

ユリアーキオータ門の古細菌由来のホモセリン脱水素酵素のクローニング

日大生産工(院) ○佐藤 豊
日大生産工 吉宗 一晃

1. まえがき

1990年に Carl Richard woese らによって提唱された 3 ドメイン説は生物を基本的な遺伝の仕組みや生化学的性質を元に大きく分類する方法であり、生物は真核生物と真正細菌、古細菌(アーキア)に分けられる。一般的に古細菌は、高 NaCl 濃度環境に生育する高度好塩菌や熱水噴出孔などの高温環境に生育する超好熱菌、メタン菌や好熱好酸性菌などの極限環境に生息する生物として認知されている。形態的には真正細菌と同じ原核生物に属し、細胞の大きさや細胞核を持たないことなど共通点があるが、DNA の複製やタンパク質合成系といった生命の基幹部分の機構は真核生物に類似しているという特徴がある。好熱アーキアは 45℃以上の生育至適温度、あるいは 55℃以上の生育限界温度を有するアーキアであり、知見は少ないが独自の異化代謝や生合成機構、真核生物や真正細菌と異なった開始コドンを持つものもある。

古細菌の分類群には、メタン菌や高度好塩菌を中心としたユリアーキオータ門、超好熱菌や好熱好酸性菌を中心としたクレンアーキオータ門などがある。ユリアーキアは既知の古細菌の 8 割以上が分類されているため共通する性質は乏しいが、クレンアーキアとの比較では、やや真正細菌寄りの細胞骨格や細胞分裂機構を持っているという特徴がある。クレンアーキアは既知の古細菌の 2 割弱が分類され、多くが超好熱菌や好熱好酸性菌に占められている。また、水素や硫黄を酸化、あるいは従属栄養的に増殖するものが多いという特徴がある。

系統樹とは、共通先祖を有すると考えられている様々な生物種の遺伝子あるいはタンパク質のアミノ酸配列の間の進化的関係を樹木の枝分かれのように描いて表現した図である。枝分かれは系統の分岐を示し、枝の長さや高さは進化の程度や時間経過を示す。16S rRNA 系統解析は系統樹の作成にも用いられ、リボソームの小サブユニットの RNA 塩基配列を基にした微生物の進化系統

を明らかにする方法の一つである。

アスパラギン酸を原料とするアミノ酸代謝経路は、L-アスパラギン酸を出発物質として、アスパチルリン酸、L-アスパラギン酸-4-セミアルデヒド、L-ホモセリン、O-ホスホ-L-ホモセリンを経て L-トレオニンや L-メチオニン、L-イソロイシンを生合成する経路である¹⁾。

アロステリック酵素は、酵素タンパク質の活性部位以外の部位(アロステリック部位)に低分子の物質(エフェクター)が結合することで酵素の立体構造が変化し、酵素活性の強弱が変化する現象を示す酵素である。酵素の基質特異性と反応特異性における概念モデルとして、基質の形状と活性部位の形状の合致による触媒作用を説明した鍵と鍵穴モデルが存在するが、アロステリック酵素はアロステリック部位にエフェクターが結合すると立体構造が変化し、酵素機能や速度定数が変化する。

ホモセリン脱水素酵素は L-ホモセリンと NAD(P)⁺を基質とし、L-アスパラギン酸-4-セミアルデヒドと NAD(P)H, H⁺を生合成する反応を可逆的に触媒する酵素である。NAD(P)⁺を基質とする反応の生成物である NAD(P)H が 340 nm の波長で高感度の検出できることから、340nm の波長で吸光度を測定して、時間変化による活性を測定することができる。ホモセリン脱水素酵素はアスパラギン酸代謝経路において L-アスパラギン酸-4-セミアルデヒドから L-ホモセリンを生合成する反応を触媒するが、十分な活性が得られなかった場合、L-ホモセリンを生合成する反応よりも L-リシンを生合成する反応に進みやすくなるため、十分な酵素活性を得ることが重要である。アスパラギン酸代謝経路の枝分かれ部位に関する鍵酵素であると報告されている²⁾。

本研究ではホモセリン脱水素酵素遺伝子を有する好熱ユリアーキアである

Methanopyrus kandleri,

Methanothermobacter

marrburgensis, *Methanohalobium*

evestigatum 由来のホモセリン脱水素酵素

cloning of homoserine dehydrogenase from archaea of euryarchaeota
Yutaka SATOU and Kazuaki YOSHIMUNE

を生産および精製する。また、アロステリックエフェクターについて検討し、活性測定を行なう。

2. 実験方法及び測定方法

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes より好熱ユリアーキア由来ホモセリン脱水素酵素を検索して、*M. kandleri*, *M. marburgensis*, *M. evestigatum* を用いることにした。*M. kandleri*, *M. marburgensis*, *M. evestigatum* 由来のホモセリン脱水素酵素の塩基配列に類似する塩基配列をもつ生物を BLAST 検索で探して、系統樹を作成した。また、ホモセリン脱水素酵素のアミノ配列の系統樹も作成した。

3. 実験結果及び検討

プライマーの設計について、プライマーの長さや GC 含有量, Tm などを検討して増幅効率がよく、非特異的反応が起こらないプライマーを設計した。また、BLAST 検索でプライマーの特異性を確認した。

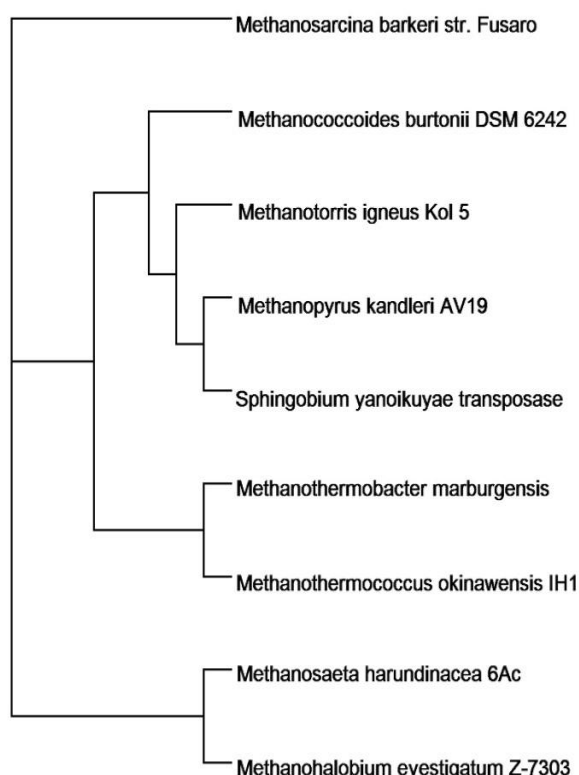


Fig.1 ホモセリン脱水素酵素をコードする遺伝子の塩基配列の系統樹

Fig.1 はホモセリン脱水素酵素をコードする遺伝子の塩基配列の系統樹である。この系統樹より *M. kandleri*, *M. marburgensis*, *M. evestigatum* の相同性は低いと考えられる。

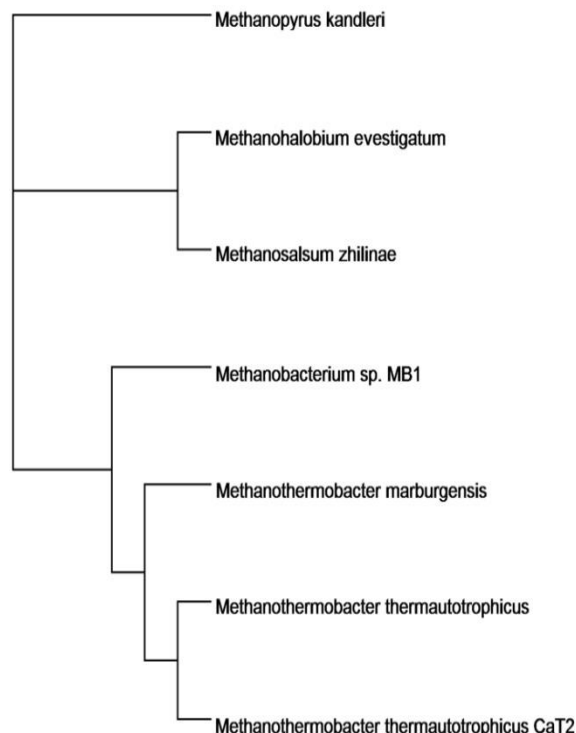


Fig.2 ホモセリン脱水素酵素のアミノ酸配列の系統樹

Fig.2 はホモセリン脱水素酵素のアミノ酸配列の系統樹である。この系統樹より *M. kandleri*, *M. marburgensis*, *M. evestigatum* の相同性は低いと考えられる。

4. 参考文献

- 1) Georg Jander, and Vijay Joshi, Aspartate-derived Amino Acid Biosynthesis in Arabidopsis thaliana, American Society of Plant Biologists, 2009, 1-5
- 2) Schroeder AC, et al., Threonine-insensitive Homoserine Dehydrogenase from Soybean, The Journal of Biological Chemistry, 2010, 827-834