

トピックス

最初に合成されるのはピリドキサール 5'- リン酸だった

ビタミン B₆のデノボ生合成系は大腸菌やその他の比較的少数の細菌に存在するII型と、多くの真正細菌・真核生物・古細菌に存在するI型の2種類がある。II型の生合成系では、1-デオキシ-D-キシロース-5-リン酸と4-ヒドロキシ-L-トレオニンからピリドキシン5'-リン酸が最初に合成される。しかし、I型の経路に関しては、Tanaka等¹⁾によって、グルタミンのアミド窒素が利用されること、また、Spenserの研究グループによって、始めに合成されるビタミンB₆化合物はピリドキサールであることが提唱されていた²⁾ものの、ピリジン環を作るのに用いられる5炭素基質と3炭素基質は特定されておらず、最初に合成されるビタミンB₆化合物の種類についても、はつきりとした情報が得られていなかった。今回、コネル大学のBurns等³⁾が、初めて、I型の生合成系で、図に

示したようなリブロース-5-リン酸とグリセルアルデヒド-3-リン酸およびグルタミンからピリドキサール5'-リン酸(PLP)が最初に合成されることを明らかにした。

I型の生合成経路に関する研究は、最近、活発に行われており、本経路において必須の遺伝子として、SNZとSNOファミリーの遺伝子が酵母とカビで同定されている⁴⁾。また、酵母では、リボース-5-リン酸イソメラーゼも必要とされることが示されている⁵⁾。枯草菌でもyaaDとyaaEと呼ばれている、各々、SNZとSNOに相同な遺伝子産物が必須であることが明らかとなっている⁶⁾。しかしながら、これらの酵素の基質は特定されておらず、また、触媒する反応の様式に関する不明であった。

Burns等は枯草菌、*Bacillus subtilis*のYaaDタンパク質とYaaEタンパク質を発現させ、各々を均一に精製した。

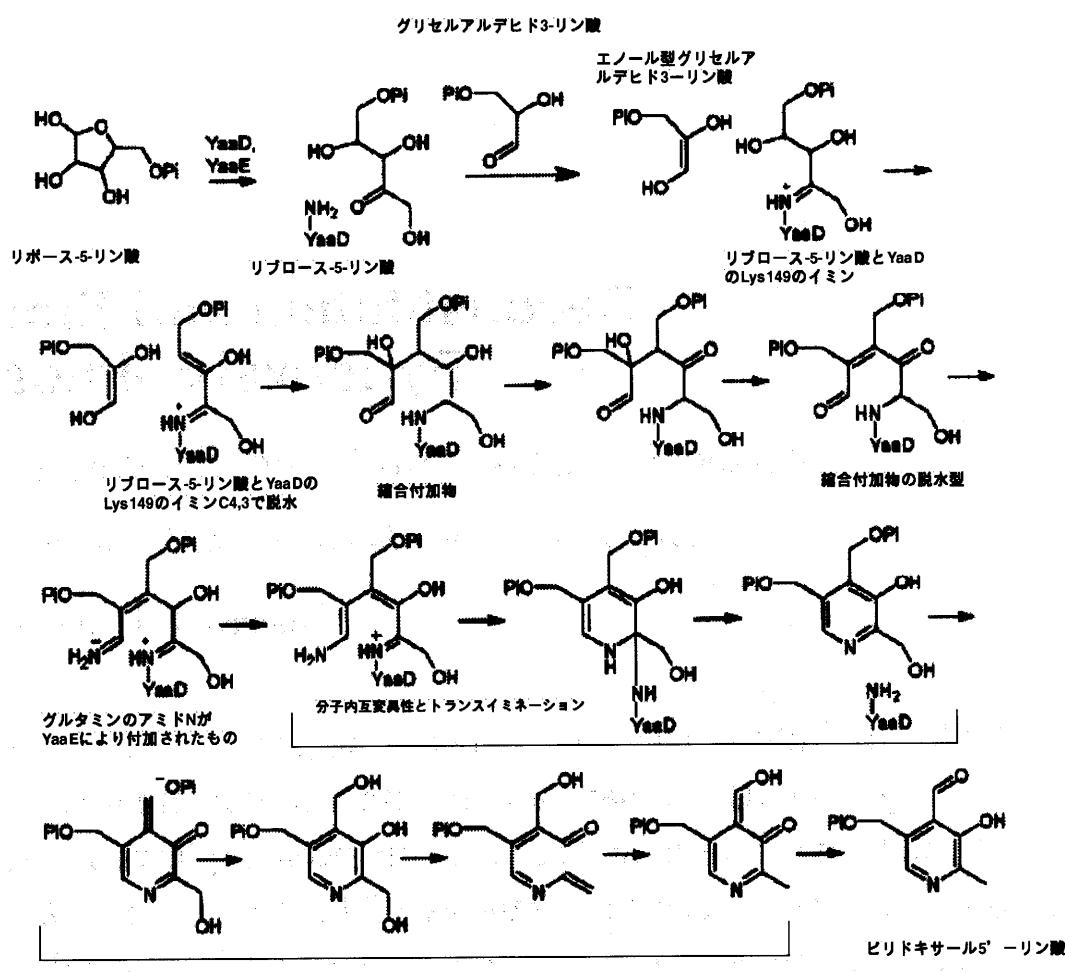


図. 参考文献3から引用

彼らはこれらタンパク質の複合体をPLP合成酵素としている。なお、これらのタンパク質が複合体を形成することは、最近、Belitsky⁷⁾によって示された。さらに、結晶構造解析の結果からも両酵素が複合体を形成することで、ピリジン環の合成が進行すると考えられることがBauer等⁸⁾によって報告された。YaaEタンパク質はグルタミンアミドトランスフェラーゼと高い相同性を示すため、アミド窒素をピリジン環に導入するために作用していると考えられている。また、YaaDタンパク質は、ヒスチジンのイミダゾール環を形成する酵素、イミダゾールグリセロールリン酸合成酵素と高い相同性を示し、反応機構も本酵素のそれと類似性が高いものと考えられた。これらの情報が、今回、Burns等の研究の上で非常に役に立った。

彼らは、精製したYaaDタンパク質の分子質量を調べたところ、遊離型酵素に加えて、本酵素の基質と予測されるリブロース-5-リン酸が結合しているものが存在していることを見いだした。実際、遊離型酵素とリブロース-5-リン酸あるいはリボース-5-リン酸と混ぜて保温すると、遊離型酵素はほとんど全て基質結合型に変化した。リボース-5-リン酸はリブロース-5-リン酸に異性化された後にYaaD酵素タンパク質に結合することがわかった。本酵素は異性化活性をも持っているのである。リブロース-5-リン酸は本酵素の194番目のリシン残基とイミンを形成して結合していると思われた。本酵素のもう一つの基質は3炭素化合物である。彼らはグリセルアルデヒド-3-リン酸をこの基質であると推定した。そこで、YaaD、YaaE、リブロース-5-リン酸、グリセルアルデヒド-3-リン酸を混合したところ、PLPができてくることがわかった。この反応において、5炭素化合物としてリボース-5-リン酸とリブロース-5-リン酸の両方が基質となり、3炭素化合物として、グリセルアルデヒド-3-リン酸とジヒドロキシアセトンリン酸が基質となることがわかった。この反応の最適pHは、6.6-6.6であった。

これらの結果から、図に示すような反応機構で、PLPが合成されるものと考えられた。まず、リブロース-5-リン酸がYaaD酵素タンパク質とイミンを形成し、このイミンの3、4の炭素間で脱水反応が生じ、そこにエノール型のグリセルアルデヒド-3-リン酸が反応し、縮合化合物を与える。互変異性により、付加化合物の脱水型ができた後、グルタミンのアミド窒素がYaaE酵素タンパク質の働きにより、その脱水型に付加される。この化合物が分子内互変異性とトランスイミネーションにより、2-ヒドロキシ-4'、5'-ジホスホピリドキシンを与える。このあとは、Spenser等²⁾によって記述されたのと同様な様式によって、4'位のリン酸が置換し、2'の炭素から水が失われ、

互変異性によって、最終的にPLPが生成される。この反応機構はこれらの中間体が同定されたわけではなく、あくまでも推定機構である。今後、内容の詳細に関して証明がなされていくものと思われる。

この研究とは別に、Wrenger等⁹⁾は、最近、マラリア原虫が、I型のビタミンB₆生合成系を持つことを明らかにしている。この場合、PLP合成酵素とピリドキシン(ピリドキサール)キナーゼ遺伝子の発現が一致した時期で行われていることを示している。PLPが最初に合成されるとすれば、キナーゼ活性が必要であるとは思われないが、生合成されたPLPがホスファターゼによって速やかに脱リン酸化されるのかもしれない。あるいは、生物の種類によってPLP合成酵素の基質特異性に多少の違いがあるのかもしれない。今後の検討課題である。人類を依然として苦しめているマラリアの化学治療薬としてPLP合成酵素阻害剤が有効となるかもしれない。

(高知大学・農学部・生物資源科学科 八木 年晴)

文 献

- 1) Tanaka K, Tazuya K, Yamada K, Kumaoka H (2000) Biosynthesis of pyridoxine: origin of the nitrogen atom of pyridoxine in microorganisms. *J Nutr Sci Vitaminol* **46**, 55-57
- 2) Zeidler J, Ullah N, Gupta R N, Pauloski R M, Sayer B G, Spenser I D (2002) 2'-Hydroxypyridoxol, a biosynthetic precursor of vitamins B₆ and B₁ in yeast. *J Am Chem Soc* **124**, 4542-4543
- 3) 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
- 4) Ehreshhaft M, Bilski P, Li M Y, Chignell C F, Daub M E (1999) A highly conserved sequence is a novel gene involved in *de novo* vitamin B₆ biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 9374-9378
- 5) Kondo H, Nakamura Y, Doug Y X, Nikawa J, Sueda S (2004) Pyridoxine biosynthesis in yeast: participation of ribose 5-phosphate ketol-isomerase. *Biochem J* **379**, 65-70
- 6) Sakai A, Kita M, Katsuragi T, Ogasawara N, Tani Y (2002) *yaaD* and *yaaE* are involved in vitamin B₆ biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J Biosci Bioeng* **93**, 309-312
- 7) Belitsky B R (2004) Physical and enzymological interaction of *Bacillus subtilis* proteins required for *de novo* pyridoxal 5'-phosphate biosynthesis. *J Bacteriol* **186**, 1191-1196
- 8) 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
- 9) Wrenger C, Eschbach M-L, Müller I B, Warnecke D, Walter R D (2005) Analysis of the vitamin B₆ biosynthesis pathway in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* **280**, 5242-5248