

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来グルタミン酸脱水素酵素における
活性調節の分子機構の解析

Molecular mechanism for allosteric regulation of glutamate dehydrogenase from
Thermus thermophilus

富田武郎¹, 宮崎高志¹, 西山真^{1,2}

Takeo Tomita¹, Takashi Miyazaki¹, Makoto Nishiyama^{1,2}

(¹東大・生物生産工学研究センター, ²理研 SPring-8)

(¹Biotechnology Research Center, The University of Tokyo, ²RIKEN SPring-8)

e-mail: uttomi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

グルタミン酸脱水素酵素(GDH)は、NAD(H)または NADP(H)を補酵素として用い、グルタミン酸 (Glu) の酸化的脱アミノ化と 2-オキソグルタル酸(2-OG)の還元的アミノ化を可逆的に触媒する酵素であり、アンモニア同化や異化に重要な働きを担っている (Fig. 1)。また、GDH は TCA サイクルの中間体でもある 2-OGと、Arg, Pro, Orn のようなアミノ酸の生合成における初発物質であり、様々な窒素化合物における窒素の供給源である Glu の間の変換を行うことから、炭素・窒素代謝、アミノ酸代謝に重要な役割を担うと考えられる。*T. thermophilus* のゲノム上にはお互いに 50%程度のアミノ酸配列相同性を有する *gdh* ホモログ遺伝子(*gdhA*, *gdhB*)が 2 つ並んで存在する。GdhB は酸化的脱アミノ化よりも還元的アミノ化反応に強い活性を示すが、GdhA は脱水素酵素活性を示さない。GdhB は GdhA とヘテロ複合体を形成することにより、酸化的脱アミノ化の活性が上昇し、その一方で還元的アミノ化活性が低下する。また、GdhA/GdhB ヘテロ複合体では、ロイシンを始めとした分岐鎖アミノ酸などにより顕著な活性の上昇が観察される。

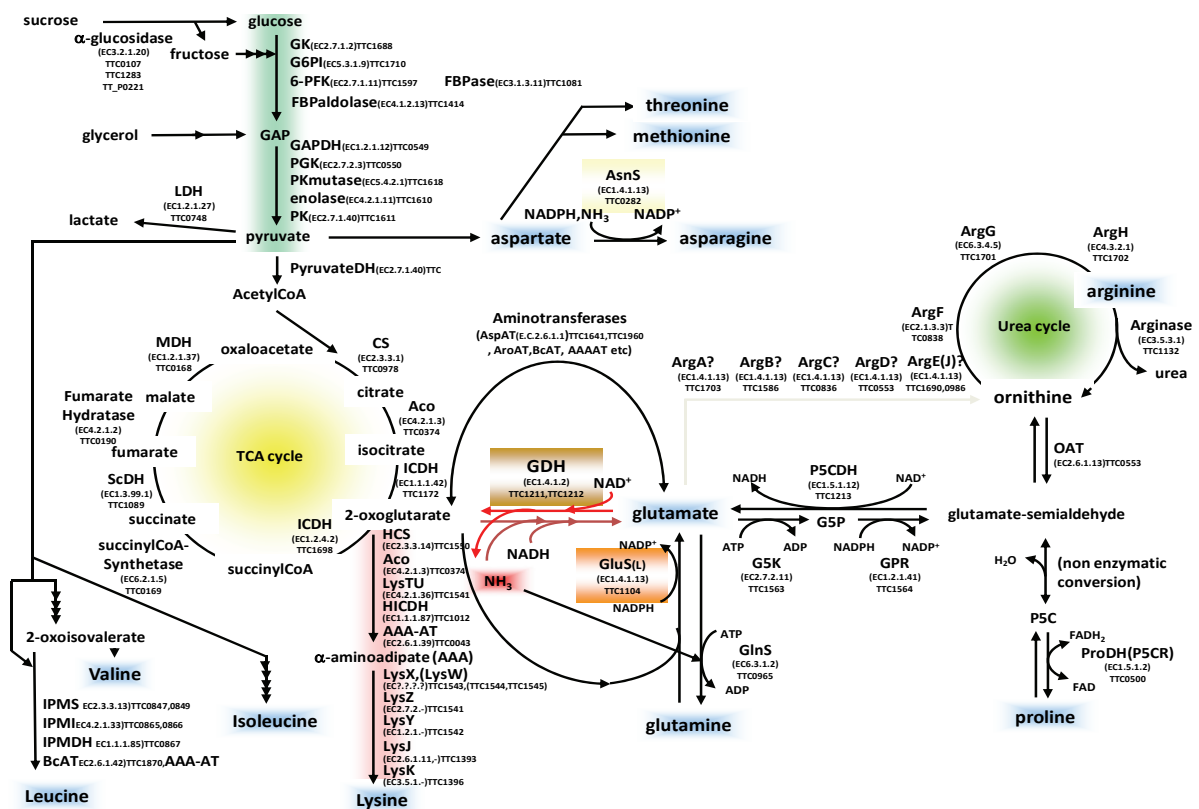


Fig. 1 *T. thermophilus*のGDH周辺の代謝マップ

今回、ロイシンによる GDH のアロステリック調節の構造基盤を明らかにするため、GdhA/GdhB/Leu 複合体およびGdhA の結晶構造解析を行った。GdhA/GdhB/Leu の結晶構造を 2.9Å 分解能で、GdhA の結晶構造を 2.2Å 分解能で構造決定に成功し、現在精密化中である。GdhA/GdhB/Leu は古細菌、バクテリア、動物で知られているものと同様の 6 量体構造を有していた。一方、GdhA はホモ 4 量体構造を有していた (Fig. 2)。GdhA の 4 量体では通常見られる触媒ドメイン同士により形成される接触面の他に、GDH ファミリー酵素ではこれまでに例のないヌクレオチド結合ドメイン同士により形成される接触面を有することでホモ 4 量体が形成されていることが明らかとなった。

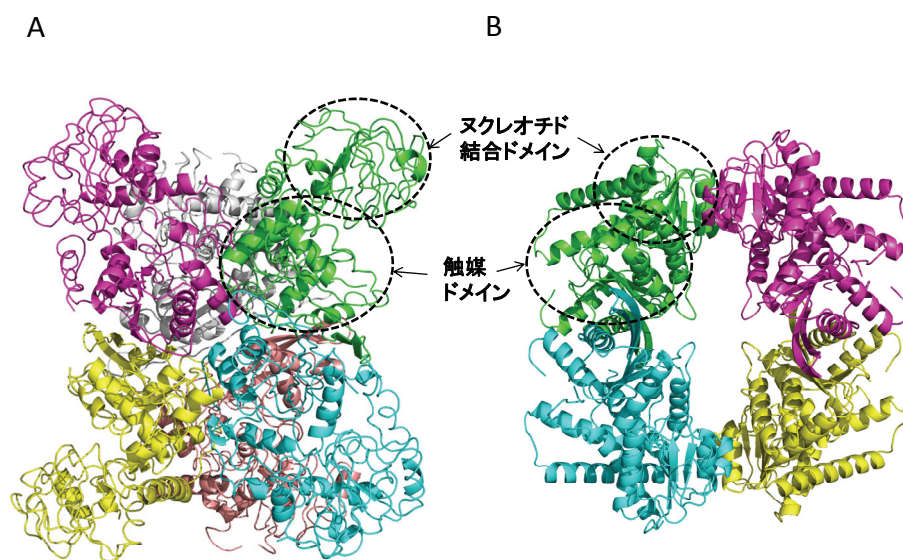


Fig. 2 GDHの結晶構造 (A) GdhA/GdhB/Leu複合体の6量体構造
(B) GdhAの4量体構造

アロステリック調節の生理機能を明らかにするために *gdhB* 遺伝子の C 末端に his-tag を融合した組換え株を作製し、pull down assay を行った結果、*T. thermophilus* において GdhA と GdhB が結合していることが観察された。また、最少培地等における遺伝子破壊株の生育実験から GdhB がグルタミン酸分解に関わる唯一の酵素であることと、GdhA、GdhB とともに少なくとも観察した条件下ではグルタミン酸合成には関与しないことが明らかとなった。以上のことからロイシンによるシグナルがグルタミン酸分解の調節により密接に関わっていることが示唆された。