

還元剤添加による超好熱アーキア由来ホモセリン脱水素酵素の構造と機能の変化

日大生産工(院) ○平山 泰史 東邦大理 後藤勝

大工大工 大島敏久 日大生産工 吉宗一晃

1. 緒言

ホモセリン脱水素酵素はアスパラギン酸経路の鍵酵素であり、NAD(P)H依存的にアスパラギン酸 4-セミアルデヒド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。超好熱アーキア *Sulphurisphaera tokodaii* 由来ホモセリン脱水素酵素 (StHSD) を中温菌である *Escherichia coli* を用いて37°Cで組換え生産を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, 2時間の熱処理で活性の高い熱成熟酵素となる。

一般に55°C以上に生育至適温度を示す微生物を好熱菌という。生育温度に応じて55~75°Cの範囲で生育可能な中等度好熱菌, 生育上限温度が75°Cを超える高度好熱菌, さらに生育至適温度が80°C以上でも生育する超好熱菌に分類される。

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が, 超好熱菌由来の酵素は常温生物の酵素の熱変性温度でも熱変性しない。¹⁾

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の部位とそれを支える構造形成部位が連携して存在する。StHSDの活性中心部位は基質を捕まえるときに口をひらいた状態の構造をとっており, 基質が結合すると全体の構造が閉じた構造へ大きく変化する。

Sulphurisphaera tokodaii 由来ホモセリン脱水素酵素の熱成熟酵素と未成熟酵素のアポ酵素を比較すると, 基質結合領域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ている。基質結合領域が開くことによって, 基質のターンオーバーがしやすくなり, 熱成熟酵素の活性が高くなると考えられている。²⁾

これまでに未成熟酵素のNAD⁺複合体の構造を明らかにしている。NAD⁺はリボースの2位にリン酸がエステル結合したもので, 未成熟

酵素の基質結合領域にあるArg38と水素結合を形成する。

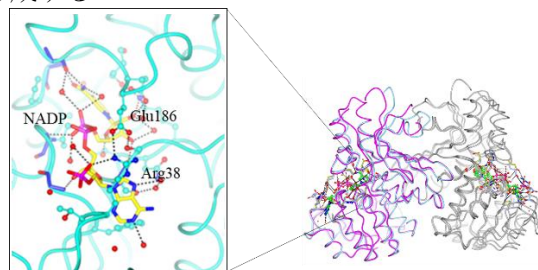


図1. 触媒領域の一部 (水素結合は点線)

未成熟酵素と熱成熟酵素は2つのサブユニットのC末端領域にあるC303残基間でジスルフィド結合を形成している。熱成熟酵素はジスルフィド結合をジチオトレイトール等の還元剤を添加することによる還元的切断で活性化することが分かっている。³⁾

本実験では, 未成熟酵素と熱成熟酵素の構造の違いから, その機能に違いがあると考え, 未成熟酵素と熱成熟酵素を還元的切断させた場合とさせなかった場合のNAD⁺, NADP⁺, ホモセリンに対する V_{max} , K_m を測定し, その違いを調べた。

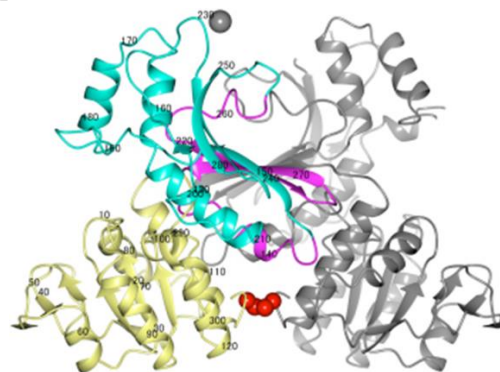


図2. 構造のジスルフィド結合 (ジスルフィド結合は赤球)

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。

Structural and functional changes of homoserine dehydrogenase from hyperthermophile by the addition of a reducing agent

Yasufumi HIRAYAMA, Masaru GOTO, Toshihisa OHSHIMA and Kazuaki YOSHIMUNE

超好熱古細菌由来のStHSD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 StHSD 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、その後に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(P)⁺ から NAD(P)H の 30°C での変換速度を 340 nm の波長で、分光光度計を用いて測定した。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、基質濃度に対する酵素比活性をプロットし、Excel で Michaelis-Menten 式にフィッティングすることによっ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。精製タンパク質の純度は SDS-PAGE で確認した。

3. 結果及び考察

熱成熟酵素と未成熟酵素の動力学的パラメータである V_{max} 、 K_m を測定したところ、熱成熟酵素と比較して未成熟酵素は NADP⁺ に対する K_m が低いということがわかった(表1)。

このことから、未成熟酵素は熱成熟酵素より補酵素に対して高い親和性を持つことがわかる。この理由として、未成熟酵素は基質ポケットを熱成熟酵素のように大きく開くことができないため、NADP⁺ との複合体で形成される酵素の Arg38 との水素結合を形成しやすく、基質が離れにくくなり、親和性が高くなると考えられる。反対に、熱成熟酵素は、基質ポケットを大

きく開くことができるため、水素結合を形成しにくいことが考えられる。

表1. 還元処理をしないStHSDの動力学的パラメータ

| 酵素 | 基質 | V_{max} (U/mg) | K_m (mM) |
|-------|-------------------|------------------|------------|
| 熱成熟酵素 | NAD ⁺ | 1.8 | 0.67 |
| | NADP ⁺ | 0.13 | 0.54 |
| | ホモセリン | 1.8 | 0.29 |
| 未成熟酵素 | NAD ⁺ | 0.37 | 0.32 |
| | NADP ⁺ | 0.03 | 0.046 |
| | ホモセリン | 0.45 | 0.19 |

次に、還元剤を添加して熱成熟酵素と未成熟酵素の動力学的パラメータである V_{max} 、 K_m を測定したところ、還元剤を添加していない場合と同様に、未成熟酵素は NADP⁺ に対する K_m が低いということがわかった(表2)。また還元剤を添加したことによって熱成熟酵素の NADP⁺ に対する K_m がさらに上昇した。

この理由として、熱成熟酵素のジスルフィド結合を切断したことによって、基質結合領域が広がったことが考えられる。結合領域が広がったことによって、NADP⁺ との複合体で形成される酵素の Arg38 との水素結合がさらに形成しにくくなったためと考えられる。

表2. 還元剤存在下の動力学的パラメータ

| 酵素 | 基質 | V_{max} (U/mg) | K_m (mM) |
|-------|-------------------|------------------|------------|
| 熱成熟酵素 | NAD ⁺ | 2.1 | 0.63 |
| | NADP ⁺ | 0.11 | 2.5 |
| | ホモセリン | 1.8 | 0.16 |
| 未成熟酵素 | NAD ⁺ | 0.36 | 0.35 |
| | NADP ⁺ | 0.0047 | 0.081 |
| | ホモセリン | 0.38 | 0.14 |

参考文献

- 1) Kumar, S. *et al.* Biochemistry. **2001**, 40(47), 14152-14165
- 2) Kubota, T. *et al.* Commun Biol. **2022**, 14, 704
- 3) Tomonaga, Y. *et al.* Biochem. Biophys. Rep. **2015**, 3, 14-17.