

超好熱アーキア由来ホモセリン脱水素酵素の熱成熟による 基質結合領域の構造変化と基質に対する親和性の変化

日大生産工(院) ○久保田 達哉 東邦大理 後藤勝
大工大工 大島敏久 日大生産工(院) 吉宗一晃

1. 緒言

ホモセリン脱水素酵素(HSDH)はアスパラギン酸からスレオニンなどの必須アミノ酸を合成する経路であるアスパラギン酸経路の鍵酵素である。生育至適温度が約 80°Cの超好熱アーキア *Sulphurisphaera tokodaii* 由来 HSDH(StHSDH)を常温性の大腸菌 (37°C培養)で遺伝子組換え生産すると活性の低い未成熟酵素が得られる。この未成熟酵素は 70°Cで 3時間の熱処理を行うと活性が約2倍高い熱成熟酵素となる。未成熟酵素の立体構造解析に初めて成功し、既知の熱成熟酵素の構造と比較した。本報告では、未成熟酵素と熱成熟酵素の構造と活性の違いについて報告する。

全生物は真核生物、真正細菌、アーキアの3つに大別することができる。1977年から1990年にかけて米国イリノイ大学のWoeseらによって全生物を16S rRNA系統解析によって全生物を真核生物ドメイン、真正細菌ドメイン、アーキアドメインの3つに大別、3ドメイン説が提唱された。

一般的に酵素等は熱に弱く過剰の熱が加わると変性しその活性を失ってしまう。しかしながらアーキアの中でも超好熱アーキアと呼ばれるものは70°C以上に至適生育温度を有し、酵素が高い熱安定性を有する物も存在していることが確認されている。

酵素は生体触媒で、20種類のアミノ酸が100~1000個つながったひものようなタンパク質からできており、細胞内のリボソームで遺伝子情報により生産される。このひものようなタンパク質が生産されると一つの形に折りたたまれ、本来の触媒機能(活性)をもつ立体的な構造を形成する。この折りたたみは生物(細胞)が正常に増殖できる環境(温度など)では非常に早いので、これまでその途中の未熟な酵素の形はなかなか捉えることができないとされている。

一般に酵素分子はボール状の形をしており、基質と結合し触媒機能を発揮する活性中心部位とそれを支える構造形成部位が連携して存在する。この活性中心部位は基質(NAD)と結合する前は開いた構造をとっており、基質が結合すると閉じた構造へ大きく変化する。

HSDH(EC.1.1.1.3)は酸化還元酵素に分類される。HSDHは細菌や植物に存在し、アスパラギン酸からメチオニン、トレオニン及びビソロイシンなどの必須アミノ酸を生合成する経路の反応を触媒する。このアスパラギン酸経路は植物や真菌、細菌及びアーキアには存在するが、動物はこの経路を持っていないため、HSDHの阻害剤はヒトに害のない除草剤や抗生物質を作る際の標的にもなる経路の一つである。

本研究で用いられる酵素は、超好熱アーキア(古細菌)由来である。未成熟酵素と熱成熟酵素の構造の違いを明らかにするために超好熱アーキアの遺伝子を大腸菌で組換え生産し、得られた組換え酵素を精製した。

2. 実験方法および測定方法

酵素の比活性とタンパク質定量の作成のために検量線を作成した。検量線作成にはBCA法を用い、標準タンパク質にウシ血清アルブミンを用いた。

超好熱古細菌由来のStHSDHに遺伝子ST1519を挿入した発現プラスミドpST1519で大腸菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)株を形質転換した。その後、37°Cで拡大培養した。大量培養によって得られた培養液を遠心分離して集菌した。集菌後、氷上で超音波破碎をした。破碎後に遠心分離して上清を回収し、透析を行った。

得られた上清を熱処理せずにDEAE TOYOPEARL樹脂を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーで夾雑タンパク質の除去を行

Conformational changes in substrate-binding regions and substrate-binding affinity by thermal maturation of homoserine dehydrogenase from hyperthermophilic archaeon

Kubota Tatsuya, Goto Masaru, Ohshima Toshihisa and Yoshimune Kazuaki

った。カラムに充填した樹脂にTris-HCl を流して平衡化を行った。酵素液を注ぎ樹脂にStHSDH を吸着させた。吸着後、カラムにTris-HClを流すことで非吸着タンパク質を除去した。カラムをTris-HCl で洗浄した後、各濃度の NaClを加えたTris-HClをカラムに順次流すことで未成熟 StHSDH を溶出させた。また、アポ酵素(NADPが添加していない未成熟酵素)を得るためにBlue-Sepharose樹脂を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行った。Blue-Sepharose樹脂にはアデニル基に似たリガンドがあるためNADPを持たない未成熟酵素をカラムに結合させ、その後塩を加えたバッファー(Tris-HCl (pH8.0))で溶出した。

酵素活性測定は分光光度計で行った。ホモセリン存在下、NADからNADHの30°Cでの変換速度を340 nmの吸光度測定で活性測定した。活性測定後、作成した検量線を用いて反応速度を算出した。その後、Lineweaver-Burk plotを用いて酵素の動力学的パラメータである V_{max} , K_m の算出を行った。また、酵素の協同性の確認としてHill plotによってHill 係数を算出し、比較を行った。阻害作用が見られた場合にはLineweaver-Burk plot を用いて阻害形式を確認後、Morrisonの式を用いて見かけの阻害定数 K_i を算出した。精製タンパク質の純度はSDS-PAGEで確認した。

結晶化はハンギングドロップ法(蒸気拡散法)を用いた。形の良い結晶を高エネルギー加速器研究機構(KEK)に試料として送り、X線回折像を得た。X線構造解析は配列のみが示されている2次元的数据であるため、結晶構造解析ソフトであるCCP4によって3次元的数据に変換した。その後、StHSD を参照しながら分子置換法により立体構造モデルを作成した。

3. 実験結果, まとめ

結晶構造解析により、Blue-Sepharose樹脂で精製した未成熟酵素はアポ酵素(NADPが添加していない未成熟酵素)であることが分かった。この未成熟アポ酵素は70°Cで2時間の熱処理により、約2倍活性化した。基質結合領域から186番目のグルタミン酸残基の位置が未成熟酵素よりも熱成熟酵素のほうが開いた位置にあることが分かった(図1)。基質が結合したとき、186番目のグルタミン酸残基は基質結合によって38番目のアルギニン残基と水素結合を形成して蓋をするような形となる。基質結合領域が相対的に開いた結果、基質のターンオーバーがされやすくなり活性化につながったと

考えている。ターンオーバーがされやすくなったということは基質が結合して離れる動作がスムーズになり、結果として活性が上昇したと考えている。

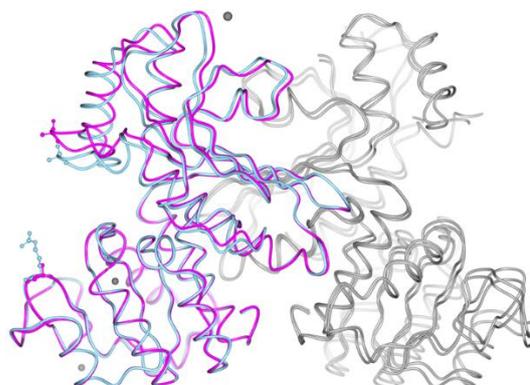


図1 未成熟アポ酵素と熱成熟アポ酵素二量体構造を持つ超好熱アーキア *S. tokodaii*由来HSDHの熱成熟酵素(マゼンタ)と未成熟酵素(水色)のサブユニットを重ねて、もう片方のサブユニットを灰色で表した。

基質結合による構造変化は未成熟酵素でも熱成熟酵素でも基質結合領域である146~225番目のアミノ酸残基で起こっていた。その中でも特に160~190番目のアミノ酸残基で変化していた。160~190番目のアミノ酸残基は基質結合領域の入り口に位置するアミノ酸で、熱成熟酵素のほうが基質結合領域が大きく開いた構造となったことが分かった。また未成熟酵素よりも熱成熟酵素の構造変化が大きいことが分かった。

未成熟酵素は熱成熟酵素より基質結合による構造変化が小さいためターンオーバーが非効率に行われ、結果として活性が低いということが分かった。これは加熱によって疎水性相互作用が増加して、温度安定性が強化されたと考えている。

参考文献

- 1) Mamounis, K. *et al.* , J. Biol. Chem., **2020**, *295*, 6472-6481
- 2) Lázaro, M. *et al.* , Commun. Biol., **2021**, *684*, 1-8
- 3) Ayan, E. *et al.* , Commun. Biol., **2022**, *73*, 1-13
- 4) Ogata, K. *et al.* , Sci. Rep., **2018**, 5749, 1-8
- 5) Kubota, T. *et al.* , Commun. Biol., **2022**, *704*, 1-7