

No. 61

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 株のグルタミン酸脱水素酵素(Gdh)の活性調節機構の解析

Regulatory mechanism of glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB27

富田武郎, 宮川智治, 宮崎高志, 葛山智久, 西山真

Takeo Tomita, Tomoharu Miyagawa, Takashi Miyazaki, 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

グルタミン酸脱水素酵素(Gdh)は、グルタミン酸の酸化的脱アミノ化とその逆反応である 2-オキシグルタル酸にアミノ基を付加する反応を可逆的に触媒する酵素であり、グルタミン酸シンターゼ、グルタミンシンターゼ、アスパラギンシンターゼとともにアンモニアの同化、アミノ酸合成、分解において重要な役割を担っている。*T. thermophilus* HB27 株はゲノム上に2つ並んだ *gdh* ホモログ遺伝子(*gdhA*, *gdhB*)を有しており、お互いに 50%近いアミノ酸配列相同性を持っているが、それらの酵素学的性質、活性制御機構は不明である。本研究は、両遺伝子の機能構造相関および活性調節機構を明らかにすることを目的とする。

両タンパク質の特性を解析するため、それぞれ大腸菌に組換え発現させ、アフィニティー精製し、グルタミン酸分解活性、生成活性を測定した。その結果、GdhA は Gdh 活性を持たない一方で、GdhB はグルタミン酸分解活性よりも生成活性の方が高いことが明らかとなった。Bovine 由来の Gdh の結晶構造を基にした活性中心のアミノ酸残基の比較から Gdh の反応において触媒残基であると考えられる bovineGDH の Lys126 にあたるアミノ酸残基が GdhB では保存されているのに対し、GdhA では Ala に置換されていた。この違いが、GdhA と GdhB の活性の有無の違いを決定付けていると考えられた。

一方、*T. thermophilus* 菌体から精製した native-Gdh の活性は分解活性の方が高いことが示された。ゲルろ過カラムを用いた分子量測定から組換え GdhB が 4 量体構造を持つのに対して、native-Gdh は GdhB とは異なり 6 量体構造を持つことが示唆された。RT-PCR により *gdhB* 遺伝子だけでなく Gdh 活性を持たない *gdhA* 遺伝子も転写されていること、さらに両遺伝子が同一転写単位に存在していることが示唆された。GdhA 抗体、GdhB 抗体を用いた Western blotting から GdhB だけでなく GdhA もタンパク質として翻訳されていることが明らかになった。さらに $\Delta gdhA$, $\Delta gdhB$, $\Delta gdhA/\Delta gdhB$ 遺伝子破壊株において目的遺伝子が破壊されていること、また GdhA, GdhB 抗体がそれぞれのタンパク質に対して特異的な抗体であることが確認できた。

GdhA, GdhB を大腸菌で共発現させた結果、両者の相互作用が観察され、複合体タンパク質は GdhB 単体と比べてグルタミン酸生成活性が低下したことから、GdhA と GdhB の直接の相互作用を介した活性調節機構が存在することが示唆された。