

人工 FAD を用いた D-アミノ酸酸化酵素の
酵素・基質複合体の構造解析
Structural Investigation on the ES Complex of D-amino Acid Oxidase
By using Artificial FAD

宮原 郁子^a, 瀬戸山 千秋^b, 二科 安三^b
Ikuko Miyahara^a, Chiaki Setoyama^b, Yasuzo Nishina^b

^a大阪市立大学, ^b熊本大学
^aOsaka City University, ^bKumamoto University

補酵素 FAD の 8 位のメチル基を NHCH₃ に置換した HM-FAD を D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) に再構成させた酵素は、酸化力が低下し反応が進行しないため、DAO の基質 D-アミノ酸と安定な複合体を形成することができる。そこで HM-FAD を再構成した DAO と基質 D-アミノ酸との複合体結晶構造を得ようと試みたが、基質が活性部位に固定された構造を得ることが出来なかった。

キーワード： D-アミノ酸酸化酵素、ES 複合体

背景と研究目的：

D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) は、FAD を補酵素とするフラビン酵素であり、D-アミノ酸を酸化して α -イミノ酸にする反応を触媒する。DAO は生体内では、脳内に比較的高濃度に存在し、神経伝達物質として作用する D-セリンの代謝を介し、神経伝達の調節に関与することが指摘されている。我々はこれまでに、DAO と Benzoate 複合体結晶を作成した後、その結晶に D-アミノ酸アナログとしての *o*-amino-benzoate をソーキングして得られた結果 [1]や、D-プロリンをソーキングして反応させることでイミノ酸プロリンを結合した構造[2]を得ることにより、DAO の反応機構を提唱した。今回、FAD の 8 位を N-メチル基で置換し、酸化力が低下した人工 FAD を用いることで、基質が結合しても反応が進行しない酵素・基質 (ES) 複合体の立体構造を得ることを試みた。また、ソーキングする D-アミノ酸としては D-セリンの他、溶液中で混合すると吸光度変化がみられるため、蛋白質に結合すると予測される (未発表) D-ロイシンと D-バリンを用いることとした。

実験：

8 位のメチル基を N-メチル基で置換したリボフラビンは前大阪市大の笠井氏より提供された[3]。置換リボフラビンを FAD 合成酵素により FAD 型にし、C18 の HPLC カラムを用いて精製した。ブタ腎臓由来の D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) は、大腸菌で大量発現したのち既報の通り精製を行い、2 M KBr を含む緩衝液 (100 mM Na-ピロリン酸, pH 8.3) での透析により FAD をはずした後、KBr を含まない緩衝液で透析してから、人工 FAD を加えることで再構成した。再構成した DAO を用いて、野生型酵素と同様に Benzoate と共結晶化すること [1]により、X線構造解析に適した結晶が得られた。Benzoate を含まない沈殿剤溶液 (200 mM Na-Acetate, 100 mM Na-citrate, 30 % (w/v) PEG4000) で結晶を洗った後、10 mM の D-ロイシン、D-セリン、D-バリンをそれぞれ沈殿剤溶液に加えたものに 12 時間漬けることにより、基質アミノ酸のソーキングを試みた。ソーキング後の結晶は、そのままループですくい -180°C の条件下で BL38B1 にてデータ収集を行った。位相決定は、既に構造が分かっている野生型 DAO (PDB ID; 1VE9) の Benzoate 複合体構造をモデル構造とした分子置換法により決定し、全てのデータについて構造解析を行った。また、構造解析の結果、Benzoate が活性中心に残っていた場合には、さらに濃度をあげ、ソーキング時間を長くするなどの検討をおこない、再測定をした。それぞれの基質について複数のデータを収集したが、最も分解能が良かったものについて表 1 に纏めた。

表 1. 回折データおよび精密化の統計値

soaking	D-ロイシン	D-セリン	D-バリン
soaking 濃度と時間	10 mM, 12h	100 mM, 2days	10 mM 2days
格子定数(a,b,c)	71.93, 90.36, 108.31	70.41, 91.96, 109.44	70.72, 91.70, 108.79
分解能 (\AA)	50.0-2.10(2.18-2.10)	50.0-2.10(2.18-2.10)	50.0-2.0(2.07-2.0)
redundancy	5.4(5.5)	5.4(5.5)	5.7(5.6)
completeness(%)	99.7(100.0)	99.8(100.0)	96.0(98.3)
$I/\sigma(I)$	46.0(5.88)	43.79(9.78)	42.23(6.4)
R_{merge} (%)	6.3(27.7)	12.2(24.2)	7.3(24.1)
R_{factor} (%)	21.1	23.1	23.5
R_{free} (%)	25.9	29.1	28.5

結果および考察：

D-ロイシンをソーキングした複合体については、活性部位には Benzoate でないと思われる電子密度が見られたため、D-ロイシンを合わせてモデルを構築し精密化を行った（図 1）しかし、精密化の結果、D-ロイシンの平均温度因子は 70 \AA^2 となり、この値は、結晶全体の平均温度因子 45 \AA^2 や、人工 FAD の平均温度因子 40 \AA^2 対して高く、活性部位に固定されていないことが明らかとなった。DAO と Benzoate 複合体構造 (PDB ID; 1VE9) の場合には、Benzoate はループ構造が活性部位を閉じるように存在しているのに対し、今回得られた構造ではこのループ部分にあたる電子密度が見えていない。すなわち、D-ロイシンは活性部位に結合してもループが閉じず、揺らいでいるということが分かった。

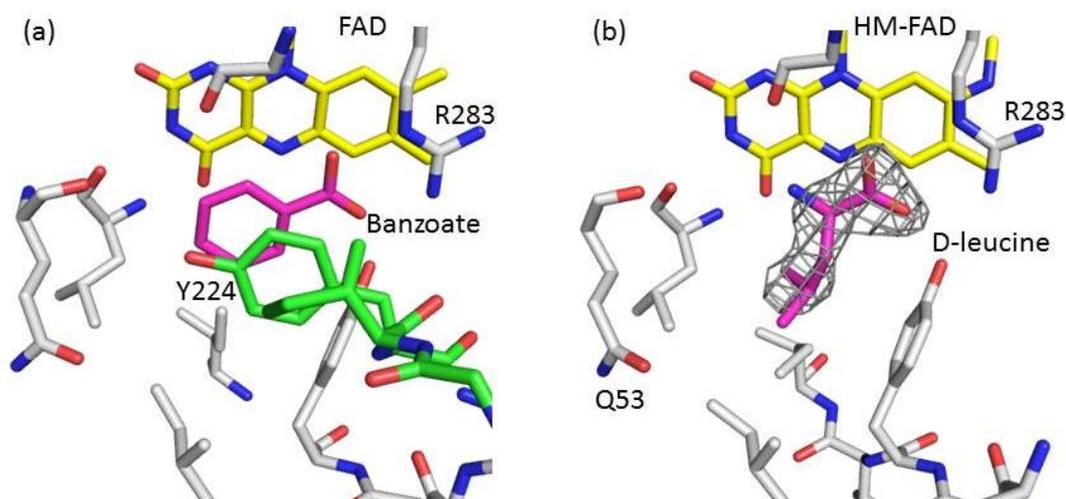


図 1. 野生型 Benzoate 複合体 (a) と人工 FAD 再構成型 D-ロイシン複合体 (b) の活性部位
Benzoate 複合体では Y224 を含むループ（緑）が活性部位を閉じるように存在している。

(b) には D-ロイシンに相当する $2F_o - F_c$ マップ (2σ) を描いている。

D-バリンと D-セリンについては、ソーキングする濃度や時間を変化させ、複数のデータ収集を行ったが、アミノ酸の結合サイトには Benzoate の電子密度が見えるか、あるいはまったく電子密度が無い構造しか得られなかった。両者とも野生型酵素の基質であるので、酸化力が下がっていても大過剰に D-アミノ酸を加えれば結合するのではないかと想定し実験を行ったが、結合したのち代謝されてしまったか、結合するために必要な構造変化が結晶中では出来なかったと考えられる。

今後の課題：

今回利用した結晶化条件で析出した結晶では、基質濃度やソーキング時間を調整することでは ES 複合体を得ることが難しいことが明らかとなった。人工 FAD で再構成した DAO を用いて、ソーキング法により ES 複合体構造を得ようとするならば、Benzoate を含まない、新たな結晶化条件を探索する必要がある。

参考文献：

- [1] H. Mizutani et al, *J. Biochem.*, **122**, 825 (1997).
- [2] H. Mizutani et al, *J. Biochem.*, **128**, 73 (2000).
- [3] S. Kasai et al., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **24**, 201 (1978).

©JASRI

(Received: September 11, 2018; Early edition: November 28, 2018;
Accepted: December 17, 2018; Published: January 25, 2019)