

アーキア由来のホモセリン脱水素酵素を用いたホモシステインの測定

日大生産工 (院) ○朝長佳久 日大生産工 小森谷友絵

日大生産工 神野英毅 大阪工 工学 大島敏久 日大生産工 吉宗一晃

1 まえがき

本研究で測定するホモシステインはメチオニンの代謝中間物質である。このホモシステインは心血管疾患患者や高血圧患者の血液中では増加していることが確認されている¹⁾²⁾。このためこれら疾患の重要なバイオマーカーとなり得る。我々はこれまでに超好熱アーキア *Sulfolobus tokodaii* 由来ホモセリン脱水素酵素 (HSDH) がホモシステインによって酵素活性が変化することを明らかにした。この酵素の活性の変化を測定することで反応系中のホモシステインの濃度を測定したが検出感度が低いという問題があった。そこでテトラゾリウム塩 (WST-1) を用いた検出法について報告する。

2 実験方法および測定方法

Fig1 に示すように本酵素はホモセリンから L-アスパラギン酸-4-セミアルデヒドを生成する酵素である。この反応により生成する NADH の吸光度を 340nm の波長で測定し、時間変化による活性求め、さらに反応系の中にホモシステインを添加し、ホモシステイン濃度による酵素の活性変化の値を測定した。

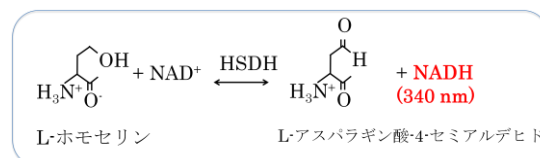


Fig1 HSDH による脱水素反応

テトラゾリウム塩を用いる反応では Fig1 で生成する NADH をさらに Fig2 で示す反応により 1-mrthoxy-5-methylphenazium methylsulfate(mPMS)存在下で WST-1 と反応させホルマザン色素を生成させる³⁾。NADH のモル吸光係数 $\epsilon = 6.22 \times 10^3$ なのに対してホルマザンのモル吸光係数 ϵ は 3.7×10^4 であるため感度の高い測定が可能である。

Fig2 ホルマザンの生成

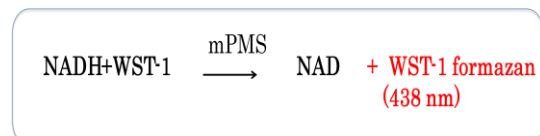


Fig2 ホルマザンの生成

なお本酵素を用いた活性の測定は反応系の温度一定を保温できるように温度コントローラーが備わったものを使用する。

Measurement of the homocysteine using the allosteric regulation of hyperthermophilic-archaeobacterium *Sulfolobus tokodaii* form homoserine dehydrogenase
Yoshihisa TOMONAGA, Tome KOMORIYA, Hideki KOHNO, Toshihisa OHSHIMA and Kazuaki YOSHIMUNE

3 実験方法および結果

反応時間における生成物の吸光度の変化を測定した。吸光度の変化量 ΔOD を求め、酵素の比活性の値を計算し、グラフ化した。また至適条件の検討として酵素の活性にpHや温度がどのように影響を及ぼすかを検証した。至適条件の検討として反応系の温度を上昇させたところ70℃付近の高温下でも酵素活性が確認された。しかしながら高温域では高い活性が得られるもののホモシステインの有無による差が確認されず本研究の趣旨であるホモシステイン濃度の定量には不向きであることが確認された。下記のFig3に各温度におけるホモシステインの有無による比活性の比を示す。比の値が1.0から離れているほどホモシステインによる影響を受けていることを示している。

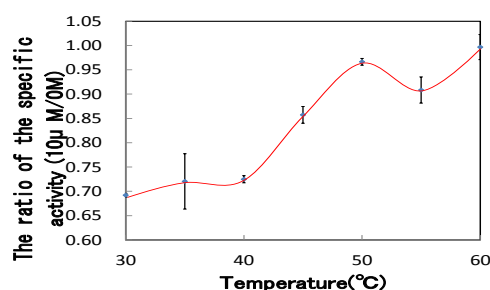


Fig3 各温度による比活性への影響

次にpHによる影響を調べた。pHが8.0付近でホモシステイン添加の有無による活性の差が最も見られたためこのpHを至適条件とした。下記のFig4に結果を示す。

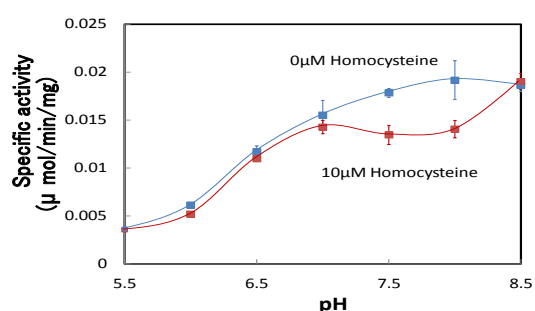


Fig4 pHによる活性への影響

上記の条件を踏まえて反応系の活性測定を行い検量線の作成を行ったところホモシステインの濃度に従って比活性の値が減少することが確認された。結果をFig5に示す。

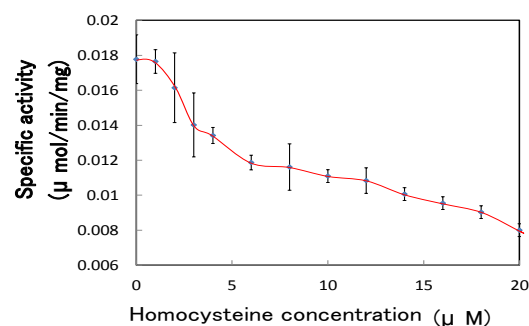


Fig5 WST-1を用いたホモシステイン濃度測定

4 まとめ

結果に示すようにWST-1を用いた反応では反応系の温度が30℃、バッファのpHが8.0のとき最もホモシステインの有無による活性の差が大きくなることが確認できた。ホモシステイン濃度が0から5 μMまでの範囲では比活性の差が確認され定量が可能であるとした。また低濃度における誤差はホモシステイン溶液の希釈率を上げることで添加量を増加させることにより修正できるとした。

「参考文献」

- 1) Anna Waskiewicz, Elzbieta Sygnowska, Grazyna Broda
Kardiologia Polska 70, 9:897-902 (2012)
- 2) Graeme J Hankey, John W Eikelboom, *The Lancet*, 354, 407-413, (1999)
- 3) Yuta mutaguchi, Taketo Ohmori, Haruhiko Sakuraba, Kazunari Yoneda, Katsumi Doi, Toshihisa Ohshima
Analytical Biochemistry 409 (2011) 1-6