

6-1

## 超好熱古細菌由来ホモセリン脱水素酵素の機能解析

日大生産工(院) ○朝長佳久

大工大 大島敏久

日大生産工 吉宗一晃

## 1 緒言

ホモシステインはメチオニンの代謝中間物質である。心血管疾患患者や高血圧患者の血清中では増加することが確認されている。また血清中のホモシステイン濃度が約  $8.2\mu\text{M}$  以上になると死亡リスクが高くなるという報告がある。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<sup>1)2)</sup>。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) の活性がホモシステインによって増加することを明らかにした。Fig. 1 の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。この際反応系にホモシステインが存在しているとその濃度に依存して酵素が活性化する。この活性は補酵素である NAD が還元されて生じる NADH の  $340\text{nm}$  の吸光度を測定することで測定できる。しかしながらこの酵素の反応は可逆反応であるため逆反応によって酵素活性の初速度を正確に測定することが困難である。さらに血清中のホモシステイン濃度は  $6.0\mu\text{M}$  程度であるが、この濃度のホモシステインによる活性化を正確に測定するには酵素活性測定法の更なる高感度化が必要であった。そこで我々は高感度化のために水溶性のホルマザンを生じるテトラゾリウム塩 (WST-1) を用いた測定系でのホモシステイン

濃度の測定を行った。

この測定方法では Fig. 2 に示すように生成する NADH を電子キャリアーである 1-mrthoxy-5-methylphenazium methylsulfate (mPMS) 存在下で WST-1 と反応させ不可逆的にホルマザン色素を生成させ、その濃度を  $438\text{nm}$  の吸収波長を用いて測定する<sup>3)</sup>。また NADH のモル吸光係数は  $\epsilon=6.22 \times 10^3$  なのに対してホルマザンのモル吸光係数は  $\epsilon=3.7 \times 10^4$  であるため感度の高い測定が可能である。

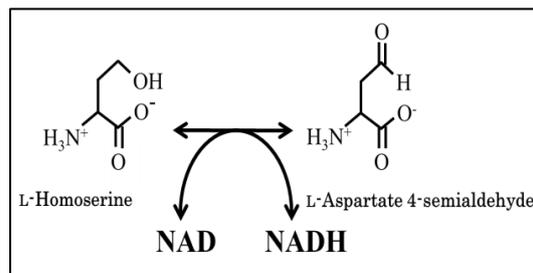


Fig.1 HSDH による脱水素反応

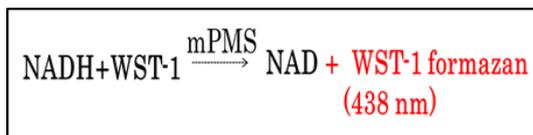


Fig.2 ホルマザン色素の生成

## 2 実験方法

生成物の吸光度の変化を経時的に測定した。吸光度の変化量  $\Delta OD$  を求め、測定時間とのグラフを作成した。エッペンチューブに  $0.1\text{mM}$  Tris,  $2.5\text{mM}$  NAD,  $0.1\text{mM}$  WST-1,  $0.04\text{mM}$  mPMS,  $1\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $8\text{mM}$  L-ホモセリンと

Functional analysis of hyperthermophilic-archaeobacterium form homoserine dehydrogenase

Yoshihisa TOMONAGA, Toshihisa OHSHIMA and Kazuaki YOSHIMUNE

なる様に添加した。この段階で必要に応じてホモシステインと還元剤を加えた。ホモシステイン濃度が0Mである場合、測定にはホモシステインと同量の純水を用いた。最後にHSDHを加え混和させた。混和後即座にブラックセルに300 $\mu$ l注ぎ、ベース補正後生成されるホルマザン色素の濃度を438nmの吸収波長を用いて測定した。

### 3 結果

この測定系は臨床検査に用いることを想定しているため、ヒト血清中のホモシステイン測定を行った。しかしながらFig. 3に示すように血清中に含まれる物質によって吸光度が直線的に上昇しなかった。そこで血清中のタンパク質が入射光を散乱させていると考え、ヒト血清にあらかじめ界面活性剤を加える方法を検討した。測定に使用する界面活性剤はエステル結合を含まないため酸、アルカリに対して安定的なTritonX-100と非イオン性界面活性剤であるTween20をヒト血清に対して1v/v%となるように加えた。これによって吸光度が直線的に上昇することが確認できた。

Fig.3に界面活性剤未添加の場合と界面活性剤(1v/v% TritonX-100、1v/v% Tween20)添加時の測定結果を示す。

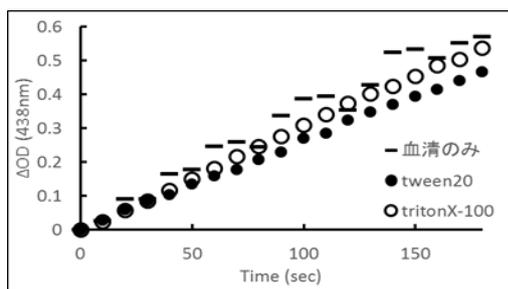


Fig.3 界面活性剤を添加した場合の反応

本反応系で測定するホモシステインは室温条件下で酸化され二量体であるホモシスチンとなる。このホモシスチンは本酵素の阻害剤になることが確認されている。このため測定に際し還元剤を加える必要がある。Table 1に示すように還元剤を添加すると酵素活性が阻害を受けるため、還元剤の検討を行った。

還元剤としてジチオトレイトール(DTT)及び、2-メルカプトエタノールを添加し測定した。

Table 1 還元剤の有無による影響

	無し	2-メルカプトエタノール	DTT
終濃度 (μM)		570μM	1μM
比活性 (U/mg)	0.502	0.308	0.25

Table2に示すように還元剤の添加により阻害を受けるもののホモシステインによる活性化はどちらの還元剤においても観測された。

Table2 還元剤のホモシステインへの影響

	無し	2-メルカプトエタノール	DTT
終濃度 (μM)		570μM	1μM
活性化 (%)	3.6	15.7	17.5

DTTの場合、1μMという低濃度でホモシスチンによる阻害が見られなくなった。毒物及び劇物指定法では2-メルカプトエタノールは毒物に指定されているため、今後はDTTを添加してホモシステイン測定法の開発を行っていく。

### 4 まとめ

血清中のホモシステイン測定系を改良することができた。WST-1を用いることにより高感度な測定が可能となった。ヒト血清中の物質により吸光度上昇の直線性が失われたが、界面活性剤の添加により再現性の高い測定が可能となった。使用する界面活性剤はTween20よりもTriton X-100を利用した方が阻害を受けにくいことが分かった。またホモシスチンの形成を阻害する還元剤として1μM DTTを添加する必要がある。DTT濃度は2-メルカプトエタノールのもののおよそ1/500の濃度でホモシスチンの形成を抑制できることが分かった。

「参考文献」

- 1) Anna Waskiewicz, *et al.* KardiologiaPolska. 70, 897-902, (2012)
- 2) Graeme J Hankey, *et al.* The Lancet. 354, 407-413, (1999)
- 3) Yuta Mutaguchi *et al.* Analytical Biochemistry. 409, 1-6, (2011)