

進化分子工学による高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来
ホモイソクエン酸脱水素酵素(TtHICDH)の基質特異性の変換

Directed evolution of homoisocitrate dehydrogenase
from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*
鈴木夢生, 朝田久仁子, 宮崎淳一, 富田武郎, 葛山智久, 西山真

Yumewo Suzuki, Kuniko Asada, Junichi Miyazaki, Takeo Tomita, Tomohisa Kuzuyama,
Makoto Nishiyama
(東京大学生物生産工学研究センター)
e-mail: umanis@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* のホモイソクエン酸脱水素酵素(HICDH)は、 α -アミノアジピン酸を経由するリジン生合成第4番目の酵素であり、ホモイソクエン酸から2-オキソアジピン酸を合成する脱炭酸脱水素反応を触媒する。TCA(Tricarboxylic acid)回路のイソクエン酸脱水素酵素(ICDH)およびロイシン生合成の3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素(IPMDH)の paralog であり、触媒する反応が非常に類似している。

高度好熱菌 *thermophilus* の HICDH(TtHICDH)は、イソクエン酸(IC)およびホモイソクエン酸(HIC)を基質として認識するが、3-イソプロピルリンゴ酸(3-IPM)を基質として認識しない。TtHICDH の基質認識機構を明らかにするため、TtHICDH の基質認識部位のアミノ酸配列を改変した様々な変異体を作製したところ、2ScHICDH(R85V/Y86A) が3-IPM を基質として認識できるようになったことがわかった^[1]。ところが、2ScHICDH の IPMDH 活性は微弱であり、IPMDH をコードする *leuB* 遺伝子が欠損した大腸菌の生育を相補できなかった。

そこで、進化分子工学により 2ScHICDH を template として 3-IPM に対する活性の向上を試みた。結果、*leuB* 欠損の大腸菌の生育を相補する TtHICDH の変異体が4つ得られた。その中で、最も活性の高かった変異体・LR5-1 およびその His15 を Tyr に戻した変異体 LR5-1/Y15H の反応速度論的解析をおこなった結果 IPM に対する K_M に比べて k_{cat} に大きな改善が見られ、これが、大腸菌の生育の相補の原因であることが分かった。また、改変体 LR5-1/Y15H は、37°Cでの k_{cat} は TtIPMDH の 1/2 以下だが、60°Cでは、TtIPMDH を上回ることがわかった。また、LR5-1 で見つかった変異をひとつずつ 2ScHICDH のものに戻したものなど多数の変異酵素を作製し、それらの反応速度論的解析を行ったところ、導入したすべての変異が活性向上に寄与していることが示された。これらの変異の多くは活性中心から離れて分子表面に存在していることから、これらの構造の可動性を高めることで k_{cat} を上昇させている可能性が考えられた。

これまでに、TtHICDH の基質フリーでの結晶構造は明らかにしているが^[2]、基質や補酵素との複合体構造は得られていない。現在、結晶構造解析による TtHICDH 野生型酵素や改変酵素の基質認識機構の解明を試みている。

Reference

- [1] Miyazaki, J., Kobashi, N., Nishiyama, M., Yamane, H. (2003) *J. Biol. Chem.* 278(3):1864-71
- [2] Miyazaki, J., Asada, K., Fushinobu, S., Nishiyama, M. (2003) *J. Bacteriol.* 187(19):6779-88