

# 好熱菌由来 D-セリン脱水素酵素の構造解析 Structural analysis of D-serine dehydrogenase from thermophile

米田一成<sup>1,\*</sup>, 櫻庭春彦<sup>2</sup>, 大島敏久<sup>3</sup>

<sup>1</sup>東海大学農学部, 〒862-8652 熊本県熊本市東区鹿渡 9-1-1

<sup>2</sup>香川大学農学部, 〒761-0795 香川県木田郡三木町池戸 2393

<sup>3</sup>大阪工業大学工学部, 〒535-8585 大阪市旭区大宮 5 丁目 16-1

Kazunari Yoneda<sup>\*1</sup>, Haruhiko Sakuraba<sup>2</sup>, Toshihisa Ohshima<sup>3</sup>

<sup>1</sup>School of Agriculture, Tokai University, Kumamoto, Japan

<sup>2</sup>Faculty of Agriculture, Kagawa University, 2393 Ikenobe, Miki-cho, Kita-gun, Kagawa761-0795, Japan

<sup>3</sup>Osaka Institute of Technology, Osaka, Japan

## 1 はじめに

近年Lアミノ酸の鏡像異性体であるD-アミノ酸が注目されており、特に、乳酸菌や酵母を利用した発酵食品中に、D-アミノ酸が多く含まれることがすでに知られている。また、人の脳内にはD-セリンが存在していることも知られており、D-セリンは脳神経の新規バイオマーカーとしても着目されている。D-セリンの代謝に関わる脱水素酵素はこれまでに報告例が少ないために、本研究ではゲノム情報を利用したD-セリン脱水素酵素(D-SerDH)の同定を行うと共に、クローニング、酵素大量発現、精製および、結晶化を行った。安定性の高いL-セリン脱水素酵素はこれまでに酵素の機能解析および、立体構造解析の報告があり、環境中および、食品中のL-セリンの定量用酵素として有用であることがすでに明らかになっている[1-2]。しかし、耐熱性D-SerDHは未だに発見されていないのが現状である。安定性の高いD-SerDHは、D-セリンの定量や、酵素センサー開発への応用が期待できる。

## 2 実験

好熱菌由来D-SerDHの大量発現は大腸菌を用いて行い、精製には耐熱性酵素であることを利用して、70°C、20分間の熱処理を行った後の遠心上清を、Talon コバルトクロマトグラフィーによって精製した。結晶化スクリーニングには市販のスクリーニングキットを使用し、シッティングドロップ蒸気拡散法を用いて結晶化を行った。その結果、表1の条件で結晶が得られたため、X線回折実験を行った。クライオプロテクトANT (抗凍結剤)には30% v/vのエチレングリコールを選択し実験に用いた。X線の波長は1.00 Å、振動角度は1イメージにつき0.25°、X線の照射時間は1イメージ当たり0.25秒、結晶から検出器までの距離は201.1 mmに設定にした。X線回折データの処理にはXDSを用いた。

## 3 結果および考察

D-SerDHを純粋に精製した後、濃縮を行い、結晶化を行った(図1)。その結果、ポリエチレングリコール3,350を沈殿剤とした条件で解析に適した結晶が得られた(図2)。本結晶を用いてX線回折実験を行った結果、分解能8 Å程度のデータ測定が可能であった(図3)。本実験で得られたデータは低分解能であり、今後さらに高品質な結晶を作製する必要がある。

表1: D-SerDHの結晶化条件

酵素濃度	15.6 mg/ml
補酵素濃度	0.5 mM NAD <sup>+</sup>
沈殿剤濃度	15% PEG 3,350
塩	0.1 M ギ酸 Mg
結晶化温度	20°C

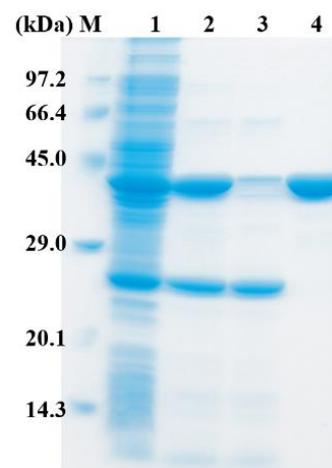


図1: D-SerDHのSDS-PAGE、M; マーカー、1; 粗酵素、2; 熱処理後の上清、3; Talon スルー、4; 精製後のD-SerDH(約39 kDa)

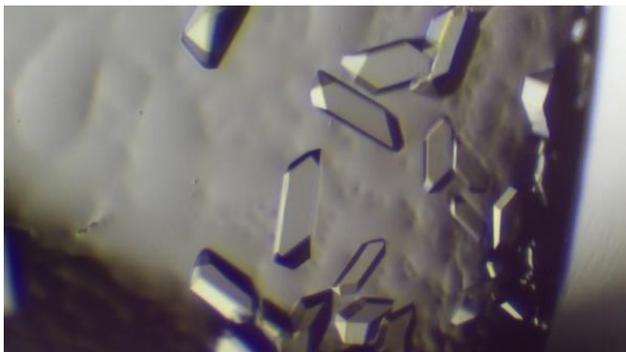


図 2 : D-SerDH の結晶 (空間群 P121)

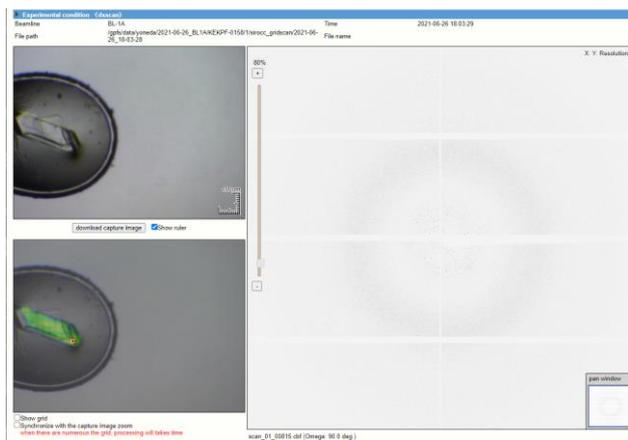


図 3 : D-SerDH の結晶と X 線回折像

### 謝辞

X 線回折実験を行うにあたり、Photon Factory のビームラインスタッフの皆様には大変お世話になりました。心より感謝申し上げます。

### 参考文献

[1] Yoneda K, Sakuraba H, Araki T, Shibata T, Nikki T, Ohshima T. "Crystallization and preliminary X-ray analysis of L-serine 3-dehydrogenase complexed with NADP<sup>+</sup> from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum calidifontis*." Acta Crystallographica section F. (2013) **F69**: 134-136.

[2] Yoneda K, Sakuraba H, Araki T, Ohshima T. "Crystal structure of the NADP<sup>+</sup> and tartrate-bound complex of L-serine 3-dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum calidifontis*." Extremophiles. (2018) **22**: 395-405.

\* kyoneda@agri.u-tokai.ac.jp