

## 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\*<sup>1)</sup>, 老川典夫<sup>1,2)</sup>

(<sup>1)</sup> 関西大学大学院・工学研究科, <sup>2)</sup> 関西大学・化学生命工学部)

【目的】 イネのセリンラセマーゼ (SerR) は、ピリドキサルリン酸を補酵素とし、Ser のラセミ化および脱水反応 (SerDH) を触媒するバイファンクショナル酵素である。先にわれわれは、これら 2 つの酵素活性がマグネシウム(II)イオン ( $Mg^{2+}$ ) 存在下で影響を受けることを見いだした。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。

【方法】 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でそれぞれ Ala に置換し、E219A/D225A 変異型酵素遺伝子を調製した。本変異型酵素遺伝子を大腸菌で発現し、変異型酵素を精製後、 $Mg^{2+}$  が精製標品の 2 つの酵素活性に及ぼす影響を検討した。また、アクリルアミドを用いる蛍光消失法で、 $Mg^{2+}$  が本変異型酵素の構造に及ぼす影響を検討した。SerR 活性は HPLC で、SerDH 活性はサリチルアルデヒド法で酵素反応の結果生成する Ser エナンチオマーまたはピルビン酸を定量し測定した。

【結果と考察】 E219A/D225A 変異型酵素の SerR および SerDH の比活性は、それぞれ親酵素の約 30, 50% に減少した。また反応速度論解析の結果、本変異型酵素の SerR および SerDH 反応に対する  $K_m$  および  $k_{cat}$  は、 $Mg^{2+}$  存在下でも変化しないことが明らかとなった。また本変異型酵素の SerR 反応の  $K_{eq}$  は、約 1 となり、 $Mg^{2+}$  は、とくに L-Ser を基質として用いた場合の親酵素の SerR 活性に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。さらに、アクリルアミドを用いる蛍光消失実験の結果から、本変異型酵素の構造は、 $Mg^{2+}$  の存在下でも変化しないことが明らかとなった。これらの結果から、SerR の Glu219 と Asp225 は、 $Mg^{2+}$  の結合に関与し、これらの残基に  $Mg^{2+}$  が結合することにより、SerR の構造が変化し、その結果、SerR の SerR 活性は増加し、SerDH 活性は減少すると考えられる。