

タンパク質工学によるリンゴ酸脱水素酵素の高活性化

～産業利用を目指した酵素の機能改変～

理学研究科 生命科学専攻

©D2 ひらぎけいと 平木慶人、特任講師 にしおかずや 西尾和也、教授 みずしまつねひろ 水島恒裕

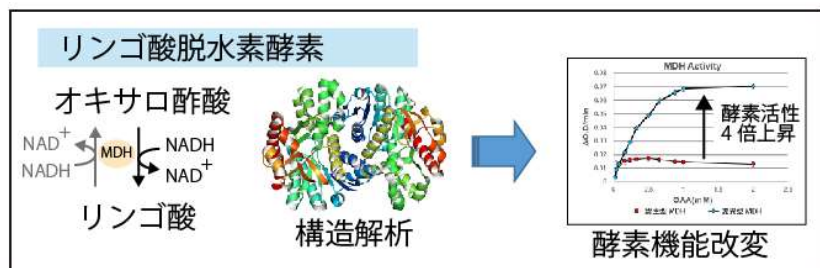
キーワード

酵素利用, リンゴ酸脱水素酵素 (MDH), タンパク質工学, MDH-UV 法

研究概要

リンゴ酸脱水素酵素 (MDH) はオキサロ酢酸とリンゴ酸の相互変換を触媒する酸化還元酵素であり、細胞内のエネルギー代謝に関わるクエン酸回路やグリオキシル酸回路で働いている。また、MDH は NAD(H) を補酵素とすることから、NAD⁺ と NADH の吸収極大の違いを利用することで心臓や肝機能障害の指標となる血中アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) の検出に用いられている。

我々は出芽酵母の MDH3 に着目し、MDH3 が一般的な MDH より高い酵素活性を持つことを見出した。さらに、反応状態の MDH3 の構造解析を行い、MDH3 の Active-site Loop (MDH の触媒反応において基質の有無に応じて開閉する特徴的な領域) が一般的な MDH とは異なり常に開状態であることを明らかにした。MDH3 は、この構造的な特徴により触媒反応の回転数が増加し、一般的な MDH より高い活性を持つと考えられる。次に MDH3 と一般的な MDH の立体構造を比較し、Active-site Loop を開状態に保つために必要なアミノ酸残基を特定した。また、この結果をもとに AST の検査薬として用いられる好熱菌の MDH に部位特異的変異を導入し、MDH3 型の Active-site Loop 構造をもつ高活性型 MDH を作製した。



アピールポイント

リンゴ酸脱水素酵素 (MDH) は血液中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 検出に用いる MDH-UV 法に使用される酵素であり、その活性や安定性の向上を目指した研究が行われてきた。

また近年 MDH は、大腸菌や *Mannheimia* 属菌において、タンパク質の強制発現や別種の酵素への置換により酵素活性を高めることで、生分解性プラスチックであるポリブチレンサクシネートの原料となるコハク酸の生産量が増加することが報告されている。

本研究により開発した MDH の高活性化方法は、一般的な MDH に高く保存されたアミノ酸を部位特異的変異により高活性な出芽酵母 MDH3 と同じアミノ酸に置換し、Active-site Loop の特徴を変換する方法である。この変異導入部位は生物種の 90%以上が一般的 MDH 型であることから、好熱菌を含めた多様な MDH に対して有効であると考えられる。また、生体内には乳酸脱水素酵素 (LDH) 等、MDH と同様に NAD(H) を補酵素として脱水素反応を触媒する酵素が多数存在することから、これら多くの酵素の機能改変への応用が期待できる。

補酵素 NAD 依存
脱水素酵素
(MDH, LDH...)

酵素の
高活性化

物質生産
医療・健康