

超好熱アーキア由来ホモセリン脱水素酵素の基質ホモセリン結合による構造変化

日大生産工(院) ○日高瀬名 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

アーキアとは真核生物でも細菌でもない3つ目のドメインである。アーキアと真正細菌は原核生物であるにも関わらず生化学的性質を調べるとアーキアは真正細菌より真核生物に近い性質を持っていることがわかっている。古細菌には、好熱性古細菌、高度好塩菌やメタン菌が含まれている。古細菌の定義は16SリボソーマルRNA 遺伝子の塩基配列の特徴によって定義されている。¹⁾

一般に、大腸菌などの常温菌は30℃から37℃が生育至適温度となっており、高温環境では生きていくことができない。しかし、50℃以上でも生育できる好熱菌、50℃以上かつ50℃未満でも生育できる好熱菌を中等度好熱菌が存在する。また、生育至適温度が80℃を超えるものを超好熱菌といい、その多くはアーキアである。

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、アスパラギン酸からシステイン、メチオニン、スレオニンおよびイソロイシンを合成する際の中間の代謝産物であるホモセリンの合成に関与する酵素である。一般にHSDHはアスパラギン酸経路の代謝産物の1つであるL-スレオニンによって阻害され、その基質であるアスパラギン酸-4-セミアルデヒドが増加することで、リシンへの生合成速度が相対的に高まるため、アスパラギン酸経路の鍵酵素といえる。また、HSDHはヒトには存在せず、植物や真菌類、細菌類などにしか存在していない。そのため、HSDHに注目した抗生物質や除草剤の開発が期待されている。

超好熱アーキアである*Sulphurisphaera tokodaii*由来のHSDHの機能解析が行われており、この菌由来のHSDHを大腸菌を用いて37℃で組換え生産すると、基質ホモセリンに対する活性の低い未成熟酵素が得られる。また、この組換え生産された未成熟酵素は70℃で熱処理すると、

活性の高い熱成熟酵素になることがわかっている。²⁾

これまでの研究でStHSDHはシステインによる阻害を受けることがわかっている。³⁾ホモセリンはセリンの側鎖がメチレン基で延長され、末端にヒドロキシ基を持つのに対し、システインは側鎖の末端がチオール基となっており、この構造の類似性が代謝阻害に影響していると考えられる。

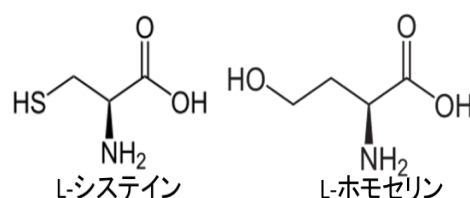


図1. システインとホモセリンの構造

本来の反応であるホモセリンはStHSDHによって代謝されるため、その複合体の構造解析の報告が未だ無い。そのため、本研究ではホモセリンとStHSDHの結合時に補酵素として作用しているNAD(P)を添加しないことにより、反応を進めずにStHSDHのホモセリン複合体の結晶化を試みる。得られた結晶の構造解析を行うことにより、StHSDHのホモセリン複合体の立体構造を解明するとともに、StHSDHにおけるホモセリンとシステインの結合位置を比較することを目的とする。

2. 実験方法

2-1 大腸菌TOP10の形質転換

超好熱アーキア由来のStHSDHに遺伝子ST1519を挿入した発現プラスミド pST1519で大腸菌TOP10を形質転換した。コンピテントセルを氷上で溶かし、発現プラスミドを2 μl添加した後、氷上で30分インキュベートした。その後、42℃で1分間ヒートショックを行い、再度氷上で1分間静置した。その後、LB液体培地を500 μl加え、37℃で1時間振盪培養を行った。振盪培養後、LB寒天培地に塗布した。塗布後、LB

Effect of Homoserine Substrate Binding on the Three-Dimensional Structure of a Hyperthermophilic Archaea-Derived Homoserine Dehydrogenase

Sena HIDAKA, Toshihisa OHSHIMA, Masaru GOTO, Kazuaki YOSHIMUNE

寒天培地表面の乾燥が確認できたら、37°Cで一晩インキュベートした。

2-2 プラスミド精製

LB液体培地5ml入った試験管にアンピシリンを10 µl添加し、大腸菌TOP10の形質転換で得たコロニーを植菌し、一晩37°Cで振盪培養した。培養液が濁っていることを確認し、集菌した。集菌したものをISOSPIN Plasmidを用いて、プラスミド精製を行った。

2-3 拡大培養

得られた精製プラスミドを用いて2-1と同様の手順で大腸菌BL24を形質転換し、できたコロニーを用いて37°Cで拡大培養を行った。その後、大量培養によって得られた菌体にTris-HCl pH8.0を加え、氷上で超音波破碎を行った。破碎後、遠心分離を行い、上清を採取し酵素液とした。

2-4 酵素精製

得られた上清を 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 StHSDH を溶出させた。また、アポ酵素（補酵素 NADP が結合していない酵素）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⁺を持たない酵素をカラムに結合させ、その後に NaCl を加えたバッファー(Tris-HCl(pH8.0))で溶出した。

2-5 結晶化

最適な結晶化条件を検討するため、バッチ法にて結晶化を行った。精製した酵素液 100 µL に対して 100 mM ホモセリンを 20 µL 添加し、終濃度を 16 mM ホモセリン混合液とした。この酵素液と沈殿剤それぞれ 2 µL を混合し、プレート内のウェルへ入れ、パラトンで蓋をした。沈殿剤には Crystal Screen kit を使用した。2週間後に結晶ができているかを確認した。結晶ができていた条件を検討したのちに、ハンギング

ドロップ法にて再度結晶化を行った。サンプルカップにグリースを塗り、サンプルカップ内にリザーバー(結晶化母液)を 100 µL 入れた。カバーガラスに 16 mM ホモセリン混合酵素液を 2 µL 載せ、リザーバー2 µL とピペッティングにより混ぜた。カバーガラスを液滴が密閉されるようにサンプルカップへ重ねて 1 週間室温で静置した。静置後、顕微鏡で結晶ができているかを確認した。得られた結晶にはアルコールを添加することによって X 線構造解析時の極低温下でも氷の結晶が生成しないようにした。X 線回折を行い、結晶の空間群や格子定数を調べた。

3. 結果および考察

リザーバー条件として50% PEG MME2000、2M 硫酸アンモニウム、1M 酢酸ナトリウム(pH4.0)、純水を混合させたものを用いてハンギングドロップ法を行ったところ、平たく表面積の大きい結晶を得ることができ、この形状はX線を結晶にあてやすく構造解析に適しているといえる。X線構造解析では、空間群がP 2₁2₁2であり、分解能が1.62 Å、R_{merge} 8.0%と非常に良好な解析結果となった。立体構造解析ではホモセリン複合体とシステイン複合体の構造を比較したところ、基質であるホモセリンとシステインの結合位置は完全に同じであることがわかった。このことはホモセリンとシステインの構造が似ていることから説明がつき、これによりシステインが代謝阻害に影響していると考えられる。また、このホモセリン複合体とシステイン複合体の構造差異を残基ごとにピークで確認した。ピークが確認できるところがホモセリン複合体とシステイン複合体の違いであり、特有の構造を形成しているのかわかる。しかしながら、大きなピークとして確認できるのはアミノ酸残基25付近のみであり、このアミノ酸残基はNADの結合位置として知られている。今回の実験においてホモセリン複合体にNADは添加していないことから、この構造差異は極めて似た構造を有しており、システインは阻害剤として非常に効果的であると考えられる。

参考文献

- 1) Wheelis, M. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1992**, 89 (7), 2930–2934.
- 2) Kubota, T. *et al. Commun Biol* **2022**, 14, 704
- 3) Ogata, K. *et al. Sci. Rep.* **2018**, 8, 5749