

PLP 依存性デヒドラターゼ類の機能解析と物質生産への応用

北海道大学農学研究院・応用生命科学部門 和田 大

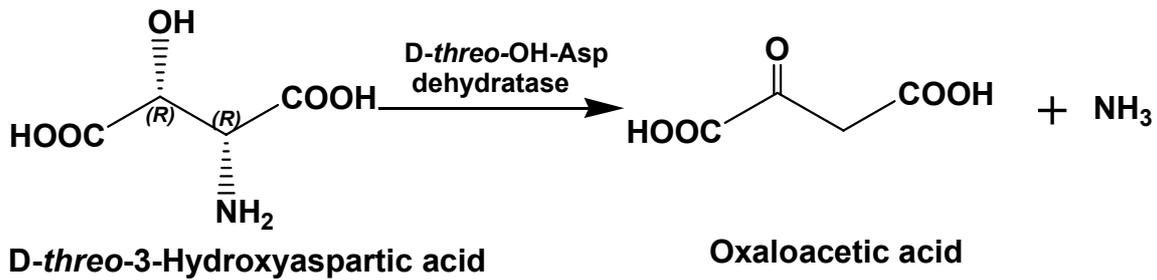
Pyridoxal 5'-phosphate (PLP)依存性のアミノ酸変換酵素(以下 PLP 酵素)はビタミン B6 酵素とも呼ばれ、古細菌からヒトに至るまで、あらゆる生物に存在している。PLP 酵素には aminotransferase、racemase、dehydratase など色々な種類があるが、一般に反応特異性が甘く、複数の反応を触媒することが多い。これは全ての PLP 酵素の反応が、基本的に同じ反応中間体を經由して進行するという PLP 酵素のケミストリーに由来する性質である。それゆえ、一次構造から反応特異性、基質特異性の予測が難しい酵素の1つであるといえる。本研究では PLP 酵素のうち、3 位に-OH もしくは-SH 基をもつアミノ酸に作用する dehydratase 類に注目した。どちらの場合も、データベース上のアノテーション、すなわち一次構造から予想される機能とは異なった反応を触媒するケースである。

1) 3-ヒドロキシアスパラギン酸デヒドラターゼに関する研究

3-ヒドロキシアスパラギン酸(HO-Asp)はアスパラギン酸の-OH アナログであり、自然界ではペプチド性抗生物質の構成成分などとして見いだされる。また、分子中に2個の不斉炭素を有し、4つの光学異性体が存在するのが特徴である。

HO-Aspを単一炭素源としてスクリーニングした土壌細菌 *Pseudomonas* sp. T62 より、HO-Asp デヒドラターゼを電気泳動的にほぼ均一に精製した。本酵素は SDS-PAGE 上で約 39,000 であり、L-スレオ体の HO-Asp に特異的に作用し、エリスロ体の HO-Asp やスレオニン、セリンなどは基質とならなかった。本酵素は Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} 等の2価金属で活性化された。

HO-Asp デヒドラターゼは真核生物である酵母 *Saccharomyces cerevisiae* にも見出された。*S. cerevisiae* の酵素は分子質量約 39,500 であり、やはり L-スレオ体の HO-Asp に特異的であった。以前、本酵素はその一次構造の相同性から、セリンラセマーゼではないかと考えられていたがセリンラセマーゼ活性は検出されず、現在ではデータベースからもセリンラセマーゼホモログのアノテーションは削除されている。現在、DL-HO-Asp の光学分割に有用な D 体に作用する HO-Asp デヒドラターゼを探索中である。(下図参照)



D-スレオ-3-ヒドロキシアスパラギン酸デヒドラターゼ反応

2) システインデスルフヒドラーゼに関する研究

Cysteine desulfhydrase (CD)は、システイン (Cys)をピルビン酸と NH₃、H₂S に分解する。Cys 生産菌の分子育種を行う過程で、宿主菌の CD 活性の低下が Cys 高生産につながることを見出した。しかし、大腸菌の Cys 分解系はこれまで不明であったため、CD を活性染色法で検出したところ、少なくとも 5 種類の CD が存在することが分かった。5 種類の CD を同定した後、各遺伝子破壊株を構築し、CD としての機能を解析した。

大腸菌の全ゲノムライブラリーや精製タンパク質の情報を用いて、Tryptophanase (TNase ; *tnaA* 産物), Cystathionine β-lyase (*metC* 産物), O-Acetylserine sulfhydrylase-A, -B (*cysK* 産物, *cysM* 産物), MalY regulatory protein (*maly* 産物)の 5 種類を CD として同定した。各遺伝子破壊株を構築して CD 活性を測定したところ、野生株と比較して有意に活性が低下した。また、CD 遺伝子破壊株の Cys 生産量は野生株を上回り、同定した CD が *in vivo* で Cys 分解酵素として機能していることが判明した。特に、*tnaA* は培地への Cys 添加によって転写誘導を受けること、また、その破壊株は Cys によって生育が著しく阻害を受けることから、複数個存在する大腸菌 CD の中で TNase が Cys 分解に最も重要な働きをすることが示唆された。このことから Tnase の触媒する CD 反応は、単なる副反応ではなく Cys 分解に関して主要な生理的役割を果たしていると考えられた。

さらにアミノ酸発酵に広く用いられる *Corynebacterium glutamicum* についても Cys 発酵の可能性を探るべく CD 活性を持つ酵素の探索を行った。その結果、*C. glutamicum* でも Cystathionine β-lyase (*metC* 産物)が CD 反応を担っていることが判明した。これらの CD をコードする遺伝子の破壊は、Cys の発酵生産の生産性向上に有効であると考えられた。