

イネのセリンラセマーゼ： マグネシウム（Ⅱ）イオンによる構造変化と2酵素活性の制御

郷 上 佳 孝, 松 島 由 貴, 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. : Regulation of Two Enzyme Activities and Structural Changes by Magnesium (II) Ion

Yoshitaka GOGAMI, Yuki MATSUSHIMA and Tadao OIKAWA
Department of Life Science and Technology, Faculty of Chemistry, Material Bioengineering,
Kansai University, Suita Osaka 564-8680, Japan

Summary

The serine racemase is a bifunctional enzyme that catalyzes a racemization and a dehydration (α , β -elimination) of serine, and it has been found in various eukaryotes, such as human, mouse, fission yeast, cellular slime mold and plants. The serine racemase belongs to the fold-type II of the pyridoxal 5'-phosphate (PLP) enzymes. We reported the cloning and expression of the serine racemase from *Oryza sativa* L. (SerR) and discovered the regulation mechanism of two enzyme reactions by Magnesium (II) ion (Mg^{2+}). To examine the regulation mechanism of Mg^{2+} , we tried to analyze the fluorescence quenching of tryptophan (Trp) residues in SerR by acrylamide. The result showed that the structure of SerR is distorted by the addition of Mg^{2+} , and this structural change probably regulates the two enzyme activities.

D-アミノ酸はかつて非天然物と考えられていたが、分析技術の向上に伴い、微生物をはじめとする様々な生物にその存在が報告されている。例えば微生物の細胞壁のペプチドグリカン層には、D-アラニンやD-グルタミン酸が必須であり¹⁾、またD-アラニンは水性甲殻類のオスモライトとして働くことが知られている。D-セリンは、特に哺乳類の脳に多く存在し、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体のグリシン結合サイトのコアゴニストであり、統合失調症の治療薬として期待されている²⁾。また脳内でD-セリンはセリンラセマーゼによって生合成されている³⁾。われわれは植物では発芽玄米中にD-セリンがその他のD-アミノ酸と比べて高い割合 (D/(D+L)%) で存在していることを確認しており、そのD-セリンの生合成に関与すると考えられる、セリンのラセミ化と脱水反応を触媒するセリンラセマーゼ (SerR) の存在を明らかにした⁴⁾。また本酵素のラセマーゼ活性の触媒効率 (k_{cat}/K_m) は、 Mg^{2+} 存在下では基質との親和性が高くなることによって増加し、デヒドラターゼ活性の触媒効率は V_{max} が大きく低下することによって減少することを明らかにした。本研究では、 Mg^{2+} の本酵素の構造変化に及ぼす影響について、アクリルアミドを用いる蛍光消滅法で検討した。

実験方法

イネのセリンラセマーゼのアクリルアミドを用いた蛍光消滅の測定

大腸菌での発現系を用いて調製した粗酵素溶液から SerR を、Ni-NTA (QIAGEN) カラムクロマトグラフィーで精製した。その精製 SerR 標品 (0.5 mg/mL) に、10 mM 2-(N-Cyclohexylamino)ethanesulfonic acid (CHES)-NaOH (pH 9.0) に溶解したアクリルアミド溶液 (0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.20, 0.25 M) を添加し、10 mM 基質または 1 mM Mg^{2+} の存在下および非存在下でトリプトファン残基の蛍光消失を、励起波長 295 nm で生じる蛍光を 330 nm で分光蛍光光度計を用いて測定した。また Stern-Volmer 定数は①式より算出した。

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q] \dots \dots \dots \textcircled{1}$$

F_0 : 消光剤 (アクリルアミド) 非存在下での蛍光強度 F : 蛍光強度 Q : 消光剤濃度 (M) K_{sv} : Stern-Volmer 定数

結果と考察

*所在地：大阪府吹田市山手町 3-3-35 (〒564-8660)

われわれは本酵素の4つのトリプトファン残基(Trp136, Trp257, Trp312, Trp333)の立体的配置を調べるために、分裂酵母のセリンラセマーゼの立体構造を用いて本酵素の推定立体構造を作成した(Fig. 1a)。その結果Trp257が本酵素の活性中心のMg²⁺結合サイトの近傍に位置し(Fig. 1b)、また他のトリプトファン残基は本酵素の表面にあることが推定された。さらに分裂酵母のセリンラセマーゼにはトリプトファン残基が存在しないが、本酵素には4つ存在していることから蛍光消失に適していることがわかった。本酵素の活性に及ぼすMg²⁺の制御機構を調べるために、Mg²⁺存在下および非存在下、基質D-セリンまたはL-セリン存在下でアクリルアミドを用いた蛍光消失を行った(Fig. 2a, b)。その測定結果よりStern-Volmerプロット(Fig. 1c)を用いてK_{sv}値を算出した(Table 1)。

Table 1 Stern-Volmer constants

Substrate	Mg ²⁺	K _{sv}
None	0 mM	3.12
None	+ 1 mM	2.96
L-Ser	0 mM	3.26
L-Ser	+ 1 mM	3.07
D-Ser	0 mM	3.10
D-Ser	+ 1 mM	2.89

Mg²⁺の添加により、本酵素のトリプトファン残基とアクリルアミドの相互作用が低下し、本酵素の立体構造に歪みが生じていることがわかった。その結果、Mg²⁺が本酵素の立体構造を変化させ、L-セリンとD-セリンの2つの基質に対するラセマーゼ活性とデヒドラターゼ活性を制御し

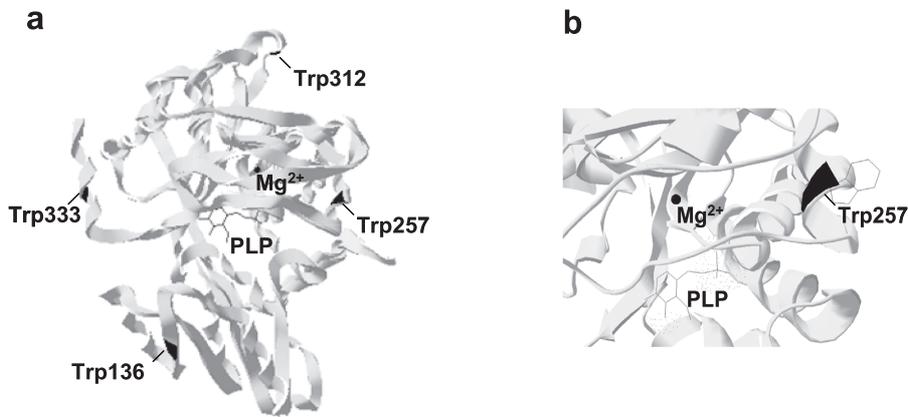


Fig. 1 Proposed three-dimensional subunit structure of the serine racemase from *Oryza sativa* L.

a: Subunits structure. The three-dimensional subunit structure of Os-SerR. Mg²⁺ is shown as a black sphere.
b: Active site of SerR. Try257, PLP, and Mg²⁺ are shown as a black ribbon, white sticks, and a black sphere, respectively.

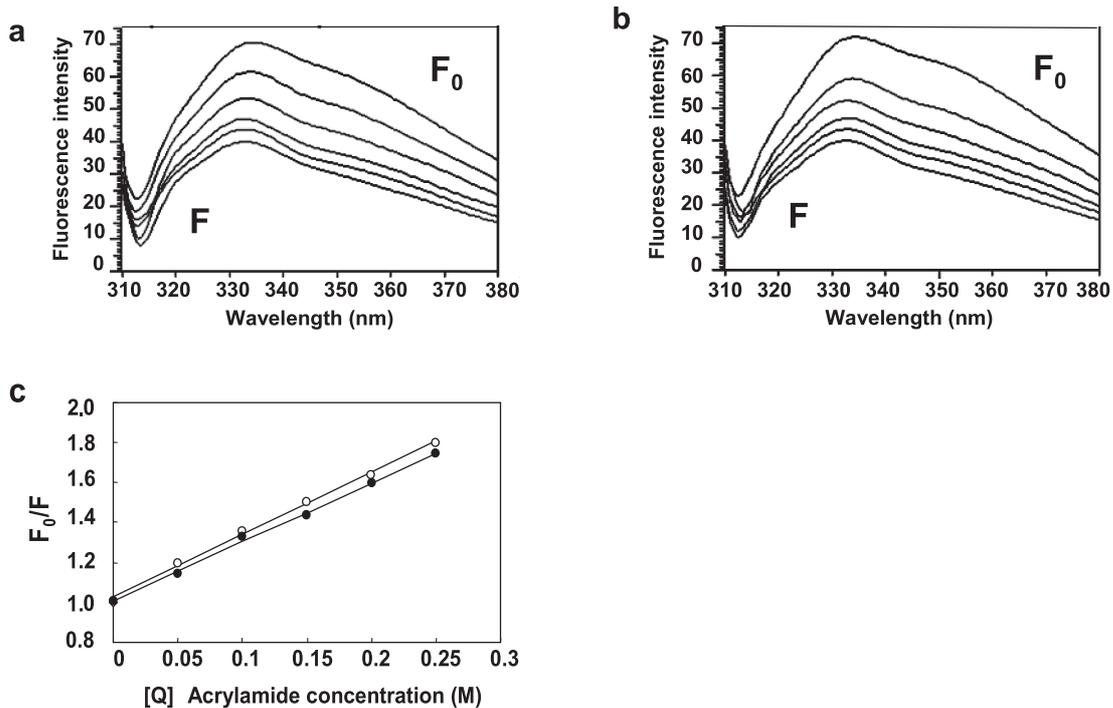


Fig. 2 Fluorescence quenching analysis of the tryptophan residues in *Os*-SerR by acrylamide.

a: Fluorescence spectra in the absence of Mg²⁺. b: Fluorescence spectra in the presence of Mg²⁺. c: Stern-Volmer plot.

ていることが示唆された。また分裂酵母のセリンラセマーゼでは Lys57 と Ser82 残基は L-セリンおよび D-セリンの α -プロトンの付加および引き抜きに関与しており、これらの残基により 2つの酵素反応が進行すると考えられている⁵⁾。しかし両反応の詳細な制御メカニズムは明らかになっていない。本酵素においては Lys68 と Ser93 が分裂酵母の Lys57, Ser82 と同様に保存されており、2つの酵素反応に作用していると考えられる。今回の研究で明らかにした酵素学的性質に基づいて推測すると、本酵素の機能は L-および D-セリンを分解するか、それらを合成する働きをしていると考えられるが、その機能はまだ明らかではない。

参考文献

1) Osborn MJ (1969) Structure and biosynthesis of the

- bacterial cell wall. *Annu Rev Biochem* 38: 501–538.
- 2) Tsai G, Yang P, Chung L, Lange N, Coyle JT (1998) D-serine added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 44: 1075–1076.
- 3) Wolosker H, Sheth KN, Takahashi M, Mothet JP, Brady RO Jr, Ferris CD, Snyder SH (1999) Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 721–725.
- 4) 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, 日本農芸化学会 2007 年度大会講演集: pp. 213.
- 5) Yoshimura T (2008) Structure and function of amino acid racemase. *Seikagaku* 80 (4): 324–330.