

平成21年 5月 11日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007年度 ～ 2008年度
 課題番号：19580074
 研究課題名（和文） β -ヒドロキシアスパラギン酸デヒドラターゼの1次構造解析
 研究課題名（英文） Structural analysis of β -hydroxyaspartate dehydratase
 研究代表者 和田 大（WADA MASARU）
 北海道大学・大学院農学研究院・准教授
 研究者番号：00301416

研究成果の概要： 土壌細菌 *Delftia* sp. HT23 株から D-threo-3-hydroxyaspartate dehydratase を単離・精製した。本酵素は D-threo-3-hydroxyaspartate に対して活性を示す酵素の初めての例である。一方、*Pseudomonas* sp. T62 由来の L-threo-3-hydroxyaspartate dehydratase をコードする遺伝子をクローニングして、その遺伝子産物を大腸菌内で発現させた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物代謝、PLP 酵素

1. 研究開始当初の背景

生物の体の大部分はL-アミノ酸で構成されていることは古くからよく知られている。一方、D-アミノ酸は細菌のペプチドグリカンなど限られたところに存在すると考えられおり、細菌以外の生物にD-アミノ酸が含まれていることはあまり知られてはいなかった。近年、分析技術の発展に伴い、多くの生物の様々な部位にD-アミノ酸が存在し、重要な生理機能を果たしていることが明らかとなっ

てきた。D-アミノ酸が幅広い分野の研究者から注目を浴びている。

このようなD-アミノ酸の研究から、未知のD-アミノ酸代謝経路の存在が示唆され、D-アミノ酸変換酵素の研究が盛んに行われるようになってきた。

しかしながら、タンパクを構成している一般的な20種のアミノ酸以外のD体を変換する酵素の知見についてはほとんど報告がなく、興味を持たれるところである。

このD体の特殊アミノ酸のうち今回注目したのはβ-hydroxyaspartateである。このアミノ酸はAspartateの3位の炭素についている水素基が水酸基に置換されたもので、分子中に2つの不斉炭素を持ち4つの光学異性体を持つ。

これまでに4つの光学異性体を特異的に認識する酵素としてThreonine aldolaseなどが報告されているが、それ以外にはあまり報告例がない。したがって4つの異性体を特異的に認識する酵素を取得し、その諸性質や作用機構を解明することは学術的に非常に意義深いものである。

近年、光学活性化合物の合成法、分析法の著しい技術的發展と光学異性体間の生理活性の違いの理解によって光学活性化合物の重要性が高まっている。さらに医薬品のみならず、農薬、液晶材料、化粧品、香料および一般の化合物においても年々、光学活性化合物への需要の高まりをみせている。そのため効率的に、光学的に純粋な光学活性化合物を生産する方法の開発が重要な課題となっている。光学活性化合物の合成法として野依博士のBINAP触媒によるノーベル賞受賞は記憶に新しいところである。しかしながら、有機合成化学による不斉合成反応の発達が著しいとはいえ、その利用範囲は限られている。一方、酵素は立体、位置特異的の反応を触媒するものとしてよく知られている。その選択性が高いという特徴を持つ酵素を生体触媒として利用し、光学活性化合物を合成する方法は有効であるといえる。実際、選択性の高い酵素は光学活性化合物の工業的な生産に広く利用されている。さらに現在、立体選択性が高いという酵素の特徴を生かして、有機化学合成法が苦手とする4種の光学異性体が存在する化合物の立体選択的合成を行う分割法・合成法が開発が期待されている。

近年、β-hydroxyaspartateは哺乳類の神経細

胞の興奮性グルタミン酸トランスポーターの競争的阻害剤として注目を浴びている。4つの光学異性体のうち、特にL-threo体の誘導体が阻害に最も効果的であると報告されている。光学的に純粋なβ-hydroxyaspartateのL-threo体を合成する際、現在の有機化学的合成法では煩雑な操作を必要とし、その簡便な合成法が開発が期待されている。

そこで本研究では、選択性の高い酵素を用いた酵素的光学分割法によってL-threo-HO-Aspの合成の可能性を探ることにした。この手法では、有機合成によって得られたL-threo-HO-AspとD-threo-HO-Aspのラセミ体から酵素を用いてD-threo-HO-Aspのみを分解することにより、光学的に純粋なL-threo-HO-Aspを得るという手法を用いる。

一方、L-threo-3-Hydroxyaspartate dehydratase (L-THA DH) (EC 4.3.1.16)はL-threo-3-hydroxyaspartate (L-THA)からアンモニアを脱離させてオキサロ酢酸を生成する反応を触媒する。本酵素は1999年に和田らによって単離された土壌細菌*Pseudomonas sp.* T62に見出された。本酵素のN末端アミノ酸配列を用いて相同性解析を行った結果、*Saccharomyces cerevisiae*由来serine racemaseホモログのN末端アミノ酸配列と相同性を持っていた。2003年に和田らによって*S. cerevisiae*のserine racemaseホモログの大腸菌内における発現系が構築され、機能解析が行われた。一方で、*Pseudomonas sp.* T62由来酵素の遺伝子は未だクローニングされていなかった。

2. 研究の目的

本研究ではD体の特殊アミノ酸であり、2つの不斉炭素があるD-threo-3-hydroxyaspartic acidを変換する酵素を探索し、諸性質を解明することを目的とした。

また、本研究の第2の目的はL-THAを基

質とする酵素としては細菌由来では唯一の報告例である *Pseudomonas* sp. T62 由来 L-THA DH をコードしている Open Reading Frame (ORF) を解明してクローニングすることである。さらに、大腸菌での発現系を構築し、組換え酵素を用いて諸性質を解明することである。

3. 研究の方法

土壌より *D-threo*-HO-Asp を単一炭素源とした培地を用いて *D-threo*-HO-Asp 資化性菌のスクリーニングを行い、 β -hydroxyaspartate dehydratase 活性をもつ *Delftia* 属の細菌と *Pseudomonas* 属の細菌を取得した。

また、L-THA のクローニングにおいて、以下の実験を行った。まず、既知の部分アミノ酸配列を元に Degenerated PCR を行った。その結果 615 bp の内部配列を取得した。得られた内部配列を元に Inverse PCR を行い、本酵素をコードしている全長 957 bp の ORF を取得した。この ORF がコードしている推定アミノ酸配列は、エドマン分解によって得られた内部配列と一致した。また、取得した塩基配列を DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録し、アクセシオンナンバー AB297468 を取得した。

4. 研究成果

3-ヒドロキシアスパラギン酸(HO-Asp)はアスパラギン酸の構造アナログであり、2つの不斉炭素を持ち、4つの光学異性体を持つ。すでに4つの光学異性体のうち *L-threo*-HO-Asp に作用し、オキサロ酢酸とアンモニアを生成する酸化的脱アミノ反応を触媒する *L-threo*-HO-Asp dehydratase が土壌細菌 *Pseudomonas* sp. T62 から発見されている。

本研究では、最も高い *D-threo*-HO-Asp 分解活性を示した *Delftia* sp. HT23 から *D-threo*-3-HO-Asp dehydratase を電気泳動的に

均一に精製した。本酵素の立体選択性を調べたところ、*D-threo*-HO-Asp へのある程度の選択性を示した。また基質特異性を調べたところ、*L-serine*, *D-serine* にも微弱な活性がみられた。本酵素の N 末端アミノ酸配列および内部アミノ酸配列を決定した。決定した部分配列を相同性検索にかけたところゲノムが決定されている *Delftia acidovorans* SPH-1 株の putative Alanine racemase と相同性が見られた。この配列を元に本酵素のクローニングを行い、大腸菌 JM109 を宿主として発現を行った。大腸菌で発現させた組換え酵素を用いてより詳細な諸性質を解明した。本酵素は *D-threo*-HO-Asp に対して活性を示す dehydratase の初めての例である。

Pseudomonas sp. T62 由来 L-THA DH をコードしている Open Reading Frame (ORF) を取得した。さらに、大腸菌での発現系を構築し、組換え酵素を用いて諸性質を解明した。

本酵素の ORF がコードしている推定アミノ酸配列を用いて FASTA 検索を行った。その結果、*S. cerevisiae* 由来 serine racemase ホモログ YKL218cp と 64%、*S. pombe* 由来 serine racemase と 64%、*Mus musculus* 由来 serine racemase と 36%、*Escherichia coli* K-12 株由来生分解型 threonine dehydratase (tdcBp) と 38%の相同性を示した。

本酵素の ORF を His-tag が付加される発現ベクター pQE-30 に組み込み、発現用プラスミド pQE30lthadh を構築した。この pQE30lthadh を大腸菌内で発現させた結果、LB 培地に 0.01 mM の isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加する条件で良好な発現がみられた。得られた組換え粗酵素溶液をアフィニティークロマトグラフィーカラムで精製したところ、ワンステップで電気泳動的に均一な精製酵素を得た。SDS-PAGE の結果、推定

分子量は 39 kDa と見積もられた。この値は、推定アミノ酸配列から計算される 35.7 kDa という値と、matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) 解析による 36.0 kDa という値より大きめに見積もられている。この違いはタンパク質表面の荷電等が原因で引き起こされると考えられる。

組換え酵素の N 末端のエドマン分解を行ったところ、推定アミノ酸配列の 15 個のアミノ酸残基と一致した。この事実から、組換え酵素を取得できたと結論付けた。

組換え酵素の L-THA に対する dehydratase 活性は野生株由来酵素の活性と大きな違いはなかった ($K_m = 0.54$ mM, $V_{max} = 39.0$ $\mu\text{mol min}^{-1}$ [mg protein] $^{-1}$)。また、他の 3-hydroxyaspartate 異性体に対する dehydratase 活性も検出できなかった。

さらに、最終濃度 5 mM の L-erythro-3-hydroxyaspartate と D-serine が反応溶液中に存在するとき、本酵素の L-THA に対する dehydratase 活性が阻害され、その比活性は 15% と 27% まで減少した。それぞれの阻害定数 K_i 値は 0.20 mM と 22.8 mM であった。

D-Serine によって、反競争阻害 (uncompetitive inhibition) が、L-erythro-3-hydroxyaspartate によって、非競争阻害 (non-competitive inhibition) が引き起こされていた。しかし、阻害形式は速度論的に決められるもので、実際の阻害機構とは必ずしも一致しないことが知られている。たとえば、基質結合部位に強固に結合する競争阻害剤は見かけ上速度論的には、非競争阻害になることが知られている。今回の実験からは、速度論的に L-erythro-3-hydroxyaspartate は非競争阻害形式であることが示唆されたが、この阻害剤存在下では相対活性が 10% にまで減少しており、基質結合部位に強固に結合している可能

性があるとも考えられる。

本酵素の活性は、最終濃度 1 mM の EDTA を添加した際に 69% 阻害された。そこで、精製の際に添加した 2 価カチオン Mn^{2+} を透析によって除去した酵素をコントロールとして、活性に対する金属イオンの影響を調べた。最終濃度 1 mM の MnCl_2 , MgCl_2 , そして CaCl_2 を添加すると、その比活性は 151%, 196%, そして 159% に上昇した。

また、最終濃度 10 mM の adenosine 5'-monophosphate (AMP) や adenosine 5'-diphosphate (ADP) を反応溶液に加えると、その比活性は 144% と 106% に上昇した。一方、adenosine 5'-triphosphate (ATP) や 5'-diphosphate (GDP) を反応溶液に加えると、その比活性は 89% と 73% に減少した。

tdcBp に対する AMP の影響などの、生理学的役割がはっきりしており、かつ、効果も顕著な例と比較すると、serine racemase などと同様に、これらの 2 価カチオンあるいはヌクレオチドによるが酵素へ与える影響には生理学的な意義はあまりないように思われる。

本酵素の推定アミノ酸配列を Prosite 検索した。その結果、Prosite PS00165 という pyridoxal 5'-phosphate (PLP) 結合配列が保存されており、本酵素における 53 番目のリジン残基が PLP 結合部位と推定された。そこで、53 番目のリジン残基をアラニンに置換した pQE30lthadhK53A プラスミドを構築した。このプラスミドを用いて変異酵素 K53A の大腸菌における大量発現を行い、精製した。この変異酵素 K53A には検出できるレベルの L-THA DH 活性はなかった (pQE30lthadh が発現する組換え酵素の < 0.01% 以下の活性)。さらに、吸収スペクトルを測定したところ、pQE30lthadh が発現する組換え酵素に存在していた 410 nm 付近の極大ピークが変異酵素 K53A においてはほぼ消失していた。これら

の事実から本酵素の 53 位のリジンが PLP 結合部位であると強く示唆された。

本酵素のアミノ酸配列は真核生物のラセマーゼ類と相同性を持っていた。具体的には、*S. pombe* 由来 serine racemase と 64%、*M. musculus* 由来 serine racemase と 36%、*S. broughtonii* 由来 aspartate racemase と 39%の相同性があった。これらの真核生物のラセマーゼ類は、racemase 反応に加えて、dehydratase 活性を持つことが報告されている。一般的に、PLP 要求性酵素は“あいまい”な反応を示すといわれており、基質特異性が広いものや、異なる反応を触媒する酵素が存在するものが多い。つまり、本酵素も、L-THA DH 反応に加えて racemase 反応を触媒すると考えられたため、racemase 活性測定をおこなった。しかしながら、検出できるレベルの serine/aspartate racemase 活性はなかった ($< 5.0 \times 10^{-2} \text{ pmol h}^{-1} [\text{mg protein}]^{-1}$)。

さらに、本酵素は、*E. coli* K-12 株由来生分解型 threonine dehydratase (tdcBp) と 38%のアミノ酸配列上の相同性を持っていた。L-THA と L-threonine は構造類似体である。そのため、本酵素も L-threonine を基質とする可能性が示唆された。さらに、tdcBp も L-THA を基質とする可能性が示唆された。この可能性を検証することにした。

まず、tdcBp 発現用プラスミド ASKA/JW3088 を ASKA clone collection (NBRP) から分譲していただいた。この発現用プラスミド ASKA/JW3088 と pQE30lthadh を用いて大腸菌における大量発現を行った。精製した酵素を用いて基質特異性を調べた。その結果、L-THA DH は検出できるレベルの L-threonine DH 活性を持っていなかった。さらに、tdcBp も検出できるレベルの L-THA DH 活性を持っていなかった。この結果より、アミノ酸配列上相同性のある

これらの酵素は、機能の面で区別できた。

本研究では、以上の結果を得た。これらの結果より、次のような考察を行った。L-THA DH の生理的意義は未だ解明されていない。L-THA は自然界において、抗菌性ペプチド中に存在することが報告されている。例えば、*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* の生産する syringomycin E である。本研究で着目した酵素は *Pseudomonas* 属由来であり、syringomycin E 生産菌と類縁種であるため、抗菌性ペプチドを生産する可能性がある。そして、生産したペプチドを分解した際に生じる L-THA に対する耐性機構として L-THA DH を持つ可能性がある。本酵素が L-THA 特異的であり、類似酵素が持つ racemase 活性を持たない理由も、本酵素が L-THA を解毒するために存在するためと考えると説明がつく。このような、本酵素の生理的意義を解明するためには、*Pseudomonas* sp. T62 が抗菌性ペプチドを生産するかどうかを、まず確認する必要があると考えた。

また、本研究の結果からだけでは、アミノ酸配列上に相同性のある類似酵素との機能の違いの原因を説明できなかった。つまり、本酵素には racemase 活性がない一方で、真核生物の racemase 類は副反応として L-THA DH 活性を持つ。これらの機能の違いを説明するためには、アミノ酸配列からのみではわからなかった立体構造上の微細な違いを特定する必要があると考えられる。そのために、本酵素の立体構造解析や分子モデリング等を行うことによって、本酵素の三次構造を取得する必要があると考えた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

T. Murakami, T. Maeda, A. Yokota, and M. Wada, Gene cloning and expression of pyridoxal 5'-phosphate-dependent L-threo-3-hydroxyaspartate dehydratase from *Pseudomonas* sp. T62, and characterization of the recombinant enzyme. *Journal of Biochemistry* (Tokyo), **145**, 661-668, (2009). 査読あり

[学会発表] (計 6 件)

1. 和田 大、村上知子、横田 篤：
Pseudomonas sp. T62 由来
L-threo-3-hydroxyaspartate dehydratase へ
の変異導入による機能改変. 日本農芸化学
学会本大会、福岡、2009 年 3 月 27 日
2. 村上知子、横田 篤、和田 大：
Pseudomonas sp. T62 由来
L-threo-3-hydroxyaspartate dehydratase の機
能解析と分子モデリング. 日本農芸化学
会北海道支部 第一回合同学術講演会、
札幌、2008 年 8 月 9 日
3. 和田 大：3-ヒドロキシアスパラギン酸
に作用する PLP 依存性デヒドラターゼ(シ
ンポジウム). 日本農芸化学会本大会、名
古屋、2008 年 3 月 26 日
4. 前田隆行、村上知子、横田 篤、和田 大：
Delftia sp. HT23 由来の D-threo-3-ヒドロキ
シアスパラギン酸デヒドラターゼのクロ
ーニングと発現. 日本農芸化学会本大会、
名古屋、2008 年 3 月 26 日
5. 村上知子、前田隆行、横田 篤、和田
大：*Pseudomonas* sp. T62 由来
L-threo-3-hydroxyaspartate dehydratase の
機能解析. 日本農芸化学会本大会、名古
屋、2008 年 3 月 27 日
6. 村上知子、横田 篤、和田 大：
Pseudomonas sp. T62 由来
L-threo-3-hydroxyaspartate dehydratase 遺
伝子のクローニングと大腸菌での発現.
日本農芸化学会北海道支部 第一回合同
学術講演会、札幌、2007 年 7 月 28 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者
北海道大学・大学院農学研究院・准教授
和田 大 (WADA MASARU)
研究者番号：00301416

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし