

超好熱アーキアの $\alpha\beta\gamma\delta$ 型色素依存性 L-プロリン脱水素酵素複合体の機能解析と X 線結晶構造解析

佐賀大学総合分析実験センター 川上竜巳

【目的】 色素依存性脱水素酵素はジクロロインドフェノールやフェリシアン化カリウムなどの人工色素を電子受容体として、基質を酸化できるフラビン酵素である。人工色素を電子受容体にできる脱水素酵素はバイオセンサー用素子としての利用が期待されているが、そのほとんどが膜結合性の酵素であるため、不安定になることが多く、応用利用以前に機能解析もままならない状態であった。一方、超好熱菌の生産する酵素は温度や pH、有機溶媒などに対して高い安定性を示すことが知られている。超好熱菌を用いて、高い安定性を有する色素依存性脱水素酵素をスクリーニングした結果、*Thermococcus* 属や *Pyrococcus* 属の超好熱アーキアに、2 種類の新規な色素依存性 L-プロリン脱水素酵素 (ProDH, $\alpha\beta\gamma\delta$ 型と $\alpha_4\beta_4$ 型) が可溶性画分に存在することを見出した。後者の酵素はこれまでに機能解析および X 線結晶構造解析を行い、その特徴的な機能と構造を明らかにしている^{1,2)}。一方で、*T. profundus* 由来の前者の酵素はこれまでにやってきた機能解析から、 β サブユニット (42 kDa) が ProDH 活性を触媒する成分であること、 α サブユニット (53 kDa) は色素依存性 NADH 脱水素酵素活性を触媒する成分であること、 γ サブユニット (19 kDa) が電子伝達タンパク質であるフェレドキシン様タンパク質であることなど、新規な多機能酵素であることを明らかに

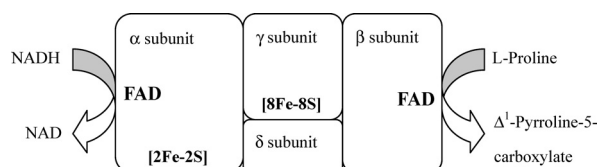


図 1 $\alpha\beta\gamma\delta$ 型色素依存性 L-プロリン脱水素酵素複合体の模式図

しているが (図 1)³⁾、その構造解析には成功していない。構造解析を行うことにより本酵素の分子内電子伝達や機能未知の δ サブユニット (10 kDa) の役割を明らかにできるだけでなく、応用開発を行う上でも重要であると考え、これまでも結晶化スクリーニングを行ってきたが、構造解析に適した結晶を得るまでには至っていない。本研究では、これまでに材料としていた *T. profundus* の ProDH について、その発現系を構築し直し、精製法を改良することで、収量の改善と単結晶ではないが結晶を得ることができたので、報告する。

【方法】 これまで本酵素の発現ベクターとしては、各サブユニット遺伝子を pET11a ベクターに組み込み、T7 プロモーター領域を含む断片を 1 つの pET ベクターに連結して構築していた。この発現ベクターを用いて大腸菌で酵素を発現させると、複合体構造の ProDH が生産されるが、結晶化スクリーニングを行うには精製酵素の収量が低く、培養から精製までに時間を要した。酵素を迅速簡便、かつ大量に精製するため、His タグの導入を検討した。 α , β , γ , δ の各サブユニット遺伝子を N 末端に His タグが付加されて発現する pET15b ベクターに組み込み、1 つのサブユニットだけに His タグが付加されて発現するように、前述の方法で pET ベクターに連結した (それぞれ pET/A-his, pET/B-his, pET/F-his, pET/X-his とする)。この 4 種類の発現ベクターを BL21 CodonPlus (DE3) RIPL に導入し、酵素を発現させ、熱処理、Ni カラムを用いて精製した。これらの酵素は SDS-PAGE と Native-PAGE により純度を確認し、結晶化用のサンプルとした。酵素の結晶化スクリーニングは Hampton Research 社の Crystal Screen I, II, Index, Emerald Biosystems 社の Wizard I, II, III を用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法で行った。

【結果】 上述の方法で酵素を精製し、SDS-PAGE による純度検定を行った結果、A-his, B-his, F-his, X-his のすべ

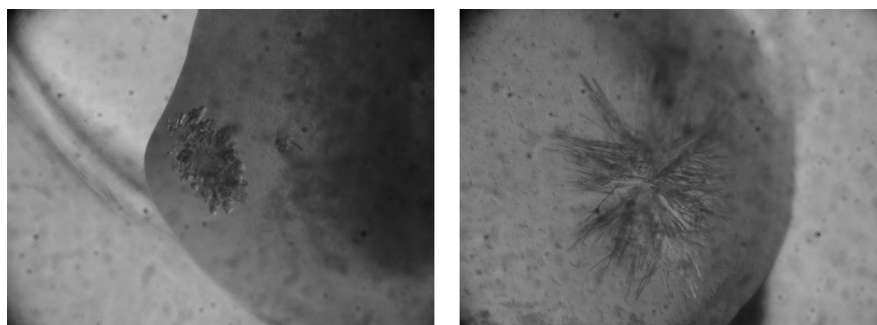


図 2 左: Index 71, 右: Crystal Screen II 43 の条件で得られた結晶

てについて高度に精製できていることが明らかになった。しかし、それらを Native-PAGE に供したところ、B-his と X-his は単一のバンドを示したが、A-his はバンドがスミアになり、F-his では 2 本のバンドが確認された。なぜこのようになったかは不明であるが、結晶化に用いる酵素は B-his と X-his を選択した。この方法で、2L の LB 培地で培養した大腸菌約 10 g から 10 mg 以上の精製酵素が得られ、精製に要する時間は 1 日であり、当初の目的である簡便かつ大量に調製することに成功した。この酵素を用いて結晶化スクリーニングを行った結果、約一週間で Crystal Screen II 43, Index 71 など針状結晶などが得られた(図 2)。

【今後の展開】 今回のスクリーニングによって得られた結晶は回析実験を行えるものではなかったが、これらの条件

を基に、解析に適した結晶化条件をスクリーニングしていく予定である。解析に適した結晶が得られれば、構造解析を進め、この酵素の L-プロリンや NADH からの電子伝達経路の解析や応用利用を踏まえた機能改変などを行っていく予定である。

最後に、本研究を遂行するにあたり、ご理解をいただき、研究奨励金を賜りました財団法人農芸化学研究奨励会に深謝申し上げます。

- 1) H. Tsuge, R. Kawakami, H. Sakuraba, H. Ago, M. Miyano, K. Aki, N. Katunuma, and T. Ohshima, *J. Biol. Chem.* **280**, 31045-9 (2005).
- 2) R. Kawakami, H. Sakuraba, H. Tsuge, S. Goda, N. Katunuma, and T. Ohshima, *FEBS J.*, **272**, 4044-54 (2005).
- 3) R. Kawakami, H. Sakuraba, and T. Ohshima, *Extremophiles*, **8**, 99-108 (2004).

加水分解酵素の糖転移能を高めるための基質エンジニアリング

東北大学大学院工学研究科 小林厚志

【目的】 ゲノムプロジェクトの成果により、近年におけるポストゲノム研究の発展は目覚ましいものがある。酵素触媒反応もゲノムプロジェクトの恩恵にあずかり、数多くの酵素がクローニングされ、それらの諸性質が明らかになっている。また、酵素蛋白質の立体構造情報も簡単に利用可能になり、かつ、蛋白質の機能改変技術もここ数年で向上していることから、優れた触媒能を有する酵素蛋白質の出現が待たれるところである。しかしながら、このような条件がそろっているにもかかわらず、実際の反応系において組換え酵素蛋白質触媒が所望する機能や効率を示さないのも事実である。このことは、酵素反応の効率化において、遺伝子工学を用いる酵素構造の改良に関わる研究に重点がおかれ、実際の反応場および基質の構造に関する情報が軽視されているためである。

筆者は、酵素反応の効率化には基質の状態が重要であると考え、遺伝子工学に因らない、基質の活性化技術と高次構造化技術を用いる酵素触媒反応の基礎研究を行ってきた。最近の研究で澱粉の構成成分であるアミロースがらせん内に脂溶性分子を包接することを利用し、澱粉-糖脂質複合体を α -アミラーゼ基質として用いることにより、効率的な配糖化反応が進行することを明らかにした¹。この結果は水に難溶な化合物であっても、二つの基質分子を近接させることによって、酵素反応が進行するという

ことを示唆するものである。

本研究では、基質構造の制御が酵素触媒反応の効率化に最も重要な要因であることを示すために、 α -アミラーゼによる糖転移反応における糖脂質中のアグリコン部位の影響を評価した。

【実験方法】 超音波処理は、糖脂質と *Klebsiella pneumoniae* 由来のプルラナーゼ(天野エンザイム)により処理した可溶性澱粉との混合溶液に対し、20 kHz, 1.7 W/cm², 0°C で 30 分間照射することによって行った。糖アクセプターである糖脂質としては、phenyl, octyl 基をアグリコンとする β -グルコシドを用いた。超音波処理後の基質溶液に、所定濃度の TVAI を添加することで反応開始し、HPLC を用いて生成物の分離を行い、NMR 及び MALDI-TOF MS を用いて構造解析を行った。

【結果と考察】 MALDI-TOF MS により、octyl, phenyl どちらの β -グルコシドを用いた反応系においても、1~5 糖程度のオリゴ糖が転移した生成物の存在を確認した(図 1)。また、反応溶液の HPLC 解析により、octyl β -グルコシド反応系のみにおいて、多くの副生成物の存在を確認した(図 2)。それぞれのピークを HPLC により分取し、構造解析を行ったところ、 α -1,4 転移生成物のみを与える phenyl β -グルコシド反応系と異なり、octyl β -グルコシド反応系では、 α -1,4 結合以外にも α -1,3, α -1,6 結合を介して糖が転移した生成物を与えることが明らかになった。このことから、アグリコンの構造次第で糖転移反応生成物の結合様式を制御できることが示唆される。また、 α -アミラー