

ジヒドロネオプテリン・アルドラーゼの結晶構造

Crystal Structure of Dihydroneopterin Aldolase from *Thermus thermophilus* HB8久野玉雄¹, 中村光裕¹, 瀧尾擴士¹, 佐藤伸哉¹, 三木邦夫^{1,2}Tamao Hisano¹, Mitsuhiro Nakamura¹, Koji Takio¹, Shinya Sato¹, Kunio Miki^{1,2}(¹理研播磨, ²京大院理)(¹RIKEN Harima Inst.; ²Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

e-mail: hisano@riken.jp

葉酸やその誘導体はプリン、ピリミジン、アミノ酸の生合成に必須であり、生命の維持に欠かせない。高等動物では食物摂取により直接葉酸類を補給し、能動的輸送系を介して細胞内に取り込むことができる。一方、微生物はそのような輸送系を持っておらず、GTP から新生合成する。その生合成経路の酵素は抗菌剤開発のターゲットとして注目されている。テトラヒドロ葉酸の生合成において、ジヒドロネオプテリン・アルドラーゼは4番目の反応ステップの酵素として働く。本酵素は7,8-ジヒドロネオプテリン (DHN) を6-ヒドロキシメチル-7,8-ジヒドロプテリン (HHP)とグリコールアルデヒドに変換する。これまで生成物との複合体の結晶構造が報告され、反応機構が提唱されている。しかし、そのモデルでは基質そのものの結合様式は明らかではなく、基質のトリオール部分が切断される機構は不明である。我々は *Thermus thermophilus* HB8 由来の酵素について、基質認識機構および反応機構を明らかにするために、基質およびその類似体を用いてそれらとの複合体の結晶構造解析を行い、LC/MS によって生成物の検討を行った。

本酵素は8量体を形成する。活性部位は隣り合う2つのサブユニットの間に位置する。基質が結合していない状態では活性部位近傍に位置する Arg-44 から Ala-53 の領域の構造に揺らぎが見られた。特に Tyr-51 の側鎖では C α -C β 結合の二面角が大きく変化した2つの構造に対応する電子密度が得られた。このことから、基質非結合状態ではオープン構造とクローズド構造の間でのダイナミックな揺らぎが常に起こっていると考えられる。DHNをソーキングした結晶の構造解析では生成物HHPが活性部位に結合した構造が得られた。活性部位周辺の構造の揺らぎは見られず、生成物の結合によりクローズド構造が安定化されたと考えられる。一方、基質類似体である5,6,7,8-テトラヒドロネオプテリン (THN) との複合体では活性部位への入り口近傍にある Gly-13-Ala-26 の領域で大きな構造変化が見られた。LC/MS 解析の結果、THNは酵素の作用を受けないが、THNが徐々に酸化されてDHNと変化することによって酵素の作用を受け、HHPに変換されることが判った。複合体結晶の調製では酸化されていないTHNを捉えることに成功し、得られたTHN複合体構造は反応前の基質結合状態をmimicすると考えられる。THNのC9水酸基はGlu-20と水素結合しているが、HHP結合状態では対応する水酸基はGlu-21と水素結合している。またVal-17周辺のループはトリオール部分と立体障害を起こさないようにコンフォメーション変化している。これらのことから、触媒反応過程では、オープン構造の酵素にDHNが結合すると、Gly-13-Ala-26領域の構造変化によってトリオール部分がC6-C9結合を軸に回転し、C10水酸基が触媒残基Lys-197と相互作用するようになると考えられる。また、この回転によりC9水酸基がN5と水素結合し、プロトンを供与出来るようになると思われる。7,8-ジヒドロビオプテリン (DHB) との複合体でもTHNの場合と同様の構造変化が見られた。DHBのメチルジオール部分はTHNのトリオール部分と同じ方向を向いて酵素に結合していた。しかし、DHBが酵素作用を受けないことはLC/MSによって確認された。メチルジオール部分が回転してもLys-197と適切な相互作用をすることが出来ないため、酵素作用を受けないと考えられる。