

## アスパラギン酸ラセマーゼの温度適応に関する構造解析 Structural Analysis on Temperature Adaptation in Aspartate Racemases

藤井知実<sup>1,\*</sup>, 山内貴恵<sup>1</sup>, 郷上佳孝<sup>2</sup>, 老川典夫<sup>2</sup>, 畑安雄<sup>1</sup>

<sup>1</sup>京都大学化学研究所, 〒611-0011 宇治市五ヶ庄

<sup>2</sup>関西大学化学生命工学部, 〒564-8680 吹田市山手町 3-3-35

Tomomi Fujii<sup>1,\*</sup>, Takae Yamauchi<sup>1</sup>, Yoshitaka Gogami<sup>2</sup>, Tadao Oikawa<sup>2</sup>, and Yasuo Hata<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Chemical Research, Kyoto University, Gokasho, Uji, 611-0011, Japan

<sup>2</sup>Department of Life Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University, 3-3-35 Yamate-cho, Suita, Osaka 564-8680, Japan

### 1 はじめに

生物において、L-アミノ酸の存在が支配的であるが、真正細菌の細胞壁中のペプチドグリカンのみならず、古細菌や哺乳類の細胞組織においてもD-アミノ酸が見出されており、重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。D-アミノ酸の多くは、L-アミノ酸からアミノ酸ラセマーゼにより生合成される。アミノ酸ラセマーゼは、その酵素反応にピリドキサル 5'-リン酸(PLP)が補酵素として関与する PLP 依存型と、関与しない PLP 非依存型に分類されている。

90°C以上の高温環境下で生育する超好熱性古細菌 *Thermococcus litoralis* DSM 5473 株の PLP 非依存型アスパラギン酸ラセマーゼ (TlAspR) がクローニング・高発現され、95°Cで最大活性を示すことが明らかにされた。耐熱性酵素は、高温条件下でも変性が起こらず熱安定性が高いという特徴から、バイオテクノロジーや産業利用など幅広い分野での活用が期待できる。一方、低温～常温環境下で生育する乳酸菌 *Lactobacillus sakei* NBRC 15893 株の PLP 非依存型アスパラギン酸ラセマーゼ (LsAspR) がクローニング・高発現された。この酵素は、好熱菌の酵素とは対照的に、生育温度が 5～40°Cであり、低温～常温下でも活性を示す。

従って、*Thermococcus* 由来酵素及び *Lactobacillus* 由来酵素の立体構造を決定し構造比較を行うことができれば、極限環境下での酵素の耐熱性獲得、基質認識及び酵素反応の機構が明らかにでき、酵素の幅広い応用が可能になることが期待できる。

### 2 実験

タンパク質濃度 20mg/ml の LsAspR 溶液について蒸気拡散法で結晶化条件の検索を行い、25% (v/v) PEG-MME550, 5% (v/v) 2-Propanol, 0.1M Na acetate pH4.8 を沈殿剤溶液とする条件において LsAspR 結晶が得られた。また、タンパク質濃度 12 mg/ml の TlAspR 溶液に対し、沈殿剤溶液を 24% (w/v) PEG1500, 0.2 M L-Proline, 0.1 M HEPES pH7.5 とするシッティングドロップ蒸気拡散法とマイクロシーディング法による結晶化により TlAspR 結晶を得た。

これらの結晶について、KEK PF 構造生物学ビームラインにおいて放射光回折実験を行い、回折強度データを収集した。その際、LsAspR については結晶化母液中の結晶を、TlAspR については 10% (v/v) Ethylene glycol を含む沈殿剤溶液に浸した結晶を、100Kの液体窒素気流中で冷却した。

LsAspR 結晶は、空間群  $P3_121$ 、格子定数  $a = b = 104.68 \text{ \AA}$ ,  $c = 97.29 \text{ \AA}$  であり、TlAspR 結晶は、空間群  $P2_12_12$ 、格子定数  $a = 90.26 \text{ \AA}$ ,  $b = 125.78 \text{ \AA}$ ,  $c = 40.64 \text{ \AA}$  であった。分子置換法による位相決定を行い、LsAspR については分解能  $2.6 \text{ \AA}$  で、TlAspR については分解能  $1.6 \text{ \AA}$  で結晶構造を決定した。

### 3 結果および考察

LsAspR 分子及び TlAspR 分子は共に、2つの同一サブユニットからなる分子内に二回回転対称軸をもつ二量体分子であり、N 末端側ヘリックス同士を接近させて二量体を形成している。二量体形成面では各サブユニットの  $\beta$  シート間や  $\alpha$  ヘリックス間で水素結合や疎水性相互作用が生じている。両者の結晶構造の比較により、TlAspR は分子表面やサブユニット間の相互作用を強化することで立体構造を安定化させて耐熱性を得ていることが示唆された。また、両者の分子内キャビティーに大きな差があることが分かった。

### 4 まとめ

LsAspR 及び TlAspR の結晶構造をそれぞれ分解能  $2.6 \text{ \AA}$  及び  $1.6 \text{ \AA}$  で決定したが、LsAspR の結晶構造は分子の一部がディスオーダーしていた。今後は、他の結晶化条件の検索・多種のクライオプロテクタントの検討・マイクロビームを利用した測定実験等を行うことによりデータの質の改善を目指したい。

### 謝辞

放射光実験に際し大変お世話になりました、KEK PF ビームラインスタッフの皆様に深く感謝申し上げます。

\* fujii@scl.kyoto-u.ac.jp