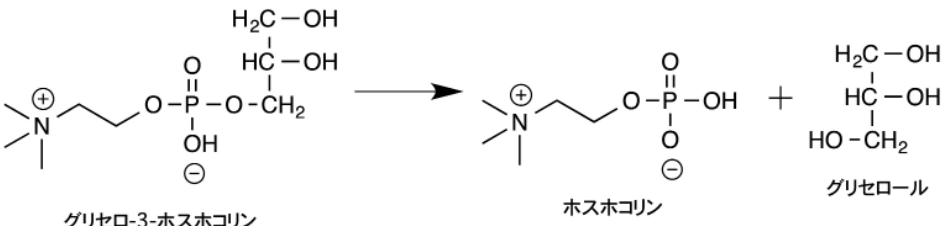
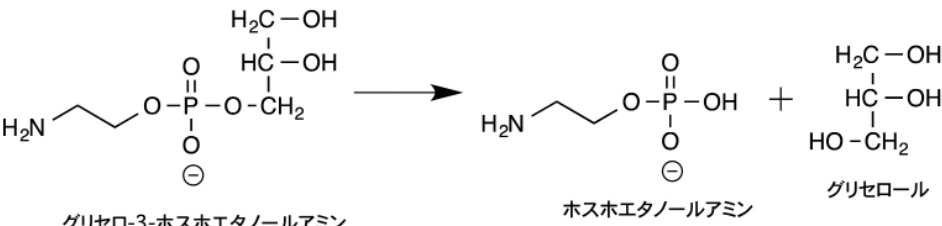


研究代表者	所属・職名 共生システム理工学類・教授 氏名 杉森大助
研究課題	グリセリン酸代謝酵素の反応メカニズムの解明 Elucidation of reaction mechanism of enzyme involved in glycerophosphate metabolism
成果の概要	<p>昨年度、申請者の研究室では、図1、2に示す反応を行うことができる2種類の酵素（GPE型とGPC型）を世界で初めて発見した。</p> <div style="text-align: center;">  <p>図1. GPC型酵素の酵素反応</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>図2. GPE型酵素の酵素反応</p> </div> <p>本年度奨励的研究資金の提供を受け、これら酵素の触媒反応メカニズムを解明するために、両酵素の組換え大量発現、酵素の結晶化条件の検討、酵素反応阻害剤や結合金属イオンの種類と数、酵素の物理化学的解析などを実施した。</p> <p>まず、両酵素を遺伝子組換え技術で大量に合成し、簡便に純度の高い酵素を調製する方法を確立することに成功した。具体的には、GPC型酵素については放線菌／大腸菌シャトルベクターを利用して構成型プロモーターであるPLDプロモーターの下流に本酵素のTat系分泌シグナル、本酵素遺伝子を連結し、その下流にPLDターミネーターを配置した組換え発現ベクターを作製した。これを用いて、放線菌を形質転換させることにより、著量のGPC型酵素を分泌生産させることに成功した。これにより、これまで7工程必要であった精製工程を3工程まで短縮することができた。一方、GPE型酵素については誘導型プロモーターを持つ大腸菌用発現ベクターのマルチクローニングサイトに自身のTat系分泌シグナルを含む本酵素遺伝子を挿入することで組換え発現ベクターを作製した。これを用いて、大腸菌を形質転換させることにより、著量のGPE型酵素を菌体内生産させること成功した。これにより、これまで7工程必要であった精製工程を3工程まで短縮することができた。</p> <p>次に、コンピューターを用いて酵素分子の形状（立体構造）を予測した。その結果、GPC型酵素およびGPE型酵素の立体構造は、野兔病菌 <i>Francisella tularensis</i> 由来酸性ホスファターゼ（AcpA）の構造に類似していることがわかった（図3）。一方、触媒作用が行われると予想される酵素の活性中心を構成するアミノ酸残基は、3者間で極めて良く似て</p>

成果の概要

いることがわかった。唯一明らかに異なる点は、AcpA では175番目のセリンが触媒作用を担っているのに対して、GPC型酵素およびGPE型酵素ではセリンに良く似たスレオニンに置換されている点であった。これら3者は、互いに作用する反応物（基質）が全く異なる。この違いが何に起因するのか解明するためには、GPC型酵素およびGPE型酵素のX線結晶構造解析とともに今後詳細な研究を進める必要がある。そこでX線結晶構造解析をするために両酵素の結晶化条件を調べた。その結果、それぞれ良質な結晶が形成される可能性がある条件を見出した。

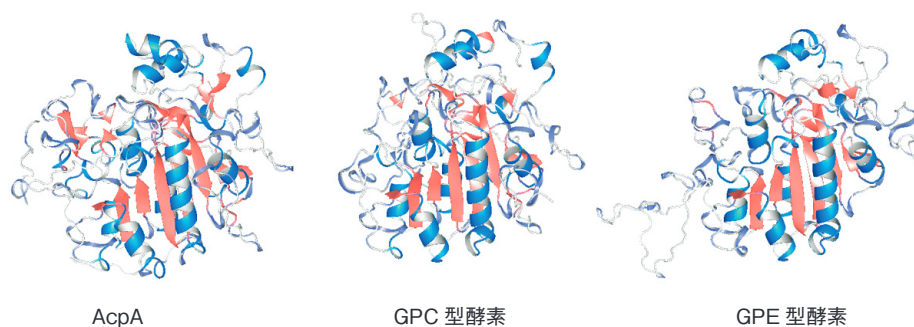
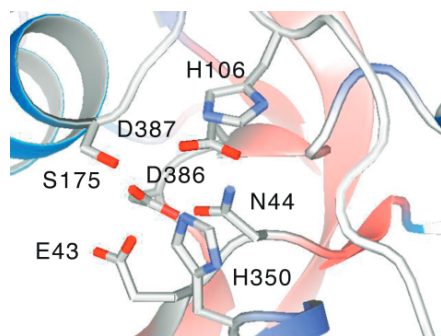


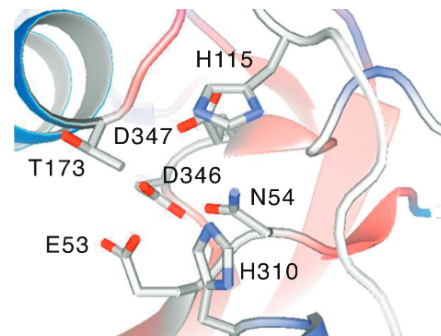
図3. GPC型酵素およびGPE型酵素の立体構造予測の結果

注：酸性ホスファターゼ（AcpA）の立体構造をテンプレートとして用いて構造予測した。

(A) AcpA



(B) GPC型酵素



(C) GPE型酵素

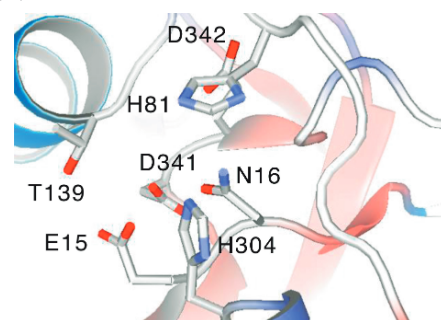


図4. GPC型酵素およびGPE型酵素の触媒中心の構造予測

ICP-MS 分析した結果、GPC型酵素は1分子中に1つのカルシウムイオンを保持していることがわかった。GPC型酵素は類似化合物であるコリン、カルバミコリンによって競争阻害を受けることが明らかになった。この結果より、酵素-基質類似化合物複合体の共結晶を作成できる可能性があることがわかった。共結晶を構造解析できれば、基質と酵素分子の結合の様子を高精度で推定可能になる。

成果の概要

GPC型酵素に関して物理化学的解析を行った結果、酵素と基質分子の結合のしやすさ（ K_m 値）は1.41mMで、特段親和性が高いというわけではなかった。また、ターンオーバー数は $29s^{-1}$ （酵素1分子が1秒間に29分子の基質分子を分解）であり、加水分解酵素としては処理能力が低い部類であることが明らかになった。今後さらに、基質認識メカニズムの解明を行い、触媒機序解明を目指す予定である。

なお本研究によって、以下の成果を得た。

査読付き論文

- 1) Daisuke Sugimoriほか, Purification, characterization, molecular cloning, and extra-cellular production of a novel bacterial glycerophosphocholine cholinephosphodiesterase from *Streptomyces sanglieri*, J. Biosci. Biotechnol., 117 (4), 422–430 (2014).

国際会議

- 1) Purification, characterization, and gene cloning of glycerophosphoethanolamine ethanolaminephosphodiesterase from *Streptomyces sanglieri* A14, Shingo Mineta and Daisuke Sugimori, Enzyme Engineering XXII, September 24, 2013 (Toyama, Japan).
- 2) A novel glycerophosphocholine cholinephosphodiesterase from *Streptomyces sanglieri*, Koki Okuda, Junki Ogasawara, and Daisuke Sugimori, Enzyme Engineering XXII, September 24, 2013 (Toyama, Japan).

国内学会発表 8件

国際会議依頼講演

- 1) A novel glycerophosphocholine cholinephosphodiesterase and glycerophosphoethanolamine ethanolaminephosphodiesterase from *Streptomyces sanglieri*, Daisuke Sugimori, Koki Okuda, Shingo Mineta, and Kazutaka Murayama, 2014 AOCs annual meeting (23rd Annual Biocatalysis Symposium), May 7, 2014 (San Antonio, TX).

共同研究費

- 1) 平成25年度、旭化成ファーマ株式会社、リン脂質測定に使用する酵素のスクリーニング、240万円