

# 細菌のアラニン代謝関連酵素の機能と応用

2022 年

芦田 裕之

## 目次

略語一覧	3
序章	4
第1章 低温適応型 L-アラニンデヒドロゲナーゼの構造解析	12
参考文献	25
第2章 <i>Shewanella</i> sp. Ac10 および <i>Phormidium lapideum</i> 由来 L-アラニン デヒドロゲナーゼの補酵素特異性の改変	29
考察	38
参考文献	39
第3章 <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 由来アラニンラセマーゼの分子進化と 酵素学的解析	42
第1節 <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 由来アラニンラセマーゼの 分子進化的解析	44
第2節 <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 由来アラニンラセマーゼの 酵素学的解析	46
考察	60
参考文献	63
第4章 細菌由来 L-AlaDH および AlaR を用いた D-アラニンの酵素的 定量法	67
考察	75
参考文献	76
総括	78
論文目録	81
謝辞	82

## 略語一覧

AMP	adenosine monophosphate
ATP	adenosine triphosphate
D-AAO	D-アミノ酸オキシダーゼ (D-amino acid oxidase)
EDTA	エチレンジアミン四酢酸
HEPES	2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジル] エタンスルホン酸
HPLC	high performance liquid chromatography
IPTG	isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside
L-AAO	L-アミノ酸オキシダーゼ (L-amino acid oxidase)
LB	Luria-Bertani
<i>meso</i> -DAP	<i>meso</i> -ジアミノピメリン酸
mPMS	1-methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate
MurNAc	N-アセチルムラミン酸
NAD <sup>+</sup>	nicotinamide adenine dinucleotide
NADP <sup>+</sup>	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NorVal	ノルバリン (norvaline)
NorLeu	ノルロイシン (norleucine)
PAGE	ポリアクリルアミド電気泳動法
PCR	polymerase chain reaction
PDB	protein data bank
PLP	ピリドキサーール 5'-リン酸
SDS	sodium dodecyl sulfate
TCA	トリクロロ酢酸 (trichloro acetic acid)
UDP	uridine diphosphate
WST-1	water-soluble tetrazolium -1

## 序章

アミノ酸はタンパク質の構成成分であるとともに様々な生体機能の調節分子として、生体に不可欠な存在である。本論文で取り上げたL-アラニンはタンパク質の構成アミノ酸の一種であり、側鎖にメチル基を有する。L-アラニンの代謝では、L-アラニンはピルビン酸へと転換された後にクエン酸回路へと運ばれエネルギー源となる。また糖新生においてグルコースを生合成する際の出発物質であるピルビン酸の基質となる。

アラニンアミノトランスフェラーゼ (Alanine transaminase, ALT, EC 2.6.1.2) (1) はビタミン B6 の補酵素型であるピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) を補酵素とし、L-アラニンと 2-オキソグルタル酸からピルビン酸と L-グルタミン酸を生成する反応を触媒する。同酵素は特に肝臓に多く含まれており肝障害のマーカーとして用いられている。細菌では L-アラニンは L-アラニンデヒドロゲナーゼ (L-Alanine dehydrogenase, L-AlaDH) (2) によってピルビン酸へと代謝分解される。

L-アラニンの光学異性体である D-アラニンは細菌細胞壁のペプチドグリカンの必須構成成分である。D-アラニンは D-アミノ酸オキシダーゼ (D-Amino acid oxidase, D-AAO, EC 1.4.3.3) によってピルビン酸に変換される (3)。D-AAO は FAD を補酵素とし酵母からヒトまで広く存在する。D-AAO を持たない多くの細菌は D-アラニンをアラニンラセマーゼ (Alanine racemase, AlaR) (4) の作用により L-アラニンへと変換し、L-アラニンと同様の経路により代謝する。

以下に細菌のアラニン代謝関連酵素であり、本研究の対象である L-アラニンデヒドロゲナーゼとアラニンラセマーゼについて述べる。

### 1) L-アラニンデヒドロゲナーゼ

L-アミノ酸デヒドロゲナーゼは NAD(P)<sup>+</sup> を補酵素として L-アミノ酸を対応する 2-オキソ酸とアンモニアに変換する酸化的脱アミノ反応、およびその逆の 2-オキソ酸の還元的アミノ化反応を触媒する。これまでに L-バリンデヒドロゲナ

ーゼ、L-ロイシンデヒドロゲナーゼ、L-フェニルアラニンデヒドロゲナーゼ、L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、L-アスパラギン酸デヒドロゲナーゼなどが報告されている。L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼは動物、植物から細菌まで広く存在しているが、その他のL-アミノ酸脱水素酵素は主として細菌や植物で見出されている。

このうち L-アラニンデヒドロゲナーゼ (L-AlaDH ; L-alanine: NAD<sup>+</sup> oxidoreductase, EC 1.4.1.1) は NAD<sup>+</sup> 依存的に L-アラニンをピルビン酸とアンモニアに変換する脱アミノ反応、およびその逆反応であるピルビン酸のアミノ化反応を触媒する。他の L-アミノ酸デヒドロゲナーゼが NAD(P)H の *pro-S* の水素を引き抜く Type B の酵素であるのに対し、L-アラニンデヒドロゲナーゼは NADH の *pro-R* の水素を引き抜く Type A の酵素である。この酵素はさまざまな生理学的プロセスに関与すると考えられている。例えば L-アラニンデヒドロゲナーゼ遺伝子を欠損した *Bacillus subtilis* の変異体では孢子形成が行われず、高濃度のピルビン酸を添加することで相補されると報告されている (5)。このことから L-AlaDH は *B. subtilis* の孢子形成段階において L-アラニンからピルビン酸を生成する役割を果たすと考えられる。またいくつかのランソウでは L-AlaDH は窒素固定条件下で高発現することが報告されている (6, 7)。ヘテロシストを形成する糸状性ラン藻 *Anabaena* sp. PCC7120 の *ald* 変異体では窒素源を含まない培地では野生型に比べてその増殖速度は約 50%であった (8)。このことから窒素固定細菌が正常に成長するためにはヘテロシストにおいてアラニンの異化による窒素源供給が必要であると考えられる。

L-アミノ酸デヒドロゲナーゼは基質の認識部位を除けばよく似た活性中心構造を有している。これまでにいくつかの細菌由来 L-AlaDH について NAD<sup>+</sup> やピルビン酸との複合体の構造が決定され (*Phormidium lapideum* (9) , *Archaeobus fulgidus* (10) , *Mycobacterium tuberculosis* (11) , *Thermus thermophilus* (PDB ID: 2EEZ)、基質である L-アラニンとピルビン酸の認識機構が解明されている。*M. tuberculosis* L-AlaDH では基質ピルビン酸のメチル基は Phe94、Leu130、Met133、Ala299 が形成する疎水ポケットに結合していた (11)。また *P. lapideum* L-AlaDH

ではピルビン酸のメチル基は Tyr93, Met132, Leu129 が形成する疎水性ポケット内に結合していると考えられた (9)。先に述べたように L-アミノ酸デヒドロゲナーゼには NADP(H)と NAD(H)に依存する 2 タイプの酵素が存在しており、それぞれに特徴的な補酵素認識部位を有している。この構造については第 2 章で紹介する。

## 2) アラニンラセマーゼ

アミノ酸ラセマーゼは D-あるいは L-アミノ酸の不斉 $\alpha$ 炭素に作用してラセミ体を形成する反応を触媒する。本酵素は D-アミノ酸の生合成および代謝に大きく関わっている。PLP 依存性のアミノ酸ラセマーゼとして、アラニンラセマーゼ、低基質特異性アミノ酸ラセマーゼ、セリンラセマーゼなどが、また補酵素を要求しないアミノ酸ラセマーゼとしてアスパラギン酸ラセマーゼ、グルタミン酸ラセマーゼなどが報告されている。

このうちアラニンラセマーゼ (EC 5.1.1.1) は PLP に依存して D-, L-アラニンのラセミ化を触媒する酵素である。細菌ペプチドグリカン層の主な構成成分である D-アラニンの生合成にかかわることから細菌に必須の酵素と考えられている。アラニンラセマーゼには主に D-アラニン生合成に働く ALR と D-アラニンの分解に関与する DAD が存在する。これまでにさまざまな細菌からアラニンラセマーゼが精製され、酵素学的解析が行われてきた (12-16)。アラニンラセマーゼは以前はペプチドグリカンをもつ細菌に特徴的な酵素であると考えられていたが、その後、分裂酵母や植物、甲殻類や貝類といった真核生物にもその存在が確認されている (17-22)。甲殻類や貝類では以下に述べるように環境中の塩分濃度の上昇によってアラニンラセマーゼ活性が増加することから、生成物である D-アラニンが浸透圧調整に働くオスモライトとして働く可能性が示唆されている。

アラニンラセマーゼ反応では、基質アラニンが補酵素 PLP とシッフ塩基を形成した後、 $\alpha$ -水素が塩基性触媒基によってプロトンとして引き抜かれアニオン性中間体が生成する。この際 PLP はマイナスチャージを非局在化する「電子溜り」として機能する。続いてこのアニオン性中間体に、PLP-アニオン性中間体平面

を挟んでプロトン引き抜きが起こった面とは反対の面上で酸性触媒基から  $\text{Ca}$  にプロトンが付加する。これによって基質とは異なる立体化学を有する生成物アラニンと PLP の複合体が生成する。PLP に依存するアミノ酸ラセマーゼにおいて、この時に働く塩基性触媒基と酸性触媒基が D-アミノ酸と L-アミノ酸で同一なのか（一塩基機構）異なるのか（二塩基機構）という問題が長らく議論されてきた。アラニンラセマーゼについて、現在では D-アラニンのプロトン引き抜きは PLP 結合リジン残基が、L-アラニンのプロトン引き抜きはチロシン残基が触媒基として働く二塩基機構を取ることが分かっている (4)。

### 3) D-アミノ酸の生理機能

真核生物における D-アミノ酸の生理機能についてはこの 20 年間で急速に研究が進んだ。海洋性水生生物は遊離アミノ酸を高濃度含有していることが知られているが、甲殻類の筋肉部では遊離全アラニン量の 30~60% が、二枚貝の筋肉部では 60~80% が D-アラニンであると報告されている (23, 24)。また軟体動物の頭足類（イカ・タコ類）の神経組織中では遊離 D-アスパラギン酸が見出されており、サトウガイ *Scapharca satowi* の足筋先端部にも多くの D-アスパラギン酸が含まれている (25)。第 3 章で述べるように D-アミノ酸には甘味を示すものが多く、D-アラニンは海産物の味に多大な影響を与えているものと思われる。

D-セリンは哺乳動物脳内に著量存在しており、N-メチル-D-アスパラギン酸レセプターのコアゴニストとして作用している。同レセプターは記憶や学習といった脳の高次機能に関与することから、中枢神経系の D-セリンの挙動は統合失調症や筋萎縮性側索硬化症といった様々な神経疾患に関連するであろうと考えられている (26)。また D-アスパラギン酸も記憶などの脳神経機能に関与するほか、脳ホルモンの分泌制御、テストステロン産生の活性化といった生殖への関連が指摘されている (27)。

このように D-アミノ酸の様々な生理機能が明らかになるにつれて D-アミノ酸定量に対する需要が増加している。D-アミノ酸を一斉にかつ精密に定量する方法としては二次元高速液体クロマトグラフィーを用いる方法や LC/MS/MS を用

いる方法などが開発されている (28, 29)。これらの方法では D-, L-アミノ酸の網羅的解析が可能で、感度も極めて高いが特殊な装置と技術を必要とするものであり、現在は分析を業とする企業において商業ベースで利用されている。特に分析を専門としない研究室では D-, L-アミノ酸を *N*-アセチル-L-システインや *N*-Boc-L-システインと *o*-フタルアルデヒドと反応させてジアステレオマーとして逆相カラムで分離する方法が一般的である。

簡易な定量法としては D-アミノ酸に特異的な酵素を用いた酵素法も考えられる。例えば D-アスパラギン酸はこれに D-アスパラギン酸オキシダーゼを反応させて過酸化水素を発生させ、これをペルオキシダーゼを用いて定量することで定量できる。また D-セリン定量では D-セリンを D-セリンデヒドラターゼによってピルビン酸に転換し、これを NADH と乳酸脱水素酵素を用いて定量する。酵素法では特に酵素の基質特異性が重要となる。

本論文では細菌のアラニン代謝関連酵素のうち L-アラニンデヒドロゲナーゼとアラニンラセマーゼを取り上げ、両者の機能解析と応用に関する研究結果を記す。本論文の第 1 章では低温性 L-アラニンデヒドロゲナーゼのアミノ酸組成および立体構造を中温性及び耐熱性 L-アラニンデヒドロゲナーゼと比較し、酵素の低温適応機構について検討した結果について記述する。第 2 章では *Shewanella* sp. Ac10 由来の NAD(P)<sup>+</sup>依存型 L-アラニンデヒドロゲナーゼと NAD<sup>+</sup>依存型 L-アラニンデヒドロゲナーゼの補酵素結合部位を比較し、アミノ酸置換によって補酵素特異性を改変した研究結果について記述する。第 3 章ではランソウ *Synechocystis* sp. PCC6803 由来のアラニンラセマーゼと他の細菌由来アラニンラセマーゼのアミノ酸配列比較から分子進化について述べるとともに、ランソウ酵素に特有な、基質認識部位のアミノ酸残基の解析結果について述べる。第 4 章ではランソウ由来の L-アラニンデヒドロゲナーゼとアラニンラセマーゼを用いて D-, L-アラニンの酵素的分別定量法を構築し、甲殻類中の D-, L-アラニンを定量した結果について述べる。



## 参考文献

1. Liu, Z., Que, S., Xu, J., Peng, T. (2014) Alanine aminotransferase-old biomarker and new concept: a review. *Int J Med Sci.* 11, 925-935
2. Dave, U.C., Kadeppagari, R.K. (2019) Alanine dehydrogenase and its applications - A review. *Crit Rev Biotechnol.* 39, 648-664
3. Pilone, M.S. (2000) D-Amino acid oxidase: new findings. *Cell Mol Life Sci.* 57, 1732-1747
4. Toney, M.D. (2005) Reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. *Arch Biochem Biophys.* 433, 279-287
5. Siranosian, K.J., Ireton, K., Grossman, AD. (1993) Alanine dehydrogenase (*ald*) is required for normal sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 175, 6789–6796
6. Neilson, AH., Doudoroff, M. (1973) Ammonia assimilation in blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.* 89, 15–22
7. Rowell, P., Stewart, W.D.P. (1975) Alanine dehydrogenase of the N<sub>2</sub>-fixing blue-green alga, *Anabaena cylindrica*. *Arch. Microbiol.* 107, 115–124
8. Pernil, R., Herrero, A., Flores, E. (2010) Catabolic function of compartmentalized alanine dehydrogenase in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 192, 5165–5172
9. Baker, PJ., Sawa, Y., Shibata, H., Sedelnikova, SE., Rice, DW. (1998) Analysis of the structure and substrate binding of *Phormidium lapideum* alanine dehydrogenase, *Nat. Struct. Biol.* 5, 561–567
10. Gallagher, DT., Monbouquette, HG., Schroder, I., Robinson, H., Holden, MJ., Smith, NN. (2004) Structure of alanine dehydrogenase from *Archaeoglobus*: Active site analysis and relation to bacterial cyclodeaminases and mammalian mu crystallin. *J. Mol. Biol.*, 342, 119-130
11. Agren, D., Stehr, M., Berthold, CL., Kapoor, S., Oehlmann, W., Singh, M., Schneider, G. (2008) Three-dimensional structures of apo- and holo-L-alanine dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis* reveal conformational changes upon coenzyme binding, *J. Mol.*

*Biol.* 377, 1161–1173

12. Esaki, N., Walsh, CT. (1986) Biosynthetic alanine racemase of *Salmonella typhimurium*: Purification and characterization of the enzyme encoded by the *air* gene. *Biochemistry* 25, 3261-3267
13. Inagaki, K., Tanizawa, K., Badet, B., Walsh, CT., Tanaka, H., Soda, K. (1986) Thermostable alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus*: Molecular cloning of the gene, enzyme purification, and characterization. *Biochemistry* 25, 3268-3274
14. Strych U., Penland RL., Jimenez, M., Krause KL., Benedik, MJ. (2001) Characterization of the alanine racemases from two Mycobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 196, 93-98
15. Duque, E., Daddaoua, A., Cordero, BF., De la Torre, J., Antonia Molina-Henares, M., Ramos, JL. (2017) Identification and elucidation of in vivo function of two alanine racemases from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol. Rep.* 9, 581-588
16. Muhammad, M., Li, Y., Gong, S., Shi, Y., Ju, J., Zhao, B., Liu, D. (2019) Purification, characterization and inhibition of alanine racemase from a pathogenic strain of *Streptococcus iniae*. *Pol. J. Microbiol.* 68, 331-341
17. Ono, K., Yanagida, K., Oikawa, T., Ogawa, T., Soda, K. (2006) Alanine racemase of alfalfa seedlings (*Medicago sativa* L.): first evidence for the presence of an amino acid racemase in plants. *Phytochem.* 67, 856-860
18. Uo, T., Yoshimura, T., Tanaka, N., Takegawa, K., Esaki, N. (2001) Functional characterization of alanine racemase from *Schizosaccharomyces pombe*: a eucaryotic counterpart to bacterial alanine racemase. *J. Bacteriol.* 183, 2226-2233
19. Shibata, K., Shirasuna, K., Motegi, K., Kera, Y., Abe, H., Yamada, R. (2000) Purification and properties of alanine racemase from crayfish *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 126, 599-608
20. Yoshikawa, N., Dhomae, N., Takio, K., Abe, H. (2002) Purification, properties, and partial amino acid sequences of alanine racemase from the muscle of the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 133, 445-453
21. Yoshikawa, N., Okada, S., Abe, H. (2009) Molecular characterization of alanine racemase in

- the Kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *J. Biochem.* 145, 249-258
22. Nomura, T., Yamamoto, I., Morishita, F., Furukawa, Y., Matsushima, O. (2001) Purification and some properties of alanine racemase from a bivalve mollusc *Corbicula japonica*. *J. Experimental Zoology* 289, 1-9
23. 阿部宏喜 (2008) 「水生生物における遊離 D-アミノ酸の存在、生合成および生理的意義」 *生化学* 80, 308-315
24. Okuma, E., Fujita, E., Amano, H., Noda, H., Abe, H. (1995) Distribution of free D-amino acids in the tissues of crustaceans. *Fish. Sci.*, 61, 157-160
25. Okuma, E., Watanabe, K., Abe, H. (1998) Distribution of free D-amino acids in bivalve mollusks and the effects of physiological conditions on the levels of D- and L-alanine in the tissues of the hard clam, *Meretrix lusoria*. *Fish. Sci.*, 64, 606-611
26. Wolosker H. (2018) The Neurobiology of d-Serine Signaling. *Adv Pharmacol.* 82, 325-348
27. Genchi G. (2017) An overview on D-amino acids. *Amino Acids.* 49, 1521-1533
28. 浜瀬健司、財津潔 (2004) 哺乳類体内微量 D-アミノ酸の選択的分析法の開発. *Bunsekikagaku*, 53, 677-690
29. 中野 洋介、福崎 英一郎 微量 D-アミノ酸定量のための高感度分析法の開発 Shimadzu Application Note No. 67.  
([https://www.an.shimadzu.co.jp/aplnotes/ap\\_aplnote67-jp.pdf](https://www.an.shimadzu.co.jp/aplnotes/ap_aplnote67-jp.pdf))

## 第1章 低温適応型 L-アラニンデヒドロゲナーゼの解析

### 緒言

恒常的に低温適応している好冷性微生物の酵素は好熱性微生物の酵素に比べてあまり注目されていない。しかし好冷菌が生産する低温適応型酵素はさまざまな産業分野での応用やタンパク質の構造と機能の関係を研究する上でも有用である (1, 2, 3)。しかし低温適応型酵素の特徴は限られた生物種でしか明らかにされていない。低温で高い触媒活性を示す低温適応型酵素は、進化の過程でタンパク質構造の柔軟性を獲得し触媒能力を高めていると考えられている。低温適合型酵素の結晶構造 (4, 5, 6) や三次元モデル (7, 8, 9, 10) から、これらの酵素は、塩橋、水素結合、芳香族-芳香族接触などのタンパク質安定化因子の数が減少し、プロリンやアルギニンの含有量も中温性の酵素に比べて減少していることが明らかとなっている。しかし、好冷菌酵素と中温菌酵素の構造と機能を比較するための重要な要素である生物種の類似性にはほとんど注意が払われておらず、分類学上の類似グループに属する生物において両酵素群を比較することは重要である。

NAD<sup>+</sup>依存性の L-アラニンデヒドロゲナーゼ (L-AlaDH) (EC 1.4.1.1) は L-アラニンのピルビン酸への可逆的な脱アミノ化を触媒し、光学活性アミノ酸のエナンチオ選択的生産に利用できる (11, 12)。これまでにさまざまな D-アミノ酸が L-AlaDH、アラニンラセマーゼ (EC 5.1.1.1)、D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ (EC 2.6.1.1)、ギ酸デヒドロゲナーゼ (EC 1.2.1.2) を用いた酵素反応系によって、対応する 2-オキシ酸から効率的に生産されている (12)。しかしオキサロ酢酸や  $\beta$ -クロロピルビン酸など一部の 2-オキシ酸は不安定で、37°C などの中温で長時間培養すると分解されてしまう。このような不安定な 2-オキシ酸は低温では比較的安定であるため、これらの基質を変換するには、低温で高い活性を示す低温適応型の酵素が有用であると考えられる。

本研究では、好冷菌 *Shewanella* sp. strain Ac10 と *Carnobacterium* sp. strain St2 か

ら低温活性 L-AlaDH 遺伝子をクローニングし、3次元構造モデルを構築して中温菌や好熱菌の L-AlaDH と比較した。

## 1. 方法

### 1-1 試薬類

*Bacillus subtilis* 由来 L-AlaDH (BsuAlaDH) は Sigma 社から購入した。*Bacillus stearothermophilus* 由来の L-AlaDH (BstAlaDH) はユニチカ株式会社の近藤氏から提供いただいた。*Vibrio proteolyticus* 由来の L-AlaDH (VprAlaDH) はプラスミド pVprAlaDH を保持する大腸菌 TG1 株より精製した (13)。

制限酵素および修飾酵素は TaKaRa Biochemicals または TOYOBO から購入した。オリゴヌクレオチドは Biologica から購入した。その他の試薬はすべてナカライテスクまたは富士フィルム和光純薬から入手した。

### 1-2 菌体

南極海の海水から分離されたグラム陽性菌 *Carnobacterium* sp. strain St2 は酵母エキス 1.2 g、ポリペプトン 2.3 g、クエン酸ナトリウム 0.3 g、グルタミン酸 0.3 g、硝酸ナトリウム 50 mg、硫酸第一鉄 5 mg、人工海水塩 (Jamarin S; Jamarin Laboratory) を含む培地 (pH 7.5) 1 リットルで培養した。グラム陰性菌 *Shewanella* sp. Ac10 は既報のように培養した (14)。

大腸菌は NAD<sup>+</sup>依存性の L-AlaDH 活性を持たないため、L-AlaDH 遺伝子の発現には大腸菌 TG1 株、JM109 株、C600 株を使用した。

### 1-3 脂肪酸組成

*Carnobacterium* sp. strain St2 の脂肪酸組成は、島津製作所の GC-14A 型ガスクロマトグラフに水素炎イオン化検出器と HR101 型キャピラリーカラムを装備して、既報の方法に従って測定した (14)。

### 1-4 DNA 操作と塩基配列解析

DNA 塩基配列はアプライドバイオシステムズ社のモデル 377B 自動 DNA シーケンサーと色素標識ターミネーターシーケンサーキット (アプライドバイオン

ステムズ社)を用いて決定した。PCRは、サーマルサイクラー(Perkin-Elmer Cetus)を用いて dNTP を 0.2 mM の濃度で含む反応混合液 0.05 ml、各プライマー 100 pmol、鋳型 DNA 10 ng、反応バッファー、2.5 U の ExTaq または LATAq DNA ポリメラーゼ(TaKaRa)を用いて行った。16S rRNA 遺伝子(rDNA)は *Carnobacterium* sp. strain St2 の染色体 DNA を鋳型として、Weisburg らの方法 (15) で PCR を行って増幅し塩基配列を決定した。これらの配列は Ribosomal Database Project (16)、GenBank および EMBL データベースから取得した配列と比較し、GenCANS-RDP システム (17, 18) で分類した。MEGALIGN プログラムで CLUSTAL 法 (19) を用いて配列を揃え系統樹を構築した。

#### 1-5 遺伝子のクローニングとプラスミドの構築

制限酵素 *Sau3AI* で部分消化して得られた *Shewanella* sp.Ac10 株および *Carnobacterium* sp.St2 株の染色体 DNA の断片を、pUC118 の *Bam*HI サイトに挿入した。大腸菌 TG1 を宿主としてライブラリー構築を行った。ジゴキシゲニンで標識した DNA プロブを用いたコロニーハイブリダイゼーションにより、遺伝子ライブラリーから L-AlaDH 遺伝子を持つ陽性クローンを選択した。L-AlaDH 遺伝子に特異的な DNA プロブは、L-AlaDH の 2 つのコンセンサス配列に合わせて設計された以下のプライマーを用いて PCR を行うことで得られた：

Forward primer 5'-GAA(or G)ATT(or C,A)AAA(or G)AAT(or C)AAT(or C)GAA(or G)TA, Reverse primer 5'-CCIGCIACT(or C)TCIG(or C)A(or T)CATIGG。

PCR は以下のプログラムに従って行った。変性 95°C で 1 分、アニーリング 33 ~ 38°C で 2 分、伸長 72°C で 1 分を 45 サイクル行った。近接領域を含まない L-AlaDH 遺伝子全長を PCR 法によって取得し、酵素を過剰生産するための発現プラスミドを作製した。

*Shewanella* sp. strain Ac10 L-AlaDH (SheAlaDH) 遺伝子のクローニングには、Forward primer 5'-CGAGGATCCATATGATTATTGGTGTTCACACAG および Reverse primer 5'-TACGAATTCAAGCAAGTAGGCTTTTTGG を、また *Carnobacterium* sp. strain St2 L-AlaDH (CarAlaDH) 遺伝子のクローニングには、

Forward primer 5'-GAGGGATCCTTATGAAAATCGGTATACCTAAAG および Reverse primer 5'-TTTGAATTCTATTTATTGAAACAAGTACTTGC を用いた。得られた遺伝子は *Bam*HI と *Eco*RI で消化した後、既報 (11) のようにプラスミド pFDHAlaDH の *lac* プロモーターと *tac* プロモーターの下流にある *Bam*HI - *Eco*RI サイトに挿入した。得られた *Shewanella* sp.Ac10 株および *Carnobacterium* sp.St2 株の L-AlaDH 遺伝子をコードするプラスミドをそれぞれ pSheAlaDH2 および pCarAlaDH2 と命名した。

#### 1-6 酵素活性測定

L-AlaDH 活性は 200 mM のグリシン-KCl-KOH 緩衝液 (pH 10.0)、70 mM の L-アラニン、1.0 mM の NAD<sup>+</sup> および L-AlaDH を含む反応混合液 (1 ml) で 25°C における NAD<sup>+</sup> の還元を 340 nm の吸光度をモニターすることにより測定した。タンパク質量は Bio-Rad 社のプロテインアッセイキットを用いて決定した。酵素活性の 1 unit は 1 分間に 1  $\mu$ mole の NADH 生成を触媒する酵素量とした。Kinetic parameter は 2 番目の基質の濃度を一定にしたまま 1 番目の基質の濃度を変化させ初速度から速度定数を決定した。データのフィッティングは、KaleidaGraph ソフトウェア (Adelbeck Software) を用いて行った。タンパク質の分子量は 200 mM の NaCl を含む 100 mM のリン酸カリウム緩衝液で平衡化した Superdex 200 カラム (Pharmacia) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーによって推定した。分子量マーカーとして、ウシ肝臓カタラーゼ (240~250 kDa)、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ (150 kDa)、ウシ血清アルブミン (68 kDa)、ウシ赤血球炭酸アンヒドラーゼ (29 kDa)、ウマ心臓チトクローム c (12 kDa) を用いた。

#### 1-7 酵素精製

SheAlaDH は pSheAlaDH2 を保持する大腸菌 TG1 株から精製した。すべての操作は 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2) 中で行った。細胞 (2.7 g wet weight) を 10 ml の緩衝液に懸濁し、超音波処理で破碎した。遠心分離後、上澄み液に硫酸アンモニウムを最終濃度 2 M になるように加え、Phenyl-Superose FPLC カラム



(Pharmacia) にアプライした。酵素は 2 - 0 M の硫酸アンモニウムグラジエントで溶出した。活性画分を集め、Centricon-50 (Amicon) で濃縮後、Superdex 200 カラム (Pharmacia) を通した。最後に酵素液を MonoQ FPLC カラム (Pharmacia) にアプライし、0 - 0.4 M NaCl グラジエントで溶出した。

## 1-8 分子モデリングと構造解析

L-AlaDH の構造はランソウ *Phormidium lapideum* 由来 L-AlaDH (PlaAlaDH) の構造を基に MODELLER, version 4 (20) というプログラムを用いて行った。

## 2. 結果および考察

### 2-1 L-AlaDH 遺伝子を持つ低温適応菌のスクリーニング

L-AlaDH 遺伝子を保有する低温適応菌を PCR 法を用いて検索したところ、グラム陽性菌 St2 株が L-AlaDH 遺伝子を保有していることがわかった。この菌株は 4°C でよく成長し、最適な生育温度は 20°C 前後で、30°C 以上ではほとんど成長しない。また、この菌株ではドコサヘキサエン酸が全脂肪酸の 6% を占めており、寒冷地に適応した微生物に特徴的なドコサヘキサエン酸やエイコサペンタエン酸などの多価不飽和脂肪酸が含まれていることがわかった (3)。St2 株は、その 16S rDNA 配列から、低 G+C 含有グラム陽性細菌群に属すると考えられた。St2 株は南極の細菌 *Carnobacterium alterfunditum* (21) に最も類似していた。そこでこの菌株を *Carnobacterium* sp. strain St2 と命名した。もう一つの菌株、グラム陰性の南極の細菌 *Shewanella* sp. Ac10 株が L-AlaDH 遺伝子を持っていた。この菌株は 4°C でよく増殖し、20°C 前後で最適な増殖を示し、30°C 以上ではほとんど増殖しない。この菌株の分類学上の特徴と脂肪酸組成についてはすでに報告されている (14)。

### 2-2 L-AlaDH 遺伝子のクローニングと発現

*Shewanella* sp. Ac10 および *Carnobacterium* sp. St2 から PCR 法により L-AlaDH

遺伝子を取得した。pSheAlaDH2 を保持する大腸菌 TG1 における SheAlaDH の発現レベルは、細胞抽出液中の L-AlaDH の比活性（約 4 U/mg of protein）から判断して全可溶性タンパク質の約 10%であった。この比活性は 20~37°Cの培養温度に影響されなかった。一方、pCarAlaDH2 を発現させた大腸菌 TG1 を 37°Cで培養すると抽出液中に L-AlaDH 活性は認められなかったが、30°C以下の温度で培養すると低いながら酵素活性（0.03~0.07U/mg of protein）が検出された。大腸菌 TG1 を宿主株とし pCarAlaDH2 の元となった pFDHAlaDH (11) をベクターとした発現系は、pUC118、pKK233-2、pFDHAlaDH をベクターとし大腸菌 JM109 株、C600 株、TG1 株を宿主株とした系を含め、検討した全ての組み合わせの中で最も高いレベルの L-AlaDH 活性を示した。これらの組み合わせは、いずれも 37°Cで培養した場合には L-AlaDH 活性は検出できなかった。

SheAlaDH は、SDS-PAGE ゲル上で単一のメインバンドを形成するレベルまで精製された。一方、CarAlaDH は非常に不安定で急速に失活し精製できなかった。

### 2-3 アミノ酸配列の類似性と系統的分析

CarAlaDH と SheAlaDH のアミノ酸配列を、他の細菌由来の L-AlaDH のアミノ酸配列と比較した。CarAlaDH は *Geobacillus stearothermophilus* など同じ低 G+C 含量グラム陽性菌グループの酵素と最も高い同一性を示した（58.5~62.8%）。さらに SheAlaDH は VprAlaDH と最も類似していた（同一性レベル 76.5%）。*Vibrio proteolyticus* は *Shewanella* sp. strain Ac10 と同じ  $\gamma$ -proteobacteria に属する中温性グラム陰性菌であるが、SheAlaDH と CarAlaDH の配列同一性は 47.4%と低かった。L-AlaDH の系統相関関係を同じ生物種の 16S rDNA 間の系統相関関係と比較した（Fig. 1）。2つの系統樹の分岐パターンは類似しており、L-AlaDH 遺伝子の相関関係は遺伝子の水平移動などによる不連続的なものではないことがわかった。それぞれの L-AlaDH は、各生物種の代謝要件を満たすように他の L-AlaDH とは分かれて進化したと考えられる。以上の結果から、L-AlaDH は低 G+C 含量グラム陽性菌グループの L-AlaDH と、グラム陰性菌の  $\gamma$ -proteobacteria の L-AlaDH の2つのクラスターに分類できるものと考えられた。同じグループ

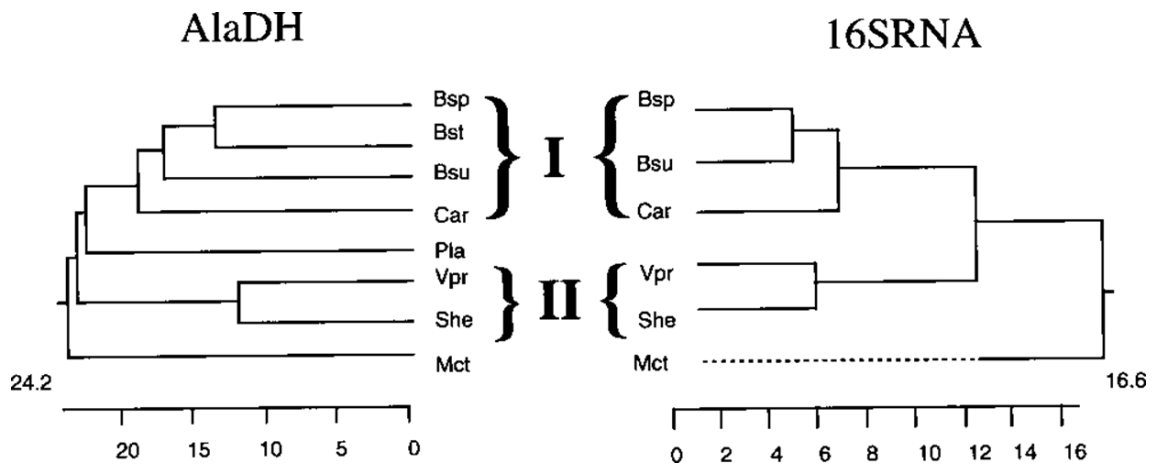


Fig. 1. Comparison of phylogenetic trees for AlaDHs and 16S rDNAs from various bacterial strains. I and II indicate low-G+C-content gram-positive bacteria and members of the  $\gamma$ -subdivision of the *Proteobacteria*, respectively. AlaDHs from *Phormidium lapideum* (Pla) and *G. stearothermophilus* (Bst) were also included in the analysis, although the 16S rDNA sequences of these organisms could not be obtained. AlaDHs from *Carnobacterium* sp. strain St2 (Car), *Bacillus subtilis* (Bsu), *Bacillus sphaericus* (Bsp), *V. proteolyticus* (Vpr), *Shewanella* sp. strain Ac10 (She), *Mycobacterium tuberculosis* (Mct).

の L-AlaDH を比較することで異なる温度への適応に影響する構造的要因を明らかにすることができるかと期待された。

#### 2-4 好冷菌 L-AlaDH の特性

L-AlaDH の触媒活性の最適温度は 50%失活温度と同じ範囲にある (Table 1)。SheAlaDH は CarAlaDH よりも安定していたが中温菌および好熱菌由来の全ての L-AlaDH よりも不安定であった (Fig.2)。このように好冷菌由来の L-AlaDH はいずれも低温適応型酵素に特徴的な特徴を持っていた。CarAlaDH の熱安定性は、大腸菌 TG1/pCarAlaDH2 から調製してもオリジナルの *Carnobacterium* sp. St2

TABLE 1. Properties of AlaDHs

Parameter	Source of AlaDH gene					
	$\gamma$ -Subdivision of the <i>Proteobacteria</i>		Low-G+C-content gram-positive bacteria			
	<i>V. proteolyticus</i>	<i>Shewanella</i> sp. strain Act10	<i>B. stearrowthermophilus</i>	<i>R. subtilis</i>	<i>Carnobacterium</i> sp. strain St2	
Optimum growth temp (°C)	37	20	57	37	20	
Thermostability (°C) <sup>a</sup>	63	59	81	64 <sup>b</sup>	41 <sup>c</sup>	
Maximum activity temp (°C)	53-57	47-50	75-80	60-64 <sup>b</sup>	35-38 <sup>c</sup>	
$K_m$ for L-alanine (mM)	30	7.6	ND <sup>d</sup>	1.73 <sup>b</sup>	3.8 <sup>c</sup>	
$K_m$ for NAD <sup>+</sup> (mM)	0.21	0.24	ND	0.18 <sup>b</sup>	0.2 <sup>c</sup>	
$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	36	27	ND	47-140 <sup>b</sup>	ND	
$k_{cat}/K_m$ for L-alanine (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1.2	3.5	ND	27-81 <sup>b</sup>	ND	
Arg/(Arg + Lys) ratio	0.39	0.47	0.5	0.34	0.19	
Proline content (%)	4.5	4.3	4.3	5.0	5.0	
Glycine content (%)	8.8	9.4	10.8	10.1	10.1	
No. of salt bridges <sup>e</sup>	117	87	132	99	60	
No. of aromatic interactions <sup>e</sup>	36	30	54	42	48	
No. of hydrogen bonds <sup>e</sup>	1,892	1,986	1,936	1,947	1,962	
Hydrophobic interactions <sup>f</sup>	2.2	2.1	2.2	2.2	2.1	
No. of loop insertions/no. of deletions <sup>g</sup>	2/0	2/0	3/1	2/1	2/1	

<sup>a</sup> Temperature at which the enzyme loses 50% of its original level of activity after 30 min of incubation.

<sup>b</sup> Data obtained from reference 36.

<sup>c</sup> The values were estimated from the results obtained with a crude enzyme preparation.

<sup>d</sup> ND, Not determined.

<sup>e</sup> Total number in hexamer.

<sup>f</sup> Ratio of buried apolar surface area to polar surface area.

<sup>g</sup> Compared with PlaAlaDH.

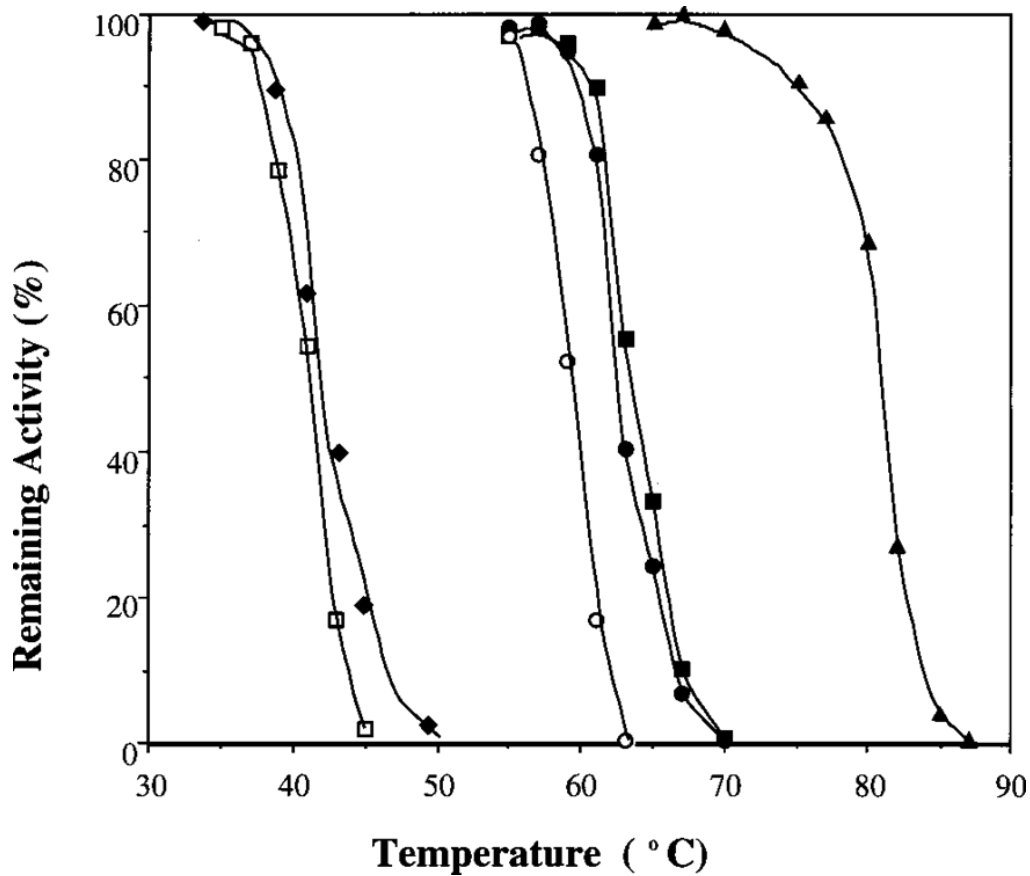


Fig. 2. Thermal stabilities of AlaDHs from the psychrotropic organisms *Carnobacterium* sp. strain St2 (recombinant [□] and wild type [◇]) and *Shewanella* sp. strain Ac10 (○), the mesophilic organisms *V. proteolyticus* (●) and *B. subtilis* (■), and the thermophilic organism *G. stearothermophilus* (▲). The activities of AlaDHs remaining after incubation for 30 min at different temperatures in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.2) are shown.

から調製しても変わらなかった (Fig.2)。CarAlaDH の不安定さはおそらく酵素の固有の特性であろう。

SheAlaDH と VprAlaDH の温度指標 (温度-活性と温度-安定性の関係) の測定値は数°Cの差しかない。一方、CarAlaDH は BsuAlaDH や BstAlaDH とは大きく異なる。したがってグラム陽性菌由来の L-AlaDH は構造と安定性の関係を研究するための良いツールとなるものと思われた。そこで本研究では CarAlaDH の特性を明らかにするために大腸菌 TG1/pCarAlaDH2 の粗酵素抽出物を使用した。

好冷菌酵素の kinetic parameter を Table 1 に示した。SheAlaDH の  $k_{cat}$  値は VprAlaDH の  $k_{cat}$  値よりもわずかに低いが、SheAlaDH の  $k_{cat}/K_m$  値は VprAlaDH の  $k_{cat}/K_m$  値の3倍近くであった。一方 BsuAlaDH の  $k_{cat}/K_m$  値は SheAlaDH の  $k_{cat}/K_m$  値の少なくとも9倍であった。L-AlaDH は *B. subtilis* の正常な孢子形成に必須であることが知られている (22)。孢子を形成する細菌の L-AlaDH は孢子を形成しない細菌の L-AlaDH よりも高活性である可能性が考えられた。

## 2-5 好冷菌の L-AlaDH の構造的特徴

アルギニン残基はリジン残基よりも安定した結合を形成し、タンパク質-タンパク質間やタンパク質-溶媒間で有利な相互作用をもたらす。そのためアルギニン残基の含有量はタンパク質の安定性にとって重要な因子と考えられている (23, 24, 25)。グラム陽性菌由来の3つの L-AlaDH、CarAlaDH、BsuAlaDH、BstAlaDH において熱安定性は総塩基性残基 (Arg+Lys) に対するアルギニン残基のモル比や塩橋数と同様の関係にあることがわかった (Table 1)。このことから CarAlaDH の熱不安定性は総塩基性残基 (Arg + Lys) に対するアルギニン残基の比率が低いことや塩橋数が少ないことで説明できる。

SheAlaDH は VprAlaDH よりも熱に対して不安定であるが、その差はわずかである (Table 1)。したがって SheAlaDH と VprAlaDH の違いはアルギニン残基に関連する要因以外で決定されていると考えられる (Table 1)。プロリン残基やグリシン残基は分子骨格の柔軟性に影響を与えることでタンパク質の安定性に寄与すると考えられている (26)。しかし L-AlaDH の熱安定性はこれらのアミノ酸

組成では説明できない (Table 1)。さらにアミノ酸組成を用いて計算した他の指標、例えば hydrophobicity (27) や aliphatic index (28) などでも好冷菌と中温菌の L-AlaDH には差がないことがわかった。

## 2-6 好冷性 L-AlaDH のホモロジーモデリング

PlaAlaDH はホモ六量体構造 (29) であり、VprAlaDH (13) や BstAlaDH (30) など他の L-AlaDH も同様のサブユニット構造を持つことが分かっている。SheAlaDH の分子量はゲルろ過クロマトグラフィーにより約 24 万 Da と推定された。この結果と SDS-PAGE の結果から、SheAlaDH もホモ六量体構造であることがわかった。CarAlaDH の分子量は不安定なために決定できなかったが CarAlaDH もホモ六量体構造であると推定してモデリングを行った。PlaAlaDH の X 線結晶構造を参考にホモロジーモデリングを用い、2 種類の好冷性 L-AlaDH、2 種類の中温性 L-AlaDH、1 種類の耐熱性 L-AlaDH の構造モデルを構築した。これらの構造をもとに好冷性 L-AlaDH の熱安定性を決定する様々な要因を推定した。

その結果、同じ細菌グループ (SheAlaDH と VprAlaDH、BstAlaDH と BsuAlaDH と CarAlaDH) の L-AlaDH を比較すると、耐熱性 L-AlaDH - 中温性 L-AlaDH - 好冷性 L-AlaDH の順に塩橋の総数が減少することがわかった (Table 1)。CarAlaDH の構造モデルからサブユニットあたりの塩橋を形成するアルギニン残基の数は、BsuAlaDH と BstAlaDH に比べて、それぞれ 2 つと 5 つ少ないことが分かった (Fig. 3)。CarAlaDH が熱に不安定なのは、塩橋の総数、特にアルギニン残基が形成する塩橋の数が少ないことで説明できるかもしれない。しかし、低温適応生物から単離されたタンパク質によく見られる表面拡張ループの数 (1, 31) や芳香族-芳香族相互作用 (1, 9) が少ないことなど他の構造的特徴は好冷性 L-AlaDH の構造モデルには見られなかった。このように低温適応型 L-AlaDH はその不安定性が主に塩橋数の低さに依存するという点でユニークであると思われた。

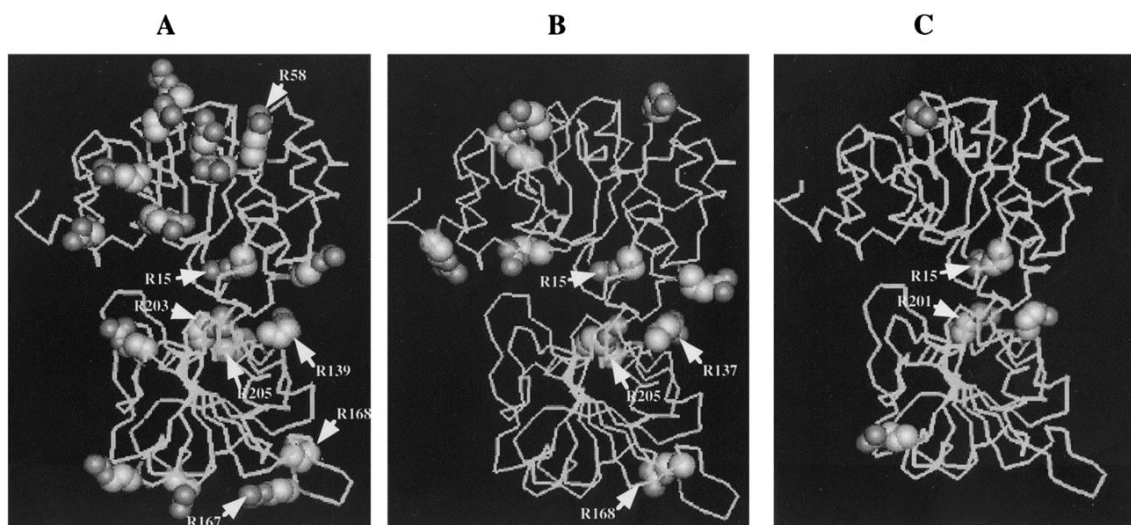


Fig. 3. Locations of arginine residues in the three-dimensional structural models of AlaDHs from the thermophilic organism *B. stearrowthermophilus* (A), the mesophilic organism *B. subtilis* (B), and the psychrotrophic organism *Carnobacterium* sp. strain St2 (C). The arginine residues are shown as space-filling models, and the residues that form salt bridges are indicated by arrows. The lines indicate the C<sub>α</sub> traces of the protein monomers.



## 参考文献

1. Gerday, C., Aittaleb, M., Arpigny, J.L., Baise, E., Chessa, J.P., Garsoux, G., Petrescu, I., G. Feller, G. (1997) Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. *Biochim. Biophys. Acta* 1342, 119–131
2. Marshall, C.J. (1997) Cold-adapted enzymes. *Trends Biotechnol.* 15, 359–364
3. Russell, N J. (1992) Physiology and molecular biology of psychrophilic microorganisms, p. 203–224. *In* R. A. Herbert and R. J. Sharp (ed.), *Molecular biology and biotechnology of extremophiles*. Chapman and Hall, Inc., New York, N.Y.
4. Aghajari, N., Feller, G., Gerday, C., Haser, R. (1998) Structures of the psychrophilic *Alteromonas haloplanctis*  $\alpha$ -amylase give insights into cold adaptation at a molecular level. *Structure* 6, 1503–1516
5. Alvarez, M., Zeelen, J.P., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martia, J.A., Wyns, L., Wierenga, R.K., Maes, D. (1998) Triose-phosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties. *J. Biol. Chem.* 273, 2199–2206
6. Russell, R.J., Gerike, U., Danson, M.J., Hough, D.W., Taylor, G.L. (1998) Structural adaptations of the cold-active citrate synthase from an Antarctic bacterium. *Structure* 6, 351–361
7. Aittaleb, M., Hubner, R., Lamotte-Brasseur, J., Gerday, C. (1997) Cold adaptation parameters derived from cDNA sequencing and molecular modeling of elastase from Antarctic fish *Notothenia neglecta*. *Protein Eng.* 10, 475–477
8. Feller, G., Zekhnini, Z., Lamotte-Brasseur, J., Gerday, C. (1997) Enzymes from cold-adapted

- microorganisms. The class C  $\beta$ -lactamase from the Antarctic psychrophile *Psychrobacter immobilis* A5. *Eur. J. Biochem.* 244, 186–191
9. Narinx, E., Baise, E., Gerday, C. (1997) Subtilisin from psychrophilic Antarctic bacteria: characterization and site-directed mutagenesis of residues possibly involved in the adaptation to cold. *Protein Eng.* 10, 1271–1279
  10. Wallon, G., Lovett, ST, Magyar, C., Svingor, A., Szilagyi, A., Zavodszky, P., Ringe, D., Petsko, GA. (1997) Sequence and homology model of 3-isopropylmalate dehydrogenase from the psychrotrophic bacterium *Vibrio* sp. 15 suggest reasons for thermal instability. *Protein Eng.* 10, 665–672
  11. Galkin, A., Kulakova, L., Yoshimura, T., Soda, K., Esaki, E. (1997) Synthesis of optically-active amino acids from the corresponding  $\alpha$ -keto acids with *Escherichia coli* cells expressing heterologous genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4651–4656
  12. Hummel, W., Kula, M-R. (1989) Dehydrogenase for the synthesis of chiral compounds. *Eur. J. Biochem.* 184, 1–13
  13. Kato, S., Ohshima, T., Ishihara, K., Galkin, A., Yoshimura, T., Esaki, N., Soda, K. (1997) Purification and properties of alanine dehydrogenase from *Vibrio proteolyticus*. *Nihon Nougai Kagaku Kaishi.* 71, 293 (In Japanese.)
  14. Kulakova, L., Galkin, A., Kurihara, T., Yoshimura, T., Esaki, N. (1999) Cold-active serine alkaline protease from the psychrotrophic bacterium *Shewanella* strain Ac10: gene cloning and enzyme purification and characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 611–617
  15. Weisburg, WG., Barns, SM., Pelletier, DA., Lane, DJ. (1991) 16S ribosomal DNA

- amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703
16. Maidak, BL., Olsen, GJ., Larsen, N., Overbeek, R., McCaughey, MJ., Woese, CR. (1997) The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* 25, 109–111
  17. Wu, C. Protein Information Resource. <http://pir.georgetown.edu/gfserver/genefind.html>. [26 July 1999, last date accessed.]
  18. Wu, C., Shivakumar, S. (1994) Back-propagation and counter-propagation neural networks for phylogenetic classification of ribosomal RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 22, 4291–4299.
  19. Clewley, JP., Arnold, C. (1997) MEGALIGN. The multiple alignment module of LASERGENE. *Methods Mol. Biol.* 70, 119–129
  20. Sali, A., Blundell, TL. (1993) Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234, 779–815
  21. Franzmann, PD., Hopfl, P., Weiss, N., Tindall, BJ. (1991) Psychrotrophic, lactic acid-producing bacteria from anoxic waters in Ace Lake, Antarctica; *Carnobacterium funditum* sp. nov. and *Carnobacterium alterfunditum* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 156, 255–262
  22. Siranosian, K J., Ireton, K., Grossman, AD. (1993) Alanine dehydrogenase (ald) is required for normal sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 175, 6789–6796.
  23. Argos, P., Rossman, MG., Grau, UM., Zuber, H., Frank, G., Tratschin, JD. (1979) Thermal stability and protein structure. *Biochemistry* 18, 5698–5703
  24. Menendez-Arias, L., Argos, P. (1989) Engineering protein thermal stability. Sequence statistics point to residue substitutions in  $\alpha$ -helices. *J. Mol. Biol.* 206, 397–406

25. Mrabet, N. T., Van den Broeck, A., Van den Brande, I., Stanssens, P., Laroche, Y., Lambeir, AM., Matthijssens, G., Jenkins, J., Chiadmi, M., Van Tilbeurgh, H. (1992) Arginine residues as stabilizing elements in proteins. *Biochemistry* 31, 2239–2253
26. Matthews, BW., Nicholson, H., Becktel, WJ. (1987) Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6663–6667
27. Kyte, J., Doolittle, RF. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105–132
28. Ikai, A. (1980) Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *J. Biochem.* 88, 1895–1898
29. Baker, PJ., Sawa, Y., Shibata, H., Sedelnikova, SE., Rice, DW. (1998) Analysis of the structure and substrate binding of *Phormidium lapideum* alanine dehydrogenase. *Nat. Struct. Biol.* 5, 561–567
30. Kuroda, S., Tanizawa, K., Sakamoto, Y., Tanaka, H., Soda, K. (1990) Alanine dehydrogenase from two *Bacillus* species with distinct thermostabilities: molecular cloning, DNA and protein sequence determination, and structural comparison with other NAD(P)-dependent dehydrogenases. *Biochemistry* 29, 1009–1015
31. Szilagyi, A., Zavodszky, P. (1995) Structural basis for the extreme thermostability of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Thermotoga maritima*: analysis based on homology modeling. *Protein Eng.* 8, 779–789

## 第2章 *Shewanella* sp. Ac10 および *Phormidium lapideum* 由来 L-アラニン デヒドロゲナーゼの補酵素特異性の改変

### 緒言

NAD<sup>+</sup>と NADP<sup>+</sup>は生体内に存在する 2つの類似した酸化還元型補酵素である。NADP<sup>+</sup>は AMP 部位の 2'-水酸基にエステル化されたリン酸基が存在し、NAD<sup>+</sup>とは構造的に異なる。NAD(P)<sup>+</sup>依存性酵素の NAD<sup>+</sup>と NADP<sup>+</sup>の補酵素結合ドメインの構造は互いによく似ていることがわかっている。これまでに *Thermoactinomyces intermedius* 由来の NAD<sup>+</sup> 特異的 L-ロイシンデヒドロゲナーゼ (L-LeuDH) (TinLeuDH) と NADP<sup>+</sup> 依存性酸化還元酵素とのアミノ酸配列比較の結果から TinLeuDH の補酵素特異性を決定していると思われる一連のアミノ酸残基が決定された。これらのアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換し、野生型本来の補酵素特異性を NADP<sup>+</sup>型に変換できることが報告された (1)。NAD<sup>+</sup>や NADP<sup>+</sup>は高価であるため、これらを補酵素とする酵素を合成反応などに応用する場合には補酵素再生系を共役させることが多い。補酵素再生系と共通の補酵素を使用する必要があることから NAD<sup>+</sup>依存性酵素と NADP<sup>+</sup>依存性酵素の相互変換は重要である。

第1章で述べた L-アラニンデヒドロゲナーゼ (L-AlaDH) [L-alanine: NAD<sup>+</sup> oxidoreductase, deaminating, EC 1.4.1.1]は L-アラニンからピルビン酸への可逆的な酸化的脱アミノを触媒する酵素で *Bacillus* 属などの細菌から単離されている (2-8)。L-AlaDH は A 型立体特異性酵素であり、他のアミノ酸デヒドロゲナーゼとは補酵素の立体特異性が異なる (9)。L-AlaDH の多くはランソウ *Phormidium lapideum* 由来のものを含め NAD<sup>+</sup>依存性の酵素である。しかし *Shewanella* sp. Ac10 由来の L-AlaDH (SheAlaDH) は NADP<sup>+</sup>に対しても活性を示す (10)。この L-AlaDH のアミノ酸配列を他の NAD<sup>+</sup>依存型アミノ酸脱水素酵素のアミノ酸配列と比較したところ SheAlaDH の補酵素結合部位には NADP<sup>+</sup>の 2'-リン酸基との結合に関与すると予想される Arg 残基が存在するこ

とが分かった。

本研究では補酵素結合部位のアミノ酸残基に部位特異的変異を導入し *Phormidium lapideum* 由来の L-AlaDH (PlaAlaDH) と SheAlaDH の補酵素特異性の改変を試みた。

## 1. 方法

### 1-1 試薬類

制限酵素および修飾酵素は TaKaRa Biochemicals 社から購入した。NAD<sup>+</sup>および NADP<sup>+</sup>はオリエンタル酵母社より購入した。その他の試薬はすべて富士フィルム和光純薬から購入した。オリゴヌクレオチドは Biologica 社および Griner 社から入手した。SheAlaDH の遺伝子を含むプラスミド pSheAlaDH は前述の方法で調製した (10)。遺伝子の発現には大腸菌 JM109 株とプラスミドベクター pUC18 および pUC119 を用いた。

### 1-2 *Phormidium lapideum* 由来 L-AlaDH のクローニングと精製

ランソウ *Phormidium lapideum* の染色体 DNA は Genomic DNA Purification Kit MagExtractor - Genome - (TOYOBO CO. LTD.)を用いて調製した。*Phormidium* L-AlaDH の発現ベクターを構築するために、以下のプライマーを用いて PCR 法によりコード領域を増幅した。

5'-CCCTGCAGCTAAAGGATGTTGGTAAAATCG-3' (下線 : *Pst* I site)

5'-GCAAGCTTGGGTGGCTCC-GGTCGCAGTCGAAGC-3' (下線 : *Hind*III site)。

*Phormidium* L-AlaDH 遺伝子の全長を含む PCR 産物 (1.5kb) を *Pst* I と *Hind*III で消化し、同じ制限酵素で処理した pUC18 ベクターにライゲーションした。得られたプラスミド pMAD1 は DNA シークエンスによって構築を確認した。

プラスミド pMAD1 で形質転換した大腸菌 JM109 株を、50 μg/ml のアンピシリンを添加した LB 培地で 37°C で培養した。3 時間培養後、IPTG を最終濃度 0.2 mM になるように添加し、さらに 18 時間培養した。遠心分離で菌体を回収し、5 mM EDTA と 0.05% 2-メルカプトエタノールを含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.2) に懸濁し超音波破碎した。遠心分離 (100,000×g、60 分) 後の上清に 30%飽和になるよう硫酸アンモニウムを添加し、沈殿を 50 mM

リン酸カリウム緩衝液 (pH7.2) で一晚透析した。DEAE Toyopearl 650 (TOSOH) および Superdex 200HR (GE Healthcare Bio-sciences) を用いたカラムクロマトグラフィーにより *Phormidium* L-AlaDH を精製した。

### 1-3 変異導入

DNA mutagenesis kit (GE Healthcares) および Mutan Super Express kit (TaKaRa Biochemicals) を用いて、L-AlaDH 遺伝子に部位特異的変異を導入した。使用した変異導入用プライマーは以下の通りである。

I198R, 5'- CAAATTTTTTGGACAGGAATGTG -3'

R199I, 5'- GATACTGATATCCAAAACAC -3'

D198G, 5'- GTAATGCATCGATACTGCGACCCAAAACAAC -3'

D198A, 5'- GTAATGCATCGATACTGCGAGCCAAAACAAC -3'

D198V, 5'- GTAATGCATCGATACTGCGAACCAAAACAAC -3'

D198L, 5'- GTAATGCATCGATACTGCGAAGCAAAACAAC -3'

DNA シーケンサー 370A (Applied Biosystems 社) を用いた DNA シークエンスにより変異確認を行った。

### 1-4 酵素活性測定およびタンパク質定量

野生型および変異型の SheAlaDH および PlaAlaDH は、前述のように組み換え大腸菌 JM109 株から精製した (5,10)。L-AlaDH 活性は、30°C (SheAlaDH) または 45°C (PlaAlaDH) で Beckman DU650 分光光度計を用い 340nm の吸光度で NAD(P)<sup>+</sup>の還元を測定した (5)。酵素 1 ユニットは 1 分間に 1 μmole の NAD(P)H の生成を触媒する酵素量と定義した。速度定数は一定の L-アラニン濃度 (70 mM) 下で NAD(P)<sup>+</sup>の濃度を変化させたときの初速度を測定し求めた。補酵素特異性として 20 mM の L-アラニンと 0.5 mM の NAD(P)<sup>+</sup>で活性測定を行った。タンパク質濃度は Bio-Rad 社のプロテインアッセイキットを用いて測定した。



## 2. 結果

### 2-1 SheAlaDH の補酵素結合部位の予測

PlaAlaDH の NAD<sup>+</sup>結合部位のアミノ酸配列を SheAlaDH を含む他の NAD<sup>+</sup>特異的 L-アミノ酸デヒドロゲナーゼのアミノ酸配列と比較した (11-14) (Fig. 1)。PlaAlaDH の Asp197 はさまざまな L-アミノ酸デヒドロゲナーゼ間で保存されており、NAD<sup>+</sup>の AMP 部位の 2', 3'-水酸基と水素結合を形成することが示されている (15-17)。SheAlaDH は保存されている Asp 残基の隣の位置にアルギニン残基 (Arg199) を含む点でユニークである。SheAlaDH は NADP<sup>+</sup>の 2'-リン酸基とこの Arg 残基との間のイオンの相互作用を通じて、NADP<sup>+</sup>に作用していると考えられる。PlaAlaDH の補酵素結合部位の 3次元構造 (17) から、Ile198 の側鎖が NAD<sup>+</sup>の AMP 近傍に位置していることが明らかとなった (Fig. 2)。PlaAlaDH の Ile198 は SheAlaDH では Arg に置換されており (Arg199)、この Arg 残基が NADP<sup>+</sup>の 2'-リン酸基と相互作用すると予想される。Ile198 を Arg に置換した変異型 PlaAlaDH も、おそらく SheAlaDH と同じように NADP<sup>+</sup>と結合できると考えられる。

<b>Leucine dehydrogenase, <i>T.intermedius</i> (X79068)</b>	203	<b>D</b> INKENAD	210
<b>Leucine dehydrogenase, <i>B. sphaericus</i> (AB103119)</b>	203	<b>D</b> VNKAAVS	210
<b>Glutamate dehydrogenase, <i>C. symbiosum</i> (Z11747)</b>	261	<b>G</b> PDGYIYD	268
<b>Phenylalanine dehydrogenase, <i>Rhodococcus</i> sp. (U08381)</b>	205	<b>D</b> TDTERVA	212
<b>Alanine dehydrogenase, <i>Shewanella</i> sp. (AF070715)</b>	198	<b>D</b> RSIDALR	205
<b>Alanine dehydrogenase, <i>P. lapideum</i> (D37807)</b>	197	<b>D</b> INVERLS	214

Fig. 1. Alignment of amino acid sequences around the cofactor-binding site of L-AlaDHs and other L-amino acid dehydrogenases. Their GenBank accession numbers are shown in parentheses.

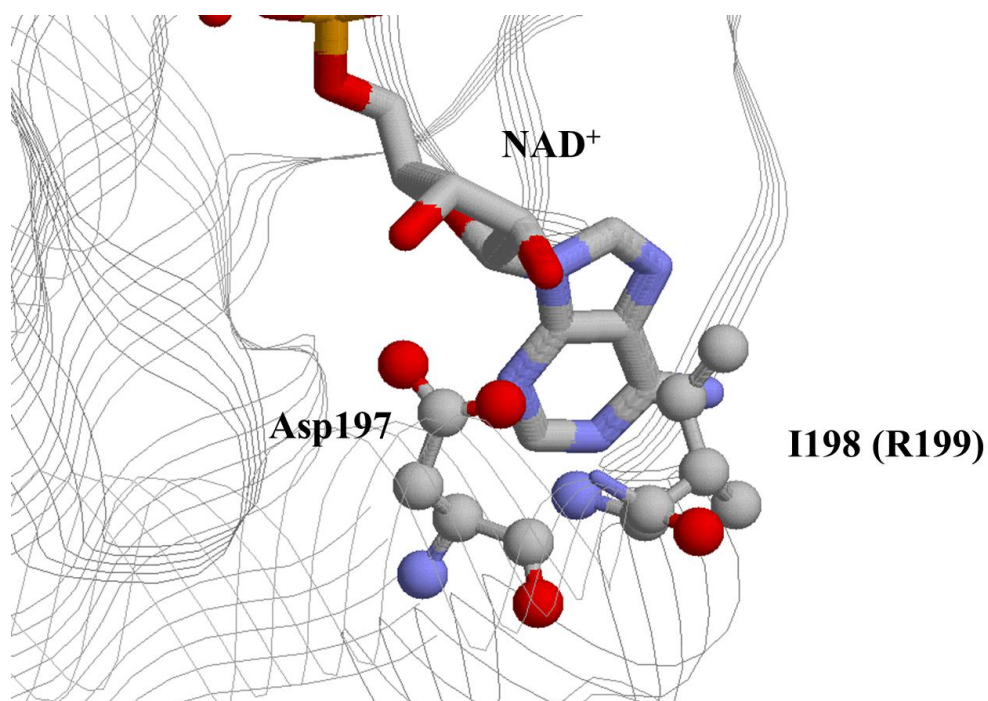


Fig. 2. Cofactor-binding site of L-AlaDH from *Phormidium lapideum* (15).

## 2-2 *Phormidium lapideum* 由来 L-AlaDH I198R 変異体酵素の作製

PlaAlaDH の Ile198 を Arg に置換した I198R 変異体酵素を作製し、その kinetic parameter を決定した (Table 1)。予想通り元々の PlaAlaDH が NAD<sup>+</sup> のみに作用するのに対し、PlaAlaDH I198R 変異体酵素は NADP<sup>+</sup>にも作用した。また PlaAlaDH I198R 変異体酵素の NAD<sup>+</sup>および NADP<sup>+</sup>に対する  $K_m$  および  $k_{cat}$  値は SheAlaDH と同様の値であった。このように PlaAlaDH の 1 アミノ酸変異により同じ補酵素特異性を持つタイプの SheAlaDH に変換することに成功した。

## 2-3 *Shewanella* sp. Ac10 由来 L-AlaDH R199I 変異体酵素の作製

逆に SheAlaDH の Arg199 を Ile に置換した R199I 変異体酵素を作製し、PlaAlaDH と同様の補酵素特異性を持つ酵素に変換できるかを検討した。Table 1 に示すように SheAlaDH R199I 変異体酵素は野生型の PlaAlaDH と同様に NAD<sup>+</sup> 特異的な補酵素特異性を示した。NAD<sup>+</sup>を補酵素とした場合 SheAlaDH R199I 変異体酵素の  $k_{cat}/K_m$  値は野生型 PlaAlaDH の  $k_{cat}/K_m$  値の約 1/3 であったが、野生型 SheAlaDH の  $k_{cat}/K_m$  値とほぼ同等の値であった。

## 2-4 NADP<sup>+</sup>を補酵素とする L-AlaDH 変異体酵素の作成

SheAlaDH の Asp198 はさまざまな NAD<sup>+</sup> 特異的な酵素の間で保存されているが、NADP<sup>+</sup>依存性の酸化還元酵素では同位置に Val や Ile などの疎水性残基が保存されている (18-20)。そこで NADP<sup>+</sup>に対して顕著な選好性を示す SheAlaDH 変異体酵素を作製するために Asp198 を Gly, Ala, Val, Leu などの疎水性アミノ酸に置換した (Table 2)。変異体酵素の NADP<sup>+</sup>に対する  $K_m$  値は野生型酵素に比べて 1/2~1/11 に低下した。一方  $k_{cat}$  は 3~31 倍に増加した。その結果、変異体酵素の  $k_{cat}/K_m$  値は、NADP<sup>+</sup>を補酵素とした場合の野生型酵素の  $k_{cat}/K_m$  値の 5~270 倍になった (Table 2)。NAD<sup>+</sup>を補酵素とした場合、変異体酵素は野生型酵素よりも触媒効率が低く、変異体酵素の  $k_{cat}/K_m$  値は野生型酵素の 1/72~1/5,000 倍であった (Table 2)。NADP<sup>+</sup>を補酵素とした場合 D198A

変異体酵素が最も高い触媒効率を示した。

Table 1. Kinetic parameters for cofactors of the wild type and mutants of L-AlaDH

	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $s^{-1}\cdot mM^{-1}$ )
<b><u>NAD<sup>+</sup></u></b>			
<i>Shewanella</i> sp. Ac10			
Wild-type enzyme	0.035	34.7	990
R199I mutant enzyme	0.010	9.5	950
<i>Phormidium lapideum</i>			
Wild-type enzyme	0.036	95.5	2650
I198R mutant enzyme	0.150	95.4	640
<b><u>NADP<sup>+</sup></u></b>			
<i>Shewanella</i> sp. Ac10			
Wild-type enzyme	4.00	1.60	0.40
R199I mutant enzyme	n.d.	0.00	0.00
<i>Phormidium lapideum</i>			
Wild-type enzyme	n.d.	0.00	0.00
I198R mutant enzyme	2.80	1.30	0.46

n.d.: not detected

Table 2. Kinetic parameters for cofactors of the wild type and mutants of *Shewanella* AlaDH

	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $s^{-1} \cdot mM^{-1}$ )
<b><u>NADP<sup>+</sup></u></b>			
Wild-type enzyme	4.0	1.6	0.4
D198G mutant enzyme	0.67	24.1	36.0
D198A mutant enzyme	0.35	37.8	108.0
D198V mutant enzyme	1.1	50.2	45.6
D198L mutant enzyme	2.1	4.8	2.3
<b><u>NAD<sup>+</sup></u></b>			
Wild-type enzyme	0.035	34.7	991.4
D198G mutant enzyme	3.0	41.2	13.7
D198A mutant enzyme	5.6	43.5	7.8
D198V mutant enzyme	5.2	41.2	7.9
D198L mutant enzyme	11.4	1.9	0.2

## 考察

ランソウ *Phormidium lapideum* の L-AlaDH (PlaAlaDH) を含め、ほとんどの L-AlaDH は NAD<sup>+</sup> 特異的である。しかし好冷菌 *Shewanella* sp.Ac10 由来の L-AlaDH (SheAlaDH) は NAD<sup>+</sup> と NADP<sup>+</sup> の二重の補酵素特異性を示す。PlaAlaDH の補酵素結合部位の Ile198 が SheAlaDH では対応するアルギニン (Arg199) に置換されていることから、SheAlaDH ではこのアルギニン残基が NADP<sup>+</sup> の 2'-リン酸基の結合部位として機能しているのではないかと推測した。この推測を検証するために、部位特異的変異導入法により SheAlaDH の Arg199 を Ile に置換したところ、得られた変異体酵素 (R199I) は確かに NAD<sup>+</sup> に特異的に作用することが示された。一方 PlaAlaDH の I198R 変異体は NAD<sup>+</sup> だけでなく NADP<sup>+</sup> にも作用することがわかった。

PlaAlaDH の Asp197 は、SheAlaDH を含む様々な NAD<sup>+</sup> 特異的な L-アミノ酸デヒドロゲナーゼの間で保存されているが、NADP<sup>+</sup> 特異的な酵素では疎水性のアミノ酸が保存されていた。この残基の関連性を調べるために、Asp198 を Gly, Ala, Val, Leu に置換した変異型 SheAlaDH を作製した。NADP<sup>+</sup> に対する  $k_{cat}/K_m$  値は 5 倍から 270 倍に増加し、D198A が最も優れていた。このことから野生型酵素では Asp198 の負電荷が NADP<sup>+</sup> の 2'-リン酸基と静電的に反発していると考えられる。

*T. intermedius* 由来の NAD<sup>+</sup> 依存性 L-LeuDH は 3 つのアミノ酸残基を置換した結果 (D203A-I204R-D210R) NADP<sup>+</sup> を補酵素とすることが可能となった (1)。本研究では単一のアミノ酸置換によって L-アラニンデヒドロゲナーゼの補酵素特異性を変換できることが示された。

## 参考文献

1. Galkin, A., Kulakova, L., Ohshima, T., Esaki, N., Soda, K. (1997) Construction of a new leucine dehydrogenase with preferred specificity for NADP<sup>+</sup> by site-directed mutagenesis of the strictly NAD<sup>+</sup>-specific enzyme. *Protein Eng.* 10, 687-690
2. Yoshida, A., Freese, E. (1965) Enzymatic properties of alanine dehydrogenase of *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 96, 248-262
3. McCowen, SM., Phibbs, PV Jr. (1974) Regulation of alanine dehydrogenase in *Bacillus (licheniformis)*. *J. Bacteriol.* 118, 590-597
4. Váli, Z., Kilár, F., Lakatos, S., Venyaminov, SA., Závodszky, P. (1980) L-Alanine dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. *Biochim. Biophys. Acta* 615, 34-47
5. Sawa, Y., Tani, M., Murata, K., Shibata, H., Ochiai, H. (1994) Purification and characterization of alanine dehydrogenase from a cyanobacterium, *Phormidium lapideum*. *J. Biochem.* 116, 995-1000
6. Chowdhury, EK., Saitoh, T., Nagata, S., Ashiuchi, M., Misono, H. (1998) Alanine dehydrogenase from *Enterobacter aerogenes*: purification, characterization, and primary structure. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 2357-63
7. Shuffenhauer, G., Schräder, T., Andreesen, JR. (1999) Morpholine-induced formation of L-alanine dehydrogenase activity in *Mycobacterium* strain HE5. *Arch. Microbiol.* 171, 417-23
8. Irwin, JA., Gudmundsson, HM., Marteinson, VT., Hreggvidsson, GO., Lanzetti, AJ., Alfredsson, GA., Engel, PC. (2001) Characterization of alanine and malate dehydrogenases from a marine psychrophile strain PA-43. *Extremophiles* 5, 199-211
9. Esaki, N., Shimoi, H., Nakajima, N., Ohshima, T., Tanaka, H., Soda, K. (1989) Enzymatic in situ determination of stereospecificity of NAD-dependent dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 264, 9750-2
10. Galkin, A., Kulakova, L., Ashida, H., Sawa, Y., Esaki, N. (1999) Cold-adapted alanine dehydrogenases from two antarctic bacterial strains: gene cloning, protein characterization, and comparison with mesophilic and thermophilic counterparts. *Appl. Environ. Microbiol.* 65,

4014-4020

11. Ohshima, T., Nishida, N., Bakthavatsalam, S., Kataoka, K., Takada, H., Yoshimura, T., Esaki, N., Soda, K. (1994) The purification, characterization, cloning and sequencing of the gene for a halostable and thermostable leucine dehydrogenase from *Thermoactinomyces intermedius*. *Eur. J. Biochem.* 222, 305-312
12. Turnbull, AP., Ashford, SR., Baker, PJ., Rice, DW., Rodgers, FH., Stillman, TJ., Hanson, RL. (1994) Crystallization and quaternary structure analysis of the NAD(+)-dependent leucine dehydrogenase from *Bacillus sphaericus*. *J. Mol. Biol.* 236, 663-665
13. Teller, JK., Smith, RJ., McPerson, MJ., Engel, PC., Guest, JR. (1992) The glutamate dehydrogenase gene of *Clostridium symbiosum*. Cloning by polymerase chain reaction, sequence analysis and over-expression in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 206, 151-159
14. Brunhuber, NM., Banerjee, A., Jacobs, WR Jr., Blanchard JS. (1994) Cloning, sequencing, and expression of *Rhodococcus* L-phenylalanine dehydrogenase. Sequence comparisons to amino-acid dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* 269, 16203-16211
15. Baker, PJ., Sawa, Y., Shibata, H., Sedelnikova, SE., Rice, DW. (1998) Analysis of the structure and substrate binding of *Phormidium lapideum* alanine dehydrogenase. *Nat. Struct. Biol.* 5, 561-567
16. Baker, PJ., Turnbull, AP., Sedelnikova, SE., Stillman, TJ., Rice, DW. (1995) A role for quaternary structure in the substrate specificity of leucine dehydrogenase. *Structure* 3, 693-705
17. Vanhooke, JL., Thoden, JB., Brunhuber, NM., Blanchard, JS., Holden, HM. (1999) Phenylalanine dehydrogenase from *Rhodococcus* sp. M4: high-resolution X-ray analyses of inhibitory ternary complexes reveal key features in the oxidative deamination mechanism. *Biochemistry* 38, 2326-2339
18. Greer, S., Perham, RN. (1986) Glutathione reductase from *Escherichia coli*: cloning and sequence analysis of the gene and relationship to other flavoprotein disulfide oxidoreductases. *Biochemistry* 25, 2736-2742
19. Krauth-Siegel, RL., Blatterspiel, R., Saleh, M., Schiltz, E., Schirmer, RH., Untucht-Grau, R.



- (1982) Glutathione reductase from human erythrocytes. The sequences of the NADPH domain and of the interface domain. *Eur. J. Biochem.* 121, 259-67
20. Brown, HL., Ford, SJ., Pridmore, RD., Fritzing, DC. (1983) Nucleotide sequence of a gene from the *Pseudomonas* transposon Tn501 encoding mercuric reductase. *Biochemistry* 22, 4089-4095

### 第3章 *Synechocystis* sp. PCC6803 由来アラニンラセマーゼの分子進化と 酵素学的解析

#### 諸言

アラニンラセマーゼ (EC 5.1.1.1, AlaR) はピリドキサール 5'-リン酸 (PLP) を補酵素として L-Ala と D-Ala の相互変換を触媒する。AlaR は細菌の細胞壁のペプチドグリカン層の必須成分である D-Ala の生合成を担っており、細菌にとって不可欠な存在である。ペプチドグリカンは *N*-アセチルムラミン酸 (MurNAc) と *N*-アセチルグルコサミンが交互にユニット化された糖鎖が、短いペプチド鎖で架橋されて構成されている (1, 2)。代表的なペプチドは L-Ala-D-Glu-2,6-*meso*-diaminopimelate (*meso*-DAP) または L-Lys-D-Ala であり、その N 末端は MurNAc のラクチル基で分岐している。細菌種によっては他の D-アミノ酸もペプチドグリカンペプチドの構成要素として使用され、例えばバンコマイシン耐性菌の一部では D-Ala が D-Ser で置換されている (3)。ペプチド鎖の C 末端の D-Ala は、隣接するペプチド部位の *meso*-DAP (または L-Lys) と直接または短いペプチドブリッジを介して結合しており、その結果、糖鎖が相互に結合し細菌の細胞を取り囲む網目構造が形成される (1, 2)。

UDP-MurNAC 上でのペプチドグリカンの合成は Mur リガーゼ群酵素によって触媒される。MurC、MurD、MurE、MurF は、それぞれ L-Ala、D-Glu、*meso*-DAP、D-アラニル-D-アラニン (D-Ala-D-Ala) を ATP 依存的な一連の反応で順次結紮する。得られたペプチド鎖の末端の D-Ala は 2 つのペプチドグリカンペプチドのライゲーシヨンの際に放出される。D-Ala-D-Ala は、D-alanyl-D-alanine lyase (DdlA) によって 2 つの D-Ala 分子から ATP 依存的な反応で合成される。AlaR は D-Ala の供給源としてペプチドグリカンの生合成に欠かせない存在である。

本研究で取り上げたランソウはグラム陰性菌のものに似たペプチドグリカンを持つことが報告されている (4)。例えば、ランソウのペプチドグリカンに含まれるペプチドには、グラム陰性菌で特徴的に見られる *meso*-DAP が含ま

れている。グラム陽性菌で対応する成分は L-DAP または L-Lys である（参考文献 4 に引用されている文献を参照）。ランソウのペプチドグリカンにはグラム陽性菌のペプチドグリカンの代表的な成分であるテイコ酸は含まれていない。一方、ランソウのペプチドグリカンの層はグラム陰性菌のそれよりも厚くなっている。グラム陰性菌とグラム陽性菌のペプチドグリカン層の厚さはそれぞれ 2 - 6 nm と 20 - 40 nm である (4) が、*Synechococcus* や *Phormidium uncinatum* のペプチドグリカン層はそれぞれ 10 nm、15 - 35 nm と報告されている (4)。糸状性ランソウ *Oscillatoria princeps* のペプチドグリカン層は 250 - 650 nm である (5)。また *Synechocystis* sp. PCC 6714 のペプチドグリカン鎖の架橋度 (56%、6) はグラム陽性菌で見られる範囲であり、ほとんどのグラム陰性菌よりも高い。このようにランソウのペプチドグリカンは、グラム陽性菌とグラム陰性菌の両方のペプチドグリカンに類似したモザイク構造を有している。このようなランソウのユニークなペプチドグリカンの構造に鑑み、本研究ではペプチドグリカン生合成に欠くことができない AlaR の解析を行うこととした。

本研究では AlaR の系統解析を行い、ランソウの AlaR がグラム陽性菌酵素とグラム陰性菌酵素の分岐に先立って分岐した可能性を示唆した。また *Synechocystis* sp. PCC6803 の推定 AlaR 遺伝子 *slr0823* を大腸菌にクローニングし、酵素タンパク質を発現・精製し酵素学的特性を調べた。さらにランソウの AlaR に特徴的な活性中心近傍 Trp385 残基の機能を解析した。

## 第1節 *Synechocystis* sp. PCC6803 由来アラニンラセマーゼの分子進化的解析

### 1. 方法

#### 1-1 系統解析

AlaR の系統解析は CLC Sequence Viewer ソフトウェアの ver.7.7 (QIAGEN) を用い、デフォルト設定で行った。系統樹は Kimura protein distance measure を用いた neighbor-joining 法で 100 回のブートストラップを用いて構築した。系統樹はランソウ由来 AlaR 11 種、グラム陽性菌由来 AlaR 5 種、グラム陰性菌由来 AlaR 6 種のアミノ酸配列から作成した。

### 2. 結果

#### 2-1 AlaR の系統的な解析

緒言で述べたようにランソウのペプチドグリカンがグラム陰性菌とグラム陽性菌の両方の特性を持つユニークな構造をしている(4-6)。本研究ではペプチドグリカンの必須構成成分である D-Ala の生合成を担う AlaR の進化系統解析を行った (Fig. 1)。系統解析の結果ランソウの AlaR は 2 つのグループに分かれた。1 つは *Oscillatoria*、*Phormidium*、*Nostoc* などの糸状性ランソウ由来の AlaR である。これらの細胞は比較的厚い細胞壁を持っている(5)。もう 1 つは薄い細胞壁を持つ *Synechocystis* や *Synechococcus* の単細胞性ランソウ由来 AlaR からなるグループである(7)。*Synechococcus* の AlaR はグラム陽性菌およびグラム陰性菌の AlaR と共通の祖先タンパク質を有すると考えられるが、グラム陽性菌やグラム陰性菌の酵素とは進化的に離れた位置にある。またグラム陰性菌の AlaR はアラニン生合成に働くと考えられる ALR と、アラニンの異化に働くと考えられる DAD で別々のクラスターを形成していた。ランソウのペプチドグリカンがグラム陰性菌とグラム陽性菌の両方のペプチドグリカンに類似した性質を持っていることを考えると、グラム陰性菌とグラム陽性菌の AlaR が分離する前にランソウの AlaR が分岐していたとすれば興味深い。

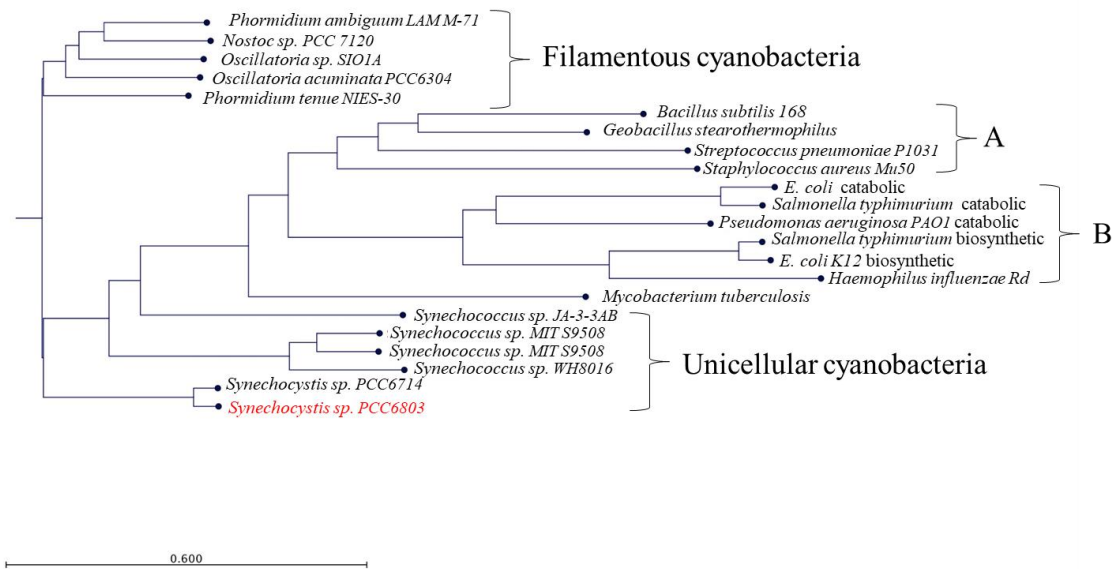


Fig. 1. Phylogenetic analysis of bacterial AlaR. A and B indicate clusters of gram-positive and gram-negative bacteria cluster, respectively.

## 第2節 *Synechocystis* sp. PCC6803 由来アラニンラセマーゼの酵素学的解析

### 1. 方法

#### 1-1 試薬類

制限酵素及び修飾酵素は TaKaRa Biochemicals 社、合成オリゴヌクレオチドは株式会社ニッポンジーンから購入した。遺伝子発現には大腸菌 BL21(DE3)pLysE 株およびプラスミドベクター pET16b を用いた。すべての試薬は特級グレードのものを使用した。*Phormidium lapideum* L-AlaDH および *Rhodococcus* sp. AIU Z-35-1 由来 L-アミノ酸オキシダーゼ (L-AAO) は以前に記載した方法で調製した (8,9)。その他の試薬は富士フィルム和光純薬株式会社から入手した。

#### 1-2 *Synechocystis* sp. PCC6803 由来 AlaR の発現ベクターの構築

*Synechocystis* sp. PCC6803 の染色体 DNA は DNA purification kit -Genome- (TOYOBO) を用いて調製した。推定 AlaR 遺伝子 *slr0823* のコード領域を以下のプライマーを用いて PCR 法により増幅した。

5'-CATATGGTCTTGAGTCGAGAC-3' (下線: *Nde* I site)

5'-GGATCCTTAGATAAGAATACGGGG-3' (下線: *Bam*HI site)

完全長の AlaR をコードする PCR 産物 (1.2kb) を *Nde*I および *Bam*HI で消化し、同じ制限酵素で処理した pET16b ベクターにライゲーションした。結果として得られたプラスミド pET-SynAlaR の構築は DNA シーケンスによって確認した。

#### 1-3 *Synechocystis* sp. PCC6803 由来 AlaR の精製と酵素活性測定

プラスミド pET-SynAlaR を保持する大腸菌 BL21(DE3)pLysE 株を 50 µg/ml のアンピシリンと 50 µg/ml のクロラムフェニコールを添加した LB 培地 (500 ml) で 37°C で培養した。2 時間培養後、IPTG を最終濃度 0.4 mM で添加し、さらに 30°C で 20 時間培養した。遠心分離により細胞を回収し、300 mM の NaCl を含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4) (緩衝液 A) に懸濁し、超音波処理により細胞

を破碎した。遠心分離（100,000×g、60分）後、上澄み液中の酵素をHisTalon™ Superflow Cartridge（TaKaRa Bio）を用いて、メーカーの推奨プロトコルに従って精製した。活性画分を回収し、緩衝液Aで平衡化したSuperdex 200 10/300ゲルろ過カラム（GE Healthcare）を備えたFPLCでイミダゾールを除去した。

D-Ala に対する AlaR 活性は、L-AlaDH と NAD<sup>+</sup>を用いたカップリングシステムを用いて以下のように測定した。50 mM glycine - NaOH 緩衝液（pH 10.0）、0.5 mM NAD<sup>+</sup>、3 mU *Phormidium* L-AlaDH および 10 mM D-Ala を含む反応混合液（1 ml）を 30°C でインキュベートし、DU-650 UV-VIS 分光光度計（Beckman Coulter）を用いて 340 nm の吸光度の増加をモニターした。AlaR の 1 unit は 1 分間に D-Ala から 1 μmole の L-Ala の生成を触媒する酵素量と定義した。

野生型および変異体 AlaR の L-および D-アミノ酸に対する基質特異性は、それぞれ D-AAO および L-AAO を用いて以下のようにして決定した。100 mM glycine - NaOH 緩衝液（pH10.0）、0.48 mM 4-アミノアンチピリン、1.0 mM フェノール、1 mU の L-AAO または D-AAO、1.6 μg の西洋わさびペルオキシダーゼおよび 10 mM の L-または D-アミノ酸からなる反応混合液（100 μl）を 30°C で 30 分間インキュベートした後、SH9000 Lab マイクロプレートリーダー（コロナ電気）を用いて 505nm の吸光度の増加を測定した。タンパク質濃度は Bio-Rad 社のプロテインアッセイキットを用いて、ウシ血清アルブミンを標準物質として測定した。

また基質濃度を変化させることにより kinetic parameter を決定した。 $K_m$  および  $V_{max}$  値は SigmaPlot ソフトウェア（ver. 14.5）を用いて Michaelis-Menten の式に従って算出した。

#### 1-4 部位特異的変異導入

*Synechocystis* AlaR の Trp385 の変異は KOD -plus- mutagenesis kit（TOYOBO）を用いて実施した。使用した変異導入プライマーは以下の通りである。

Trp385-f: 5'- ACCATATCCDDKGAAATACTCTGTG -3'

Trp385-r: 5'- GCCCAAAGTAGAGGCCCAATG -3'

Applied Biosystems PRISM 3130xl DNA sequencer (Thermo Fisher Scientific) を用いた DNA シーケンスにより変異導入を確認した。

## 2. 結果

### 2-1 *Synechocystis* sp.PCC6803 由来の AlaR の酵素学的特性

*Synechocystis* AlaR の分子量は SDS-PAGE から 46 k、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーから 75 k と推定されたことから、この酵素が二量体構造であることが示唆された (Fig. 1)。また *Synechocystis* AlaR の吸収スペクトル (Fig. 2) が示すように、この酵素は 420 nm 付近に吸収ピークを示した。ここに 20 mM のヒドロキシルアミンを添加すると消失したことから *Synechocystis* AlaR は PLP 酵素であることが示唆された。

*Synechocystis* AlaR の D-Ala から L-Ala への変換反応に最適な pH は 10.5 であった (Fig. 3)。またこの酵素は 58°C まで安定で、64°C での 15 分間のインキュベーションによって 50% 失活した (Fig. 4)。*Synechocystis* AlaR は L-Ala と D-Ala に特異的に作用し、Val、Leu、Phe、NorVal、NorLeu、Ser などの他のアミノ酸には作用しなかった。*Synechocystis* AlaR の  $K_m$  値は L-Ala および D-Ala に対してそれぞれ  $4.32 \pm 0.25$  および  $3.87 \pm 0.68$  mM であった。 $k_{cat}$  値は L-Ala と D-Ala でそれぞれ  $9.49 \pm 0.18$  と  $4.42 \pm 0.35$  s<sup>-1</sup> であった。触媒効率  $k_{cat}/K_m$  は L-および D-Ala でそれぞれ  $2.20 \pm 0.11$  および  $1.14 \pm 0.20$  s<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup> であった。これら *Synechocystis* AlaR の kinetic parameter の値は、他の生物の biosynthetic AlaR (ALR) の値と類似していた (10-14、およびその中の参考文献)。

### 2-2 *Synechocystis* AlaR の W385 変異体の酵素学的解析

*Synechocystis* AlaR と *G. stearothermophilus* AlaR のアミノ酸配列の比較を Fig. 5 に示した。*G. stearothermophilus* AlaR (15) を用いてその役割が研究されてきた活性中心アミノ酸残基は *Synechocystis* AlaR でも保存されていた。PLP 結合 Lys 残基 (*G. stearothermophilus* AlaR の K39) は D-Ala のそれぞれ  $\alpha$ -水素の引抜と付



加において一般塩基触媒、一般酸触媒として機能するが、*Synechocystis* AlaR では K65 として保存されていることが確認された。また L-Ala に対応する一般塩基触媒、一般酸触媒として働く Tyr 残基 (*G. stearothermophilus* AlaR の Y265) は Y293 として保存されていることが確認された。

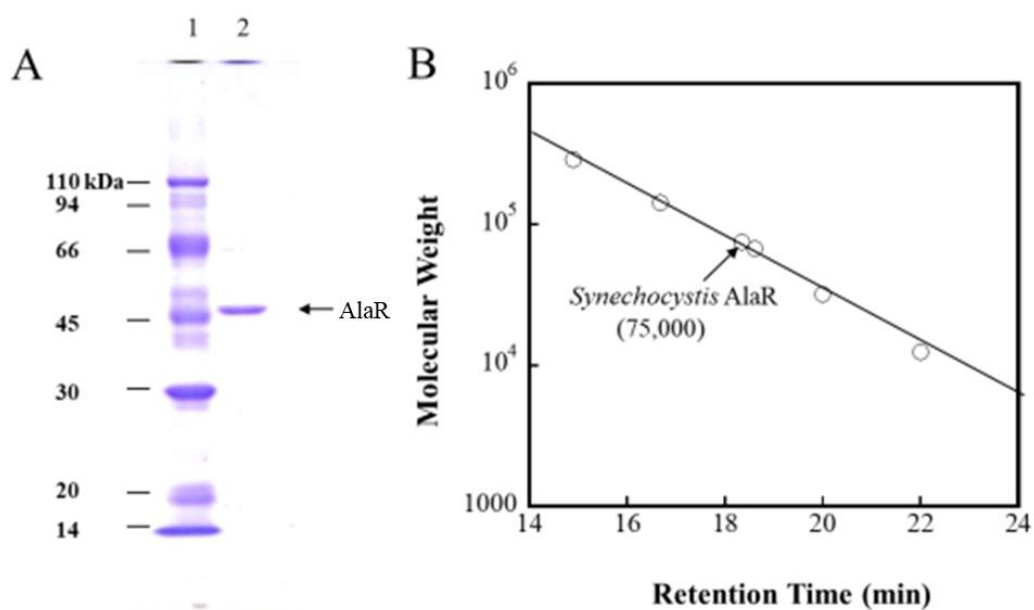


Fig. 1. Purification of *Synechocystis* AlaR. A. SDS-PAGE of *Synechocystis* AlaR. The enzyme (1.0  $\mu\text{g}$ ) was separated by a SuperSep<sup>TM</sup> Ace, 12.5% (Wako Chemicals) and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Lane 1. Mw marker, Lane 2. *Synechocystis* AlaR.

B. Gel filtration analysis of *Synechocystis* AlaR. The enzyme was subjected to FPLC equipped with a Superdex 200 10/300 gel filtration column (GE Healthcare) equilibrated with buffer A consisting of 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) and 300 mM NaCl.

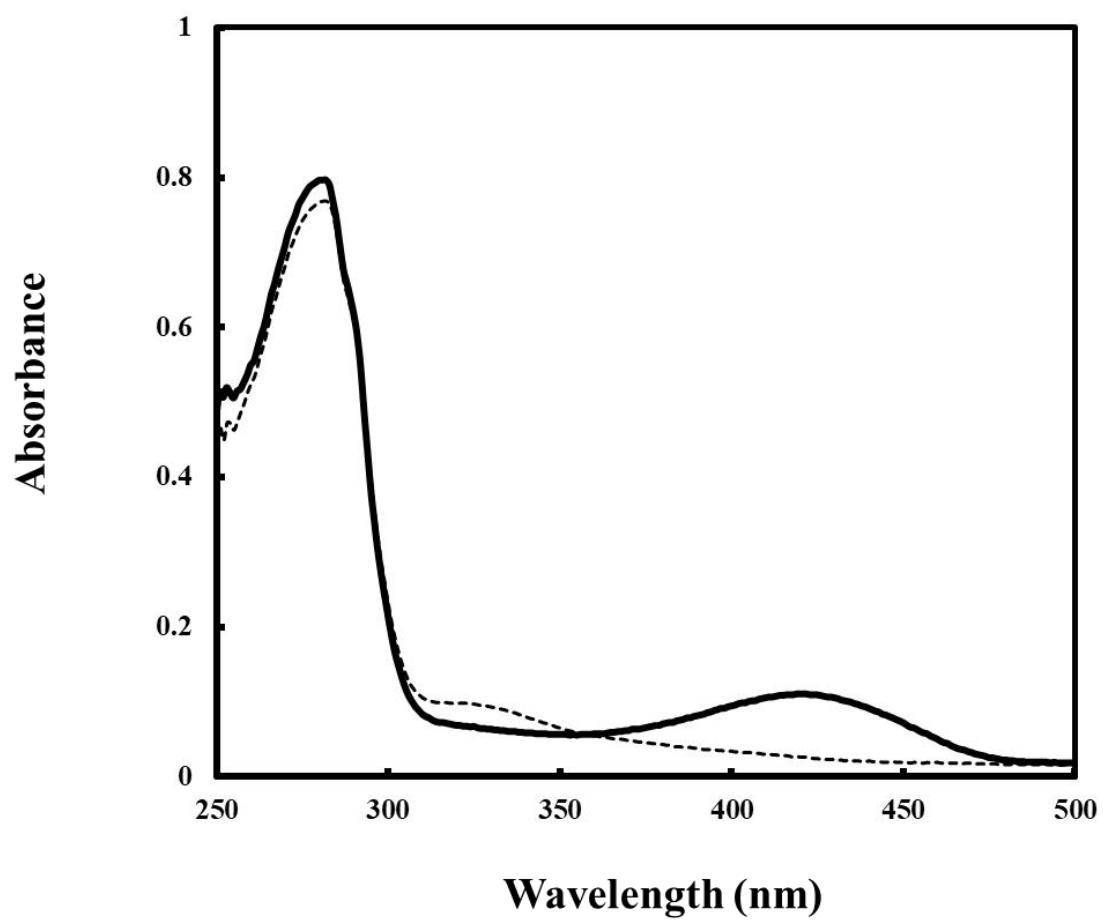


Fig. 2. Absorption spectra of 1.0 mg/ml *Synechocystis* AlaR in buffer A (bold line) and that after addition of 20 mM hydroxylamine (dot line).

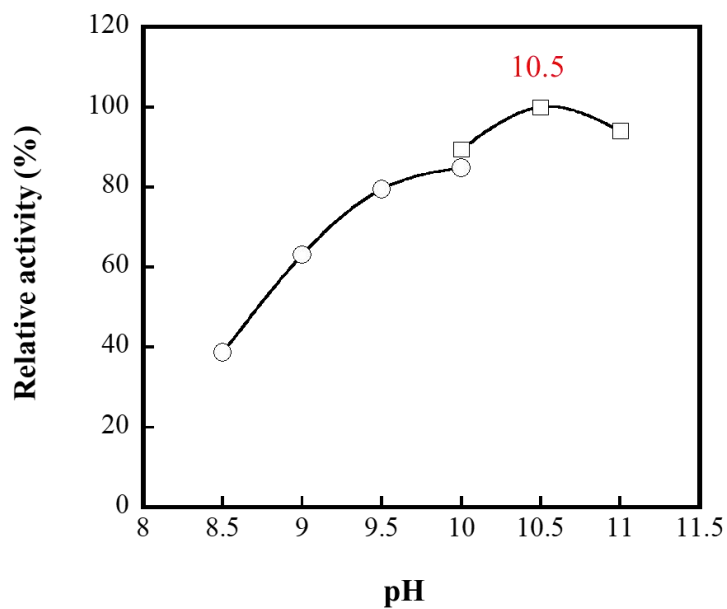


Fig. 3. Effects of pH on the activity with D-Ala of *Synechocystis* AlaR. The buffers used were each 50 mM Gly-NaOH buffer (○) and NaHCO<sub>3</sub>-NaOH buffer (□).

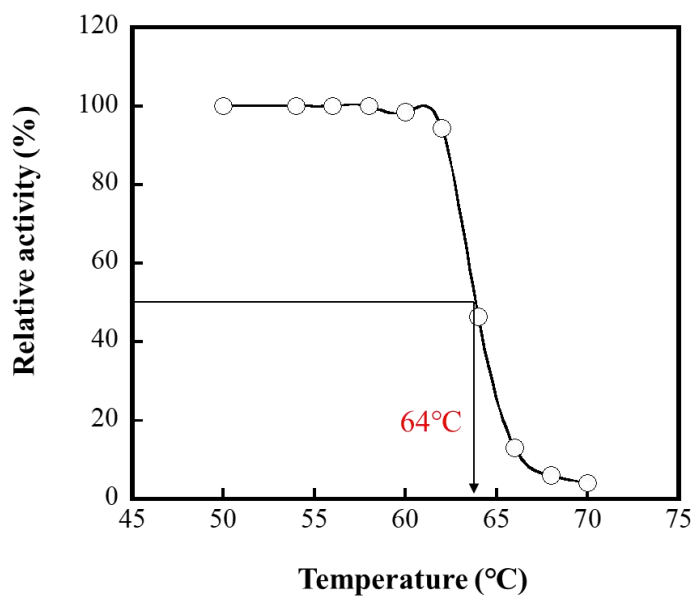


Fig. 4. Thermostability of *Synechocystis* AlaR. The *Synechocystis* AlaR (0.2 mg/ml) in buffer A was incubated for 15 min at each temperature and cooled on ice. Then the activity with D-Ala as a substrate was assayed at 30°C by the L-AlaDH coupling method as described in the text.

```

Synechocystis  MVLRSRDVKSSPEQASRVSSTLSGYRLAELIRQRAWVEIDQAALVHNVRQFRQYVGPKTNL 60
Geobacillus  -----MNDFHRDTWAEVDLDAIYDNVENLRRLPPDDTHI 34
                :  ::  :*.*. *  * : .**.:* :  .*:

Synechocystis  MAVVKADAYGHGAVRVAQTALQAGADWLAIATLGEGIELREAGITAPILLGGINSPEEI 120
Geobacillus  MAVVKANAYGHGDVQVARTALEAGASRLAVAFLDEALALREKGIEAPIVLG-ASRPADA 93
                *****:***** *:**:*:**:**. **:* *.*: : ** * * ***:** . * :

Synechocystis  EAIAHWRLQPTLCSPEQAQLFNDILLKLGKVLPVHLKLDTGMTRLGTPWPQAAN-FVGLV 179
Geobacillus  ALAAQQRIALTVFRSDWLEEASALYSGP-FPIHFHLKMDTGMRLGKDEEETKRIVALI 152
                *: * : * : . : : . : : .***:*** * ** . : : :*.*:

Synechocystis  QSLPQLRLASLYSHLATADDPNTATMLQQQERFAKAIASLRQARLPIPKLHLANSAATLH 239
Geobacillus  ERHPHFVLEGLYTHFATADEVNTDYFSYQYTRFLHMLEWLPSR---PPLVHCANSAASLR 209
                : *.: * .**:*:**:**: ** : * ** : : * . * : * *****:*.

Synechocystis  GQAWHYDMVRVGLGLYGLYPAPHLG--DCLDLKPVLTVRAKITQIRTIPPGTGVSYGHQF 297
Geobacillus  FPDRTFNMVRFGIAMYGLAPSPGIKPLLPYPLKEAFSLHSRLVHVKKLPGEKVSYGATY 269
                ::**.*.:** *:* : ** .: : : : : : : * * ** * :

Synechocystis  VSEETMPMAVVGIGYADGVPRNLSNQLLEVLLRGQPVRQIGAITMDQMMVDLRGIDDPQVG 357
Geobacillus  TAQTEEWIGTIPIGYADGWLRLQ-HFHVLVDGQKAPIVGRICMDQCMIRLPGPLP--VG 326
                .:: :..: ***** *.*. ::**: ** . : * * * * * : * * **

Synechocystis  EVVTLIGQDGRQITADHWASTLGTISWEILCGFKHRLPRILI----- 400
Geobacillus  TKVTLIGRQGEVISIDDVARHLETINYEVPCTISYRVPRIFFRHKRIMEVRNAIGRGES 386
                *****:**. *: * * * **.:*: * :.:*:**:

Synechocystis  -- 400
Geobacillus  SA 388

```

Fig. 5. Alignment of the amino acid sequence of *Synechocystis* and *Geobacillus stearothermophilus* AlaR. The amino acid residues involved in catalysis were in red color.

また PLP のピリジン窒素および 3'-OH と相互作用する *G. stearothermophilus* AlaR の R219 および R136 は、*Synechocystis* AlaR ではそれぞれ R249 および R165 として保存されていることが確認された。

*Synechocystis* AlaR の活性中心アミノ酸配列を他のさまざまな AlaR の塩基配列と比較したところ、*Synechocystis* AlaR の W385 はほぼすべてのランソウの AlaR で保存されていることが示されたが、他の細菌の AlaR では対応する残基が Tyr であることが確認された (Fig. 6)。*G. stearothermophilus* AlaR の対応する Y354 は基質認識に関与していることが知られている (16)。そこで *Synechocystis* AlaR の W385 に部位特異的の変異導入し、W385 を Ala、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr の疎水性アミノ酸残基に置換した。

W385変異体酵素の吸収、蛍光、CDスペクトルは野生型酵素と同様であり、この変異が大きな構造変化を与えていないことが示唆された (Fig. 7)。吸収スペクトルから、野生型およびW385A、W385V、W385L、W385I、W385F、W385Y変異体酵素における420nmの吸光度と280nmの吸光度の比はそれぞれ0.08、0.04、0.05、0.07、0.07、0.08、0.10と算出された。この結果はW385AおよびW385V変異体酵素のPLP含量が野生型酵素のそれよりもわずかに低いことを示唆している。W385のAlaおよびValへの変異がPLPに対する親和性をわずかに低下させた可能性がある。

W385をAla、Val、Leu、Ileなどの疎水性側鎖を持つアミノ酸残基に置換するとD-, L-Alaに対する比活性が低下したが、PheおよびTyrなどの芳香族アミノ酸に置換すると比活性にはほとんど影響を与えなかった (Table I)。そこでW385変異体酵素のD-Ala変換反応のkinetic parameterを*Phormidium* L-AlaDHとのカップリングアッセイを用いて決定した (Table II)。W385AおよびW385V変異体酵素のD-Alaに対する $k_{cat}$ 値は野生型酵素の10.9および12.7%であり、 $K_m$ 値はそれぞれ野生型酵素の2.53および3.37倍であった。一方W385をLeu、Phe、Tyrの各残基に変異させても $k_{cat}$ 値にはほとんど影響が見られなかった。またW385FおよびW385Y変異体酵素の触媒効率 ( $k_{cat}/K_m$ ) は野生型酵素のそれよりも高かった。これらの結果から、385番目の残基の大きさが酵素の触媒効率に影響を与えることが示唆された。*G. Stearothermophilus*

```

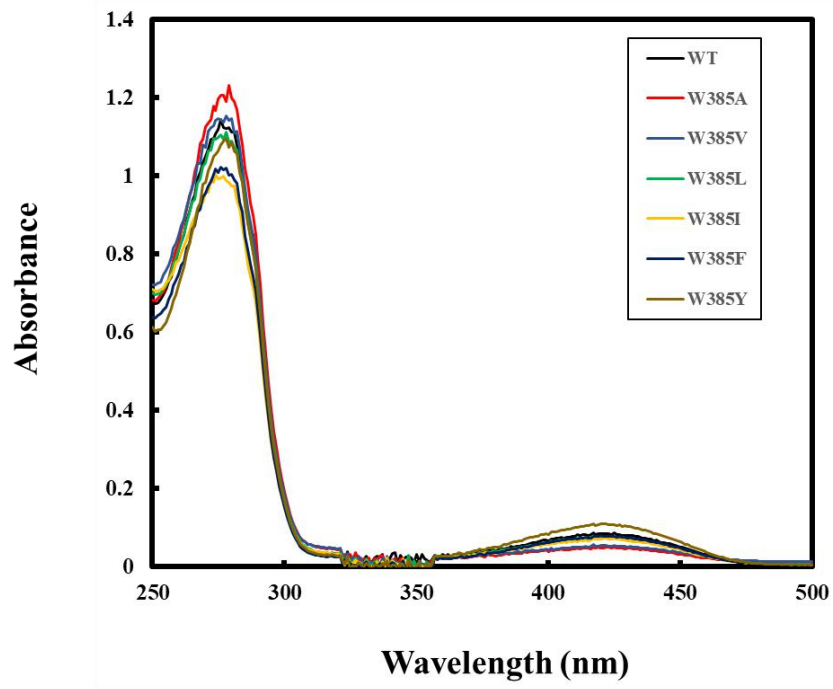
Synechocystis sp. PCC6803      -DPQVGEVVTLLG-QDGRQITADHWASTLGTISWEILCGFKHRLPRILI 400
Synechocystis sp. PCC6714      -NPQVGEVVTLLG-QDGRQITADHWASSLDTISWEILCGFKHRLPRILV 400
Nostoc sp. PCC7120             -DLQEGEIVTLLG-KQGKEKITADDWAEALNTISWEVLCGFKHRLPRVGV 385
Phormidium ambiguum IAM M-71   -NLQAGEVVTVLG-KDGFQIGADDWAEILGTISWEILCSFKHRLPRVAV 393
Oscillatoria sp. SIO1A7        -EVKPGEVVTLLG-REGRYCLSADDWAASCGTISWEILCGFKHRLPRMAV 390
Oscillatoria acuminata PCC630  -DLELGEVVTLLG-QDGNYSITADDWADKLTGTISWEILCGFKHRLPRIAV 384
Phormidium tenue NIES-30       -NLQEGDVVTLLG-RDGHHTIGPDDWAAALANTISWEILCGFKHRLPRIAV 386
Synechococcus sp. WH7803       -TLVDGVDVVTLLG-SDGDAVIHPQDWAELSDSIPWEVLCSEFKHRLPRLVV 393
Synechococcus sp. MIT S9508    -DLESGDVVTLLG-GDDQEVIRPGDWAELSGSIPWEVLCSEFKHRLPRLVV 393
Synechococcus sp. WH 8016     -GLESVDVVTLLG-RDGEQTI SPRSWAELADSIPWEVLCSEFKHRLPRLVI 393
Synechococcus sp. JA-3-3Ab     -DIQVGDVVVLLGPHLASAGFSIQDWADQLGTISYELLCGLSARLPRVLV 422

Geobacillus stearothermophilus ---PVGTVKTLIG-RQGDEVISIDDVARHLETINYEVPCTISYRVPRIFF 369
Bacillus subtilis 168          ---PPGTVKTLIG-RQGDEYISMDEIAGRLETINYEVACTISSRVPRMFL 370
Streptococcus pneumoniae P1031 ---PLGTVKTLIG-SNGDKEITATQVATYRVVTINYEVVCLSDRI PREYY 367
Staphylococcus aureus Mu50     ---KAGDSVILID-NHRESPQSVEVVAEKQHTINYEVLNLSRRLPRIYH 369
Mycobacterium tuberculosis ATC LDVAEGDEAILFG-PGIRGEPTAQDWADLVGTIHYEVVTSRGRITRTYR 381
Escherichia coli K12 biosynthe -QDKAGDPVILWG-----EGLPVERIAEMTKVSAYELITRLTSRVAMKYV 358
Salmonella typhimurium biosynt -QDNAGDPVVLWG-----EGLPVERIAEMTKVSAYELITRLTSRVAMKYI 358
Haemophilus influenzae Rd     -QDLVGDDEVILWG-----KELPIETVAKFTGILSYELITKLTFRVITEYV 359
Salmonella typhimurium ATCC 70 -QAGIGTPVELWG-----KEIKVDDVASAAGTLGYELLCVAVPRVPVTT 356
Escherichia coli catabolic    -QAGIGTPVELWG-----KEIKVDDVASAAGTLGYELLCVAVPRVPVTT 356
Pseudomonas aeruginosa PA01 ca -QAGLGSRVELWG-----PNVPVVALAAQFGSIPYQLLCNLK-RVPRVYS 355
          * . . . * : : *

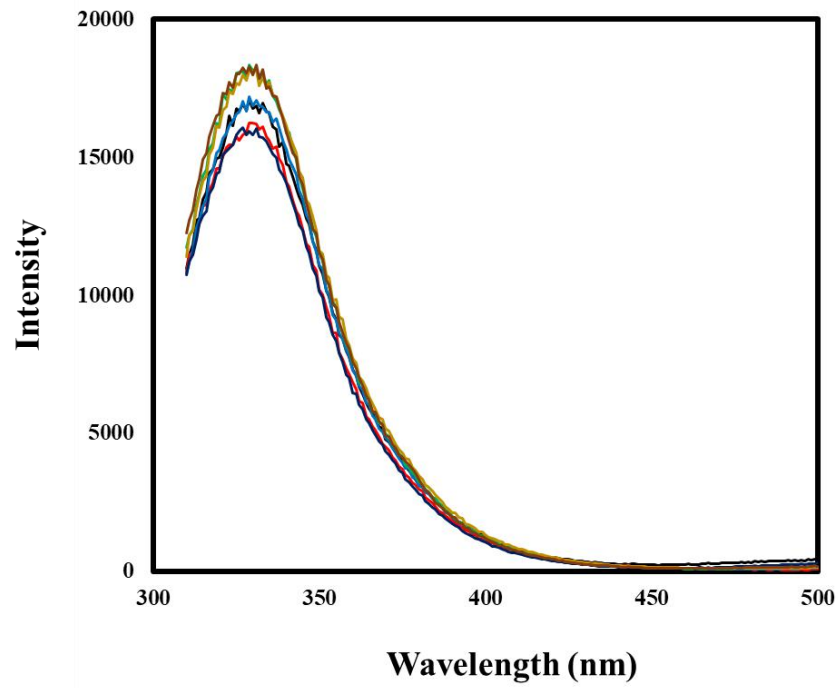
```

Fig. 6. Alignment of the amino acid sequence around W385 of the *Synechocystis* AlaR and the corresponding sequences of the other AlaRs. Amino acid sequence around W385 of the *Synechocystis* AlaR was compared with those of other AlaRs. W385 and the corresponding residues were in red (Trp) or blue (Tyr) color.

**A**



**B**



C

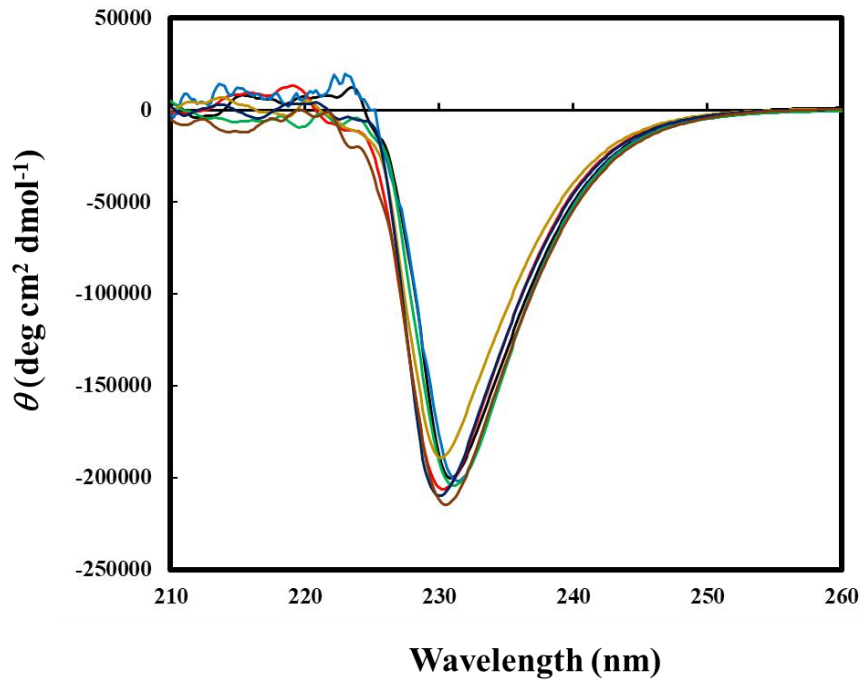


Fig.7. Spectrophotometric analysis of *Synechocystis* AlaR wild-type and W385 mutant enzymes.

A: Absorption spectra, B: Fluorescence spectra, C: CD spectra

— Wild-type, — W385A, — W385V, — W385L, — W385I, — W385F, — W385Y



Table I. Specific activity for D-, L-amino acid of *Synechocystis* AlaR W385 mutant enzymes.

<b>Enzyme</b>	<b>D-Ala</b>	<b>D-NorVal</b>	<b>D-NorLeu</b>	<b>L-Ala</b>	<b>L-NorVal</b>	<b>L-NorLeu</b>
Wild type	7.24 ± 0.01	n.d.	n.d.	7.96 ± 0.08	n.d.	n.d.
W385A	1.55 ± 0.01	2.73 ± 0.00	1.17 ± 0.00	1.53 ± 0.19	1.60 ± 0.16	0.12±0.00
W385V	1.29 ± 0.01	1.66 ± 0.02	0.46 ± 0.00	1.16 ± 0.22	1.21 ± 0.21	0.16±0.00
W385L	6.09 ± 0.03	1.54 ± 0.01	0.33 ± 0.01	2.46 ± 0.47	1.59 ± 0.17	n.d.
W385I	4.96 ± 0.00	1.31 ± 0.00	0.81 ± 0.06	2.16 ± 0.41	1.76 ± 0.01	n.d.
W385F	8.65 ± 0.07	1.44 ± 0.01	0.75 ± 0.02	4.36 ± 0.08	0.39 ± 0.06	n.d.
W385Y	5.36 ± 0.06	0.67 ± 0.02	0.51 ± 0.02	7.15 ± 0.06	0.55 ± 0.08	n.d.

The values are the average of each three samples, and expressed as an average ± SE of units / mg protein.

n.d., not detected (the value is below the detection limit).

Table II. Kinetic parameters for D-Alanine of *Synechocystis* AlaR W385 mutant enzymes.

Enzyme	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )
Wild type	3.87 ± 0.68	4.42 ± 0.35	1.14 ± 0.4
W385A	9.81 ± 0.78	0.480 ± 0.02	0.0489 ± 0.062
W385V	13.0 ± 2.32	0.506 ± 0.07	0.0346 ± 0.035
W385L	6.39 ± 1.72	6.64 ± 0.97	0.156 ± 0.74
W385I	16.7 ± 3.22	3.72 ± 0.51	0.223 ± 0.46
W385F	1.68 ± 0.35	4.25 ± 0.28	2.57 ± 0.87
W385Y	1.45 ± 0.23	5.23 ± 0.23	3.61 ± 0.81

The values are the average of each three samples, and expressed as an average ± SE.

AlaRの対応するY354の役割から予想されるように、W385は基質結合ポケットの中の1つの残基である。W385I変異体酵素のD-Alaに対する $K_m$ 値は野生型酵素の約4.3倍であったが、W385L変異体酵素の $K_m$ 値はほぼ同じであった。またW385V変異体酵素の $K_m$ 値は野生型酵素の3.4倍であった。これらの結果から、分岐鎖の3-メチル基が基質結合を阻害していることが示唆された。

また西洋ワサビペルオキシダーゼとブタ腎臓由来D-AAOまたは*Rhodococcus* L-AAOとのカップリング法を用いてVal、Leu、Phe、NorVal、NorLeu、2-aminoheptanoic acidのD-およびL-体に対するW385変異体酵素の反応性を調べた(Table I)。生成したD- および L-アミノ酸量を生成した $H_2O_2$ 量として測定した。W385A およびW385V変異体酵素はD- および L-Alaに加え、D- および L-NorVal、D- および L-NorLeuに作用した。またW385L、W385I、W385F、W385Y変異体酵素は、D- およびL-NorVal、D-NorLeuには反応したが、L-NorLeuには反応しなかった。

W385 変異体酵素のうち、NorVal、NorLeu 両基質に対して最も反応性の高かったW385A 変異体酵素について D-NorVal および D-NorLeu に対する kinetic parameter を、L-NorVal および L-NorLeu に対して活性を示す *Phormidium* L-AlaDH Y93A 変異体酵素 (unpublished result) とのカップリングアッセイを用いて決定した。D-NorVal の  $K_m$  と  $k_{cat}$  値はそれぞれ  $12.01 \pm 0.88$  (mM) と  $0.43 \pm 0.02$  ( $s^{-1}$ )、D-NorLeu の  $K_m$  と  $k_{cat}$  はそれぞれ  $15.45 \pm 1.22$  (mM) と  $0.31 \pm 0.01$  ( $s^{-1}$ )であった。NorVal と NorLeu の kinetic parameter の違いは、おそらく基質結合ポケットの大きさを反映していると思われる。また W385 を Ala および Val に変異させると D-Ala に対する  $K_m$  値が増加し、 $k_{cat}$  値が減少した。このことは、変異により基質結合ポケットが拡大したことで D-Ala および D-Ala に由来する反応中間体に対する酵素の親和性が低下したことを示唆している。

## 考察

ランソウのペプチドグリカンがグラム陰性菌とグラム陽性菌の両方の性質を示すことから(4-6)、ペプチドグリカン生合成に関わる酵素の進化が注目されている。AlaR の系統解析は既に行われているが(17-19)、これらの研究はいずれもランソウの AlaR に焦点を当てたものではなかった。今回の系統解析でランソウの AlaR はグラム陽性菌とグラム陰性菌の酵素が分離する前に分岐したことが示唆された。AlaR の分子進化はペプチドグリカンの構造的特徴と相関していると思われた。そこでランソウのモデル種とされる *Synechocystis* sp. PCC6803 の AlaR を調べ、その酵素学的特性を明らかにした。*Synechocystis* AlaR のサブユニット構造、pH profile、耐熱性、kinetic parameter などの特性は、他の生物の AlaR と類似していた (10-14)。

AlaR のアミノ酸配列をアライメントした結果 *Synechocystis* AlaR でも AlaR の触媒的に重要な残基が保存されていることがわかった。アミノ酸配列から、*Synechocystis* AlaR の W385 に対応する Trp 残基は、ほぼ全てのランソウの AlaR で保存されていることがわかった。一方、他の細菌の AlaR では対応する残基は Tyr である。興味深いことに、今回調べたランソウの AlaR の中で最も遅く分岐したと考えられる *Synechococcus* sp. JA-3-3Ab の AlaR では対応する残基は Tyr であった。このことから、Trp から Tyr への置換は AlaR の進化の過程で起こったと考えられる。*G. stearothermophilus* AlaR の Y354 は基質認識に関与していることが示唆されており、Asn 残基への変異により Ser ラセミ化活性が増加した(16)。そこで YASARA プログラムを用いて *Synechocystis* AlaR の分子モデリングを行った (20, <http://www.yasara.org/products.htm>) (Fig. 8)。枯草菌の AlaR (5IRP-B) の構造をテンプレートとして L-Ala 結合モデルを作製した。モデル構造によると、W385 は結合した L-Ala の側鎖の C3 から 3.43Å の位置にあり、この距離は W385 が基質認識に関与していることを示唆している。W385 の変異は *Synechocystis* AlaR の基質特異性に影響を与え、W385 の Ala 残基への変異は D-Ala に対する  $k_{cat}/K_m$  値を低下させたが、NorVal および NorLeu に対する活性を付与した。これらの結果から W385 が基質認識に関与していることが示唆された。

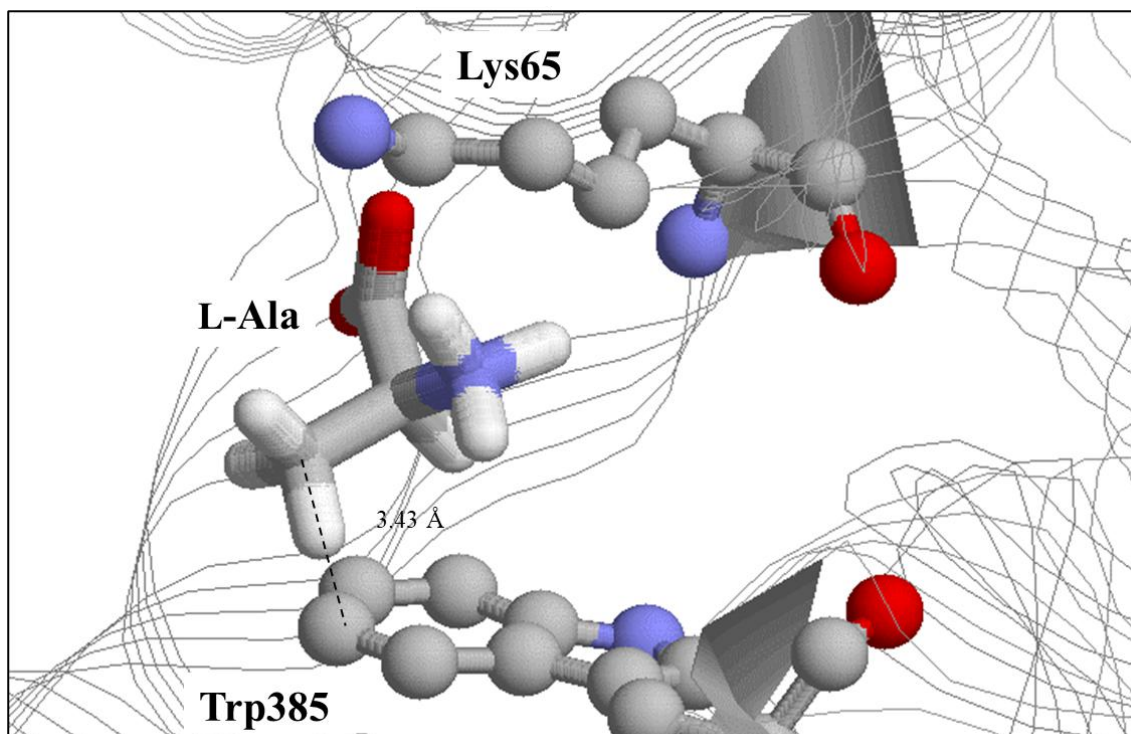


Fig. 8. Homology modeling of substrate-binding site of the *Synechocystis* AlaR. The modeling was carried out with YASARA program. Lys65 is a presumed PLP-binding residue.

今回の研究は、ランソウの AlaR の酵素学的特性に関するおそらく初めての報告である。*Synechocystis* AlaR の W385 が AlaR の基質特異性を決定していることを確認した。この Trp 残基はランソウの AlaR の特徴であり、他のグラム陽性菌やグラム陰性菌の AlaR では Tyr 残基に置き換えられていた。系統解析の結果、ランソウの AlaR は他のグラム陽性菌やグラム陰性菌の AlaR が分岐する前に分岐したことが示唆された。もしそうであればランソウのペプチドグリカンがグラム陽性菌と陰性菌の両方の性質を持っていることは示唆に富んでいる。

ランソウのペプチドグリカンは、そのモザイク構造の他に、葉緑体の進化を考える上でも興味深いものがある。植物のプラスチドはランソウを祖先にもつとする endosymbiotic 説がある。植物のプラスチドは当初ペプチドグリカンを有しており、進化の過程で徐々にそれを失っていったと考えられている (21)。現在、ペプチドグリカンは、2つのエンベロップとペプチドグリカン細胞壁を持つ灰色藻類のプラスチドに保持されている (22, 23, およびその参考文献を参照)。灰色藻類のモデル生物である *Cyanophora paradoxa* は推定 AlaR 遺伝子を含んでいる (24)。しかしアミノ酸配列の比較から、*Synechocystis* AlaR の W385 に対応する *C. paradoxa* AlaR のアミノ酸残基は Tyr であることが判明している (24)。

## 参考文献

1. Vollmer, W., Blanot, D., de Pedro, M.A. (2008) Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* 32,149-167
2. Egan, A.J.F., Errington, J., Vollmer, W. (2020) Regulation of peptidoglycan synthesis and remodelling. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 446-460
3. Billot-Klein, D., Gutmann, L., Sable, S., Guitet, E., Van Heijenoort, J. (1994) Modification of peptidoglycan precursors is a common feature of the low-level vancomycin-resistant VANB-type *Enterococcus* D366 and of the naturally glycopeptide-resistant species *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Enterococcus gallinarum*. *J. Bacteriol.* 176, 2398–2405
4. Hoiczky, E., Hansel, A. (2000) Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. *J. Bacteriol.* 182, 1191-1199
5. Hoiczky, E., Baumeister, W. (1995) Envelope structure of four gliding filamentous cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 177, 2387-2395
6. Jürgens, U.J., Drews, G., Weckesser, J. (1983) Primary structure of the peptidoglycan from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6714. *J. Bacteriol.* 154, 471-478
7. Golecki, J.R. (1977) Studies on ultrastructure and composition of cell walls of the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Arch. Microbiol.* 114, 35-41
8. Sawa, Y., Tani, M., Murata, K., Shibata, H., Ochiai, H. (1994) Purification and characterization of alanine dehydrogenase from a cyanobacterium, *Phormidium lapideum*. *J. Biochem.* 116, 995-1000

9. Isobe, K., Nagasawa, S.J. (2007) Characterization of *N*- $\alpha$ -benzyloxycarbonyl-L-lysine oxidizing enzyme from *Rhodococcus* sp. AIU Z-35-1. *J. Biosci. Bioeng.* 104, 218-223
10. Esaki, N., Walsh, CT. (1986) Biosynthetic alanine racemase of *Salmonella typhimurium*: Purification and characterization of the enzyme encoded by the *air* gene. *Biochemistry* 25, 3261-3267
11. Inagaki, K., Tanizawa, K., Badet, B., Walsh, CT., Tanaka, H., Soda, K. (1986) Thermostable alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus*: Molecular cloning of the gene, enzyme purification, and characterization. *Biochemistry* 25, 3268-3274
12. Strych U., Penland RL., Jimenez, M., Krause KL., Benedik, MJ. (2001) Characterization of the alanine racemases from two Mycobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 196, 93-98
13. Duque, E., Daddaoua, A., Cordero, BF., De la Torre, J., Antonia Molina-Henares, M., Ramos, JL. (2017) Identification and elucidation of in vivo function of two alanine racemases from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol. Rep.* 9, 581-588
14. Muhammad, M., Li, Y., Gong, S., Shi, Y., Ju, J., Zhao, B., Liu, D. (2019) Purification, characterization and inhibition of alanine racemase from a pathogenic strain of *Streptococcus iniae*. *Pol. J. Microbiol.* 68, 331-341
15. Watanabe A, Yoshimura T, Mikami B, Hayashi H, Kagamiyama H, Esaki N. (2002) Reaction mechanism of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus*: x-ray crystallographic studies of the enzyme bound with *N*-(5'-phosphopyridoxyl)alanine. *J. Biol. Chem.* 277, 19166-19172
16. Patrick WM, Weisner J, Blackburn JM. (2002) Site-directed mutagenesis of Tyr354 in



- Geobacillus stearothermophilus* alanine racemase identifies a role in controlling substrate specificity and a possible role in the evolution of antibiotic resistance. *Chembiochem.* 3, 789-792
17. Uo, T., Yoshimura, T., Tanaka, N., Takegawa, K., Esaki, N. (2001) Functional characterization of alanine racemase from *Schizosaccharomyces pombe*: a eucaryotic counterpart to bacterial alanine racemase. *J. Bacteriol.* 183, 2226-22330
18. Strych, U., Davlieva, M., Longtin, J. P., Murphy, E. L., Im, H., Michael J Benedik, M. J., Kurt L Krause, K. L. (2007) Purification and preliminary crystallization of alanine racemase from *Streptococcus pneumoniae*. *BMC Microbiol.* 17, 40
19. Oikawa, T., Tauch, A., Schaffer, S., Fujioka, T. (2006) Expression of *alr* gene from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 in *Escherichia coli* and molecular characterization of the recombinant alanine racemase. *J. Biotechnol.* 125, 503-512
20. Land, H., Humble, M. S. (2018) YASARA: A tool to obtain structural guidance in biocatalytic investigations. *Methods Mol. Biol.* 1685, 43-67
21. Cavalier-Smith, T. (2000) Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci.* 5, 174-182
22. Reyes-Prieto, A., Bhattacharya, D. (2007) Phylogeny of nuclear-encoded plastid-targeted proteins supports an early divergence of glaucophytes within Plantae. *Mol. Biol. Evol.* 24, 2358-2361
23. Lin, X., Li, N., Kudo, H., Zhang, Z., Li, J., Wang, L., Zhang, W., Takechi, K., Takano, H. (2017) Genes sufficient for synthesizing peptidoglycan are retained in Gymnosperm genomes,

and MurE from *Larix gmelinii* can rescue the albino phenotype of *Arabidopsis* MurE mutation. *Plant Cell Physiol.* 58, 587-597

24. Price, D. C., Goodenough, U. W., Roth, R., Lee, J.-H., Kariyawasam, T., Mutwil, M., Ferrari, C., Facchinelli, F., Ball, S. G., Cenci, U., Chan, C. X., Wagner, N. E., Yoon, H. S., Weber, A. P. M., Bhattacharya, D. (2019) Analysis of an improved *Cyanophora paradoxa* genome assembly. *DNA Research* 26, 287–299

## 第4章 L-AlaDH および AlaR を用いた D-アラニンの酵素的定量法の構築

### 緒言

近年の分析技術の進歩により、D-アミノ酸は哺乳類を含む様々な真核生物に存在し生理的に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。例えば D-Ser は動物の *N-methyl-D-aspartate* 受容体のコアゴニストとして機能しており脳の高次機能に関与している。D-Asp は神経伝達、ホルモン調節、そしておそらく生殖に関与していることが示唆されている (1, 2, 3)。また、D-アミノ酸は味覚との関係も報告されており、D-アミノ酸の中には甘味を持つものがあることが知られている (4)。細胞を用いた *in vitro* の実験により、これらの D-アミノ酸が甘味受容体 T1R2+3 の活性化を引き起こすことが明らかになった (5)。D-アミノ酸の中でも D-Ala は、T1R2+3 受容体に加え、L-アミノ酸の味覚感知に特異的なイノシンーリン酸依存的な T1R1+3 受容体刺激能を有する点が特徴的である。これらの結果は、D-アミノ酸が食味の決定因子として機能していることを示唆している。実際、老川らは D-アミノ酸の含有量が日本酒の味に影響を与えることを実証している。彼らは日本酒の味の主成分分析を行い、PC1 が「味の濃さ」と最も高い正の相関を持ち、PC2 が甘味と相関することを見いだした。D-Ala はその濃度が 100  $\mu\text{M}$  を超えると PC1 のスコアに影響を与える (6)。

いくつかの D-アミノ酸は、甲殻類、ホタテ、コイなどの様々な水生動物から発見されている (7)。その中でも、おそらく浸透圧調節の役割を果たしていると思われる D-Ala が多く含まれている。例えば、クルマエビ *Penaeus japonicus* の筋肉組織には 3.43  $\mu\text{moles} / \text{g wet weight}$ 、モクズガニ *Eriocheir japonicus* の筋肉組織には 16.8  $\mu\text{moles} / \text{g wet weight}$  の D-Ala が含まれている (7)。これらの結果は D-Ala の存在が魚介類の味に影響を与えることを示唆している。魚介類の D-Ala 含有量は食味の評価と相関していると考えられている (8)。その意味でも D-Ala 測定は重要で興味深い。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、様々な D-および L-アミノ酸を蛍

光ジアステレオマーに誘導体化した後、エナンチオ選択的に測定するために広く使用されている (9)。さらに液体クロマトグラフィー質量分析法 (10) も D-アミノ酸測定の標準的な方法である。これらの方法は精度が高く D-および L-アミノ酸の同時定量に使用できるが、時間がかかり、また高価な装置と訓練された人材が必要である。

酵素を用いた分光光度法は一般的に特定のアミノ酸のアッセイに有用であり、上記の装置を用いた分析法と比較して時間的にもコスト的にも有利である。本研究では、L-AlaDH と AlaR を用いて L-および D-Ala を簡便に分光光度計で測定するシステムを構築した。

## 1. 方法

### 1-1 試薬類

試薬類は富士フィルム和光純薬から入手した。

### 1-2 L-AlaDH を用いた L-アラニンのエンドポイントアッセイ (L-AlaDH system)

L-アラニンの定量は 25 mM HEPES-NaOH 緩衝液 (pH 8.5)、0.04 mM 1-methoxy-5-methylphenazinum methyl sulfate (mPMS)、0.25 mM WST-1、0.25 mM NAD<sup>+</sup>、1.0 mU *Phormidium* L-AlaDH およびサンプル溶液 (50 μl) からなる反応混合液 (100 μl) を 30°C で 1.5 時間インキュベートした後、マイクロプレートリーダー SH-9000 Lab (日本コロナ電気) を用いて 438 nm の吸光度を測定することにより行った。吸光度は光路長 1cm に換算した。

### 1-3 L-AlaDH と AlaR を用いた D-アラニンのエンドポイントアッセイ (L-AlaDH - AlaR coupling system)

D-アラニンの定量は 25 mM HEPES-NaOH 緩衝液 (pH8.5)、0.04 mM mPMS、0.25 mM WST-1、0.25 mM NAD<sup>+</sup>、1.0 mU の *Phormidium* L-AlaDH、3.0 mU の *Synechocystis* AlaR およびサンプル溶液 (50 μl) からなる反応混合液 (100 μl) を 30°C で 1.5 時間インキュベートした後、438nm の吸光度を測定することにより行った。吸光度は光路長 1cm に換算した。

### 1-4 甲殻類中のアミノ酸の分析

甲殻類のサンプルは境港市 (鳥取県) または浜田市 (島根県) の漁港で地元 の海産物市場から購入し、使用するまで -20°C で保存した。甲殻類の筋肉組織を 4 倍量の 5% TCA と混合し超音波で懸濁した後、4°C で 30 分間放置した。懸濁液を 20,000 x g、4°C で 30 分間遠心分離し上清を回収した。水飽和ジエチルエーテルで 3 回抽出しアミノ酸試料中の TCA を除去した。水層は分析するまで

-20°C で保存した。アミノ酸試料を Milli-Q 水で 50 倍に希釈し、アミノ酸分析装置 (LaChrom Elite, HITACHI) で分析した。L-, D-アラニンの測定は、試料を Milli-Q 水で 100 倍または 200 倍に希釈し、L-アラニンおよび D-アラニン含量を酵素定量システムで測定した。

## 2. 結果

### 2-1 *Phormidium* L-AlaDH および *Synechocystis* AlaR を用いた D-, L-アラニンの酵素的分別定量

本研究では、*Phormidium* L-AlaDH および *Synechocystis* AlaR を用いて D-, L-アラニンの酵素的分別定量法を構築した。本法では D-Ala は AlaR により L-Ala に変換され、続いて L-AlaDH により L-Ala の酸化的脱アミノ反応が行われる。この反応に共役する NAD<sup>+</sup>からの NADH の生成は L-Ala の脱アミノと化学量論的に一致しており、NADH は酸化還元剤 mPMS の存在下、非酵素的に WST-1 を還元して水溶性ホルマザン (モル吸光係数  $\epsilon = 37.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) を形成する (11)。

上記の L-AlaDH のみを用いた L-Ala 定量法により 438nm の吸光度の増加と L-Ala 濃度 (0 - 50  $\mu\text{M}$ ) との間に直線関係が認められた (Fig. 1)。D-Ala と L-AlaDH - AlaR coupling system では 438nm の吸光度の増加と D-Ala 濃度 (0 - 50  $\mu\text{M}$ ) との間に直線関係が認められた (Fig. 2)。また等濃度の L-Ala と D-Ala の混合物では、D-Ala のみを用いた場合とよく似た検量線が得られた (Fig. 2)。この結果から、L-AlaDH-AlaR カップリングシステムは D-Ala だけでなく、total (L- + D-) Ala の測定にも使用できることがわかった。

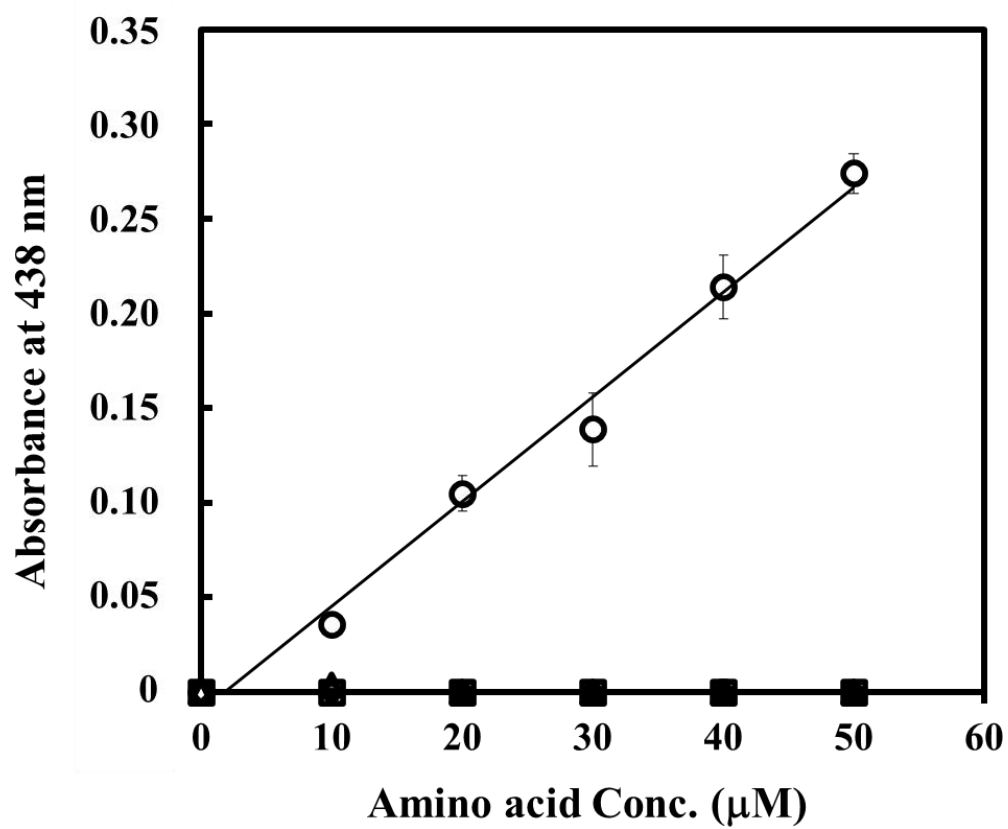


Fig. 1

Calibration curve for L-Ala (○), D-Ala (◻), Gly (◊) and L-Ser (△) obtained with the assay system lacking AlaR. The average values of each three measurements were plotted.

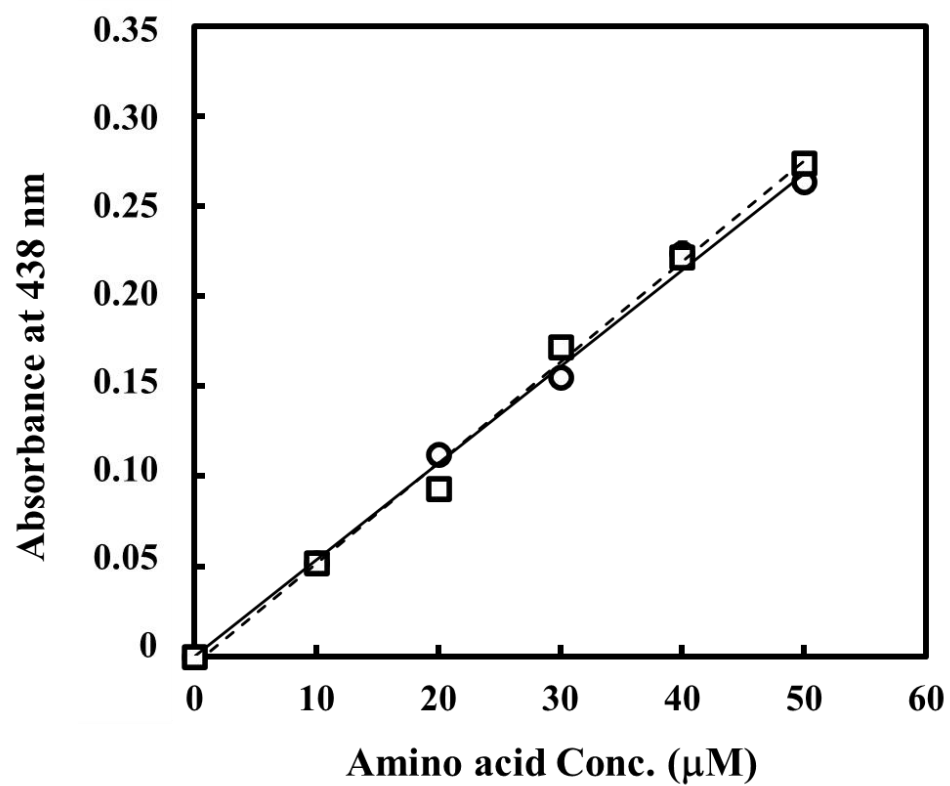


Fig. 2  
Calibration curve for D-Ala (○) and one-to-one mixture of L-Ala + D-Ala (□) obtained with the AlaR-L-AlaDH coupling assay system. The average values of each three measurements were plotted.



## 2-2 甲殻類筋肉組織中の D-, L-アラニンの定量

山陰地方に分布するモサエビ (*Argis lar*)、オニエビ (*Lebbeus groenlandicus*)、アマエビ (*Pandaluseous*)、ウチワエビ (*Ibacus ciliates*)、ズワイガニ (*Chionoecetes opilio*)、ベニズワイガニ (*Chionoecetes japonicus*)、ケガニ (*Erimacrus isenbeckii*) の計 7 種類の甲殻類の筋肉組織中の Ala 含量を測定した。

試料溶液に L-と D-Ala の両方が含まれている場合 L-AlaDH - AlaR coupling system では L- + D-Ala 含量を示す。その場合、まず L-AlaDH system を用いて L-Ala 含量を定量し、次に L-AlaDH - AlaR coupling system 用いて total (L- + D-) Ala 含量を測定した。D-Ala の量は L- + D-Ala 含量から L-Ala 含量を差し引いて求めた。

甲殻類の D-Ala 定量結果を Table 1 に示した。従来の HPLC 法 (12) を用いてモサエビ (*Argis lar*) サンプルの D-Ala 含有量を測定した結果、 $2.64 \pm 0.93$  ( $\mu\text{moles} / \text{g wet weight}$ ) と酵素法で得られた値 ( $2.6 \pm 1.1 \mu\text{moles} / \text{g wet weight}$ , Table 1) と同様の値が得られた。

Table 1. Alanine contents of crustacean in San-in region.

甲殻類	Total (L- + D-Ala) <sup>a</sup>	L-Ala <sup>a</sup>	D-Ala <sup>a</sup>
<u>エビ類</u>			
モサエビ	15.2 ± 2.0	12.6 ± 1.4	2.6 ± 1.1
オニエビ	8.7 ± 1.5	8.1 ± 1.1	2.2 ± 1.7
アマエビ	10.1 ± 1.9	10.7 ± 1.0	0.0 ± 0.0
ウチワエビ	4.7 ± 0.4	3.3 ± 0.3	1.4 ± 0.4
<u>カニ類</u>			
ズワイガニ	20.1 ± 1.0	13.9 ± 0.7	8.1 ± 1.2
ベニズワイガニ	22.0 ± 3.8	13.6 ± 1.3	8.8 ± 3.9
ケガニ	9.8 ± 1.1	8.1 ± 1.3	3.0 ± 1.4

a. The units of values are μmoles/g wet weight. The values are the average of each three samples, and expressed as an average ± SE.

\* SE are determined from the following formula.

$$SE = \frac{\sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}{\sqrt{n}}$$

## 考察

エビ類とカニ類の多くは D-Ala を多量に含んでおり、カニ類の D-Ala 含量はエビ類よりも高かった。またエビ類の方がカニ類よりも Gly を多く含む傾向が見られた (Data not shown)。Gly には甘味があるので、これがエビ類とカニ類の甘味の違いを示しているのかもしれない。甲殻類の中では *P. eous* は D-Ala をほとんど含まなかった。これは *P. eous* がアラニンラセマーゼ活性をほとんど持たないという報告 (13) と一致する。*P. eous* は塩分濃度が安定している深海に分布しているため、オスモライトの生産は必要ないと思われる (13)。

L-AlaDH と AlaR を用いた酵素法による D-Ala 測定系はシンプルで、高価な装置を必要としない。438nm の吸光度を評価する必要があるが、単波長測定用の分光光度計はそれほど高価ではない。この方法は魚介類の食味の評価に応用でき、市場などの現場で使用可能であると考えられる。

## 参考文献

1. Yoshimura, T., Nishikawa, T., Homma, H. *et al.* (2016) *D-Amino acids Physiology, Metabolism, and Application*. Basingstoke: Springer Nature
2. Wolosker, H. (2018) The Neurobiology of D-Serine Signaling. *Adv Pharmacol.* 82, 325-48
3. Baccari, GC., Falvo, S., Santillo, A., Di Giacomo Russo, F., Di Fiore MM. (2020) D-Amino acids in mammalian endocrine tissues. *Amino Acids* 52, 1263-73
4. Solms, J., Vuataz L., Egli RH. (1965) The taste of L-and D-amino acids. *EXperimentia* XXI/12: 692-693
5. Nelson, G., Chandrashekar, J., Mark, AH., Luxin, F., Grace, Z., Nicholas, JPR., Zuker, CS. (2002) An amino-acid taste receptor. *Nature* 416,199–202
6. Okada, K., Gogami, Y., Oikawa, T. (2013) Principal component analysis of the relationship between the D-amino acid concentrations and the taste of the sake. *Amino Acids* 44, 489-98
7. Abe, H. (2002) Distribution, metabolism and physiological functions of free D-amino acids in aquatic invertebrates. *日本水産学会誌* 68, 516-25
8. Abe, H. (1994) Effects of free D-amino acids on the taste of marine animal muscle. *浦上財団研究報告書* 4, 129-36
9. Hamase, K., Morikawa, A., Zaitso, K. (2002) D-Amino acids in mammals and their diagnostic value. *J Chromatogr B* 781, 73-91
10. Nakano, Y., Taniguchi, M., Fukusaki, E. (2019) High-sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based chiral metabolic profiling focusing on amino acids and related metabolites. *J Biosci Bioeng.* 127, 520-27
11. Ishiyama, M., Shiga, M., Sasamoto, K., Mizoguchi M., He, PG. (1993) A new sulfonated tetrazolium salt that produces a highly water-soluble formazan dye, *Chem Pharm Bull.* 41, 1118-1122
12. Ito, T., Hemmi, H., Kataoka, K., Mukai, Y., Yoshimura, T. (2008) A novel zinc-dependent D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.* 409, 399-406
13. Abe, H. (2000) Physiological function of free D-alanine in Decapoda Crustacea.

比較生理生化学 17, 100 - 108

## 総括

タンパク質を構成するアミノ酸の一種である L-アラニンの代謝では、L-アラニンはピルビン酸へ転換された後、クエン酸回路へと運ばれエネルギー源となる。また糖新生においてグルコースを生合成する際の出発物質であるピルビン酸の基質となる。本研究では細菌のアラニン代謝関連酵素のうち L-アラニンデヒドロゲナーゼ (L-AlaDH) とアラニンラセマーゼ (AlaR) をとりあげ、その機能解析を行うとともに両者を組み合わせた D-アラニン定量法を構築した。

第 1 章では、好冷菌 *Shewanella* sp. strain Ac10 と *Carnobacterium* sp. strain St2 の低温性 L-AlaDH を取り上げ、両者のアミノ酸組成および立体構造を中温性及び耐熱性 L-AlaDH と比較し、低温性 L-AlaDH の低温適応機構について解析した結果を記した。

低温性、中温性、耐熱性 L-AlaDH の分子進化系統樹とそれぞれの酵素を有する生物種の 16S rDNA の分子進化系統樹を比較したところ 2 つの系統樹の分岐パターンは類似しており、L-AlaDH は各生物種の生育環境に適した要件を満たすように進化してきたものと考えられた。熱安定性が異なるグラム陽性菌由来の 3 つの L-AlaDH、すなわち CarAlaDH (*Carnobacterium* sp. strain St2、低温性)、BsuAlaDH (*Bacillus subtilis*、中温性)、BstAlaDH (*Geobacillus stearothermophilus*、耐熱性) の構造を比較した結果、アルギニン残基の含量と熱安定性の間に相関関係があり、熱安定性は総塩基性残基 (Arg+Lys) に対するアルギニン残基のモル比と正に相関することが明らかとなった。一方、分子骨格の柔軟性を調節することでタンパク質の安定性に寄与すると考えられているプロリン残基やグリシン残基の含量からはそれぞれの酵素の熱安定性を説明できなかった。ホモロジーモデリングの結果からは、低温性 L-AlaDH の不安定性は主として塩橋数が低いことに起因すると推論された。

第 2 章では、NAD(P)<sup>+</sup>依存型 *Shewanella* sp. Ac10 由来 L-AlaDH と NAD<sup>+</sup>依存型 L-AlaDH の補酵素結合部位を比較し、アミノ酸置換によって補酵素特異性を改変した研究結果について述べた。

第1章で温度安定性を解析した *Shewanella* sp. Ac10 L-AlaDH は  $\text{NAD}^+$  だけでなく  $\text{NADP}^+$  も補酵素として用いることができる。これは補酵素結合部位に  $\text{NADP}^+$  の 2'-リン酸基の結合部位としてアルギニン残基が存在するためであると示唆された。アミノ酸配列の比較から、専ら  $\text{NAD}^+$  を補酵素とするランソウ *Phormidium lapideum* の L-AlaDH では Ile198 がこのアルギニン残基に相応するアミノ酸残基であることがわかった。そこで *P. lapideum* L-AlaDH の Ile198 を Arg に置換した変異体酵素 (I198R) を作成し補酵素特異性を解析したところ、*P. lapideum* L-AlaDH I198R 変異体酵素は  $\text{NADP}^+$  も補酵素として用いることができるようになった。また  $\text{NAD}^+$  特異的な L-AlaDH では  $\text{NAD}^+$  のアデニンリボースの 2'-, 3'-OH と相互作用を示すと考えられる Asp 残基が保存されていた。この保存されている Asp 残基は  $\text{NADP}^+$  依存性酵素では疎水性アミノ酸に置き換わっていた。そこで *Shewanella* L-AlaDH の保存されている Asp 残基 (Asp198) を Gly, Ala, Val, Leu の疎水性アミノ酸に置換したところ、これらの変異体酵素ではさらに  $\text{NADP}^+$  に対する特異性が上昇した。以上の結果から、 $\text{NADP}^+$  の 2'-リン酸基近傍アミノ酸残基に部位特異的変異導入することにより  $\text{NAD}^+$  特異的酵素から  $\text{NADP}^+$  にも反応性を示す酵素に改変できることが示された。

第3章では、ランソウ AlaR および他の細菌由来 AlaR の分子進化系統樹を作成して AlaR の分子進化について考察した結果、ならびに基質認識部位にあってランソウ AlaR に特異的な Trp 残基の解析結果について述べた。

ランソウのペプチドグリカンにはグラム陰性菌とグラム陽性菌のペプチドグリカン双方の性質を示す。そこでペプチドグリカン生合成に関与する AlaR の分子系統解析を行った。アミノ酸配列を用いた分子進化系統樹からランソウの AlaR はグラム陽性菌とグラム陰性菌の酵素が分離する前に分岐したことが示唆され、AlaR の分子進化とペプチドグリカンの構造的特徴との関連がうかがわれた。アミノ酸配列アライメントからはランソウ *Synechocystis* sp. PCC6803 の AlaR において基質認識に関与すると考えられる Trp385 が *Synechococcus* sp. JA-3-3Ab を除くほぼ全てのランソウの AlaR で保存されていた。これに対してランソウ以外の細菌および *Synechococcus* sp. JA-3-3Ab の AlaR では対応する残基が Tyr であった。*Synechococcus* sp. JA-3-3Ab

は今回調べたランソウの中で最も遅く分岐したと考えられることから、この残基は進化の過程で Trp から Tyr へ置換されたと考えられた。そこでランソウの AlaR における Trp 残基の機能を解析するため、*Synechocystis* sp. PCC6803 由来 AlaR の Trp385 を Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr の疎水性アミノ酸に置換した変異体酵素を作製し、酵素学的解析を行った。その結果 *Synechocystis* AlaR の W385A 変異体酵素は D-, L-Ala だけでなく D-, L-Norvaline や D-, L-Norleucine に対しても活性を示すことが確認された。また *Synechocystis* AlaR の分子モデリングを行ったところ、Trp385 は基質 L-Ala の側鎖の C3 から 3.43Å の位置にあり、Trp385 が基質認識に関与していることが示唆された。

第4章ではランソウ由来 L-AlaDH と AlaR を用いて D-, L-アラニンの酵素的分別定量法を構築するとともに、同法によって甲殻類中の D-, L-アラニンを定量した結果について述べた。

エビ類とカニ類の多くは浸透圧調節物質として D-Ala を多量に含んでいる。D-Ala は甘味を呈することから、その含量がこのような海産物の味に影響することが予想される。本研究で構築した酵素的定量法では L-Ala は L-AlaDH の酵素反応により、また D-Ala は AlaR と L-AlaDH を共役させた酵素反応により生成する NADH を、それぞれ 1-methoxyphenazine methosulfate を電子キャリアーとしてテトラゾリウム塩 WST-1 から生成する水溶性ホルマザンの 438 nm の吸光度の増加として測定した。この定量法において D-, L-Ala 濃度と 438 nm の吸光度の間に直線的な相関関係が認められたことから、同法が D-, L-Ala の定量法として有効であると判断した。この酵素的定量法を用いて山陰地方の甲殻類の筋肉中の L-, D-Ala を定量するとともに、その結果を従来の HPLC 法と比較し評価した。酵素的定量法で得られたモサエビの D-Ala 含量については従来の HPLC 法で測定した D-Ala 含量と同様の値が得られた。4 種のエビ類と 3 種カニ類の D-, L-Ala 含量を測定したところ、相対的にカニ類の D-Ala 含量はエビ類の D-Ala 含量よりも高いことが明らかとなった。本研究で確立した酵素的定量法は簡単で高価な装置を必要としない。そのため、市場等での魚介類の食味の評価に応用できる可能性が期待された。



## 論文目録

1. Galkin, A., Kulakova, L., Ashida, H., Sawa, Y., Esaki, N. (1999) Cold-adapted alanine dehydrogenases from two antarctic bacterial strains: Gene cloning, protein characterization, and comparison with mesophilic and thermophilic counterparts. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4014-4020
2. Ashida, H., Galkin, A., Kulakova, L., Sawa, Y., Nakajima, N., Esaki, N. (2004) Conversion of cofactor specificities of alanine dehydrogenases by site-directed Mutagenesis. *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic* 30, 173-176
3. Ashida, H., Sawa, Y., Yoshimura, T. (2021) Enzymatic determination of D-alanine with L-alanine dehydrogenase and alanine racemase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 85, 2221-2223
4. Ashida, H., Murakami, K., Inagaki, K., Sawa, Y., Hemmi, H., Iwasaki, Y., Yoshimura, T. (2021) Evolution and properties of alanine racemase from *Synechocystis* sp. PCC6803. *J. Biochem.* (in press)

## 謝辞

名古屋大学 吉村 徹 教授には本学位論文を作製するにあたり、様々なご指導ご鞭撻をいただきました。それらがなければここまで進めることはできなかったと思います。深謝いたします。

また本学位論文の研究遂行に多大なご協力をいただきました島根大学 澤嘉弘 教授(現 名誉教授)、京都大学 江崎信芳 教授 (現 名誉教授)、名古屋大学 邊見 久 准教授、岩崎 雄吾 准教授、岡山大学 稲垣 賢二 教授、岡山大学 村上佳穂さんに深く感謝いたします。

島根大学 落合英夫 教授 (現 名誉教授)、澤 嘉弘 教授(現 名誉教授)、柴田均 教授 (現 名誉教授) には研究やさまざまな点で多くのご指導をいただき深く感謝いたします。またこれまで研究を支えていただいた島根大学 生物化学研究室の学生さんたちにも感謝いたします。

島根大学 総合科学研究支援センター 遺伝子機能解析部門の中川 強 教授をはじめスタッフの方々には研究を支えていただき感謝いたします。

最後に、本研究の内外で今までお世話になったすべての方々に深く感謝するとともに皆様方の益々のご発展と健康を心よりお祈りいたします。

2022年1月7日

芦田 裕之