

超好熱アーキア *Sulfolobus tokodaii* 由来アルコール脱水素酵素の熱活性化に伴う構造変化の解明

Elucidation of the structural changes in heat activation of alcohol dehydrogenase from a hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii*

郷田秀一郎*, 梶山晃成, 永野結花, 内田拓郎, 海野英昭, 畠山智充
長崎大学, 〒852-8521 長崎市文教町 1-14

Shuichiro Goda,* Kosei Kajiyama, Yuka Nagano, Takuro Uchida, Hideaki Unno, and Tomomitsu Hatakeyama

¹Nagasaki university, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki, 852-8521, Japan

1 はじめに

これまで多くの好熱菌・超好熱菌由来グルタミン酸脱水素酵素は、大腸菌を宿主に用いてリコンビナントタンパク質として生産されると、天然由来のものほどの活性を示さず不活性型として得られることが報告されている[1]。不活性型酵素は加熱することによって活性化し、多くの同酵素は天然由来のものと同程度の活性を有するまでに活性化する。我々は、超好熱菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来アルコール脱水素酵素(StADH)が、これまで報告されているグルタミン酸脱水素酵素と同様に、リコンビナントタンパク質として生産されると不活性型として得られることを見出した。これまで多くのグルタミン酸脱水素酵素で不活性型として得られることが報告されているが、熱活性化における構造変化は不明である。そこで、熱活性化による構造変化を X 線小角散乱(SAXS)測定によって明らかにすることとした。

2 実験

測定は高エネルギー加速器研究機構 BL-6A にて行った。測定条件は、カメラ長は~1 m、検出器には Dectris PILATUS3-1M を用いた。測定した散乱曲線は $0.0069 \text{ \AA}^{-1} < Q < 0.26 \text{ \AA}^{-1}$ の範囲を用いた。StADH は大腸菌 BL21Codonplus(DE3)RIPL を宿主に用いて生産させた。精製は疎水性クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、及びゲルろ過によって行い、SDS-PAGE で単一のバンドを示すまでに精製した。加熱型 StADH は大腸菌破砕液を 90°C で 30 分加熱することによって得たものを非加熱型と同様に生成を行った。加熱による構造変化は非加熱型 StADH を種々の時間 90°C で加熱後、冷却したものを用いて酵素活性測定及び SAXS 測定を行った。

3 結果および考察

酵素活性測定を行ったところ、StADH はリコンビナント酵素として生産されると比活性が 0.28 U/mg しか示さず、加熱処理によって 1.31 U/mg まで活性化された。また、基質及び補酵素に対するミカエリス定数(K_m)を求めると、基質に対する K_m 値に大き

な違いは見られなかったものの、補酵素に対する K_m 値は加熱によって減少が見られ、補酵素と酵素の親和性が加熱によって高くなると考えられた。

非加熱型と加熱型の構造の違いを解析するために、SAXS 測定を行った。その結果、不活性型はギニエ半径(R_g)値が 38.5 Å であったのに対して加熱型は 35.6 Å と分子構造が少し小さくなっていた(Table 1)。基質及び補酵素の構造変化に与える影響を調べるため、それぞれ加えて測定を行ったが、大きな変化は見られなかった(Table 1)。

Table 1: StADH のギニエ半径(R_g)変化(Å)

		+エタノール	+NAD
不活性型	38.5	38.3	38.1
活性型	35.6	36.1	36.2

加熱による構造変化は種々の時間 90°C で加熱した非加熱 StADH の酵素活性と X 線小角散乱によって解析した。その結果、分子の回転半径であるギニエ半径は 15 秒加熱することによって活性型ほどのサイズに変化したが、酵素活性は 45 秒ほど加熱することによって最大値を示した。このことから StADH

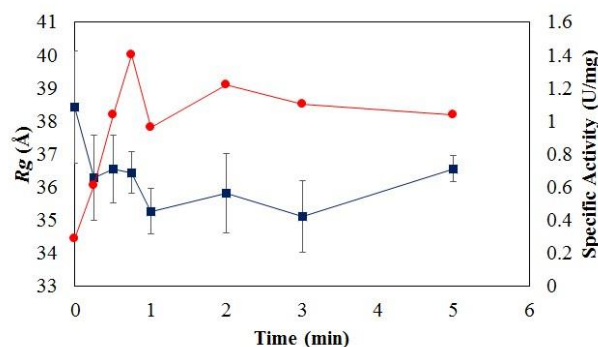


図 1 : 不活性型 StADH の加熱による酵素活性変化 (赤) と R_g 値 (青) の変化。

の熱活性化は、分子全体の構造が変化した後で、微細な構造変化が起こることによって完全な酵素活性を示すと考えられた。

4 まとめ

StADH の熱活性化は分子のサイズがコンパクトになる構造変化とともに起こり、まず始めに全体の大きな構造変化が起こり、そのあとに起こる微細な構造変化が酵素の完全な活性化に必要であることが明らかとなった。

参考文献

[1] 郷田秀一郎ら, 日本結晶学会誌 **58**, 215 (2016).

* sgoda@nagasaki-u.ac.jp