl) , および *Ch. aurantiacus* (Cau) の由来の酵素を対象に行った.

これらの結果は、同生物種内でも MDH と LDH の進化速度が異なることを示唆している. 第 2 章で述べたように、MDH の構造変化は可動ループおよび触媒ループで起こり、その他の領域はほとんど変化が見られなかった (図 2-9C) ため、各ループ以外の領域の変異は、触媒機能の消失等の酵素機能そのものへの影響が少ないことが推察できる. したがって、アミノ酸配列の多様な変化も進化の過程で保存され、MDH 間の相同性が幅広い値を示したと考えられる. 一方、LDH はアロステリック酵素であるため、活性部位以外の変異

であっても酵素機能の低下につながる確率が高い。その結果、LDH 間の相同性が、MDH 間よりも高かったと考えられる。

MDH と LDH の open 構造比較

MDH と LDH の構造変化における違いを調べるために、第 2 章で決定した gs-MDH の各結晶構造と LDH の結晶構造を用いて、基質認識の要素を比較した。まず、基質結合前の状態である open 構造について、活性部位表面の電荷分布を比較した。gs-LDH を含む PDB に登録されている多くの LDH [6-8] は、open 構造の可動ループがディスオーダーしており、それらの結晶構造では活性部位の電荷分布を正確に比較できない。具体的には、PDB に登録されている open 構造 (apo 構造) の LDH (gs-LDH とのアミノ酸配列の相同性が 45% 以上でカット・オフ) の構造数 23 の内、16 は可動ループが観察されなかった。そこで、可動ループが明瞭に観察されている lc-LDH の結晶構造を用いて、電荷分布を表示した。また、gs-LDH の可動ループは、PDB に登録されている相同配列の主鎖構造を基に、ディスオーダー領域の分子構造を予測する Segment Matching 法を用いてループモデリングを行った [9]。

図 3-2 に示すように、gs-MDH の活性部位は R86, R92, N124, R155, H179 および K218 等のアミノ酸残基で正電荷ポケットが構成されていた。一方、lc-LDH の活性部位は Q100, R106, N138, R169, H193, Y238 および D235、gs-LDH の活性部位は Q102, R108, N140, R171, H195, Y240 および D235 でそれぞれ構成されており、どちらも正電荷ポケットが形成されていないかった (図 3-2 では lc-LDH の R169 および gs-LDH の R171, H195 は、それぞれ Y238 および Y240 に覆われている)。したがって、正電荷ポケットの効果として、gs-MDH の活性部位は負電荷が強い OAA に対する親和性が高く、OAA 結合により基質結合ポケット内で反発する正電荷の中和と構造変化の促進が予想される。一方、両 LDH の活性部位は、可動ループと基質結合ポケット間の電荷による反発が弱く、負電荷が弱い PYR に対しても gs-MDH

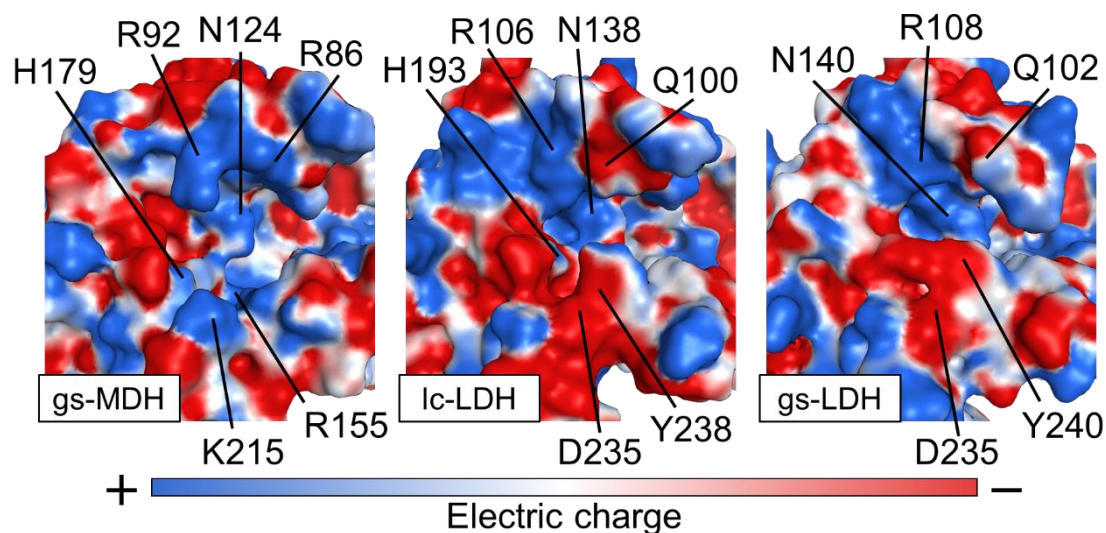
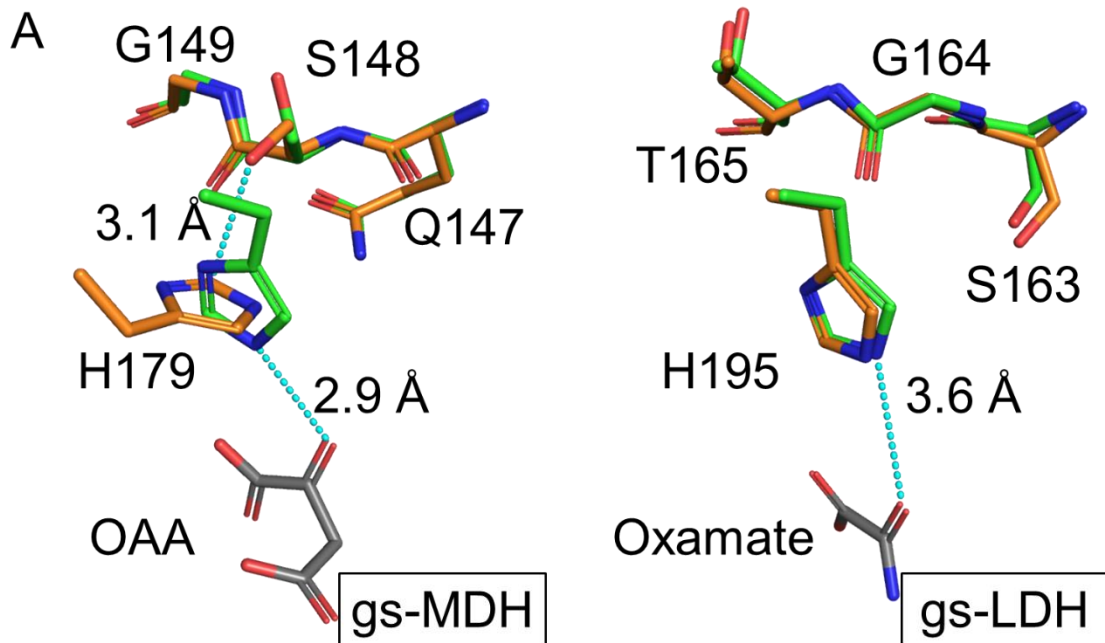


図 3-2. gs-MDH および LDH の分子表面の電荷分布. gs-MDH (左; PDB ID: 7BY8), lc-LDH (中央; 2ZQZ) および gs-LDH (右; テンプレート構造: 1LDB) の表面電荷は、正電荷をブルー、負電荷をレッドで示した.

より構造変化が起こりやすいと推察される.

触媒残基の switching

次に、反応に直接関わる触媒残基の switching について、gs-MDH と gs-LDH の触媒残基側鎖の配向を比較した. X 線結晶構造解析から、gs-MDH の触媒残基は、open から closed 構造への可動ループのコンフォメーション変化に伴い、触媒残基の配向が変化し、基質の α -ケト基と水素結合を形成した. 一方、gs-LDH の触媒残基は、open 構造 (PDB ID: 1LDB) と closed 構造 (PDB ID: 1LDN) で同じ配向を示し、可動ループのコンフォメーションに関わらず基質の α -ケト基と水素結合が可能な配向に位置していた (図 3-3A). したがって、gs-LDH は open 構造でも見かけ上触媒反応が可能であり、基質による構造変化の誘導は必須でないことが示唆された. 2019 年に鈴木らは、ウサギの心筋由来 LDH を用いて触媒反応における基質結合や可動ループの構造変化のエネルギー解析を行い、open 構造でも触媒反応が可能であることを計算科学的手法を用いて示した [10]. 本研究での触媒残基の比較結果は、こ



B

```

M Gst : DSDIVVITAGIARKPGMSRDDLVTTNQIKMKQVTKVVKYSPNCYIIVLTNP-VDAMTYTVFKESGFPKNRVIGQSGVLD
M Bsu : GSDIVVITAGIARKPGMSRDDLVSTNEKIMRSVTQEVKYSYSPDSIIVVLTNP-VDAMTYAVYKESGFPKERVIGQSGVLD
M Ban : DSDVVVITAGIARKPGMSRDDLVATNSKIMKSIITRDIAKHSPNAIIVVLTNP-VDAMTYSVFKEAGFPKERVIGQSGVLD
M Bbr : DADLVIITAGIARKPGMSRDDLVNTNAGIMKSVAEQVKTYAPNSIVLVLSNP-VDAMTYTFFKTSGFPKERVIGQSGVLD
M Gka : DSDIVVITAGIARKPGMSRDDLVTTNQIKMKQVTKVVKYSPNCYIIVLTNP-VDAMTYTVFKESGFPKNRVIGQSGVLD
M Hha : GSDLVVIITAGIARKPGMSRDDLVATNSKIMKSVTKEIVKYSYPCYIIVLTNP-VDAMTYSVFQEAGLPKNRVIGQSGVLD
M Pth : DSDIVIITAGIARKPGMSRDDLVTTNQIKMKQVTKVVKYSPNCYIIVLTNP-VDAMTYTVFKESGFPKNRVIGQSGVLD
M Sac : DSDIVIITAGVARKPGMSRDDLVTTNAGIVRSVCEQVRQTCPDAYVIVLSNP-VDAMTWVAVRTLGFPKNRVIGQSGVLD
M Tco : DSDIVIITAGVARKPGMSRDDLVTTNAGIVRSVCEQVRQTCPDAYVIVLSNP-VDAMTWVAVRTLGFPKNRVIGQSGVLD
L Gst : DADLVVICAGANQKPGETRLDLVDKNIAIFRSIVESVMASGFQGLFLVATN-PVDILTYATWKFSGLPHERVIGSGTILD
L Bsu : DADIVCICAGANQKPGETRLDELVEKNLKFVGVSEVMASGFDFLFLVATN-PVDILTYATWKFSGLPKERVIGSGTILD
L Blo : A-DMNVVITAGPRQKPGQSRLELVGATVNLKAIIMPVNLKVPAPNAIYMLI-TNPVDIATHVAQKLTGLPENQIFGSGTNLD
L Lca : DADLVVITAGAPQKPGETRLDLVKNLKIILKSIIVDPVIVDSGFNGIFLVAAN-PVDILTYATWKLSGFPKNRVVGSGTSLD
L Tth : ARA-VVLAAGVAQRPGETRLQLLDRNAQVFAQVVPVRLVLEAAPEAVLL-VATNPVDVMTQVAYRLSGLPPGRVVGSGTILD

```

図 3-3. MDH および LDH の活性部位およびアミノ酸配列の比較. A. gs-MDH (左) および gs-LDH (右) の open 構造 (オレンジ) および closed 構造 (グリーン) の比較. 各構造はスティックモデル, 水素結合は破線で示した. B. バクテリア由来の MDH および LDH のアミノ酸配列アライメント. アミノ酸配列アライメントは, *G. stearothermophilus* (Gst), *Ba. subtilis* (Bsu), *Ba. anthracis* (Ban), *Br. brevis* (Bbr), *G. kaustophilus* (Gka), *H. halophilus* (Hha), *P. thermoglucosidasius* (Pth), *S. acidophilus* (Sca), *Thermobacillus composti* (Tco), *Bi. longum* (Blo), *L. casei* (Lca) および *T. thermophilus* (Tth) 由来の MDH (M) および LDH (L) を対象に実施した. MDH の QSG 配列および LDH の SGT 配列の領域は, 赤枠で示した.

の報告に構造的解釈を与えた. すなわち, MDH と LDH の基質特異性の差異は, 基質結合ポケットの表面電荷強度の違いおよび触媒残基の switching の有無が要因と考えられた.

gs-LDHの触媒残基は switching 機能を持たないことが判明したため、他の細菌由来の LDH についても switching 機能を確認した。7種のバクテリア由来の LDH について、各触媒残基の配向を比較した結果、すべての LDH の open 構造が、gs-MDH の closed 構造と同じ触媒残基の配向を示した (図 3-4A) 。すなわち、LDH は共通の性質として触媒残基の switching 機能を持たないと考えられた。一方、6種のバクテリア由来の MDH の open 構造を比較すると、高度好熱菌 *T. thermophilus* および超好熱菌 *T. flavus* 由来 MDH の触媒残基は、gs-MDH の closed 構造と同じ配向を示し、残りの4種は gs-MDH の open 構造と同じ配向を示した。(図 3-4B) このことから、触媒残基の switching 機能は、多くの MDH の高基質特異性の要因として保存されていると推察された。また、open 構造で触媒残基が活性型を示した

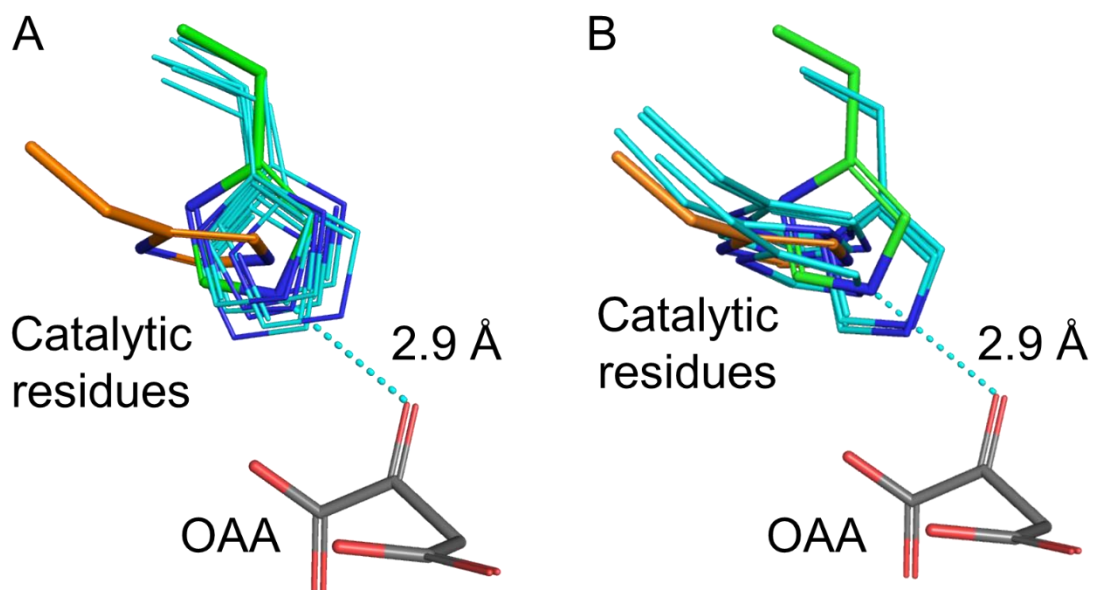


図 3-4. バクテリア由来 MDH および LDH の触媒残基の比較. gs-MDH の open 構造および closed 構造は、オレンジおよびグリーンで示した。OAA および gs-MDH_closed の触媒残基間の水素結合は、破線で示した。A. gs-MDH およびバクテリア由来 LDH の比較. 重ね合わせは、*G. stearothermophilus* (PDB ID: 1LDN) , *Bi. longuim* (1LLD) , *Clostridium Thermocellum* (1Y6J) , *Deinococcus radiodurans* (2V6B) , *T. thermophilus* (2V6M) , *L. casei* (2ZQZ) および *Ba. subtilis* (3PQE) 由来の LDH の結晶構造 (シアン) を使用した。B. gs-MDH およびバクテリア由来 MDH の比較. 重ね合わせは、*Chlorobaculum tepidum* (1GUZ) , *T. thermophilus* (1IZ9) , *T. flavus* (1WZI) , *Ba. anthracis* (3TL2) , *M. extorquens* (4ROR) および *Thermaerobacter marianensis* (7AOB) 由来の MDH の結晶構造 (シアン) を使用した。

MDH は、いずれも高度好熱菌もしくは超好熱菌由来であった。触媒残基の switching は、触媒ループに柔軟性が必要だと予想されるが、同時に柔軟性の上昇は熱に対する安定性の低下を招く。このため、高い安定性が求められる高度好熱菌や超好熱菌では switching 機能は保存されなかったと考えられる。

触媒残基周辺の構造比較

触媒残基の switching に関与するアミノ酸残基について、両酵素の触媒残基周辺の環境を比較した。gs-MDH の open 構造において、触媒残基 H179 の近辺に S148 が存在しており、switching によって側鎖の配向が H179 の反対側に変化していた (図 3-3A)。このことから、open 構造における S148 と H179 との相互作用が推察された。一方 gs-LDH では、S が G (G164) に置換されており、相互作用は観察されなかった。したがって、触媒残基周辺の相互作用の違いが、gs-MDH と gs-LDH の switching 機能の違いに関与していると予想された。また、gs-MDH の S148 の主鎖構造は、前後に位置する Q147 および G149 と共に cis 型配座をとっていた。一方 gs-LDH では、これらのアミノ酸残基が S163 および T165 に置換されており、trans 型配座の主鎖構造をとっていた。これらの配列 (gs-MDH の QSG 配列および gs-LDH の SGT 配列) は、それぞれ MDH および LDH に広く保存されていた (図 3-3B)。以上の結果から、MDH に保存された特徴的な QSG 配列が、触媒残基の switching 制御に関与すると考えられた。

gs-MDH および gs-LDH の変異体解析

gs-MDH と gs-LDH の立体構造比較から、正電荷ポケットが基質選択に重要であることが示唆された。そこで、gs-MDH および gs-LDH の可動ループ上の正電荷アミノ酸残基もしくはループ領域全体の変異体を作製し、可動ループの電荷の変化が基質特異性へ与える影響を調べた (表 3-2)。まず、gs-MDH の正電荷ポケットを構成する R86 および R92 を

表 3-2. gs-MDH および gs-LDH の野生型および変異体の酵素特性

Enzymes	Oxaloacetate		Pyruvate	
	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})
gs-MDH_WT	0.0055 ± 0.0006	1300 \pm 58	ND	
gs-MDH_R86Q	0.029 ± 0.0036	300 \pm 58	16 \pm 1.7	69 \pm 3.2
gs-MDH_R86V	0.062 ± 0.0073	57 \pm 6.5	13 \pm 3.4	7.3 \pm 0.87
gs-MDH_R92Q	0.20 ± 0.017	1.3 \pm 0.05	ND	
gs-MDH_R92A	0.33 ± 0.018	0.93 \pm 0.03	ND	
gs-MDH_SWP	0.0094 ± 0.0010	15 \pm 1.0	ND	
gs-LDH_WT*	1.5	6.0	0.060	250
gs-LDH_Q102R*	0.06	250	1.8	0.9
gs-LDH_SWP	9.4 \pm 0.28	11 \pm 0.11	29 \pm 2.5	65 \pm 5.3

ND: not detected. * Wilks HM, et al., 1988.

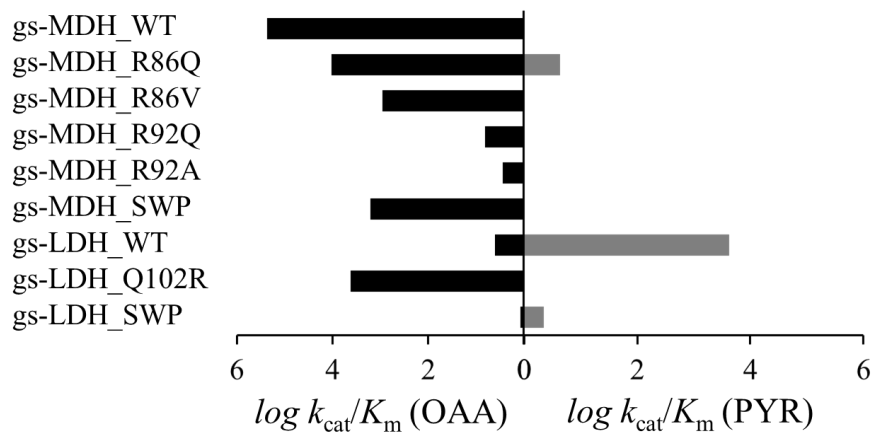


図 3-5. OAA および PYR に対する gs-MDH および gs-LDH の反応性. WT : 野生型. SWP : gs-MDH および gs-LDH 間の可動ループ領域の相互置換変異.

中性アミノ酸残基である Q や側鎖長が短い V に置換した. R86Q および R86V は, OAA に対する触媒効率が WT と比べて約 1/20 および約 1/260 にそれぞれ低下した (図 3-5). これは, R86 と OAA の β -カルボキシ基間の相互作用が失われたことで, 基質結合が不安定になった

結果と考えられる。一方, PYR に対して新たに反応性が観察された。この結果は, 変異により可動ループと基質結合ポケット間の反発が減少したため, open 構造から closed 構造への構造変化がより容易になり, PYR への反応性が向上したと考えられる。

gs-MDH の R92 変異体は, いずれも OAA に対する触媒効率が顕著に減少し, PYR に対しての反応性も観察されなかった。R92 は, 触媒残基から OAA の α -ケト基へのプロトン移行を安定化することから, 顕著な反応性の低下は, 触媒残基からのプロトン移動が不安定になった結果であると考えられる。

gs-LDH の野生型および Q102R の酵素特性に関しては Wilks らが報告している [11]。gs-LDH_Q102R は, PYR に対する反応性が大幅に減少した一方で, OAA に対する反応性が増加し, 単変異で完全な基質特異性のシフトが報告された。対照的に, 正電荷を減少させた gs-MDH の R86 変異で PYR への反応性が観察されたことから, 活性部位における正電荷の増加は, 両酵素において OAA の選択的な反応に重要な要素であると推察された。また, 基質選択の要素の観点から, 単変異による基質特異性のシフトは, gs-LDH の基質選択が基質の α -ケト酸骨格の認識のみに依存することを示唆している。

次に, 可動ループ全体の基質特異性への寄与を調べるために, gs-MDH と gs-LDH 間で可動ループ領域を入れ替えた gs-MDH_SWP および gs-LDH_SWP を作製した。gs-MDH_SWP は, OAA に対する触媒効率が WT よりも約 1/150 に減少し, R86Q 変異を含んでいるにもかかわらず PYR に対する反応性は観察されなかった。一方で gs-LDH_SWP は, gs-LDH_WT と同様に OAA と PYR の両方に対して反応性を示したが, 両基質とも k_{cat} 値が著しく低下し, 酵素機能がほとんど消失していた。これらの結果は, 可動ループと基質結合ポケット等との相互作用ネットワークが崩れたことで, 可動ループの安定性や構造変化の機能そのものが低下したためと考えられる。

gs-MDH および gs-LDH の変異解析の結果から, gs-MDH の基質結合ポケットや可動ループの正電荷は, 負電荷が弱い PYR 等の α -ケト酸と反応しない要因のひとつであるこ

とが明確になった。しかし, gs-MDH の各変異体は, 正電荷の緩和にもかかわらず, 未だ OAA に対して高い反応性を保持していた。すなわち, 基質-可動ループ間の電荷による引力以外にも, gs-MDH の構造変化の動力となる要因があると考えられる。その可能性として, 可動ループのコンフォメーション変化に影響する柔軟性の違いが予想される。一方, gs-LDH の各変異体は, OAA に対しても反応性を示した。この結果は, LDH が触媒残基の switching 機能を持たないことと矛盾しないが, 複合的な要因の可能性も考慮しなければならない。

gs-MDH および gs-LDH の分子動力学解析

gs-MDH および gs-LDH の活性部位表面の電荷分布および変異体解析の結果から, LDH は, 可動ループと基質結合ポケット間の電荷の反発が弱いため, MDH と比べて closed 構造になりやすいと推察される。しかし, closed 構造への移行は可動ループのフレキシビリティの違いも大きく影響する。そこで, 分子動力学 (MD) シミュレーションにより MDH と LDH の可動ループの柔軟性を調べた (図 3-6)。gs-LDH の open 構造は, Segment Matching 法により可動ループを予測した構造を使用した。また, apo 構造で可動ループが観察されている lc-LDH (PDB ID : 2ZQZ) および tt-LDH (PDB ID : 4A73) の結晶構造についても MD シミュレーションを実施した。可動ループの柔軟性は, MD シミュレーション中の可動ループ領域の RMSD 値の変化に基づき評価し, RMSD 値が安定化する 100.5~500.0 ps の平均値から各酵素の柔軟性を比較した。平均 RMSD 値が高いほど 0 ps からの構造の変化が大きく, 柔軟性が高いことを示している。

Open 構造における gs-MDH, lc-LDH, gs-LDH および tt-LDH の可動ループの平均 RMSD 値は, それぞれ 1.2 Å, 1.9 Å, 1.5 Å および 1.6 Å であった。常温菌由来である lc-LDH の値が最も高く, 次いで好熱菌由来である gs-LDH と tt-LDH が gs-MDH よりも高い値を示した。したがって, open 構造において gs-MDH の可動ループが最も柔軟性が低いことが示唆された。

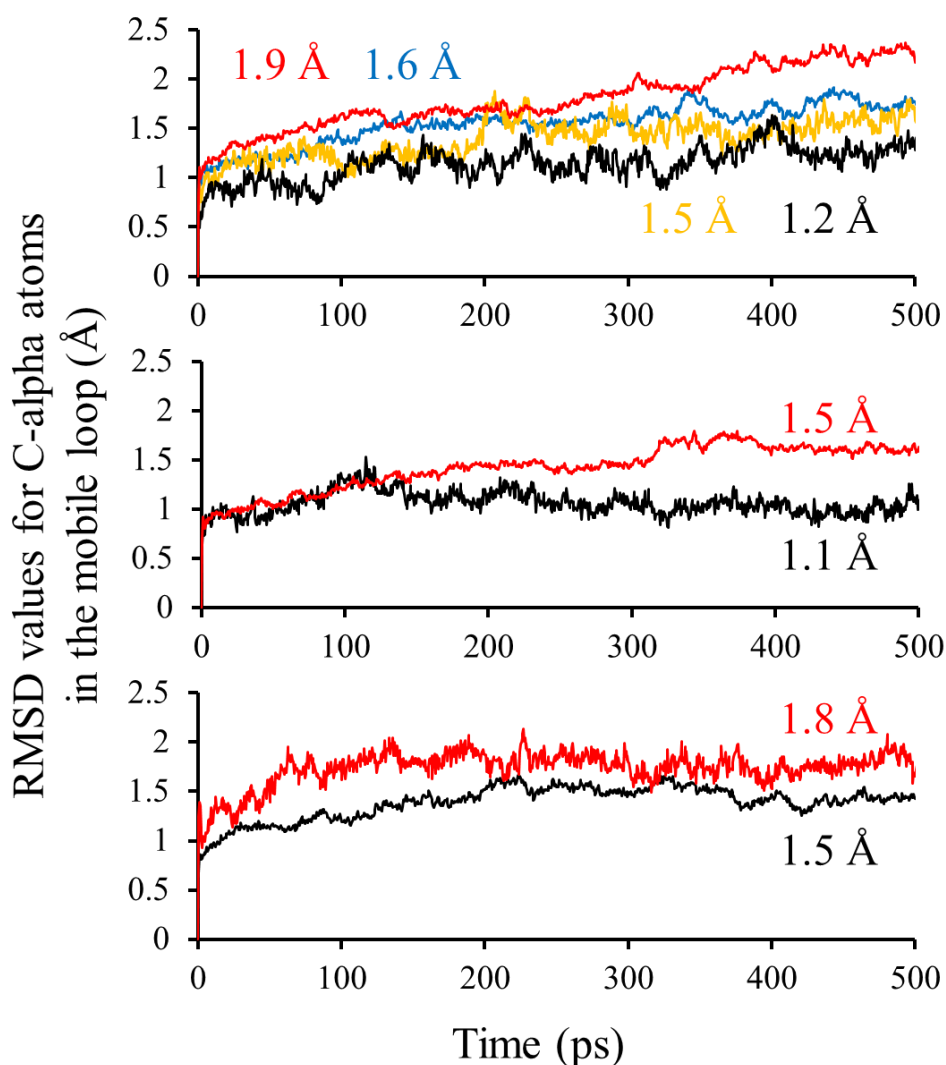


図 3-6. gs-MDH および LDH の MD シミュレーション. RMSD 値は, 各酵素の可動ループに対して算出し, 100.5~500.0 ps の RMSD 値の平均を各グラフに示した. 温度条件は 30°C とした. apo 構造 [上段; gs-MDH (ブラック) vs lc-LDH (レッド) vs gs-LDH (ブルー) vs tt-LDH (イエロー)], リガンド存在下の closed 構造 [中段; gs-MDH (ブラック) vs gs-LDH (レッド)] およびリガンド非存在下の closed 構造 [下段; gs-MDH (ブラック) vs gs-LDH (レッド)].

次に両酵素の closed 構造における柔軟性の違いを評価した. 両酵素の closed 構造は活性部位に結合するリガンドが異なっており, gs-MDH では OAA が, gs-LDH (PDB ID: 1LDN) では阻害剤である oxamate が結合している. gs-MDH においては, OAA が可動ループと基質結合ポケットを架橋しており柔軟性の低下が予想されるため, リガンド非存在下で

の MD シミュレーションも行った. gs-MDH および gs-LDH のリガンド存在下の平均 RMSD 値は, それぞれ 1.1 Å および 1.5 Å であった. また, gs-MDH および gs-LDH のリガンド非存在下の平均 RMSD 値は, それぞれ 1.5 Å および 1.8 Å であった.

以上のように, すべての条件において, gs-MDH の可動ループは LDH の可動ループよりも低い RMSD 値を示し, 相対的に柔軟性の低い構造であることが示唆された. これは, gs-MDH の可動ループの低柔軟性が, 2 つのカルボキシ基によって可動ループと基質結合ポケットを静電的に架橋する OAA との選択的な反応を実現し, OAA に対して高い基質特異性を示すことを支持している.

3-4 まとめ

第3章では, MDH と LDH の構造変化の違いについて, アミノ酸配列, 結晶構造, 変異体特性および MD シミュレーションの結果を比較し, 両酵素の基質認識機構の違いを明らかにした. MDH と LDH のアミノ酸配列に基づくマトリックス解析では, アミノ酸配列の相同性が MDH 間および LDH 間で差があったことから, 両酵素の進化速度の違いが示唆された. LDH はアロステリック制御を備えていることに加えて, 基質認識機構に関わる構造的な要素も MDH とは異なっていたことが, 両酵素の進化速度が異なる要因の一つだと考えられる. Open 構造の比較では, gs-MDH は負電荷基質の選択や構造変化のドライビング・フォースに有利な正電荷の偏りを示した. 触媒反応を直接制御する触媒残基の switching 機能は, MDH 特有の特性として広く観察された. MD シミュレーションにより確認された MDH の可動ループの低い柔軟性は, 構造変化に基質との強い相互作用が必要であることを示しており, LDH の可動ループの柔軟性と顕著に異なっていた.

以上の結果は, gs-MDH と gs-LDH の変異体特性に構造的解釈を与えた. MDH の R86 変異体や SWP 変異体は, 活性中心の電荷と closed 構造における基質結合空間を変化させるが, 可動ループの低柔軟性による構造変化の制限と触媒残基による反応制御が働く. 結果

として、OAA に対しては親和性や可動ループとの相互作用の低下により構造変化の誘導力が減少しターンオーバーが減少する。一方、PYR に対しては親和性が上昇するが構造変化の誘導力が低いため同じくターンオーバーが減少する。gs-LDH の Q102 変異体や SWP 変異体は、負電荷基質に対する親和性を上昇させるが、構造変化による選択がないため、OAA に対する反応性が向上する。しかし、正電荷の増加によって PYR による構造変化の誘導が制限されるため、ターンオーバーが抑制される。

MDH と LDH の反応機構の違いは、両酵素の至適 pH の違いとしても現れている。MDH および LDH の至適 pH は、それぞれ 8.0 および 6.0 であり、LDH は酸性側で活性が向上する特徴がある。触媒残基からのプロトン供給は、酸性側での反応向上が化学反応的要素として予想できる。LDH の反応機構は、活性部位に電荷的な要素を持たないため化学反応的要素が強く、至適 pH が酸性側であると考えられる。一方、MDH の反応機構は酸性側では OAA の負電荷が弱まり、塩基性側では活性部位の正電荷が弱まる。したがって、MDH と LDH の反応機構は、至適 pH が反応だけでなく基質認識や構造変化に関与している例であると考えられる。

基質認識の要素における gs-MDH と gs-LDH の結晶構造の比較により、活性中心の電荷、触媒残基の switching および可動ループの柔軟性が、両酵素の基質特異性を分ける構造的要素であることが明らかになった (図 3-7)。これらに加えて、両酵素の closed 構造におけるコンパクトな基質結合空間は、 α -ケト酸骨格の基質と選択的に結合する一般的な酵素基質複合体における基質選択を含むことから、合計 4 つの要素の協同効果が、MDH の高基質特異性獲得のための基質選択戦略となる (表 3-2)。MDH の基質認識の 4 要素の協同効果は、複雑な機構により制御されているため、変異により反応が低下しやすい。しかし、LDH のシンプルな反応機構は、基質特異性を相対的に低下させるが、変異による改変が容易となる。本章では、酵素基質複合体だけでなく apo 構造に対する基質結合から MDH と LDH の酵素反応を分析することにより、MDH の高基質特異性を実現する構造的要素が明らかにな

った. 高基質特異性の構造的理解は変異による酵素機能への影響を明確にし, 極めて特異的な測定用酵素の開発に向けた MDH の機能改変デザインの基盤として期待できる.

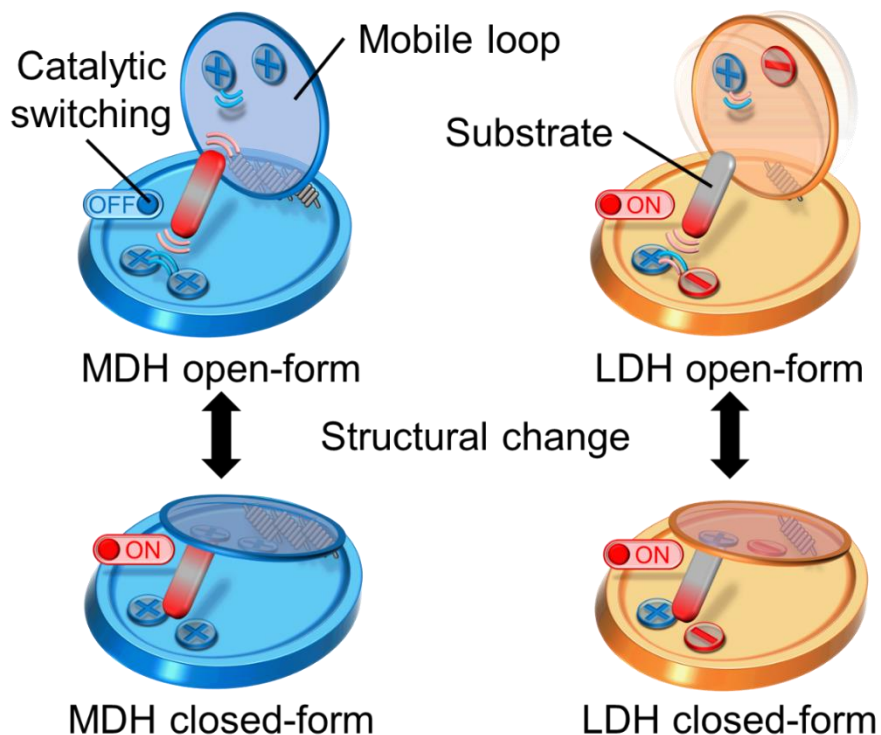


図 3-7. MDH および LDH の活性部位の構造変化モデル. 可動ループの柔軟性の違いは, バネの数で表し, 多いほど低柔軟性を示す. 活性部位の電荷分布は+および-の記号で, 触媒残基の switching 機能は, ON と OFF で表した.

表 3-2. MDH および LDH の構造変化機構に関連した基質選択戦略

基質選択戦略	MDH	LDH
活性中心の電荷	正電荷に偏り 負電荷基質と高い親和性	偏り無し 低い基質選択性
触媒残基の switching	Open 構造では OFF 反応に構造変化が必要	常に ON 反応に構造変化は不要
可動ループの柔軟性	低柔軟性 構造変化に基質との相互作用が必要	高柔軟性 構造変化に基質との相互作用は不要
Closed 構造の基質結合空間	コンパクトな空間	コンパクトな空間

参考文献

1. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
2. Takeya, M., Ito, S., Sukigara, H. & Osanai, T. Purification and characterisation of malate dehydrogenase from *synechocystis* SP. PCC 6803: Biochemical barrier of the oxidative tricarboxylic acid cycle. *Front. Plant Sci.* **9**, Article 947 (2018).
3. Boucher, J. I., Jacobowitz, J. R., Beckett, B. C., Classen, S. & Theobald, D. L. An atomic-resolution view of neofunctionalization in the evolution of apicomplexan lactate dehydrogenases. *eLife.* **3**, e02304 (2014).
4. Shimozawa, Y. & Nishiya, Y. Malate dehydrogenase of *Geobacillus stearothermophilus*: A practically feasible enzyme for clinical and food analysis. *Int J Anal Bio-Sci.* **7**, 59-67 (2019).
5. Madern, D. Molecular evolution within the L-malate and L-lactate dehydrogenase super-family. *J. Mol. Evol.* **54**, 825–840 (2002).
6. Piontek, K., Chakrabarti, P., Schär, H. -P, Rossmann, M. G. & Zuber, H. Structure determination and refinement of *Bacillus stearothermophilus* lactate dehydrogenase. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **7**, 74 –92 (1990).
7. Arai, K. *et al.* Active and inactive state structures of unliganded *lactobacillus casei* allosteric L-lactate dehydrogenase. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **78**, 681–694 (2010).
8. Coquelle, N., Fioravanti, E., Weik, M., Vellieux, F. & Madern, D. Activity, Stability and Structural Studies of Lactate Dehydrogenases Adapted to Extreme Thermal Environments. *J. Mol. Biol.* **374**, 547–562 (2007).
9. Levitt, M. Accurate modeling of protein conformation by automatic segment matching. *J. Mol. Biol.* **226**, 507–533 (1992).

10. Suzuki, K., Maeda, S. & Morokuma, K. Roles of Closed- and Open-Loop Conformations in Large-Scale Structural Transitions of l -Lactate Dehydrogenase. *ACS Omega*. **4**, 1178–1184 (2019).
11. Wilks, H. M. *et al.* A specific, highly active malate dehydrogenase by redesign of a lactate dehydrogenase framework. *Science*. **242**, 1541–1544 (1988).

第 4 章 構造変化の制御による *Geobacillus stearothermophilus* 由来

リンゴ酸デヒドロゲナーゼの低温適正化

4-1 背景

第 3 章までは、MDH および LDH の基質特異性に関する基礎的な構造-機能相関を解明した。第 4 章では、本研究により解明された gs-MDH の反応サイクルを基に、合理的な機能改変をデザインすることで、gs-MDH の酵素的測定法における課題の解決と有用性の向上を試みた。

中等度好熱菌由来である gs-MDH は、他の市販 MDH と比較して基質親和性、熱安定性などの特性に優れ、検査薬用酵素として高い有用性を持つ。一方、gs-MDH の高い熱安定性は、一般的な検査温度（例えば、AST 測定では 30°C もしくは 37°C）での低活性を招き、至適温度の 70°C と比較して 30°C では比活性が約 7.7%にまで低下することが課題となっている。

MDH の温度と比活性の関係は、可動ループの柔軟性に強く影響される [1]。実際に、好冷性 MDH では、低温における高比活性と可動ループの高い柔軟性を有する一方で、好熱性 MDH は高い熱安定性と合わせて可動ループの低い柔軟性を有することが報告されている [2]。また第 2 章では、OAA 結合による gs-MDH の正電荷ポケットの中和が、open 構造から closed 構造への可動ループの構造変化と触媒残基の活性化を誘導することが示された。したがって、gs-MDH の可動ループの柔軟性の向上は、反応サイクルにおける structural-change ステップの促進に繋がり、結果として低温におけるターンオーバーの向上が期待できる。

しかし、第 3 章で示したように gs-MDH の可動ループの柔軟性は、高基質特異性に関連しており、可動ループの機能改変は複雑な要素を含んでいる。Open 構造における可動ループの低柔軟性は、正電荷ポケットとの相乗効果によって MC の結合による closed 構造

への構造変化を制限するため、可動ループの柔軟性向上は、gs-MDH の高基質特異性への悪影響が予想される。したがって、gs-MDH のターンオーバーの向上には、触媒反応後の closed から open 構造への構造変化の促進が求められる。また、gs-MDH の可動ループの変異解析から、可動ループ上のアミノ酸残基に対する変異導入は、OAA に対する反応性の低下を示した。したがって、可動ループに直接変異を導入することなく closed から open 構造への構造変化を促進させることで、gs-MDH の高基質特異性と低温活性の両立が期待できる。

本章では、gs-LDH の高柔軟性に着目し、gs-MDH の closed 構造に特異的な寄与が期待されるアミノ酸残基を gs-LDH との結晶構造比較およびアミノ酸配列のアライメントにより決定した。また、低温における比活性の向上が観察された変異体の X 線結晶構造解析を行い、変異による機能向上の分子機構を解明した。さらに、結晶構造を基にした MD シミュレーションによる可動ループの柔軟性の評価を行った。

4-2 材料と方法

立体構造比較

野生型 gs-MDH, G218Y および野生型 gs-LDH の立体構造の重ね合わせおよび RMSD 値の算出は、MOE software を用いて行った。

アミノ酸配列のマルチプルアライメント

マルチプルアライメントは、*G. stearothermophilus*, *Bi. longum*, *T. thermophilus*, *L. casei*, *Ba. subtilis*, *Ba. anthracis*, *Br. brevis*, *Ch. aurantiacus*, *G. kaustophilus*, *H. halophilus*, *Pa. thermoglucosidasius*, *S. acidophilus* および *Thermobacillus composti* 由来の MDH および LDH のアミノ酸配列を基に GENETYX software を用いて行った。

表 4-1. gs-MDH 変異体の構築に使用した DNA primer set.

Primer		Sequence
G218F	Forward	5'- <u>TTT</u> GAAATCGTTAACCTGCTGGGTAATGGC-3'
	Reverse	5'-ACCGCCTTTGCGGGTACGTTCCACAATG-3'
G218Y	Forward	5'- <u>TAT</u> GAAATCGTTAACCTGCTGGGTAATGGC-3'
	Reverse	5'-ACCGCCTTTGCGGGTACGTTCCACAATG-3'
G218W	Forward	5'- <u>TGG</u> GAAATCGTTAACCTGCTGGGTAATGGC-3'
	Reverse	5'-ACCGCCTTTGCGGGTACGTTCCACAATG-3'

変異コドンは下線で示した.

G218 変異体の発現ベクターの構築

G218 変異体の発現ベクターは, 野生型 gs-MDH の発現ベクターを鋳型とした inverse PCR 法により構築した. PCR に使用した DNA primer set は, 表 4-1 に示す.

G218 変異体の酵素発現および精製

G218 変異体の組み換え菌は, 発現ベクターで *E. coli* BL21(DE3) 株を形質転換することで取得した. 速度論解析を目的とした組み換え菌の培養, 発現誘導および酵素精製は, 第 3 章と同様の手順で実施した. 結晶化への使用を目的とした組み換え菌の培養, 発現誘導および酵素精製は, 2 章と同様の手順で実施した.

G218 変異体の酵素特性評価

G218 変異体の酵素活性は, 第 3 章と同条件で測定した. G218 変異体の速度定数は, 0.005~0.5 mM OAA を含む反応液 A に対して基質阻害を含む Michaelis-Menten 式 (式 2) を基に決定した [3]. G218 変異体の残存活性は, 30~80°C で 1 時間インキュベート後に直ち

に氷上で冷却し、反応液 A に対して 30°C で測定した。G218 変異体の温度依存性は、反応液 A に対して 30~80°C の各温度で測定した。すべての酵素活性は、n=3 の独立した実験から平均化した。

G218 変異体の AST 測定シミュレーション

AST 測定シミュレーションは、ヒト AST および G218 変異体の 30°C における速度定数を基に実行した。反応シミュレーションは、血清サンプル 0.3 mL および各 MDH を含む酵素試薬 2.7 mL の反応条件における NADH の減少量を 0.1 秒ごとに算出することで実行した。検出限界 AST 濃度は、各 MDH の反応速度が飽和する血清サンプル中の AST 濃度と定義し、酵素試薬中の野生型 MDH および G218 変異体 0.05 U/mL ごとに算出した。

G218Y の結晶化

G218Y の結晶は、10 mg/mL G218Y, 2 mM OAA および 2 mM NAD⁺を含むタンパク質溶液を用いて、リザーバー3 [20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 12 % (w/v) PEG 8000 および 0.2 M MgCl₂] に対して 20°C でのハンギングドロップ蒸気拡散法により共結晶化させた。

G218Y の X 線結晶構造解析

結晶は、15% (w/v) MPD を含むリザーバー3 に浸漬後、-180°C の N₂ ガスで瞬間冷凍した。回折データの indexing および integration は、XDS により行った [4]。Scaling および merging は、AIMLESS program [5] で行った。初期位相は、gs-MDH の open 構造 (PDB ID : 7BY8) をモデルにした分子置換法により MOLREP [6] で決定した。精密化は、COOT [7] および REFMAC [8] を使用したモデル構築サイクルにより完了した。

G218Y の分子動力学解析

分子構造の解析前処理, MD シミュレーションおよび RMSD 値の算出は, 第 3 章と同様の条件および方法で行った. Open 構造の MD シミュレーションは, 野生型 (PDB ID : 7BYC) および G218Y (PDB ID : 7F8D) 結晶構造の open 構造のサブユニットを基に実施した. Closed 構造の MD シミュレーションは, 野生型 (PDB ID : 7BYC) および G218Y (PDB ID : 7F8D) 結晶構造の closed 構造のサブユニットを基に実施した.

4-3 結果と考察

gs-MDH および gs-LDH の結晶構造およびアミノ酸配列の比較

前述のように酵素の柔軟性の上昇は, 反応機会の増加によるターンオーバーの向上が期待される. 一方で, 温度変化に対して鋭敏になり, 熱安定性の低下を伴う場合がある [9]. *gs-MDH* の優れた熱安定性と低温活性の両立に向けて, 次の点に着目して変異体のデザインを行った.

一つ目は, LDH の構造を基にした可動ループの高柔軟性の導入である. 第 3 章では, MD シミュレーションなどの構造分析により LDH の可動ループにおける高い柔軟性が観察された. MDH と LDH は, 同ファミリーに属しており全体の分子構造も高い類似性を示すことから, 高柔軟性のカギとなるアミノ酸残基を容易に適応できる可能性が高い.

二つ目は, *gs-MDH* の closed 構造の改変 (open 構造の維持) である. MDH において, open 構造と基質との相互作用による可動ループの構造変化は, 基質選択を担う重要なステップであることから, 変異導入による open 構造の改変は, *gs-MDH* の高基質特異性や親和性に悪影響を与える可能性が高い. したがって, 基質が選択的に結合した closed 構造をモデルにして変異を導入することで, *gs-MDH* の優れた特性との両立が期待できる.

Closed 構造の *gs-MDH* (PDB ID : 7BYA) および *gs-LDH* (PDB ID : 1LDN) の構造比較を図 4-1A に示した. 両構造の RMSD 値は 1.6 Å を示し, 可動ループのコンフォメーシ

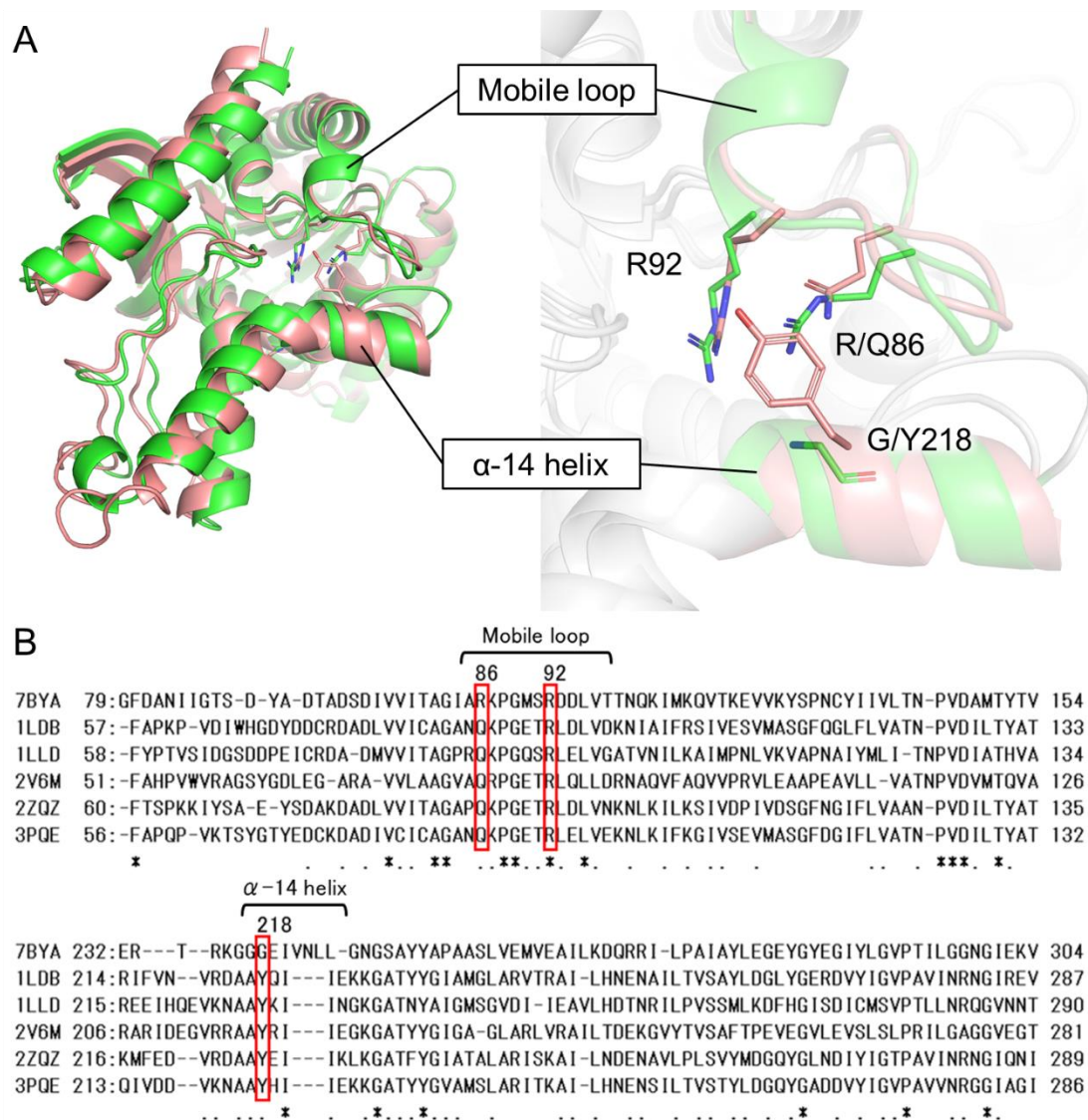


図 4-1. gs-MDH およびバクテリア LDH の構造比較およびマルチプルアライメント. A. gs-MDH (PDB ID: 7BYA, グリーン) および gs-LDH (PDB ID: 1LDN, サーモン) の closed 構造の全体構造および活性部位の重ね合わせ. 主鎖およびアミノ酸残基は, それぞれリボンおよびスティックモデルで示した. B. gs-MDH およびバクテリア LDH のアミノ酸配列アライメント. マルチプルアライメントは, gs-MDH (PDB ID: 7BYA), gs-LDH (1LDB, gs-MDH との相同性: 36%), *Bi. longuim* LDH (1LLD, gs-MDH との相同性: 35%), *T. thermophilus* LDH (2V6M, gs-MDH との相同性, 34%), *L. casei* LDH (2ZQZ, gs-MDH との相同性, 35%), および *Ba. subtilis* LDH (3PQE, gs-MDH との相同性, 35%) を対象として実施した.

オンを含めた全体構造が高い類似性を有していた. 一方, α-14 ヘルックス (gs-MDH: 216-224 番目) において, gs-MDH は 3 つの G 残基が存在するのに対して, gs-LDH では, その内の 1

```

Gst 158:RTFVAEELNLSVKDVTGFVLGGHGDDMVPLVRYSYAGGIPLEKLI PKDRLDAIVERTRKGGGEIVNLLGNGSAYYAPAAS 237
Ban 161:RTFIAQELNLSVKDITGFVLGGHGDDMVPLVRYSYAGGIPLETLIPKERLEAIVERTRKGGGEIVGLLGNGSAYYAPAAS 240
Bbr 158:RTFVAMELNVSVEDVTGFVLGGHGDDMVPLVRYSYAGGIPLEKLI PKDRLDAIVERTRKGGGEIVNLLGNGSAYYAPAAS 237
Bsu 158:RTFVAEELNLSVKDVTGFVLGGHGDDMVPLVRYSYAGGIPLETLIPKERIDAIVERTRKGGGEIVNLLGNGSAYYAPAAS 237
Cau 153:RTFIAMEAGVSVEDVQAMLGGHGDEMVPLPRFSTISGIPVSEFIAPDRLAQIVERTRKGGGEIVNLLKTGSAYYAPAAA 232
Gka 158:RTFVAEELNLSVKDVTGFVLGGHGDDMVPLVRYSYAGGIPLETLIPKDRLDAIVERTRKGGGEIVNLLGNGSAYYAPAAS 237
Hha 158:RTFVAEELNLSIKDVTGFVLGGHGDDMVPLTRYSFAGGIPLERLISKERLDAIVERTRKGGGEIVGLLGNGSAYYAPAAS 237
Pth 156:RTFVAQELNLSVKDVTGFVLGGHGDDMVPLVRYSYAGGIPLEKLI PKDRLDAIVERTRKGGGEIVNLLGNGSAYYAPAAS 235
Sac 158:CTFIARELNVSVEDVRGFVLGGHGDDMVPLVRYSNVGGIPIEKLLPKERIEAIVQRTRVGGGEIVGLLGSGSAYYAPAAS 237
Tco 158:CTFIARELNVSVEDVRGFVLGGHGDDMVPLVRYSNVGGIPIEKLLPKERIEAIVQRTRVGGGEIVGLLGSGSAYYAPAAS 237
. ** * * . . * . * . . . . . *****. ****. * . * . . . . . ***. . . . . * . . . . ** . ***. *****. ** . *****.

```

図 4-2. バクテリア由来 MDH のマルチプルアライメント. アライメントは, *G. stearothermophilus* (Gst) , *Ba. anthracis* (Ban) , *Br. brevis* (Bbr) , *Ba. subtilis* (Bsu) , *Ch. aurantiacus* (Cau) , *G. kaustophilus* (Gka) , *H. halophilus* (Hha) , *Pa. thermoglucosidasius* (Pth) , *Su. acidophilus* (Sac) および *Thermobacillus composti* (Tco) 由来の MDH を対象に実施した.

つ (G218) が嵩高い Y 残基に置き換わっていた. さらに, gs-MDH と 5 種のバクテリア由来の LDH のアミノ酸配列アライメントは, gs-LDH の α -14 ヘリックスにおける Y 残基の高い保存性を示した (図 4-1B) . 一方, バクテリア由来の MDH においては, G218 が広く保存されていた (図 4-2) . gs-LDH の活性部位において, Y218 の嵩高い側鎖が, closed 構造の可動ループの近辺に位置することから, Y218 との立体障害が可動ループの高柔軟性に寄与していると予想される. また, この立体障害は, closed 構造のみで観察されるため, G218 の嵩高いアミノ酸残基 (F, Y および W) への置換は, gs-MDH において closed 構造の可動ループの柔軟性向上につながることを期待される.

G218 変異体の速度論解析

gs-MDH の G218 を F, Y および W に置換した G218F, G218Y および G218W の速度論解析を行った. 各変異体の速度論パラメータ (表 4-2) は, 30°C における OAA の基質-飽和曲線 (図 4-3A) を基に決定した. 野生型の gs-MDH は, 0.5 mM OAA での比活性が 150 U/mg を示し, 30°C における低活性と基質阻害が観察された. また, K_m および k_{cat} 値は, それぞれ 5.5 μ M および 1300 s^{-1} であった. 一方, 0.5 mM OAA での G218F, Y および W の比活性は, そ

表 4-2. gs-MDH の野生型および G218 変異体の 30°C における速度論パラメータ.

Enzyme	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)	K_i (μM)
WT	5.5±0.6	1300±58	250±30	170±12
G218F	31±1.8	3700±340	120±3.7	1000±160
G218Y	26±2.0	3800±400	150±3.7	470±52
G218W	28±1.8	2800±230	100±11	1500±310

れぞれ 980, 750 および 820 U/mg と顕著に上昇した. また, 各変異体の K_m および k_{cat} 値は, それぞれ 26~31 μM および 2800~3800 s^{-1} を示し, K_i 値は, 野生型の 170 μM から 470~1500 μM に上昇した.

G218 変異体の顕著な k_{cat} 値の上昇は, 嵩高いアミノ酸残基の導入による可動ループの構造変化の促進を示唆した. また, 変異による基質阻害の改善が, 相乗効果として高基質濃度における比活性の上昇に寄与していると考えられた. さらに, 変異体の基質親和性の低下から, 導入残基が OAA と可動ループ間の相互作用を変化させている可能性が示唆された. G218 変異体の PYR (2.0~10 mM) に対する反応性を評価した結果, いずれの変異体も野生型と同様に全く反応性を示さず, 基質特異性の維持が確認された. したがって, closed 構造への変異導入は, 基質認識に関わる open 構造の活性部位環境を変化させないことが示唆された.

G218 変異体の温度特性

gs-MDH の優れた温度特性に対する変異の影響を調べるため, G218 変異体の残存活性および温度依存性を評価した. 各変異体の残存活性は, 野生型と同様に最大 60°C まで保持され, 70°C で低下したことから, 変異体の高い熱安定性が確認された (図 4-3B). また, 30°C における変異体の比活性は, 野生型の最大 3.9 倍に上昇した (図 4-3C). 以上の結果か

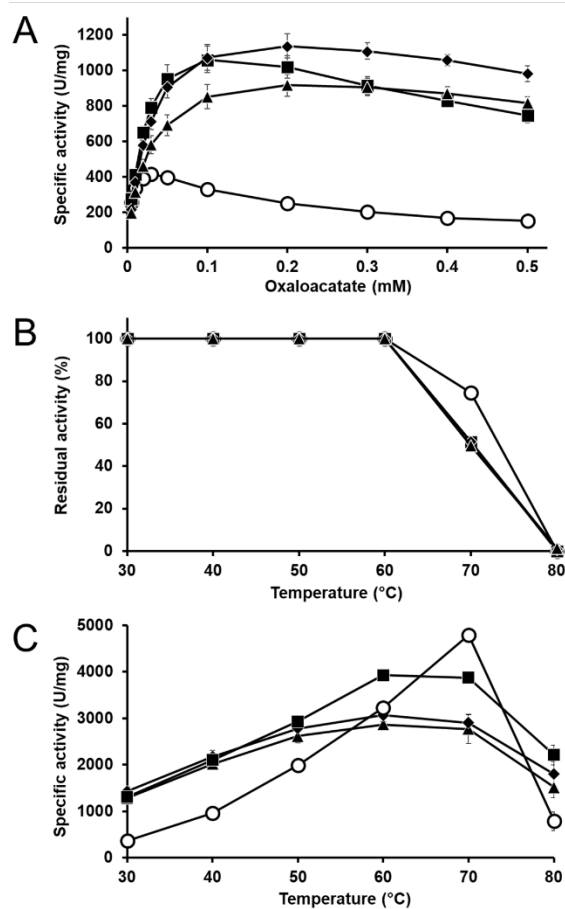


図 4-3. gs-MDH の野生型 (○), G218Y (■), G218F (◆) および G218W (▲) の酵素特性. エラーバー: 標準偏差 (S.D.); n=3. A. OAA に対する基質-飽和曲線. 各比活性は, OAA 濃度 0.005~0.5 mM に対して 30°C で測定した. B. 熱安定性. 各残存活性は, 30~80°C で 1 時間のインキュベーション後に算出した. C. 0.5 mM OAA における温度依存性.

ら, G218 の変異により熱安定性の保持と低温における高活性を併せ持つ gs-MDH の開発に成功した.

G218 変異体の速度論パラメータに基づく AST 測定シミュレーション

G218 変異による比活性向上の検査薬における効果を検証するため, AST 測定シミュレーションによる野生型との比較を行った. シミュレーションは, 30°C における各酵素の速度論パラメータを基に計算した. 試薬中の MDH 濃度 0.05 U/mL ごとの検出限界 AST 濃

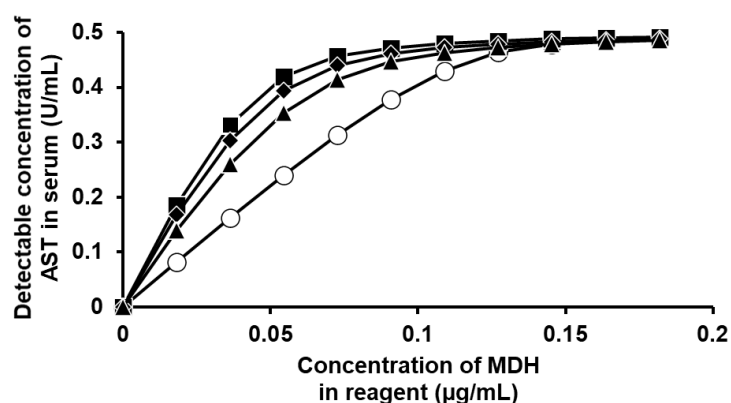


図 4-4. 30°C における gs-MDH の野生型 (○), G218Y (■), G218F (◆) および G218W (▲) の AST 測定シミュレーション. シミュレーションは, 各酵素の 30°C の速度論パラメータを基に計算し, 検出限界 AST 濃度は, 試薬中の gs-MDH 濃度 0.05 U/mL ごとに算出した.

度は, 高 MDH 濃度 (0.15~0.2 µg/mL) では野生型と G218 変異体で同じ値であったが, 低 MDH 濃度 (~0.1 µg/mL) では, 顕著に上昇していた (図 4-4). したがって, G218 変異による k_{cat} 値の上昇は, AST 測定における追隨酵素としての有用性を向上させることが示唆された. また, これらの結果は, G218 変異による K_m 値の低下は, AST 測定において MDH の追隨能力に影響しないことを示唆している.

G218Y の X 線結晶構造解析

G218 変異体の中で最も触媒効率が高かった G218Y の結晶構造 (分解能 2.4 Å) を決定した (表 4-3). G218Y の結晶は, OAA および NAD^+ 存在下で co-crystallization 法によって取得した. 野生型 gs-MDH と同様に, G218Y の結晶構造は, 四量体の内の 3 つのサブユニットが NAD^+ が結合した open 構造を示し, 残りのサブユニットは, closed 構造を示した (図 4-5). しかし, closed 構造の活性部位における OAA の電子密度は不明瞭であった.

gs-MDH の野生型および G218Y の全体構造の比較

gs-MDH の野生型および G218Y の全体の RMSD 値は, open 構造における両構造の

表 4-3. データコレクションおよび精密化統計

G218Y	
PDB ID: 7F8D	
Data collection	
X-ray source	BL26B1
Wavelength (Å)	1.0000
Space group	$P2_12_12_1$
Unit cell parameters	
a, b, c (Å)	77.42, 110.2, 150.8
α, β, γ (°)	90.00, 90.00, 90.00
Resolution range (Å) ^a	48.51-2.40 (2.47-2.40)
R_{merge} (%) ^{a,b}	9.1 (39.0)
Completeness (%) ^a	100 (100)
Total reflections	693,361
Unique reflections	51,272
$CC_{1/2}$ (%) ^a	99.9 (97.3)
$I/\sigma(I)$ ^a	21.5 (7.7)
Refinement	
Resolution range (Å) ^a	48.5-2.40 (2.46-2.40)
Number of reflections	51,207
$R_{\text{cryst}}/R_{\text{free}}$ (%) ^{a,c,d}	17.6 (19.0)/24.9 (28.4)
RMSD bond length (Å)	0.008
RMSD bond angle (degree)	1.518
Number of atoms	
Protein	9,520
Water	176
Ligand	206
Average B-factor (Å ²)	
Overall	50.7
Protein	50.7
Ligand	61.9
Water	41.6
Ramachandran plot (%) ^e	
Favored	97.6
Allowed	2.1

^a Values in parentheses are for the highest resolution shell.

^b $R_{\text{merge}} = \sum_{\text{hkl}} \sum_i |I_{\text{hkl},j} - \langle I_{\text{hkl}} \rangle| / \sum_{\text{hkl}} \sum_i I_{\text{hkl},j}$, where $I_{\text{hkl},j}$ is the intensity of observation $I_{\text{hkl},j}$ and $\langle I_{\text{hkl}} \rangle$ is the average of symmetry-related observations of a unique reflection.

^c $R_{\text{cryst}} = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$, where F_o and F_c are observed and calculated structure factor amplitudes, respectively.

^d R_{free} was calculated using a randomly-selected 5% of the dataset that was omitted from all stages of refinement.

^eRamachandran plots were prepared for all residues other than Gly and Pro.

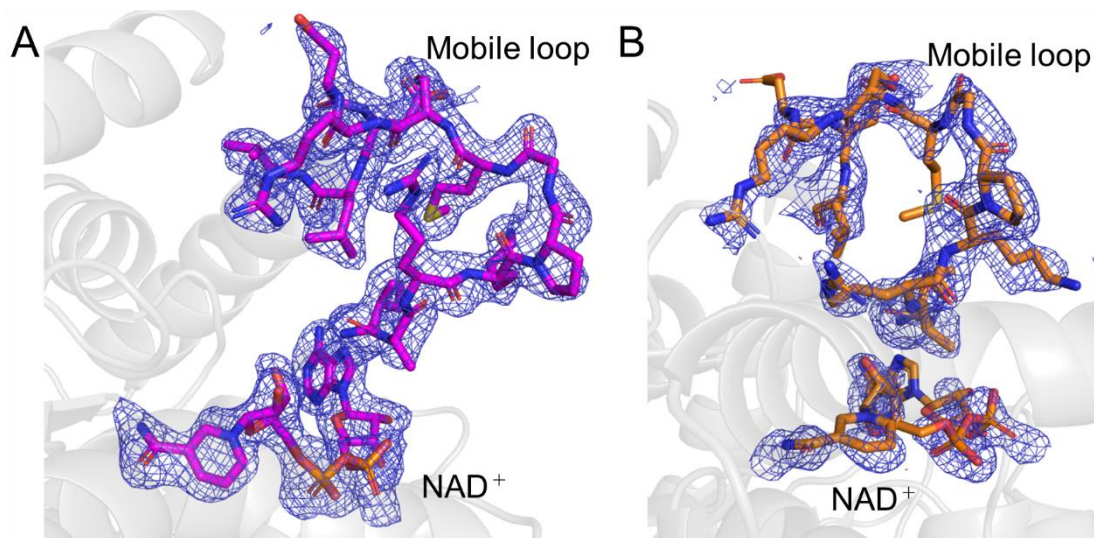


図 4-5. G218Y の結晶構造における可動ループおよび NAD⁺ のコンフォメーション. 電子密度図は、構造因子の計算から可動ループおよび NAD⁺ を除いた 2 σ レベルにおける $F_o - F_c$ omit マップを示した. A. open 構造の活性部位. B. closed 構造の活性部位.

高い類似性を示した (図 4-6A および B) . 一方, closed 構造においては, 可動ループ領域の RMSD 値が変異により顕著に上昇した (図 4-6C および D) . これらの結果は, 変異が closed 構造の可動ループのコンフォメーションのみに影響を与えることを示している.

gs-MDH の野生型および G218Y の closed 構造の活性部位の比較

G218Y において, open 構造の Y218 側鎖の配向は, 活性部位の外側に向かっていて一方で, closed 構造では, *gs-LDH* の closed 構造と同様に Y218 側鎖の配向が活性部位に向かっていて (図 4-6A および C) . また, 変異体の closed 構造の可動ループは, Y218 との立体障害により野生型よりもねじれたコンフォメーションを有していた.

Closed 構造において, 野生型および G218Y の R155 は同じ位置に存在していたことから, 変異体における OAA の α -カルボキシ基は, 野生型と同様の位置に結合し, 触媒反応を受けると推察される. R155 とは対照的に, R86 および R92 は, 変異によって活性部位での位置が変化していた. R86 は, 可動ループのねじれにより R92 と同様の位置に置き換わり,

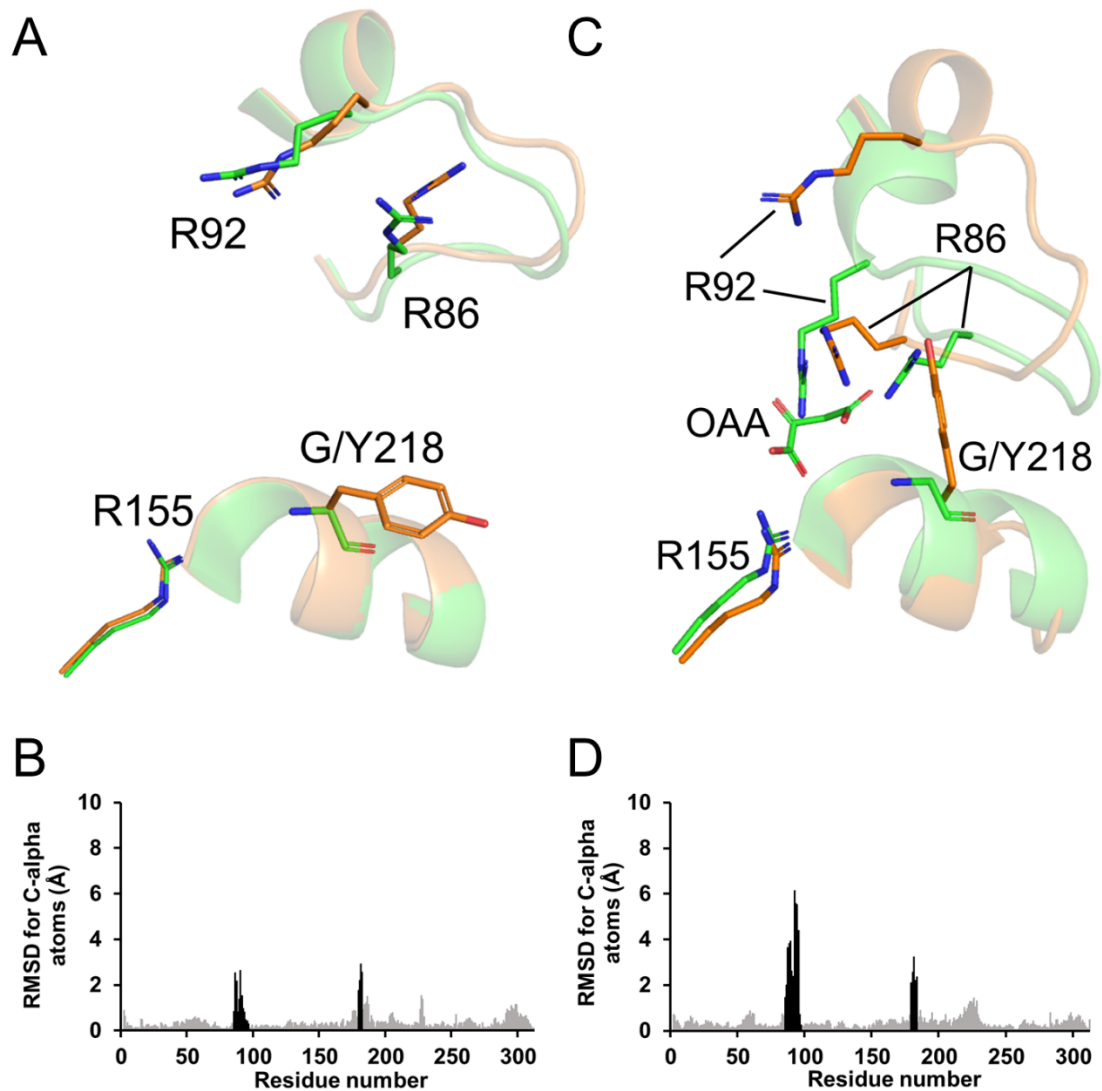


図 4-6. gs-MDH の野生型および G218Y の活性部位構造および RMSD 値. A および C. 野生型 (グリーン) および G218Y (オレンジ) の Open 構造 (A) および closed 構造 (C). 可動ループおよび α -14 ヘリックスの主鎖をリボンモデルで示した. B. 野生型および変異体間の open 構造における RMSD 値. D. 野生型および変異体間の closed 構造における RMSD 値. 可動ループおよび触媒ループ領域はブラック, その他の領域はグレーで示した.

OAA の β カルボキシ基との相互作用が予想されるアミノ酸残基は, 変異体では観察されなかった. 野生型では, R92 は OAA の遷移状態の安定化に寄与することから, 変異体において R86 が R92 に置き換わっていたことが, 触媒活性の保持につながったと考えられる. また, OAA の安定化に関与する R86 と OAA の β カルボキシ基間の相互作用の欠失は, G218Y の

結晶構造における OAA の不明瞭な電子密度や OAA に対する高い K_m 値の要因だと考えられる。

Co-crystallization 法により得られた野生型 (PDB ID : 7BYA) および G218Y (PDB ID : 7F8D) の結晶構造は, open および closed 構造の両方を有するため, 標準化等の処理をすることなく各酵素の open 構造と closed 構造の B-factor の違いを比較できる. そこで, gs-MDH の野生型および G218Y の B-factor 差 (closed 構造 - open 構造) を比較した (図 4-7). 野生型では, 可動ループ領域が負の値を示したことから, open 構造が closed 構造よりも B-factor が高く, 柔軟性が高いことを示唆している. 一方, 変異体では, 可動ループ領域が正の値を示し, closed 構造の可動ループが open 構造よりも柔軟性が高いことを示唆している. 以上の結果は, closed 構造の可動ループの柔軟性の上昇により, closed から open 構造への構造変化が促進され, 反応サイクルのターンオーバーが上昇したことを示唆している.

MD シミュレーションによる可動ループの柔軟性の評価

野生型および G218Y における可動ループの柔軟性を評価するために, 両酵素の結晶構造を用いて MD シミュレーションを行った (図 4-8). Open 構造では, 野生型および変異体の可動ループは, 同様の RMSD 値を示し, 両酵素の可動ループが類似した柔軟性を有することが示唆された. 一方, closed 構造では, G218Y の可動ループが野生型よりも高い

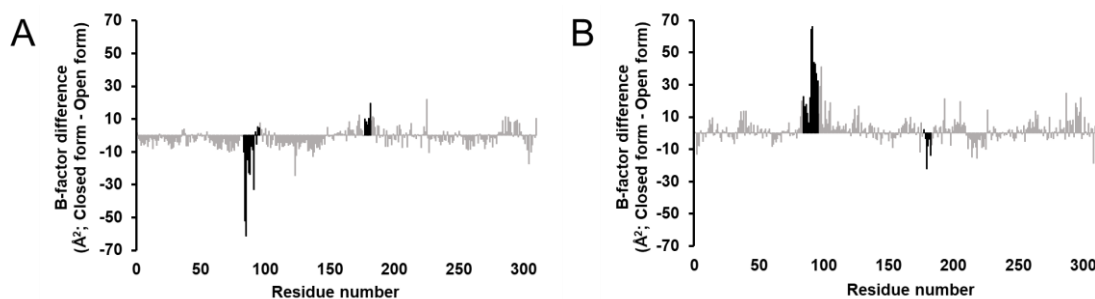


図 4-7. Open および closed 構造間の B-factor 差. B-factor 差は, 各結晶構造の closed 構造の B-factor から open 構造の B-factor を差し引いて算出した. 可動ループおよび触媒ループはブラック, その他の領域はグレーで示した. A. 野生型 (PDB ID : 7BYA) における B-factor 差. B. G218Y (PDB ID : 7F8D) における B-factor 差.

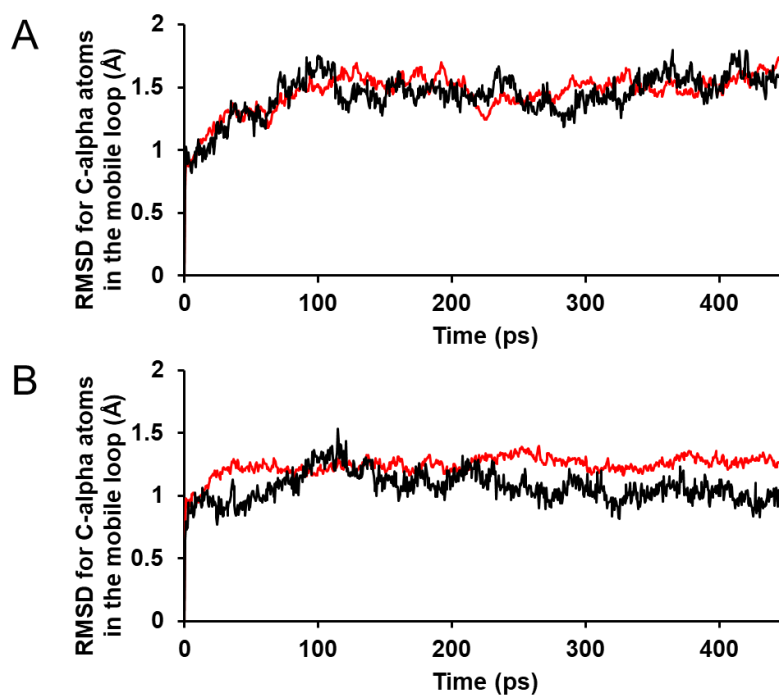


図 4-8. MD シミュレーションにおける gs-MDH の野生型および G218Y の可動ループの RMSD 値の比較. シミュレーションは, 野生型 (ブラック) および G218Y (レッド) の結晶構造に対して 30°C で実施した. RMSD 値は, 可動ループを対象に算出した. A. Open 構造のシミュレーション. B. Closed 構造のシミュレーション.

RMSD 値を示した. 以上の結果は, B-factor 差の結果と同様に, 変異が closed 構造の可動ループの柔軟性を上昇させたことを示しており, この局所的な柔軟性の向上が, gs-MDH の安定性と比活性の両立に寄与したと考えられる.

4-4 まとめ

第 4 章では, gs-MDH の closed 構造における可動ループの柔軟性を向上させることで, 高温での安定性と低温での比活性を兼ね備えた G218 変異体をデザインした. gs-MDH の open 構造は基質認識に重要であることから, gs-LDH の結晶構造を基に closed 構造の可動ループに対して相互作用が期待される G218 変異体を作製した. G218 変異体は, 低温において野生型よりも高い比活性を有しており, 野生型と同様の熱安定性を示した. G218Y の closed

構造は、野生型と比較して可動ループのねじれたコンフォメーションを有しており、それにより OAA との相互作用も野生型と異なっていた。また、G218Y の特徴的なコンフォメーションは、closed 構造の可動ループの柔軟性を向上させ、closed から open 構造への構造変化の促進による活性向上を示唆した。検査薬の実使用温度での高反応性および保存安定性の両立に成功した本変異体は、gs-MDH の検査薬用酵素としての有用性をさらに高めた。また、構造変化を利用して基質結合から酵素反応までの特定のステップや構造に局所的な変異を導入した本デザイン手法は、PE による機能改変の幅を広げる新たな観点となる。

参考文献

1. Lee, D., Hong, J. & Kim, K. J. Crystal structure and biochemical characterization of malate dehydrogenase from *Metallosphaera sedula*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **509**, 833–838 (2019).
2. Meemongkolkiat, T. *et al.* Thermal adaptation in the honeybee (*Apis mellifera*) via changes to the structure of malate dehydrogenase. *J. Exp. Biol.* **223**, jeb228239 (2020).
3. Takeya, M., Ito, S., Sukigara, H. & Osanai, T. Purification and characterisation of malate dehydrogenase from *synechocystis* SP. PCC 6803: Biochemical barrier of the oxidative tricarboxylic acid cycle. *Front. Plant Sci.* **9**, Article 947 (2018).
4. Kabsch, W. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 133-144 (2010).
5. Evans, P. R. & Murshudov, G. N. How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **69**, 1204-1214 (2013).
6. Vagin, A. & Teplyakov, A. MOLREP: An Automated Program for Molecular Replacement. *J. Appl. Crystallogr.* **30**, 1022-1025 (1997).
7. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 486-501 (2010).
8. Murshudov, G. N. *et al.* REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **67**, 355-367 (2011).
9. Suzuki, T., Yasugi, M., Arisaka, F., Yamagishi, A. & Oshima, T. Adaptation of a thermophilic enzyme, 3-isopropylmalate dehydrogenase, to low temperatures. *Protein Eng.* **14**, 85-91 (2001).

第 5 章 *Geobacillus stearothermophilus* 由来リンゴ酸デヒドロゲナー

ゼの C 末端残基欠失による酵素特性への影響

5-1 背景

第 4 章では, closed 構造の活性中心のアミノ酸残基の変異により, 反応速度の向上が確認された. 基質認識や触媒残基の活性化などの役割を有する可動ループとの相互作用の改変は, わずかな変化でも MDH の機能に大きく影響を与えると予想される. このように酵素の活性中心を構成し触媒反応や基質結合に関与するアミノ酸残基群は第一層領域とされ, 第一層領域と相互作用するアミノ酸残基群は第二層領域と呼ばれる. 第二層領域の変異導入は, 劇的な機能向上は期待できないものの, 酵素機能の消失や顕著な低下などのリスクが低い [1]. 第 5 章では, gs-MDH の第二層領域である C 末端領域が, 可動ループや gs-MDH の酵素特性に与える影響を調べ, 活性部位周辺の相互作用と機能の関係の理解を試みた.

gs-MDH の可動ループの 2 つのヒンジ領域は, 一方が補酵素結合部位を形成し, OAA の還元反応に必要な NADH が結合する. もう一方は, C 末端領域 (290~309 番目の残基で構成される α 17-ヘリックスおよび C 末端残基) が隣接している (図 5-1). gs-MDH の C 末端領域は, 可動ループのヒンジ領域と相互作用しているため, 構造変化をはじめとした酵素機能への関与が予想される. しかし, MDH の C 末端領域と酵素機能との関係に関して, 未だ報告はない.

本章では, *in silico* 解析により, 可動ループのヒンジ領域と相互作用する C 末端領域の欠失が活性中心の相互作用ネットワークに与える影響を調べた. また, C 末端欠失変異体の速度論解析の結果, K_m 値や k_{cat} 値に大きな変化はなかったが, 変異による基質阻害の大幅な低下が確認された. さらに, C 末端一残基欠失変異体の結晶構造解析により, C 末端領域との相互作用の減少による可動ループのコンフォメーションの変化が示唆された.

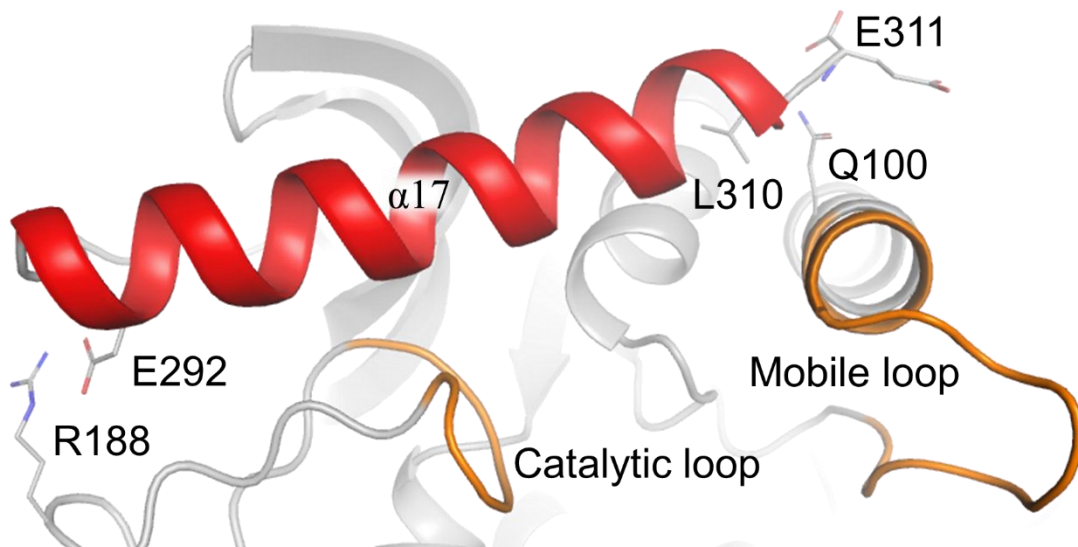


図 5-1. 野生型 gs-MDH の C 末端領域周辺の構造. α -17 ヘリックスはレッドで示し, 可動ループおよび触媒ループは, オレンジで示した.

5-2 材料と方法

In silico 解析

C 末端欠失変異体の立体構造は, MOE software の Protein Builder program および Energy Minimalization program を用いてモデリングし, Quick Prep program を用いてプロトンおよび電荷の付加を行った. 野生型および変異体の重ね合わせおよび相互作用エネルギーの算出は, MOE software を用いて実行した.

C 末端欠失変異体の発現ベクターの構築

C 末端欠失変異体の発現ベクターは, 野生型 gs-MDH の発現ベクターを鋳型とした inverse PCR 法により構築した. PCR に使用した DNA primer set は, 表 5-1 に示す.

C 末端欠失変異体の酵素発現および精製

C 末端欠失変異体の組み換え菌は, 変異体発現ベクターを *E. coli* BL21(DE3) 株に

表 5-1, gs-MDH 変異体の構築に使用した DNA primer set.

Primer		Sequence
ΔE311	Forward	5'- TGAGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGAC -3'
	Reverse	5'- CAGCATAACGCATAAACATTTTTTCACCGATTCCACG -3'
ΔL310- E311	Forward	5'- TGAGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGAC -3'
	Reverse	5'- CATAACGCATAAACATTTTTTCACCGATTCCACGCTTT -3'
ΔL310	Forward	5'- <u>GAAT</u> TGAGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGAC -3'
	Reverse	5'- CATAACGCATAAACATTTTTTCACCGATTCCACGCTTT -3'

変異コドンは下線で示した.

形質転換することで取得した. 速度論解析を目的とした組み換え菌の培養, 発現誘導および酵素精製は, 第 3 章および第 4 章と同様の手順で実施した. 結晶化への使用を目的とした組み換え菌の培養, 発現誘導および酵素精製は, 第 2 章および第 4 章と同様の手順で実施した.

C 末端欠失変異体の酵素特性評価

C 末端欠失変異体の速度論解析, 残存活性および温度依存性の評価は, 第 4 章と同様の方法で行った.

ΔE311 の結晶化

ΔE311 の結晶は, 10 mg/mL ΔE311 および 2 mM NAD⁺を含むタンパク質溶液を用いて, リザーバー4 [0.1 M *N*-cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid buffer (pH 8.8) および 20% (w/v) PEG 8000] に対して 20°C でのハンギングドロップ蒸気拡散法により共結晶化させた.

***ΔE311* の X 線結晶構造解析**

結晶は、20% (w/v) グリセロールを含むリザーバー4 に浸漬後、-180°C の N₂ ガスで瞬間冷凍した。回折データの解析、初期位相決定および精密化は第 4 章と同様の手順で行った。

5-3 結果と考察

***In silico* における C 末端残基欠失の可動ループへの影響**

gs-MDH における C 末端領域と活性部位との相互作用の基礎的観察として、gs-MDH の apo-form (PDB ID : 7BY8) の C 末端領域と周辺残基との相互作用エネルギーを算出した。その結果、可動ループのヒンジ領域と C 末端領域間の相互作用エネルギーは、合計 -12.1 kcal/mol であった (表 5-2)。その中でも、C 末端に位置する E311 とヒンジ領域の Q100 間の相互作用エネルギーは、-8.3 kcal/mol であった。また、C 末端領域は、触媒ループ近傍に存在する R188 と静電的相互作用を形成しており、その相互作用エネルギーは -32.1 kcal/mol であった。第 2 章で示したように、可動ループの構造変化は触媒ループの活性化に関与することから、C 末端領域が可動ループから触媒ループにわたる相互作用を介して酵素特性へ寄与することが推察された。

gs-MDH における C 末端領域の変化が酵素構造に与える影響を考察するため、C 末端残基を一残基欠失させた $\Delta E311$ 、二残基欠失させた $\Delta L310$ -E311、野生型の L310 のみを欠失させ E311 の負電荷の性質を C 末端に残した $\Delta L310$ を構築し、それぞれの相互作用エネルギーを算出した。野生型の活性部位における C 末端領域が形成する相互作用エネルギーは、合計 -44.2 kcal/mol であった (表 5-2)。一方、 $\Delta E311$ 、 $\Delta L310$ -E311 および $\Delta L310$ の活性部位における相互作用エネルギーは、それぞれ -76.4、-75.9 および -77.7 kcal/mol を示し、活性部位の相互作用数の増加による C 末端領域の安定化が示唆された。また、3 種の C 末端欠失変異体の可動ループは、野生型と比較して活性部位側にわずかにシフトしていた (図 5-2)。以

表 5-2. 野生型 gs-MDH および C 末端欠失変異モデルの相互作用エネルギー.

Enzymes	C-terminal region		Interacting residues	Interaction energy (kcal/mol)	Total interaction energy (kcal/mol)
WT	E292	-	R188	-32.1	-44.2
	M309	-	<u>D93</u>	-0.8	
	E311	-	<u>Q100</u>	-8.3	
	E311	-	<u>K101</u>	-3.0	
Δ E311	E287	-	R188	-35.0	-76.4
	K298	-	D181	-10.0	
	K298	-	D182	-15.1	
	S299	-	D182	-2.6	
	S302	-	D182	-2.6	
	S302	-	<u>R92</u>	-3.8	
	M309	-	<u>D93</u>	-0.7	
	M309	-	<u>T97</u>	-3.1	
	L310	-	<u>Q100</u>	-3.4	
Δ L310- E311	E292	-	R188	-35.3	-75.9
	K298	-	D181	-9.9	
	K298	-	D182	-21.0	
	S302	-	D182	-2.6	
	S302	-	<u>R92</u>	-3.6	
	M309	-	<u>D93</u>	-0.8	
	M309	-	<u>T97</u>	-1.6	
	M309	-	<u>Q100</u>	-1.1	
Δ L310	E292	-	R188	-35.0	-77.7
	K298	-	D181	-9.9	
	K298	-	D182	-15.1	
	S299	-	D182	-2.6	
	S302	-	D182	-2.6	
	S302	-	<u>R92</u>	-3.8	
	M309	-	<u>T97</u>	-3.2	
	M309	-	<u>D93</u>	-0.7	
	E310	-	<u>Q100</u>	-4.8	

可動ループおよびヒンジ領域を構成するアミノ酸残基を下線で示した.

上の結果は, gs-MDH において C 末端領域が触媒部位と密接に相互作用し, 可動ループのコ

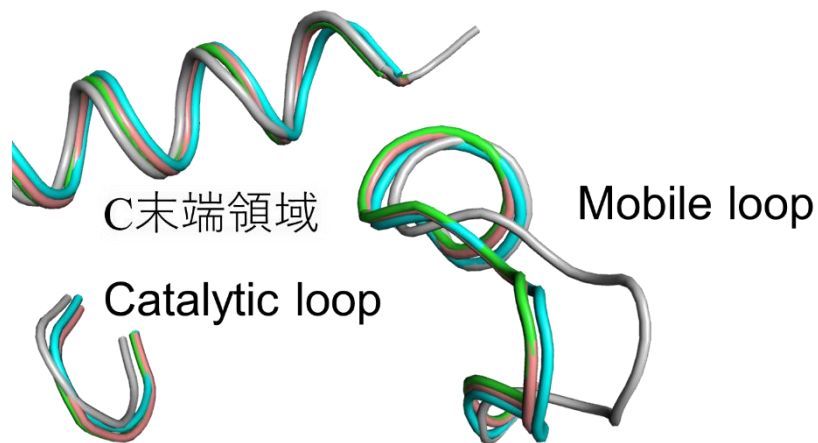


図 5-2. 野生型 gs-MDH および C 末端欠失変異体の活性部位. 野生型, $\Delta E311$, $\Delta L310$ -E311 および $\Delta L310$ は, それぞれグレー, グリーン, シアンおよびサーモンで示した.

ンフォメーションや酵素機能の制御への寄与を示唆している.

$\Delta E311$, $\Delta L310$ -E311 および $\Delta L310$ の速度論解析

C 末端残基の欠失による gs-MDH の酵素特性への寄与が示唆されたため, 実際に 3 種の C 末端欠失変異体を作製し, OAA に対する速度論解析を行った (表 5-3). $\Delta E311$, $\Delta L310$ -E311 および $\Delta L310$ の k_{cat} 値は, それぞれ 840, 1200 および 810 s^{-1} を示し, 可動ループと相互作用するアミノ酸残基の欠失にも関わらず大幅な減少は見られなかった. また, 変異体の K_m 値は, 野生型に対してほとんど変化がなかった.

表 5-3. 野生型 gs-MDH および C 末端残基欠失の速度論パラメータ.

Enzyme	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1}\mu M^{-1}$)	K_i (μM)
WT	5.5 \pm 0.6	1300 \pm 58	250 \pm 30	170 \pm 12
$\Delta E311$	6.0 \pm 0.5	840 \pm 83	140 \pm 17	1300 \pm 97
$\Delta L310$ -E311	8.3 \pm 0.8	1200 \pm 53	150 \pm 17	1400 \pm 120
$\Delta L310$	7.0 \pm 0.8	810 \pm 70	120 \pm 19	870 \pm 170

一方で, C 末端の欠失により基質阻害の大幅な低下が観察された (表 5-3) . 野生型は, K_i 値が 170 μM と強い基質阻害を有しており, 0.5 mM OAA における比活性が最大活性 (0.03 mM OAA) の約 37%にまで低下する (図 5-3A) . 一方, ΔE311 , $\Delta\text{L310-E311}$ および ΔL310 の K_i 値は, それぞれ 1300, 1400 および 870 μM と顕著に上昇し, これによって, 0.5 mM OAA 濃度における比活性が 1.5~2.4 倍に向上した. 以上の結果から, C 末端残基の欠失により高基質親和性を維持した低基質阻害の変異体が得られた.

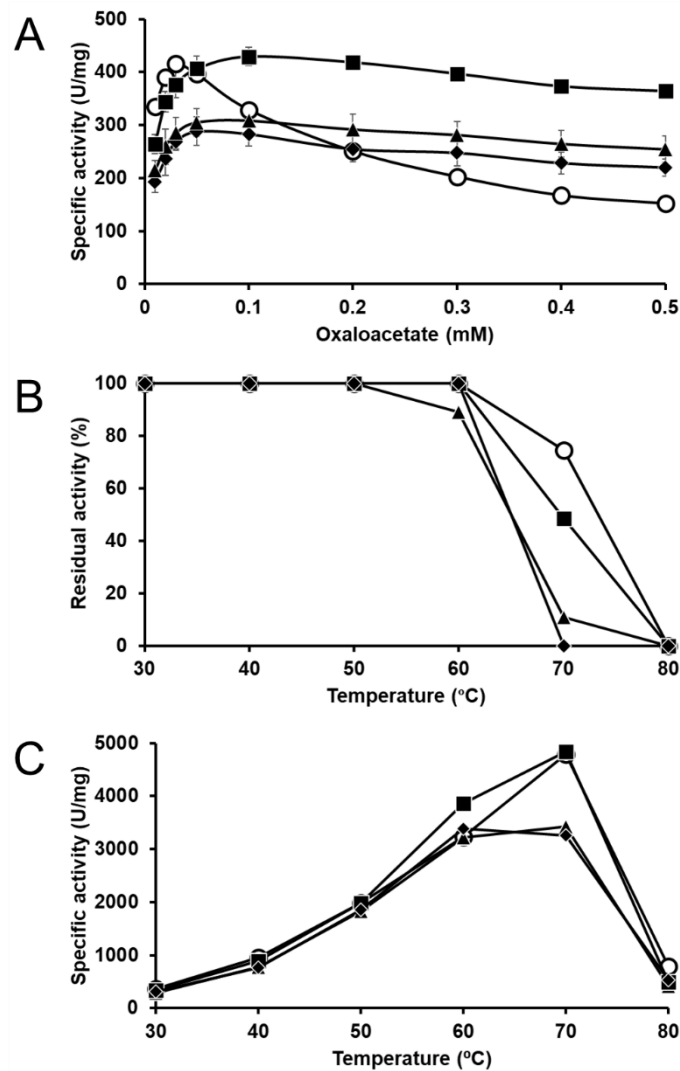


図 5-3. 野生型 gs-MDH (○) , ΔE311 (▲) , $\Delta\text{L310-E311}$ (■) および ΔL310 (◆) の酵素特性. エラーバー : 標準偏差 (S.D.); n=3. A. OAA に対する基質-飽和曲線. 各比活性は, OAA 濃度 0.005 ~0.5 mM に対して 30°C で測定した. B. 熱安定性. 各残存活性は, 30~80°C で 1 時間のインキュベーション後に算出した. C. 0.5 mM OAA における温度依存性. 30~80°C の各温度で活性測定を行った.

ΔE311, ΔL310-E311 および ΔL310 の温度特性

C末端残基の欠失による gs-MDH の熱安定性への影響を調べるため、各変異体の温度特性を評価した。残存活性において、ΔL310-E311 は、野生型と同様に 60°C まで 100% の活性を保持し、70°C での低下を示した (図 5-3B)。また、一残基欠失の ΔE311 および ΔL310 は、70°C での大幅な活性の低下を示したが、60°C における残存活性の低下は ΔE311 では 89% に留まった。ΔL310-E311 の温度依存性は野生型と同様の傾向を示し、C末端残基の二残基の欠失は、gs-MDH の温度特性にほとんど影響を与えなかった (図 5-3C)。また、ΔE311 および ΔL310 においても、70°C での熱安定性の低下に伴い、温度依存性の低下を示したが、60°C までは野生型と同様の活性を示した。

gs-MDH は、高基質親和性と基質特異性から免疫標識用酵素などの臨床検査や医薬品原料の工業的生産等への応用が期待されている。しかし、それらの用途は過剰な基質濃度条件下で反応させるため反応効率の低下を招くことから、gs-MDH の強い基質阻害は利用用途の拡大における重要な課題である。したがって、本変異体は gs-MDH の熱安定性や温度依存性を損なうことなく応用における課題を解決した実用的な酵素である。

ΔE311 の結晶構造解析

C末端残基の欠失による影響を構造的に調べるために ΔE311 の結晶構造解析を行った (表 5-4)。ΔE311 の結晶は、2 mM NAD⁺との共結晶化により得られ、決定された結晶構造の非対称単位は、NAD⁺が結合した ΔE311 が 6 分子含まれていた (図 5-4A)。各構造の C末端領域は、すべて 308~310 番目までの 3 残基がディスオーダーしており、中には 305~310 番目までの 5 残基がディスオーダーしているサブユニット構造も見られた (図 5-4B)。また、その内の 1 分子 (chain A) の C末端領域は他のサブユニットより配向の違いが大き

表 5-4. データコレクションおよび精密化統計

AE311	
Data collection	
X-ray source	BL44XU
Wavelength (Å)	1.0000
Space group	C121
Unit cell parameters	
a, b, c (Å)	242.85, 82.72, 136.7
α, β, γ (°)	90.00, 98.59, 90.00
Resolution range (Å) ^a	48.63-2.28 (2.32-2.28)
R_{merge} (%) ^{a,b}	8.7 (36.0)
Completeness (%) ^a	99.8 (99.7)
Total reflections	478,752
Unique reflections	122,192
$CC_{1/2}$ (%) ^a	99.9 (99.7)
$I/\sigma(I)$ ^a	7.8 (2.8)
Refinement	
Resolution range (Å) ^a	48.63-2.28 (2.34-2.28)
Number of reflections	116,109
$R_{\text{cryst}}/R_{\text{free}}$ (%) ^{a,c,d}	23.4 (29.5)/28.0 (31.7)
RMSD bond length (Å)	0.008
RMSD bond angle (degree)	1.498
Number of atoms	
Protein	13,815
Water	181
Ligand	264
Average B-factor (Å ²)	
Overall	69.3
Protein	69.3
Ligand	78.7
Water	58.5
Ramachandran plot (%) ^e	
Favored	93.3
Allowed	5.8

^a Values in parentheses are for the highest resolution shell.

^b $R_{\text{merge}} = \sum_{\text{hkl}} \sum_i |I_{\text{hkl},j} - \langle I_{\text{hkl}} \rangle| / \sum_{\text{hkl}} \sum_i I_{\text{hkl},j}$, where $I_{\text{hkl},j}$ is the intensity of observation $I_{\text{hkl},j}$ and $\langle I_{\text{hkl}} \rangle$ is the average of symmetry-related observations of a unique reflection.

^c $R_{\text{cryst}} = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$, where F_o and F_c are observed and calculated structure factor amplitudes, respectively.

^d R_{free} was calculated using a randomly-selected 5% of the dataset that was omitted from all stages of refinement.

^eRamachandran plots were prepared for all residues other than Gly and Pro.

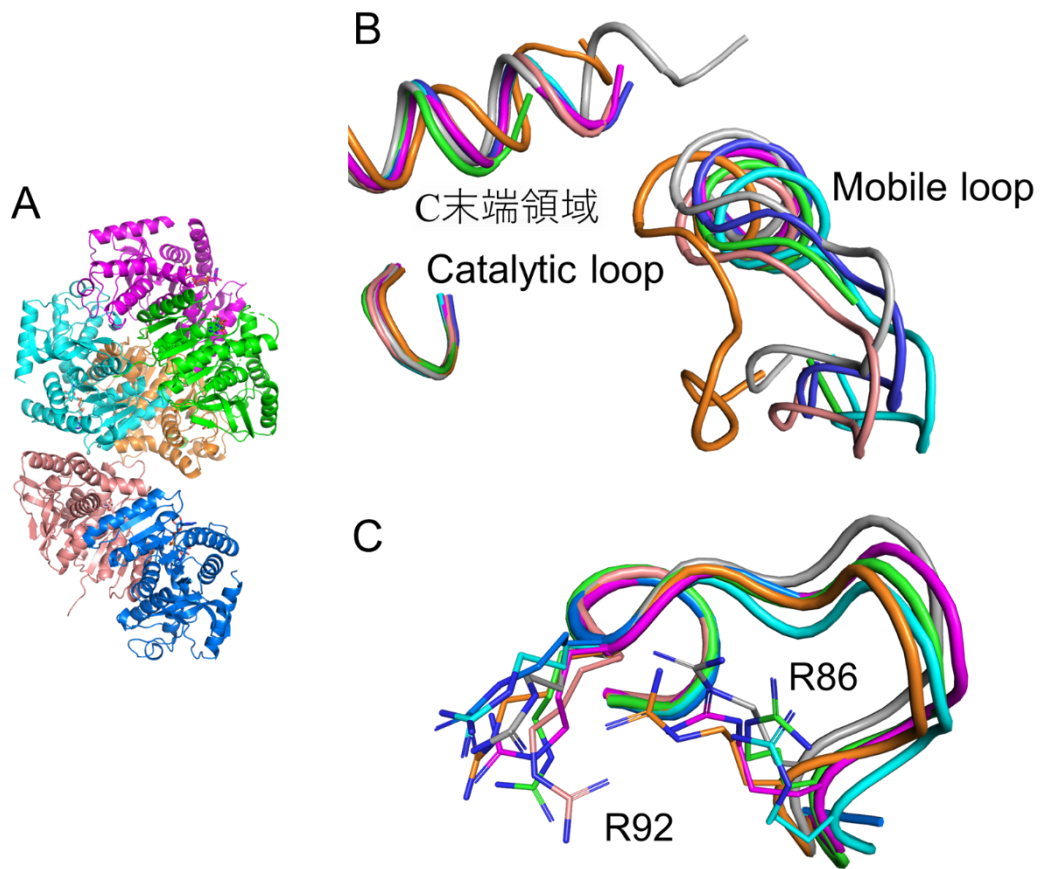


図 5-4. $\Delta E311$ の非対称単位および活性部位構造. $\Delta E311$ の構造は、サブユニットごとに色分けし、野生型の構造はグレーで示した. A. $\Delta E311$ 結晶の非対称単位. 活性部位に結合する NAD^+ は、スティックモデルで示した. B. 野生型および $\Delta E311$ の活性部位の重ね合わせ図. C. 野生型および $\Delta E311$ の可動ループに対する重ね合わせ図. 構造の重ね合わせは、可動ループ領域の RMSD 値が最小になるように実行した. 各可動ループの R86 および R92 は、スティックモデルで示した.

かった. $\Delta E311$ の可動ループは、サブユニット間でコンフォメーションにばらつきがあり、特に chain A では、可動ループが活性部位側へシフトしていた. したがって、C 末端領域とヒンジ領域との相互作用が、可動ループのコンフォメーションの制御に重要であることが示唆された.

野生型 gs-MDH と $\Delta E311$ の各サブユニット間の RMSD 値を図 5-5 に示した. RMSD 値は、可動ループで 1.1~3.3 Å, C 末端領域で 0.4~2.2 Å を示した. また、それらを除いた領域では、RMSD 値がほとんど変化しなかったことから、 $\Delta E311$ 変異は C 末端領域および可動

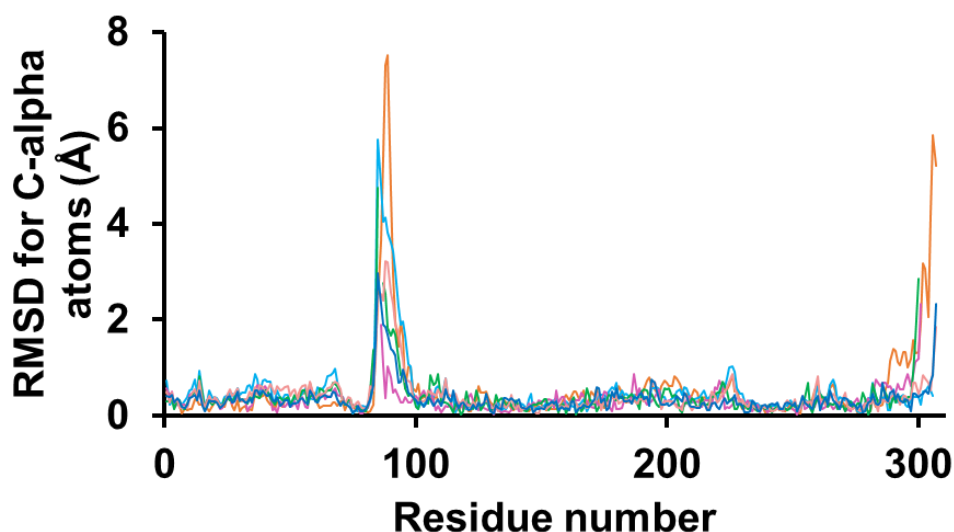


図 5-5. 野生型 gs-MDH および $\Delta E311$ の各サブユニット間の RMSD 値. $\Delta E311$ の chain A, B, C, D, E および F は, それぞれオレンジ, シアン, マゼンタ, グリーン, サーモンおよびブルーで示した.

ループのみにコンフォメーションの変化を与えることが示された. これらの結果は, $\Delta E311$ 変異による可動ループおよび C 末端領域のコンフォメーションの違いが, gs-MDH の基質阻害の低下に寄与することを示唆している. また, $\Delta E311$ の可動ループにおいて, 基質との相互作用に重要なアミノ酸残基 (R86, R92) は, 基質結合やコンフォメーションへの影響が予想される特別な相互作用を形成しておらず, いずれも野生型と比べ配向に顕著な傾向は見られなかった (図 5-4C). したがって, 基質阻害の低下は変異による可動ループ自体のコンフォメーションが寄与していると考えられる.

OAA に対する強い基質阻害は, 種々の MDH で報告されている [2-3]. しかし, MDH の基質阻害機構についてはほとんど解明されていない. 他の酵素における基質阻害機構についての構造的な知見は, *G. kaustophilus* 由来グリシンオキシダーゼ (Gox) やメタゲノムライブラリから発見されたエステラーゼで報告されている. Gox では, 活性部位に触媒反応が可能な反応性グリシン以外に非反応性グリシンも結合した結晶構造が決定され, 広い活性部位空間での過剰な基質の結合による基質阻害機構が推察された [4]. また, エステラーゼ

の結晶構造解析においても、活性部位の広いオキシアニオンホールへの反応生成物の結合による基質阻害が報告された [5].

このように、活性部位空間と基質阻害の関連性についての事例が報告されていることから、 $\Delta E311$ の基質阻害の低下は、可動ループの活性部位側へのシフトによる活性部位空間の変化が寄与した可能性が考えられる。 $\Delta E311$ において、特に C 末端領域および可動ループのコンフォメーションの違いが大きかった chain A では、野生型と比べて顕著な活性部位空間の縮小が観察された (図 5-6) . 以上の結果から、E311 とヒンジ領域との相互作用により制限されていた可動ループの可動域が、変異により活性部位側へ広がり、過剰な基質結合を制限する活性部位空間の調節が可能となったことが、基質阻害が低下した原因の一つとして考えられる.

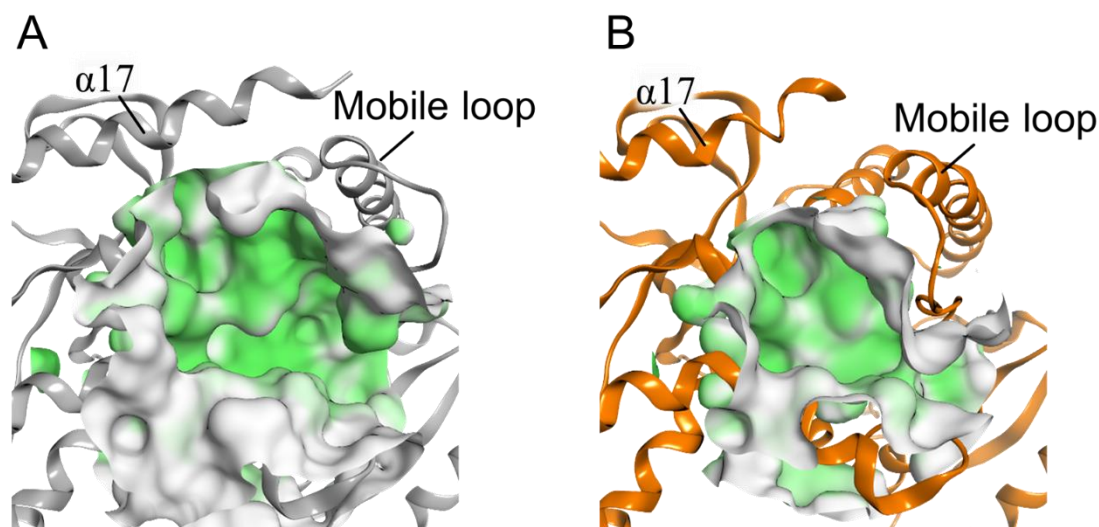


図 5-6. 野生型 (A) および $\Delta E311$ の chain A (B) の分子表面図. 各酵素の主鎖をリボンモデルで示し、タンパク質の基質結合ポケットをグリーンで示した.

5-4 まとめ

第 5 章では、gs-MDH の第二層領域である C 末端領域における機能解析と欠失変異による影響を検討した。*In silico* 解析において、C 末端残基の欠失は活性中心との相互作用数

の増加と可動ループのコンフォメーションのシフトをもたらし、欠失変異による gs-MDH の酵素特性への寄与を示唆した。欠失変異体の速度論解析は、高基質親和性および反応速度の維持と基質阻害の低下による高 OAA 濃度での比活性向上を示した。さらに、欠失変異体は実用的に十分な熱安定性を有していたことから、基質過剰条件においても高比活性を發揮する免疫検査用酵素などへの用途の拡大が期待された。

$\Delta E311$ の結晶構造では C 末端領域の配向の揺らぎと可動ループのコンフォメーションの違いが観察され、C 末端領域が可動ループのコンフォメーション制御に関与することが示唆された。また、 $\Delta E311$ では活性部位側へシフトした可動ループによる狭い活性部位空間が観察され、過剰な基質結合の制限による基質阻害の低下への寄与が推察された。本研究結果は、MDH のコンフォメーション制御における C 末端領域の役割に関する新たな知見であり、基質阻害の構造的な理解への寄与が期待できる。

参考文献

1. Tokuriki, N. *et al.* Diminishing returns and tradeoffs constrain the laboratory optimization of an enzyme. *Nat. Commun.* **3**, Article number: 1257 (2012).
2. Li Gelpi, J., Dordal, A., Montserrat, J., Mazo, A. & Cortes, A. Kinetic studies of the regulation of mitochondrial malate dehydrogenase by citrate. *Biochem. J.* **283**, 289–297 (1992).
3. Ahn, J. H. *et al.* Enhanced succinic acid production by *Mannheimia* employing optimal malate dehydrogenase. *Nat. Commun.* **11**, Article number: 1970 (2020).
4. Shiono, T., Nomura, T., Nishiya, Y. & Arai, R. Crystal structure of glycine oxidase from *Geobacillus kaustophilus*. *Photon Factory Activity Report*, **2014** (32), B (2015).
5. Höppner, A. *et al.* Crystal structures of a novel family IV esterase in free and substrate-bound form. *FEBS J.* **288**, 3570–3584 (2021).

第6章 総括

産業利用酵素は、安定性や高比活性など様々な特性が求められ、PEによる理想的な酵素開発の研究が盛んに行われている。その中でも基質特異性は、酵素全体や活性部位における複雑な相互作用により制御されることから、酵素基質複合体構造を基にした静的解析では、基質認識機構の解明は困難である。本研究では、優れた基質特異性を有し、検査分野において様々な用途に利用されている gs-MDH を対象に、可動ループの構造変化に関連した基質認識機構の解明と反応サイクルを基にした合理的な機能改変を試みた。

第2章では、gs-MDH の種々の結晶化条件の検討により、反応サイクルに対応した4種の構造を決定した。Apo-form の活性部位は、MDH の活性部位に保存されているアミノ酸残基により正電荷ポケットを形成しており、これにより生まれる可動ループと基質結合ポケット間での電荷的な反発は、DC である OAA に対して選択的な構造変化をもたらすことを示唆した。MDH において新規に決定された OAA/open-form と closed-form の比較は、基質結合ではなく、可動ループの構造変化による触媒残基の switching の誘導を明らかにし、構造変化が基質選択に重要な役割を持つことを示唆した。これらの知見は、酵素基質複合体構造の静的解析だけでなく、基質結合から触媒反応に至るまでの動的解析が、基質認識機構の理解において欠かせない要因であることを示している。

第3章では、MDH の近縁酵素であり低基質特異性で知られる LDH との構造比較により、反応サイクルにおける基質認識機構の違いを比較した。LDH の活性部位は、正電荷ポケットを形成せず、電荷による基質選択能力が低いことが示唆された。また、種々の LDH は触媒残基の switching 機構を有しておらず、触媒反応に可動ループの構造変化を必要としないことが明らかになった。さらに、gs-MDH の open 構造において触媒残基との相互作用が示唆された S148 は、その前後の配列も含めて MDH で高度に保存されており、switching の制御への寄与が示唆された。gs-MDH の可動ループに対する変異解析では、活性部位の正電荷の緩和により MC に対する反応性が観察され、正電荷ポケットの基質選択への寄与を示

した。また、gs-MDH と種々の LDH の構造を用いた分子動力学解析は、LDH と比較して gs-MDH の可動ループの低柔軟性を明らかにし、OAA による活性部位の架橋が gs-MDH の構造変化に必要であることを示唆した。以上の結果から、 α -ケト酸構造が結合する活性部位の空間認識も含めた 4 つの要素により gs-MDH が高基質特異性を獲得していることが明らかになった。本研究結果は、高基質特異性を実現する詳細な基質認識機構を明らかにした初めての知見であり、 α -ケト酸デヒドロゲナーゼファミリーだけでなく、様々な酵素の基質認識における基礎的な洞察を与えた。

第 4 章では、gs-MDH の反応サイクルに基づいた合理的な機能改変による、gs-MDH の課題解決と有用性向上を試みた。gs-LDH との closed 構造の比較により、LDH のみに保存性の高い Y 残基が見出され、これに対応する gs-MDH の G218 への変異導入は、closed 構造における可動ループの柔軟性向上と open 構造の保持が期待された。G218 変異体の速度論解析は、野生型と比較して顕著な比活性の向上を示した。また、G218 変異体は野生型と同程度の熱安定性を示し、高比活性と熱安定性を兼ね備えた変異体の開発に成功した。さらに、G218Y の結晶構造は、変異残基による可動ループのねじれたコンフォメーションを示し、嵩高いアミノ酸残基の立体障害による可動ループの柔軟性向上が示唆された。これは分子動力学解析により検証され、G218Y の可動ループは、野生型と比較して closed 構造での高い RMSD 値を示した。以上の結果は、反応サイクルに基づく合理的な機能改変の成功例として、酵素特性の保持と機能向上の両立に向けた新たなデザイン手法を提供する。

第 5 章では、基質や補酵素と直接相互作用せず、酵素機能への影響が少ない第二層領域における機能解析と欠失変異による影響を検討した。gs-MDH の *in silico* 解析は、C 末端残基の欠失による C 末端領域の相互作用数の増加および可動ループのコンフォメーションのシフトを示し、C 末端領域の活性部位環境への寄与を示唆した。欠失変異体の速度論解析は、高基質親和性および反応速度の維持と基質阻害の低下による高 OAA 濃度での比活性向上を示した。さらに、特性評価の結果、欠失変異体は実用的な熱安定性を維持していたこと

から、免疫標識用酵素などへの用途の拡大が期待された。 $\Delta 311$ の結晶構造は C 末端領域の配向の揺らぎと可動ループのコンフォメーションの違いが観察され、C 末端領域が可動ループのコンフォメーション制御に関与することが示唆された。また、 $\Delta E311$ では活性部位側へシフトした可動ループによる狭い活性部位空間が観察され、過剰な基質結合の制限による基質阻害の低下への寄与が推察された。以上の結果は、MDH のコンフォメーション制御における C 末端領域の役割に関する新たな知見であり、基質阻害の構造的な理解への寄与が期待できる。

論文目録

主論文 (査読付き)

原著

1. Yoshiaki Nishiya, Yuya Shimozawa
“Properties of *Geobacillus stearothermophilus* malate dehydrogenase used as a diagnostic reagent and its characterization by molecular modeling”
Int J Anal Bio-Sci, **4**, 21–27 (2016).
博士論文 第 1 章, 第 2 章
2. Yuya Shimozawa, Tomoki Himiyama, Tsutomu Nakamura, and Yoshiaki Nishiya
“Structural analysis and reaction mechanism of malate dehydrogenase from *Geobacillus stearothermophilus*”
J. Biochem, **170**, 97–105 (2021).
博士論文 第 2 章, 第 3 章, 第 4 章, 第 5 章
3. Yuya Shimozawa, Tomoki Himiyama, Tsutomu Nakamura, and Yoshiaki Nishiya
“Increasing loop flexibility affords low-temperature adaptation of a moderate thermophilic malate dehydrogenase from *Geobacillus stearothermophilus*”
Protein Engineering, Design and Selection, **34**, gzab026 (2021).
博士論文 第 4 章
4. 下澤 勇弥, 氷見山 幹基, 中村 努, 西矢 芳昭
“臨床検査用酵素の立体構造的解釈：リンゴ酸デヒドロゲナーゼと乳酸デヒドロゲナーゼの基質特異性の違いについて”
生物試料分析, **44**, 151–159 (2021).
博士論文 第 3 章
5. Yuya Shimozawa, Tsutomu Nakamura, Tomoki Himiyama, and Yoshiaki Nishiya
“Reducing substrate inhibition of malate dehydrogenase from *Geobacillus stearothermophilus* by C-terminal truncation”
Protein Engineering, Design and Selection, submitted.
博士論文 第 5 章

総説

1. Yuya Shimozawa and Yoshiaki Nishiya
“Malate dehydrogenase of *Geobacillus stearothermophilus*: A practically feasible enzyme for clinical and food analysis”
Int J Anal Bio-Sci, **7**, 59–67 (2019).
博士論文 第1章, 第3章

その他の論文 (査読付き)

1. 佐々本 康平, 下澤 勇弥, 北田 広明, 花本 圭史, 清水 太一, 松尾 康光, 西矢 芳昭
“酵素特性を理解するための実験法の開発と高校生物教育への実践”
摂南大学融合科学研究所論文集, 第5巻 (第1号), 87–101 (2019).
2. Misaki Hiruta, Saki Yoshida, Yuya Shimozawa, Yoshiaki Nishiya
“Altered substrate specificities of mandelate oxidases generated by site-directed mutagenesis of L-lactate oxidase”
Int J Anal Bio-Sci, **7**, 35-39 (2019).
3. Yuya Shimozawa, Hiroshi Aiba, Yoshiaki Nishiya
“Structural prediction and analysis of the highly reactive alkaline phosphatase from *Shewanella* sp. T3-3”
Int J Anal Bio-Sci, **8**, 39-43 (2020).
4. Yuya Shimozawa, Saki Yoshida, Kazuya Ikeda, Yuri Kato, Fuka Toyama, Yoshiaki Nishiya
“Easy preparation of a stable membrane-bound lactate dehydrogenase for application in lactate biosensor”
Int J Anal Bio-Sci, **8**, 1-6 (2020).

謝辞

学部学生時代から適切なお助言を頂き、また大学院へ進学してからは指導教員として適切な研究設計から研究発表まで懇切丁寧にご指導いただきました摂南大学大学院理工学研究科 生命科学専攻 西矢芳昭教授に篤く御礼申し上げます。

また、本論文をまとめるにあたり様々なお助言を賜りました、同専攻 尾山廣教授、同専攻 木村朋紀准教授および同専攻 中嶋義隆教授に心より感謝申し上げます。

また、X線結晶構造解析に関する技術指導や論文執筆における多くのお助言を頂いた国立研究開発法人産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 生体分子創生研究グループの中村努様、氷見山幹基様をはじめとしたグループの皆様に心より感謝申し上げます。

また、近畿大学大学院 農学研究科 応用微生物学研究室 加塩健吾様、米田菜織様、長澤壯柄様および特殊環境微生物学研究室の学部生、大学院生、卒業生および友人の皆様には、日々の大学生活の中で様々な発見や学びを頂きました。ご協力ありがとうございました。