

Delftia sp. HT23 由来 D-threo-3-hydroxyaspartate dehydratase の 機能解析と光学分割への応用

生命分子化学講座 微生物生理学分野

武田由希

【背景・目的】アスパラギン酸アナログである 3-hydroxyaspartate (HO-Asp) は分子内に 2 個の不斉炭素を持ち、4 種の光学異性体が存在する (Fig). このうち L-threo 体が神経生理学分野において重要であるが、立体選択的合成は困難である。物質生産への応用が期待できること、および 2 個の不斉炭素を認識する酵素の報告例が少ないことから HO-Asp の D-threo 体を分解する酵素に着目した。当研究室において土壌細菌 *Delftia* sp. HT23 から D-threo-HO-Asp dehydratase (D-THA DH) が精製され、一次配列の相同性から、真核生物由来の D-serine dehydratase (DSD) などの類縁酵素である可能性が示唆された。本研究では、新規酵素 D-THA DH の詳細な機能解析、および類縁酵素との関連性を探ることを第一の目的とした。また、本酵素は酵素的光学分割に応用できる可能性が示唆されたため、この手法による HO-Asp の効率的な調製を第二の目的とした。

【方法と結果①】本酵素と類縁酵素との関連性を探るために大きく 3 つの性質を解析した。1 つ目は本酵素の触媒特性である。解析の結果、本酵素の主反応は HO-Asp の D-threo 体と L-erythro 体の dehydratase 反応である一方、活性は弱いながらも類縁酵素から予測される DSD 反応もまた触媒した。2 つ目に pyridoxal 5'-phosphate (PLP) 要求性酵素である本酵素の PLP 結合部位が、類縁酵素間で保存されていることを実験的に明らかにした。3 つ目に本酵素の金属要求性を調べたところ、類縁酵素と類似した特徴を示し、本酵素の触媒活性に関与する金属は Zn^{2+} であると予測した。分子モデリングにより予測した本酵素の立体構造も類縁酵素と類似しており、酵素の諸性質が類似している理由と考えられる。本研究により、D-THA DH と類縁酵素の構造的・機能的な面での関連性を証明した一方、HO-Asp 異性体という珍しい基質に働くという点、およびアミノ酸の D 体、L 体の両方に働くという点で本酵素の新規性が高いこともまた明らかになった。

【方法と結果②】本酵素は HO-Asp の D-threo 体と L-erythro 体に対して高い特異性を示す。この性質を利用して DL-threo 体と DL-erythro 体からそれぞれ L-threo 体と D-erythro 体の調製を試みた。この応用研究に用いるには *E. coli* における本酵素の発現量が不十分であったため、発現宿主を放線菌に変更することで発現量を増加させた。酵素的光学分割の結果、理論最大収率 50% に対し、それぞれ 38.9%、48.9% の高収率で、L-threo 体と D-erythro 体を取得した。本研究は酵素的光学分割を用いて HO-Asp の異性体を調製した初の例であり、この方法は、結晶化以外の精製ステップを必要としない効率的なものである。

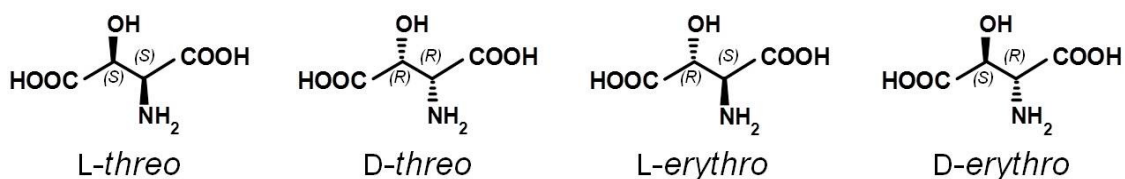


Fig. 3-hydroxyaspartate の 4 種の光学異性体