

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来 Threonine dehydratase 変異体の作成  
**Site-directed Mutagenesis of Threonine dehydratase from *Thermus thermophilus* HB8**

臼井 舞<sup>1</sup>, 後藤 勝<sup>1</sup>, 佐藤 浩之<sup>1</sup>, 山内 貴恵<sup>2</sup>, 三原 久明<sup>2</sup>,  
 栗原 達夫<sup>2</sup>, 江崎 信芳<sup>2</sup>, 宮原 郁子<sup>3</sup>, 広津 建<sup>4</sup>

Mai Usui<sup>1</sup>, Masaru Goto<sup>1</sup>, Hiroyuki Satoh<sup>1</sup>, Takae Yamauchi<sup>2</sup>, Hisaaki Mihara<sup>2</sup>,  
 Tatsuo Kurihara<sup>2</sup>, Nobuyoshi Esaki<sup>2</sup>, Ikuko Miyahara<sup>3</sup>, Ken Hirotsu<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>東邦大・理, <sup>2</sup>京大・化研, <sup>3</sup>大阪市大・院理, <sup>4</sup>理研・播磨研)

(<sup>1</sup>Toho Univ., <sup>2</sup> Inst. for Chemical Research, Kyoto Univ., <sup>3</sup>Osaka City Univ.,  
<sup>4</sup>Riken Harima Inst.)

e-mail: [goto@biomol.sci.toho-u.ac.jp](mailto:goto@biomol.sci.toho-u.ac.jp)

Threonine dehydratase (TDH) は L-Threonine を脱水し、2-ketobutyrate と NH<sub>3</sub> を生成する反応を触媒し、ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) 依存性酵素である。また TDH は Serine dehydratase (SDH) や Serine racemase (SerR) と同じ PLP 酵素 FoldType II に属している。

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の TDH (tTDH) の native 構造を 2.15 Å 分解能で決定し、Lys51 が PLP とシッフ塩基を形成する触媒残基であることを確認した。また tTDH と SDH および SerR の活性部位の構造を比較したところ、SDH ではアラニンである残基が tTDH や SerR ではセリン残基に置換されていることが分かった。

データベースでの一次配列の比較においても、一般的に、この残基は PLP 依存性の dehydratase ではアラニン残基として保存されており、PLP 依存性の racemase ではセリン残基として保存されていることを確認した。

そのため PLP 依存性 racemase に保存されている Ser73 を持つ tTDH がラセミ化活性を持つのではないかと考えられた。そこで tTDH の酵素活性を測定したところ、D,L-Threonine、D,L-Serine を基質とするデヒドラターゼ活性とラセミ化活性を有していることがわかった。しかし、デヒドラターゼ活性が D-Threonine、D-Serine を基質としているか、ラセミ化活性により生じた L-Threonine、L-Serine を基質としているかについての詳細はわからなかった。

Lys51 と Ser73 のラセミ化活性とデヒドラターゼ活性との関係を調べるため、PCR cloning による K51A、S73A 変異体の作成、大量発現系の構築を行った。今後、両変異体に対して酵素活性測定を行い、TDH の基質特異性と触媒反応のメカニズムを明らかにしたい。

