

高度好熱菌由来 ADP リボースピロリン酸分解酵素の反応経路
- 時間分割結晶解析と反応速度解析 -

**Reaction pathway of ADP-ribose pyrophosphatase
- Time-resolved X-ray crystallography and kinetic studies -**

神谷信夫¹, 甲斐健太郎¹, 中川紀子², 倉光成紀², 宮原郁子¹

Nobuo Kamiya¹, Kentaro Kai¹, Noriko Nakagawa², Seiki Kuramitsu², Ikuko Miyahara¹

(¹大阪市大院理, ²阪大院理)

(¹Osaka City Univ., ²Osaka Univ.)

e-mail: nkamiya@sci.osaka-cu.ac.jp

ADPリボースピロリン酸分解酵素 (ADPRase) はNudixファミリーに属し, 2価金属イオンの存在下, ADPリボース (ADPR) をAMPとリン酸化リボース (R5'P) に加水分解する. ADPRaseの結晶構造は, 高度好熱菌の酵素をはじめ既に複数報告されているが, その反応機構については, これまでに2種類のモデルが提唱されており, 未だ確定していない.

我々は, pH4.6で析出させたADPRaseの結晶にADPRをソーキングした後, 30mMのZn(II)イオンをソーキングして酵素反応を開始させ, 反応時間の異なる結晶をクライオトラップしてそれぞれの構造を決定することにより, 酵素反応の進行をその場観察することに成功した. その結果, (1) まずADPRaseのGlu86に配位したZnイオン (ZN2) がADPRを反応中間体構造に導き, (2) 続いてGlu82に配位したZnイオン (ZN1) が水を水酸化物イオンに活性化し, (3) それがインライン配置でADPRの α リン原子を親核攻撃してAMPとR5'Pを生成すること, (4) 加水分解後, R5'PはAMPより速やかに反応キャビティから系外に出るのに対し, (5) AMPはZN1との配位結合を維持して反応キャビティに残り, (6) 系のZnイオン濃度が高ければ, さらに第3のZnイオン (ZN3) を取り込んで安定化され, Glu82をブロックすることが判明した.

上記の反応経路は, ADPRaseの反応速度解析の結果とよく整合する. ADPRaseは, Znイオンの濃度が10-100 μ Mの領域で活性化され, 0.2mM以上では阻害効果を受ける. 活性化領域では, 反応速度の逆数はZnイオン濃度の逆数の2次関数として表され, ZN2とZN1が連続して作用することにより反応が進行することに対応している. 一方, 阻害領域の反応速度は, AMPの共存により減少し, R5'Pの共存により上昇する. 以上, ADPRaseの反応速度は, Znイオンと, 生成物であるAMP/R5'Pの濃度により影響され, 一見複雑な様相を呈するものの, 上述した反応経路のその場観察の結果に基づけば, すべてのデータを矛盾なく見事に説明できる.

これまでの構造生物学では多くの場合, ADPRaseについても同様に, 実際には反応しない基質類似体や生成物との複合体の結晶構造解析や, 活性に関与するアミノ酸残基を部位特定の改変した変異体に対する反応速度解析に基づいて, 酵素の反応機構が論じられてきた. しかしながら, このようにして得られた構造や特性は, 原理的には, 実際に進行する化学反応を反映していることを保証されていない. 酵素の反応機構は, 反応をその場観察し, 反応速度解析の結果と照合して初めて明らかにすることができるものである.