
 研究論文紹介

 分裂酵母のピリドキサルレダクターゼの精製、クローニング、触媒活性
 —アルド-ケトレダクターゼスーパーファミリー中で
 新たなファミリーを成す酵素—

高知大学農学部生物資源科学科*、遺伝子実験施設**、大阪大学大学院理学研究科***

 中野 充宏[°]、森田 友岳[°]、山本 朋和[°]、佐野 尚[°]、
 芦内 誠^{**}、増井 良治^{***}、倉光 成紀^{***}、八木 年晴[°]

Vitamin(Japan),75(9),465-467(2001)

**Purification, Molecular Cloning, and Catalytic Activity of
Schizosaccharomyces pombe
 Pyridoxal Reductase
 A POSSIBLE ADDITIONAL FAMILY IN THE ALDO-KETO REDUCTASE SUPERFAMILY**

 Mitsuhiro NAKANO^{*}, Tomotake MORITA^{*}, Tomokazu YAMAMOTO^{*}, Hisashi SANO^{*},
 Makoto ASHIUCHI^{**}, Ryoji MASUI^{***}, Seiki KURAMITSU^{***}, Toshiharu YAGI^{*}

[J. Biol. Chem., 274 (33), 23185-23190 (1999)]

^{*}Department of Bioresources Science, Faculty of Agriculture and

^{**}Reserch Institute of Molecular Genetics, Kochi University and ^{***}Department of Biology,
 Graduate School of Science, Osaka University

ピリドキサルレダクターゼ(EC 1. 1. 1. 65)は、NADPHを補酵素としてピリドキサル(PL)のピリドキシ(PN)への還元を触媒する酵素である。本酵素はパン酵母、ビール酵母に存在が報告されており、PNデヒドロゲナーゼと称されていた。1988年にGuirardとSnellはパン酵母から本酵素を精製し、本酵素の生理的pHにおける反応の平衡がPN生成側に著しく傾いていることを見だし、本酵素をPLレダクターゼと名付けた。出芽酵母(パン酵母)由来の本酵素の性質を表1にまとめた。本酵素は最適pH、分子量、NADPH要求性、SH試薬、バルビタール、ケトン化合物に対する反応性等において、哺乳動物肝臓由来のクロルデコンレダクターゼ(アルドケトレダクターゼ(AKR)スーパーファミリーのファミリー1に属する酵素)に類似していた。AKRは

自然界に広く分布し、それら酵素はAKRスーパーファミリーに属し、アミノ酸配列の相同性に基づいて40%以上の相同性を示すAKRを一つのファミリーとして分類される(AKRスーパーファミリーに関するホームページがあり、<http://www.med.upenn.edu/akr/>で見ることができる)。現在、大きく12のファミリーに分類されている。PLレダクターゼは酵素化学的性質からAKRに属すると考えられるが、一次構造が不明であったためファミリー内での属性を特定できなかった。本論文は、分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)の本酵素を均一に精製し、クローニングを行い、本酵素の構造を決定し、基質特異性と構造の特徴を明らかにした。その結果から、本酵素が一つの独立したファミリー(AKR 8)を成すことを示した。

表 1. 分裂酵母 *S. pombe* と出芽酵母 *S. cerevisiae* 由来のピリドキサルレダクターゼの性質.

	分裂酵母 (本研究)	出芽酵母 (文献1)
分子量 (native)	41,000 ± 1600	33,000 ± 930
(denatured)	39,000 ± 370	37,000
最適 pH (PN formation)	6.5 ~ 7.5	6.0 ~ 7.0
(PL formation)	8.5	8.6
基質特異性		
NADPH K_m (mM)	0.0143	0.08 - 0.1700
NADH	基質にならない	基質にならない
PL K_m (mM)	1.14	0.130
V_{max} (μ mol/min/mg)	90.9	42
2-Nitrobenzaldehyde		
K_m (mM)	0.096	0.120
V_{max} (μ mol/min/mg)	54.4	42
PLP K_m (mM)	基質にならない	0.790
V_{max} (μ mol/min/mg)		17
PN K_m (mM)	33.3	3.3
V_{max} (μ mol/min/mg)	4.01	5
2-Phthalaldehyde		
K_m (mM)	0.118	0.310
V_{max} (μ mol/min/mg)	2.08	24
	自殺基質となった	

本酵素は、分裂酵母からButyl-TOYOPEARL, OrangeA, EDAB-TOYOPEARLの三段階のカラムクロマトグラフィーを経て収率6.6%, 比活性は104.6倍に均一精製できた。本酵素はButyl-TOYOPEARLカラムクロマトグラフィー後に非常に不安定となったが、0.005%のTween40の添加で安定化できた。本酵素の性質をまとめて表1に示した。出芽酵母の酵素と異なり、本酵素はPLPを基質としなかった。PLの他、2-nitrobenzaldehyde (2-NBA)が良好な基質となり、 K_{cat}/K_m 値はPLの約5倍であった。PLのアルデヒド型が基質となりヘミアセタール型は基質とならないことが示唆された。2-Phthalaldehydeは反応に伴って本酵素を失活させる自殺基質となった。その他にpyridine-2-aldehyde, pyridine-3-aldehyde, pyridine-4-aldehydeが基質となった。直鎖のアルデヒド, ケトン化合物は基質とならなかった。この結果から、本酵素の基質はピリジン環である必要はなく、六員環のアルデヒド基のオルト位が電子密度の高い状態である化合物が良い基質になると考えられた。

本酵素のクローニングと大腸菌での高生産系構築のために、本酵素の推定コード遺伝子(*plr+*)を発現ベクターpET, pKF3, pTrc99Aに導入し、大腸菌を形質転換したが、いずれも発現量は低かった。本遺伝子は分裂酵母由来のものであり、細菌特有のリボゾーム結合部位を有していない。また、本遺伝子の構造遺伝子内には42 bpから成るパンドローム構造が存在しており、この領域が転写あるいは翻訳速度低下の原因となる可能性が考えられた。本遺伝子の開始コドンの上流に細菌特有のリボゾーム結合部位(AGGAGGA)を導入し、アミノ酸配列を変えないようにパンドロームを形成する塩基に置換を与えた遺伝子断片をpTrc99Aに導入して、プラスミドpTPLR3を構築した。pTPLR3を導入した大腸菌クローン株において本酵素活性の顕著な増加が得られ、SDS-PAGE上で本酵素の生産が確認できた。本遺伝子の発現調節機構についての詳細は不明であるが、大腸菌において本遺伝子のパンドローム構造がアテニューエーターとして認識されたと考えられる。組換え型ピリドキサルレダクターゼは天然型と

分子量, 基質特異性, N末端側のアミノ酸配列が一致した。この結果, 本酵素の一次構造が決定できた。

本酵素とその他のAKRファミリーの構造比較の結果, 比較的配列相同性の高いAKRとしてAKR6のK+チャンネルの β 2-サブユニット(18.3%), AKR7のヒトカルボキシベンズアルデヒドレダクターゼ(13.5%)が存在したが, 20%以上の配列相同性を示すものは存在しなかった。しかし, 本酵素はAKR特有の保存領域として触媒部位(Asp-47, Tyr-53, Lys-83), NADPH結合部位(Gly-283, Ser-284, Arg-293)が保存されており, 本酵素の二次構造はファミリー1のヒトアルドースレダクターゼによく似ていた。このため, 新たな8番目のAKRファミリーを成すことがわかった。

本酵素の生理機能について現在不明であるが, 次の可能性が考えられる。酵母における補酵素型であるピリドキサル-5'リン酸(PLP)の生合成は, $PN \rightarrow PL \rightarrow PLP$ よりも $PN \rightarrow PNP \rightarrow PLP$ の方が可能性が高いので, 本酵素がPLP生合成に重要であるとは考えにくい。むしろ, 高濃度のPLを取り込んだ酵母はPNを選択的に排出する²⁾ので, 本酵素はPLのPNへの還元とそれにつ

づくPNの排出系に関与している可能性がある。つまり, PLはPN(PL)キナーゼを阻害する³⁾ので, PLを無害なPNへと変換し, 排出する。本酵素は凍結融解後の培養細胞から漏出し, 低濃度の界面活性剤(Tween40)の添加で安定化されることから, 本酵素は細胞膜の脂質に弱く結合して膜周辺に局在し, PLのPNへの還元と生成したPNの選択的な排出に関与する可能性が示唆された。

現在, 本酵素の膜周辺局在性を生化学, 免疫学的手法で証明し, また本遺伝子破壊株の解析を行っている。(平成13.7.16受付)

文 献

- 1) Guirard BM, Snell EE (1988) Physical and kinetic properties of a pyridoxal reductase purified from bakers' yeast. *Biofactors* **1**, 187-192
- 2) Shane B, Snell EE (1976) Transport and metabolism of vitamin B₆ in the yeast *Saccharomyces carlsbergensis* 4228. *J Biol Chem* **251**, 1042-1051
- 3) White RS, Dempsey WB (1970) Purification and properties of vitamin B₆ kinase from *Escherichiacoli* B. *Biochemistry* **9**, 4057-4064