

域からの入力の影響より高いと考えられる。

前述のように、グルタミン酸受容体の量やシナプスの大きさは、シナプスの活動性と強い関係があるので、筆者らが発見した左右差は、とりもなおさず海馬の神経活動の左右差に直結していると考えている。

他の研究との比較

受容体とシナプス面積の関係については、先行研究がある。AMPA受容体はシナプス面積が大きいほど数が多く、NMDA受容体はシナプス面積の影響を受けないであろうということは形態学者^{8,9)}あるいは、生理学者²⁾たちにより示されていた。理由として、AMPA受容体はグルタミン酸によるシナプス電流を直接反映すると考えられているが、NMDA受容体はむしろシナプス可塑性誘導に重要だとされていたからである。筆者のデータは、それらの結果をおおむね追認しながら、サブユニットごとに詳細にシナプス面積と受容体の関係を導いている。

胚の発生過程では左右軸形成の研究が盛んである^{10~12)}が、脳の分子的・機能的な左右差については類似の研究はない。「分子から見た脳の左右差」という分野はまだ拓かれたばかりと言えるだろう。

- 1) 発生過程でどのような分子が働いてこのような脳の左右差を作っているのか？
 - 2) ヒト、サルのような霊長類でもこのような受容体やシナプス形態の左右差があるのかどうか？
 - 3) 受容体やシナプスの左右差が、果たしてどのように神経活動の左右差をもたらしているのか？
- など、多くの解き明かすべき問題がある。筆者は今後、これらの問題に答えていきたいと考えている。

あとがき

今から思うと、当たり前のことを長年かけて示したに過ぎないように感じます。しかし当時は、微妙な差しか出ない実験のため五里霧中で、ときに垣間見える光にも確信が持てない状態でした。深く考えずにNR2B定量を引き受けてしまったから困難さに気づいたとき、GluR1の差のSDS-FRL法での追試、理研異動後も週末に電顕を見るために理研・生理研間を高速道路で往復しているときなど、ずっと薄氷を踏むようでした。続けてこれたのは、単に脳の非対称性がきれいに思えたからです。

ここでは³⁾、生化学・形態学・生理学と、今まで三つのラボで学んできた手法が全て使われています。研究者としての基礎を与えて下さった中西(重忠)先生、最大限の裁

量権を下された重本先生、異動後もなかなか終結しない仕事を助けて下さった平瀬さんにこの場でお礼を申し上げます。そして、生理研技官の山田さんや前橋さんにも感謝を表したいと思います。

- 1) Somogyi, P., Tamas, G., Lujan, R., & Buhl, E.H. (1998) *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 26, 113-135.
- 2) Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., & Nakahara, H. (2003) *Trends Neurosci.*, 26, 360-368.
- 3) Shinohara, Y., Hirase, H., Watanabe, M., Itakura, M., Takahashi, M., & Shigemoto, R. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 19498-19503.
- 4) Cohen, R.S., Blomberg, F., Berzins, K., & Siekevitz, P. (1977) *J. Cell Biol.*, 74, 181-203.
- 5) Kawakami, R., Shinohara, Y., Kato, Y., Sugiyama, H., Shigemoto, R., & Ito, I. (2003) *Science*, 300, 990-994.
- 6) Fujimoto, K., Umeda, M., & Fujimoto, T. (1996) *J. Cell Sci.*, 109, 2453-2460.
- 7) Shinohara, Y. & Hirase, H. (2009) *Front Neuroanat.*, 3, 1-6.
- 8) Takumi, Y., Ramirez-Leon, V., Laake, P., Rinvik, E., & Ottersen, O.P. (1999) *Nat. Neurosci.*, 2, 618-624.
- 9) Racca, C., Stephenson, F.A., Streit, P., Roberts, J.D., & Somogyi, P. (2000) *J. Neurosci.*, 20, 2512-2522.
- 10) Meno, C., Saijoh, Y., Fujii, H., Ikeda, M., Yokoyama, T., Yokoyama, M., Toyoda, Y., & Hamada, H. (1996) *Nature*, 381, 151-155.
- 11) Supp, D.M., Witte, D.P., Potter, S.S., & Brueckner, M. (1997) *Nature*, 389, 963-966.
- 12) Hirokawa, N., Tanaka, Y., Okada, Y., & Takeda, S. (2006) *Cell*, 125, 33-45.

篠原 良章

(理化学研究所基礎科学特別研究員
(平瀬研究ユニット))

Left-right asymmetry of the hippocampal synapses
Yoshiaki Shinohara (Hirase Research Unit, RIKEN Brain Science Institute, 2-1, Hirosawa, Wako, Saitama, 351-0198, Japan)

X線構造による希少糖生産酵素の単糖異性化反応機構の解析

はじめに

単糖とは、糖の基本単位で、炭素原子三つ以上からなるポリヒドロキシアルデヒド(アルドース)あるいはポリヒドロキシケトン(ケトース)である。その構造中に不斉炭素が多くあり、例えば、炭素原子六つからなるヘキソース

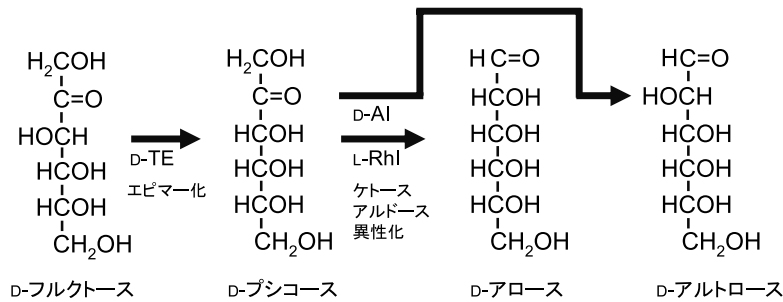


図1 D-フルクトースを出発原料としたD-プシコース、D-アロース、D-アルトロースの生産ストラテジー

それぞれ作用させる酵素は、D-タガトース3-エピメラーゼ (D-TE)、L-ラムノースイソメラーゼ (L-Rhl)、D-アラビノースイソメラーゼ (D-AI) である。

では、D-グルコース等のアルドヘキソースで16種、D-フルクトース等のケトヘキソースで8種、計24種もの立体異性体が存在する。しかしながら、天然に存在する単糖はかぎられており、ヘキソースであればD-グルコース、D-フルクトース、D-ガラクトース、D-マンノースのみが多量に存在し、その他のものはごく微量にしか存在が確認できない「希少糖」と呼ばれている。香川大学の何森らのグループは、種々の単糖異性化酵素を用いて、天然に豊富に存在するD-グルコースおよびD-フルクトースから「希少糖」を大量に生産する技術開発に成功した¹⁾。現在では、数多くの種類の希少糖が比較的安価で市販されるようになり、希少糖を用いた研究が可能となった。

希少糖の生産ストラテジーの一部を図1に示す。D-フルクトースの3位をエピマー化（不斉炭素のキラリティーを反転）するエピメラーゼを用いてD-プシコースを生産する。次に、ケトース⇌アルドースの異性化を行うイソメラーゼを作用させる。イソメラーゼの種類によってD-アロースとD-アルトロースが生じる。このように、エピメラーゼとイソメラーゼを順次作用させて、24種の立体異性体が生産できる。さらに、それぞれの単糖を還元することにより10種の糖アルコールが合成でき、合計34種の単糖（ほとんどが希少糖）生産ストラテジーが提案されている¹⁾。筆者らは、より効率的な希少糖の生産のための分子設計を行うことを目的に、希少糖生産酵素についてX線結晶解析を行ってきた。

1. D-タガトース3-エピメラーゼ

1994年、D-タガトースの3位のエピマー化を触媒する土壌菌 *Pseudomonas cichorii* 由来D-タガトース3-エピメラーゼ (*PcD-TE*) が発見された²⁾。それまで、リン酸化された単糖のエピメラーゼは見つかったが、フリーの単

糖に作用するエピメラーゼの報告はなかった。さらに、*PcD-TE* は、D-タガトースだけではなく、D-フルクトース (D-タガトースの4位エピマー) にも作用してD-プシコースを生成することができ、この *PcD-TE* の発見によって希少糖生産は飛躍的に進展した。

フリーの単糖を基質とするエピメラーゼのX線結晶解析は、Rheeらのグループによる土壌菌 *Agrobacterium tumefaciens* 由来D-プシコース3-エピメラーゼ (*AtD-PE*, *PcD-TE* と高いホモロジーを持つが、D-プシコースに対して高い基質特異性を示すことから命名された³⁾、および筆者らのグループによる *PcD-TE*⁴⁾ の2例が報告されている。X線構造から得られた *PcD-TE*/D-フルクトース複合体の活性部位の構造を図2(a)上に示す。*PcD-TE* は、活性部位に Mn^{2+} を持ち、Glu152, Asp185, His211, Glu246 と配位結合を形成している。残り二つの配位座に、基質であるD-フルクトースの2位カルボニル酸素 (O2) と3位の水酸基 (O3) が配位結合を形成している。His188 と Arg217 が都合よく O1, O2 と水素結合を形成し、基質の1, 2, 3位は、かなり厳密に認識されている。それに対して、基質の4, 5, 6位付近は疎水性アミノ酸残基が配置されており、かろうじて Cys66 が水素結合を形成できる距離にあるのみである。このことが、4, 5, 6位の基質認識を甘くしている原因であり、その結果、*PcD-TE* はD-タガトースとD-フルクトースの双方を基質とできるのであろう。*PcD-TE* においては、基質をはさむように向かい合った二つのグルタミン酸、Glu152 と Glu246 が酸-塩基触媒として働き、cis-エンジオレート中間体 (図2(a)下、反応機構の2および3段階目) を経る反応機構が予想できる。Rheeらは、*AtD-PE* のX線構造から、D-フルクトース→D-プシコースのエピマー化の場合は、イオン化したGlu246 (*AtD-PE* ではGlu244) が塩基触媒として働き (C3を脱プロトン化)、

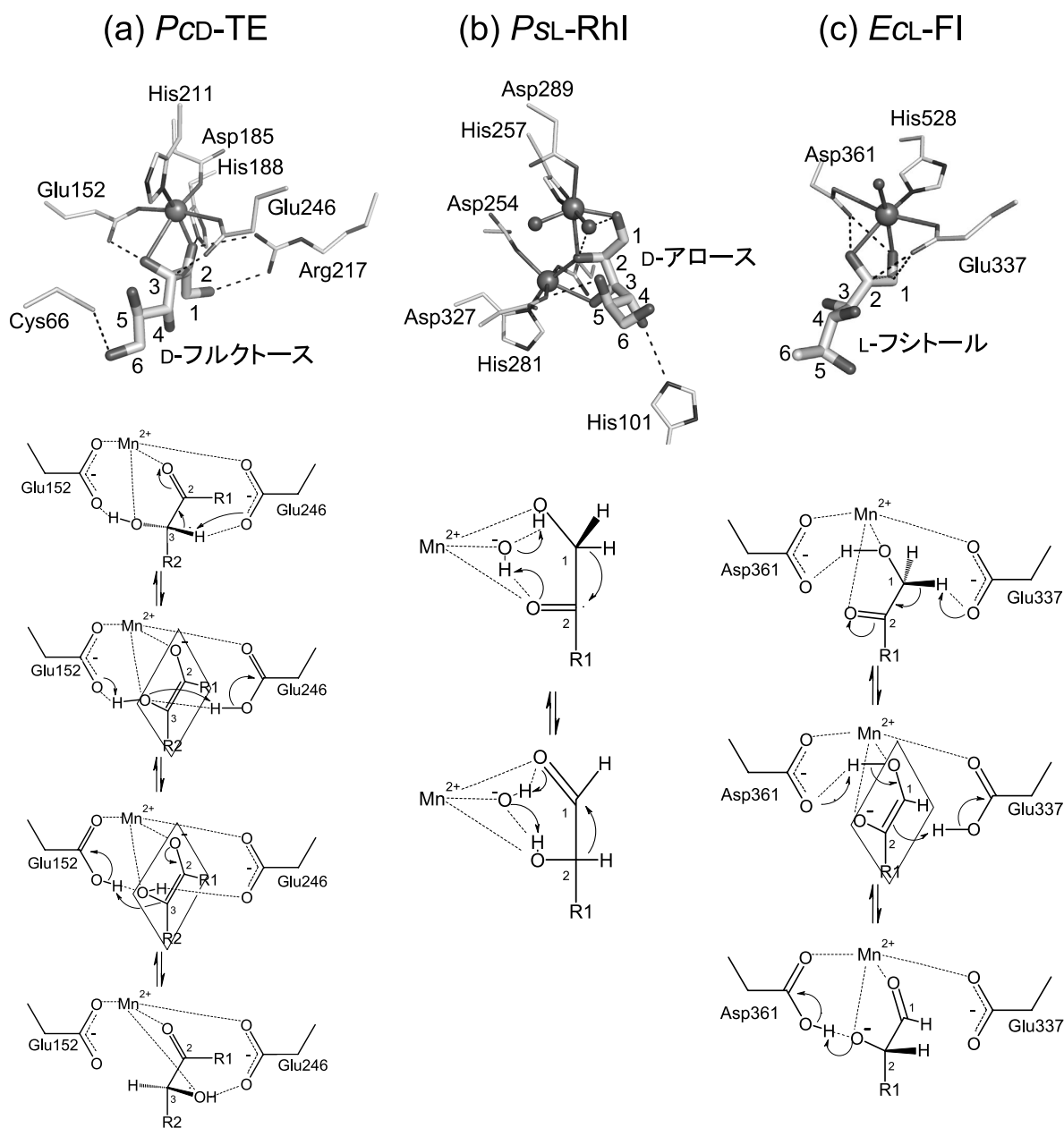


図2 (a) *PcD-TE* (PDB code 2QUN), (b) *P_{SL}-Rhl* (2I57), (c) *Ecl-FI* (1FUI) の基質 (阻害剤) が結合した活性部位の構造, および予想される触媒反応機構
基質 (阻害剤) を太い結合で, 金属イオン, 水分子を球で示す.

イオン化していない Glu152 (*AtD-PE* では Glu150) が酸触媒として働く (反対側から C3 にプロトンを付加) という反応機構を提唱している. しかし, 逆反応の場合は, これら二つのグルタミン酸のイオン化状態も逆にならなければならず, この二つのグルタミン酸の反応方向によるイオン化制御機構については不明であるとしていた³⁾. そこで,

筆者らは, *PcD-TE* の X 線構造から, Glu152 が O3 と水素結合していることに着目し, C3-O3 proton-exchange 機構を提唱した (図 2(a) 下)⁴⁾. まず, Glu246 が C3 位のプロトンを引き抜く. それにともない基質は平面構造を持った *cis*-エンジオリート反応中間体になり, O3 位のプロトンが Glu152 に引き抜かれると同時に Glu246 からプロトンが

O3に移る。最後に Glu152 が C3 をプロトン化して反応が終わる。結果的に C3 と O3 上にあったプロトンが交換されたことになる。この反応機構だと、二つのグルタミン酸は常にイオン化されており、反応の方向によってイオン化状態が制御される必要はない。また、Glu152 および Glu246 の周囲の構造から、これらの pK_a はかなり低くなっていると予想され、イオン化されているということをサポートしている。

2. L-ラムノースイソメラーゼ

L-ラムノースイソメラーゼは、L-ラムノース（アルドース） \leftrightarrow L-ラムノース（ケトース）の異性化を可逆的に触媒する酵素であり、大腸菌の L-ラムノース代謝系において発見された。土壌菌 *Pseudomonas stutzeri* 由来 L-ラムノースイソメラーゼ (P_{SL-RhI}) は、L-ラムノースの他、D-アロース \leftrightarrow D-プシコースの異性化も触媒することから D-プシコースから D-アロースの生産に使われている⁵⁾。

X 線構造から得られた P_{SL-RhI}/D -アロース複合体の触媒活性部位の構造を図 2(b) 上に示す⁶⁾。 P_{SL-RhI} の触媒部位には二つ Zn^{2+} が存在し、これらはアミノ酸残基、水分子、基質により 6 配位 8 面体構造をとっている。ただし、 P_{SL-RhI} は Mn^{2+} 存在下で最大触媒活性を示すことから、本来、酵素は Zn^{2+} ではなく Mn^{2+} を持っている可能性が高い。基質の O1, O2, O3 は、金属イオンと配位結合するとともに、周囲のアミノ酸残基と水素結合を形成しており、酵素により厳密に認識されている。 O4 は His101 と、 O5 は Asp327 と、それぞれ水素結合を形成している。 O6 は、アミノ酸残基とは水素結合を形成せず、疎水環境に存在している。これは、本来の基質である L-ラムノース (6-デオキシマンノース) を認識するためであろう。 D-アロースと L-ラムノースは、4, 5 位のキラリティーが反転している。 P_{SL-RhI}/L -ラムノース複合体の X 線結晶解析を行ったところ、興味深いことに、L-ラムノースの O4 は Asp327 と、 O5 は His101 と水素結合していた。 P_{SL-RhI} は、基質の 4, 5 位のキラリティーの反転に対して、 His101 と Asp327 が逆に働いて基質認識を行っているということがわかった。

Petsko らのグループは、 *Streptomyces olivochromogenes* 由来 D-キシロースイソメラーゼ ($SoD-XI$) について、0.95 Å 分解能 X 線構造に基づき、hydride-shift 機構を提唱している⁷⁾。これは、金属イオンにより活性化された水分子 (ヒドロキシアニオン, OH^-) が酸-塩基触媒として働き、1 位 \leftrightarrow 2 位で水素が化学結合ごと移動することによってケトース \leftrightarrow アルドースの異性化が起こるというものである

(図 2(b) 下)。 P_{SL-RhI} と $SoD-XI$ の活性部位の構造はよく似ており、 P_{SL-RhI} においても、酸-塩基触媒として働くアミノ酸残基が基質の 1, 2 位付近になく、hydride-shift 機構が支持される。

3. D-アラビノースイソメラーゼ

D-プシコースからケトース \leftrightarrow アルドースの異性化を行うと 2 位水酸基のエピマーが生成するので、D-アロースと D-アルトロースが生じる。 D-プシコース \leftrightarrow D-アルトロース間の異性化には D-アラビノースイソメラーゼが用いられる。 D-アラビノースは 5 炭糖であるが 4 位までのキラリティーは D-アルトロースと同じである。

筆者らは、 *Bacillus pallidus* 由来 D-アラビノースイソメラーゼ ($BpD-AI$) の結晶化および予備的な X 線回折実験について報告し、現在、構造解析中である⁸⁾。 $BpD-AI$ は三次元構造既知の大腸菌 L-フコースイソメラーゼ ($EcL-FI$) とアミノ酸配列において 63% の相同性を持つことから、その反応機構についてある程度予想できる。図 2(c) 上に、 $EcL-FI$ と阻害剤である L-フシトールとの複合体の活性部位構造を示す⁹⁾。 Mn^{2+} に配位した Glu337 と Asp361 が基質をはさむように位置し、 $PcD-TE$ とよく似た構造をしている。 Schulz らは、この X 線構造に基づき、Glu337 と Asp361 が酸-塩基触媒として働き、cis-エンジオレート中間体を経るという $EcL-FI$ の反応機構を提唱している (図 2(c) 下)⁹⁾。 $BpD-AI$ においても Glu337 と Asp361 は保存されており、おそらく同様の反応機構であると考えられる。しかしながら、 $EcL-FI$ の構造は 2.5 Å 分解能で、基質 (阻害剤) の温度因子が高い等の問題点がある。また、なぜ、 $BpD-AI$ が炭素原子を一つ多く持つ D-アルトロースも基質とできるかについて明らかにするためにも、より高分解能の X 線結晶解析が必要である。

おわりに

単糖は分子内でヘミアセタールを形成し、鎖状と環状構造の平衡にあり、酵素が基質として捉えるのは環状構造だと考えられる。本稿では、鎖状になった基質について述べたが、酵素がどのように環状の基質を認識し開環するのか、 α , β -アノマーはどのように認識しているのかなど、まだまだ解明すべきことはある。最近、Langan らのグループは、中性子線回折により、 *Streptomyces rubiginosus* 由来 D-XI のプロトン化状態を正確に決定し、より包括的な触媒反応機構について説明しようとしている¹⁰⁾。今後、酵素/基質複合体の三次元構造は、より詳細な酵素触媒反

応機構の解明にとってますます重要となってくるであろう。

ここで紹介した筆者らの研究は、香川大学希少糖研究センター何森教授らの研究グループとの共同研究である。X線回折データ収集は、高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory, および SPring-8 にて行った。

- 1) Granström, T.B., Takata, G., Tokuda, M., & Izumori, K. (2004) *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 89–94.
- 2) Itoh, H., Okaya, H., Khan, A.R., Tajima, S., Hayakawa, S., & Izumori, K. (1994) *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 2168–2171.
- 3) Kim, K., Kim, H.-J., Oh, D.-K., Cha, S.-S., & Rhee, S. (2006) *J. Mol. Biol.*, **361**, 920–931.
- 4) Yoshida, H., Yamada, M., Nishitani, Y., Takada, G., Izumori, K., & Kamitori, S. (2007) *J. Mol. Biol.*, **374**, 443–453.
- 5) Leang, K., Takada, G., Fukai, Y., Morimoto, Y., Granstrom, T. B., & Izumori, K. (2004) *Biochim. Biophys. Acta*, **1674**, 68–77.
- 6) Yoshida, H., Yamada, M., Ohyama, Y., Takada, G., Izumori, K., & Kamitori, S. (2007) *J. Mol. Biol.*, **365**, 1505–1516.
- 7) Fenn, T.D., Ringe, D., & Petsko, G.A. (2004) *Biochemistry*, **43**, 6464–6474.
- 8) Takeda, K., Yoshida, H., Takada, G., Izumori, K., & Kamitori, S. (2008) *Acta Crystallogr. Sect. F*, **64**, 945–948.
- 9) Seemann, J.E. & Schulz, G.E. (1997) *J. Mol. Biol.*, **273**, 256–268.
- 10) Kovalevsky, A.Y., Katz, A.K., Carrell, H.L., Hanson, L., Mustyakimov, M., Fisher, S., Coates, L., Schoenborn, B.P., Bunick, G.J., Glusker, J.P., & Langan, P. (2008) *Biochemistry*, **47**, 7595–7597.

吉田 裕美, 神鳥 成弘

(香川大学総合生命科学研究センター)

Catalytic reaction mechanisms of the enzymes producing rare sugars based on X-ray structures

Hiromi Yoshida and Shigehiro Kamitori (Life Science Research Center & Faculty of Medicine, Kagawa University, 1750-1 Ikenobe, Miki-cho, Kita-gun, Kagawa 761-0793, Japan)

K63 結合型ポリユビキチン鎖選択的な脱ユビキチン化機構

1. ユビキチンとユビキチン鎖

ユビキチン (Ub) はタンパク質分解のシグナルとして

知られる¹⁾。分解される基質タンパク質には、鎖状に繋がった複数の Ub が共有結合により付加される。それを目印として認識したプロテアソームは、基質タンパク質を分解する。この Ub-プロテアソームによるタンパク質分解システムは、真核細胞に必須のシステムであり、その発見に対して 2004 年にノーベル化学賞が授与されている。近年では、タンパク質分解以外にも様々な細胞内プロセスを制御するシグナル分子として Ub が機能することも明らかになってきており、その重要性はますます注目されている。

通常、Ub は、自身の C 末端に保存されたグリシン残基と分解される基質タンパク質のリジン残基とのイソペプチド結合を介して基質タンパク質に付加されるが、自身のリジン残基を介して連続的に繋がることにより、ポリ Ub 鎖と呼ばれるポリマーを形成する。実際には、七つのリジン残基 (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) に加えて、N 末端のアミノ基を介して直鎖状に繋がることもできるため、結合に使われるリジン残基やアミノ基の違いによって、形と機能の異なる 8 種類のポリ Ub 鎖が合成される^{2,3)}。生体内で最も豊富に存在するのは、プロテアソームによる分解シグナルとして働く K48 結合型のポリ Ub 鎖であるが、それ以外の結合型のポリ Ub 鎖については、完全にその機能が理解されているわけではない。しかしながら、K63 結合型ポリ Ub 鎖については、DNA 修復や受容体の下方制御などにおいて重要なシグナルとして機能することが報告されている^{2,4,5)} (図 1A)。

2. 特定のユビキチン鎖を見分ける機構

生体内には繋がり方の異なるポリ Ub 鎖が存在しているが、Ub 鎖とそれを認識するタンパク質との複合体の立体構造の情報はほとんど無い。数少ない例の一つとして、K63 結合型ポリ Ub 鎖の合成を行う Ub 連結酵素 (E2) である Ubc13・Mms2 複合体の例があげられる⁶⁾。Ubc13・Mms2 複合体と Ub との複合体の結晶構造解析では、Ubc13・Mms2 複合体に結合した Ub 分子の C 末端 G76 が、結晶内で隣に接触している Ub 分子の K63 の近傍に位置していた。したがって、この隣の Ub 分子と Ubc13・Mms2 複合体との相互作用は、選択的に K63 結合型 Ub 鎖を合成する際に起きている状況と同様であると解釈できた。また、Ub-associated (UBA) ドメインと K48 結合型 Ub 二量体との複合体の結合モデルが予測されていたが^{7,8)}、K63 結合型 Ub 鎖と結合タンパク質との複合体の構造決定の例は報告されておらず K63 結合型 Ub 鎖を特異的に認識するメカニズムはほとんど解明されていなかった。