

超好熱アーキア由来ホモセリン脱水素酵素の NADP による阻害

日大生産工(院) ○渡辺 一矢 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

1. 緒言

超好熱菌は 90°C 程度の高温でも生育できる菌のことで、海底火山などに生育し、多くはアーキアに分類される。アーキアは生物分類の最上位の階級であるドメインを形成し、動植物が含まれる真核生物や大腸菌などを含む真正細菌とは異なる生物に分類されている。アーキアのゲノムサイズは真核生物のものよりもかなり小さく、真正細菌の半分程度である。アーキアの代謝経路は他のドメインのものとは異なる特徴をもつことが知られている。超好熱アーキア由来の糖ヌクレオチド合成酵素は広い基質特異性を持ち、二機能をもつ。一つの酵素が多段階の反応を触媒することはことと矛盾しない。アーキアゲノムには生育に必要な代謝経路の酵素遺伝子群が同定されていないものが多数存在する。これは比較的研究が進んでいる既知の真正細菌と真核生物の酵素遺伝子との相同性の低さが原因であると考えられている。この様にアーキアには独特な代謝系及び酵素が存在するため、アーキア由来酵素を用いることで既存の酵素とは異なった全く新しい酵素利用法の開発も可能となる。

アスパラギン酸経路はアスパラギン酸からメチオニン、トレオニン及びイソロイシンを生合成する経路である (図 1)。動物にはこの代謝経路が存在しないため、ヒトの場合はこの経路で合成されるこれらアミノ酸は必須アミノ酸であり、必ず摂取する必要がある。ホモセリン脱水素酵素(HSDH)はアスパラギン酸経路において還元型のニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)依存的に

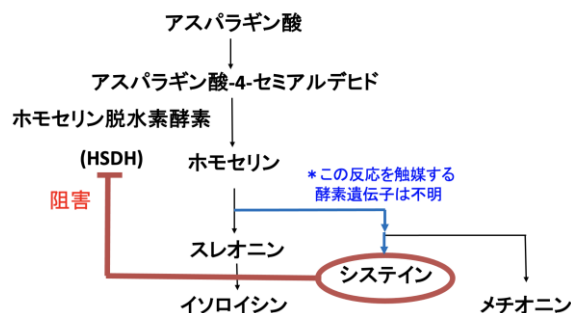
*S. tokodaii*のアスパラギン酸経路

図 1. アスパラギン酸経路

アスパラギン酸-4-セミアルデヒドからホモセリンを合成する反応を触媒する酵素で、この代謝系の反応速度を調節する鍵酵素であることが多い。*Sulfurisphaera tokodaii* は温泉から単離された生育限界温度 87°C、酸性 (pH3) 条件を好む好気性好酸性のアーキアである。*S. tokodaii* 由来ホモセリン脱水素酵素 (StHSD) はアスパラギン酸経路によって合成されるシステインによって阻害されることが明らかになっている。

NAD は StHSD のような酸化還元酵素の働きを助ける補酵素の一つで、酵素によって酸化される際に NAD は還元され NADH となる。NAD を構成するリボース部分の 2 位のヒドロキシ基にリン酸がエステル結合したものがニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADP) である。NAD と NADP の構造の違いはリン酸エステルの有無だけであるが、生体内では厳密に区別され、還元的な生合成における電子供与体は NADPH であることが多い。

Inhibition of homoserine dehydrogenase
from hyperthermophilic archaeon by NADP

Kazuya WATANABE, Toshihisa OHSHIMA, Masaru GOTO and Kazuaki YOSHIMUNE

本研究ではStHSDがNADPによって阻害される際の阻害形式や阻害定数を明らかにした。

2. 実験方法

StHSD推定遺伝子をPCRで増幅し発現ベクターpET101に挿入した。この発現プラスミド pHSDH で *Escherichia coli* BL21(DE3)を形質転換し、得られた組換え体を培養し、集菌後、超音波破碎により得られた無細胞抽出液を粗酵素液とした。陰イオン交換クロマトグラフィーである DEAE-TOYOPEARL に供し、10 mM tris (pH 8.0) に50mM NaClを加えた溶出液でHSDHを溶出させ精製酵素とした。StHSD活性は100mM tris (pH8.0)、10mM L-ホモセリンおよび10mM NAD存在下で30°CでNADHの生成を340nmで測定することにより行った。タンパク質濃度は BCA protein assay kit (ThermoScientific Pierce)を用いて行った。1 Uは1分間に50°Cで1 μ molの生成物を生成する酵素量とした。

3. 結果

NADP による阻害を調べたところ、阻害定数は 30 μ M であった。

このL-Cysteineによる阻害形式を調べたところ、L-Homoserineに対して競合阻害、NADに対して不競合阻害であったため、L-ホモセリンの結合部位にL-Cysが結合していることが考えられた。

参考文献

- 1) Ogata, K. *et al.* Sci. Rep. 2018,8,5749.
- 2) T. Wakamatsu, *et al.*,

Extremophiles .,17,:379-389,(2013)

- 3) T. Ohshima *et al.*, *Biosci Biotechnol Biochem.*,76 (9),:1601-1610,(2012)

- 4) Ohshima, T. *et al.*, *App. Environ. Microbiol.*1998,64,6 ,2152-2157