

ユリ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

Carl Richard Woese らによって提唱された 3 ドメイン説によると生物は真核生物, 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温環境, 高塩濃度環境などの特殊な環境で生育する原核生物として認知されている. ユリ古細菌とは古細菌の分類群の一つである.

アスパラギン酸代謝経路は, 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.

近年, 世界中で高血圧患者が増加しており, 世界保健機関(WHO)の調査によると, 25 歳以上で高血圧と診断される人は, 2008 年に世界で 10 億人を超えた. また, 日本国内においても国民医療費の高騰や高血圧性疾患による死亡者が年間約 7000 人であることが問題視されている. そのため予防医学や早期

治療の観点から診断薬の開発が注目されている.

本研究で測定するホモシステインは心血管疾患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. そのためこれらの疾患の重要なバイオマーカーとなり得る. 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が明らかになっており, 本研究では *Methanothermobacter thermautotrophicus*, *Picrophilus torridus*, *Thermoplasma volcanium* 由来 HSDH の酵素活性をそれぞれ測定する. この酵素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する.

2. 実験方法及び測定方法

HSDH を発現する遺伝子を有するユリ古細菌 *M. thermautotrophicus*, *P. torridus*, *T. volcanium* のゲノム DNA 溶液を鋳型として PCR を実施した. DNA の増幅はアガロースゲル電気泳動で確認した. PCR 産物中の DNA を Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System で精製し, 精製 DNA 溶液の濃度は吸光度測定により算出した.

形質転換には Champion pET 101 Directional TOPO Expression Kit を用いた. 精製 DNA 溶液 1 µl, Salt Solution 1 µl, Sterile Water 3 µl, TOPO Vector 1 µl を静かに混合し, 常温で 5 分間インキュベーションをした. *E. coli* TOP10 を氷上で融解させ, TOPO クローニング反応液に 40 µl 加えた. 氷上で 30 分間静置した後, ヒートショック (42°C, 30 秒間)を行ない, ヒートショック後に氷上に静置した. S.O.C. medium 250 µl をそれぞれ加え, 37°C で 1 時間培養した. アンピシリン含有の LB 寒天培地上に 125 µl プレーティングし, 37°C で一晩培養した.

3. 実験結果及び検討

PCR はユリ古細菌 *M. thermautotrophicus*, *P. torridus*, *T. volcanium* のゲノム DNA 溶液を鋳型として実施した. それぞれのアニーリング温度を検討し, *M. thermautotrophicus* のゲノム DNA 溶液は 59°C, *P. torridus* のゲノム DNA 溶液は 58°C, *T. volcanium* のゲノム DNA 溶液は 62°C のアニーリング温度で PCR を実施した際, アガロースゲル電気泳動で DNA 増幅が確認できた. 図 1 は *M. thermautotrophicus* の DNA 増幅バンド, 図 2 は *P. torridus* の DNA 増幅バンド, 図 3 は *T. volcanium* の DNA 増幅バンドをそれぞれアガロースゲル電気泳動で確認したものである.

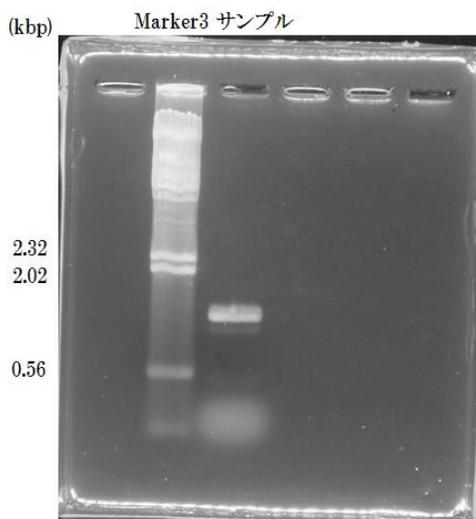


図 1. *M. thermautotrophicus* の DNA 増幅バンド

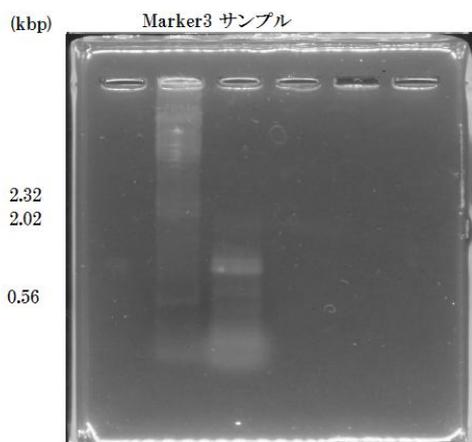


図 2. *P. torridus* の DNA 増幅バンド

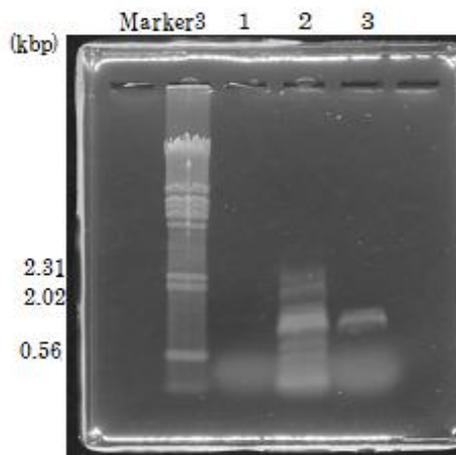


図 3 は *T. volcanium* の DNA 増幅バンド (サンプル 3)

DNA は 260 nm の波長で高感度に検出することができることから, 精製 DNA 溶液の濃度は 260 nm の波長における吸光度を測定して, 測定値から算出した. (表 1)

| | OD ₂₆₀ | 濃度 (µg/ml) |
|---|-------------------|------------|
| <i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> | 0.22 | 11.1 |
| <i>Picrophilus torridus</i> | 0.32 | 15.9 |
| <i>Thermoplasma volcanium</i> | 0.33 | 16.7 |

E. coli TOP10 の形質転換には Champion pET 101 Directional TOPO Expression Kit を用いた. 培養後の LB 寒天培地上にコロニーは確認できなかった.

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, 827-8