

新規過酸化アルキル分解酵素の立体構造解析 Structural study of novel alkyl hydroperoxide scavenging enzymes

秋山友了, 深野和紘, 新村洋一, 矢嶋俊介*

東京農業大学バイオサイエンス学科, 〒156-8502 世田谷区桜丘 1-1-1
Tomonori Akiyama, Kazuhiro Fukano, Youichi Niimura and Shunsuke Yajima*
Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Setagaya-ku, Tokyo, 156-8502, Japan

1 はじめに

好気性生物において、酸素はエネルギー生産に利用される一方、容易に還元されて過酸化物質などの活性酸素種を生じる。過酸化物質は低濃度ではセカンドメッセンジャーなど生物にとって優位に働くが、過剰に存在すると DNA 切断や蛋白質変成を引き起こし、人では疾病や老化の原因になることが知られている。そのため、過酸化物質の還元無毒化は生物にとって必要不可欠な反応であるといえる。しかし、通性嫌気性菌である乳酸菌は呼吸鎖やヘム系の catalase を欠いており、一般に酸化ストレスに弱いとされてきた。

近年の健康志向の高まりから、乳酸菌のもつ生理的機能に注目が集まっており、また、乳酸菌を利用している発酵食品にも関心が高まっている。そこで、我々のグループでは、発酵食品や乳酸菌の機能性の要因を解明する一連の研究の過程で、各種発酵食品から菌体外過酸化物質を分解する乳酸菌のスクリーニングを行い、過酸化リノール酸および過酸化アルキルの分解に優れる菌株の単離に成功した。そして、その活性本体である、2 種の過酸化アルキル分解酵素を精製し、遺伝子のクローニングを行った。

両酵素の特徴として、

どちらも既知の過酸化物質分解酵素との全域における相同性は低いが、活性中心近傍は NADH peroxidase に共通の配列が見いだされた。NADH peroxidase は H_2O_2 に高い反応性を示すが、過酸化アルキルへの反応性は知られていない。一方、両酵素は H_2O_2 への反応性は低いが過酸化アルキルへの反応性が高い。さらに興味深いことに、既知の過酸化アルキル還元反応である AhpF-AhpC 系、Thioredoxin 系、Glutathione 系ともに補助蛋白質を必要とするのに対し、両酵素はそれぞれが単独で反応を触媒することを明らかにした。このような例は初めてである。

そこで本研究では、このような新規過酸化アルキル分解酵素の立体構造解析を行い、基質特異性メカニズム、反応触媒メカニズムを明らかにすることで、既存の分解酵素との違いを明らかにすることを目指す。これにより、過酸化物質の分解メカニズムにおける新たな知見を加えることが期待できる。さらに、酸化ストレスに弱いとされてきた乳酸菌から既知の酵素とは異なる、過酸化物質分解酵素を単離すること

ができたことは、今後ますます乳酸菌の持つ機能性や、発酵食品のもつ機能性の解明につなげられること、またそれらの有用性を証明することに貢献できると考えている。

2 実験

過酸化アルキル分解酵素遺伝子を pET101 に組み込み、宿主として BL21 Star(DE3)を用いて組換え体の発現を行った。疎水カラムおよび陰イオン交換カラムにより精製を行い、目的蛋白質を得た。結晶化は、ハンギングドロップ蒸気拡散法により行い、回折データ収集を PF にて行った。初期構造の決定は分子置換法を用いた。Refmac5 による計算と coot によるモデル構築を繰り返し、精密化を行った。

3 結果および考察

今回結晶化スクリーニングにより、2 種類の酵素それぞれで結晶を得ることができた。一つは空間群 $P2_12_12$ に属し、もう一方は空間群 $P2_1$ に属していた。前者の分解能は 2.8 \AA であり、mosaicity も HKL2000 の処理で 1 を超える大きな値であった。そのため、分解能改善のための結晶化条件の検討とクライオプロテクタント条件の検討を行ったが、改善は見られていない。また、後者は分解能 2.0 \AA の回折データ収集に成功した。精密化を行い、 $R_{\text{work}}/R_{\text{free}} = 0.20/0.23$ である。酵素は、ホモ 2 量体を形成していたが、非対称単位中に 2 つの 2 量体が存在していた。

4 まとめ

目的酵素の一方について構造を得ることに成功した。今後は両者の構造比較や、基質複合体などの取得により、より詳細な基質認識機構の解明を目指す。

謝辞 (オプション)

謝データ測定にあたり PF スタッフの方々に深く感謝致します。

* yshun@nodai.ac.jp