

アミノ酸分析に向けたアミノ酸代謝酵素の熱安定性に関する研究

山口, 浩輝

<https://hdl.handle.net/2324/2236349>

出版情報：九州大学, 2018, 博士（農学）, 論文博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏 名 : 山口 浩輝

論文題名 : アミノ酸分析に向けたアミノ酸代謝酵素の熱安定性に関する研究

区 分 : 乙

論 文 内 容 の 要 旨

生体内のアミノ酸濃度と疾患は相関しており、肝不全やフェニルケトン尿症に対してはそれぞれ分岐鎖アミノ酸やフェニルアラニン分析用酵素が臨床分野で既に用いられている。分析用酵素の実用化においては基質特異性と保存安定性が重要な要素である。しかしながら、これらを満たす酵素が存在しないために分析が困難なアミノ酸が多く存在している。特に、近年我が国において患者数が著しく増加している鬱病と潰瘍性大腸炎はそれぞれトリプトファンとヒスチジンが指標となり得るが、これらの分析用酵素は保存安定性に課題があった。そこで本研究では、保存安定性と関連する酵素の熱安定性に着目し、分析用酵素の実用化に向けた熱安定性向上を検討した。更に、他のアミノ酸分析用酵素への展開を目指して、既に実用化されているロイシン脱水素酵素の熱安定性の分子メカニズムを構造的観点から考察した。

まず、トリプトファン分析用酵素については高い基質特異性を有している *Chromobacterium violaceum* 由来のトリプトファン酸化酵素(VioA)に着目し、部位特異的変異導入法で変異体を調製した。C395A 変異体は 45°C、15 分間熱処理後の残存活性が野生型の 3.4 倍高く、C395A 変異体の T_m 値は 49.3°C で野生型より 4.2 度高かった。加速安定性試験の結果、C395A 変異体は 4°C 保存下における酵素活性の半減期が 452 日で、野生型の 49 日より大幅に長かった。更に、変異導入による基質特異性への影響もほとんど見られなかった。また、ヒト血漿中のトリプトファン濃度を高い正確性 (CV 値 2.9%以下) と精度 (機器分析値との乖離率 3.2%以下) で定量可能であったことから、VioA (C395A)はトリプトファン分析用酵素として有用であることが分かった。この VioA(C395A)が安定化した分子メカニズムを解明するため、X 線結晶構造解析で立体構造を分解能 1.8 Å で決定した。立体構造情報から、安定性向上の一因は、基質ポケット近傍に位置する溶媒露出した C395 がアラニン残基になることで、周辺の疎水性クラスターが安定化されていることであると考察した。

続いて、ヒスチジン分析に向けて、*Photobacterium phosphoreum* 由来ヒスチジン脱炭酸酵素 (HisDC) と *Rhizobium* sp. 4-9 由来ヒスタミン脱水素酵素 (HDH) を組み合わせた分析法を新たに構築した。野生型の HisDC は、保存安定性が低かったため、HisDC のホモロジーモデリングから溶媒露出していると予想したシステイン残基 C57 をセリン残基に変異させたところ、C57S 変異体は 45°C、15 分間熱処理後の残存活性が野生型の 4.9 倍高く、 T_m 値は 52.9°C で野生型より 12.2 度高かった。また、C57S 変異体は 4°C、遮光条件下で 200 日以上活性の低下が見られず、50 日以内に失活する野生型より大幅に安定化していた。HisDC(C57S)は、HDH と組み合わせることによりヒト血漿中のヒスチジン濃度を高い正確性 (CV 値 2.0%以下) と精度 (機器分析値との乖離率 5.8%以下) で定量可能であった。既に市販されている HDH は保存安定性が高いことから、HisDC(C57S) と組み合わせることで、ヒスチジン分析の実用化に十分な性質を持った酵素の取得に成功したと判断した。

次に、既に臨床応用されている *Geobacillus stearothermophilus* 由来 LeuDH (*GstLeuDH*)の熱安定性の分子メカニズムを解明するため、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析によって、アポ

体および NAD⁺複合体の立体構造をそれぞれ分解能 3.0 Å、3.2 Å で決定した。アポ体と NAD⁺複合体の構造比較から *GstLeuDH* は NAD⁺の結合によってオリゴマー界面における新たな分子間相互作用を獲得することで、NAD⁺の結合による熱安定性の向上が達成されていると考察された。更に *GstLeuDH* との配列同一性がそれぞれ 96%、94%である *Lysinibacillus sphaericus* 由来 LeuDH (*LspLeuDH*) および *Sporosarcina psychrophila* 由来 LeuDH (*SpsLeuDH*) との比較から、*GstLeuDH* の分子界面に存在する Ala94、Tyr127 および C 末端領域を介した分子間相互作用が熱安定性に重要であることが示唆された。これらの知見は LeuDH が属する Glu/Leu/Phe/Val 脱水素酵素ファミリーに広く応用できる可能性がある。

結論として、トリプトファンおよびヒスチジンに対する分析用酵素の熱安定性向上により臨床応用に向けた新規アミノ酸分析法の基盤を構築した。本知見により、鬱病や潰瘍性大腸炎の再燃予測における簡易診断法の実現が大いに期待できることに加え、生理学的研究など様々な場におけるアミノ酸分析が可能になる。更に、ロイシン脱水素酵素の熱安定性メカニズムを立体構造から解明し、Glu/Leu/Phe/Val 脱水素酵素ファミリーに属する酵素の熱安定性について知見を深めることができた。本研究成果は、臨床・産業応用に向けたアミノ酸代謝酵素の更なる研究開発の礎になると考えられる。