

## ピリドキサル5'-リン酸合成酵素の立体構造と反応

アーキア, カビ, 酵母, マラリア原虫などに存在するビタミンB<sub>6</sub>デノボ合成経路は, ピリドキシン5'-リン酸を最初の生成物とし, 大腸菌などの真正細菌に主として存在する経路(生合成経路II)とは異なり, 補酵素型であるピリドキサル5'-リン酸(PLP)を最初の生成物とする経路(生合成経路I)である. このPLPを生成する反応はPLP合成酵素によって触媒される. この反応は図1に示すようにリブ로스-5-リン酸(あるいはリボース-5-リン酸)とジヒドロキシアセトンリン酸(あるいはグリセルアルデヒド-3-リン酸)とグルタミンの3種の化合物を基質とする<sup>1)</sup>. 本反応は, これらの化合物が縮合されてピリジン誘導体であるPLPを生成するという非常に複雑な反応であり, その反応機構が興味深いだけでなく, これまで想定されてきたPLPデノボ合成経路の生理・生化学的意義を再考させる点でも非常に興味深い.

最近, このPLP合成酵素の立体構造が明らかにされたので紹介する. 本酵素は異なる遺伝子によってコードされる2種の酵素サブユニットの複合体である. このうち最初に立体構造が報告されたのはPDXT, PDX2, YaaE, SNO, SNZBなどと, 本酵素を持つ生物種によって様々に命名されてきたグルタミンナーゼ活性を示すグルタミンナーゼサブユニットである. Bauer<sup>2)</sup>らによって, *Bacillus subtilis*由来のYaaEについて決定された. ついで, 合成反応部分

を触媒する合成サブユニットの立体構造がZhu<sup>3)</sup>らによって報告された. 本サブユニットは, PDXS, PDX1, YaaD, SNZ, SOR1などと命名されてきたタンパク質である. 本トピックスでは, *Geobacillus stearothermophilus*由来の合成サブユニットの立体構造を主として紹介する. 最後に, 予想された2種のサブユニットの複合体の構造についてもふれる.

合成サブユニットのモノマーは図2に示すように, ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>バレル構造を基本とした構造をしている. このバレルは, 図中で $\beta 1 \sim \beta 8$ と示されている8本の平行に並んだ $\beta$ 鎖と, 同じく $\alpha 1 \sim \alpha 8$ と記されている8本の $\alpha$ 鎖で構成されている. 8本の $\beta$ 鎖を表している矢印の先端が紙面の上方向に向かって突き出ており, これらの先端部分が活性中心を構成している. この部分に, 基質そのものではないが構造の類似したメチルペンタンジオールが結合している様子を見ることができる.  $\beta 1$ と $\beta 8$ と記されている文字の中間に見られるスティックモデルがそれである. この先端近傍の活性中心部分に, ペントース-5-リン酸のペントース部分が結合すると考えられる. また, その右横 $\alpha 8'$ と記されている文字の下にみられるのは硫酸イオンであり, この部分は, 本来, ペントース-5-リン酸のリン酸基が結合する部分であると考えられる. また, ポリペプチド鎖上の五箇所のアミノ酸残基が球状に示さ

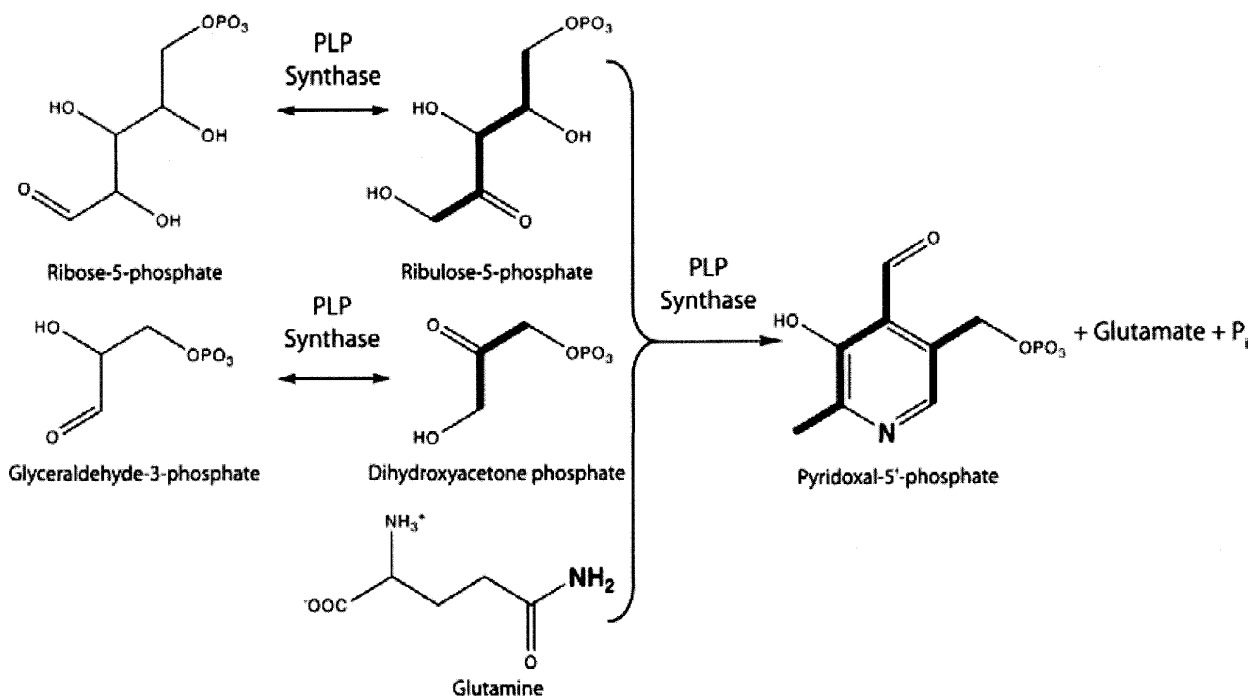


図1. PLP合成酵素の反応<sup>3)</sup>

れている。これらの部分も、バレルの上端の活性中心近傍にあり、これらのアミノ酸残基に変異を起こした酵素をもつ菌株はビタミン B<sub>6</sub> 要求性となる。合成サブユニットは、このバレル構造に加えて、 $\alpha 6'$  と  $\alpha 6''$  の 2 つの突出とバレルの横に存在する  $\alpha 8'$  とバレルの上部に存在する  $\alpha 8''$  のポリペプチド鎖を持つ。

合成サブユニットの 4 次構造を図 3 に示した。結晶状

態で、12 量体となっている。6 量体が 2 つ重なって円筒(シリンダー)形(高さ 90 Å, 直径 110 Å)をしている。各々のサブユニットの占める厚みを直線で示している。各々の 6 量体は、構成するモノマーの活性中心がすべてシリンダーの内側に向き、かつ 25 度上側に傾斜するように配置している。図 3 で示している 6 つの楕円形は、各々のモノマーの  $(\beta/\alpha)_8$  バレル構造を示している。したがって、

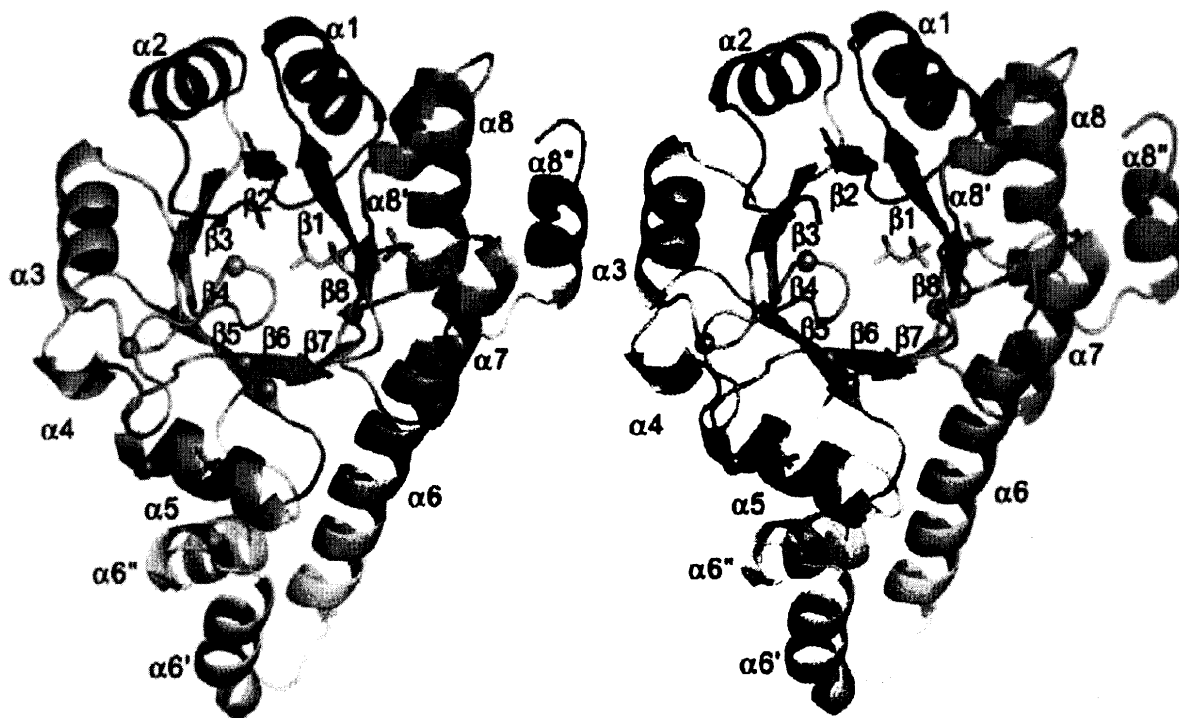


図 2. PLP 合成酵素合成サブユニットのモノマーの立体構造<sup>3)</sup>

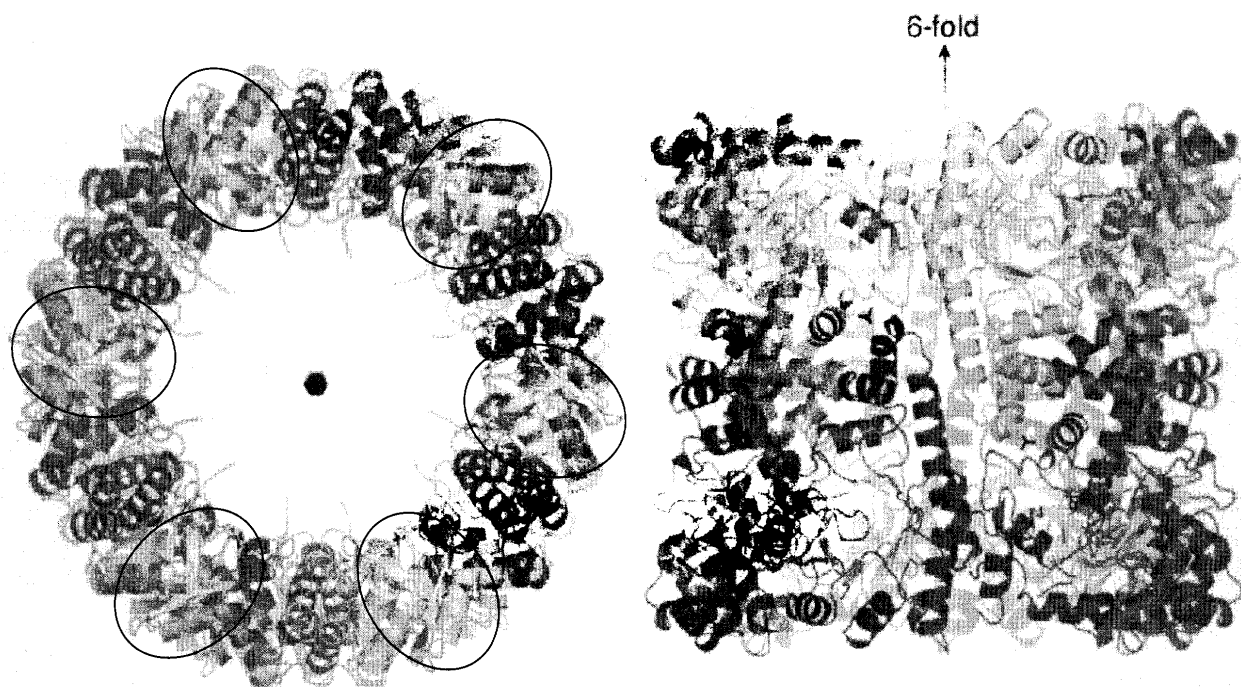


図 3. PLP 合成酵素合成サブユニットの 4 次構造<sup>3)</sup>

このシリンダーの上部と下部の両側に各々のモノマーの活性中心が配置されている。

結晶化した状態ではこのような12量体となっているが、可溶化した状態では6量体と12量体が平衡状態で存在していることがわかった。酵素溶液に硫酸イオンとリン酸イオンを添加すると、12量体の割合が増大した。生理的条件下で、どちらの形で存在しているかは不明である。

合成サブユニットとグルタミナーゼサブユニットはどのような複合体を作っているのだろうか。現在のところ、両サブユニットの複合体の結晶を用いて構造解析されてはいないが、かなり高い確率で予想される構造が提唱されている。合成サブユニットの6量体の活性中心に向き合うようにグルタミナーゼサブユニットが配置しているというものである。もちろん、グルタミナーゼサブユニットも6量体で構成されており、グルタミナーゼサブユニットのモノマーの各々が、合成酵素の各々のモノマーと活性中心を向け合う形で配置している。この構造はPLP合成酵素と類似の反応を触媒するその他の酵素(グルタミンアミドトランスフェラーゼ)には見られない非常に特徴的なものである。一般的に、グルタミンアミドトランスフェラーゼによって触媒される反応では、グルタミンの加水分解によって生じたアンモニアはシリンダーの内部をチャンネルされて、合成反応のために輸送される。しかしながら、PLP合成酵素ではこのシリンダー内部を使ってチャンネルされることなく、合成サブユニットにアンモニアが利用されているようである。本菌由来の酵素だけではなく、今までに(推定)一次構造の解明された各種生物中のPLP合成酵素は非常に共通した構造をとっており、この特徴的な立体構造とアンモニアの利用の様式は、全ての生物由来の本酵素で、共通していると思われる。予想された複合体の構造を確認することと、詳細な反応機構の解明が望まれる。それらの成果は新しい治療薬の開発に大きく寄与することが期待される<sup>4)</sup>。

なお、YaaEとYaaDは*B. subtilis*由来の酵素タンパク質であり、これらがPLP合成酵素活性を有していること

はSakai等<sup>5)</sup>により示され、グルタミンのアミド窒素がビタミンB<sub>6</sub>に取り込まれることはTazuya等<sup>6)</sup>により、さらに*S. cerevisiae*のSNO1とSNZ1が複合体をつくり、グルタミンアミドトランスフェラーゼとなっていることはDong等<sup>7)</sup>によって明らかにされており、わが国の研究者がこの分野で貴重な貢献をしていることを指摘しておきたい。また、ビタミンB<sub>6</sub>の合成についての総説<sup>8)</sup>が最近報告されているので参考にされたい。

(高知大学農学部 八木 年晴)

## 文 献

- 1) Burns, K.E., Xiang, Y., Kinsland, C.L., McLafferty, F.W., Begley, T.P. (2005) Reconstitution and biochemical characterization of a new pyridoxal-5'-phosphate biosynthetic pathway. *J Am Chem Soc* **127**, 3682-3683
- 2) Bauer, J.A., Bennett, E.M., Begley, T.P., Ealick, S.E. (2004) Three-dimensional Structure of YaaE from *Bacillus subtilis*, a Glutaminase Implicated in Pyridoxal-5'-phosphate Biosynthesis. *J Biol Chem* **279**, 2704-2711
- 3) Zhu, J., Burgner, J.W., Harms, E., Belitsky, B.R., Smith, J.L. (2005) A new arrangement of ( $\beta/\alpha$ ) 8 barrels in the synthase subunit of PLP synthase. *J Biol Chem* **280**, 27914-27923
- 4) Wrenger, C., Eschbach, M.-L., Muller, I.B., Warnecke, D., Walter, R.D. (2005) Analysis of the vitamin B<sub>6</sub> biosynthesis pathway in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, **280**, 5242-5248
- 5) Sakai, A., Kita, M., Katsuragi, T., Tani, Y. (2002) serC is involved in vitamin B<sub>6</sub> biosynthesis in *Escherichia coli* but not in *Bacillus subtilis*. *J Biosci Bioenz*, **93**, 309-312
- 6) Tazuya, K., Adachi, Y., Masuda, K., Yamada, K., Kumaoka, H. (1995) Origin of the nitrogen atom of pyridoxine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, **1244**, 113-116
- 7) Dong, Y.-X., Sueda, S., Nikawa, J.-I., Kondo, H. (2004) Characterization of the products of the genes SNO1 and SNZ1 involved in pyridoxine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, **271**, 745-752
- 8) Sakai, A., Kita, M., Tani, Y. (2004) Recent progress of vitamin B<sub>6</sub> biosynthesis. *J Nutr Sci Vitaminol* **50**, 69-77