

# K11

## FUGUE を用いた AstA と AstB の触媒機構の予測

(1 山之内製薬株式会社・分子医学研究所・ゲノム創薬研究室 2 Cambridge

大学・Biochemistry 部門)

### はじめに

大腸菌 (病原性株含む) の Arginine 代謝は、全体の約 3 % しか関与していない Minor な Arginine Decarboxylase (ADC) 経路と、Major だが生化学的な特徴づけがあまり行われていない Arginine Succinyl Transferase (AST) 経路の 2 つによって担われている<sup>1)</sup>。AST 経路では、まず Arginine が Arginine succinyl transferase (AstA ; EC 2.3.1.109) によって N2-succinylarginine となり、続いて Succinylarginine dihydrolase (AstB; EC 3,-,-,-) によって N2-succinylornithine となる。さらに AstC, AstD, AstE を順番に利用し最終的には Glutamate に至る。

筆者らが Sequence/Structure 相同認識手法 (Fold 認識手法) の一つとして開発したソフトウェア FUGUE<sup>2)</sup>は、Query 配列とそのホモログによって作られたプロファイルが、立体構造既知のファミリーのプロファイルと相同性関係があるかどうかを検出するプログラムであり、その感度の高さは CASP, CAFASP などで実証されている。

今回、FUGUE により AstA と AstB について、それぞれ構造既知のファミリーと相同性があることを見出した<sup>3)</sup>ので報告する。

### AstA は Nat スーパーファミリーのメンバー

大腸菌 AstA (SWISSPROT Code ASTA\_ECOLI) の配列は FUGUE により Zscore=11.6 (信頼度 99% 以上) にて GNAT ファミリー (トップヒットは *Bacillus subtilis* yqjY) に類似した構造をとると予測された。アラインメント (図 1a) をもとに AstA

### 1 白井宏樹、2 水口賢司

の構造モデルを作成 (図 1b) した。これはプログラム Verify3D<sup>4)</sup>により長い insertion 領域を除いて正の 3D-1D compatibility score が得られ、プログラム JOY<sup>5)</sup>により疎水性コアの形成が確認された。

GNAT は細菌類における抗生物質耐性機能から哺乳類における circadian rhythm に関与する機能に至るまで広い細胞機能に関わっているが、分子機能は共通しており、アセチル CoA のアセチル基を基質に転移するのを触媒する酵素である<sup>6)</sup>。そして GNAT は Nat スーパーファミリーのメンバーの一つであり、Nat スーパーファミリーはアシル CoA のアシル基を転移させる酵素という点で共通の分子機能をもったスーパーファミリーである。AstA はアシル基の一つであるサクシニル基をサクシニル CoA から基質に転移するのを触媒する酵素であり、AstA は Nat スーパーファミリーの新規なメンバーとして帰属できた。

Nat は V 字型をした構造であり、GNAT に存在する 4 箇所のモチーフのうちモチーフ C, D, A は N 末側 Arm に、モチーフ B は C 末側 Arm に位置し、Arm 間の Cavity 部分で触媒機能を有している<sup>7)</sup>。

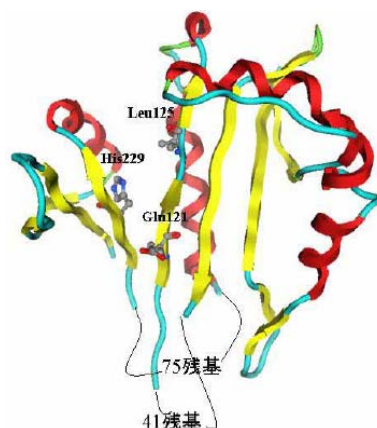


図 1b AstA の立体構造モデル

モチーフ間に長い Insertion が見られたが、触媒領域とは逆の方向に出ていると考えられる (図 1b)。

GNAT のモチーフ上最も保存度の高い 8 つの残

基のうち 7 箇所までが AstA で保存されている (図 1a)<sup>8)</sup>。残りの 1 箇所 (GNA1 の Tyr143 に相当する残基) については AstA では保存されていない。

GNAT のメンバーは全て同様の触媒メカニズムを有している。General Base が水分子を介して起こした脱プロトン化された基質アミノ基による直接の nucleophilic attack が起こると考えられている。General Base の残基の位置は GNAT において完全には保存されていないが、AstA の Glu121 に位置している場合も多い。AstA のメンバーにはモノマーとして働くものと、α鎖、β鎖から成るヘテロマーとして働くものが知られている。モノマーの配列とβ鎖の配列には Glu121 が完全に保存されており、Glu121 が AstA の有力な General Base の候補といえる。α鎖には保存されておらず、α鎖は酵素活性を有しないと推察できる。

図 1a GNAT(上段)と AstA(下段)のアラインメント

MOTIF	
conserved	(--)
1112 No.	(--)
1112	(--)
AAC6_CITDI	(6) fyiirMeegdlagTikvlt (38) IVDhrteVAtGmi (11) LCgHiediAvHskygsgLgllLgdlvGfdys (4) ildcdeknvufkfyekGgfnag (7)
PAT_STRV	(1) NYQIWNIAECNSYQIERANILT (31) FELLINNSLVGIGL (5) ETWELHPLVFPDYQKNGIGIKLELEAREQ (33) IKINKHPYFYQNGYIVG (22)
ATUA_ECOLI	(7) ADIRBATEADMPACTIVNHVI (30) LVAEDCEVAGTAYA (9) DTAESVUVVPRHQSTGLSTLVHLKLEAQG (7) IGLPNDESVMHEALGYAERG (37)
	(5) VKLRPLEREDLRVHQLDNNAS (31) FVVECDGKAGLVEL (9) HRAAEFQIIISPEYQKGLATRAAKLAMDYGTVL (8) VDKENENAIHYIRKLGFVEG (42)
ASTA_ECOLI No.	(--)
ASTA_ECOLI	(1) MVIRPVERSDVSAIMQLASKTG (38) LEDSETGTAGICAI (41) GSSELTFLDLPDRREGNGVLLSKSRFEMFAER (75) VHPQTAPARAIVLEEGFRYRN (96)
Q82PV1	(1) RVIRVEHADIAIMQLACKTG (38) LEDSETGEVGGICAI (41) GSSELTFLDLPDRREGNGVLLSKSRFEMFAER (75) VHPQTAPARAIVLEEGFRYRN (96)
g122987667	(1) IVRVVVRQGVDAIMRLAQETG (38) MEDTDTGTVAGVCGI (41) GYAEVCSLFLSPRYRTSGVGLLSRFRFLAQFR (75) THSDTIPARRMLEAGGLRYEN (88)
ASTG_PSEAE	(0) MIVRVFTSADLPALIELARSTG (38) LED-DACKVVVGISAI (41) GNSSELCSLFLHADHRSGINGLLSRARFLIAER (75) VHPNTEPALAMIKAGGFYQG (94)
g122987666	(1) LFVFGRLADDALEHMAATAQ (38) LEDASGKIMGTASI (41) GNSRLAGYIIDPSLRGDAAHMSRARMYIAAR (75) PDSKALLAYDIHLEEGFETDR (94)
ASTA_PSEAE	(1) LVMRPAQAADLPQVQRLAADSP (38) LEDSASGELVGCASAI (41) GNSLLTSFYVQVDLVQSVYAEINSGRLLFMASHP (75) VHPRAQITFDILMRGEGFETDN (88)

GNAT の 4 配列 (最上段の 1112 は PDB code で、配列を JOY format で転述) と AstA の 6 配列 (上の 2 配列 (太字・下線) はモノマー分子、中間の 2 配列 (太字) はβ鎖分子、下の 2 配列 (細字) はα鎖分子) のアラインメント。() 内の数字は 4 箇所のモチーフ (C,D,A,Bモチーフ) 以外の N 末、C 末、およびモチーフ間の領域における残基数。conserved の行には、8 箇所の highly conserved residues のうちの AstA にも保存されている 7 箇所に○印、AstA に保存されていない残基 1 箇所 (本文参照) を #印で表現した。&は His229、\$は Leu125、%は Glu121 (本文参照)

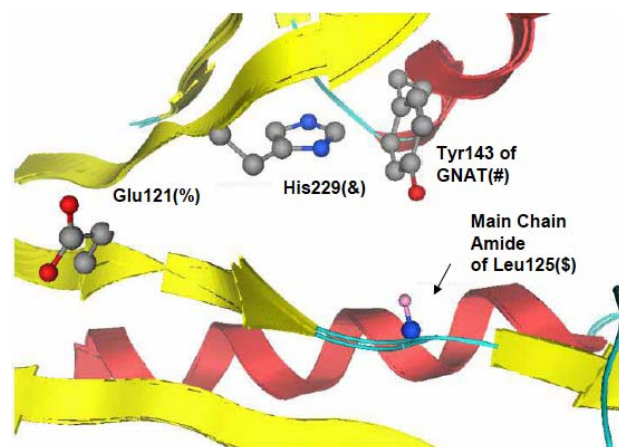


図 1c AstA モデルと GNAT の活性部位の重ね合わせ図 () 内のマークは図 1a に対応

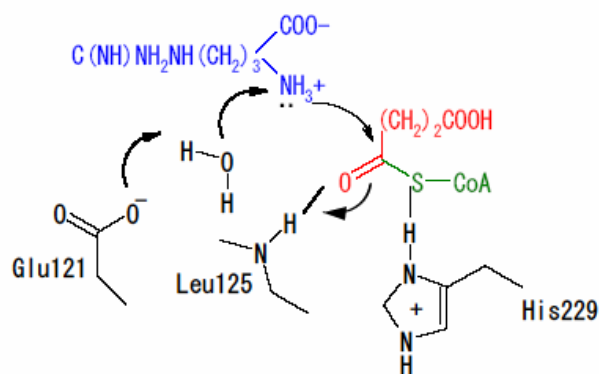


図 1d AstA の触媒機構

GNAT の触媒反応を促進する要素としては、反応中間体 4 面体構造の安定化と CoA-SH 基の離脱の促進が提唱されている。チオエステルカルボニル基の Polarization は nucleophilic attack の促進と中間体の安定化の両方に関与する重要な要素と思われるが、この役割は主鎖のアミド基によって担われている。AstA モデル構造から AstA においては Leu125 の主鎖のアミド基が候補である。GNAT において CoA-SH 基の離脱を促進すると考えられている Tyr 残基 (図 1 a で # 印) を AstA では保存していない。AstA モデル構造から、His229 が構造上近い位置 (図 1 c) に存在しており、この残基が CoA-SH 基の離脱を促進すると推測できる。触媒サイトの近傍にこれ以外の polar な残基は存在していない。これらの観察をもとに、図 1 d のように触媒機構を提唱することができた。

## AstB は AT スーパーファミリーのメンバー

大腸菌 AstB(SWISSPROT Code ASTB\_ECOLI)の C 末側 70 残基を除いた配列は FUGUE によって、Zscore=6.2(信頼度 99%以上)にて AT スーパーファミリー (ヒト Amidinotransferase がトップヒット) に類似した構造をとると予測された。

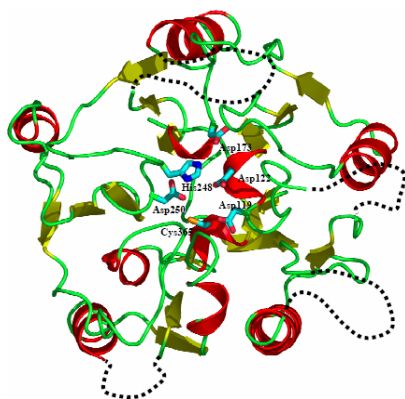


図 2b AstB の立体構造モデル

AT に共通の配列上の特徴として、触媒に関与する Cys 残基の配列上の近傍に Gly rich の領域が存在しており、典型的には 3 残基の続いた Gly の配列が見られる。AstB はこの 3 残基の続いた Gly の配列が見られる。

AT スーパーファミリーは、過去に著者らの研

究によって見出されたスーパーファミリーであり、主として Arginine などの Guanidino 基もしくは修飾された Guanidino 基を、加水分解もしくは転移させるという分子機能を有している。AstB

図2a ATスーパーファミリー(上段)とAstB(下段)のアライメント

Catalytic	(--)-#-o-----(-) o-----(-) p-----(-) -
LUDW No.	(--)-170-----180-----(-)-260-----(-)-310-----370-----(-)-410-----(-)
LUDW	(164) SAMPRDLlVvgnIEZ (72) DAADPIRAGrDIFA (35) HIDAfNIIGpgVL (39) WLSNMVLMeLekrVMVD (27) LGGgFHCATLDV (11)
LBD	(102) DXPCROGLlSvgteIie (59) dAAmVLRFGeDLLY (34) hVDsiViPLRpGLV (40) wIgMMLLVrpdiAVVD (27) LGGgFcAATLDV (11)
LH70	( 60) SVrVEDEPVIcraCII (37) ERGDIMmgdhFi (34) ELktgLAYLehnNL (23) yAArcCIWNer-vIMP (27) IDGGVSMSLfz ( 0)
RABT_ECOLI No.	(--)-120-----130-----(-)-180-----(-)-250-----(-)-260-----(-)-310-----320-----(-)-370-----(-)
RABT_ECOLI	(116) SADTLdGRKHlTVANLN (39) DEGAANHNSLGHHY (61) HNDVTAvSNRQVLFc (41) LFNSoLLSRDDGSMMIV (38) NGGGPaCLRLRV (77)
Q82F9	(116) SAdALdGRKHlTVANLN (39) DEGAANHNSLGGEY (61) HNDVTAvSNRQVLFc (41) LFNSoLLSRDGMllLV (38) NGGGPaCLRLRV (77)
Q88E15	(116) SAdTdAGRvhFAANLN (39) DEGAAnHRFCRAY (60) HNDVtSVNGEVLFx (41) LFNSoLLSRBEDGSMLIV (38) NGGGPaCLRLRV (73)
RABT_PSEAE	(116) SAdTdAGRvhFAANLN (39) DEGAAnHTFCRDY (60) HNDVtSVNGEVLFx (41) LFNSoLLSRKADGSMllV (38) NGGGPaCLRLRV (72)
Q88Sj6	(116) SAdTdAGRvhFAANLN (39) DEGAAnHRFCQDY (60) HNDVtAVNGEVLFx (41) LFNSoLLSRPDGSMLIl (38) NGGGPaCLRLRV (72)
Q822987669	(116) SAdTNdGRvhFTAPNIC (39) DEGAAnHTFCRAIC (60) HNDVtAVNGRNtlFX (41) LFNSoLLTPDGKVLIr (38) NGGGPaCLRLRV (71)

AT スーパーファミリーの 3 配列 (PDB code、配列を JOY format で記述) と AstB の 6 配列の活性部位近傍のアラインメント。このフォールドは、熱の 5 回対称性を有しており、この図で表した領域は、活性部位近傍で、中央の対称軸の付近に位置している。() 内の数字は N 末、C 末、および活性部位近傍を繋ぐ領域における残基数。Catalytic の行には、8 箇所の highly conserved residues のうちの AstA にも保存されている 7 箇所に○印、AstA に保存されていない残基 1 箇所 (本文参照) を印で表現した。& は His229、\$ は Leu125 (本文参照)

は Guanidino 基を 2 度加水分解する活性 (dihydrolase 活性) を有しており、これらのことから、AT スーパーファミリーの新規なメンバーとして帰属できた。AT スーパーファミリーは活性部位を軸として、偽の 5 回対象性を有する構造



である<sup>9)</sup>が、これらの要素を繋ぐ4箇所は配列や長さが多様であり、AstBにおいても長い Insertion が見られたが、中心付近の活性部位の配列は保存されている。

AT スーパーファミリーは Cysteine protease と同様の触媒機構が提唱されており、触媒残基の Cys の硫黄原子による guanidino 炭素原子への nucleophilic attack が起こるとされている。

Catalytic triad(ヒト AT の番号で Cys407, His303, Asp254)は AT スーパーファミリーにも AstB にも完全に保存されている。したがって AstB も本質的に同様の機構を有していると推測できる。とくに、AT スーパーファミリーのうちでも加水分解活性を有している Arginine deiminase(ADI)<sup>10)</sup>や Peptidyl arginine deiminase(PAD)と同様の機構で進むと考えられる。ADI や PAD の Catalytic triad の3残基に加え、2つの Acidic な残基が活性部位に存在しており、活性に関与していると考えられている。AstB ではこれら2箇所が完全に保存されており、かつさらにもう1残基の Acidic な残基(Asp119)が活性部位に位置している。AstB は ADI や PAD と異なり2度加水分解する活性(dihydrolase 活性)があるので、この追加的な Asp119 が dihydrolase 活性に関与している可能性が示唆される。

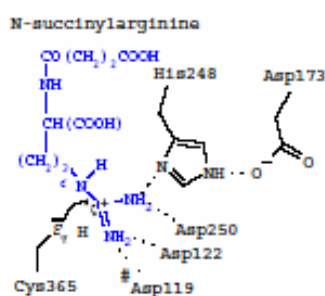


Fig2c AstB による基質認識

### Arginine catabolism pathway の進化

Arginine 分子は炭素、窒素、エネルギー源であり、その代謝経路に関する研究は古くから行われている。酵素の進化を考察する際に、2つの異なったシナリオを想像できる。触媒活性を保持しな

がら新しい分子を基質として認識する方向性と、基質を保持しながら新しい触媒機構を獲得する方向性である。Nat スーパーファミリーは前者に、AT スーパーファミリーは後者であると考えられる。Arginine catabolism の新しいパスウェイを作る際に、AstA は触媒機構を保持した祖先から進化し、AstB は基質特異性を保持した祖先から進化したと考えられる。

### 結論

FUGUE により AstA と AstB の相同性認識を行うことができた。ともに数箇所の長い Insertion が存在しており、このことが、本手法が有効であったことの一因と思われる。ここで提唱した触媒残基や触媒メカニズムの情報は、O157 株をはじめとした病原性株による大腸菌感染症の治療薬創製において、スクリーニング系構築や阻害薬デザインのための有用な知見となるであろう。

### References and Notes

- [1] Schneider, BL et al. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 4278-4286
- [2] Shi, J. et al. (2001) *J. Mol. Biol.* **310**, 243-257.
- [3] Shirai, H. and Mizuguchi, K. (2003) *FEBS Lett.* **555**, 505-510.
- [4] Luthy, R. et al. (1992) *Nature* **356**, 83-85.
- [5] Mizuguchi, et al. (1998) *Bioinformatics* **14**, 617-623.
- [6] Marmorstein, R. (2001) *J. Mol. Biol.* **311**, 433-444.
- [7] Watson, et al. (2002) *Mol. Cell* **9**, 685-694.
- [8] Neuwald, AF. and Landsman, D. (1997) *Trends Biochem Sci.* **22**, 154-155.
- [9] Humm, A. et al. (1997) *EMBO J.* **16**, 3373-3385.
- [10] Das, K. et al. (2004) *Structure* **12**, 657-667.