

(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¹⁾。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 FUGUE²⁾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³⁾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

shirai.hiroki@yamanouchi.co.jp

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 Verify3D⁴⁾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 JOY⁵⁾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⁶⁾。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⁷⁾。

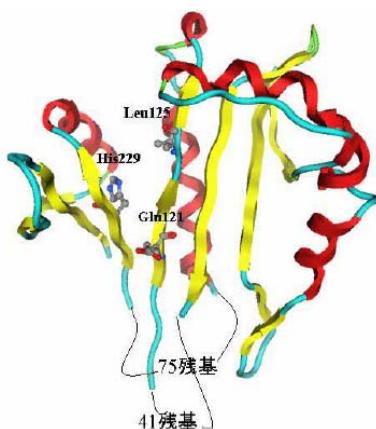


図 1b AstA の立体構造モデル

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)⁸⁾。残りの 1 箇所 (GNAT 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。

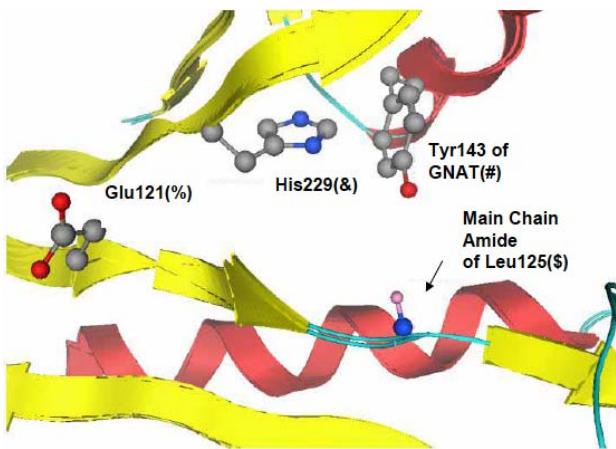


図 1c AstA モデルと GNAT の活性部位の重ね合わせ図 () 内のマークは図 1a に対応

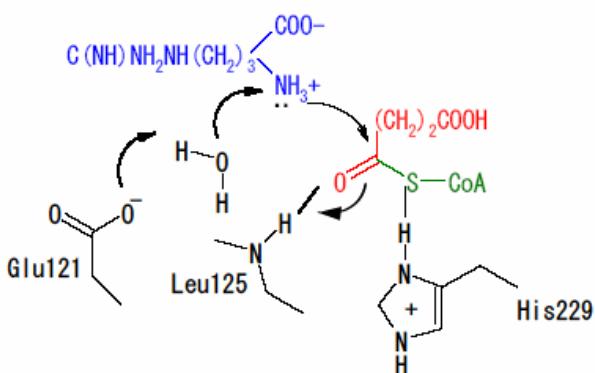


図 1d AstA の触媒機構

図 1a GNAT(上段)と AstA(下段)のアラインメント



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ているが、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 1d 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。

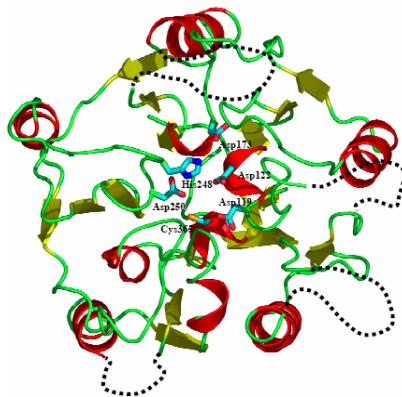


図 2b AstB の立体構造モデル

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スヌーパーファミリー(上段)とAstB(下段)のアラインメント

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ミンメント。このフォールドは他の 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 端、C 端、および活性部位を環状ペプチド上における残基番号。Catalytic の斧には、8 個所の highly conserved residues のうちの 7 個所に O、AstA にも保存されている新しい要素 1 個所 (本文参照) を斜線で示した。残りは B1229、S125 は Lys125 (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⁹⁾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)¹⁰⁾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。

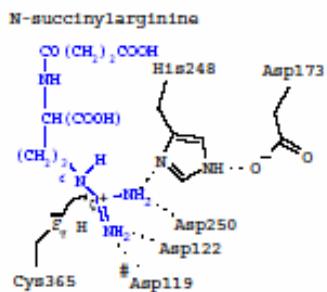


Fig2c AstBによる基質認識

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つの異なる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.