

システイン-NAD 共有結合複合体による

超好熱古細菌由来ホモセリン脱水素酵素の新規阻害形式

日大生産工(院) ○中村仁紀 東邦大・理工 緒方康平 大阪工大・工学 大島敏久
東邦大・理工 後藤勝 日大生産工 吉宗一晃

【緒言】

アスパラギン酸経路はアスパラギン酸(Asp)からリシン(Lys)、スレオニン(Thr)、メチオニン(Met)、イソロイシン(Ile)といったアミノ酸を生成する経路である。このアスパラギン酸経路は植物、細菌及び古細菌には存在するが、動物はこの経路を持っていないため、除草剤や抗生物質を作る際の標的ともなる。この経路に含まれる酵素のうち、ホモセリン脱水素酵素(HSDH)はアスパラギン酸経路の最初の分岐点であるホモセリンの合成に関わる酵素である。HSDHはNAD(P)H依存的にアスパラギン酸-4-セミアルデヒド(Asa)からホモセリンを生成する反応を可逆的に触媒する酵素である。細菌や植物由来のHSDHについては幅広く研究がされているが、生命の第3のドメインである古細菌由来のHSDHの研究はあまり進んでいない²⁾。これまでに超好熱古細菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来 HSDH(StHSDH)がシステイン(Cys)によって阻害を受けることが明らかになっている。そこでこのStHSDHのシステイン複合体の立体構造解析を行うとともにシステインによるStHSDHの阻害形式の考察を行った。

StHSDHは70°Cで20分間の熱処理を行うことによって熱成熟し活性化することや、StHSDHのホモ二量体の分子間のジスルフィド結合を還元条件下によって切断することによって活性化する²⁾。ホモセリン及びNADに対する熱成熟StHSDHの酸化型、還元型の K_m 、 V_{max} をTable1に示す。

Table 1. 酸化型と還元型の動力学的パラメータ

	Homoserine		NAD	
	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)
酸化型	0.21	0.81	0.31	1.0
還元型	0.54	1.8	0.33	1.3

【実験方法】

酵素の調製ではまず、発現プラスミドで形質転換を行った菌体をpH8.5のTris-HClで懸濁し超音波破碎によって菌体を破碎した。遠心上清の酵素液を70°Cで2時間の熱処理を行った。その遠心上清を10mM Tris-HCl(pH8.5)で透析を行った。透析後の酵素液をDEAE-TOYOPEARLを用いて陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。

StHSDHの活性測定はNADとホモセリン、還元剤である0.02 mM DTT、100 mM Tris-HCl(pH8.5)を加えて30°Cで340nmの吸光度の上昇を測定することで行った。1Uは毎分1 μ molの基質を変化させることができる酵素量として定義した。

アスパラギン酸経路においてAspから合成されるアミノ酸であるMet、Ile、Thr、Lys及びCysの5種類のアミノ酸と、システインと構造が似ているセリン(Ser)を10 mM加え、その阻害を確認し、阻害定数 K_i および阻害形式を調べた。阻害定数 K_i はDixon plotにより算出した。

構造解析ではStHSDHとCys、NADの複合体をX線構造解析を行う。また、StHSDH、NAD及びCysの三者複合体の吸光度スペクトルとStHSDH及びNADの複合体のものの差を測定することによってCysとNADの吸光度の確認を行った。

【結果、考察】

StHSDHは、NADとホモセリンからNADHとアスパラギン酸-4-セミアルデヒドを生成する反応を可逆的に触媒する。この2基質、2生成物の反応には酵素に基質の両方が取り込まれなければ反応が進行しないSequential機構と、1つずつ順に反応して生成物を作るPing pong機構の2種類がある。活性測定の結果、このStHSDHの反応機構はSequential機構で反応するということが分かった。よって

Cysteine-NAD covalent complex formed in the active site of *Sulfolobus tokodaii* homoserine dehydrogenase affords its novel type regulation

Sanenori NAKAMURA, Kouhei OGATA, Toshihisa OHSHIMA, Masaru GOTO and Kazuaki YOSHIMUNE

StHSDH が基質であるホモセリンと NAD を同時に取り込まなければ反応が進行しないということを示している。

各種アミノ酸を加えた場合の StHSDH への阻害の影響を Table2 に示す。Cys による阻害が最も大きく、アミノ酸を加えない場合の活性を 100%としたとき 5.2%まで活性が低下したことを確認した。また、Cys の各基質に対する阻害形式及び阻害定数 K_i を調べた結果を Table3 に示す。Cys とホモセリンは構造が異なるにも関わらず StHSDH と同じ活性部位を競い合うという興味深い結果を得ることができた。

StHSDH と NAD 及びシステインの複合体の構造解析を行ったところ 2.1Å の分解能を得ることができた。

Table2 アミノ酸による活性への影響

アミノ酸	相対活性(%)
無し	100
Methionine	100
Isoleucine	98
Threonine	97
Lysine	96
Serine	86
Cysteine	5.2

Table3 システインの各基質に対する阻害定数及び阻害形式
阻害定数(K_i) 阻害形式

NAD	0.55 (mM) 不競合阻害
Homoserine	0.011(mM) 競合阻害

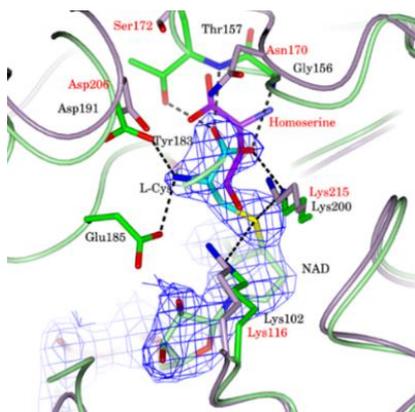


Fig. 1 StHSDH の NAD 及び Cys 複合体と PhHSDH とホモセリン複合体の重ね合わせの図

緑が StHSDH、マゼンタが PhHSDH である。中央にある Cys の硫黄原子と下部にある NAD のニコチンアミド環の C4 炭素原子が 1.9Å と非常に近い位置に位置するため、この二つの原子が共有結合を形成している可能性がある。

この活性中心を超好熱古細菌である *Pyrococcus horikoshii* の HSDH(PhHSDH)のホモセリン複合体のものと重ね合わせ、比較を行った結果を Fig. 1 に示す。StHSDH のホモセリン結合部位に Cys が結合することが示された。また、Cys は StHSDH の Glu185 残基と水素結合していることが分かった。PhHSDH にはこの Glu185 残基に相当するアミノ酸残基が存在しないため、この Glu185 残基が Cys による結合と阻害に関係していることが予想できる。

StHSDH、Cys 及び NAD の複合体と、StHSDH と NAD の複合体の吸収スペクトルを測定した結果、Fig. 2 に示すようにその差から 320nm 付近にピークが確認された。このことから、Cys と NAD の共有結合が示唆された。アミノ酸中の Cys ではなく遊離している Cys が NAD と共有結合を形成するのはこれまで確認されておらず初めての発見となった。

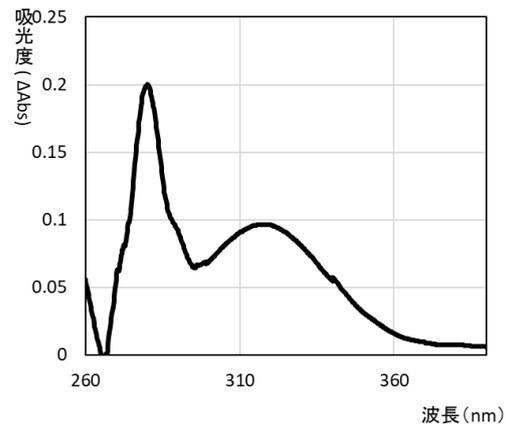


Fig. 2 Cys-NAD のスペクトル差

StHSDH、Cys 及び NAD の複合体の吸収スペクトルと StHSDH と NAD の複合体のものの差を測定した。Cys と NAD が共有結合を形成する際、320nm 付近に差スペクトルが確認される³⁾。この結果からも Cys と NAD 間の共有結合が示唆された。

【参考文献】

- 1) Omori, K *et al.*, Journal of Bacteriol. (1993) 175, 785-794
- 2) Tomonaga, Y *et al.*, Biochem. Biophys. (2015) 73, 594-651
- 3) Diaz-Sanchel A G. *et al.*, Biochem. J. (2011) 439, 443-452