

緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来 D-スレオニンアルドラーゼ
の酵素学的諸性質と結晶構造に関する研究

平成 29 年 1 月

日本大学大学院理工学研究科博士後期課程

物質応用化学専攻

平 戸 祐 喜

目次

ページ

第一章 序論

1.1 アミノ酸光学異性体	1
1.2 タンパク質と酵素の構造	3
1.3 ピリドキサール 5'-リン酸依存性酵素	4
1.4 スレオニンアルドラーゼ	6
1.5 キラル化合物の生産	7
1.6 タンパク質工学	10
1.7 緑藻 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	11
1.8 本研究の意義と目的	11
参考文献	12

第二章 緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来 D-スレオニンアルドラーゼの酵素学的諸性質

2.1 序論	14
2.2 材料と方法	15
2.2.1 材料	15
2.2.2 生物と培養	15
2.2.3 酵素活性測定	15
2.2.4 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> からの D-スレオニンアルドラーゼを コードする遺伝子の単離と配列決定	16
2.2.5 大腸菌 <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)内での D-スレオニンアルドラーゼの発現と精製	17
2.2.6 その他解析・測定法	20
2.3 結果と考察	21
2.3.1 D-スレオニンアルドラーゼをコードする遺伝子の 配列決定とクローニング	21
2.3.2 組換え D-スレオニンアルドラーゼの精製	23
2.3.3 pH と温度による D-スレオニンアルドラーゼ活性への影響	25
2.3.4 D-スレオニンアルドラーゼの基質特異性と動態パラメータ	27
2.3.5 D-スレオニンアルドラーゼによる D-スレオニンおよび D- <i>allo</i> -スレオニンの合成	29
2.3.6 様々な化合物による D-スレオニンアルドラーゼ活性への影響	30
2.3.7 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> の無細胞抽出液における D-スレオニンアルドラーゼ活性	34

2.4 まとめ	35
参考文献	36
第三章 緑藻 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 由来 D-スレオニンアルドラーゼの結晶化と X 線解析	
3.1 序論	38
3.2 材料と方法	39
3.2.1 D-スレオニンアルドラーゼの遺伝子発現	39
3.2.2 D-スレオニンアルドラーゼの精製	40
3.2.3 結晶化	40
3.2.4 データ収集・処理	41
3.3 結果と考察	42
3.4 まとめ	47
参考文献	48
第四章 緑藻 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 由来 D-スレオニンアルドラーゼの結晶構造解析	
4.1 序論	50
4.2 方法	51
4.2.1 構造決定と精密化	51
4.2.2 基質複合体モデルの構築	52
4.3 結果と考察	53
4.3.1 D-スレオニンアルドラーゼの 3 次元構造	53
4.3.2 基質複合体モデル	60
4.3.3 反応機構の推定	63
4.4 まとめ	64
参考文献	65
第五章 総括	67
謝辞	68

第一章

序論

本論文の発表にあたり、まずその研究背景と基本事項について解説し、本研究の目的について述べる。

1.1 アミノ酸光学異性体

アミノ酸は分子内にアミノ基とカルボキシル基をもつ化合物の総称である。アミノ酸はタンパク質の構成成分であり、すべてのタンパク質は20種類の標準アミノ酸から構成されている。標準アミノ酸はプロリンを除いて α 位にアミノ基をもつため、 α -アミノ酸とも呼ばれる[1, 2]。グリシン以外の標準アミノ酸は不斉炭素を持つため、鏡像異性体が存在し、それらは立体構造によってL-アミノ酸とD-アミノ酸に区別される (Fig. 1-1)。鏡像異性体同士は同じ物理化学的性質 (沸点, 融点, 溶解度など) を示すが、偏光面の回転方向が異なり、他の不斉炭素をもつ化合物と作用させた場合異なる性質を示す。アミノ酸の化学合成ではL-アミノ酸とD-アミノ酸が等量混合物 (ラセミ体) として合成されるが、タンパク質を構成する α -アミノ酸はすべてL立体配置を示す。生体中のL-アミノ酸はアミノ転移酵素やグルタミン合成酵素などで合成され、遊離型のD-アミノ酸は遊離型のL-アミノ酸を基質として主に異性化酵素により生合成されている。

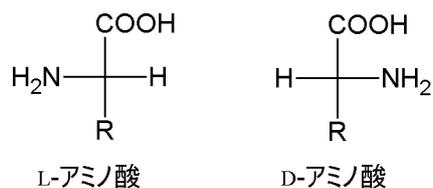


Fig. 1-1. L-アミノ酸とD-アミノ酸 (R: 側鎖)

また、標準アミノ酸のスレオニンとイソロイシンはそれぞれ2つの不斉炭素をもつのでそれぞれ4種の立体異性体が存在し、2組の鏡像異性体ができる (Fig. 1-2)。例えば、L-とD-スレオニン、L-*allo*-とD-*allo*-スレオニンはそれぞれ鏡像関係にあり、D-スレオニンはL-*allo*-、D-*allo*-スレオニン両方のジアステレオマーである。ジアステレオマー同士は物理化学的性質が異なる別の化合物である。

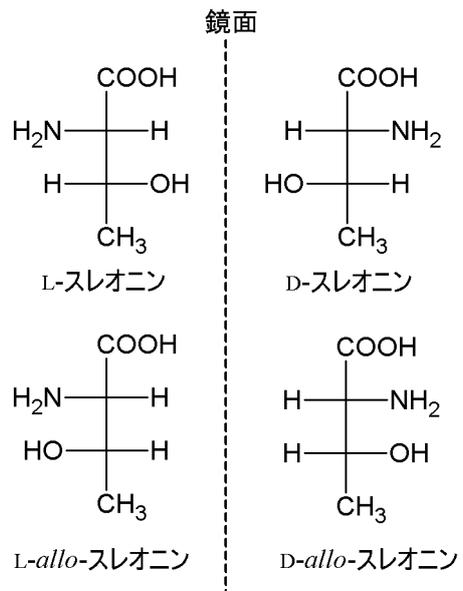


Fig. 1-2. スレオニンの立体異性体

1.2 タンパク質と酵素の構造

アミノ酸どうしは、アミノ基とカルボキシル基間で水を失って縮合し（ペプチド結合, Fig. 1-3）ペプチドを形成することができる。アミノ酸が多数重合（20~50 個以上）するとポリペプチドとよばれ、タンパク質は 1 本または 2 本以上のポリペプチドから構成されている。ヒトには約 2 万 2 千種のタンパク質があるとされ[2], それぞれのタンパク質は構成するアミノ酸（アミノ酸残基）の数とその配列（1 次構造）が異なる。タンパク質は 1 次構造のほかにも主鎖間の水素結合による 2 次構造, 側鎖間の結合による 3 次構造, 3 次構造を形成した分子をサブユニットとして複数個が会合する 4 次構造によって 3 次元立体構造を形成している。

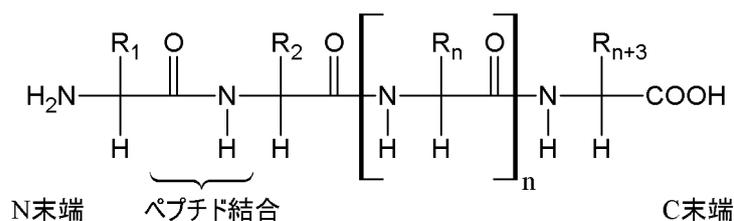


Fig. 1-3. タンパク質（ペプチド）の 1 次構造

タンパク質は生体内でさまざまな機能を持っている。例えば、生体内のほぼすべての反応は酵素タンパク質によって触媒されている。そのようなタンパク質の機能や性質を決めるのは主にその立体構造である。「酵素」はふつうの化学触媒と異なり、反応のほとんどが穏やかな条件（100°C 以下, 大気圧, ほぼ中性の pH）で進み[1], 反応物（基質）と生成物に対して特異性が高い。また、酵素の中には反応を補助する補因子を必要とするものがある。補因子には金属イオンやピリドキサル 5'-リン酸などの有機分子（補酵素）があり、その中で酵素と常に結合するものは補欠分子族と呼ばれる。

1.3 ピリドキサール 5'-リン酸酵素

ピリドキサール 5'-リン酸 (PLP, Fig. 1-4) はビタミン B₆ 作用を示す化合物のひとつで、中性ないしアルカリ性で種々のアミノ酸と Schiff 塩基を形成することから多くのアミノ酸代謝酵素における補酵素となっている。これらの酵素は酵素内の特定のリジン残基の ε-アミノ基と Schiff 塩基 (内部アルジミン) を形成しており、内部アルジミンへ基質のアミノ酸が接近するとイミノ転移反応によって α-アミノ基と Schiff 塩基 (外部アルジミン) を形成しその後の触媒反応を行う[3]。これらの酵素は PLP 酵素と呼ばれる。

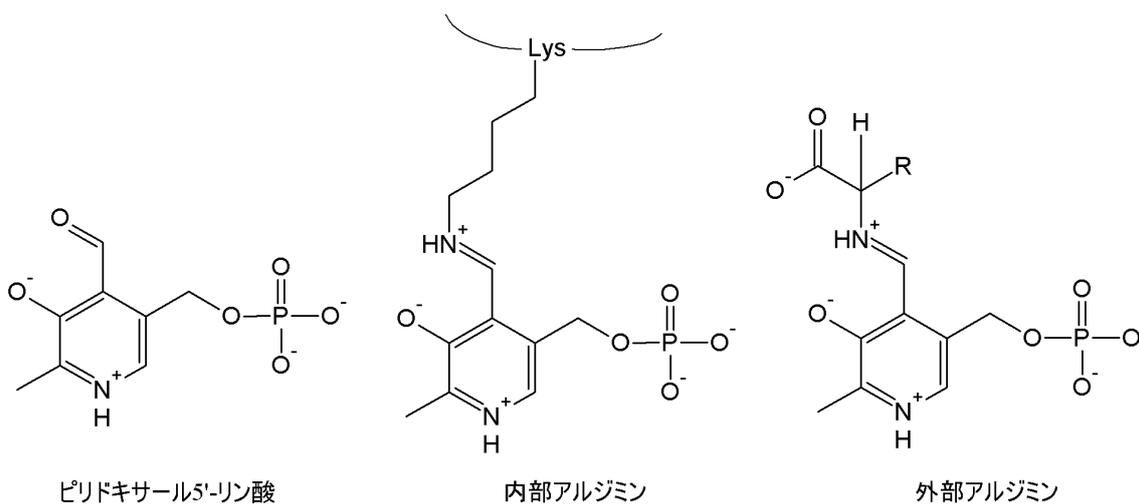


Fig. 1-4. ピリドキサール 5'-リン酸とアルジミン構造

様々な反応を触媒する PLP 酵素はその立体構造 (または二次構造予測) から 7 種類のグループ (fold type) に分けられている (Table I-1)。それぞれの fold type に属する酵素群において触媒機能に相関はなく、異なる fold type の酵素間において構造上の類似性はない[4, 5] (Fig. 1-5)。

Table I-1. PLP 酵素の分類 [5-7]

Fold type	酵素名
I	アスパラギン酸トランスアミナーゼ, アラニンラセマーゼ (カビ), オルニチンデカルボキシラーゼ (原核生物), オルニチントランスアミナーゼ, セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ, チロシンフェノールリアーゼ, トリプトファンナーゼ, スレオニンアルドラーゼ
II	セリンラセマーゼ (真核生物), スレオニンデアミナーゼ, トリプトファンシンターゼ β -サブユニット
III	アラニンラセマーゼ (細菌), オルニチンデカルボキシラーゼ (真核生物), D-セリンデヒドラターゼ, D-スレオニンアルドラーゼ (細菌)
IV	D-アミノ酸トランスアミナーゼ, 分岐鎖 L-アミノ酸トランスアミナーゼ
V	グリコーゲンホスホリラーゼ
VI	D-リジン 5,6-アミノムターゼ
VII	リジン 2,3-アミノムターゼ

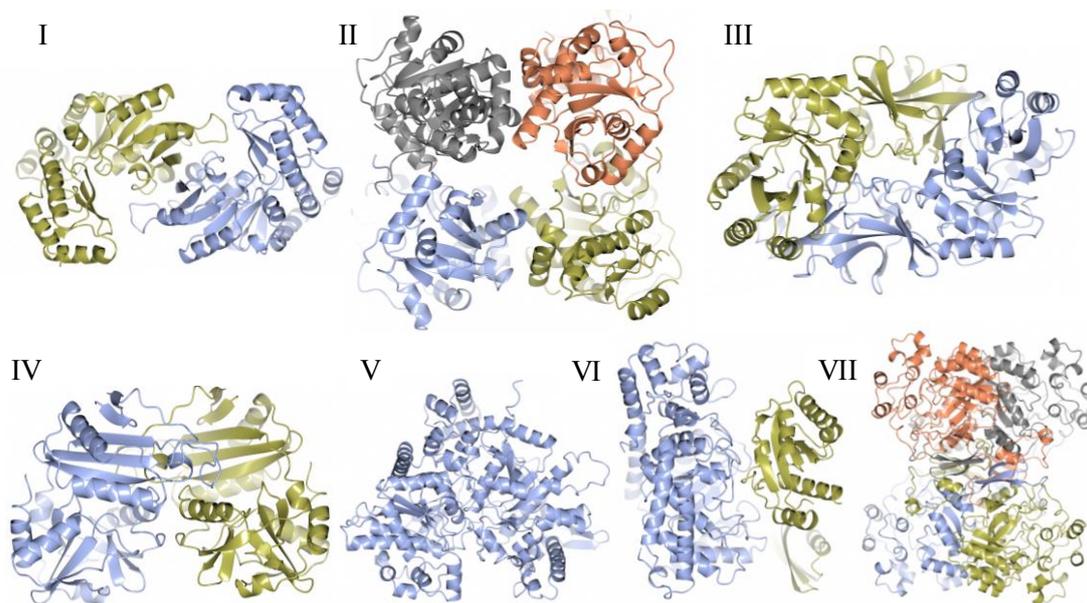


Fig. 1-5. 各 fold type における PLP 酵素の構造。青, 金, 赤およびグレーはそれぞれ異なるサブユニットを示す。I; L-スレオニンアルドラーゼ (PDB エントリー: 4lnj), II; スレオニンデアミナーゼ (PDB エントリー: 1ve5), III; アラニンラセマーゼ (PDB エントリー: 1sft), IV; D-アミノ酸トランスアミナーゼ (PDB エントリー: 1daa), V; グリコーゲンホスホリラーゼ (PDB エントリー: 6gpb), VI; D-リジン 5,6-アミノムターゼ (PDB エントリー: 1xrs), VII; リジン 2,3-アミノムターゼ (PDB エントリー: 2a5h)。

1.4 スレオニンアルドラーゼ

スレオニンアルドラーゼ (TAs) はスレオニンなどの β -ヒドロキシ- α -アミノ酸からグリシンと対応するアルデヒドへの相互変換を触媒する酵素の総称である (Fig. 1-6)。TAs は基質の α 位での立体選択性によって L 体および D 体へ特異的な酵素に分類される。その L 型酵素はさらに基質の β 炭素での立体選択性によって L-スレオニンアルドラーゼ (EC 4.1.2.5), L-*allo*-スレオニンアルドラーゼ (EC 4.1.2.49), L-スレオニンと L-*allo*-スレオニンどちらも基質とする低特異性 L-スレオニンアルドラーゼ (EC 4.1.2.48) に分類される。一方 D 型の酵素では D-スレオニンと D-*allo*-スレオニンどちらも基質とする低特異性 D-スレオニンアルドラーゼ (DTA, EC 4.1.2.42) のみ知られており, D-スレオニンまたは D-*allo*-スレオニンのどちらか一方を認識する酵素は現在まで見つかっていない[8]。すべての TAs は PLP 酵素であり, L 型スレオニンを基質とする TAs (LTAs) の fold type は I 型であり, DTA の fold type は III 型である (Table I-1)。LTAs は天然に広く存在し, いくつかの植物や脊椎動物, 細菌, 酵母, カビで見つまっているが[9], DTA は一部の細菌でのみの報告にとどまっている[10]。また, TAs の生理的役割について, LTA はグリシンの生合成経路に関与すると考えられているが[11, 12], DTA に関してはまだわかっていない。

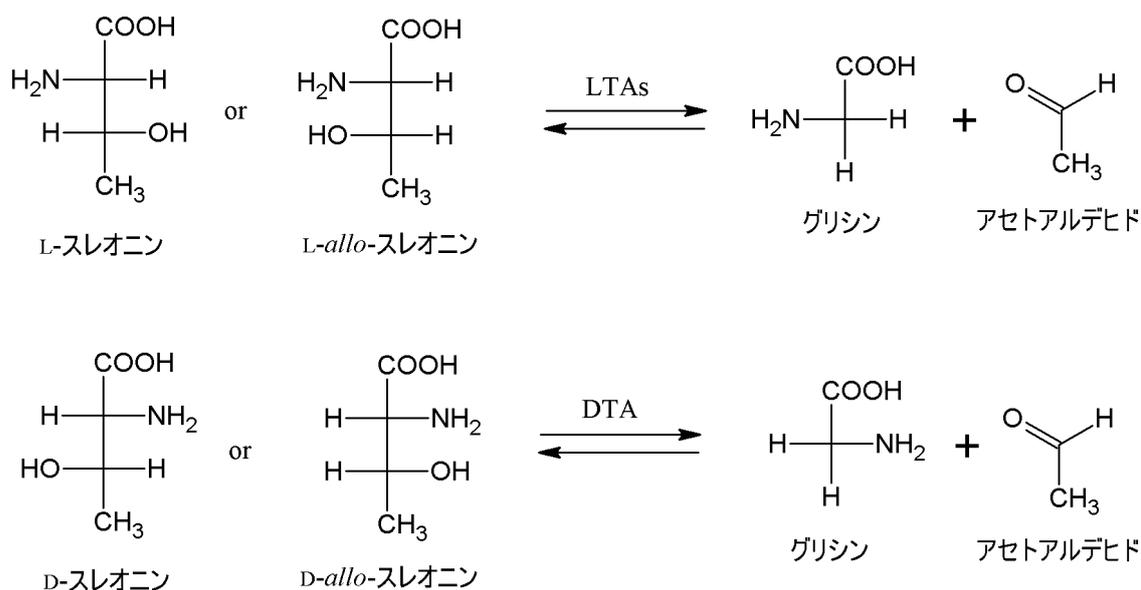


Fig. 1-6. スレオニンアルドラーゼの反応

1.5 キラル化合物の生産

世界のキラル技術市場は拡大傾向であり、その市場規模は 2011 年の約 53 億ドルから、2016 年には 72 億ドルに達していると考えられた[13]。そのキラル技術の大半はアミノ酸や医薬品などのキラル化合物の生産に関するものである。生体に作用するキラル化合物は鏡像異性体によって効果が異なる。例えば、抗炎症剤として用いられているイブプロフェンは S 体のみ効果があり、また鎮静剤として用いられるサリドマイドは R 体のみ効果がある一方で、S 体は重大な先天性欠陥を引き起こす[1]。したがって、生体に作用するキラル化合物は光学的に高い純度であることが望まれる。しかしながら、キラル触媒を除く一般の有機化学合成の技術では鏡像異性体を等量含んだ混合物（ラセミ体）が得られる。光学的な純度の高いキラル化合物の生産には 2 種類の生物工学的手法がある。ひとつは立体選択性をもつ酵素によってキラル化合物を直接不斉合成する方法、他方は化学合成によって生じたラセミ体を材料として、鏡像異性体の一方を立体選択性酵素によって分解する方法である。後者の方法は光学分割と呼ばれており、出発物質からの最大収率が 50%であることから、残りの不要な化合物を再利用するなど製造プロセスが複雑になる[14]。そのためキラル技術市場では不斉合成法の規模が大きいですが、光学分割法は不斉合成法の代替法として有用である。

TAs は合成反応において 2 個の不斉炭素を作り、また様々な β -ヒドロキシ- α -アミノ酸を光学分割できるため有機合成化学の分野で強力なツールになると考えられている[15]。DTA の場合、医薬品に使われるキラル化合物の生産に関するいくつかの応用研究が報告されている。例えば DTA は、コストのかかる優先晶出法による光学分割に代わり、抗生物質チアムフェニコールやフロルフェニコールの中間体の光学分割に利用できると報告されている (Fig. 1-7) [16, 17]。また、パーキンソン病治療薬 *L-threo*- β -(3,4-ジヒドロキシフェニル)セリンの中間体の光学分割への応用が研究され、反応性の高いアミノ基を保護する必要があった従来法よりプロセスが単純化できると報告されている (Fig. 1-8) [18]。さらに、医薬原料 (2*R*,3*S*)-2-アミノ-3-ヒドロキシ-3-(ピリジン-4-イル)-1-(ピロリジン-1-イル)プロパン-1-オンの中間体の不斉合成への応用が研究され、従来法の開始物質である有毒なイソシアノ酢酸エチルを使用しない安全性の高い医薬原料製造プロセスが報告されている (Fig. 1-9) [19, 20]。

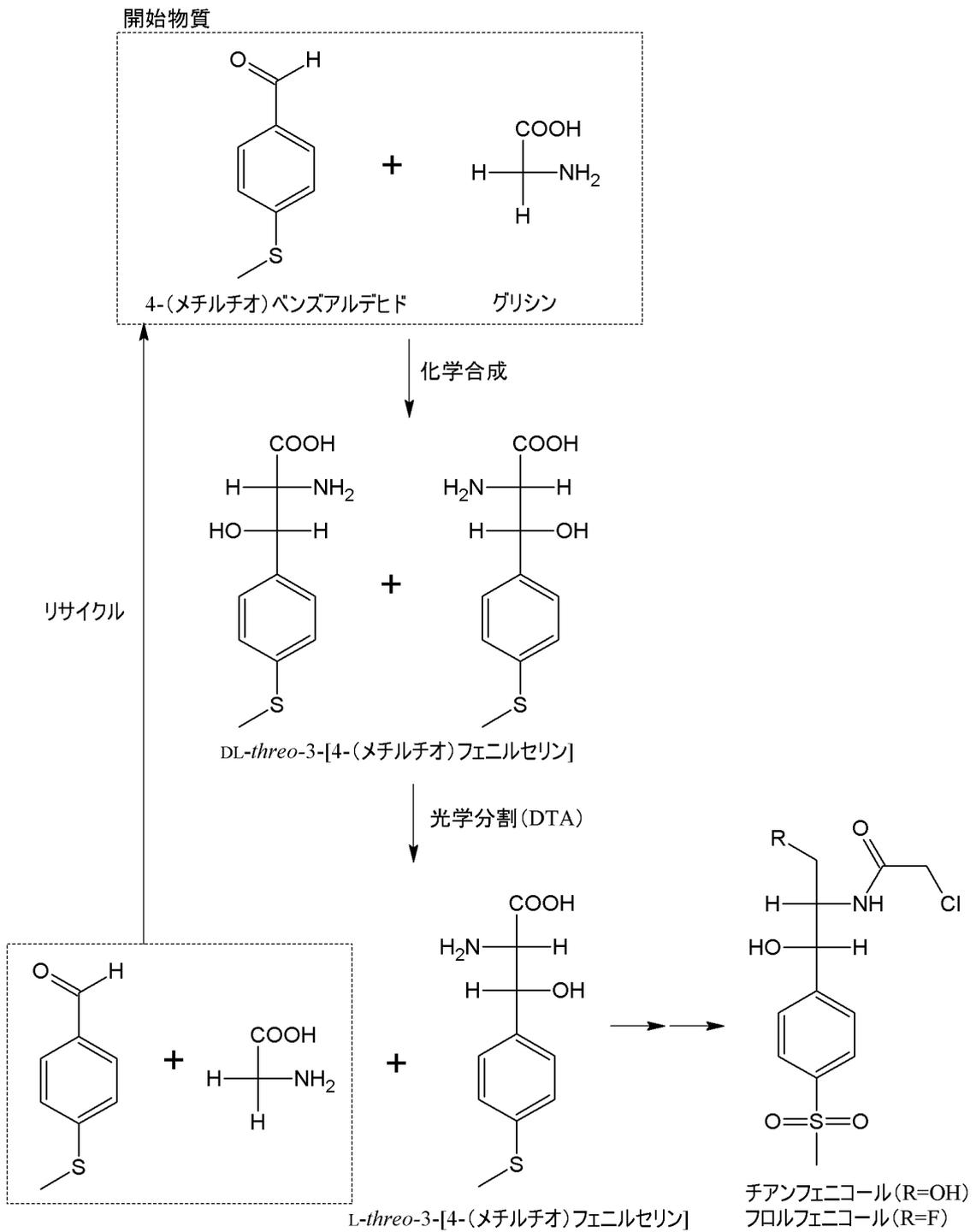


Fig. 1-7. DTA を利用した抗生物質チアンフェニコールおよびフロルフエニコールの生産法

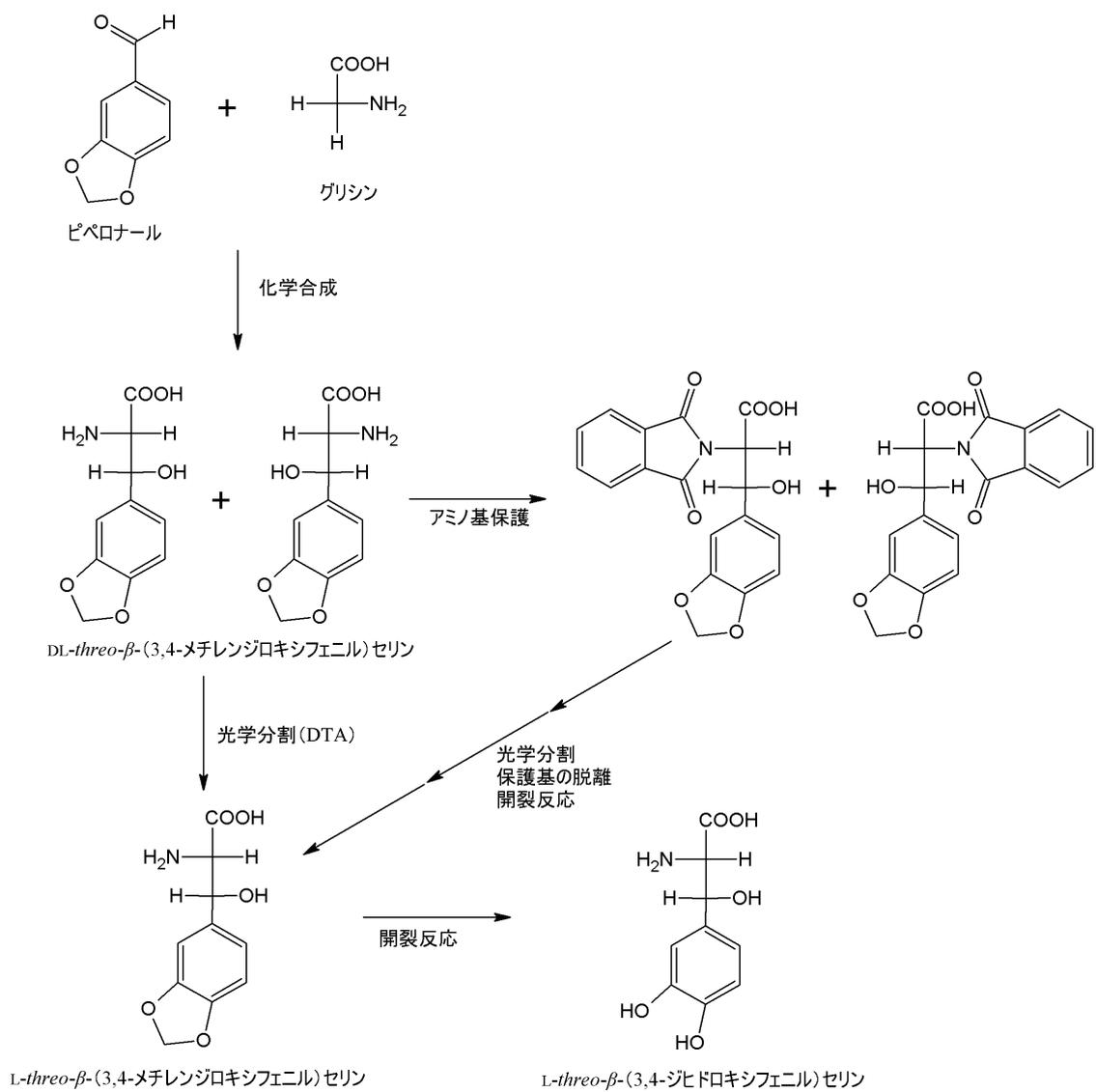


Fig. 1-8. パーキンソン病治療薬 L-*threo*- β -(3,4-ジヒドロフェニル)セリンの製造法

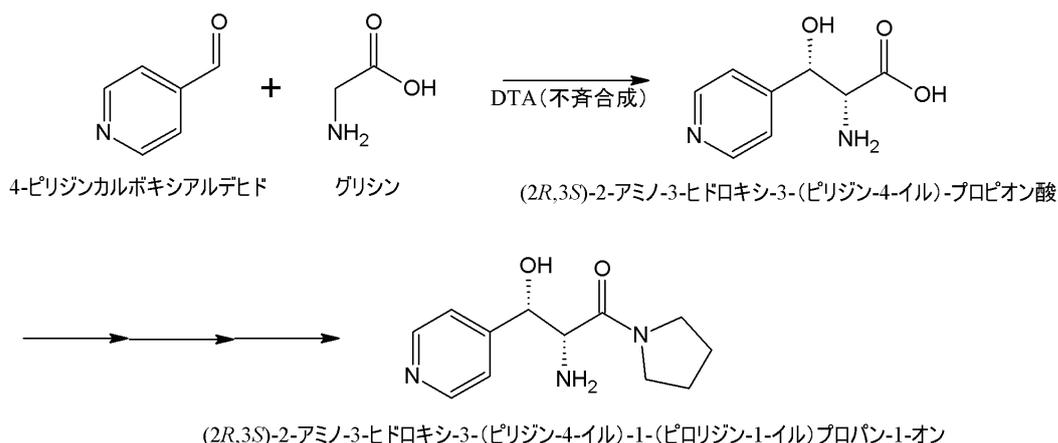


Fig. 1-9. DTA を利用した医薬原料 (2*R*,3*S*)-2-アミノ-3-ヒドロキシ-3-(ピリジン-4-イル)-1-(ピロリジン-1-イル)プロパン-1-オンの生産法

1.6 タンパク質工学

タンパク質工学とは、天然（野生型）の酵素などのタンパク質の機能を改変する技術であり、現在では遺伝子改変を用いる進化分子工学的手法と合理的タンパク質工学的手法がよく用いられている[21]。進化分子工学とは、人工的な遺伝子配列の集団から目的の機能をもつタンパク質をコードするものを淘汰の原理で選び、選ばれた遺伝子をランダムに変異することによって機能を多様化させ、さらに淘汰するといったサイクル繰り返すことで最適な遺伝子を創り出すバイオテクノロジーを意味する[22]。合理的タンパク質工学とは、対象となるタンパク質の構造と機能の相関情報より変異する場所等を予測し、対象タンパク質から目的のタンパク質へ改変するバイオテクノロジーを意味する。これらの方法はタンパク質工学において有用であるが、両手法にはボトルネックが存在する。進化分子工学的手法では、最適な遺伝子を創り出すのに遺伝子へのランダムな変異と機能を持つかどうかのスクリーニング作業で多くのサイクルを要す点、合理的タンパク質工学的手法では構造情報を得るのに一般的な結晶構造解析においてタンパク質の結晶化が必要な点である。

タンパク質の結晶化には様々な結晶化手法や用いる結晶化試薬の種類と濃度、タンパク質濃度、温度、pH など検討項目が多く、X線回折に適した結晶を得ることは難しい。いくつかのタンパク質の結晶構造解析プロジェクトにおいて、その結晶化の成功率は20～50%程度と少ない[23]。

1.7 緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii*

緑色 *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) は真核生物の緑色植物門緑藻綱ボルボックス目に属し、2本の鞭毛を持つ約 10 μm の球形ないし楕円形の単細胞緑藻である (Fig. 1-10)。*C. reinhardtii* は核、葉緑体、ミトコンドリアゲノムの形質転換が可能な生物であり、世代交代時間が5時間と短く培養が容易な点から光合成や鞭毛運動などの研究対象になっており、緑の酵母と紹介されるほど有用なモデル生物である[24, 25]。さらに、*C. reinhardtii* のすべてのゲノム配列は2007年より公開され、データベースの整備・更新がなされている[26]。



Fig. 1-10. *Chlamydomonas reinhardtii* の光学顕微鏡写真

1.8 本研究の意義と目的

キラル化合物の生産および光学分割において酵素は重要な存在である。D-スレオニアルドラーゼは光学活性をもつキラル化合物を不斉合成でき、また β -ヒドロキシ- α -アミノ酸からD型のみを分解できるので工業的な利用が期待される。しかしながら、D-スレオニアルドラーゼは研究例が少なく、これまで原核生物である細菌由来の酵素以外では知られていなかった。真核生物由来のD-スレオニアルドラーゼの存在は、合理的タンパク質工学において工業的に有用な機能や特徴をもつ酵素を設計するため重要であり、また、いまだ判明していないD-スレオニアルドラーゼの生理的役割の解明の糸口となる可能性を秘めている。本研究では、真核生物で初めての緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来のD-スレオニアルドラーゼの酵素学的諸性質および結晶構造を明らかにすることを目的とした。

参考文献

- [1] Voet, D. and Voet, J., D. (2012) ヴォート生化学 第4版, 51–61, 365.
- [2] 今堀 和友, 山川 民夫 (2007) 生化学辞典 第4版, 57, 821.
- [3] Toney, M. D. (2005) Reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **433**, 279–287.
- [4] 林 秀行 (2014) ピリドキサル酵素の反応機構. *生化学*, **86**, 214–231.
- [5] 吉村 徹 (2008) アミノ酸ラセマーゼの構造と機能. *生化学*, **80**, 324–330.
- [6] Yoshimura, T. and Goto, M. (2008) D-Amino acids in the brain: structure and function of pyridoxal phosphate-dependent amino acid racemases. *FEBS Journal*, **275**, 3527–3537.
- [7] Percudani, R. and Peracchi, A. (2009) The B6 database: a tool for the description and classification of vitamin B6-dependent enzymatic activities and of the corresponding protein families. *BMC Bioinformatics*, **10**, 273–280.
- [8] Dückers, N., Baer, K., Simon, S., Gröger, H. and Hummel, W. (2010) Threonine aldolases—screening, properties and applications in the synthesis of non-proteinogenic β -hydroxy- α -amino acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **88**, 409–424.
- [9] Liu, G., Zhang, M., Chen, X., Zhang, W., Ding, W. and Zhang, Q. (2015) Evolution of Threonine Aldolases, a Diverse Family Involved in the Second Pathway of Glycine Biosynthesis. *J. Mol. Evol.*, **80**, 102–107.
- [10] Franz, A. E. and Stewart, J. D. (2014) Threonine aldolases. *Adv. Appl. Microbiol.*, **88**, 58–101.
- [11] McNeil, J. B., McIntosh, E. M., Taylor, B.V., Zhang, F., Tangs, S. and Bognar, A. L., (1994) Cloning and molecular characterization of three genes, including two genes encoding serine hydroxymethyltransferases, whose inactivation is required to render yeast auxotrophic for Glycine. *J. Biol. Chem.*, **269**, 9155–9165.
- [12] Liu, J. Q., Dairi, T., Itoh, N., Kataoka, M., Shimizu, S. and Yamada, H. (1998) Gene cloning, biochemical characterization and physiological role of a thermostable low-specificity L-threonine aldolase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **255**, 220–226
- [13] BBC Research (2012) Global market for chiral technology to grow to \$7.2 billion by 2016. <https://bccresearch.wordpress.com/>
- [14] 八十原 良彦 (2006) バイオ不斉還元システム. *化学と生物*, **44**, 629–632.
- [15] Fesko, K. (2016) Threonine aldolases: perspectives in engineering and screening the enzymes with enhanced substrate and stereo specificities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 2579–2590.
- [16] Liu, J. Q., Odani, M., Dairi, T., Itoh, N., Shimizu, S. and Yamada, H. (1999) A new route to L-threo-3-[4-(methylthio)phenylserine], a key intermediate for the synthesis of antibiotics: recombinant low-specificity D-threonine aldolase-catalyzed stereospecific resolution. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 586–591.

- [17] Liu, J. Q., Dairi, T., Itoh, N., Kataoka, M., Shimizu, S. and Yamada, H. (2000) Diversity of microbial threonine aldolases and their application. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.*, **10**, 107–115.
- [18] Liu, J. Q., Odani, M., Yasuoka, T., Dairi, T., Itoh, N., Kataoka, M., Shimizu, S. and Yamada, H., (2000) Gene cloning and overproduction of low-specificity D-threonine aldolase from *Alcaligenes xylooxidans* and its application for production of a key intermediate for parkinsonism drug. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54**, 44–51.
- [19] Goldberg, S. L., Goswami, A., Guo, Z., Chan, Y., Lo, E. T., Lee, A., Truc, V. C., Natalie, K. J., Hang, C., Rossano, L. T., Schmidt, M. A. (2015) Preparation of β -hydroxy- α -amino acid using recombinant D-threonine aldolase. *Org. Process Res. Dev.*, **19**, 1308–1316.
- [20] Schmidt, M. A., Reiff, E. A., Qian, X., Hang, C., Truc, V. C., Natalie, K. J., Wang, C., Albrecht, J., Lee, A. G., Lo, E. T., Guo, Z., Goswami, A., Goldberg, S. L., Pesti, J., Rossano, L. T. (2015) Development of a Two-Step, Enantioselective Synthesis of an Amino Alcohol Drug Candidate. *Org. Process Res. Dev.*, **19**, 1317–1322.
- [21] Renneberg, R. (2014) カラー図解 EURO 版 バイオテクノロジーの教科書(上), 104-110.
- [22] 伏見 譲 (2013) 進化分子工学—高速分子進化によるタンパク質・核酸の開発, 3-20.
- [23] 岩田 想 (2005) 膜蛋白質の結晶構造解析に将来はあるのか. 蛋白質 核酸 酵素, **50**, 197–206.
- [24] Goodenough, U. W. (1992) Green Yeast. *Cell*, **70**, 33–538.
- [25] 福澤 秀哉, 久保 雄昭 (2009) クラミドモナス. *低温科学*, **67**, 17–21
- [26] Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L. K., Drouard, L. M., Marshall, W. F., Qu, L. H., Nelson, D. R., Sanderfoot, A. A., Spalding, M. H., Kapitonov, V. V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S. M., Grimwood, J., Schmutz, J., Chlamydomonas Annotation Team, JGI Annotation Team, Grigoriev, I. V., Rokhsar, D. S. and Grossman, A. R. (2007) The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science*, **318**, 245–251

第二章

緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来 D-スレオニンアルドラーゼの酵素学的諸性質

2.1 序論

DTA は D-スレオニンのような β -ヒドロキシ-D-アミノ酸をグリシンおよび対応するアルデヒドへの相互変換を触媒する。この酵素はピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) 依存性酵素であり、いくつかの金属イオンに依存する[1]。DTA は基質の α 位の立体配座において高い立体選択性をもつが、 β 位では立体選択性が寛容である[2]。

DTA は C-C 結合の形成と開裂を触媒するため有機合成反応において強力なツールとなる[3]。開裂反応はパーキンソン病の治療薬や抗生物質の生産における中間体の光学分割に[4, 5]、合成反応は医薬原料を生産する研究に使われている[6]。また、合成反応において DTA は様々なアルデヒドを基質とすることが可能である一方グリシン以外のアミノ酸は許容できないと考えられていたが、*Pseudomonas sp.* などの一部の細菌由来の DTA は D-アラニンや D-セリンなども基質とすることができると報告され、より多くの多彩な β -ヒドロキシ-D-アミノ酸の生産が可能になった [7, 8]。

TAs の生理的役割は現在議論中であるが、L-スレオニンアルドラーゼの場合第二のグリシン生合成経路に関与していると考えられている[9, 10]。さらに、酵母のグリシン要求株に L-スレオニンアルドラーゼが必須であると報告され、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼに変わるグリシン生合成の代替経路に用いられるとわかった[11]。しかしながら、DTA の生理的役割についての知見はない[9]。

DTA の酵素学的諸性質は例えば *Arthrobacter sp.* DK-38 など、いくつかの細菌で詳細に調べられているが[12, 13]、現在まで真核生物由来 DTA の存在は知られていない。本研究では、真核生物由来 DTA の発見とその酵素学的諸性質について報告する。

2.2 材料と方法

2.2.1 材料

D-threo-フェニルセリンは高知大学農林海洋科学部の村松久司准教授のご厚意により供与された。NADH, 酵母由来アルコール脱水素酵素およびゲルろ過カラムクロマトグラフィーのための分子量マーカーはオリエンタル酵母（東京, 日本）より得た。遺伝子操作に用いた制限酵素はタカラバイオ（滋賀, 日本）より得た。プラスミドはメルクミリポア（マサチューセッツ, アメリカ）と GenScript（ニュージャージー, アメリカ）より得た。遺伝子操作キットはキアゲン（ヒルデン, ドイツ）, タカラバイオおよび東洋紡（大阪, 日本）より得た。プライマーはファスマック（神奈川, 日本）より合成されたものを使用した。そのほかの試薬はシグマ（セントルイス, アメリカ）, ナカライテスク（京都, 日本）および和光純薬工業（大阪, 日本）より得た。HiTrap DEAE FF, Mono Q 5/50 GL および Superose 12 10/300 GL カラムは GE ヘルスケア（バッキンガムシャー, イギリス）より, Cosmosil 5C18-AR-300 カラムはナカライテスクより購入した。

2.2.2 生物と培養

C. reinhardtii NIES-2237（国立環境研究所より分譲）は Tris-acetate-phosphate（TAP）培地 [14] または TAP 培地に D-スレオニン を 1 g/L になるよう添加した培地（TAP + D-Thr 培地）を用いて 25°C で 4 日間培養した。培養における光条件は蛍光灯（9000 LUX）を用いて 16 時間点灯, 8 時間消灯（暗条件）を繰り返した。

2.2.3 酵素活性測定

スレオニンアルドラーゼ活性は酵母由来アルコール脱水素酵素とのカップリングによるアセトアルデヒド還元（NADH の酸化）を 340 nm で分光測定した（Fig. 2-1）。本方法は Liu らのカップリング法をもとに改変した [10]。100 mM HEPES-NaOH バッファー（pH 8.1）, 5 mM D-スレオニン, 50 μ M PLP, 100 μ M MnCl₂, 200 μ M NADH, 26 U/mL 酵母由来アルコール脱水素酵素および酵素溶液を含んだ混合液（0.5 mL）を標準酵素反応溶液として測定に用いた。DTA 活性における 1 U は 50°C で 1 min に 1 μ mol のアセトアルデヒドの生成を触媒する酵素量として定義した。この時 NADH のモル吸光係数は $6.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ とした。フェニルセリンに対するアルドラーゼ活性はこの時生成されるベンズアルデヒドを 280 nm で吸光測定した。この時ベンズアルデヒドのモル吸光係数は $1.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ とした。対照実験は酵素溶液を加えないこと以外同じ条件で行われた。

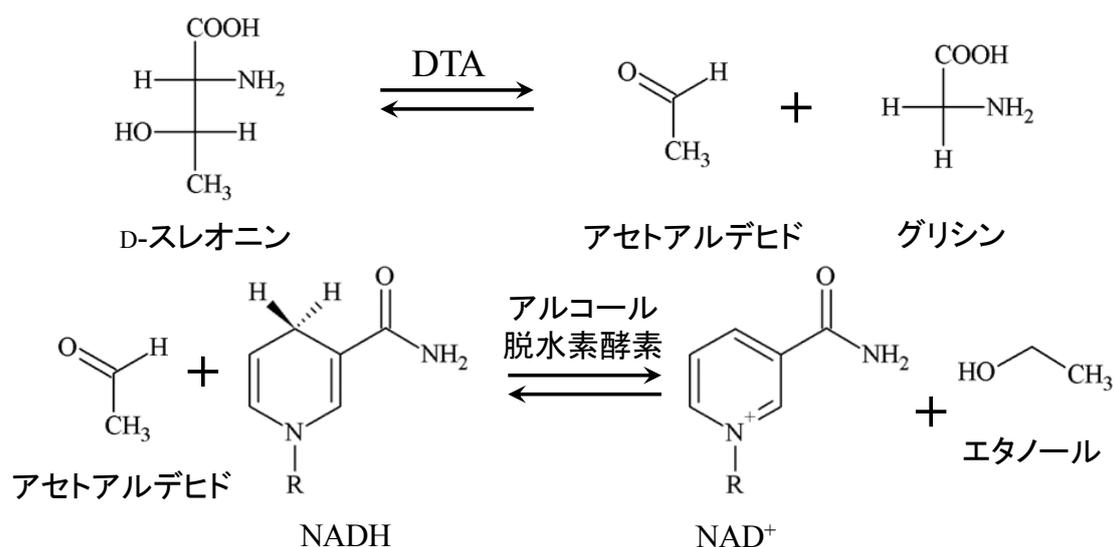


Fig. 2-1. 酵母由来アルコール脱水素酵素とのカップリングによる DTA 活性測定

DTA の D-スレオニンと D-*allo*-スレオニン合成活性は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって測定された。この方法は片岡らの方法をもとに改変した[13]。100 mM HEPES-NaOH バッファー (pH 8.1), 100 mM グリシン, 350 mM アセトアルデヒド, 10 μ M PLP, 1 mM MnCl_2 および酵素溶液を含む反応溶液 0.5 mL を 50°C で 0, 15, 30 または 60 min インキュベートし, 0.5 mL の 1 N 塩酸で反応を停止させた。その溶液を希釈後ろ過し, 合成されたアミノ酸を含むサンプル 100 μ L に 300 μ L の誘導体化試薬を混合し誘導体化した。誘導体化試薬は 0.5 mL のエタノール中に *o*-フタルアルデヒド 15 mg を溶かした溶液と 11 mL の 0.1 M ホウ酸ナトリウムバッファー (pH 10) 中に 30 mg の *N*-アセチル-L-システインを溶かした溶液を混合することで作成した。誘導体化したサンプル溶液 20 μ L は D-スレオニンと D-*allo*-スレオニンの濃度と光学的純度を測定するために 30°C で保持された Cosmosil 5C₁₈-AR-300 カラムへ供された。誘導体化したスレオニンは 50 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 6.5) 中の 22-25%メタノールの直線的な濃度勾配によって溶出された。カラムの流速は 0.7 mL/min とした。

2.2.4 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来 D-スレオニンアルドラーゼをコードする遺伝子の単離と配列決定

RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて *C. reinhardtii* NIES-2237 から全 RNA を抽出した。Chlamydomonas resource center [15]のデータベース内のコーディング配列をもとにして, センスプライマー (5'-ATGCGGGCGCTGGTTTCC-3') とアンチセンスプライマー (5'-TCATTGCCCTGGCCCCGCCC-3') をデザイン, 合成した。逆転写には逆転写酵素 ReverTra Ace (東洋紡), アンチセンスプライマーおよび全 RNA を用いた。得られた逆転写産物を鋳

型として KOD+ Ver. 2 (東洋紡) およびセンス, アンチセンスプライマーを用いて PCR した。その増幅産物は SUPREC-PCR (タカラバイオ) を用いて精製され, 配列解析された。その解析には genetic analyzer 3100xl (Applied Biosystems) を用いた。得られた DTA をコードしている遺伝子は *dta* と名付けた。

2.2.5 大腸菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)内での D-スレオニアルドラーゼの発現と精製

mRNA 由来の遺伝子情報をもとに, 翻訳されるアミノ酸配列は変化させずに大腸菌のコードン頻度に合わせ, GC 含量の調整やポリメラーゼのスリップと相同性組換えを促進する配列を除くなど大腸菌での遺伝子発現に適した DTA 遺伝子 (*dta'*, Fig. 2-2) を設計した。ベクター pUC57 の中の *EcoRV* 制限部位の間に遺伝子 *dta'* とその N 末端と C 末端にそれぞれ *Nde I* と *Xho I* 制限部位を付け加えた DNA を組み込んだプラスミド pUC57/*dta'* を合成した (GenScript)。その *dta'* を pUC57/*dta'* から制限酵素 *Nde I* と *Xho I* を用いて消化し, DNA Ligation Kit Ver. 2.1 (タカラバイオ) を用いて発現ベクター pET41b(+) の中へ連結した。得られた発現プラスミド (pCrDTA, Fig. 2-3) をコンピテントセル *Escherichia coli* BL21(DE3) の中へヒートショック法[16]を用いて導入した。25 mg/mL カナマイシンを添加した LB 寒天培地によって選択されたシングルコロニーを 25 mg/mL カナマイシンを添加した 24 mL の LB 培地にて 37°C で前培養した。2 L 容のマリンフラスコ (古川理工) に 1.2 L の同様の培地を用意し, そこへ前培養液を加え 25°C, 16 時間培養した。得られた pCrDTA をもつ大腸菌 (90.8 g) を遠心分離によって回収した。集めた菌体を 50 μ M PLP とセリンプロテアーゼ阻害剤である 1 mM フッ化フェニルメチルスルホニルを含む 100 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.0) に懸濁し, 氷上で超音波破碎した。遠心分離後, 上清の無細胞抽出液を硫酸アンモニウム分画した。活性画分の 25-60%飽和画分を 20 μ M PLP を含む 50 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.0) で再懸濁し, 同様の溶液に対して透析した。その酵素溶液を遠心分離とフィルターろ過を用いて沈殿を除き, 弱陰イオン交換カラムである Hitrap DEAE FF カラムへ供した。そのカラムは 20 μ M PLP を含む 50 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.0) で平衡化され, 0-500 mM NaCl を用いた直線的な濃度勾配によって目的画分を溶出した。流速は 1 mL/min とした。活性画分を回収し, 得られた活性画分を 20 μ M PLP を含む 50 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.0) に対して透析した。透析後の活性画分をフィルターろ過し, 強陰イオン交換カラムである Mono Q 5/50 GL カラムへ供した。カラムは 20 μ M PLP を含む 50 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.0) で平衡化され, 0-500 mM NaCl を用いた直線的な濃度勾配によって目的画分を溶出した。流速は 0.5 mL/min とした。得られた活性画分を回収し, -80°C で保存した。

Original	1	ATGCGGGCGCTGGTTTCCAAAGCGCGGTGGCCCACTCGGTGGCGGGCGGGCTCGCAG
Optimized	1	ATGGTGTCTGGTTTCCAAAGCTCGTCTGGCTCACTCAGTCGGTGGCCGTGAAGTCA
Translated	1	<u>M R A L V S K A R L A H S V G G R A S Q</u>
Original	61	GCCACAAGATGTFGCAGCCACCATCTCTGTAGCGGGCAACCGCACACCTCGCGACGCC
Optimized	61	GCTACCCGCTGTGTCTTACCATCTCCGCAAGTGTGCCCCGGCACATCTGGTGTATGCC
Translated	21	A T R C A A T I S A S R A P A H L G D A
Original	121	CTTCAAGATGTGGACACGCCCTCCCTCATCTTGGACTTGGATGCTTTTACAGAAACTGT
Optimized	121	CTGATGATGTGGACACCCCGGCGCTGATCTGGATCTGGACGCGCTTTGATGTAACTGC
Translated	41	L H D V D T P A L I L D L D A F D R N C
Original	181	GAGAAGCTAAAGGCGCTCATGGCGGGCTTCCCGGCGTGGCAGTGGCCCCACGCCAAG
Optimized	181	GAANAAGTAAAGGCGTGTGGCAGGTTTCCCGGCTGGCTGTGTGCCCCGATGCTAAA
Translated	61	E K L K G V M A G F P G V A V R P H A K
Original	241	GCCACAAGTGTGGGAGGTGGCGCGGGCGAGTGCACCTGCTGGGGCGGAAGGGCGTG
Optimized	241	GCGCACAAATGTGGGAGGTGGCGCGTCCCAACTGCAGCTGCTGGTGGCAAGGGCGT
Translated	81	A H K C A E V A R R Q L Q L L G A K G V
Original	301	TGTCGCCAAAGGTCACTGAGGCTGAGCGATGGCGGAGGGCGGGGTGCCATCTGTG
Optimized	301	TGCTGTGAGAAAGTCACTGAAAGCGAAGCAATGGCTGAAGCGGTGTTCAAGTCTGTG
Translated	101	C C Q K V I E A E A M A E G G V S D L L
Original	361	CTGTCCAATGAGTCACTTGGCGCCAGGAAATTAACCGCTTGGTGGCCTTGGCGCGG
Optimized	361	CTGTGCAATGAAGTCACTTGGCGCGTAAATTAACCGCTTGGTGGTCTGGCGCGGCA
Translated	121	L S N E V I A P R K I D R L V G L A A A
Original	421	GGGCGCGCTGTGGCGGTGTGCTACGAGCGGGAGGCAACCTGCGGCGAGTGAATGCTGG
Optimized	421	GGTGCACGCTGGCGGTGTGCTAAGCTGAAGTAATCGCGCAGCTGAATGCGGCC
Translated	141	G A R V G V C Y E R E D N L R Q L N A A
Original	481	GCGCGGCAOCTGGCACGCATCTGGATGTGCTGGTGGAGCTGAACGTGGGGCAAGACAG
Optimized	481	GCGCGAGCTGTGGCACCCATCTGGATGTCTGGTGAACCTGAACGTGGTCAAGATGCC
Translated	161	A A A R G T H L D V L V E L N V G Q D R
Original	541	TGTGGCGTGAACCTGGCGGATGAGGTAGTGCAGCTGGCGGCGCGCGCGCGCGGCTGGAC
Optimized	541	TGTGGCGTAAATTCAGCAGATGAGGTGTTGAGCTGGCGGCGTGGCGGCGAGCTGTGAT
Translated	181	C G V N S A D E V V Q L A R A A A G L D
Original	601	AATGTGGCGTTTGGCGCATTGAGCCTACCACGGCGGCTACAACATGTTGTGTATCCC
Optimized	601	AACGTGGCGTTTGGCGCATTGAGCCTACCACGGCGTCTGAGCAGCTCGTGTGTATCCC
Translated	201	N V R F A G I Q A Y H G G L Q H V R D P
Original	661	GCGACCGCGCGCAGCGAGTGGGCGAGTGTGGCGGGCGCGCGCGCGCGGCTGGATGCC
Optimized	661	CGTGAACGCTGCCAAGCTGTGGCTCAGGTGTGGTGTGCGCGCGCGCTGGCGTGTGCA
Translated	221	R D R A Q R V G Q V V G R A R A A V D A
Original	721	CTGAAGCGCGCTGGACTGCCCTGGCACAGGTACGGGGGGCGGCACTGGCACCTACAGG
Optimized	721	CTGAAAGCGCAGGTCTGCCGTGTGACACCGTACGGCGGCGGCACTGGCACCTACAGG
Translated	241	L K A A G L P C D T V T G G G T G T Y R
Original	781	GTTGAGCGGCGCAGCGGTGTGTTACGGAGGTGACCGCGGCTCGTTCGCCTTCAGCGAC
Optimized	781	GTCGAAGCTGCTCGGCTGTCTTACGGAGGTGACCGCGGCGAGTTTTCGCCTTCAGCGAT
Translated	261	V E A A S G V F T E V Q P G S F A F S D
Original	841	GCAGACTACGACCGCAACCTGCAGGAGGACGGCGCGTGGCGAGTGGGAGCAGAGCCTG
Optimized	841	GCAGACTACGCTCGCAATCTGCAGGAAAGTGGTGGCGTGGTGAATGGGAAACAAAGTCTG
Translated	281	A D Y A R N L Q E D G G V G E W E Q S L
Original	901	TGGGTGCTACGCGAGTTATGAGCGTCAACCCAGCTCGGGGCGTGGCGGTGGGACGCC
Optimized	901	TGGGTTCTGACCCAGGTGATGTCGTTACGGCGGCGGCTGCTGGCTGTTGTCGATGCG
Translated	301	W V L T Q V M S V T P A R G L A V V D A
Original	961	GGCACCAAGCGGTGTCATTGGAACAGTGGGCGCGCGGACTGCCGCCCGCTTCGAGCGG
Optimized	961	GGCACCAAGCGGTGAGCCTGGAATCTGGCGCGCGGCTGCGCGCGCGGCTTGAAGCC
Translated	321	G T K A V S L D S G P P R L P P A F E A
Original	1021	GCGTACGGCACAAATGATGAGTACGGCAGCGGGCGGCGACGACGCGCAAGCTCATGTGG
Optimized	1021	GCGTATGGCACGATGATGGAATACGGCTTGGTGGCGATGAACATGTAACCTGATGCG
Translated	341	A Y G T M M E Y G S G G D E H G K L M W
Original	1081	CCGACGGCGCCTACAGCTGCCATGTCGCTGCCGAGTGGGCGAGCTGCTGTGCTA
Optimized	1081	CCGCAAGCGCCTATCAGCTGCCATGAGCCTGCCGGAAGTGGTCTCTGCTGCTGCTG
Translated	361	P Q G A Y Q L P M S L P E V G S L L L L
Original	1141	CAGCGGGCGCACTGGACCCCGCTCACTGTATGACTGGCTGGTGGCGCGCGGGCGG
Optimized	1141	CAGCGGGCGCACTGTGATCCGACCGTCACTGTATGACTGGCTGGTGGCGCGCGGGCGG
Translated	381	Q P G H C D P T V N L Y D W L V A A R R
Original	1201	CAGCAGGGGGGCGCAGCAGCGGGGGCGTGGACGGTGGCGAGTGGAGGCGGTGTGGCCC
Optimized	1201	CAGCAAGTGGCCAGCAACAGGTTGGCTGGATGGTGGGCTGGGAGCCGCTGGCGCG
Translated	401	Q G G Q Q Q G G V D G W R V E A V W P
Original	1261	ATCGGGGGGCGGGGCGAGGCAATGA
Optimized	1261	ATCGTGGTGTGGTCCGGTCAATAA
Translated	421	I R G R G P G Q *

Fig. 2-2. 遺伝子 *dta* と *dta'* の塩基配列比較とその推定アミノ酸配列。アスタリスクは終止コドンを示す。下線部は精製タンパクにおいてエドマン分解法によって同定されたアミノ酸配列を示す。Original; 遺伝子 *dta* の塩基配列, Optimized; 大腸菌での発現に適した合成遺伝子 *dta'* の塩基配列, Translated; CrDTA のアミノ酸配列。

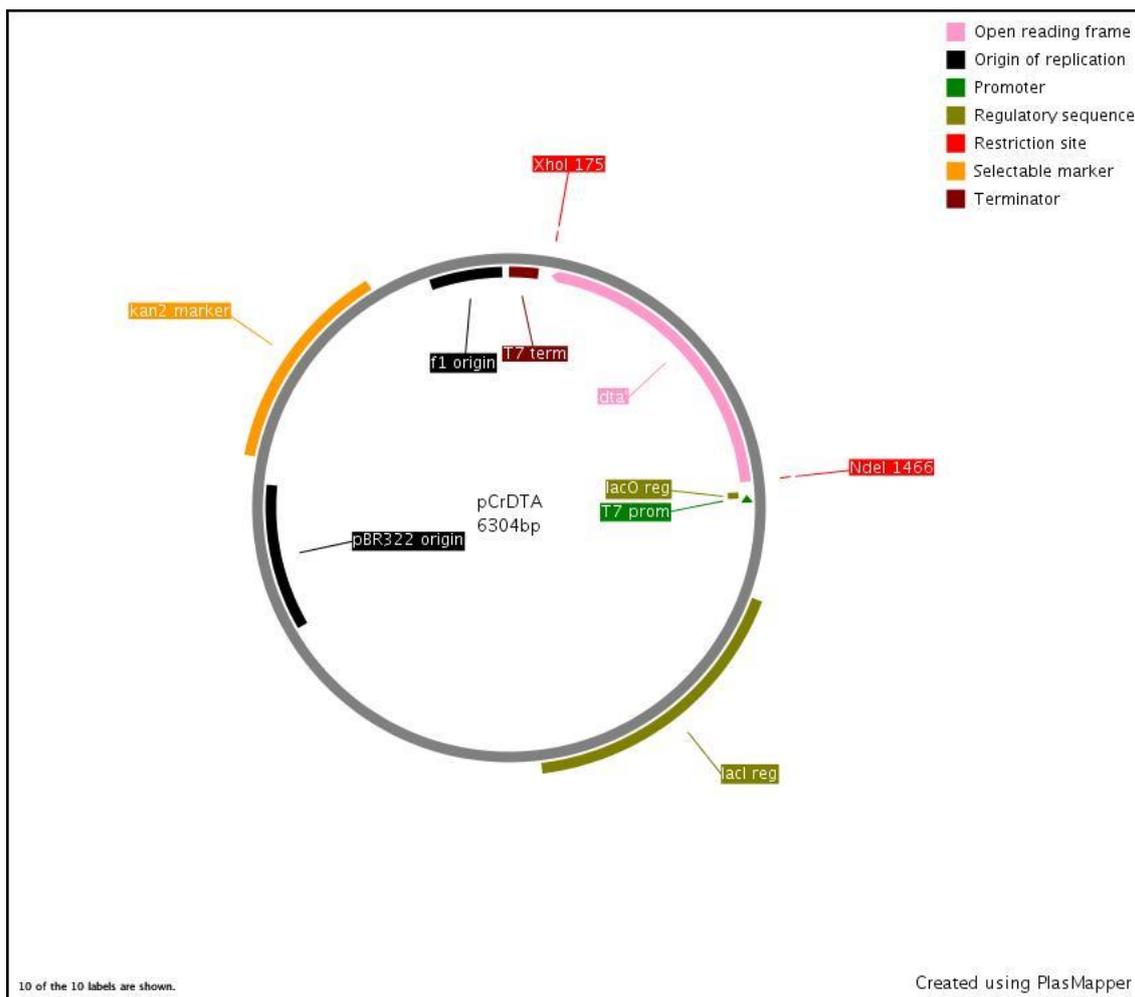


Fig. 2-3. pCrDTA のプラスミドマップ。ピンク; 遺伝子 *dta*, 黒; 複製開始点, 緑; プロモータ領域, 黄緑; 転写制御領域, 赤; 今回用いた制限部位, 黄; カナマイシン耐性遺伝子, 茶; ターミネータ領域。Web サービス PlasMapper により作成。

2.2.6 その他解析・測定法

ゲルろ過カラムである Superose 12 カラムを用い、分子質量マーカーと比較することで CrDTA の分子質量を推定した。分子質量マーカーは glutamate dehydrogenase (290 kDa), enolase (67 kDa), myokinase (32 kDa) および cytochrome *c* (12.4 kDa) を用いた。Bradford 法を用いてタンパク質濃度を決定した[17]。スタンダードとしてウシ血清アルブミンを用いた。酵素の精製度と各サブユニットの分子質量は sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を用いて調べた。分子質量マーカーは CLEARLY Protein Ladder (タカラバイオ) を用いた。Quick Blue Staining Solution (BioDynamics Laboratory Inc.) を用いてゲルは染色された。酵素の N 末端アミノ酸配列は Procise 492 cLC protein sequencer (Applied Biosystems) および PPSQ-10 (島津製作所) を用いてのエドマン分解法によって決定した。すべての塩基配列とアミノ酸配列は Chlamydomonas resource center および NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) のデータベースから得た。相同性検索には NCBI の BLAST プログラム[18]を用いた。アミノ酸配列の多重整列には DNAMAN 6.0 プログラム (Lynnon LLC) を用いた。ラインウィーバー・バークプロットを用いて動態パラメータ (1 秒間における酵素のターンオーバー数を示す k_{cat} 値および基質の親和性を示す K_m 値) を算出した。

2.3 結果と考察

2.3.1 D-スレオニンアルドラーゼをコードする遺伝子の配列決定とクローニング

アラニンラセマーゼ N 末端ドメインと注釈されている *C. reinhardtii* の塩基配列 `pasa_Sanger_mRNA23075` は Chlamydomonas resource center 上のゲノムデータベースから得られた。*C. reinhardtii* からその遺伝子を単離し、配列解析した。その結果解析された 1287 bp のオープンリーディングフレーム（この配列は DNA Databank of Japan のデータベースへ登録された。アクセッション番号: LC185459）は 44999 Da の推定分子質量で 428 アミノ酸残基をもつタンパク質をコードしていた（Fig. 2-2）。データベース上の `pasa_Sanger_mRNA23075` の配列と *C. reinhardtii* 細胞から単離・配列解析した遺伝子 *dta* の配列を比較したところ、データベース上の配列の内 913-948 番が *dta* において欠落していた。これはデータベースの配列情報がゲノムドラフトによるスプライシング前のゲノム配列情報のみであるため、イントロン配列の推定が実際のコーディング配列 (*dta*) と異なると考えられる。

CrDTA 発現大腸菌を得るためにまず筆者は mRNA を逆転写 PCR して得た DTA 遺伝子 *dta* と pET41b(+) から構築した発現プラスミドを大腸菌 *E. coli* BL21 (DE3) 内へ導入した。しかしながら、得られた組換え大腸菌を SDS-PAGE へ供したところ、タンパク質の大量発現をしめすようなメジャーなタンパク質バンドは観察されなかった。遺伝子 *dta* は大腸菌のレアコドンを多く含んでいたため、大腸菌中で *dta* はその翻訳途中で停滞・遅延し大量発現に至らなかったと考えられた。そこで大腸菌での発現に適した合成遺伝子 *dta'* を含む pCrDTA を再度 *E. coli* BL21 (DE3) へ導入した。その結果、DTA 活性をもつタンパク質の大量発現を確認した。組換え大腸菌から調製した無細胞抽出液の比活性は 0.8 U/mg であった。

西村らは同じ PLP 酵素に分類されるアラニンラセマーゼの酵素活性を *C. reinhardtii* 内で検出した [14]。しかしアラニンラセマーゼ遺伝子の同定には至らなかった。塩基配列 `pasa_Sanger_mRNA23075` は「アラニンラセマーゼ N 末端ドメイン」であるとデータベース上で注釈があったのでアラインラセマーゼをコードする遺伝子だと考えられた。しかしながら、この遺伝子から発現したタンパク質はアラニンラセマーゼ活性を示さず、DTA 活性を示した。

CrDTA のアミノ酸配列情報を用いて一次配列のホモロジーサーチを行った。その結果、CrDTA は PLP 酵素のアラニンラセマーゼファミリー (fold type III) に属していることがわかった。そのファミリー内のタンパク質で比較した場合、CrDTA は例えば細菌由来アラニンラセマーゼや真核生物由来 D-セリンデヒドラターゼなどのほかの PLP 酵素より細菌由来 DTA と配列相同性が高かった (Fig. 2-4)。しかしながら、*Arthrobacter* sp. 由来および *Alcaligenes xylosoxidans* 由来の細菌由来 DTA 同士の配列相同性は 91% と高い一方で、CrDTA と細菌由来 DTA の配列相同性は *Arthrobacter* sp. 由来 DTA とは 39% で *A. xylosoxidans* 由来とは 40% と低かった。この結果より CrDTA は細菌由来 DTA とは異なる立体構造を有する

と示唆された。一方で, *A. xylooxidans* 由来 DTA の結晶構造より決定された活性部位残基 [9]は CrDTA でも保存されていた。このことから細菌由来 DTA が CrDTA の祖先タンパク質であると仮定した場合, DTA 遺伝子が細菌から真核生物へ伝達される過程においてそれらの生物は DTA の機能を維持する必要があったと考えられた。よって DTA には細菌から真核生物にかけて重要な生理的役割をもつ可能性があり, CrDTA の生理的役割に関する研究が望まれる。

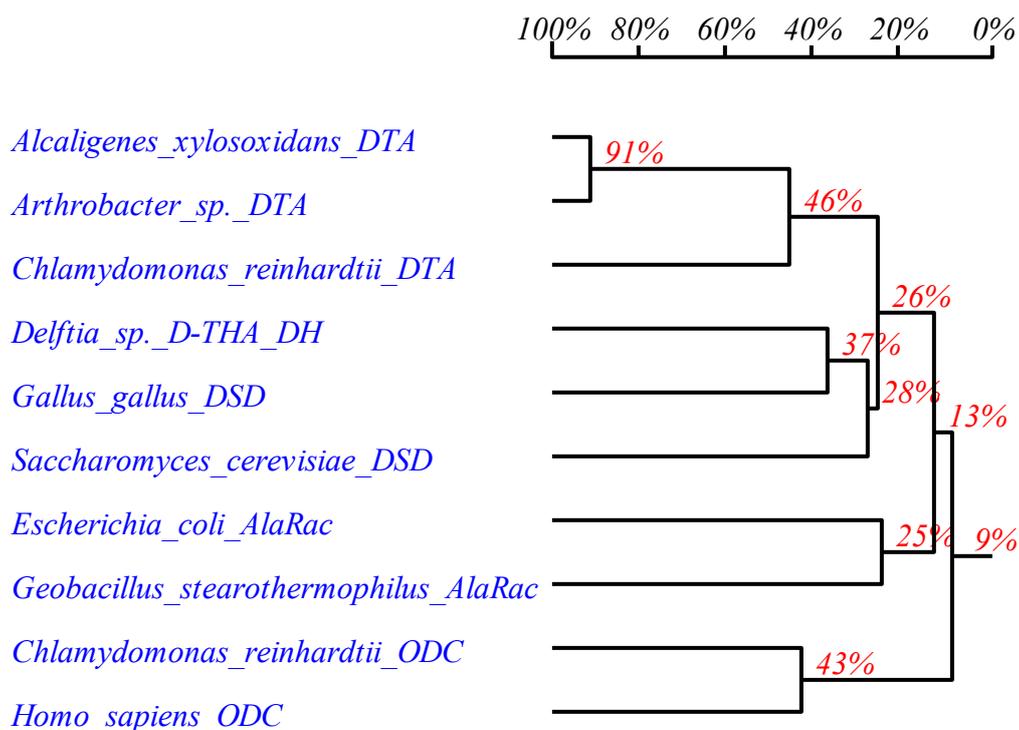


Fig. 2-4. 主な PLP 酵素 (fold type III) におけるアミノ酸配列比較。青字が「属_種_酵素名」を示す。DTA; D-threonine aldolase, D-THA_DH; D-threo-3-hydroxyaspartate dehydratase, DSD; D-serine dehydratase, Alac; alanine racemase, ODC; ornithine decarboxylase。赤字が配列相同性を示す。

2.3.2 組換え D-スレオニンアルドラーゼの精製

CrDTA は pCrDTA をもつ *E. coli* BL21 (DE3) から硫酸アンモニウム分画, DEAE-Sepharose と Mono Q カラムクロマトグラフィーによって均一に精製された (Table II-1)。CrDTA は 8.56 倍にまで精製され, 精製酵素の比活性は 7.05 U/mg であった。精製酵素は SDS-PAGE で分子質量 45 kDa にシングルバンドを得た (Fig. 2-5)。その 45 kDa のタンパク質バンドの N 末端アミノ酸配列は MRALVSKARLAH と決定された。解析された N 末端アミノ酸配列は遺伝子 *dta* のアミノ酸配列と一致した。ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによってこの精製酵素の分子質量は 60 kDa であると決定された (Fig. 2-6)。酵素学的諸性質の試験には精製された組換え CrDTA を用いた。

Table II-1. 組換え CrDTA の精製

Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Cell-free extract	4520	5490	0.823	1.00	100
Ammonium sulfate	2750	3280	0.840	1.02	60.9
DEAE-Sepharose	482	115	4.20	5.11	10.7
Mono Q	159	22.5	7.05	8.56	3.51

スレオニンアルドラーゼ活性は基質として D-スレオニンを用いて決定した。

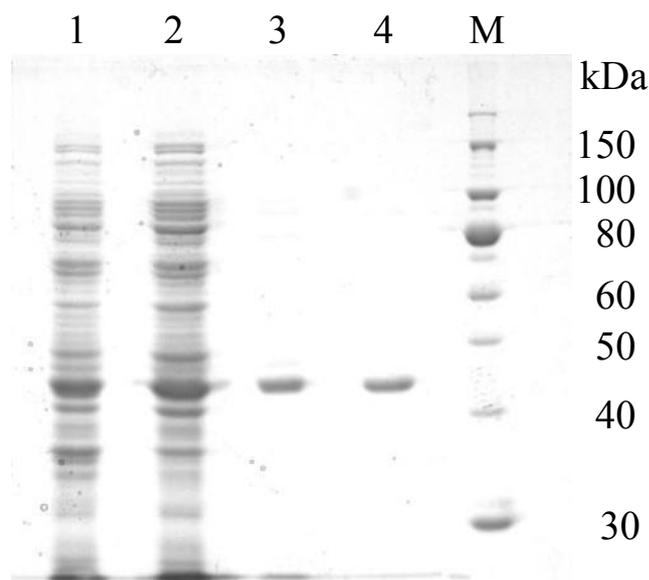


Fig. 2-5. SDS-PAGE による CrDTA の発現と精製の解析。レーン 1; 無細胞抽出液, レーン 2; 硫酸アンモニウム分画後の活性画分, レーン 3; DEAE-Sepharose カラムクロマトグラフィー後の活性画分, レーン 4; Mono Q カラムクロマトグラフィー後の活性画分, レーン M; タンパク質マーカー。タンパク質バンドはクマシーブリリアントブルー (CBB) 染色によって検出された。

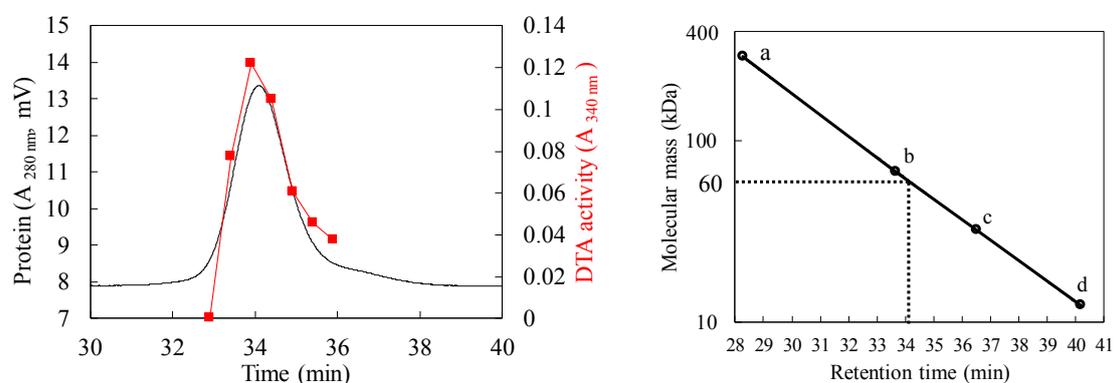


Fig. 2-6. ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子質量の決定。左図; Superose 12 カラムクロマトグラム。右図; 分子質量マーカーを用いた検量線による DTA の分子質量の決定。分子質量マーカーは glutamate dehydrogenase (a, 290 kDa), enolase (b, 67 kDa), myokinase (c, 32 kDa) および cytochrome c (d, 12.4 kDa) を用いた。

2.3.3 pH と温度による D-スレオニンアルドラーゼ活性への影響

CrDTA 活性の最適 pH は 50°C において 0.1 M MES-NaOH バッファー (pH 4.7-7.0), 0.1 M HEPES-NaOH バッファー (pH 6.8-8.1), 0.1 M HEPES-NaOH-NaCl (pH 8.4-8.6), 0.1 M Bis-Tris-HCl バッファー (pH 8.3-9.0) を用いて決定された。本酵素は HEPES-NaOH バッファーを含んだ pH 8.4 の溶液中で最大活性を示した (Fig. 2-7)。

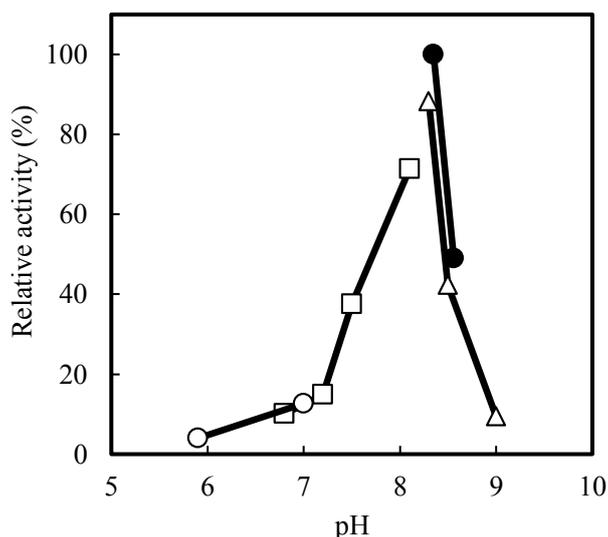


Fig. 2-7. pH による D-スレオニンアルドラーゼ活性への影響。0.1 M MES-NaOH バッファー (pH 4.7-7.0, ○), 0.1 M HEPES-NaOH バッファー (pH 6.8-8.1, □), 0.1 M HEPES-NaOH-NaCl バッファー (pH 8.4-8.6, ●) および 0.1 M Bis-Tris-propane-HCl バッファー (pH 8.3-9.0, △) を用いた。pH 8.4 での活性を 100% とした。

CrDTA 活性の最適温度は 20°C から 70°C での活性測定によって決定した。この酵素は 70°C のとき最大の活性を示した (Fig. 2-8a)。しかしながら、今回の活性測定で用いているアルコール脱水素酵素が熱変性するため 70°C 以上の測定は行えなかった。50°C から 70°C の間で最大活性の 70%以上の活性を示した。酵素溶液を 0, 5, 10, 30, 60, 120, 180 min 様々な温度 (50, 70, 80°C) でインキュベートした後、活性測定を行い CrDTA の熱耐性を調べた。その結果 CrDTA は 50°C, 180 min のインキュベートの後約 90%の残存活性を示し、70°C でのインキュベートによって 5 min 以内に不活化が始まり 60 min で完全に失活した (Fig. 2-8b)。また、80°C でのインキュベートでも 5 min 以内に完全に失活した。

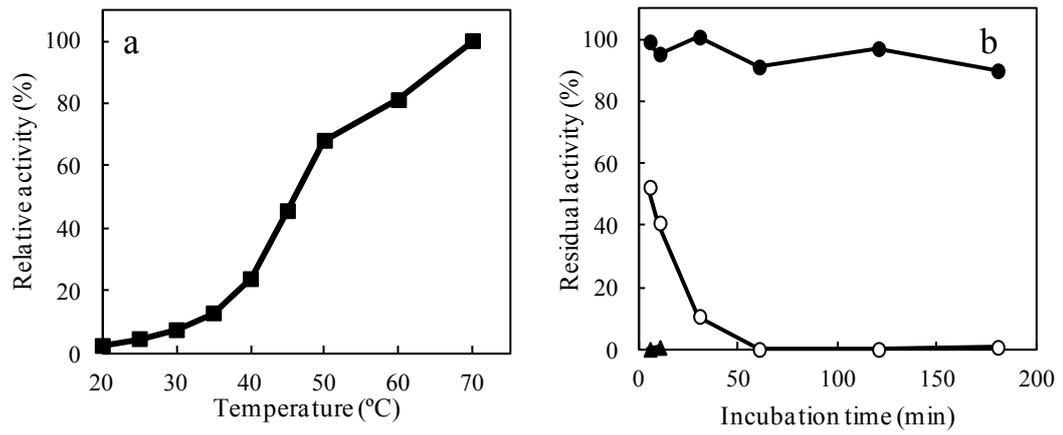


Fig. 2-8. (a) 温度による CrDTA 活性への影響。70°C のときの活性を 100%としたときの相対活性で示した。(b) 50°C (●), 70°C (○)および 80°C (▲)での熱耐性。インキュベーション前の酵素 (100%) と比較し, 残存活性とした。

2.3.4 D-スレオニンアルドラーゼの基質特異性と速度論的パラメータ

CrDTA の基質特異性と速度論的パラメータは Table II-2 に示した。本酵素は D-スレオニン, D-*allo*-スレオニンおよび D-*threo*-フェニルセリンなど, D-セリンをのぞく β -ヒドロキシ-D-アミノ酸に対して活性を示した。試した基質の中で D-*threo*-フェニルセリンが最も良い基質であり, その触媒効率は $35 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であった。しかしながら, D-*threo*-フェニルセリンが 1mM 以上の濃度のとき, 基質阻害が観察された (Fig. 2-9)。一方, L型のセリンやスレオニンでは活性化されなかった。このことより, 本酵素は基質の α 炭素側の立体化学的認識は厳密であり, β 炭素側の立体化学的認識は寛容であると示唆された。しかしながら, D-*allo*-スレオニンを基質としたとき, CrDTA の K_m 値が約 8 倍, k_{cat} 値が約 6 倍 D-スレオニンより高い値を示した。基質特異性を調べられている細菌由来 DTA において両基質における比活性の差は少なく, K_m 値においても最大で 2 倍程度の差であった [5, 12]。これは CrDTA の特徴ある性質であり, いまだ存在が明らかになっていない D-スレオニンまたは D-*allo*-スレオニンに特異的なアルドラーゼの合理的タンパク質工学による設計のターゲットになりうると思われた。

Table II-2. CrDTA 活性の基質特異性と動態パラメータ

Substrate	Relative activity (%)	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($M^{-1} s^{-1}$)
D-Threonine	100	0.31	4.2	1.3×10^4
D- <i>allo</i> -Threonine	406	2.4	25	1.1×10^4
L-Threonine	ND	-	-	-
L- <i>allo</i> -Threonine	ND	-	-	-
D- <i>threo</i> -Phenylserine	1230	0.81	280	35×10^4
D-Serine	ND	-	-	-
L-Serine	ND	-	-	-

ND, not detectable

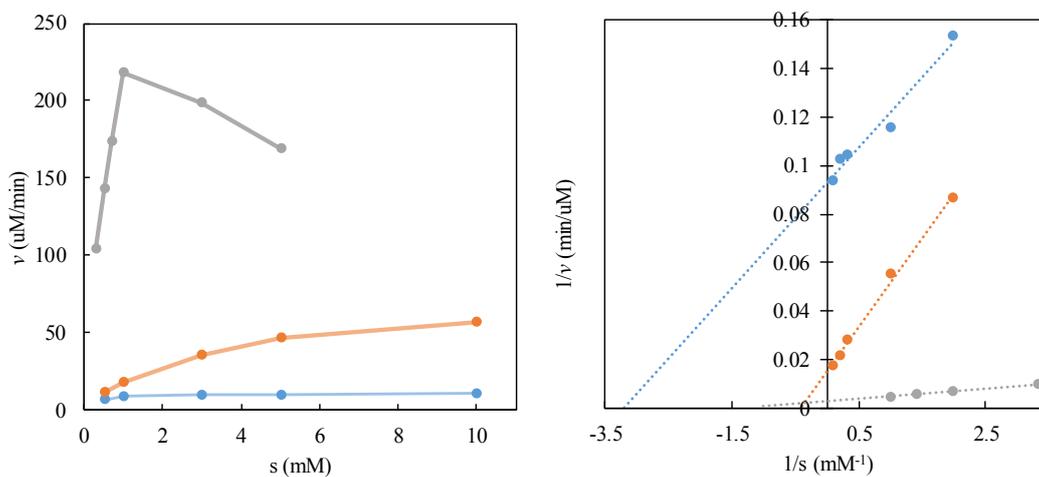


Fig. 2-9. β -ヒドロキシ-D-アミノ酸を基質としたときの CrDTA の s - v 曲線 (左図) とライネウーバー・バークプロット (右図)。基質にはブルー;D-スレオニン, オレンジ;D-*allo*-スレオニン, グレー;D-*threo*-フェニルセリンを用いた。

2.3.5 D-スレオニンアルドラーゼによる D-スレオニンおよび D-allo-スレオニンの合成

CrDTA はグリシンとアセトアルデヒドから D-スレオニンおよび D-allo-スレオニンの合成を触媒する。酵素産物として D-スレオニンおよび D-allo-スレオニンの混合物が得られた (Fig. 2-10)。1 時間のインキュベート後, D-スレオニンおよび D-allo-スレオニンの変換率はそれぞれ 6.7% および 4.6% となり, D-スレオニンのジアステレオマー過剰率は 18% であった。ジアステレオマー過剰率 (%) は,

$$\frac{[\text{D-スレオニン}] - [\text{D-allo-スレオニン}]}{[\text{D-スレオニン}] + [\text{D-allo-スレオニン}]} \times 100$$

で算出した[19]。D-スレオニンおよび D-allo-スレオニン合成における比活性はそれぞれ 50.9 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ および 36.8 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であった。D 型スレオニンの変換率と比活性はそれぞれ 1.46 倍と 1.38 倍と D-スレオニンのほうが D-allo-スレオニンより高く, それらの関係が類似していることを示した。この結果より, 生産物としての D-スレオニンのジアステレオマー過剰は CrDTA の活性の生産物特異性によって引き起こされたと示唆された。このことから, D 型スレオニンの分解反応において基質の β 位の立体構造により動態パラメータが異なる CrDTA は合成反応においても基質の β 位の立体構造によって差が生じると判明した。

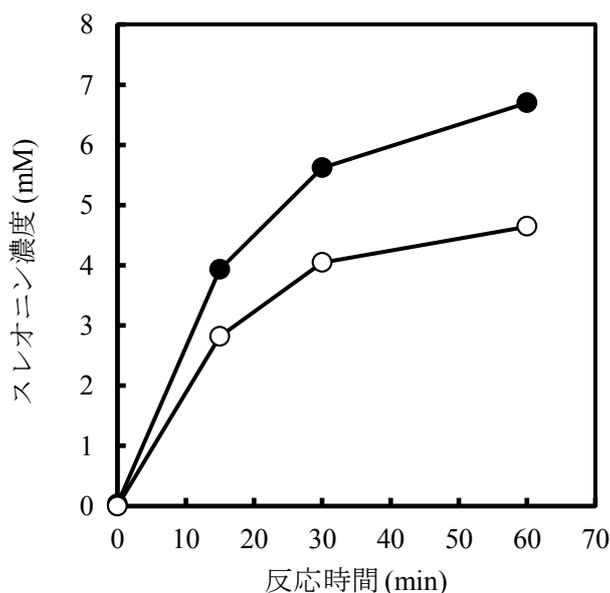


Fig. 2-10. CrDTA を用いた D-スレオニン (●) および D-allo-スレオニン (○) の生産。縦軸は酵素反応液中のスレオニン濃度とした。

2.3.6 様々な化合物による D-スレオニンアルドラーゼ活性への影響

DTA は一般に二価の金属イオンに依存するので、CrDTA 活性の各金属イオンの依存性を調べた。CrDTA 活性は $MnCl_2$, $CoCl_2$, $NiCl_2$ および $MgCl_2$ によって活性化したが、 $CaCl_2$, $CuCl_2$, および $ZnCl_2$ によって強く阻害された (Table II-3)。加えて、金属酵素阻害剤 (EDTA およびシアン化ナトリウム) は酵素活性を強く阻害した。それらの結果は CrDTA が補因子として一部の二価の金属イオンを要求することを示している。CrDTA 活性の金属依存性は *Arthrobacter* sp. DK-38 由来 DTA 活性の金属依存性とよく一致した[2]。活性を阻害した亜鉛イオンはタンパク質中、例えば真核生物由来 D-セリンデヒドラターゼで 5 配位をとり[20]、銅イオンは歪んだ 8 面体構造 (6 配位) をとる。それ故、この酵素は正 8 面体 (6 配位) をとる二価の金属イオンによって活性化され、CrDTA の活性部位に金属イオンを厳密に認識する残基が存在することが明らかになった。金属酵素阻害剤の 8-ヒドロキシキノリンは酵素反応に影響を与えなかった。2 塩基性で金属イオンへキレートする 8-ヒドロキシキノリン (Fig. 2-11) の金属イオンへの侵入は金属へ配位している CrDTA の金属結合部位によって立体障害を起こすため妨げられたと考えられる。

Table II-3. 様々な化合物による D-スレオニンアルドラーゼ活性への影響

Compounds	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None ^a		40.8
MnCl ₂ ^a	0.1	100
CoCl ₂ ^a	0.1	87.5
NiCl ₂ ^a	0.1	83.6
MgCl ₂ ^a	0.1	75.7
CaCl ₂ ^a	0.1	13.3
CuCl ₂ ^a	0.1	0
ZnCl ₂ ^a	0.1	0
Hydroxylamine ^b	1	5.2
Iodoacetate ^b	1	89.2
<i>p</i> -Chloromercuribenzoic acid ^b	1	93.2
8-Hydroxyquinoline ^b	1	105
EDTA ^b	1	0
Sodium cyanide ^b	1	12.7

^a MnCl₂を除いた標準酵素反応溶液を用いて酵素活性への金属塩の影響を調べた。

^b MnCl₂を含んでいる標準酵素反応溶液で阻害剤の影響を調べた。

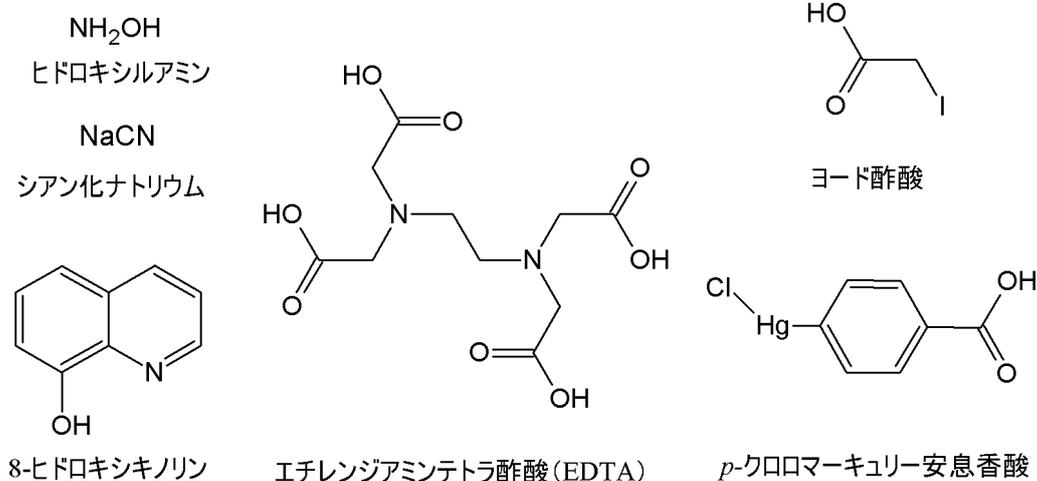


Fig. 2-11. 使用した阻害剤の構造式

CrDTA は PLP 酵素阻害剤として知られているヒドロキシルアミンによっても酵素反応は強く阻害された。さらに酵素溶液 (pH 8.0) の UV-VIS スペクトルを測定したところ, CrDTA の極大吸収波長は波長 280 nm および 416 nm であった (Fig. 2-12)。遊離型の PLP の極大吸収波長は 388 nm であり [21, 22], 280 nm の極大吸収波長はタンパク質由来である。活性部位のリジン残基とアルジミンを形成した酵素—PLP 複合体 (内部アルジミン) は一般に 418 nm 付近にメジャーな極大吸収を, 330 nm にマイナーな極大吸収を示す [23]。内部アルジミン固有の極大吸収波長は PLP との相互作用する残基によって前後する。それ故, CrDTA の 416 nm の吸収極大は CrDTA が PLP と内部アルジミン構造を形成していることを示唆した。それらの結果は CrDTA が PLP 酵素であることを強く示唆した。

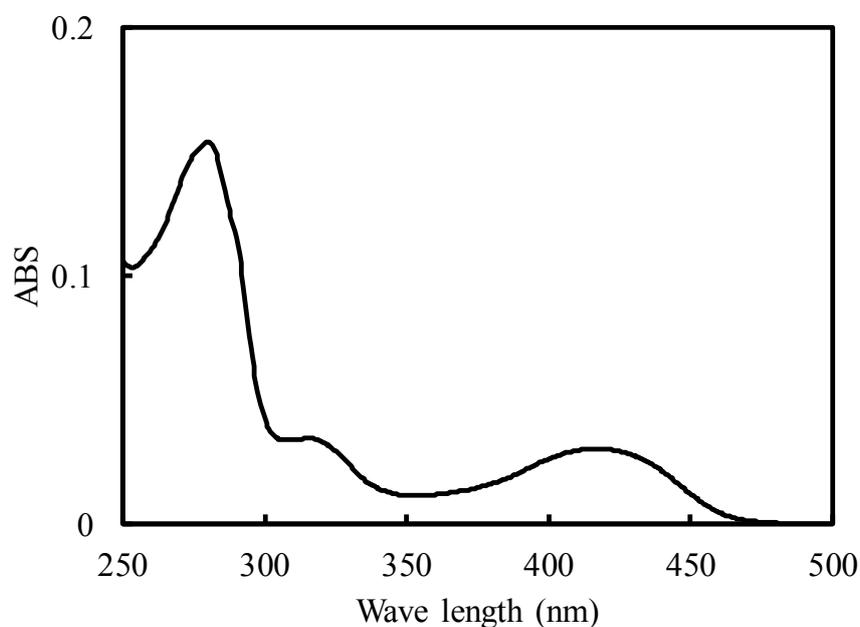


Fig. 2-12. CrDTA の UV-VIS スペクトル。90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の CrDTA, 50 mM HEPES-NaOH (pH 8.0) を測定溶液として用いた。

SH 試薬であるヨード酢酸および *p*-クロロマーキュリー安息香酸は酵素反応に影響を与えなかった。細菌由来 DTA では本研究で用いた SH 試薬によって強く阻害される[13]。SH 試薬は活性部位付近のシステイン残基へ結合することで阻害されるので、細菌由来 DTA の活性部位の近傍にシステイン残基が存在し、CrDTA ではシステイン残基が保存されていないということが考えられた。それぞれの DTA のアミノ酸配列を比較したところ、*Arthrobacter* sp. DK-38 由来 DTA のシステイン 303 残基が CrDTA ではセリン残基（329 番）が対応していた（Fig. 2-13）。*Arthrobacter* sp. DK-38 由来 DTA のアミノ酸配列は結晶構造が明らかになっている *A. xylosoxidans* 由来 DTA と約 90% と酷似しており、その 303 番残基は *A. xylosoxidans* 由来 DTA で活性部位近傍に位置していた。これらの知見から、細菌由来 DTA は活性部位近傍に位置するシステイン 303 番残基によって SH 試薬の影響を受け、システイン残基を保存していない CrDTA では阻害効果を受けないと予想された。また、酵素反応において DTA の活性部位近傍のシステイン 303 番残基は DTA 活性の有無に影響を与えないと唆された。システイン残基は求核剤として作用しやすく反応性が高いので、CrDTA が細菌由来 DTA より安定性が増加したと言える。

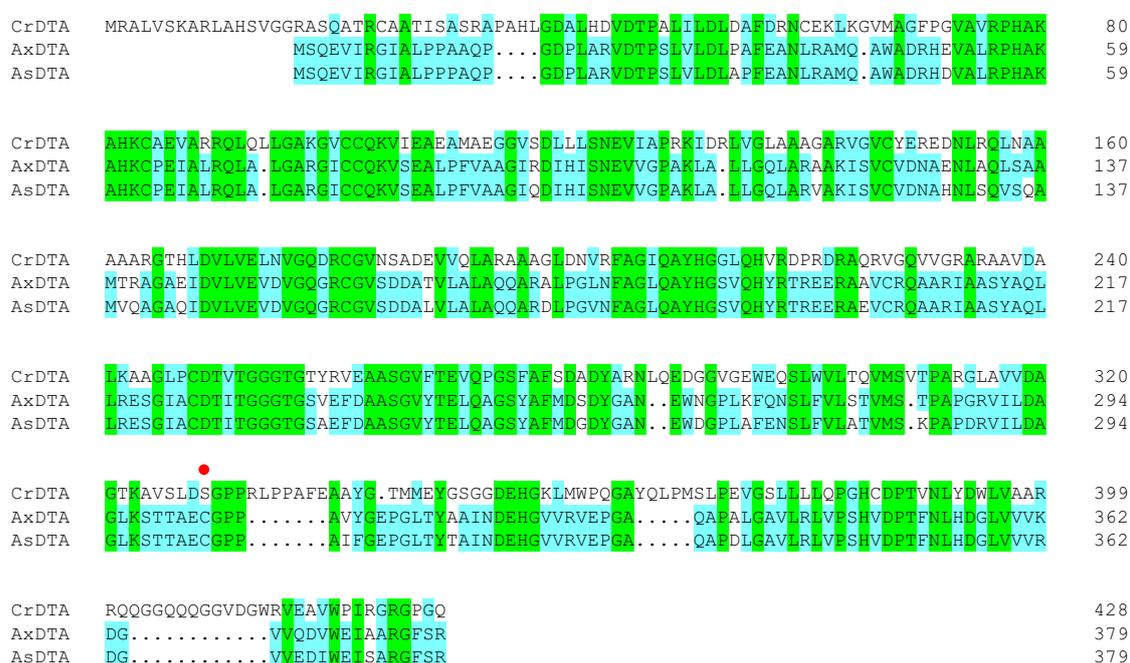


Fig. 2-13. DTA のアミノ酸配列アライメント。CrDTA; *C. reinhardtii* 由来 DTA, AxDTA; *Alcaligenes xylosoxidans* 由来 DTA, AsDTA; *Arthrobacter* sp. 由来。緑は 3 種、青は 2 種の生物でアミノ酸残基が保存されていることを示した。赤丸は 329 番残基（細菌由来 DTA では 303 番）を示した。

2.3.7 *Chlamydomonas reinhardtii* の無細胞抽出液における D-スレオニンアルドラーゼ活性

C. reinhardtii は D-スレオニンを添加した場合でも生育への悪影響は観察されなかった。TAP および TAP+D-Thr 培地で培養した *C. reinhardtii* から無細胞抽出液を調製した。得られた無細胞抽出液を DTA 活性測定した。その結果, *C. reinhardtii* 細胞中に DTA 活性を検出した (Fig. 2-14)。さらに, TAP+D-Thr 培地で培養した *C. reinhardtii* 細胞から TAP 培地で培養した細胞より高い DTA 活性を検出した。これらの結果より, *C. reinhardtii* は CrDTA を発現し, D-スレオニンの添加によってその発現が誘導されると示唆された。

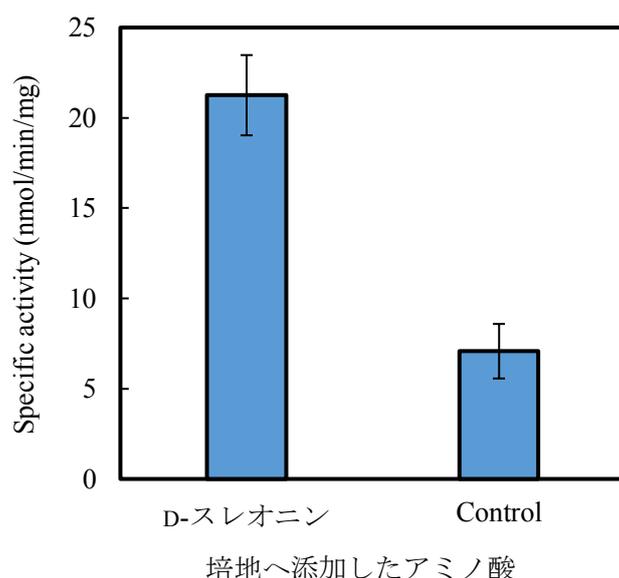


Fig. 2-14. 培地へ添加したアミノ酸による *C. reinhardtii* 無細胞抽出液中の DTA 活性への影響 ($n=3$)。Control は TAP 培地での DTA 活性を示した。

C. reinhardtii 細胞中に CrDTA タンパク質が発現しているかどうかを確認するために, ウェスタンブロット法によって調べた。その結果, *C. reinhardtii* の無細胞抽出液から硫酸アンモニウム分画および DEAE-Sephrose カラムクロマトグラフィーによって得られた粗精製酵素画分においてシグナルが検出された (Fig. 2-15)。そのタンパク質バンドは約 45 kDa に位置し, 組換え CrDTA の泳動距離と一致した。この結果より, *C. reinhardtii* 細胞内で発現している DTA 活性を示すタンパク質は *dta* 遺伝子産物と一致することがわかった。

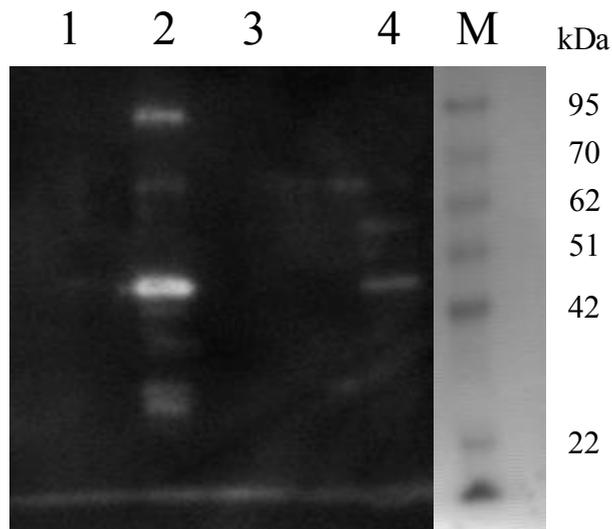


Fig. 2-15. 抗 CrDTA 抗体を用いて検出したウェスタンブロット画像。レーン 1; ネガティブコントロール(酵母無細胞抽出液), レーン 2; ポジティブコントロール(精製組換え CrDTA), レーン 3; *C. reinhardtii* 無細胞抽出液, レーン 4; 粗精製酵素画分, レーン M; タンパク質マーカー。抗 CrDTA ウサギ抗体を一次抗体, 西洋ワサビペルオキシダーゼ結合型抗ウサギヤギ抗体を二次抗体とした。

2.4 まとめ

本研究により, 真核生物由来 DTA の存在が明らかとなり, その酵素学的諸性質が調べられた。CrDTA は細菌由来 DTA と同じく PLP 酵素であり, 二価の金属イオンを要求した。一方, D-スレオニンおよび D-*allo*-スレオニンを基質としたとき $K_m \cdot k_{cat}$ 値に大きな差が生まれること, スレオニンの合成活性に差が生まれること, SH 試薬の影響を受けないこと, アミノ酸配列が大きく異なることなど細菌由来 DTA と異なる性質を持つことが明らかになった。

参考文献

- [1] Liu, J. Q., Dairi, T., Itoh, N., Kataoka, M., Shimizu, S., Yamada, H. (2000) Diversity of microbial threonine aldolases and their application. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.*, **10**, 107–115.
- [2] Franz, A. E., Stewart, J. D. (2014) Threonine aldolases. *Adv. Appl. Microbiol.*, **88**, 58–101.
- [3] Dückers, N., Baer, K., Simon, S., Gröger, H., Hummel, W. (2010) Threonine aldolases—screening, properties and applications in the synthesis of non-proteinogenic β -hydroxy- α -amino acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **88**, 409–424.
- [4] Liu, J. Q., Odani, M., Dairi, T., Itoh, N., Shimizu, S., Yamada, H. (1999) A new route to L-threo-3-[4-(methylthio)phenylserine], a key intermediate for the synthesis of antibiotics: recombinant low-specificity D-threonine aldolase-catalyzed stereospecific resolution. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 586–591.
- [5] Liu, J. Q., Odani, M., Yasuoka, T., Dairi, T., Itoh, N., Kataoka, M., Shimizu, S., Yamada, H. (2000) Gene cloning and overproduction of low-specificity D-threonine aldolase from *Alcaligenes xylooxidans* and its application for production of a key intermediate for parkinsonism drug. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54**, 44–51.
- [6] Goldberg, S. L., Goswami, A., Guo, Z., Chan, Y., Lo, E. T., Lee, A., Truc, V. C., Natalie, K. J., Hang, C., Rossano, L. T., Schmidt, M. A. (2015) Preparation of β -hydroxy- α -amino acid using recombinant D-threonine aldolase. *Org. Process Res. Dev.*, **19**, 1308–1316.
- [7] Fesko, K., Uhl, M., Steinreiber, J., Gruber, K., Griengl, H. (2010) Biocatalytic Access to α , α -dialkyl- α -amino acids by a mechanism-based approach. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 121–124.
- [8] Fesko, K., Strohmeier, G. A., Breinbauer, R. (2015) Expanding the threonine aldolase toolbox for the asymmetric synthesis of tertiary α -amino acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99**, 9651-9661.
- [9] Liu, G., Zhang, M., Chen, X., Zhang, W., Ding, W., Zhang, Q. (2015) Evolution of threonine aldolases, a diverse family involved in the second pathway of glycine biosynthesis. *J. Mol. Evol.*, **80**, 102-107.
- [10] Liu, J. Q., Dairi, T., Itoh, N., Kataoka, M., Shimizu, S. and Yamada, H. (1998) Gene cloning, biochemical characterization and physiological role of a thermostable low-specificity L-threonine aldolase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **255**, 220–226
- [11] McNeil, J. B., McIntosh, E. M, Taylor, B.V., Zhang, F., Tangs, S., Bognar, A. L. (1994) Cloning and molecular characterization of three genes, including two genes encoding serine hydroxymethyltransferases, whose inactivation is required to render yeast auxotrophic for Glycine. *J. Biol. Chem.*, **269**, 9155-9165.
- [12] Liu, J. Q., Dairi, T., Itoh, N., Kataoka, M., Shimizu, S., Yamada, H. (1998) A novel metal-activated pyridoxal enzyme with a unique primary structure, low specificity D-threonine aldolase from *Arthrobacter* sp. strain DK-38. *J. Biol. Chem.*, **273**, 16678-16685.
- [13] Kataoka, M., Ikemi, M., Morikawa, T., Miyoshi T., Nishi K., Wada, M., Yamada, H., Shimizu, S.

- (1997) Isolation and characterization of D-threonine aldolase, a pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme from *Arthrobacter* sp. DK-38. *Eur. J. Biochem.*, **248**, 385-393.
- [14] Nishimura, K., Tomoda, Y., Nakamoto, Y., Kawada, T., Ishii, Y., Nagata, Y. (2007) Alanine racemase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Amino acids*, **32**, 59-62.
- [15] Chlamydomonas Resource Center, <http://www.chlamycollection.org/>
- [16] 松村 正實 (1997) ラボマニュアル遺伝子工学, 146-147.
- [17] Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- [18] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410.
- [19] Walsh, P. J. and Kozlowski, M. C. (2008) Fundamentals of Asymmetric Catalysis.
- [20] 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.
- [21] Harris, C. M., Johnson, R. J. and Metzler, D. E. (1976) BAND-SHAPE ANALYSIS AND RESOLUTION OF ELECTRONIC SPECTRA OF PYRIDOXAL PHOSPHATE AND OTHER 3-HYDROXYPYRIDINE-4-ALDEHYDES. *Biochimica et Biophysica Acta*, **421**, 181-194.
- [22] Goldberg, J. M., Zheng, J., Deng, H., Yong Q. Chen, Y. Q., Callender, R. and Kirsch, J. F. (1993) Structure of the Complex between Pyridoxal 5'-Phosphate and the Tyrosine 225 to Phenylalanine Mutant of *Escherichia coli* Aspartate Aminotransferase Determined by Isotope-Edited Classical Raman Difference Spectroscopy. *Biochemistry*, **32**, 8092-8097
- [23] di Salvo, M. L., Florio, R., Paiardini, A., Vivoli, M., D'Aguanno, S. and Contestabile, R. (2013) Alanine racemase from *Tolypocladium inflatum*: A key PLP-dependent enzyme in cyclosporin biosynthesis and a model of catalytic promiscuity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **529**, 55-65

第三章

緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来 D-スレオニンアルドラーゼの結晶化と X 線解析

3.1 序論

スレオニンは 2 つの不斉炭素を含むので 4 つの立体異性体 (L-, L-*allo*-, D-, D-*allo*-スレオニン) が存在する。いくつかの β -ヒドロキシ- α -アミノ酸 (例: スレオニン) およびグリシンと対応するアルデヒド (例: アセトアルデヒド) の相互変換は TAs によって触媒される [1]。スレオニンアルドラーゼは基質の α 位の立体選択性により L または D 型酵素のどちらかへ分類される。さらに, L 型のスレオニンアルドラーゼは基質の β 位の立体選択性によって 3 つのタイプ (L-スレオニン特異的な酵素, L-*allo*-スレオニン特異的な酵素および L-スレオニンと L-*allo*-スレオニンの両方を基質とする酵素) へ分類される [2]。一方 D 型酵素の場合, D-スレオニンと D-*allo*-スレオニンの両方を基質とする酵素である DTA が報告されている [3]。

DTA の酵素学的諸性質は原核生物であるグラム陽性細菌 *Arthrobacter* sp. およびグラム陰性細菌 *A. xylosoxidans* と真核生物である緑藻 *C. reinhardtii* で研究され, 例えばいくつかの二価の金属イオンや PLP を要求することが明らかになっている [4, 5, 6]。 *Arthrobacter* sp. DK-38 由来 DTA の酵素反応は SH 試薬によって大きく阻害されるので, 酵素の活性部位にシステイン残基が存在すると示唆された。しかしながら, CrDTA では SH 試薬の影響を受けなかった。また, 細菌由来 DTA では D-および D-*allo*-スレオニンを基質として用いたときの比活性の差は僅かであったにもかかわらず, CrDTA では D-*allo*-スレオニンを基質として用いたときのターンオーバー数は D-スレオニンをを用いたときより 6 倍高かった [7, 8]。さらに, CrDTA と細菌由来 DTA のアミノ酸配列同一性は比較的低い値を示した。それらの結果は DTA の触媒反応にかかわる部位が CrDTA と細菌由来 DTA で異なると示唆した。CrDTA の構造情報は合理的タンパク質工学を用いた D-または D-*allo*-スレオニンに対して厳密な立体選択性をもつ酵素のデザインの一助になると考えられる。

細菌由来 DTA の結晶構造は 2015 年に報告された。その報告によって触媒反応に関係する金属の結合部位が同定され, そしてそれは DTA 活性において二価の金属イオンが必要であるとされた今までの知見と一致した (PDB エントリー: 4V15) [9]。しかしながら, DTA の現在の限られた構造情報だけでは細菌由来および真核生物由来 DTA の違いや立体選択性をもつ D-または D-*allo*-スレオニンアルドラーゼの開発は難しく, さらなる DTA の結晶構造の情報がその問題を解決するために必要である。本研究では CrDTA の構造解析のための重要な段階である酵素の発現, 精製, 結晶化およびその予備的な X 線解析を報告する。

3.2 材料と方法

3.2.1 D-スレオニンアルドラーゼの遺伝子発現

リコンビナントベクターpCrDTA (2.2.5 項) を *E. coli* BL21 (DE3) コンピテントセル内へ導入した。25 mg/mL カナマイシンを添加した LB 寒天培地によってシングルコロニーを選択し、その細胞を 25 mg/mL カナマイシンを添加した LB 培地中で 298 K, 16 時間培養した。その後、菌体を遠心分離 (8000 g, 10 min) によって回収し、精製を開始するまで 193 K で保存した。詳しい酵素生産のためのクローニング条件を Table III-1 に記載した。

Table III-1. 酵素生産法

Source organism	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> NIES-2237
DNA source	Synthetic (codon-optimized DNA for <i>Escherichia coli</i> expression)
Forward primer	None
Reverse primer	None
Cloning vector	pUC57
Expression vector	pET-41b(+)
Expression host	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)
Complete amino acid sequence	MRALVSKARLAHSVGGRASQATRC AAT I SASRAPAHLGDALH- DVDTPALILDLDAFDRNCEK LKGVMAGFPGVAVRPHAKAH- KCAEVARRQLQLLGAKGVCCQKVI EAEAMAEGGVSDLLLS- NEVIAPRKIDRLVGLAAAGARVGV CYEREDNLRQLNAAAA- ARGTHLDVLEVELNVGQDRCGVNSADEVVQLARAAAGLDNV- RFAGIQAYHGGLQHVRDPRDRAQRVGVVGRARA AVDALK- AAGLPCDVTVTGGGTGT YRVEAASGVFTEVQPGSF AFS DAD- YARNLQEDGGVGEWEQSLWVLTQVMSVTPARGLAVVDAGT- KAVSLDSGPPRLPPAFEAAYGTMMEY GSGGDEHGKLMWPQ- GAYQLPMSLPEVGSLLLLLQPGHCDPTVNL YDWLVAARRQQ- GGQQGGVDGWRVEAVWPIRGRGPQ

3.2.2 D-スレオニンアルドラーゼの精製

回収した CrDTA を発現する大腸菌 (80.6 g) を 50 μ M PLP および 1 mM フッ化フェニルメチルスルホニルを含む 100 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.0) で懸濁し, 80 W, 80 サイクル (30 s 破碎, 30 s 冷却) という条件で超音波破碎した。その後遠心分離によって無細胞抽出液を得た。無細胞抽出液を硫酸アンモニウム分画し, その 25-60%飽和画分を次の操作に用いた。得られた画分を 20 μ M PLP を含む 100 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.0) で懸濁し, 20 μ M PLP を含む 100 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.0) に対して透析した。得られた溶液は遠心分離とフィルターろ過によって微粒子を取り除き 20 μ M PLP を含む 100 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.0) で平衡化した HiTrap DEAE FF カラムへ供試した。0-500 mM NaCl を用いた直線的な濃度勾配によって活性画分を溶出した。溶出画分の酵素活性を酵母由来のアルコール脱水素酵素とのカップリング法 (2.2.3 項) を用いて測定した。DTA 活性画分は回収され SDS-PAGE によって解析された。回収した精製酵素を 20 μ M PLP および 100 μ M MnCl₂ を含む 20 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.0) に対して透析した。その後精製酵素は限外ろ過によって 5-15 mg/mL のタンパク質濃度になるまで濃縮された。得られた濃縮液を結晶化のサンプルとした。タンパク質濃度は Bradford 法によって決定された[10]。

3.2.3 結晶化

結晶化実験は 295 K でハンギングドロップ蒸気拡散法によって行われた (Fig. 3-1)。金属塩やアルコールなどの添加剤や結晶化剤を含むリザーバー溶液をサンプルカップへ 100 μ L, 撥水処理されたカバーガラス上へ 2 μ L 加えた。カバーガラス上のリザーバー溶液, 結晶化サンプル (3.2.2 項) および添加剤 (競合阻害剤等) を混合しドロップ溶液 (4-6 μ L) を作製した。ドロップ溶液が乗っているカバーガラスを反転させ, フチに真空グリースを塗ったサンプルカップと合わせサンプルカップ内のリザーバーとドロップ溶液を密封する。サンプルカップ内の溶液, 特にドロップ溶液の水分子は設置温度における水の蒸気圧が平衡に達するまで徐々に蒸発する。その結果ドロップ溶液内の結晶化剤濃度は徐々に高くなり, タンパク質の沈殿形成が促進される。その沈殿形成が緩やかに促進されたとき, 規則正しくタンパク質分子が並ぶ場合があり, その結果タンパク質結晶を形成する[11]。

結晶化条件の初期スクリーニングのため, リザーバー溶液としてハンプトンリサーチ社の結晶化スクリーニングキット (Crystal Screen, Crystal Screen 2, PEG/Ion) およびポリエチレングリコール (PEG) 1540 を沈殿剤となるよう改変した PEG/Ion キットを使用した。さらなる結晶化条件最適化のため, リザーバー溶液中の結晶化剤の濃度, バッファーの種類・pH および様々なアルコールの添加を検討した。また, 酵素の基質アナログ (DL-2,3-ジアミノプロピオン酸等) をドロップ溶液へ加えることで, 酵素-基質複合体の共結晶化を試みた。

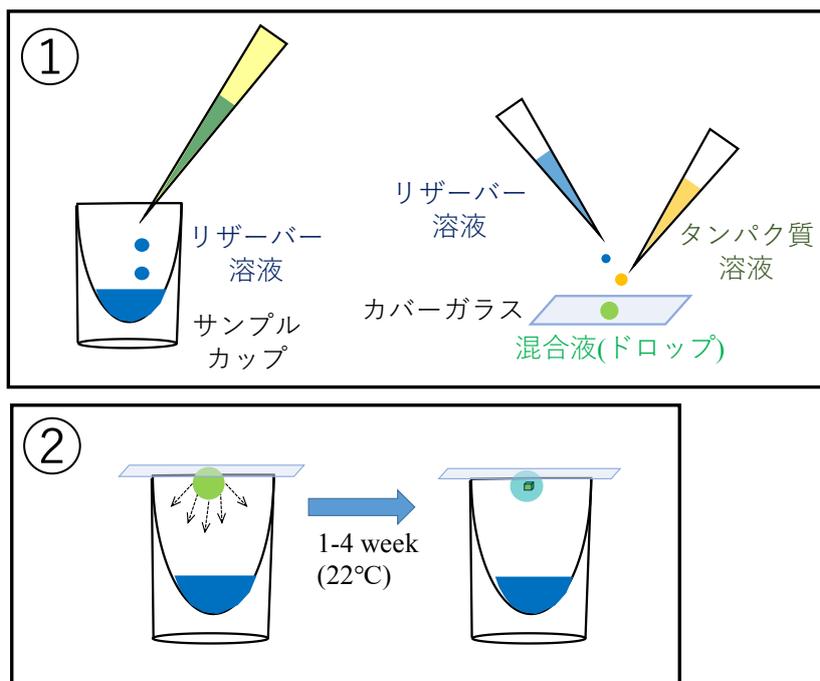


Fig. 3-1. ハンギングドロップ蒸気拡散法

3.2.4 データ収集・処理

高エネルギー加速器研究機構のフォトンファクトリーアドバンスドリング (PF-AR) の NW-12A ビームラインにおいて波長 1.00000 Å の X 線を結晶へ照射することで X 線回折像を収集した。検出器 ADSC Quantum 210r CCD を用いた。結晶と検出器の距離は 214 mm で、回折像 1 枚につき 1 s の露光時間で結晶の向きは 0-135°の間を 0.25°角で回転させながら計 540 枚の回折像を収集した。回折データをプログラム XDS [12]および CCP4 パッケージ[13]内のプログラム POINTLESS [14], および SCALA [15]を用いて処理した。

3.3 結果と考察

大腸菌内で発現した組換え CrDTA を硫酸アンモニウム分画と DEAE-Sepharose カラムクロマトグラフィーによって均一に精製した。DEAE-Sepharose カラムクロマトグラフィーにおいて 100 から 300 mM NaCl によって CrDTA を溶出した。DTA 活性の溶出ピークは 187 mM 付近で検出された。タンパク質の収量は 1.8 mg/L (タンパク質量/培養液量) であった。クマシーブリリアントブルーで染色した SDS-PAGE 解析において約 45 kDa の単一バンドを検出した、それは組換え CrDTA のアミノ酸配列より計算した単量体の分子質量と一致した (Fig. 3-2)。

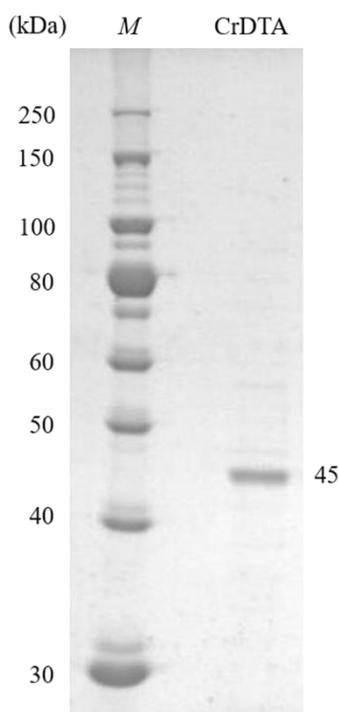


Fig. 3-2. 組換え CrDTA の精製後の SDS-PAGE。精製タンパク質 (0.6 μ g) は 10%ゲルで解析された。レーン M は分子質量マーカーとした。ゲルはクマシーブリリアントブルーで可視化された。

初期結晶化スクリーニングの結果、リザーバー溶液として PEG 4000 とイソプロパノールを用いたとき、プレート状の結晶クラスターが観察された (Fig. 3-3)。X 線解析のため単一な結晶生産のためその条件を最適化した。また、基質-酵素複合体結晶を得るため、DTA の基質アナログをドロップ溶液へ添加した。その予備試験として、CrDTA 活性に対する様々な基質アナログの阻害効果を調べた (Fig. 3-4)。その結果、DTA 活性への阻害効果が高かった DL-2,3 ジアミノプロピオン酸, *o*-ホスホ-DL-スレオニン, D-セリンおよび 3-ヒドロキシ-3-フェニルプロピオン酸を添加剤として結晶化に用いた。試した添加剤の中で、DL-2,3 ジアミノプロピオン酸および *o*-ホスホ-DL-スレオニンを用いたとき結晶形成が観察され、添加剤なしの条件より品質の良い結晶が得られた。DL-2,3 ジアミノプロピオン酸および *o*-ホスホ-DL-スレオニンを用いて得た結晶を X 線回折実験に適用した。その結果、*o*-ホスホ-DL-スレオニンを使用した結晶は解析困難な双晶状態であると観察された。最終的に、24% (w/v) PEG 1540, 20% (v/v) 2-メチル-2,4-ペンタンジオール (MPD) および 0.2 M Mg(NO₃)₂ を含むリザーバー溶液と DL-2,3 ジアミノプロピオン酸を添加剤として用いた結晶化条件において、X 線回折試験に適する単一な棒状結晶を得た (Fig. 3-5)。詳細な結晶化条件については Table III-2 にまとめた。

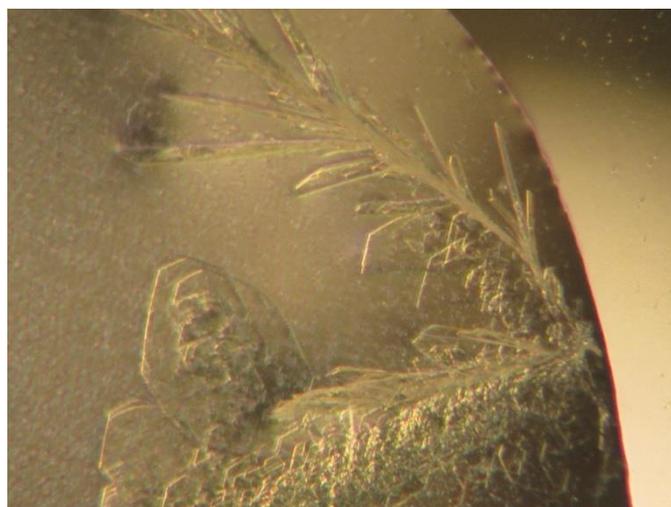


Fig. 3-3. 結晶化条件スクリーニング中に観察された CrDTA 結晶クラスター。

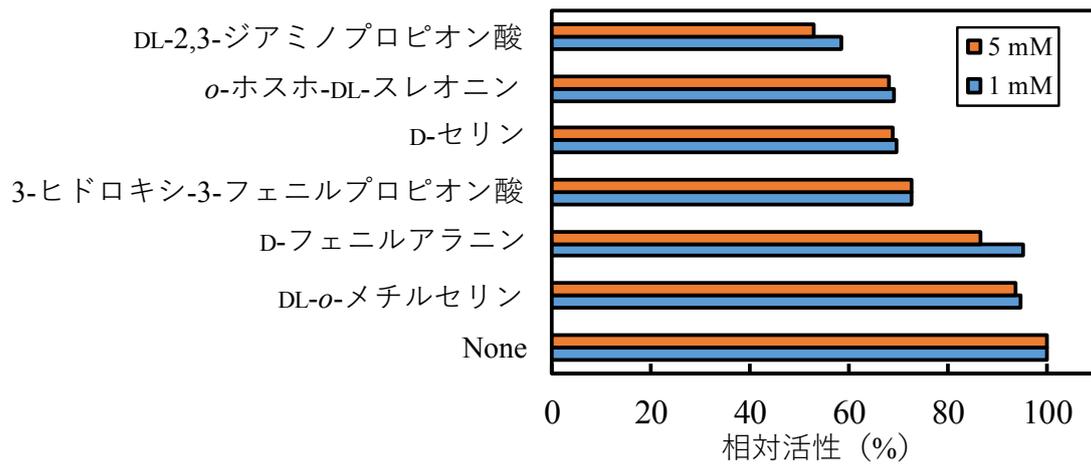


Fig. 3-4. 競合阻害剤による CrDTA 活性への影響。基質として 5 mM D-スレオニンを用いた。オレンジが 5 mM, シアンが 1 mM 阻害剤存在下での相対活性。阻害剤なし (None) を 100% とした。

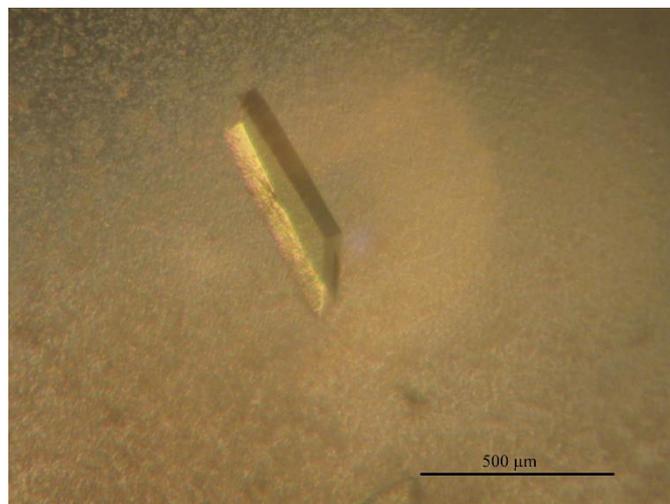


Fig. 3-5. CrDTA の棒状結晶。スケールバー; 500 μm

Table III-2. CrDTA の結晶化条件

Method	Hanging drop vapor diffusion
Plate type	24-well plates
Temperature (K)	295
Protein concentration (mg mL ⁻¹)	7.8
Buffer composition of protein solution	20 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 μM PLP, and 100 μM MnCl ₂
Composition of reservoir solution	24% PEG 1540, 20% 2-methyl-2,4-pentanediol and 0.2 M Mg (NO ₃) ₂
Additive solution	50 mM DL-2,3-diaminopropionic acid
Volume and ratio of drop	5 μL (2:2:1, protein: reservoir: additive solution)
Volume of reservoir (μL)	100

CrDTA 結晶は X 線回折試験され、分解能 1.85 Å の回折像が得られた (Fig. 3-6)。回折データの収集や処理データの統計に関する情報は Table III-3 に記載した。回折パターンの解析によりこの結晶は空間群 *P1* に属し、単位胞のパラメータは長さが $a=64.79$, $b=74.10$, $c=77.07$ Å で角度が $\alpha=77.07$, $\beta=69.34$, $\gamma=71.93$ °であると算出された。4 分子の CrDTA が非対称ユニットを形成すると仮定され、単位胞体積と非対称ユニットの質量の関係をしめす Matthews 係数[16]は $2.12 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ で溶媒容量は 41.9%であった。

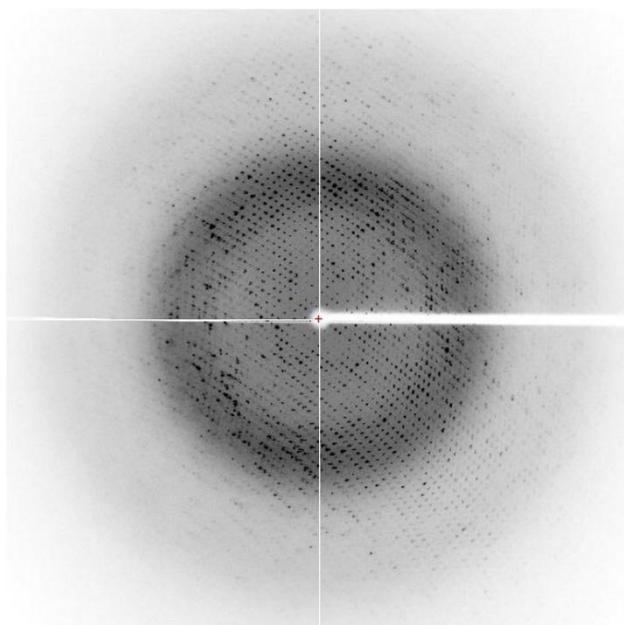


Fig. 3-6. CrDTA 結晶の X 線回折像

Table III-3. 回折データ収集および処理。

Diffraction source	NW-12A, KEK PF-AR
Wavelength (Å)	1.00000
Temperature (K)	95.000
Detector	ADSC Quantum 210r
Crystal-to-detector distance (mm)	214
Rotation range per image (°)	0.25
Total rotation range (°)	135
Exposure time per image (s)	1
Space group	<i>P</i> 1
Unit cell parameters (Å, °)	$a = 64.79, b = 74.10, c = 89.94,$ $\alpha = 77.07, \beta = 69.34, \gamma = 71.93$
Mosaicity (°)	0.43
Resolution range (Å)	42.28–1.85 (1.95–1.85)
Total no. of reflections	181300
No. of unique reflections	111548
Completeness (%)	88.6 (91.3)
Multiplicity	1.6 (1.6)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	9.2 (3.0)
$R_{r.i.m}$	0.062 (0.201)
Overall B factor from Wilson plot (Å ²)	20.0

括弧内は最も分解能が高い回折スポット（最外殻）についての統計値をしめす。

CrDTA の構造は CrDTA との配列相同性が 40%である *A. xylooxidans* 由来 DTA の結晶構造 (PDB エントリー: 4V15) をサーチモデルとしてプログラム MOLREP [17]を用いた分子置換法により解かれた。その結果は良好で、第一回目の rigid body モードの精密化のあと R_{factor} は 49.36%だった。さらに、CrDTA 結晶は非対称ユニットのうち2つのホモダイマーを含むと観察された。CrDTA の精製酵素の分子質量はゲルろ過クロマトグラフィーによって約 60 kDa と決定された (2.3.2 項)。それは CrDTA が液中でモノマーとダイマーの平衡状態で存在することを示唆している。*A. xylooxidans* および *Arthrobacter* sp. 由来 DTA はモノマーで活性をしめすと報告されたが[4, 8], その後結晶構造解析された *A. xylooxidans* 由来 DTA ではダイマー構造で安定であると解析された[9]。今回の CrDTA 分子の会合に関する知見は細菌由来 DTA のそれと類似する傾向を示した。

3.4 まとめ

本研究により CrDTA の構造解析のための結晶化条件が明らかにされ、CrDTA の結晶が得られた。CrDTA 結晶は X 線回折に適用され、その回折データは構造解析に適した品質を保持していた。CrDTA 結晶の回折データは分解能 1.85 Å で処理され、結晶格子の単位胞は空間群 $P1$ に属し、そのパラメータは $a = 64.79$, $b = 74.10$, $c = 77.07$ Å, $\alpha = 77.07$, $\beta = 69.34$, $\gamma = 71.93^\circ$ であると算出された。また、単位胞内の非対称ユニットは 4 分子で、2 つのホモダイマー構造が観察された。

参考文献

- [1] Liu, J. Q., Dairi, T., Itoh, N., Kataoka, M., Shimizu, S. and Yamada, H. (2000) Diversity of microbial threonine aldolases and their application. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **10**, 107–115.
- [2] Dücker, N., Baer, K., Simon, S., Gröger, H. and Hummel, W. (2010) Threonine aldolases—screening, properties and applications in the synthesis of non-proteinogenic β -hydroxy- α -amino acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88**, 409–424.
- [3] Fesko, K. (2016) Threonine aldolases: perspectives in engineering and screening the enzymes with enhanced substrate and stereo specificities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 2579–2590.
- [4] Kataoka, M., Ikemi, M., Morikawa, T., Miyoshi T., Nishi K., Wada, M., Yamada, H. and Shimizu, S. (1997) Isolation and characterization of D-threonine aldolase, a pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme from *Arthrobacter* sp. DK-38. *Eur. J. Biochem.*, **248**, 385–393.
- [5] Goldberg, S. L., Goswami, A., Guo, Z., Chan, Y., Lo, E. T., Lee, A., Truc, V. C., Natalie, K. J., Hang, C., Rossano, L. T. and Schmidt, M. A. (2015) Preparation of β -hydroxy- α -amino Acid Using Recombinant D-Threonine Aldolase. *Org. Process Res. Dev.*, **19**, 1308–1316.
- [6] Hirato, Y., Tokuhisa, M., Tanigawa, M., Ashida, H., Tanaka, H. and Nishimura, K. (2016) Cloning and characterization of D-threonine aldolase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry*, In press.
- [7] Liu, J. Q., Dairi, T., Itoh, N., Kataoka, M., Shimizu, S. and Yamada, H. (1998) A Novel Metal-activated Pyridoxal Enzyme with a Unique Primary Structure, Low Specificity D-Threonine Aldolase from *Arthrobacter* sp. Strain DK-38. *J. Biol. Chem.*, **273**, 16678–16685.
- [8] Liu, J. Q., Odani, M., Yasuoka, T., Dairi, T., Itoh, N., Kataoka, M., Shimizu, S. and Yamada, H. (2000) Gene cloning and overproduction of low-specificity D-threonine aldolase from *Alcaligenes xylosoxidans* and its application for production of a key intermediate for parkinsonism drug. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54**, 44–51.
- [9] Uhl, K. K., Oberdorfer, G., Steinkellner, G., Berket, L. R., Mink, D., Assema, F., Schürmann, M. and Gruber, K. (2015) The Crystal Structure of D-Threonine Aldolase from *Alcaligenes xylosoxidans* Provides Insight into a Metal Ion Assisted PLP Dependent Mechanism. *PLOS ONE*, **10**, 1–15.
- [10] Bradford, M. M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
- [11] 相原 茂夫 (2005) タンパク質の結晶化—回折構造生物学のために, 86-88.
- [12] Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Cryst.*, **D66**, 125–132.
- [13] Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G. W., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A. and Wilson, K. S. (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Cryst.*, **D67**, 235–242.
- [14] Grosse-Kunstleve, R. W., Sauter, N. K., Moriarty, N. W. and Adams, P. D. (2002) The

Computational Crystallography Toolbox: crystallographic algorithms in a reusable software framework. *J. Appl. Cryst.*, **35**, 126–136.

[15] Evans, P. (2006) Scaling and assessment of data quality. *Acta Cryst.*, **D62**, 72–82.

[16] Matthews, B. W. (1968) Solvent Content of Protein Crystals. *J. Mol. Biol.*, **33**, 491–497.

[17] Vagin, A. and Teplyakov, A. (1997) MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement. *J. Appl. Cryst.*, **30**, 1022–1025.

第四章

緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来 D-スレオニンアルドラーゼの結晶構造解析

4.1 序論

β -ヒドロキシ- α -アミノ酸は 2 つのキラル炭素を持っていることから 4 種類の立体異性体が存在する。TAs は β -ヒドロキシ- α -アミノ酸に対する立体選択性によって 4 種類に分類される (1.4 項)。L 型に属する酵素には厳密な立体選択性を持つものが存在するので、立体化学的に純粋な L 型 β -ヒドロキシ- α -アミノ酸の生産は容易である。一方、D 型に属する DTA は β 位の立体認識が寛容であるため、DTA のみでは立体化学的に純粋な β -ヒドロキシ- α -アミノ酸を生産することは困難である [1]。

DTA では基質の α 位の立体認識について研究されている。Fesko らによって β -ヒドロキシ- α -アミノ酸の α 位水素の代わりにメチル基などを組み込んだ β -ヒドロキシ- α,α -ジアルキル- α -アミノ酸を合成する DTA がいくつかの細菌種で発見され、それらの一次配列を比較することで基質の α 位の立体認識について考察された [2, 3]。また、Qin らによって L-*allo*-スレオニンアルドラーゼの結晶構造が明らかとなり、LTAs における基質の β 位の立体認識について有望な構造活性相関情報をもたらした [4]。しかしながら、DTA の β 炭素側の認識に関する知見はほとんど存在しない。

第二章より CrDTA の D-*allo*-スレオニンを基質として用いたときのターンオーバー数は D-スレオニンをを用いたときより 6 倍高く、CrDTA と細菌由来 DTA のアミノ酸配列も比較的異なることが明らかにされた。それらの結果より CrDTA の構造情報が D-または D-*allo*-スレオニンに対して厳密な立体選択性をもつ酵素開発の一助になると考えられた。

DTA の立体構造に関する研究は、2015 年に報告された細菌 *Alcaligenes xylosoxidans* 由来 DTA の結晶構造解析 (PDB エントリー: 4V15) の一報のみが知られている [5]。それ故、現在までの DTA の限られた構造情報では立体選択性をもつ D-または D-*allo*-スレオニンアルドラーゼの開発は困難であり、さらなる DTA の構造情報がその問題を解決するために必要である。本研究では第三章において得られた X 線回折データを解析し、CrDTA の結晶構造を明らかにした。また、基質複合体モデルを作成することで基質の β 位の立体認識と DTA の反応機構について考察した。

4.2 方法

結晶構造解析のために用いた CrDTA 結晶の結晶化条件およびその X 線回折実験については第三章に示したので省略する。

4.2.1 構造決定と精密化

収集した X 線回折データからプログラム REFMAC 5 [6]の *rigid body refinement* および *restrained refinement* モードにより精密化し、プログラム Coot [7]により電子密度の確認および座標を修正した。それぞれの CrDTA サブユニットの中へ対応するアミノ酸残基が入っていない適当なサイズの余剰な電子密度をもつ空間へ PLP および Mn イオンを追加した。その時 PLP は 80 残基目のリジン残基 (Lys 80) の ϵ -アミノ基とアルジミンを形成する位置へ追加されたので、PLP および Lys 80 はそれらが結合した内部アルジミン (LLP, Fig. 1-4) としてアサインされた。非対称ユニット内の 4 分子をそれぞれ A, B, C, D チェインと名付けた。A チェインでは 1-22, 363-365 および 403-406 番残基, B チェインでは 1-23, 362-367 および 402 番残基, C チェインでは 1-21, 362-366, 403-407 番残基, D チェインでは 1-22, 362-367 および 402-406 番残基に対応する電子密度が確認されなかった。これらの残基に対応するアミノ酸残基は構造モデルへ組込まなかった。水分子は適当なサイズの余剰な電子密度をもつ空間へ適宜アサインされた。最終的な CrDTA 構造モデルは精密化および座標修正を繰り返すことで (約 25 サイクル) 得られ、そのモデルは $R_{\text{factor}} = 23.59\%$, $R_{\text{free}} = 24.88\%$ まで精密化された。ラマチャンドラン・プロットを用いたペプチド主鎖の歪みはプログラム RANPAGE [8]によって確認され、CrDTA 中の 96.6%の残基が好ましく、3.4%は許容範囲内であり、構造上無理のある残基は存在しないと確認された。詳しい精密化についての情報は Table IV-1 に記載した。タンパク質構造の図の作成にはプログラム CCP4MG [9]を用いた。

Table IV-1. CrDTA の構造精密化に関する統計値

Refinement	
Resolution (Å)	42.28–1.85
R _{factor} (%)	23.59
R _{free} (%)	24.88
Root-mean-square deviation	
Bond length (Å)	0.0082
Bond angle (°)	1.4499
No. of atoms	
Protein	11967
Metal ion	4
Cofactor	68
Water	699
Average B factor (Å ²)	
Protein	24.5
Metal ion	37.8
Cofactor	21.9
Water	28.8
Ramachandran analysis	
Favoured (%)	96.6
Allowed (%)	1.6
Outliers (%)	0

4.2.2 基質複合体モデルの構築

CrDTA の基質との複合体モデルを *in silico* で構築するため、プログラム Coot および分子のトポロジーファイルを生成する Web サービス PRODRG2 Server [10]を利用した。CrDTA の基質分子モデルを PRODRG2 Server を用いて作成した。作成した基質分子モデルを CrDTA 活性部位中へ追加した。さらに、基質のアミノ基を LLP のシッフ塩基に対してアミノ基転移反応が可能な位置へ、そのカルボキシル基を Arg180 のグアニジド基と塩橋を形成する位置へ調整した。この基質分子モデルを含んだ CrDTA 構造は REFMAC 5 の *rigid body refinement* および *restrained refinement* モードによって構造精密化された。得られた構造において Web サービス PISA [11]によって基質の位置が溶媒和自由エネルギーの観点から不利にならないことを確認した。また CrDTA の基質複合体モデルは、同 *fold type* の PLP 酵素である

Geobacillus stearothermophilus 由来アラニンラセマーゼの D-アラニン複合体モデル (PDB エントリー: 116g) の活性部位と重ね合わせることで基質の向きや位置に大きな差異がないことを確認した。

4.3 結果と考察

4.3.1 D-スレオニンアルドラーゼの 3 次元構造

CrDTA のそれぞれのサブユニットは典型的なトリオースリン酸イソメラーゼ (TIM) バレルドメイン (52-299 残基) および β -ストランドドメイン (15-51 および 300-428 残基) によって構成されていた (Fig. 4-1)。TIM バレルとはそれぞれ 8 つの β -ストランドと α -ヘリックスが一次配列上で交互につながり、規則的ならせん状に巻く内側の β -バレルとその周りを逆平行に取り巻く α -ヘリックスを含むフォールディング構造を指す。TIM バレルドメインは既知構造の約 10% で確認され、タンパク質の立体構造において最も共通したフォールドと言われている[12]。また、TIM バレルは fold type III の PLP 酵素に共通した構造でもある。

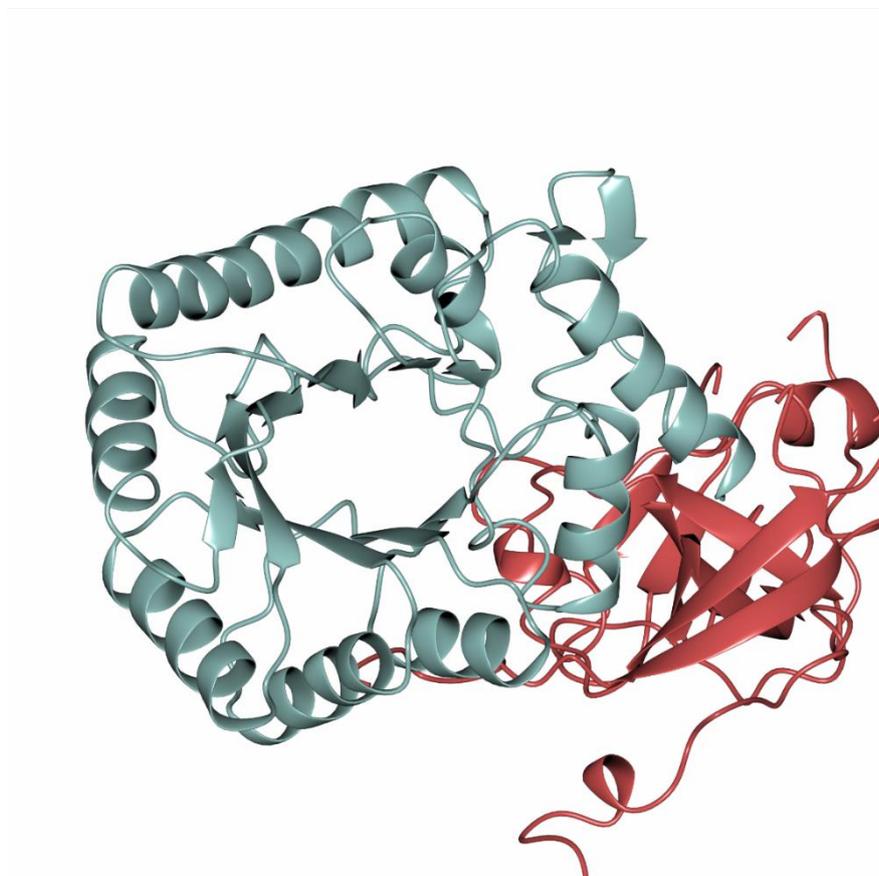


Fig. 4-1. CrDTA モノマーのリボン構造。シアン;TIM バレルドメイン, マゼンダ; β -ストランドドメイン。

CrDTA 結晶において非対称ユニット内に 2 つのホモダイマーが存在すると観察された (3.3 項)。PISA を用いて各サブユニット間の相互作用を調べた。CrDTA は Mn イオンを 2 つ含んだホモダイマー状態で安定であり、サブユニット A-B ダイマーの溶媒和エネルギーは -12.6 kcal/mol であり、サブユニット C-D ダイマーの場合 -17.5 kcal/mol であった。それらのサブユニットは同じ PLP 酵素 (fold-type III) である細菌由来のアラニンラセマーゼや D-スレオニンアルドラーゼ、真核生物由来の D-セリンデヒドラターゼと同様に TIM バレルドメインともう一方のサブユニット由来の β -ストランドドメインが相互作用したヘッド-トゥ-テール配置で会合すると観察された (Fig. 4-2)。それぞれサブユニットの表面積は約 16500 \AA^2 であり、2 つのサブユニット間が相互作用する面積は約 3200 \AA^2 (各サブユニットで約 1600 \AA^2) であると算出された。つまり、各サブユニット表面の約 10% がサブユニットどうしの会合を支えているとわかった。また、それらの相互作用はすべて非共有結合性であると解析された。

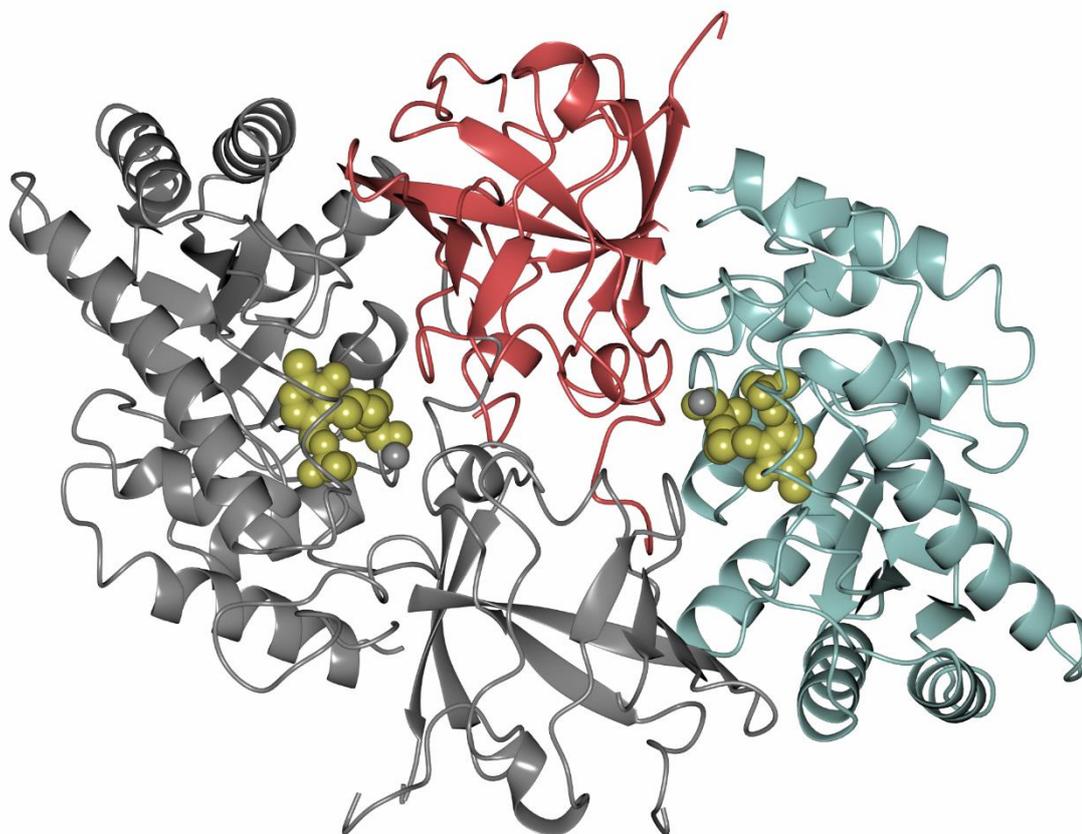


Fig. 4-2. CrDTA の結晶構造。シアンリボン;TIM バレルドメイン, マゼンダリボン; β -ストランドドメイン, グレーリボン; もう一方のサブユニット, ゴールドスフィア;PLP, グレースフィア; 金属イオン。

CrDTA の活性部位はそれぞれのサブユニットの TIM バレルドメインともう一方のサブユニット由来の β -ストランドドメインによって計 2 カ所で構築していた (Fig. 4-3)。PLP は非反応時の酵素内で活性部位のリジン残基と共有結合し、内部アルジミン構造をとることが多い[13]。CrDTA の場合、活性部位内の残存した電子密度より PLP は Lys 80 と内部アルジミン構造をとると示唆された (Fig. 4-4)。PLP のピリジン環は Tyr 210 とスタッキング相互作用していた。ピリジン環の窒素原子は Gln 272 と相互作用していた。PLP のピリジン環窒素へ相互作用する残基は PLP 酵素によって異なることが知られている。Fold type I の場合、酸性残基であるアスパラギン酸の側鎖と水素結合しておりピリジン環窒素は常にプロトン化され、fold type II の場合、中性残基のセリンまたはスレオニンの側鎖と水素結合を形成し、ピリジン環窒素は非プロトン化状態をとる。一方、CrDTA を含む fold type III の場合、細菌由来アラニンラセマーゼでは塩基性残基であるアルギニン、真核生物由来オルニチンデカルボキシラーゼではグルタミン酸、真核生物由来 D-セリンデヒドラターゼではチロシンなど側鎖の酸性・塩基性に法則はない[14]。 *Arthrobacter sp.* 由来 DTA のアミノ酸一次配列および *A. xylosoxidans* 由来 DTA の結晶構造によると細菌由来 DTA におけるピリジン環窒素と相互作用する残基はグルタミンであり[4, 15]、CrDTA と一致した。PLP のリン酸基には Thr 256, Ser 275 および Tyr 260 のヒドロキシ基, Thr 256, Gly 274 および Ser 275 の主鎖のアミド基が相互作用していた。PLP の C3 位につくヒドロキシ基は Gln 103 側鎖のアミド基および Arg 180 側鎖のグアニジノ基と水素結合を形成していた。

CrDTA は Mn や Mg などの二価の金属イオンを要求する (2.3.6 項)。また *A. xylosoxidans* 由来 DTA では、NiCl₂ などの二価の金属塩化物を酵素溶液へ加えたとき低温保存 (4°C) において活性が保持されると報告された[16]。解析された結晶の結晶化条件において酵素溶液には MnCl₂ を、リザーバー溶液には Mg(NO₃)₂ を加えた (3.2.3 項)。その結果得られた結晶構造より、活性部位中の PLP 分子近傍に金属結合部位を観察した (Fig. 4-4)。この金属結合部位は His 384 側鎖の窒素原子および Asp 386 側鎖のカルボキシ基によって構成され、金属イオンはそれら 2 残基に加え 4 つの水分子によって 8 面体構造をとっていると観察された。一方、この金属結合部位には Mn または Mg イオンのどちらかが存在すると考えられた。Mg イオンの結合距離は水分子の酸素原子および Asp 側鎖の酸素原子とは 2.07 Å の距離をとるとされ、Mn イオンの場合水分子の酸素原子では 2.19 Å, Asp 側鎖の酸素原子では 2.15 Å, His 側鎖の窒素原子とは 2.21 Å の距離をとるとされた[17]。CrDTA の金属結合部位における金属配位距離を測定したが、配位した金属イオンの同定には至らなかった (Fig. 4-5)。CrDTA は Mn と Mg イオンのどちらの添加においても活性を強化するので、結晶格子内のサブユニットにおいてもどちらの金属イオンも結合していると考えられた。今回の結晶構造の金属結合部位には Mn イオンをアサインした。また、*A. xylosoxidans* 由来 DTA 結晶構造で確認された第二の金属 (Na イオン) 結合部位は CrDTA の結晶構造では観察されなかった。

これら PLP と金属結合部位を構成要素はすべて TIM バレルドメインの残基であった。この結果より、CrDTA はモノマー状態であっても酵素活性に大きく関わる PLP および金属イ

オンが認識されると考えられる。今まで報告された DTA においてモノマー状態の活性についての知見はない。

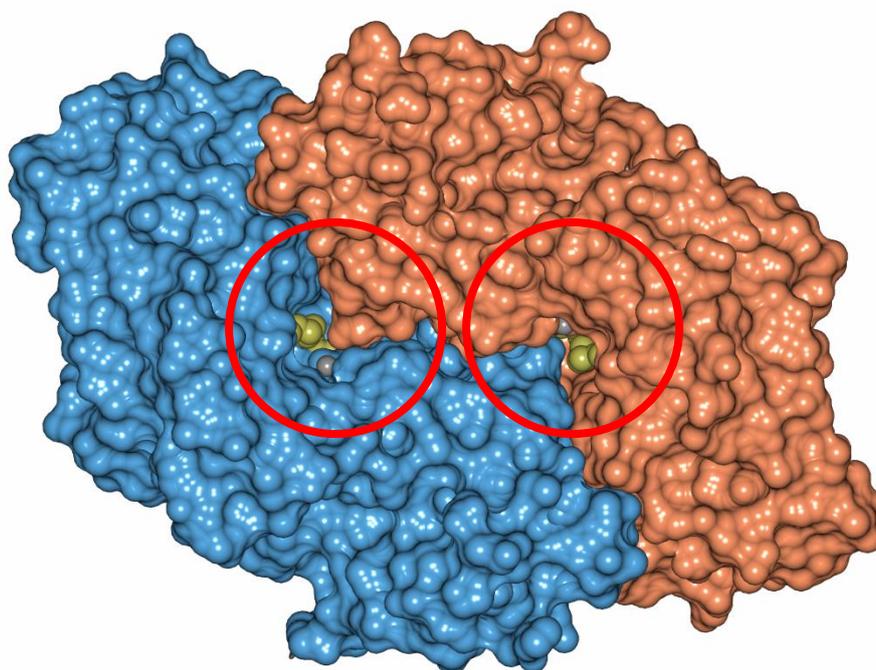


Fig. 4-3. CrDTA の結晶構造 (ファンデルワールス半径使用)。シアンおよびマゼンダ; 各サブユニット, ゴールド; PLP, グレー; 金属イオン。赤丸は活性部位を示した。

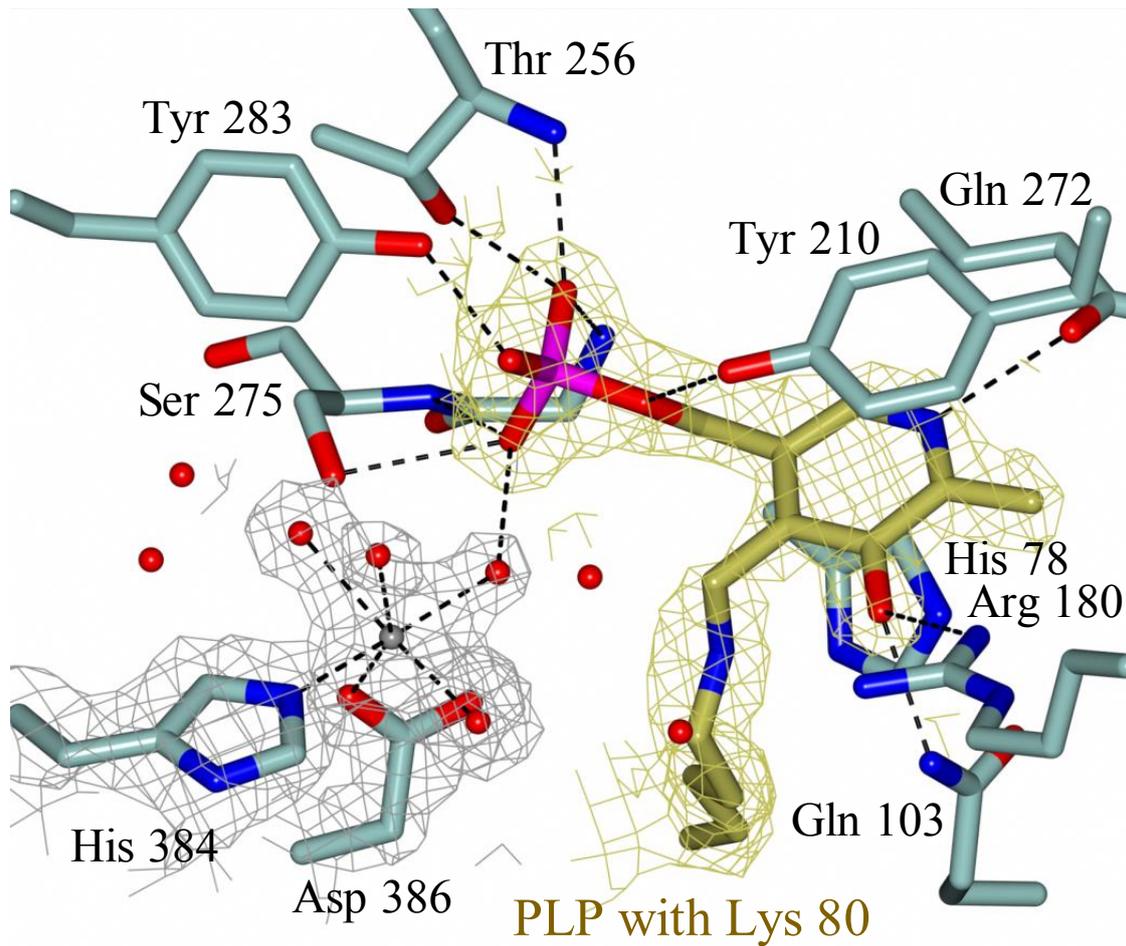


Fig. 4-4. CrDTA の活性部位における金属イオンと PLP と酵素の相互作用。シアンスティック; 活性部位残基, ゴールドスティック; PLP とリジン残基が結合した内部アルジミン, シルバースフィア; 金属イオン, レッドスフィア; 水分子。残基中の赤は酸素原子, 青は窒素原子そしてピンクはリンを示した。網目は金属および PLP 結合部位の電子密度を示した。破線は原子間の相互作用を示した。

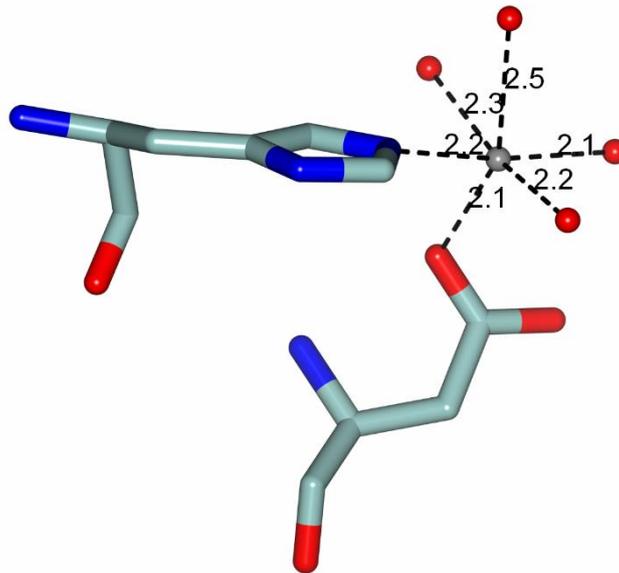


Fig. 4-5. CrDTA の金属結合部位における金属の配位結合距離。シアンスティック; 活性部位残基, シルバースフィア; 金属イオン, レッドスフィア; 水分子。残基中の赤は酸素原子, 青は窒素原子を示した。破線は原子間の相互作用を示した。

Web サービス DALI server[18]を用いた立体構造アライメントは, 1分子の CrDTA の全体構造が今までで報告されている PLP 酵素 (fold type III) に属する *A. xylosoxidans* 由来 DTA (PDB エントリー:4v15, Z-スコアは 51.0, 平均平方根偏差 (r.s.m.d) は 1.7 Å, 配列同一性は 44%), *D-threo*-3-ヒドロキシアスパラギン酸デヒドラターゼ (PDB エントリー:3wqc, Z-スコアは 41.3, r.s.m.d は 2.2 Å, 配列同一性は 25%), *D*-セリンデヒドラターゼ (PDB エントリー:3anu, Z-スコアは 40.0, r.s.m.d は 2.3 Å, 配列同一性は 26%) のそれと高い構造類似性を示すことを明らかにした。さらに, Web サービス PDBeFold[19]を用いて CrDTA と *A. xylosoxidans* 由来 DTA の立体構造をセカンダリーストラクチャーマッチング法によって重ね合わせ, それぞれ対応する残基の C α 原子間の距離を調べた (Fig.4-6)。各ドメインにおける C α 原子間の平均距離は TIM バレルドメイン間では 1.07 Å であり, β -ストランドドメイン間では 1.48 Å であると算出された。これは, TIM バレルドメインが 2つの生物の DTA のあいだでより保存していることを示す。TIM バレルドメインは PLP 酵素の特徴的なドメイン構造であり, DTA の活性部位を構成する残基のほとんどがそのドメイン由来であるため DTA 間で高度に保存していたと考えられる。また, 活性部位を構成する Gly 212 から Gln 215 (Lid 部位, Fig.4-7) の各 C α 原子に約 3.5 Å のズレが生じていた。それ以外の活性部位

を構成する残基において大きな構造変化は観察されないので、その Lid 部位の変化は細菌由来 DTA との酵素学的諸性質の違いを理解する上で重要な知見となると考えられる。

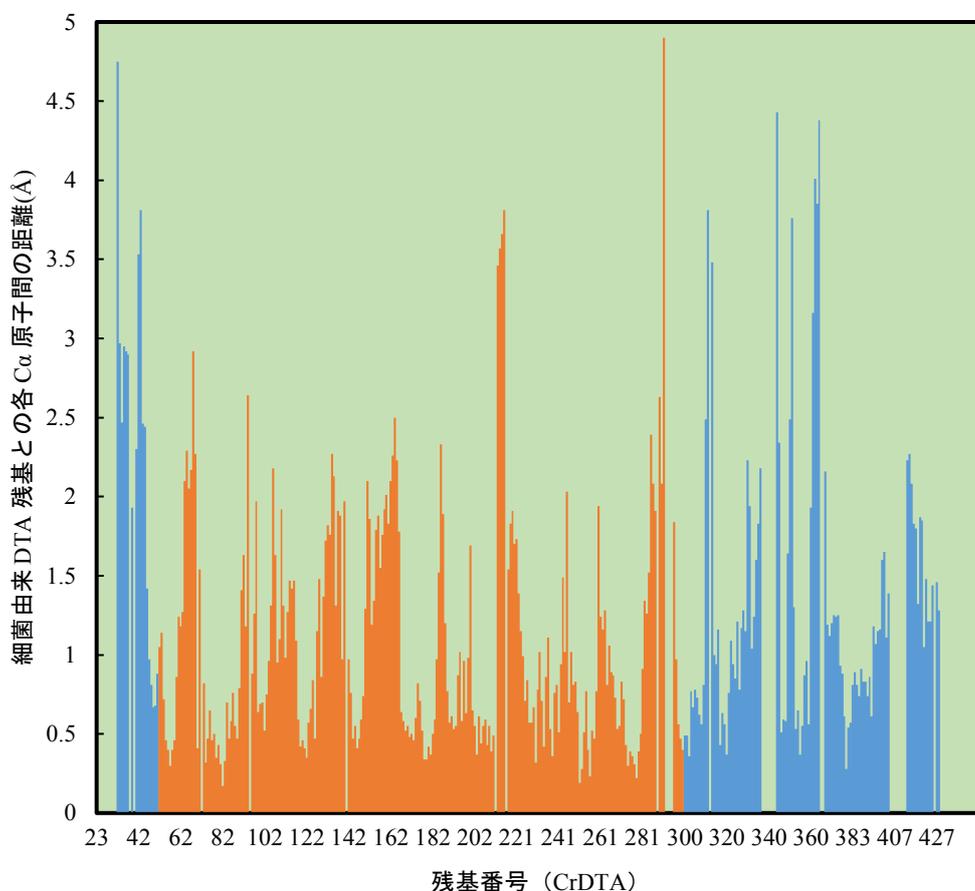


Fig. 4-6. セカンダリーストラクチャーマッチング (SSM) により算出した立体構造における CrDTA と *A. xylooxidans* 由来 DTA の構造の変化。縦軸は 2 つの立体構造を重ね合わせたときのおたがいの対応した残基間の C α 距離を示した。横軸は CrDTA の残基番号を示した。シアンバー; β -ストランドドメインに属する残基, オレンジバー; TIM バレルドメインに属する残基。

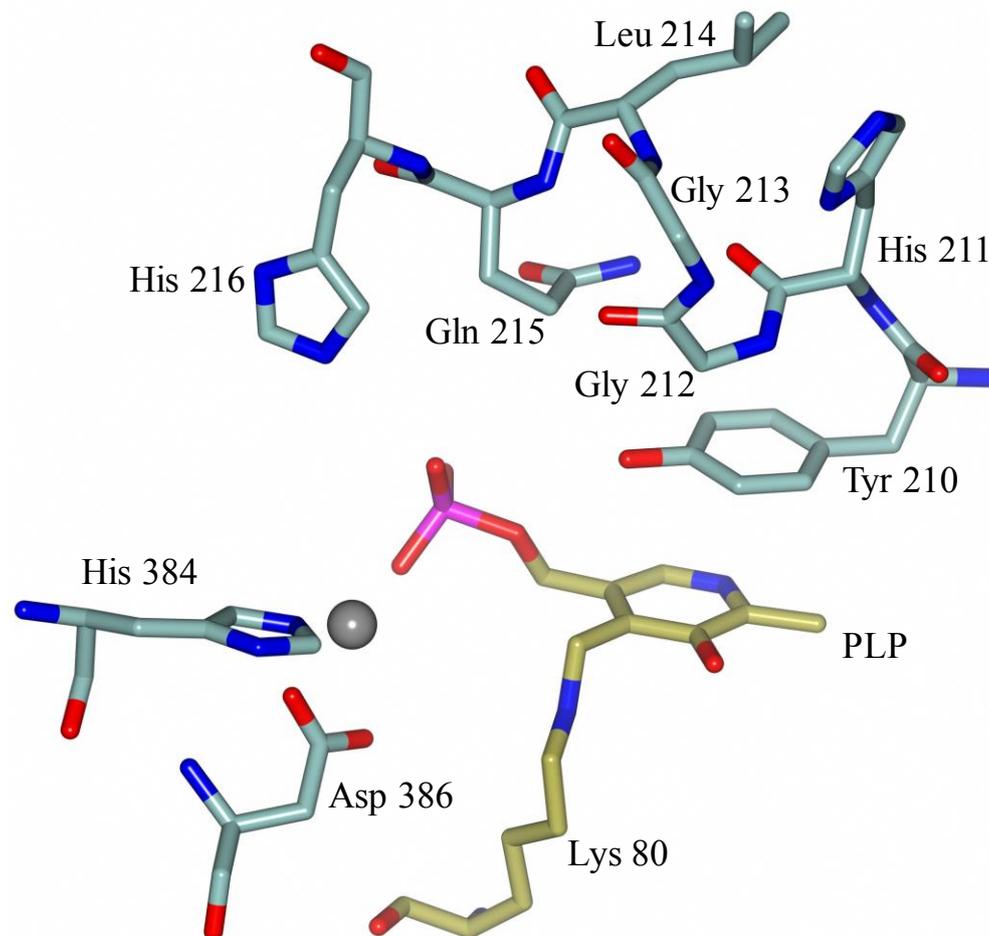


Fig. 4-7. CrDTA における Lid 部位の立体構造。シアンスティック; CrDTA 残基, ゴールドスティック; PLP とリジン残基が結合した内部アルジミン, シルバースフィア; Mn イオン。Lid 部位の前後の残基である Tyr 210 と His 216 はそれぞれ PLP とのスタッキング相互作用と触媒残基 (4.3.2 項) の役割を持つ。

4.3.2 基質複合体モデル

CrDTA の活性部位において重要な残基やその機能を推定するために, いくつかの基質モデルを活性部位に組み込んだ基質複合体をモデリングした。基質モデルとして用いた D-スレオニン, D-allo-スレオニンは CrDTA の内部アルジミンの近傍へ 4.2.2 項に示した基準をみたすようアサインされた。精密化後の基質複合体モデルの構造を Fig. 4-8 に示した。その構造より, Arg 180 側鎖は基質に向かって伸長し, そのグアニジノ基と基質のカルボキシ基によって塩橋が形成されると推測された。基質のカルボキシ基は Asp 180 のほかに LLP の C3 位につくヒドロキシ基およびもう一方のサブユニットの β -ストランドドメイン由来の Asp

353の主鎖アミド基と相互作用がみられた。基質の β -ヒドロキシ基は金属結合部位の水分子の代わりに金属イオンへ配位し、その結果 His 216 のイミダゾール基と相互作用する距離 (4.0 Å) へ位置した。基質の β -ヒドロキシ基周辺において、解離性側鎖をもつ他の残基は観察されなかったので、His 216 が CrDTA 活性における触媒残基であると考えられた。また、Dunathan による仮説[20]において、PLP 酵素の反応は PLP と結合したアミノ酸の α 位の結合の内 PLP のピリジン環平面に対して垂直な結合が優先的に切断されることで起こるとされた。DTA は C-C 結合の切断を触媒する酵素であり、基質の α - β 炭素の結合は PLP のピリジン環に対してほぼ垂直であると観察された。それゆえ、基質複合体モデルは反応機構において Dunathan 仮説に矛盾しないことがわかった。

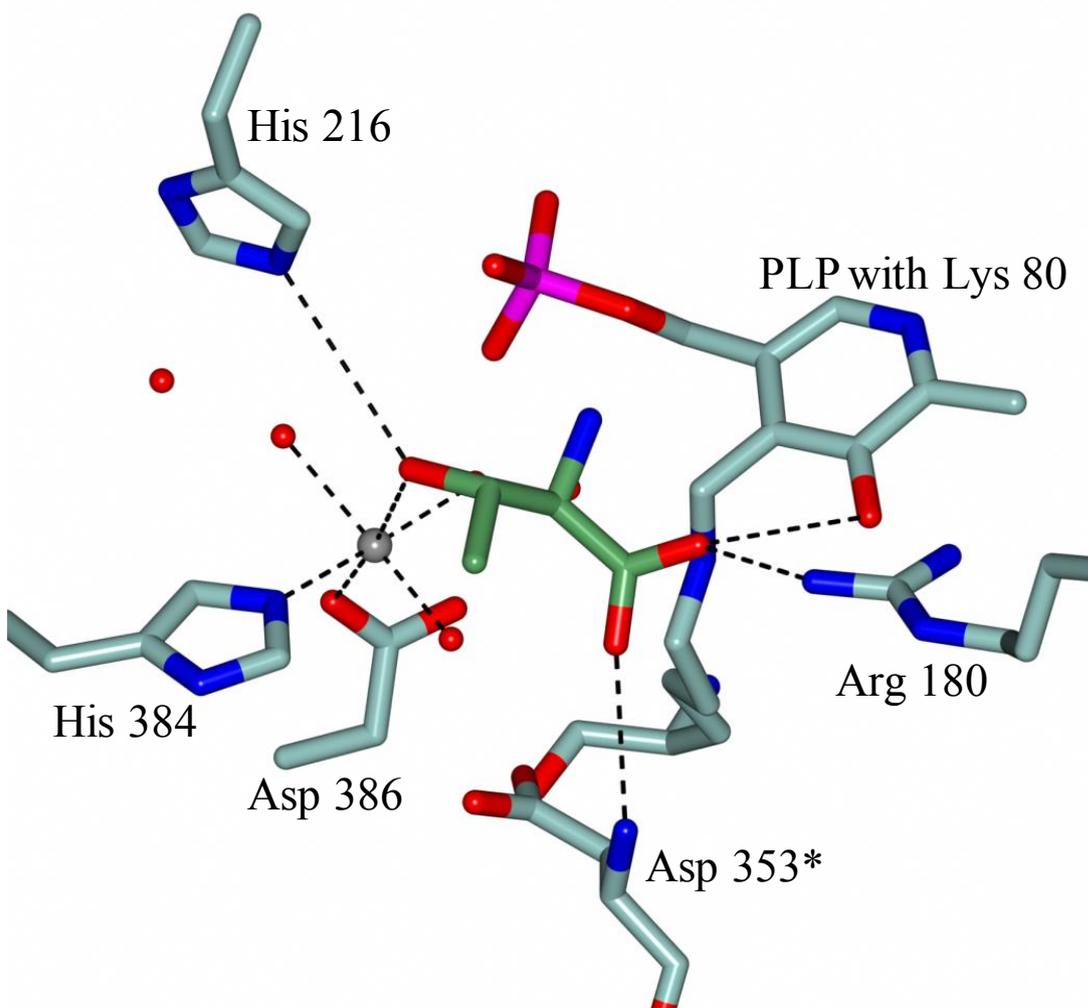


Fig. 4-8. CrDTA と基質複合体モデルの構築。シアンスティック; 活性部位残基, シルバースフィア; 金属イオン, レッドスフィア; 水分子, グリーンスティック; D-スレオニン。残基中の赤は酸素原子, 青は窒素原子をしめす。破線は原子間の相互作用をしめす。アスタリスクは別のサブユニットからの残基を示す。

基質複合体モデルにおいて、D-スレオニンと D-*allo*-スレオニンの大きな空間座標の違いはその γ -メチル基で観察された (Fig. 4-9)。D-スレオニンの γ -メチル基は基質の侵入口方向へ、D-*allo*-スレオニンの γ -メチル基は活性部位内の Lid 部位の親水基 (Gly 212 のアミド基) と相互作用する距離 (3.6 Å) に位置すると観察された (Fig. 4-9c)。この結果より D-*allo*-スレオニンの活性部位への侵入は D-スレオニンと比較して妨げられる示唆された。実際に、DTA への K_m 値は D-スレオニンに対して 0.3 mM, D-*allo*-スレオニンに対して 2.4 mM であり、D-スレオニンのほうが酵素との親和性が高かった (2.3.4 項)。一方、*A. xylooxidans* 由来 DTA において D 型スレオニンに対する K_m 値の差はほとんどない。これら 2 つの DTA における基質の立体選択性の差は Lid 部位の構造変化に起因すると考えられた (4.3.1 項)。これらの結果より、Lid 部位の構造によって *syn* 型の β -ヒドロキシ-D-アミノ酸 (例: D-*allo*-スレオニン) の侵入がコントロールされていることが示唆された。それ故、*anti* 型の β -ヒドロキシ-D-アミノ酸 (例: D-スレオニン, D-*threo*-フェニルセリン) に対して立体選択性のある DTA をデザインする場合、Gly 212 をかさ高い残基 (例: アスパラギン) へ置換するのが効果的であると考えられる (Fig. 4-10)。

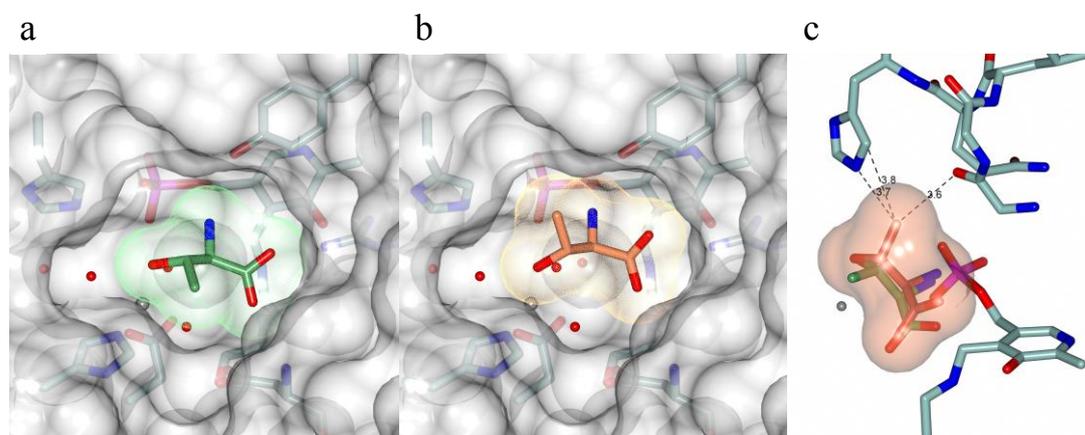


Fig. 4-9. スレオニンにおける基質複合体モデルの比較。a; D-スレオニンを基質としたときの基質複合体モデル, b; D-*allo*-スレオニンを基質としたときの基質複合体モデル, c; D-*allo*-スレオニンの γ -メチル基と活性部位の相互作用を示した。グリーンスティック; D-スレオニン, オレンジスティック; D-*allo*-スレオニン。ホワイトは活性部位の残基, グリーンは D-スレオニン, オレンジは D-*allo*-スレオニンのファンデルワールス半径を, 破線は原子間の相互作用を示した。

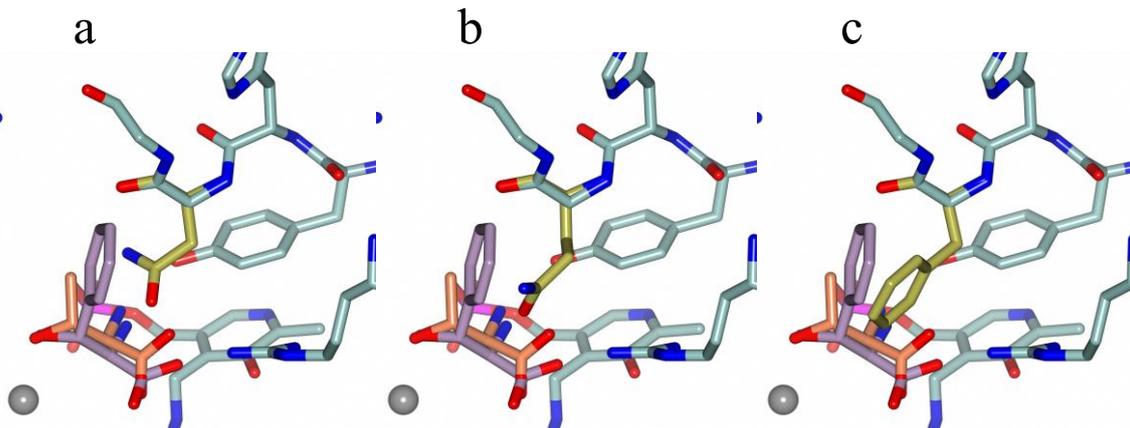


Fig. 4-10. CrDTA における Gly 212 の変異提案。シアンスティック; CrDTA 残基, ゴールドスティック; 変異体, オレンジスティック; D-allo-スレオニン, パープルスティック; D-erythro-フェニルセリン。a; アスパラギン, b; グルタミン, c; フェニルアラニンへの変異を示した。

4.3.3 反応機構の推定

4.3.1 および 4.3.2 項の活性部位の構造と基質モデルを基にして, DTA の反応機構を推測した (Fig. 4-11)。PLP 酵素において, PLP とリジン残基 (CrDTA では Lys 80) が結合した内部アルジミンは基質が活性部位へ侵入したとき, そのアミノ基によって求核攻撃を受け, PLP と基質が結合した外部アルジミンへ変化する[14]。外部アルジミンの β -ヒドロキシ基は Mn イオンによって位置が固定され, そこへ His 216 の側鎖のイミダゾール基が β -ヒドロキシ基を脱プロトンし, 基質の $\alpha \cdot \beta$ 炭素間の C-C 結合を開裂し, その結果アルデヒドとグリシンを生産すると考えられた。この反応機構は *A. xylosoxidans* 由来 DTA の反応機構を参考にして構築した[5]。 *A. xylosoxidans* 由来 DTA はそのヒスチジン残基と β -ヒドロキシ基の間にある水分子を介して脱プロトンする一方で, CrDTA はそれに相当する水分子が存在せず, His 216 が直接脱プロトンを触媒すると推測された。また, *Pseudomonas sp.* 由来の DTA における酵素反応機構も Fesko らによって示された[21]。しかし, この反応機構は細菌由来アラニンラセマーゼの反応機構より推測されたものであり, そこで脱プロトンを担うチロシン残基が CrDTA の場合基質の β -ヒドロキシ基と相互作用する位置にいなかった。それ故, 今回の反応機構の推測には *Pseudomonas sp.* 由来の DTA の反応機構を用いなかった。

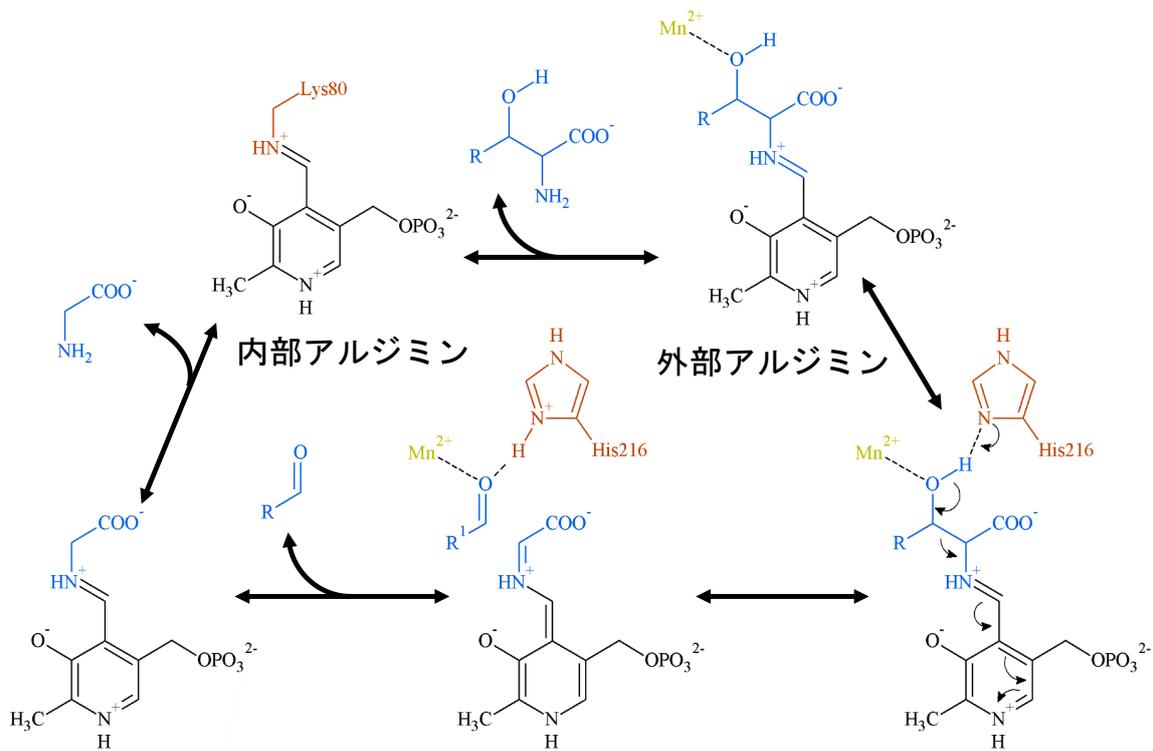


Fig. 4-11. CrDTA の推定反応機構。黒; PLP 部分, 黄; Mn イオン, 青; 基質, 赤; 活性部位残基。右回りは開裂反応, 左回りは合成反応の流れを示した。

4.4 まとめ

本研究により, CrDTA の立体構造が明らかになった。CrDTA はホモダイマーを形成していた。1つのサブユニットは fold type III に属する PLP 酵素に特徴的なドメインである TIM バレルドメインおよび β -ストランドドメインによって構成されていた。活性部位中に PLP と Mn イオンの結合部位が存在し, それらが酵素反応に関わると推測した。また, 基質複合体モデルを構築し, その構造を基にして CrDTA の基質の立体選択性および反応機構を考察した。

参考文献

- [1] Dückers, N., Baer, K., Simon, S., Gröger, H., Hummel, W. (2010) Threonine aldolases—screening, properties and applications in the synthesis of non-proteinogenic β -hydroxy- α -amino acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **88**, 409–424.
- [2] Fesko, K., Uhl, M., Steinreiber, J., Gruber, K. and Griengl, H. (2010) Biocatalytic Access to α , α -Dialkyl- α -amino Acids by a Mechanism- Based Approach. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 121-124.
- [3] Fesko, K., Strohmeier, G. A., and Breinbauer, R., (2015) Expanding the threonine aldolase toolbox for the asymmetric synthesis of tertiary α -amino acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99**, 9651-9661.
- [4] Qin, H., Imai, F. L., Miyakawa, T., Kataoka, M., Kitamura, N., Urano, N., Mori, K., Kawabata, H., Okai, M., Ohtsuka, J., Hou, F., Nagata, K., Shimizu, S. and Tanokura, M. (2014) L-*allo*-Threonine aldolase with an H128Y/S292R mutation from *Aeromonas jandaei* DK-39 reveals the structural basis of changes in substrate stereoselectivity. *Acta Cryst.*, **D70**, 1695-1703.
- [5] Uhl, K. K., Oberdorfer, G., Steinkellner, G., Berket, L. R., Mink, D., Assema, F., Schürmann, M. and Gruber, K. (2015) The Crystal Structure of D-Threonine Aldolase from *Alcaligenes xylosoxidans* Provides Insight into a Metal Ion Assisted PLP Dependent Mechanism. *PLOS ONE*, **10**, 1–15.
- [6] Murshudov, G. N., Skuba'k, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F. and Vagin A. A. (2011) *REFMAC5* for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta. Cryst.*, **D67**, 355–367.
- [7] Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. and Cowtan, K. (2010) Features and development of *Coot*. *Acta. Cryst.*, **D66**, 486–501.
- [8] Lovell, S. C., Davis, I. W., Arendall III, W. B., de Bakker, P. I., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, J. S. and Richardson, D. C. (2003) Structure Validation by C α Geometry: Φ , Ψ and C β Deviation. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, **50**:437–450.
- [9] Potterton, E., McNicholas, S., Krissinel, E., Cowtan, K. and Noble, M. (2002) The *CCP4* molecular-graphics project. *Acta Cryst.*, **D58**, 1955–1957.
- [10] Schüttelkopf, A. W. and van Aalten A. M. F. (2004) *PRODRG*: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes, *Acta. Cryst.*, **D60**, 1355–1363.
- [11] Krissinel, E. and Henrick, K. (2007) Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State. *J. Mol. Biol.*, **372**, 774-797. h
- [12] Sterner, R. and Höcker, B. (2005) Catalytic Versatility, Stability, and Evolution of the ($\beta\alpha$) $_8$ -Barrel Enzyme Fold. *Chem. Rev.*, **105**, 4038-4055.
- [13] Franz, A. E. and Stewart, J. D. (2014) Threonine aldolases. *Adv. Appl. Microbiol.*, **88**, 58–101.
- [14] 林 秀行 (2014) ピリドキサール酵素の反応機構. *生化学*, **86**, 214–231.
- [15] Paiardini, A., Contestabile, R., D'Aguzzo, S., Pascarella, S. and Bossa, F. (2003) Threonine aldolase and alanine racemase: novel examples of convergent evolution in the superfamily of vitamin B6-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1647**, 214–219.

- [16] Goldberg, S. L., Goswami, A., Guo, Z., Chan, Y., Lo, E. T., Lee, A., Truc, V. C., Natalie, K. J., Hang, C., Rossano, L. T. and Schmidt, M. A. (2015) Preparation of β -hydroxy- α -amino Acid Using Recombinant D-Threonine Aldolase. *Org. Process Res. Dev.*, **19**, 1308–1316.
- [17] Dokmanic, I., Sikic, M. and Tomic, S. (2008) Metals in proteins: correlation between the metal-ion type, coordination number and the amino-acid residues involved in the coordination. *Acta Cryst.*, **D64**, 257–263.
- [18] Holm, L. and Sander, C. (1995) Dali: a network tool for protein structure comparison. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 478–480.
- [19] E. Krissinel and K. Henrick (2004) Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Cryst.* **D60**, 2256–2268.
- [20] Dunathan, H., C. (1966) Conformation and reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **55**, 712–716.
- [21] Fesko, K., Uhl, M., Steinreiber, J., Gruber, K., Griengl, H. (2010) Biocatalytic Access to α , α -dialkyl- α -amino acids by a mechanism-based approach (Supporting Information). *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 121–124.

第五章

総括

本研究において、真核生物において初めての例となる緑藻 *C. reinhardtii* 由来 DTA を発見し、その酵素学的諸性質を調べた。CrDTA は細菌由来 DTA と同じく PLP 酵素であり、二価の金属イオンを要求した。一方、CrDTA は開裂反応において SH 試薬の影響を受けないこと、D 型スレオニンの立体構造によってそれらに対する動態パラメータに差が生じること、アミノ酸配列が細菌由来 DTA と比較的異なることなど、細菌由来 DTA とは異なる特徴を持つことを明らかにした。これらの知見から、CrDTA の立体構造情報が、例えば厳密な基質の立体選択性をもつ DTA をデザインするなど、酵素の機能改善のための合理的タンパク質工学へ有益になると考えられた。

さらなる研究で、CrDTA の構造解析のための結晶化条件を明らかにし、CrDTA の結晶を調製した。CrDTA 結晶の X 線結晶構造解析によって CrDTA の立体構造を明らかにした。CrDTA はホモダイマーを形成しており、ひとつのサブユニットは fold type III に属する PLP 酵素に共通な TIM バレルドメインと β -ストランドドメインより構成されていた。CrDTA の活性部位は PLP と Mn イオンの結合部位を持ち、それら補因子が酵素反応にかかわると推測された。また、基質複合体モデルを基にして、CrDTA の立体選択性と反応機構について考察した。

これらの研究で、CrDTA の構造活性相関を明らかにした。DTA の存在は細菌のみに限られ、研究例も少なかった。真核生物由来の CrDTA の発見は DTA の生理学的役割の解明や新たな DTA 検索の一助になると考えられる。キラル化合物の不斉合成および光学分割が可能な TAs はキラル化合物産業において有用であり、特に CrDTA は基質の立体選択性において既報の DTA にはない特徴をもつ。この知見は厳密な立体特異性を持つ DTA (例: D-スレオニンのみを厳密に認識する) をデザインする道を開くものである。厳密な立体特異性を持つ DTA は高い光学純度のキラル化合物の生産に寄与し、そのようなキラル化合物は生体へ投与することの多いキラル化合物において重要である。それ故、CrDTA およびこの酵素の構造活性相関情報はキラル化合物産業の発展につながると考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導・ご鞭撻を賜りました先生方、諸先輩方、関係者の皆様に紙面をお借りして御礼申し上げます。

セミナーおよび実験、本論文の執筆、報告会等で多大なるご指導を頂きました榎泰典教授に深く感謝いたします。卒研生の頃からの全ての研究活動についてご指導を頂きました西村克史教授に心から御礼申し上げます。本論文を執筆するにあたり、貴重なご意見やご指導を頂きました青柳隆夫教授に心から感謝いたします。ありがとうございました。

約 8 年半の研究生活において、そのほとんどを日本大学理工学部物質応用化学科の環境微生物学研究室で過ごしました。全く何も知らない私はこの研究室で谷川実准教授および徳久真弓助手に実験や研究、発表、文章の基礎から教えて頂きました。親切で丁寧なご指導に深く感謝いたします。また、博士後期課程において 2 年間、東邦大学理学部の特別研究生および後藤研究室の一員として研究に携わりました。後藤研究室の後藤勝講師にはタンパク質の結晶化や構造解析をはじめ、この研究について多大なご指導を賜りました。心より御礼申し上げます。また、後藤研究室の大学院生ならびに卒研生の皆様に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、入手困難な試薬を分けて下さり、本研究で扱った酵素に関して貴重なご意見を頂きました高知大学農林海洋科学部の村松久司准教授に心より御礼申し上げます。アミノ酸配列解析に多大なご協力頂きました島根大学生物資源科学部の芦田裕之助教および滋賀医科大学生化学・分子生物学講座の田中裕之学内講師に深く感謝致します。X線結晶構造解析における放射線取扱に関して多大なご助力およびご指導頂きました、伊掛浩輝准教授に深く感謝いたします。セミナーや報告会、学会準備等で貴重なご意見・ご指導頂きました鈴木佑典助教に深く感謝いたします。

実験を進めるにあたり、佐久田綾先輩に遺伝子クローニングについて丁寧なご指導頂きました。大学院生の石村駿君および卒研生の菅野裕司君に緑藻細胞を用いた実験についてご協力頂きました。心より感謝申し上げます。環境微生物学研究室でともに過ごした卒業生を含む卒研究生や大学院生、研究室の先輩方に心から感謝致します。ありがとうございました。