

生育上限温度の異なる超好熱アーキア由来 ホモセリン脱水素酵素の組換え発現

日大生産工(院) ○日高瀬名 吉宗一晃

1. 緒言

アーキアとは真核生物でも細菌でもない3つ目のドメインであり、アーキアと真正細菌原核生物であるにも関わらず生化学的性質を調べると真正細菌より真核生物に近い性質を持っている。古細菌には、好熱性古細菌、高度好塩菌やメタン菌が含まれている。古細菌の定義は16SリボソーマルRNA 遺伝子の塩基配列の特徴によって定義されている。¹⁾

一般に、大腸菌などの常温菌は30℃から37℃が生育至適温度となっており、高温環境では生きていくことができない。しかし、50℃以上でも生育できる好熱菌、50℃以上かつ50度℃未満でも生育できる好熱菌を中等度好熱菌が存在する。また、生育至適温度が80℃を超えるものを超好熱菌といい、その多くはアーキアである。

ホモセリン脱水素酵素(HSDH)は、アスパラギン酸経路において、アスパラギン酸からシステイン、メチオニン、スレオニンおよびイソロイシンを合成する際の中間の代謝産物であるホモセリンの合成に関与する酵素である。一般にHSDHはアスパラギン酸経路の代謝産物の1つであるL-スレオニン存在下で、アスパラギン酸-4-セミアルデヒドからリシンへの生合成速度が相対的に高まるため、アスパラギン酸経路の鍵酵素といえる。また、HSDHはヒトには存在せず、植物や真菌類、細菌類などにしか存在していない。そのため、HSDHに注目した抗生物質や除草剤の開発が期待されている。

これまでの研究で、超好熱アーキアである *Sulfurisphaera tokodaii* 由来のHSDHの機能解析が行われており、この菌由来のHSDHを大腸菌を用いて37℃で組換え生産すると、基質ホモセリンに対する活性の低い未成熟酵素が得られる。また、この組み換え生産された未成熟酵素は70℃で熱処理すると、活性の高い熱成熟酵素になることがわかっている。²⁾

*S.tokodaii*の生育至適温度は70℃から80℃であり、*Pyrococcus furiosus*の生育至適温度は100℃である。本実験では、*S.tokodaii*よりも高い至適温度を有する*P. furiosus*由来のHSDH推定遺伝子の発現および未成熟酵素の有無や熱成熟温度の違いの探求を目的とする。*P. furiosus*由来HSDH推定遺伝子の候補として *Pyrfu0279*、*Pyrfu0280*の2つが挙げられるが、*S. tokodaii*由来HSDHと相同性の高い*Pyrfu0280*を選択した。

一般的に増幅した遺伝子を発現ベクターに入れて、発現プラスミドを作成する。発現プラスミドにはT7プロモーターが含まれ、isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)を添加することで発現誘導を行うことができる。

2. 実験方法

2-1 *Pyrfu0280*遺伝子の増幅

*S.tokodaii*由来HSDHのアミノ酸配列と相同性のあるものを探索したところ、超好熱アーキア *P. furiosus*のゲノム上にHSDH推定遺伝子 *Pyrfu0280*(783 bp)を発見した。*P. furiosus*のゲノム上のHSDH推定遺伝子 *Pyrfu0280*(783 bp)部位を増幅するため、プライマーを作成した。プライマーには挿入遺伝子の方向性を決めるために5'末端に CACC 配列を加えた。このプライマーを用いて、PCRを行い、*Pyrfu0280*推定遺伝子の増幅をアガロースゲル電気泳動で確認した。

2-2 PCR産物の精製

PCR産物に含まれる余分なプライマーは、TOPOクローニングキットを用いたクローニングの妨げとなるため、ISOSPIN PCR Productを用いてPCR産物の精製を行った。

2-3 発現プラスミドの構築

2-2にて精製したPCR産物を用いて Champion™ pET Directional TOPO Expression

Recombinant Expression of Homoserine Dehydrogenase from Hyperthermophilic Archaea with Different Upper Growth Temperatures.

Sena HIDAKA, Kazuaki YOSHIMUNE

KitsでTOPOクローニングを行い、pET101にライゲーションした。ライゲーション産物で大腸菌TOP10を形質転換し、その培養菌体からプラスミドを抽出した。

2-4 TOP10の形質転換

*Pyrfu0280*発現プラスミドで大腸菌TOP10を形質転換した。コンピテントセルを氷上で溶かし、発現プラスミドを2 μ l添加した後、氷上で30分インキュベートした。その後、42°Cで1分間ヒートショックを行い、再度氷上で1分間静置した。その後、LB液体培地を500 μ l加え、37°Cで1時間振盪培養を行った。振盪培養後、LB寒天培地に塗布した。塗布後、LB寒天培地表面の乾燥が確認できたら、37°Cで一晩インキュベートした。

2-5 プラスミド精製

LB液体培地5ml入った試験管にアンピシリンを10 μ l添加し、大腸菌TOP10の形質転換で得たコロニーを植菌し、一晩37°Cで振盪培養した。培養液が濁っていることを確認し、集菌した。集菌したものをISOSPIN Plasmidを用いて、プラスミド精製を行った。

2-6 *Pyrfu0280*生産

精製したプラスミドを用いてベクターと相補的な配列を持つプライマーでPCRを行い、TOPOクローニングが成功していることを確認したら、2-4と同様の手順で大腸菌BL24を形質転換した。コロニーを植菌し、一晩振盪培養を行った。発現誘導のため、IPTGを添加し、2時間振盪培養を継続した。その後、集菌したものに10mM Tris-HCl pH8.0で加え、超音波破碎した。破碎後、遠心分離を行い、上澄みを採取し酵素液とした。発現の有無はホモセリン、NADを用いた活性測定およびポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で確認した。

2-7 活性測定

HSDH はホモセリンと NAD⁺からアスパラギン酸-4-セミアルデヒドと NADH を生成する反応を触媒するため、生成された NADH を 340 nm の波長で測定することで活性の確認を行った。³⁾活性は 10 mM ホモセリン、10mM Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD)、100 mM Tris-HCl (pH8.0)、酵素液をそれぞれ 40 μ L 加え測定した。また、測定条件として加熱なしの酵素と 70°Cに加熱した酵素を測定の対象とした。

2-8 SDS-PAGE

SDS-PAGE はゲル中のタンパク質を電気泳動させることにより分子量の大きさによってタンパク質を分離することができる。SDS を作用させたタンパク質はゲルに通電することによって陽極方向に泳動される。ゲルに分子量マーカーとサンプルを注入し、泳動させた後、一晩染色し、脱色液で脱色したのち、撮影した。

3. 結果および考察

HSDH 推定遺伝子 *Pyrfu0280* の塩基調は 783 bp であり、PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で流したところ、目的の位置にバンドが確認できたため、*Pyrfu0280* の増幅が確認できた。この PCR 産物を用いて TOPO クローニングを行い、精製したプラスミドで再度アガロースゲル電気泳動でバンドを確認したところ、約 1000 bp のところにバンドが確認できたため、目的遺伝子が pET101 に挿入されたことが示唆された。その発現プラスミドから作成した酵素液を用いて加熱前と加熱後(70°C)の活性を 2-7 の条件で測定した。このとき、加熱前は酵素活性曲線を示したが、加熱後は活性を示さなかった。また、*Pyrfu0280* のタンパク質分子質量をアミノ酸配列から計算したところ、約 27.8 kDa となった。酵素液を用いて SDS-PAGE を行ったところ、約 27.8 kDa の位置に太いバンドは得られなかった。ミスフォールディングが起きている可能性があるため、追加で 2-7 で遠心分離を行った際の沈殿物を再溶解させ、封入体 SDS-PAGE を行ったが目的のバンドは得られなかった。以上より、加熱前の活性は大腸菌由来の HSDH のものであり、*P. furiosus* 由来の HSDH は発現していないことがわかった。

この理由として生育環境の違いが挙げられる。*P. furiosus* の至適温度は 100°C であり、*S. tokodaii* よりも生育下限温度が高くなっているため、発現の有無に影響していることが考えられる。また、アーキア由来タンパク質の開始コドンはメチオニンではなくリシンである可能性があり、配列が異なっている可能性がある。

参考文献

- 1) Wheelis, M. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1992**, 89 (7), 2930–2934.
- 2) Kubota, T. *et al. Commun Biol* **2022**, 5 (1).
- 3) Hayashi, J. *et al. Sci. Rep.* **2015**, 5, 11674