

組換えアカガイアスパラギン酸ラセマーゼの精製と諸特性の解析

環境生物化学研究室 室木芳憲

指導教官 山田良平、解良芳夫、高橋祥司

1. 背景と目的

かつて非天然化合物と考えられていた D-アミノ酸が、近年、哺乳類を含む動物の体内に普遍的に存在する事が明らかとなり、その生理機能や生合成経路に関する研究が進められている。これまで当研究室では、高濃度の D-アスパラギン酸を含有するアカガイから、ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) に依存的なアスパラギン酸ラセマーゼを初めて精製し、その諸性質を解析してきた。その結果、本酵素は AMP により活性化され、ATP により阻害されるという、他のアミノ酸ラセマーゼには類を見ない特性を有している事が明らかとなった。昨年度、本酵素遺伝子が単離され、本酵素は哺乳類セリンラセマーゼと高い相同性を示し、アスパラギン酸ラセマーゼを含む他のアミノ酸ラセマーゼとは相同性を示さないことが明らかとなった。また、本酵素遺伝子を大腸菌で発現させたところ、その粗酵素抽出液にアスパラギン酸ラセマーゼ活性が確認された。そこで、本研究では本組換え酵素を精製し、その特徴づけを行った。

2. 結果および考察

2.1 組換えアカガイアスパラギン酸ラセマーゼの精製

本酵素遺伝子を 1 mM IPTG の存在下で誘導発現させた *E. coli* BL21 (DE3) の培養液 900 mL から組換え酵素 (SbAspR) の精製を行った。精製過程を Table 1 に示す。単一にから精製した組換え酵素の比活性は 10.0U/mg を示し、最終的に 2.88 mg の精製酵素が得られた。この比活性は、以前にアカガイより精製された酵素 (天然酵素) の比活性 9.7U/mg とほぼ等しい値である。精製酵素は SDS-PAGE 上で単一のバンドを示し、推定された分子質量は 38.4 kDa であった。また、ゲル濾過において推定された組換え酵素のネイティブな分子質量は 56.0 kDa であった。これらの分子質量も天然酵素の分子質量とほぼ等しい値であった。

Table 1. Purification of recombinant aspartate racemase from *E. coli* BL21 (DE3) harboring a SbAspR gene

Step	Total activity [U]	Total protein [mg]	Specific activity [U/mg protein]	Purification [fold]	Yield [%]
Crude extract	289	266	1.09	1.00	100
Blue Sepharose	60.2	6.68	9.03	8.28	20.8
Sephacryl S-100	28.8	2.88	10.0	9.17	10.0

2.2 組換えアカガイアスパラギン酸ラセマーゼの特徴づけ

組換え酵素の吸収スペクトル、PLP 依存性酵素の阻害剤の影響を解析した結果、組換え酵素も天然の酵素同様に PLP 依存性であるということが示唆された。続いて、基質濃度が組換え酵素の反応速度に及ぼす影響を解析した結果、組換え酵素によるアスパラギン酸のラセミ化も天然の酵素と同様に、ミカエリス - メンテンの反応速度論に従うということが明らかとなった。算出されたカイネ

ティックパラメーターは大きく異なる値を示し (Table 2)、組換え酵素の方が天然酵素より基質に対する親和性が高いことが示された。また、組換え酵素も天然酵素と同様にアスパラギン酸に高く特異的であった。本酵素はその推定アミノ酸配列から哺乳類のセリンラセマーゼや線虫のトレオニンデヒドラターゼ、酵母のL-トレオ-3-ヒドロキシアスパラギン酸デヒドラターゼと高い相同性を示すことが明らかとなっている。このことから、これら近縁の酵素が示す活性を組換え酵素が有するかどうか調べた。その結果、組換え酵素はL-トレオ-3-ヒドロキシアスパラギン酸およびL-セリンに対してデヒドラターゼ活性を有することが新たに示された (Table 3)。

Table 2 Kinetic parameters of recombinant and native SbAspR

	Substrate	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)
Recombinant enzyme	L-Aspartate	14.5	6.20
	D-Aspartate	17.2	8.10
Native enzyme	L-Aspartate	60.4	7.39
	D-Aspartate	159	22.6

Table 3 Dehydratase activity of recombinant SbAspR

Substrate	Specific activity (U/mg)
L-Aspartate	0.00
L-Serine	0.03
D-Seirne	0.00
L-Threonine	0.00
L-Threo-3-hydroxyaspartate	0.70
16% of the aspartate racemase activity ←	

組換え酵素も天然酵素と同様にヌクレオチドによる活性調節を受け、反応系にAMPを加えると活性が大きく上昇し、ATPを添加すると逆に活性は大きく減少した (Fig. 1)。しかし、AMPが高濃度で存在しているときには違いが見られ、天然の酵素の場合にはAMP濃度が6 mM以上になると活性化の程度が次第に低下したが、組換え酵素では調べた10 mMまでの範囲において双曲線型の活性化曲線が示された (Fig. 2)。また、ATP濃度と酵素活性の関係を解析した結果、組換え酵素は10 μ M以下のATPにより活性が大きく阻害されることが明らかとなった。さらに詳しく解析した結果、組換え酵素においてもATP結合部位とAMP結合部位はそれぞれ独立して存在していることが示された。

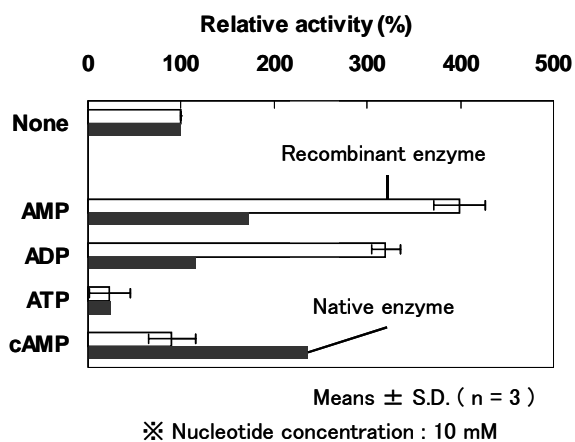


Fig. 1 Effect of nucleotides on recombinant and native SbAspR

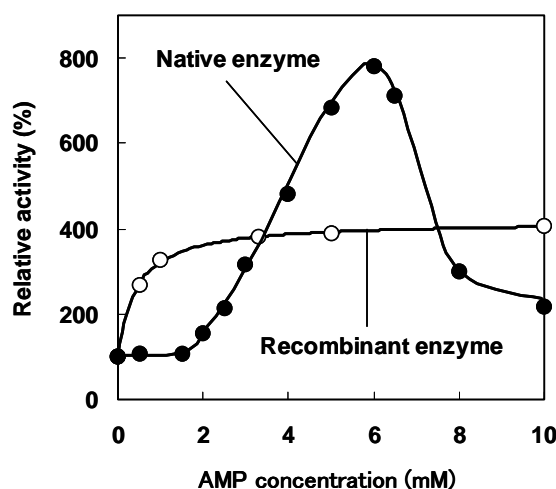


Fig. 2 Effect of AMP on recombinant and native SbAspR