

NAD アナログを用いた超好熱古細菌由来ホモセリン脱水素酵素の
システインによる阻害

日大生産工(院) ○中村仁紀 大工大・工 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。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(Table2)。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℃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。また、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(Table1)。

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

Table2 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	550 (μ M)	不競合阻害
Homoserine	11 (μ M)	競合阻害

システインはホモセリンよりも炭素原子が 1 つ少なく構造が大きく異なっているにもかかわらずホモセリンと競合阻害する。つまり酵素の同じ部位に結合すると考えられる。

立体構造解析を行った結果、システインはホモセリンの結合部位に結合し、その硫黄原子が NAD のニコチンアミド環の C4 炭素原子と共有結合を形成していることが分かった。また、同じ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、推測される StHSDH のホモセリン結合部位にシステインが結合することが示された(Fig1)。

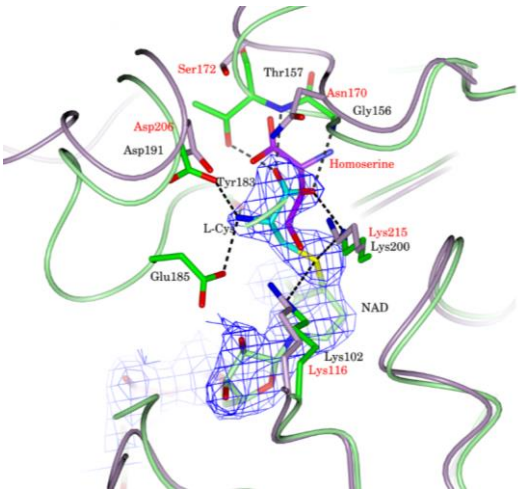


Fig. 1 StHSDH の NAD 及び Cys 複合体と PhHSDH とホモセリン複合体の重ね合わせの図

緑が StHSDH、マゼンタが PhHSDH である。中央の Cys はホモセリン結合ポケットに結合していることが示唆された。このことはホモセリンに対するシステインによる阻害形式(競合阻害)の結果と矛盾しない。

システインはホモセリンと構造が大きく異なるにもかかわらず StHSDH のホモセリン結合

Effect of NAD analogues on the inhibition of homoserine dehydrogenase of
Sulfolobus tokodaii by cysteine

Sanenori NAKAMURA, Toshihisa OHSHIMA, Masaru GOTO and Kazuaki
YOSHIMUNE

部位と同じ部位に結合する。その理由として、システインがNADと共有結合を形成していることが重要であると考えられる。そのため本実験でNADの代わりにNADと酸化還元電位の異なるNADアナログを用いてシステインによる阻害を測定し、共有結合と阻害定数への影響を調べた。

NAD アナログとはNADとよく似た構造をしている異なる化合物のことである。本実験ではNADのアミド基の窒素がCH₃に置換された Acetylpyridine Adenine Dinucleotide(APAD)、同じくアミド基の窒素が水素に置換された Pyridinealdehyde Adenine Dinucleotide (PAAD)、アミド基の酸素原子が硫黄に置換された Thionicotinamide Adenine Dinucleotide(thio-NAD)の3つを使用した(Fig2)。

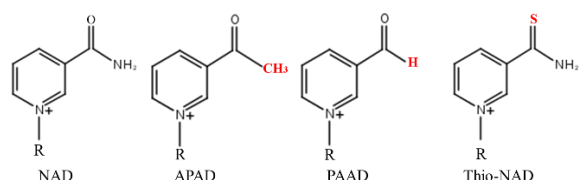


Fig. 2 NAD アナログの構造式
NAD 及び NAD アナログのニコチンアミド環の構造式を示す。APAD と PAAD はニコチンアミド環のNH₂がそれぞれCH₃とHに、Thio-NAD はニコチンアミド環のOがSに置換されている。

【実験方法】

酵素の精製ではまず、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℃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℃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 μmol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。

【結果、考察】

NAD アナログを用いて求めた結果、NADを用いた場合よりもNADアナログを用いた方がいずれもK_iが小さくなる結果が得られた(Fig3)。これはNADアナログの方がNADよりもシステインと共有結合を形成しやすいことが原因として

考えられる。アミド基のNH₂よりもCH₃、水素原子の方が電子供与性が強いAPAD、PAADの方が酸化還元電位が大きくなる。同じようにThio-NADの場合も酸素よりも硫黄原子の方が原子が大きく電子供与性が強くなるため酸化還元電位が大きくなる。そのため今回用いたNADアナログは全てNADよりも共有結合を形成しやすくK_iが小さくなったと考えられる。

APADはPAADよりやや高い酸化還元電位を持つがK_iがより大きいことの原因として置換基のかさ高さが関係していると推測できる。CH₃よりもHの方が小さくNADアナログの炭素原子にシステインの硫黄原子がより結合しやすい条件であったためであると推測できる。このことからPAADの方が酸化還元電位が高いにもかかわらずK_iが小さくなった原因であると考えられる。

Table3. システインのNAD アナログのに対する阻害定数と酸化還元電位

	NAD	APAD	PAAD	Thio-NAD
K _i (μM)	550	30	10	300
Redox Potential (mV)	-0.32	-0.258	-0.262	-0.285

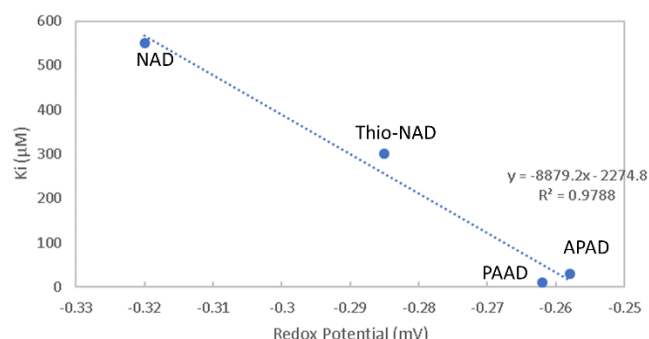


Fig. 3 阻害定数と酸化還元電位の関係
縦軸がシステインのNAD及びNADアナログに対する阻害定数K_i、横軸が酸化還元電位である。酸化還元電位が小さくなるほどK_iが小さくなる、つまりシステインとより強く共有結合を形成することを示す。

【参考文献】

- 1) Kohei Ogata *et al.*, Scientific Reports 5749 (2018)
- 2) Haruhiko Sakuraba *et al.*, Scientific Reports 11674 (2015)