

## イネのセリンデヒドラターゼ/ラセマーゼ： Mg<sup>2+</sup>による酵素反応の制御機構の発見

郷 上 佳 孝, 伊 藤 克 佳, 老 川 典 夫  
(関西大学 化学生命工学部 生命・生物工学科\*)

### **Serine Racemase from *Oryza sativa* L.: Identification of Enzyme Reaction Regulation Mechanism by Mg<sup>2+</sup>**

Yoshitaka GOGAMI, Ito KATSUYOSHI and Tadao OIKAWA  
*Department of Life Science and Technology, Faculty of chemistry, Material Bioengineering,  
Kansai University, Suita Osaka 564-8680*

#### Summary

The serine racemase from *Oryza sativa* L. is a pyridoxal 5'-phosphate containing enzyme that catalyzes a racemization and a dehydration of serine. In this study, we constructed the high expression system of the serine racemase from *Oryza sativa* L. in *Escherichia coli*, and examined the effect of the metal ions on the activity. The serine racemase activity increased by addition of Mg<sup>2+</sup> or Ca<sup>2+</sup>, while the dehydratase activity decreased by Mg<sup>2+</sup> or Cu<sup>2+</sup>. The kinetic analysis showed that Mg<sup>2+</sup> does not affect on the Vmax value of the racemase activity but decreases the Km value for L-serine. These results suggest that the serine racemase and dehydratase activities are regulated by Mg<sup>2+</sup>.

D-アミノ酸は、生体内に存在する希少アミノ酸と考えられてきたが、分析技術の発達に伴い、ヒトなどの哺乳動物の体内に遊離型および結合態D-アミノ酸が存在することが明らかにされ<sup>1)</sup>、その由来や生理的機能が注目されている。近年イネやシロイヌナズナの全ゲノムが解読されたことにより、これらのゲノム中に動物セリンラセマーゼと相同性の高い遺伝子が存在することが明らかになった。また植物由来のセリンラセマーゼホモログは、ヒトやマウスのセリンラセマーゼと同様にセリンラセマーゼおよびD-, L-セリンデヒドラターゼ活性を示すことが確認されている<sup>2)</sup>。植物体内のD-アミノ酸はアミノ酸ラセマーゼなどより生合成されると考えられているが、その生理的機能は明らかにされていない。そこで本研究ではイネのセリンラセマーゼをクローニングし、酵素科学的性質を解明するとともに本酵素の活性に及ぼす金属イオンの影響を調べ、本酵素反応の金属イオンによる制御機構を解明することを目的とした。

#### 実験方法

##### イネ (*Oryza sativa* L.) のセリンラセマーゼのクローニングと活性に及ぼす金属イオンの影響

イネ (*Oryza sativa* L.) のセリンラセマーゼ遺伝子 (*Os-ser*) をPCRで増幅し、大腸菌を宿主として高発現系を構築した。得られた形質転換体をLB (100 µg/mLアンピシリンを含む) 培地を用いて37°CでOD<sub>600</sub>が0.6に達するまで培養後、15°Cに冷却し、24時間振とう培養後集菌し、得られた菌体を超音波破碎した。遠心分離後、上清を回収しNi-NTAカラムクロマトグラフィーを用いてセリンラセマーゼを精製した。得られた精製酵素標品を用いて、セリンラセマーゼお

\*所在地：大阪府吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

よびセリンデヒドラターゼ活性に及ぼす金属イオンの影響を検討した。セリンラセマーゼ活性はPLPを補酵素，L-セリンを基質として用い，ラセマーゼ反応の結果生成するD-セリンをN-アセチル-L-システインでキラル誘導化後，逆相高速液体クロマトグラフィー<sup>3)</sup>で定量し測定した。デヒドラターゼ活性はPLPを補酵素，L-またはD-セリンを基質として用い，デヒドラターゼ反応の結果生成するピルビン酸を，サリチルアルデヒド法を用いて定量し測定した。本酵素活性におよぼす金属イオンの影響は，各種金属イオンを終濃度が1 mMになるように反応液中に添加し測定した。酵素反応は30℃で行った。

### 結果および考察

本酵素のデヒドラターゼ活性はFe<sup>2+</sup>，Al<sup>3+</sup>で活性化され，Mg<sup>2+</sup>，Zn<sup>2+</sup>，Cu<sup>2+</sup>で阻害された。またラセマーゼ活性ではMg<sup>2+</sup>，Ca<sup>2+</sup>で活性化され，Zn<sup>2+</sup>，Cu<sup>2+</sup>で阻害されることがわかった (Table 1)。反応速度論的解析から，Mg<sup>2+</sup>は本酵素のラセマーゼ活性のV<sub>max</sub>には影響をおよぼさないが，基質L-セリンに対するK<sub>m</sub>を減少させることがわかった (Table 2)。玄米中にはCa<sup>2+</sup> (約100 ppm) よりもMg<sup>2+</sup> (約1300 ppm) の方がより高濃度で含まれていることが報告されており<sup>4)</sup>，また酵母Schizosaccharomyces pombeのセリンラセマーゼの立体構造解析の結果明らかにされたMg<sup>2+</sup>結合モチーフが本酵素にも存在していることなどから，Mg<sup>2+</sup>が本酵素の2つの酵素反応を調節し，制御している可能性が示唆された。

**Table 1** Effect of metal ions on racemase and dehydratase activity

	Relative activity (%)	
	Racemase activity	Dehydratase activity
Blank	100	100
Mg <sup>2+</sup>	116	71.8
Ca <sup>2+</sup>	110	75.0
Ca <sup>2+</sup>	90	33.9
Zn <sup>2+</sup>	16	8.87
Cu <sup>2+</sup>	46	3.23
Al <sup>3+</sup>	79	110
Fe <sup>2+</sup>	55	108

(n = 3)

**Table 2** Kinetic parameters for serine racemase and serine dehydratase activities of *Oryza sativa* L.

	Racemase		Dehydratase	
	V <sub>max</sub> (μmol/min/mg)	K <sub>m</sub> (mM)	V <sub>max</sub> (μmol/min/mg)	K <sub>m</sub> (mM)
None	0.25	18.0	0.42	27.7
1 mM MgCl <sub>2</sub>	0.21	10.0	0.25	18.4

(Substrate: L-Serine)

## まとめ

イネのセリンラセマーゼホモログを大腸菌にクローニングし、精製酵素標品を用いてその酵素科学的性質を検討したところ、本酵素はセリンのラセミ化反応およびL-およびD-セリンからピルビン酸とアンモニアを生成するデヒドラターゼ反応の両反応を触媒するバイファンクショナル酵素であることが明らかになった。さらにこれらの反応におよぼす金属イオンの影響を調べたところ、本酵素のラセマーゼ活性は $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ で活性化されることが明らかになった。これはヒト<sup>5)</sup>やマウス<sup>6)</sup>由来のセリンラセマーゼと同様であった。一方デヒドラターゼ活性は $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ で阻害された。これらの金属イオンの酵素活性におよぼす影響は同じ植物由来のシロイヌナズナのセリンラセマーゼとは異なっていた。また $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ ではラセマーゼおよびデヒドラターゼ活性は共に阻害されることがわかった。またL-セリンを基質として反応速度論的解析を行ったところ、反応系内の $Mg^{2+}$ の添加によりラセマーゼ活性における基質L-セリンと酵素との親和性が高くなったことにより触媒効率が増加した (Table 2)。またデヒドラターゼ活性においては反応系内の $Mg^{2+}$ 濃度の添加により基質L-セリンと酵素との親和性が高くなったが、 $V_{max}$ が低くなることによって触媒効率が低下した (Table 2)。これらの結果から、 $Mg^{2+}$ はイネセリンラセマーゼのラセマーゼ活性およびデヒドラターゼ活性の二つの酵素反応を制御している可能性が示唆された。

## 参考文献

- 1) Hashimoto A, Oka T (1997) Prog Neurobiol 52(4): 325 - 353.
- 2) 伊藤克佳, 郷上佳孝, 岸本勝也, 老川典夫 (2007) イネセリンラセマーゼ/デヒドラターゼクローニングと酵素科学的性質の解明, 日本農芸科学会2007年度大会講演集: 213.
- 3) Ono K, Yanagida K, Oikawa T, Ogawa T, Soda K (2006) Phytochemistry 67: 856 - 860.
- 4) Yasui A, Shindoh K (2000) BUNSEKI KAGAKU Vol. 49, No. 6, pp. 405 - 410.
- 5) Cook SP, Galve-Roperh I, Martínez del Pozo A, Rodríguez-Crespo I (2002) J Biol Chem 277(31): 27782 - 27792.
- 6) Stríšovský K, Jirásková J, Barinka C, Majer P, Rojas C, Slusher BS, Konvalinka J (2003) FEBS Lett 535(1-3): 44 - 48.