

イネのセリンラセマーゼの Glu219 と Asp225 は マグネシウム (II) イオンの結合に関与する

郷上佳孝, 老川典夫
(関西大学化学生命工学部生命・生物工学科*)

The Glu219 and Asp225 Residues of the Rice Serine Racemase Involve in Magnesium (II) Binding

Yoshitaka GOGAMI and Tadao OIKAWA

Department of Life Science and Technology, Faculty of Chemistry, Material Bioengineering,
Kansai University, Suita-shi, Osaka-Fu 564-8680, Japan

Summary

We constructed the Glu219Ala/Asp225Ala serine racemase (E219A/D225A SerR) by site-directed mutagenesis, and compared the effects of Mg^{2+} on the catalytic efficiency and the structure with those of the wild-type protein. The studies on the effects of Mg^{2+} on both enzyme activities in the Glu219Ala/Asp225Ala SerR revealed that the catalytic efficiencies (k_{cat}/K_m) of both serine racemase and dehydratase reactions in the E219A/D225A SerR were not affected by the addition of 1 mM Mg^{2+} , and Glu219 and Asp225 of the SerR are the essential amino acids residues for Mg^{2+} to affect both enzyme activities. Therefore, these amino acids residues are important for the SerR to form the Mg^{2+} -binding site. Judging from the difference of the K_{eq} values between the E219A/D225A SerR and the SerR, Mg^{2+} might effect on the equilibrium states in the racemase reaction. The fluorescence quenching analysis of the E219A/D225A SerR showed that Mg^{2+} probably bound to Glu219 and Asp 225 of the SerR causes a structural change in the ternary structure of the SerR, and this is one of the reasons for Mg^{2+} to increase a serine racemase activity and decrease a serine dehydratase activity of the SerR.

セリンラセマーゼはさまざまな生物にその存在が確認されており¹⁻⁴⁾, セリンのラセミ化と脱水反応を触媒する2機能酵素である。セリンラセマーゼは、その起源や機能によって、大きく2つのグループに分類することができる。グループ1は *Enterococcus gallinarum*⁵⁾ や *Streptomyces garyphalus*⁶⁾ などのバクテリア由来の酵素であり、細胞壁の成分である D-セリンを生合成する。グループ2は、イネ⁷⁾ やヒトやマウス⁸⁾ などの真核生物由来の酵素であり、セリンに高い基質特異性を示し、PLP 酵素のホールドタイプII型に属する。ヒトやマウスの酵素では脳内で D-セリンを生合成し、生成された D-セリンは NMDA 受容体のコアゴニストとして作用する⁹⁾。しかし、イネのセリンラセマーゼ (SerR) の機能は不明のままである。先にわれわれは、SerR では、 Mg^{2+} 存在下でラセマーゼ活性が上昇し、デヒドラーゼ活性が減少することを見出した。本研究では、SerR の Mg^{2+} の結合に関与すると推定されるアミノ酸残基に部位特異的変異を導入し、 Mg^{2+} が本変異型酵素の酵素活性と構造に及ぼす影響を検討した。

実験方法

1. イネのセリンラセマーゼ : E219A/D225A 変異酵素の調製と本酵素活性に及ぼす Mg^{2+} の影響

SerR の Mg^{2+} 結合部位に存在するアミノ酸残基 (Glu219 と Asp225) を、ホモロジー検索で推定した。これらのアミノ酸残基を部位特異的変異導入法 (オーバーラップエクステンション法) でそれぞれ Ala に置換し、E219A/D225A 変異型 *serr* を得た。そのフラグメントを pET21b にクローニングし、pET21b-E219A/D225A *serr* を構築した。本変異型酵素遺伝子を大腸菌 BL21 (DE3) で発現し、変異型酵素を Ni-NTA クロマトグラフィーで精製後、 Mg^{2+} が精製酵素標品の2つの酵素活性に及ぼす影響を検討した。

2. E219A/D225A 変異型 SerR のアクリルアミドを用いた蛍光消失の測定

大腸菌での発現系を用いて調製した粗酵素液から SerR を Ni-NTA カラムクロマトグラフィーで精製した。得られた精製 SerR 標品 (0.5 mg/mL) に、10 mM 2-(N-Cyclohexylamino)-

*所在地 : 大阪府吹田市山手町 3-3-35 (〒564-8680)

(ethanesulfonic acid (CHES)-NaOH (pH 9.0) に溶解したアクリルアミド溶液 (0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.20, 0.25 M) を添加し, 10 mM 基質または 1 mM Mg²⁺ の存在下および非存在下でトリプトファン残基の蛍光消失を, 励起波長 295 nm で生じる蛍光を 330 nm で分光蛍光光度計を用いて測定した。また Stern-Volmer 定数は①式より算出した。

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q] \dots\dots\dots \textcircled{1}$$

F₀: 消光剤 (アクリルアミド) 非存在下での蛍光強度
 F: 蛍光強度 Q: 消光剤濃度(M) K_{sv}: Stern-Volmer定数

Table 1 The kinetic parameters in E219A/D225A SerR

(a) Serine racemase reaction			
Substrate : L-Serine	k _{cat} (s ⁻¹)	K _m (mM)	k _{cat} /K _m (s ⁻¹ · mM ⁻¹)
	4.2 × 10 ⁻¹	1.3 × 10 ²	3.2 × 10 ⁻³
1 mM MgCl ₂	2.6 × 10 ⁻¹	78	3.3 × 10 ⁻³
Substrate : D-Serine			
	k _{cat} (s ⁻¹)	K _m (mM)	k _{cat} /K _m (s ⁻¹ · mM ⁻¹)
	1.2 × 10 ¹	40	3.0 × 10 ³
1 mM MgCl ₂	1.4 × 10 ⁻¹	48	3.0 × 10 ⁻³
(b) Serine dehydratase reaction			
Substrate : L-Serine	k _{cat} (s ⁻¹)	K _m (mM)	k _{cat} /K _m (s ⁻¹ · mM ⁻¹)
	1.2	1.5 × 10 ²	7.9 × 10 ⁻³
1 mM MgCl ₂	7.4 × 10 ⁻¹	96	7.7 × 10 ⁻³
Substrate : D-Serine			
	k _{cat} (s ⁻¹)	K _m (mM)	k _{cat} /K _m (s ⁻¹ · mM ⁻¹)
	2.7 × 10 ⁻¹	53	5.0 × 10 ⁻³
1 mM MgCl ₂	3.1 × 10 ⁻¹	58	5.2 × 10 ⁻³

結果と考察

E219A/D225A 変異型 SerR のセリンラセマーゼ活性およびセリンデヒドラターゼの比活性は, それぞれ親酵素の約 30, 50% に減少した。この活性の減少は, 変異導入により基質結合部位の近傍の立体構造が変化したこと由来すると考えられる。また E219A/D225A 変異 SerR の活性に及ぼす Mg²⁺ の影響を調べた結果, Mg²⁺ は, セリンラセマーゼ活性およびセリンデヒドラターゼ活性に影響を及ぼさないことが分かった。反応速度論解析の結果, 本変異型酵素では 1 mM Mg²⁺ の存在下で触媒効率に変化は見られなかった (Table 1)。しかし野生型酵素では, 1 mM Mg²⁺ の存在下でセリンラセマーゼ活性が上昇し, セリンデヒドラターゼ活性が減少することが明かになり⁷⁾, Glu219 と Asp225 は本酵素に Mg²⁺ の影響を及ぼすのに必須なアミノ酸残基であることが示唆された。Mg²⁺ による本酵素活性の制御機構を調べるために, Mg²⁺ 存在下および非存在下で, 基質 D-セリンまたは L-セリン存在下でアクリルアミドを用いた蛍光消失実験を行った。得られた測定結果に基づき Stern-Volmer プロット (Fig. 1c) を作成し K_{sv} 値を算出した (Table 2)。Mg²⁺ の添加により, 本変異型酵素のトリプトファン残基とアクリルアミドの相互作用は変化せず, 本酵素の立体構造の変化が生じていないことが明らかとなった。しかし野生型酵素では, Mg²⁺ の添加により本酵素のトリプトファン残基とアクリルアミドの相互作用が低下したこと⁷⁾, Mg²⁺ が Glu219 と Asp225 に結合し, 本酵素の立体構造を変化させ, 二つの酵素活性を制御していることが示唆された。植物では, D-セリンやセリンラ

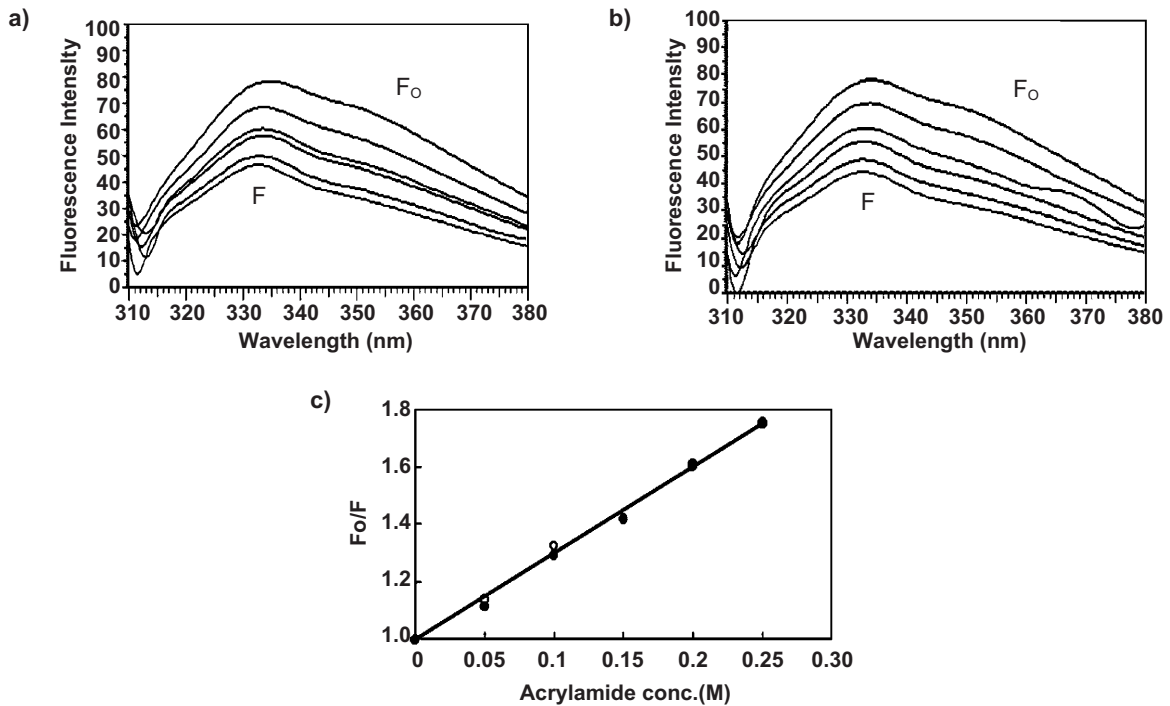


Fig. 1 Fluorescence quenching analysis of the tryptophan residues in E219A/D225A SerR by acrylamide. a. Fluorescence spectra in the absence of Mg²⁺. b. Fluorescence spectra in the presence of Mg²⁺. c. Stern-Volmer plot ○: In absence of Mg²⁺, ●: In presence of Mg²⁺.

Table 2 Stern-Volmer constants

Substrate	Mg ²⁺	E219A/D225A SerR	SerR*
		K _{sv}	K _{sv}
None	0 mM	3.03	3.12
None	1 mM	3.07	2.96
L-Ser	0 mM	2.98	3.26
L-Ser	1 mM	2.98	3.07
D-Ser	0 mM	3.27	3.10
D-Ser	1 mM	3.27	2.89

*Reference 7)

セマーゼの生理的機能は明らかになっていないが、発芽玄米中にはD-セリンが他のアミノ酸と比べて高い含有割合((D/(D+L)))で存在していることがわかっている⁷⁾。D-セリンは、シロイヌナズナに低濃度でも生育阻害を引き起こすことが報告されている¹⁰⁾。したがって、植物セリンラセマーゼの生理的機能は、根から吸収されたD-セリンを分解し、D-セリンを解毒する作用であると考えられる。

参考文献

- 1) Wolosker H, Sheth KN, Takahashi M, Mothet JP, Brady RO Jr, Ferris CD, Snyder SH (1999) Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine. *Proc Natl Acad Sci, USA* 96: 721–725.
- 2) Miranda JD, Santoro A, Engelender S, Wolosker H (2000) Human serine racemase: molecular cloning, genomic organization and functional analysis. *Gene* 256: 183–188.
- 3) Uo T, Yoshimura T, Shimizu S, Esaki N (1998) Occurrence of pyridoxal 5'-phosphate-dependent serine ra-

cemase in silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys Res Commun* 246: 31–34.

- 4) Ohnishi M, Saito M, Wakabayashi S, Ishizuka M, Nishimura K, Nagata Y, Kasai S (2008) Purification and characterization of serine racemase from a hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum islandicum*. *J Bacteriol* 190: 1359–1365.
- 5) Billot-Klein D, Blanot D, Gutmann L, van Heijenoort J (1994) Association constants for the binding of vancomycin and teicoplanin to *N*-acetyl-D-alanyl-D-alanine and *N*-acetyl-D-alanyl-D-serine. *Biochem J* 304: 1021–1022.
- 6) Svensson ML, Gatenbeck S (1981) The Presence of Two Serine Racemases in *Streptomyces garyphalus*, a D-Cycloserine Producer. *Arch Microbiol* 129: 213–215.
- 7) Gogami Y, Ito K, Kamitani Y, Matsushima Y, Oikawa T (2009) Occurrence of D-serine in rice and characterization of rice serine racemase. *Phytochemistry* 70: 380–387.
- 8) Wolosker H, Blackshaw S, Snyder SH (1999) Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-*N*-methyl-D-aspartate neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci, USA* 96: 13409–13414.
- 9) Verrall L, Walker M, Rawlings N, Benzel I, Kew JN, Harrison PJ, Burnet PW (2007) D-Amino acid oxidase and serine racemase in human brain: normal distribution and altered expression in schizophrenia. *Eur J Neurosci* 26: 1657–1669.
- 10) Erikson O, Hertzberg M, Näsholm T (2004) A conditional marker gene allowing both positive and negative selection in plants. *Nat Biotechnol* 22: 455–458.