

アカガイ アスパラギン酸ラセマーゼ バリエントの酵素学的諸特性の解析

環境生物化学研究室 藤井和人

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。さらに、本酵素遺伝子の単離が行われ、昨年度には組換え本酵素の精製と諸特性の解析も行われた。しかし、組換え本酵素は、①AMP による活性化の挙動、②ATP に対する親和性、③基質に対する親和性において、アカガイから精製した天然本酵素と異なる性質を有していた。この可能性の 1 つとして今までに単離した本酵素遺伝子の他に、アミノ酸配列が数箇所異なる本酵素バリエント遺伝子が存在する可能性が考えられた。

そこで、本研究では本酵素バリエント遺伝子の取得を検討し、大腸菌で発現させ、その酵素学的諸特性を解析し、天然本酵素と同様の諸性質を有しているかどうか確認することにした。

2. 結果と考察

2-1 アカガイ アスパラギン酸ラセマーゼ バリエント遺伝子の単離とそのアミノ酸配列

以前、当研究室で本酵素遺伝子を単離する際に取得した cDNA を用いて、5 クローンの塩基配列解析を行い、本酵素バリエント遺伝子を単離した。その推定されたアミノ酸配列は以前単離された本酵素遺伝子のもとの 6 箇所アミノ酸配列が異なっていた (Fig. 1)。

SbAspR1	MASKIPQFEVTVDIKKAYDRISKHILYTPVFTSPTFDRVGSKAGRQFYFKAENLQKTG	60
SbAspR2 (variant)	MASKIPQFDVTLADIKKAYDRISKHILYTPVFTSPTFDRVGSKAGRQFYFKAENLQKTG	60
SbAspR1	SFKARGALNALCALEREPSLAGVVTHSSGNHGQALAWASKRAGVKCCVVVPKTAPQVKF	120
SbAspR2 (variant)	SFKARGALNALCALEREPSLAGVVTHSSGNHGQALAWASKRAGVKCCVVVPKTAPQVKF	120
SbAspR1	DAMENYGAEVVKCEPNPSTRKETCEGLAKSRGYKISSDDYDVIAGGGTIALELLQQQP	180
SbAspR2 (variant)	DAMENYGAEVVKCEPNPSTRKETCEGLAKSRGYKISSDDYDVIAGGGTIALELLQQQP	180
SbAspR1	DLDAILVSVSAGGMASGICVYTKNTKSDLKVFLVEPEGKMLEECISKRERLWPNPPQFLD	240
SbAspR2 (variant)	DLDAILVSVSAGGMASGICVYTKNTKSDLKVFLVEPEGKMLEECISKRERLWPNPPQFLD	240
SbAspR1	TIADGIIQQCGNKTWPIILELPEKEIVTNNNDIVEAMRFVFARMKLVIEAAAGATVAA	300
SbAspR2 (variant)	TIADGIIQQCGNKTWPIILELPEKEIVTNNNDIVEAMRFVFARMKLVIEAAAGATVAA	300
SbAspR1	AMTERFQNFHPEAKKVGIIICGGNVDIEKLPWTKKDTK	338
SbAspR2 (variant)	AMTKRFQNFHPEAKKVGIIICGGNVDIEKLPWTKKDTK	338

Fig. 1. Amino acid sequences of *Scapharca broughtonii* aspartate gene. Different amino acid residues between SbAspR1 and SbAspR2 (variant) are indicated by **reversed letter**. The PLP attachment motif is boxed. The putative PLP-binding lysine residue (K) is indicated by **purple**. The amino acid residues interacting with PLP are indicated by **blue**. The tetraglycine loop-like sequence is indicated by underline.

2-2 アカガイ アスパラギン酸ラセマーゼ バリアントの精製

本酵素バリアント遺伝子を大腸菌で発現させ、以前解析された組換え本酵素と同様の精製法で精製を行ったところ、その比活性は 9.89 U/mg であり、以前解析された組換え本酵素及び天然本酵素とほぼ同じ値を示した (Table 1)。組換え本酵素バリアントのネイティブ分子質量及びサブユニットあたりの分子質量はそれぞれ 55.5 kDa、39.9 kDa を示し、以前解析された組換え本酵素及び天然本酵素と同じ二量体を形成していることが示された (data not shown)。

Table 1. Purification of SbAspR2 (variant) from *E.coli* BL21(DE3) harboring pEDRV2

Step / Fraction	Total activity (U)	Protein (mg)	Specific activity (U/mg protein)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	226	298	0.758	1.09	100
Blue Sepharose	69.5	7.28	9.55	12.6	30.8
Sephacryl S-100	25.8	2.61	9.89	13.0	11.4

2-3 アカガイ アスパラギン酸ラセマーゼ バリアントの酵素学的諸特性の解析

組換え本酵素バリアントの酵素学的諸特性を解析したところ、①AMP による活性化の挙動、②ATP に対する親和性、③基質に対する親和性において、どれも天然本酵素と異なり、以前解析された組換え本酵素と同様の性質を有していることが示された (Fig. 2, Table 2, 3)。

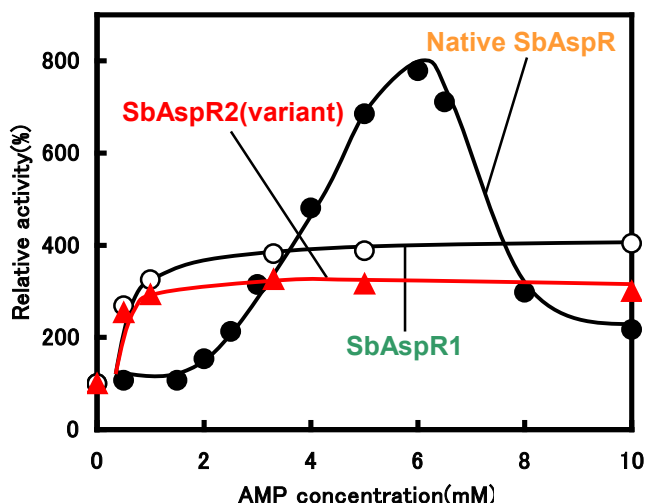


Table 2. Kinetic parameters for regulation by ATP

	$K_{0.5}^{ATP}$ (μ M)	V_{min} (U/mg)
SbAspR2(variant)	11.4 \pm 1.06	1.50 \pm 0.30
SbAspR1	7.69 \pm 1.11	3.90 \pm 0.39
Native SbAspR	1350 \pm 130	0.68 \pm 0.12

Fig. 2. Effect of AMP at different concentrations on the activity of SbAspR.

Table 3. Kinetic parameters of SbAspR

	Direction	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)	k_{cat} (s^{-1}) ^a	k_{cat}/K_m ($s^{-1}M^{-1}$)
SbAspR2(variant)	L→D	11.7	7.90	5.14	378
	D→L	13.6	7.30	4.75	349
SbAspR1	L→D	14.5	6.20	4.03	278
	D→L	17.2	8.10	5.27	306
Native SbAspR	L→D	60.4	7.39	4.80	79.5
	D→L	159	22.6	14.7	92.5