

超好熱アーキア由来ホモセリン脱水素酵素の機能解析

日大生産工（院） ○斉田 丞

日大生産工 吉宗 一晃 小森谷 友絵 神野 英毅

1.緒言

生物界は真核生物、真正細菌および古細菌（アーキア）の三つの生物群に分類される。アーキアは真核生物と真正細菌の性質を併せ持つが、そのゲノムサイズは小さく真核生物のものの約1/100、真正細菌のものの約半分である。アーキアのゲノムサイズの小ささはアーキア由来酵素が真正細菌の相同酵素と比較して基質特異性が低いことから説明できる。つまりアーキアは代謝経路中の複数の反応を真正細菌の場合よりも少ない酵素で行っていると考えることができる。超好熱アーキアは80℃以上の生育至適温度を有するアーキアであり、研究例は少ないものの独特の代謝経路を持つものが多い。そこで本研究では超好熱菌由来 *Sulfolobus tokodaii* 由来 HSDH の機能の解析を試みた。ホモセリン脱水素酵素(HSDH)は、L-ホモセリンから L-アスパラギン酸-4-セミアルデヒドへの酸化反応を NAD(P)に依存して可逆的に触媒する酵素であり、細菌、植物及び、真菌類由来 HSDH はアスパラギン酸からリジン、メチオニン、スレオニンおよびイソロイシンを合成するアスパラギン酸経路の枝分かれ部位に関する鍵酵素であることが報告されているが、超好熱アーキアの HSDH の機能に関する解明は殆ど行われていない。

NAD(P)を基質とする脱水素酵素はその生成物である NAD(P)H が 340nm の波長で高感度に検出できることから、その基質濃度の測定にも応用できる。また、HSDH の基質である L-ホモセリンアナログであるホモシステインはメチオニンの体内代謝過程において不完全な代謝や平衡状態の乱れにより生成される中間生成物であり、血漿総ホモシステイン濃度の上昇は心筋梗塞、脳卒中、アルツハイマー病などの独立した危険因子として注目されている。A.M. Pavlovic

ら¹⁾は血漿総ホモシステイン濃度が虚血性脳卒中の危険因子であるとし、増加した血漿総ホモシステイン濃度の機能状態と、これらの患者における認知機能の低下と関連付けている。

従来のホモシステインの定量方法には検体中のホモシステインを SH 基と反応する蛍光標識試薬で標識し、高速液体クロマトグラフィーにより分離して定量するプレラベル HPLC 法、検体を高速液体クロマトグラフィーで分離し、後に SH 基と反応する蛍光標識試薬で標識して定量するポストラベル HPLC 法、ホモシステインと特異的に作用する酵素を用い、酵素反応生成物を抗体法により定量する酵素免疫法、ホモシステインに特異的に作用する酵素を用い、酵素反応生成物を酵素法により定量する方法など、幾つかの定量方法が存在するが、これらは複数の工程を踏む必要があり、高精度かつ単純な血漿総ホモシステイン濃度の測定法は未だ確立されていない。また、現在ホモシステインを直接触媒する脱水素酵素は未発見である為、これを発見、作製することで血漿総ホモシステイン濃度の測定を、より簡易に行うことが可能となる。本研究室では、ホモシステイン脱水素酵素を作製するにあたりホモセリンとホモシステインの構造の近似性に注目し、ホモセリン脱水素酵素に部位特異的変異導入法を用いて特定のアミノ残基を置換、欠失させることにより酵素機能の改変を行い、ホモシステイン脱水素酵素を作製することを目的としている。また、部位特異的変異導入に用いる超好熱古細菌由来のホモセリン脱水素酵素は機能解析に関する報告例が少ないため、超好熱古細菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来のホモセリン脱水素酵素の作製および機能解析を行っている。

2.実験方法

2-1 発現プラスミド pST1519 の構築

Functional Analysis of Homoserine Dehydrogenase from Hyperthermophilic Archaea, *sulfolobus tokodaii*

Tasuku SAIDA, Kazuaki YOSHIMUNE, Tomoe KOMORIYA, and Hideki KOHNO

データベース検索により見出した好気・好酸性超好熱菌 *Sulfolobus tokodaii* のゲノム上の HSDH 推定遺伝子(915 bp)を増幅するプライマーを設計し、ChampionTM pET Directional TOPO[®] Expression Kits (Invitrogen, Carlsbad California USA)を用いたクローニング及び PCR を行い、発現プラスミド pST1519 を構築した。また、pST1519 で One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad California USA)を形質転換し、50µl/ml アンピシリン含有 LB 培地で拡大培養を行った後、Wizard Plus SV Mini preps DNA Purification System(プロメガ株式会社, Madison Wisconsin USA)を用いてプラスミド抽出を行った。得られたプラスミドは PCR で目的遺伝子部位の増幅を確認し、PCR 産物を QIA quick Gel Extraction Kit を用いて精製し、アガロースゲル電気泳動でバンドから挿入部位の塩基長が推定遺伝子 ST1519 の塩基長とほぼ同じことを確認した。

2-2 酵素液の調整

pST1519 で BL21-CodonPlus(DE3)-RIL Competent Cells (Agilent Technologies, Inc)および One Shot[®] BL21 StarTM (DE3) Chemically Competent *E. coli* を形質転換した後、50µl/ml アンピシリン含有 LB 培地で OD660 が 0.6~0.8 になるまで振盪培養し、0.2 mM IPTG を加え、3 時間 37°C で培養した。培養で得られた菌体を遠心分離(10,000 rpm, 10 分間)によって回収、1M KPB(pH 7.0)、10 mM MgCl₂(pH 7.0)で懸濁し、ULTRASONIC HOMOGENIZER smurt NR-50M を用いて超音波破碎(出力 30%, on time 10 sec, off time 10 sec, total time 60 min)を氷上で行った。さらに、遠心分離(10,000 rpm, 10 分間)後の上清を回収し、それを粗酵素液とした。粗酵素液を pierce[®] BCA protein assay kit(Thermo Fisher Scientific K.K.)を用いてタンパク質濃度測定した後、Water bath を 80°C まで加熱して、酵素を投入して、役匙でかき混ぜながら 20 分間熱を加え、遠心分離(10,000 rpm, 10 分間)によって上清を回収し、酵素液とした。

2-3 酵素の精製

酵素液量の計 10000 倍以上の体積の 10 mM KPB(pH 7.0) 1 mM MgCl₂(pH 7.0)で透析し、DEAE-TOYOPEARL カラムを標準緩衝液で平衡化し、酵素液を吸着させた。カラム体積の 5

倍量の同緩衝液で洗浄した後、20 mM NaCl によるステップワイズ法により溶出し、活性画分をフラクションに回収することで酵素を精製した。これを SDS-PAGE、Bradford 法を用いて、分子質量、タンパク質濃度を評価した。

2-4 酵素活性の測定

DL-ホモセリンに対する酵素活性について、NADH の生成に伴う A₃₄₀ の吸光度の増加を 50°C で測定した。

3. 結果及び考察

精製した酵素における活性測定結果を Fig. 1 に示した。

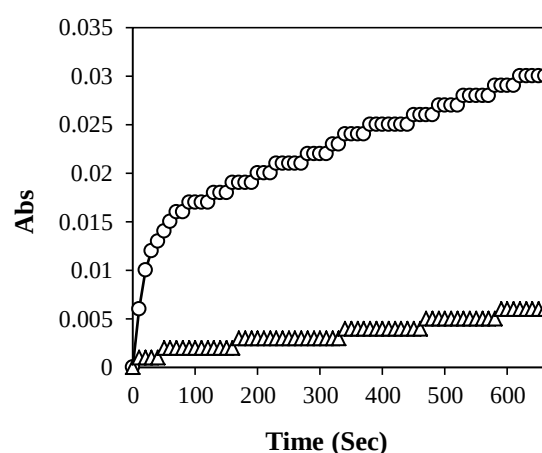


Fig. 1 pST1519 を BL21-CodonPlus(DE3)-RIL Competent Cells(○)および One Shot[®] BL21 StarTM (DE3) Chemically Competent *E. coli*(Δ)に形質転換し、得た酵素の DL-ホモセリンに対する酵素活性

2 種の宿主大腸菌を用いて形質転換を行い、酵素精製を行った結果、BL21-CodonPlus(DE3)-RIL Competent Cells を宿主大腸菌として作製した酵素に、より強い活性が見られた。また、作製したホモセリン脱水素酵素においてホモシステインに対する活性は見られなかった。

【参考文献】

- 1) A.M. Pavlovic et al, *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 113, 711-715(2011)
- 2) J. Esclapez et al, *FEBS Letters*, 581, 837-842(2007)
- 3) Wibke Kallow et al, *Journal of Molecular Biology*, 297, 395-408(2000)