

講演番号：2C15a13

講演日時、会場：3月25日 11:24～ C校舎15会場

*Corynebacterium glutamicum* 由来グルタミン酸脱水素酵素の結晶構造解析

Crystallographic analysis of glutamate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*

○富田 武郎、イン ルル、葛山 智久、西山 真 (東大・生物工学セ)

○Takeo Tomita, Lulu Yin, Tomohisa Kuzuyama, Makoto Nishiyama (Univ. Tokyo)

(目的) *C. glutamicum* はグルタミン酸やリジンなどの発酵生産に利用されている。*C. glutamicum* 由来のグルタミン酸脱水素酵素(CgGDH)は高いグルタミン酸合成活性を持つため、グルタミン生産の鍵酵素の一つであると考えられている。酵素の補酵素特異性や、基質特異性、反応の指向性に関する構造基盤を明らかにすることはグルタミン生産に関する知見やその他のアミノ酸の生合成経路の設計するための基盤となるものと期待される。そこで、CgGDH の基質、補酵素複合体の結晶構造を決定することを目指した。

(方法と結果) N末端に his-tag を融合した CgGDH を大腸菌に発現させ、Ni<sup>2+</sup>カラム、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。2-OG、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NADP<sup>+</sup>またはNADPH存在下の条件で結晶を得た。条件を最適化した結果、良質な結晶を得ることができ、2-OG/NADP<sup>+</sup>/硫酸アンモニウム入りの条件での結晶について1.68 Å分解能の回折データを得て、分子置換法により構造を決定した。CgGDHは他のバクテリア由来のGDHと同様に、ドメインIとドメインIIからなるサブユニットが会合したホモヘキサマー構造を有していた。6つのサブユニットそれぞれにNADP<sup>+</sup>またはNADPHを結合していた。A,B,C,F-chainは2-OGを結合しており、ドメインIとドメインIIの間に存在する活性中心が閉じた構造を有しているのに対し、D,E-chainでは2-OGの電子密度が観察されず、また活性中心が開いた構造を有していた。CgGDHの閉じた構造はboGDH/2-OG/NAD<sup>+</sup>の構造によく似ていた。2-OGは活性中心内で多くの特異的な結合により認識されていた。2-OGの認識様式はboGDH/2-OG/NAD<sup>+</sup>複合体のものに似ていたが、CgGDHの2-OGの2-oxo基がNADP<sup>+</sup>のニコチンアミドとよくスタッキングしていることや、アンモニア分子が存在すると考えられる側に位置するQ113がboGDHではMet残基に置換されているという特徴が見られた。NADP<sup>+</sup>も多数の特異的な結合により認識されており、2'-リン酸基はR290やK136との静電相互作用、S265との水素結合により認識されていた。また、水分子を介したK284との静電相互作用やH98との水素結合が観察された。D264は近傍に存在するがR290により隔離され、2'-リン酸基とは別の方向を向いている。R290A, S265A, K136A変異体を作製し、動力学的解析を行った結果、野生型酵素と比べて、NADPHに対するK<sub>m</sub>が上昇していたことから、これらのアミノ酸残基がNADPHの認識に直接関わっていることが明らかになった。

glutamate dehydrogenase, *Corynebacterium glutamicum*, crystal structure