

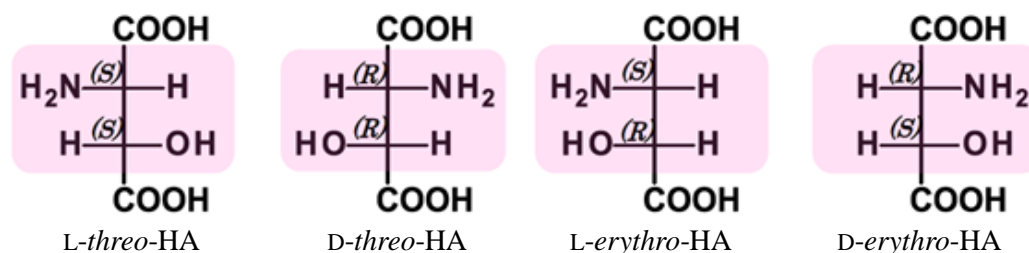
Pseudomonas sp. N99 株由来
D-erythro-3-hydroxyaspartate 分解酵素の精製および一次構造解析

生命分子化学講座 微生物生理学分野
長野弘幸

【背景・目的】 3-Hydroxyaspartate (HA) は分子内に 2 つの不斉炭素を持ち、4 種類の立体異性体が存在する (図). これらの異性体のうち、L-threo 体に特異的に作用する酵素¹⁾と、L-erythro 体及び D-threo 体に作用する酵素²⁾はすでに発見され、詳細な性質の解析が行われている. しかし、これらの HA 分解酵素は一次構造が全く異なっており、新規の D-erythro 体に作用する酵素に興味を持たれた. 本研究では *Pseudomonas* sp. N99 株に見出された新規な D-erythro-HA 分解酵素 (D-EHA DH) を精製し、その一次構造を既報の酵素と比較した.

【方法】 各種カラムクロマトグラフィーにより *Pseudomonas* sp. N99 株から D-EHA DH を精製した. 精製酵素の N 末端アミノ酸配列と内部アミノ酸配列をエドマン分解にて決定した. 決定したアミノ酸配列をもとに縮重 PCR およびインバース PCR を行い、D-EHA DH 遺伝子全長を増幅した. 増幅した D-EHA DH 遺伝子を pET-15b ベクターに挿入し、組換え酵素の活性を確認した. また D-EHA DH のアミノ酸配列を類縁酵素及び既報の HA 分解酵素と比較した.

【結果・考察】 酵素精製の結果、SDS-PAGE 上で D-EHA DH の分子量は約 39.1 kDa であった. 精製酵素は HA の異性体のうち L-threo 体 > D-erythro > D-threo 体の順に高いデヒドラターゼ活性を示した. エドマン分解により精製酵素の N 末端アミノ酸配列 28 残基と内部アミノ酸配列 18 残基を決定した. この配列をもとに遺伝子クローニングを行ったところ、D-EHA DH 遺伝子は 966 bp であった. 精製した組換え酵素は L-threo 体と D-erythro 体に活性を示した. アミノ酸配列は serine/threonine dehydratase ファミリーに属する酵素と高い相同性を示した. また、アミノ酸配列内に同ファミリーに高く保存されている PLP 結合モチーフを持つことから、本酵素は serine/threonine dehydratase ファミリーに属する PLP 酵素であることが示唆された. 本酵素は D-erythro-HA に作用する dehydratase の初の報告である.



(図) Four isomers of 3-hydroxyaspartate

- (文献) 1). Murakami *et al.*, *J. Biochem.* 2009, **145**(5): 661-668
2). Maeda *et al.*, *J. Biochem.* 2010, **148**(6): 705-712