

高感度血中胆汁酸測定開発を目指した脱水素酵素のX線結晶構造解析

中村 昇太¹, 片岡 佐智予², 織田 昌幸², 植田 成³, 大久保 忠恭¹,
小林 祐次¹(¹阪大薬,²京府大農,³旭化成ファーマ)

【目的】肝機能検査や腸の吸収検査に有用な血中胆汁酸濃度測定法の一つとして NAD を用いた酵素比色定量法が知られているが、我々のグループでは、さらに高感度な酵素サイクリング法を開発している。この方法では NAD よりもモル吸光係数が大きい thio-NAD と結合できる *Pseudomonas SP. B0831* (PS) 由来 3 α -HydroxySteroid Dehydrogenase(3 α -HSD)を利用している。しかし 3 α -HSD は thio-NAD に対する結合活性が弱いため血中胆汁酸濃度測定の際に酵素量を多く必要とする。一般に 3 α -HSD は様々な補酵素選択性を示すが、PS 由来 3 α -HSD は NAD, NADP, thio-NAD の三者と結合し、NAD と最も親和性が高い酵素である。そこで立体構造情報を基に PS 由来 3 α -HSD を改変して thio-NAD の結合活性を上げるために、X 線結晶構造解析を行った。

【方法】PS 由来 3 α -HSD と NADH の共結晶化によって、最高 1.8 の回折能を持つ結晶が得られた。*Comamonas testosteroni* 由来 3 α -HSD をモデルとした分子置換法によって位相を決定した後、構造精密化によって $R/R_{\text{free}} = 0.20 / 0.24$ の結晶構造 (右図) が得られた。



【結果および考察】PS 由来 3 α -HSD はホモダイマーを形成し、一方のモノマーのみに NADH が結合していた。NADH は 3 α -HSD の主鎖と水素結合を形成しており、thio-NAD が NAD よりも結合活性が弱くなる理由は、この水素結合が形成できないためであると考えられた。