

トリプトファン合成酵素

—X線結晶解析と部位特異的変異—

岡山大学自然科学研究科 神崎 浩

トリプトファン合成酵素(EC 4.2.1.20)はトリプトファン合成経路の最終段階、すなわちインドールグリセロ3-リン酸とL-セリンからトリプトファンの合成を触媒するピリドキサール酵素である。原核生物において本酵素は α -サブユニットと β -サブユニットからなる $\alpha_2\beta_2$ 複合体として存在する。これまで大腸菌の酵素について、両サブユニットが別々の反応を触媒する(各々を α 反応、 β 反応、また本来の反応を $\alpha\beta$ -反応と呼ぶ)、各サブユニット単独でも活性を示すが複合体では著しくその触媒能が高められる、反応中間体と考えられるインドールが遊離されずに反応が進行する、などの興味深い知見が既に得られていた。そこで、本酵素についての最近のめざましい進歩について紹介する。

現在タンパク質研究分野においてX線結晶解析による立体構造の解明が盛んに行われており、そのためには良い単結晶の取得が一番の問題とされている。本酵素においては、大腸菌の酵素を用いて結晶化が行われてきたが成功しなかった。ところが大腸菌と近縁であるサルモネラ菌の酵素から単結晶が得られ、2.5 Åの分解能でX線結晶解析に成功した。¹⁾由来の異なる酵素を用いることにより結晶化に成功した例である。

もっとも画期的であったのは両サブユニットの活性中心間に反応中間体と考えられるインドールの通り道“インドールトンネル”が見いだされたことである。このトンネル(チャンネル)の発見により従来推測されてきた反応機構すなわち、 α -反応によって生じたインドールは酵素タンパク質から遊離せず β -反応の基質となるということが裏付けられた。このトンネルの周辺には疎水性のアミノ酸残基が存在し、インドールが通過しやすい構造をとっている。

α -サブユニットは $(\alpha/\beta)_8$ バレル(樽)という特徴的な構造をとっており、¹⁾この構造をとる酵素は今までに11種知られているが、トリプトファンの生合成に関する大腸菌のフォスフォリボンアントラニル酸イソメラーゼ：インドールグリセロールリン酸合成酵素複合体の両サブユニットがこれに含まれているというのは興味深い。また α -反応の基質アナログであるインドールプロパンオールリン酸存在下での差電子密度図から α -サブユニット活性部位の詳細な構造が判明した。これまで大腸菌酵素で取得されていた不活性なミスセンス突然変異体(8残基)の変異残基はすべて活性部位に存在し、反応機構は“push-pull”型一般酸塩基触媒反応でありAsp60, Glu49が触媒残基である。Glu49については、不活性型変異酵素がいくつか知られていた上に、現在ではArgを除く19種の酵素が得られており、変異酵素はすべて不活性である。²⁾ Asp60についても部位特異的変異法により4種の変異酵素が得られGlu以外は不活性で、Glu60は野生型の15%の活性を示す。³⁾ Asp60がフレキシブルなループ上に存在し、基質への距離を調節できるため、Gluのカルボキシル基でも活性が発現すると考えられ、疎水部位に埋め込まれたGlu49が他のアミノ酸残基の置換を許さないと対照的である。

Tyr175, Gly211についても大腸菌酵素で変異酵素が得られており1残基のみの変異ではまったく活性がないのに対し、ある二重変異酵素(Tyr175 → Cys Gly211 → Glu)では活性が復活することが知られていた。⁴⁾サルモネラ菌の酵素についてもまったく同様の結果が得られており、これらの結果はX線解析データとコンピュータグラフィックスにより、TyrとGlyの占めていた基質の結合に必要な空間が二重変異によってうまく復元されたためと判明した。³⁾これは旧来の分子遺伝学で見いだしてきた現象を直接証明した一例である。

一方、 β -サブユニットにはN-ドメイン、C-ドメインの2つのドメインが観察され、それら2つのドメインにはさまれるように活性中心、インドールトンネルが存在する。¹⁾両ドメインの中心部の構造は非常によく似ておらず立体的に重ね合わせることができる。現在のところ、基質アナログ存在下でのX線結晶解析がなされていないため基質結合部位の詳細はわかっていないが、補酵素ピリドキサールリン酸周辺のアミノ酸残基についてアミノ酸置換により研究が進められている。Lys87はシップ塩基形成に関与するだけでなく、これまでHis86の機能と考えられてきた基質L-セリンの α -プロトンの引き抜きを触媒することが判明した。⁵⁾さらにGlu350, Glu109についてその酵素触媒機能における役割が検討されている。

本酵素は、3次元構造が判明し、それにより部位特異的変異の解析が急速に進歩した好例であり、さらに α -、 β -両反応の反応機構、中間体のChanneling、両サブユニットの結合、タンパク質の折りたたみ等の研究がさらに進むものと期待される。

- 1) Hyde, C. C. et al.: *J. Biol. Chem.*, **263**, 17857 (1988).
- 2) Yutani, K. et al.: *J. Biol. Chem.*, **262**, 13429 (1987).
- 3) Nagata, S. et al.: *J. Biol. Chem.*, **264**, 6288 (1989).
- 4) Yanofsky, C.: *Harvey lect.*, **61**, 145 (1967).
- 5) Miles, E. W. et al.: *J. Biol. Chem.*, **264**, 6280 (1989).