

## クライオ電子顕微鏡によりビフィズス菌酵素の微小構造を発見

ビフィズス菌では、ホスホケトラーゼ (PKT) という酵素が、単糖類の発酵において重要な役割を担っています。酵素の能力はその形状 (立体構造) に依存しており、産業利用などで酵素を高機能化するためには、立体構造情報は大変重要です。通常、酵素の立体構造は、X線結晶構造解析などを用いて解析しますが、今回、クライオ電子顕微鏡を用いて、ビフィズス菌 PKT の立体構造を決定しました。その結果、X線結晶構造解析では観測することができなかった、アミノ酸結合の微小な構造を捉えることに成功しました。

特に、基質結合ポケットの入り口に位置する QN ループと名付けた、四つのアミノ酸から構成されるループにおける微小構造の発見は、重要な知見です。この微小構造が、酵素の基質取り込みに関係していることが分かりました。QN ループには二つのコンフォメーションがあり、一つは基質のない状態で報告された X線結晶構造解析の結果と類似しており、もう一つはクライオ電子顕微鏡で初めて捉えられたものです。本研究では、これらを同時に観察することができました。このような QN ループの微細構造は、基質が結合した大腸菌の酵素と、対応するループのコンフォメーションがとても似ていることから、酵素の基質取り込みに関係していると考えられます。

### 研究代表者

筑波大学生存ダイナミクス研究センター

岩崎 憲治 教授

## 研究の背景

生物が生きる上で不可欠な代謝や免疫応答などの生命現象は、酵素と呼ばれるタンパク質に支えられています。ヒトの体内には1万種類を超える酵素が存在し、これらが特定の物質を別の物質に変換して、互いに提供しあいながらさまざまな物質やエネルギーを合成し、複雑な生命現象を維持します。酵素の中には産業上の有用物質を安価に合成できるものもあり、工業生産への応用が期待されます。しかしながら、天然に存在する酵素をそのまま利用できるとは限らず、酵素を高機能化する必要性がしばしば生じます。酵素の能力はその形状（立体構造）に依存するため、高機能化酵素を設計する上で立体構造情報は大変重要です。一般に、酵素の立体構造は、X線結晶構造解析法（XRD）や核磁気共鳴法（NMR）で詳細に調べることができますが、比較的多くの試料や結晶化が必要になるなど、必ずしも解析は容易ではありません。一方、2017年にノーベル化学賞受賞で話題になったクライオ電子顕微鏡<sup>注1)</sup>は、少ない試料で結晶化せずに立体構造情報を取得できる画期的な手法です。そこで今回、クライオ電子顕微鏡を使い、ピフィズス菌における発酵生産で重要な役割を果たす酵素、ホスホケトラーゼ（PKT）<sup>注2)</sup>の立体構造を解析しました。

## 研究内容と成果

本研究チームは、最新のクライオ電子顕微鏡を使い、PKTの立体構造を観察しました。その結果、PKTは、同一の分子二つが互い違いに密着したユニットが四つ円環状に連なった「四つ葉のクローバー」のような形であることが明らかになりました。このPKT分子をさらに原子レベルで観察すると、酵素（タンパク質）を構成するアミノ酸の鎖状の連なり（主鎖）と主鎖から分かれた側鎖が明瞭に観測されました。また、この立体構造を、従来のXRDで得られた立体構造と比較したところ、四つ葉のクローバー状の全体構造を含め、原子レベルでも、主鎖・側鎖の構造は、両者でほぼ一致していたことから、クライオ電子顕微鏡とXRDは、同等の解析精度を持つことが示されました。

一方、XRDとクライオ電子顕微鏡のそれぞれで得られた立体構造を詳細に比較すると、基質が結合するポケットの入り口付近に位置するループ（QNループ：四つのアミノ酸から構成されるループ）に微細構造の違いが見られました。クライオ電子顕微鏡では、QNループの二つの立体配座（コンフォメーション）を同時に捉えることができました。一つは基質結合部位の入り口を狭めにし(closed form)、もう一つは逆に入り口を開けていました(open form)。closed formコンフォメーションは、基質のない状態で観察したXRDのコンフォメーションと類似していますが、open formコンフォメーションは、クライオ電子顕微鏡で初めて捉えられたものです（参考図）。このコンフォメーションは、基質が結合した大腸菌の酵素トランスケトラーゼのそれと極めてよく似ていることから、QNループの微細構造は、酵素の基質取り込みに関係していることが推定されます。このように、クライオ電子顕微鏡を用いた解析によって、PKTが、基質が触媒部位にアクセスできるようになっている「開いた」構造と、その逆の「閉じた」構造の両方を持っていることが分かりました。

## 今後の展開

本研究を通じ、クライオ電子顕微鏡を用いた酵素の構造解析により、酵素高機能化の設計に有用な情報がより多く得られる可能性が示され、酵素の産業利用に役立つと期待されます。今後は、より精緻な高機能化設計に向け、酵素-基質複合体の構造の解析にも取り組む予定です。

## 参考図

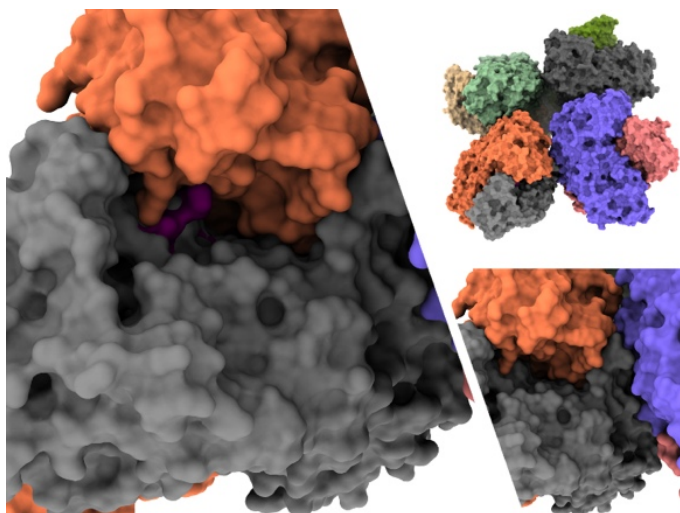


図 本研究で明らかになった PKT の立体構造

各色はすべて同一の分子であり、2分子が互い違いに密着してユニットを作り、これが連なって PKT を形成する。クライオ電子顕微鏡による解析では、四つのユニットが四つ葉のクローバー状の概形（右上）を持つことが分かった。また、XRD 構造で観測された closed form（左）に加え、open form（右下）も観測された。

## 用語解説

注1) ホスホケトラゼ (PKT)

チアミンリン酸を補酵素とする酵素。基質にリン酸を付加する。基質としては、フルクトース-6-リン酸とキシルロース 5-リン酸の二種類がある。

注2) クライオ電子顕微鏡

透過型電子顕微鏡の一種で、極低温下で試料を凍結して観察する。サンプルの結晶化が不要なため、タンパク質などの生体分子の構造解析に適している。

## 研究資金

本研究は、日本医療研究開発機構 AMED の BINDS 事業として実施されました。また、本研究で使用したホスホケトラゼは、味の素株式会社より提供を受けました。

## 掲載論文

【題名】 High-resolution structure of phosphoketolase from *Bifidobacterium longum* determined by cryo-EM single-particle analysis.

(クライオ電子顕微鏡単粒子解析によって決定されたビィフィドバクテリウム・ロンガム由来ホスホケトラゼの高分解能構造)

【著者名】 Kunio Nakata, Naoyuki Miyazaki, Hiroki Yamaguchi, Mika Hirose, Tatsuki Kashiwagi, Nidamarthi H.V. Kutumbarao, Osamu Miyashita, Florence Tama, Hiroshi Miyano, Toshimi Mizukoshi, Kenji Iwasaki

【掲載誌】 Journal of Structural Biology

【掲載日】 2021年2月15日

【DOI】 10.1016/j.jsb.2022.107842

問合わせ先

【研究に関すること】

岩崎 憲治 (いわさき けんじ)

筑波大学生存ダイナミクス研究センター 教授

URL: <https://r.goope.jp/tsukuiwaken>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報室

TEL: 029-853-2040

E-mail: [kohositu@un.tsukuba.ac.jp](mailto:kohositu@un.tsukuba.ac.jp)