

超好熱アーキア *Sulfurisphaera tokodaii* 由来アルコール脱水素酵素の熱活性化による構造変化の解明

Elucidation of the structural change of alcohol dehydrogenase from *Sulfurisphaera tokodaii* in heat activation

郷田秀一郎^{1,2}, 高嶋翔², 梶山晃成², 永野結花², 内田拓郎², 海野英昭², 畠山智充²

¹創価大学 糖鎖生命システム融合研究所

〒192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236

²長崎大学大学院工学研究科総合工学専攻, 〒852-8521 長崎県長崎市文教町 1-14

Shuichiro Goda^{1,2,*}, Sho Takashima², Kosei Kajiyama², Yuka Nagano², Takuro Uchida², Hideaki Unno² and Tomomitsu Hatakeyama²

¹GaLSIC, Soka University,

1-236 Tangicho, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan

²Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan

1 はじめに

超好熱菌や好熱菌由来酵素は大腸菌を宿主に用いてリコンビナント酵素として生産されると、しばしば活性を示さない、もしくは著しく低い活性を示さないことが報告されている[1]。多くの場合は、加熱によって、天然由来の酵素と同等の活性を示すまでに活性化されることが報告されている。我々は、超好熱アーキア *Sulfurisphaera tokodaii* 由来アルコール脱水素酵素 (StADH; ORF ID: ST2577) が、大腸菌を宿主に用いて生産させると活性が低い状態で得られ、加熱によって活性が上昇することを見出した。これまで多くの好熱・超好熱菌由来グルタミン脱水素酵素 (GDH) では同様の現象が報告されているが、アルコール脱水素酵素では報告例がなく、また GDH では活性化後の立体構造は報告されているが、低活性型の立体構造は不明である。そこで、本研究では、超好熱アーキア由来酵素の熱活性化における構造と活性の変化を、StADH を用いて行うこととした。

2 実験

目的タンパク質である StADH は、発現ベクターに pET-21a、宿主には大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL を用いて生産した。精製には、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、ゲル濾過クロマトグラフィーを用い、SDS-PAGE で単一のバンドを示すことを確認した。

酵素活性測定は、基質にエタノール、補酵素には NAD を用い、反応温度は 50°C で行った。340 nm の吸光度の変化を測定することによって反応によって生じる NADH を測定した。

溶液中のタンパク質の立体構造変化は X 線小角散乱測定によって行った。測定は高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所放射光実験施設 Photon

Factory BL-10C に設置された溶液用小角散乱実験装置で行った。

非加熱状態及び加熱後の酵素の立体構造解析は X 線結晶構造解析によって行った。結晶構造解析は長崎大学にある Rigaku 製 MicroMax007 を用いて行った。

3 結果および考察

StADH の酵素活性を測定したところ、非加熱状態での比活性は 0.28 U/mg で 90°C 30 分加熱することによって 1.31 U/mg まで活性化された。基質及び補酵素に対する K_m 値を測定したところ、基質エタノールに対する K_m 値は非加熱状態と加熱状態で 0.50 及び 0.48 mM で大きな違いは見られなかったものの、補酵素 NAD に対する K_m 値は 0.087 から 0.032 mM へと加熱によって減少した。このことは、加熱による構造変化が補酵素への親和性と関連していることを示していた。

加熱による溶液中での構造変化は SAXS 測定によって行った。非加熱状態の回転半径は 38.5 Å であったのに対して、加熱後には 35.6 Å となった。エタノール存在下でも回転半径は 38.3 Å から 36.1 Å となり、補酵素存在下でも 38.1 Å から 36.2 Å と加熱による活性化でサイズの減少が見られた。このことから、加熱による活性化はサイズの減少、すなわち立体構造の変化を伴うものであることが示された。

これまでに報告されているグルタミン酸脱水素酵素の熱活性化の研究では、加熱後の活性化状態の立体構造は報告されているが、非加熱状態の立体構造は不明であった。本研究では、加熱状態及び非加熱状態の立体構造の解明を X 線結晶構造解析によって行い、成功した。得られた結晶構造から、全体的な立体構造に大きな違いは見られないものの、酵素

中に含まれる二価金属イオンに変化が見られた。一般的にアルコール脱水素酵素には 2 分子の亜鉛が含まれ、1 分子は酵素活性に大きく影響し、基質の分極に作用している。もう 1 分子はタンパク質の立体構造の安定化に作用している。非加熱状態の酵素では、そのうちの 1 分子で基質の分極に寄与している方が亜鉛からマグネシウムに置換していることが示された。X 線結晶構造解析での解析は限界があることから、タンパク質を変性させ、含まれる二価金属イオンを解析したところ、亜鉛からマグネシウムへの置換を確認した。このことは、基質及び補酵素の近傍に存在する二価金属イオンが置換することによって補酵素 NAD に対する K_m 値に影響を与えていることが明らかになった。

そこで大腸菌で生産されるとマグネシウムが酵素分子中に含まれることから、大腸菌体内での濃度を測定したところ、大腸菌を破碎した粗酵素溶液中では亜鉛の方がマグネシウムよりも高濃度で存在していた。すなわち、StADH はより低濃度であるマグネシウムを優先的に取り込んでいることが示唆された。

4 まとめ

StADH は、大腸菌を宿主に用いて生産されると本来 2 分子の亜鉛が存在するうち 1 分子がマグネシウムに置換した低活性型として生産されることが明らかとなった。加熱処理は酵素分子中の二価金属イオンの置換を促進することによって活性化していることが明らかとなった。

参考文献

[1] S. Goda *et al.*, *Biochemistry* 15304, 44 (2005).

* goda@soka.ac.jp