

熱成熟で構造変化する超好熱アーキア由来ホモセリン脱水素酵素の変異酵素の作製

日大生産工(院) ○平山 泰史 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において中心的な役割を果たす鍵酵素である。この酵素は、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触媒する。また、その過程では補酵素であるNADHまたはNADPHが必要とされる。この反応は可逆的に進行し、ホモセリンがアミノ酸生合成の重要な中間体として生成される。

アスパラギン酸経路は、メチオニン、スレオニン、イソロイシンなどの必須アミノ酸の合成に関与しており、特に植物や微生物にとっては生命活動に不可欠である。

さらに、この酵素は哺乳類には存在しないため、ホモセリン脱水素酵素は抗生物質や除草剤のターゲットとしても注目されている。植物や微生物のみに存在する酵素であるため、これを標的とすることで、選択的にそれらの生物の成長を抑制することが可能である。このため、ホモセリン脱水素酵素は医薬品や農薬開発の面で注目されている。

酵素の機能は、活性部位の立体構造やアミノ酸配列に依存しており、特定のアミノ酸残基が酵素の触媒活性や基質特異性に重要な役割を果たす。酵素の機能や構造を詳細に理解するためには、特定のアミノ酸残基の役割を検証することが重要である。¹⁾

超好熱アーキア *Sulfurisphaera 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。

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⁾

一般的に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を越える高度好熱菌、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。

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。

Sulfurisphaera 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⁾

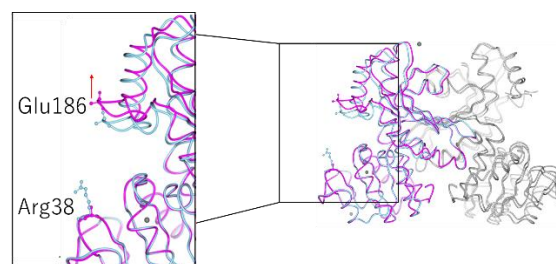


図1. StHSDの基質結合領域の比較（シアンが未成熟酵素、マゼンタが熱成熟酵素）

未成熟酵素の195番目のフェニルアラニン (F195)は、剛性領域（160–180残基）と蓋部分（181–190残基）の間に位置している。未成熟酵素と熱成熟酵素のこの領域を比較すると、14.75度の回転と2.83Åのずれが生じており、F195がこの構造変化に関与していることが考えられる。

F195はL190およびN193との疎水クラスターを形成しており、これが未成熟酵素における折りたたみを阻害していると考えられている。

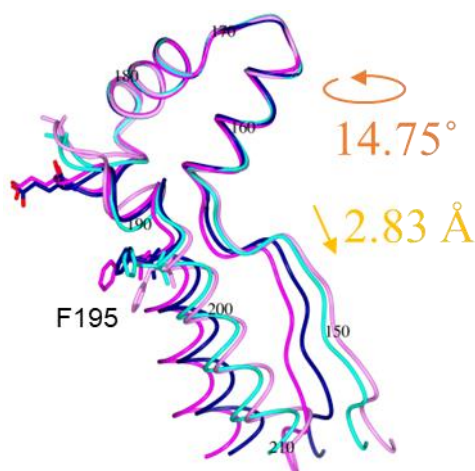


図2. StHSDの構造比較(シアンが未成熟酵素、マゼンタが熟成熟酵素)

本研究では、F195をアラニンに置換した変異体酵素を作成し、このアミノ酸残基が熟成熟および酵素活性に与える影響を評価する。

2. 実験方法および測定方法

酵素の比活性とタンパク質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。

野生型酵素の作製は、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、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た。

変異プラスミドの作製はKOD-Plus-Mutagenesis Kitのプロトコルに沿って作製し、アガロースゲル電気泳動によって、変異導入の確認を行った。変異導入の確認を行った変異プラスミドで大腸菌BL21を形質転換した。その後、37°Cで拡大培養し、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、破碎後に遠心分離して上清を回収した。

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340 nmの吸光度を、分光光度計を用いて活性測定した。活性測定は、野生型酵素と変

異型酵素をそれぞれ40°C、50°Cで30分、60分、90分、120分加熱し、活性測定を行った。活性測定後、作成した検量線を用いて反応速度を算出し、熟成熟の変化を確認した。

3. 結果及び考察

アガロースゲル電気泳動の結果目的の位置でバンドを確認できた。

40°C、50°Cにおける120分間の加熱による活性の変化を図.3、図.4に示した。

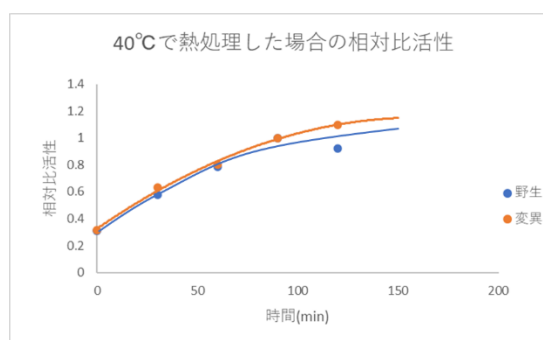


図3.40°Cで熱処理した場合の相対比活性

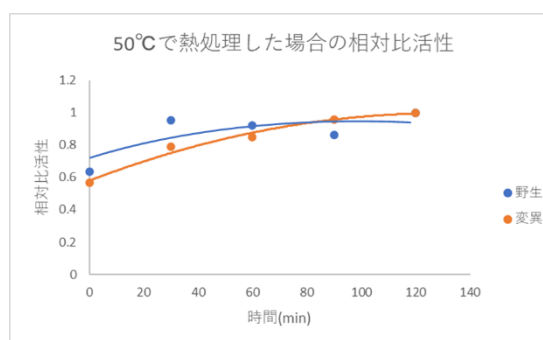


図4.50°Cで熱処理した場合の相対比活性

いずれの温度においても熟成熟に大きな変化は見られなかった。このことから195番目のフェニルアラニンの疎水クラスターを解消しても、未成熟酵素の構造のずれは変わらず生じていると考えられる。

参考文献

- 1) Buccitelli, C. et al. *Nat. Rev. Genet.* **2020**, *21* (10), 630-644.
- 2) Kubota, T. et al. *Commun Biol.* **2022**, *14*, 704.
- 3) Kumar, S. et al. *Biochemistry.* **2001**, *40*(47), 14152-14165.