

博士論文

放線菌由来 L-メチオニン脱炭酸酵素の
機能解析と臨床診断への活用

2017 年 3 月

林 将也

岡山大学大学院
環境生命科学研究科

目 次

目次	i	
略語表	iv	
第 1 章	序章	
第 1 節	アミノ酸脱炭酸酵素と PLP 酵素	1
第 2 節	L-メチオニン脱炭酸酵素	6
第 3 節	本研究の目的および論文の構成	10
第 2 章	<i>Streptomyces</i> sp. 590 由来 L-メチオニン脱炭酸酵素遺伝子のクローニング および配列解析	
第 1 節	背景および目的	11
第 2 節	実験材料および方法	
2-2-1	使用菌株	13
2-2-2	培地および培養方法	13
2-2-3	アミノキシダーゼを用いた L-メチオニン脱炭酸酵素の新規活性測定法の開発	14
2-2-4	L-メチオニン脱炭酸酵素の部分精製	16
1)	無細胞抽出液の調製	
2)	硫酸分画	
3)	DEAE-Toyopearl 650M 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー	
4)	Phenyl-Toyopearl 650M 疎水カラムクロマトグラフィー	
5)	Sephacryl S-300 HR ゲルろ過カラムクロマトグラフィー	
2-2-5	タンパク質定量法	18
2-2-6	ポリアクリルアミドゲル電気泳動	18
2-2-7	細胞毒性の評価	21
2-2-8	N 末端アミノ酸配列解析	22
2-2-9	ゲノム DNA の調製	22
2-2-10	核酸定量法	23
2-2-11	アガロースゲル電気泳動法	23
2-2-12	次世代シーケンサーによるゲノム DNA 塩基配列の決定	23
2-2-13	L-メチオニン脱炭酸酵素遺伝子の決定	23
第 3 節	結果および考察	
2-3-1	L-メチオニン脱炭酸酵素の細胞毒性評価	25
2-3-2	N 末端アミノ酸配列の決定	27

2-3-3	放線菌 <i>Streptomyces</i> sp. 590 のゲノム DNA の塩基配列の決定	27
2-3-4	L-メチオニン脱炭酸酵素遺伝子の塩基配列の決定	27
2-3-5	類縁酵素の系統解析	29
2-3-6	アミノ酸配列中の重要残基の推定	30

第3章 L-メチオニン脱炭酸酵素の大腸菌発現系構築による酵素生産と均一精製, 機能解析および抗腫瘍性の検討

第1節	背景および目的	35
-----	---------	----

第2節 実験材料および方法

3-2-1	使用菌株およびベクター	35
3-2-2	使用試薬	36
3-2-3	培地および培養方法	36
3-2-4	プラスミドの調製	37
3-2-5	PCR 法による MetDC 遺伝子の増幅	38
3-2-6	GeneArt による DNA 断片の連結	39
3-2-7	プラスミドの抽出および精製	39
3-2-8	大腸菌コンピテントセルの作製	40
3-2-9	L-メチオニン脱炭酸酵素遺伝子含有プラスミドを用いた大腸菌の形質転換	40
3-2-10	組換え L-メチオニン脱炭酸酵素の精製	41
3-2-11	ゲルろ過 HPLC 法による分子質量およびサブユニット組成の推定	43
3-2-12	酵素中の PLP 量の定量	43
3-2-13	PLP 依存性の検討	45
3-2-14	阻害剤の影響	46
3-2-15	抗腫瘍性の検討	47

第3節 結果および考察

3-3-1	酵素発現プラスミドの構築	49
3-3-2	組換え L-メチオニン脱炭酸酵素の精製	54
3-3-3	分子質量およびサブユニット組成	56
3-3-4	最適温度, 耐熱性, 最適 pH, pH 耐性	58
3-3-5	基質特異性	59
3-3-6	酵素反応速度論解析	60
3-3-7	PLP 依存性の検討	61
3-3-8	酵素活性に及ぼす阻害剤の影響	65
3-3-9	抗腫瘍性の検討	67

第4章	L-メチオニン脱炭酸酵素を用いたL-メチオニン酵素的定量法の開発	
第1節	背景および目的	70
第2節	実験材料および方法	
4-2-1	L-メチオニン脱炭酸酵素とアミノキシダーゼを併用した L-メチオニンの酵素的定量法	77
4-2-2	ヒト血清, ヒト血しょうを用いたL-メチオニンの酵素的定量試験	78
4-2-3	呈色用混合試薬の冷蔵保存性の検討	79
4-2-4	L-メチオニンの完全分解条件の検討およびL-メチオニン, L-ホモシステイン混合液からのアミノ酸の分別的定量法の検討	80
4-2-5	過酸化水素処理および加熱処理によるL-ホモシステインの影響の除去と L-メチオニン検出精度の向上の検討	85
第3節	結果および考察	
4-3-1	L-メチオニン酵素的定量法の確立	86
4-3-2	ヒト血清, ヒト血しょうサンプル中のL-メチオニン酵素的定量	93
4-3-3	呈色用混合試薬の冷蔵保存性の検討	95
4-3-4	L-メチオニンの完全分解条件の検討およびL-メチオニン, L-ホモシステイン混合液からのアミノ酸の分別的定量法の検討	96
4-3-5	過酸化水素処理および加熱処理によるL-ホモシステインの影響の除去と L-メチオニン検出精度の向上の検討	102
第5章	総括および今後の展望	107
参考文献		112
謝辞		119

略記表

本文中で使用した略語を以下に示す.

- APS : 過硫酸アンモニウム (ammonium persulfate)
- DMSO : ジメチルスルホキシド (dimethylsulfoxide)
- DTT : ジチオスレイトール (dithiothreitol)
- EDTA : エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid)
- GluDC : L-グルタミン酸脱炭酸酵素 (L-glutamate decarboxylase)
- HisDC : L-ヒスチジン脱炭酸酵素 (L-histidine decarboxylase)
- IPTG : イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)
- KPB : リン酸カリウム緩衝液 (potassium phosphate buffer)
- LB 培地 : Luria-Bertani 培地 (Luria-Bertani broth / Luria-Bertani medium)
- MBTH : 3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン塩酸塩-水和物 (3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride monohydrate)
- mdc* : L-メチオニン脱炭酸酵素遺伝子 (the gene coding L-methionine decarboxylase)
- MetDC : L-メチオニン脱炭酸酵素 (L-methionine decarboxylase)
- MGL : L-メチオニン γ -リアーゼ (L-methionine γ -lyase)
- PLP : ピリドキサール 5'-リン酸 (pyridoxal 5'-phosphate)
- PMSF : フェニルメチルスルホニルフルオリド (phenylmethylsulfonyl fluoride)
- PVDF : ポリビニリデンフルオリド (polyvinylidene fluoride)
- SDS : ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate)
- TEMED : *N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミン (*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine)
- Tris : トリスヒドロキシメチルアミノメタン (tris (hydroxymethyl) aminomethane)
- ValDC : L-バリン脱炭酸酵素 (L-valine decarboxylase)

第1章 序章

第1節 アミノ酸脱炭酸酵素と PLP 酵素

アミノ酸脱炭酸酵素 (EC 4.1.1) は、アミノ酸脱炭酸酵素はアミノ酸から二酸化炭素とアミンまたはアミノ酸の生成を触媒する一群の酵素であり (Fig. 1), 微生物, 動物, 植物に幅広く分布している¹⁾.

20 種類の標準アミノ酸の脱炭酸酵素として主に, L-ヒスチジン脱炭酸酵素 (HisDC), L-グルタミン酸脱炭酸酵素 (GluDC, GAD), L-リシン脱炭酸酵素 (LysDC), L-チロシン脱炭酸酵素 (TyrDC) および L-バリン脱炭酸酵素 (ValDC) が知られている. 中でも細菌由来の酵素が最もよく研究されており, 代表的なものに HisDC や GluDC がある. 芳香族アミノ酸脱炭酸酵素を除き, そのいずれもが高い基質特異性を示すので, 各種アミノ酸の特異的な定量に用いられている²⁾.

L-メチオニン (L-Met) を触媒する酵素としては, 当研究室で精力的に研究してきた L-methionine α,γ -lyase (MGL) をはじめ, L-methionine *S*-adenosyltransferase, L-methionine *S*-methyltransferase, L-methionine aminopeptidase, L-methionine aminotransferase, L-methionine racemase, L-methionine dethiomethylase などが知られるが, L-methionine に特異的な酸化還元酵素は知られていない. 本研究で扱う L-methionine decarboxylase に関しては, 放線菌やシダ植物, 海産渦鞭毛藻に由来する酵素の研究例に限られる.

アミノ酸脱炭酸酵素の生理的役割は, 酵素に応じて様々であり, いくつかの研究例がある. GluDC は, アミンを生産することで生育環境の pH 低下の防止に寄与すると考えられている³⁾. また, HisDC が産生するアレルギー物質のヒスタミンや, GluDC が産生する抑制系神経伝達物質の γ -アミノ酪酸 (GABA) のように, 高等動物においては, アミノ酸から脱炭酸で生じる生体アミンが中枢神経系

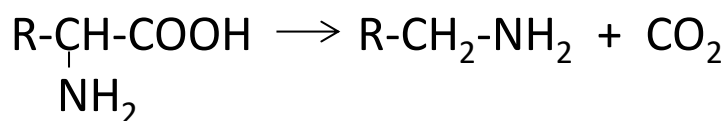


Fig. 1. アミノ酸脱炭酸酵素が触媒する反応.

における神経伝達物質あるいはその前駆体として役割を果たすと考えられている⁴⁾。また、ValDCはインドール-3-酢酸の生成に関与すると考えられている。これは植物ホルモン・オーキシン類の一種であるので、脱炭酸酵素は生理活性物質を産生する役割を果たすと考えられる。

ほとんどのアミノ酸脱炭酸酵素が補酵素として PLP を要求するビタミン B₆ 酵素である⁵⁾。PLP 酵素はその構造の違いから Fold type I, II, III, IV あるいは V に分類可能であり、PLP 依存性アミノ酸脱炭酸酵素は Fold type I あるいは Fold type III に分類されている⁶⁻⁸⁾。

さらに PLP 依存アミノ酸脱炭酸酵素はその配列から 4 つのグループに分類される⁵⁾。Group I, Group II (Fig. 2) および Group III (Fig. 3) は Fold type I の酵素, Group IV は Fold type III の酵素により構成される。Group II にはグリシン脱炭酸酵素のみ, Group III には HisDC や GluDC 等, Group III, IV には L-オルニチン脱炭酸酵素, L-アルギニン脱炭酸酵素等が属する (Table 1)。

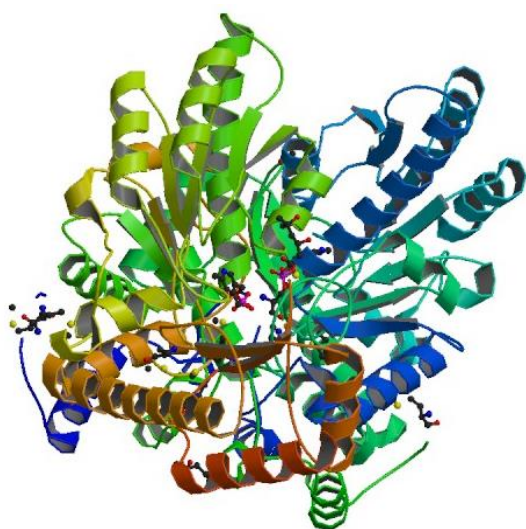
Table 1. PLP 依存性アミノ酸脱炭酸酵素の分類⁸⁾。

Fold type	Group	Enzyme
Fold type I	Group I	glycine decarboxylase
	Group II	L-glutamate decarboxylase L-histidine decarboxylase L-tyrosine decarboxylase L-lysine decarboxylase aromatic-L-amino acid decarboxylase
	Group III	L-ornithine decarboxylase (bacteria) L-arginine decarboxylase (bio-degradative)
Fold type III	Group IV	L-ornithine decarboxylase (eucaryotic) L-arginine decarboxylase diaminopimelate decarboxylase

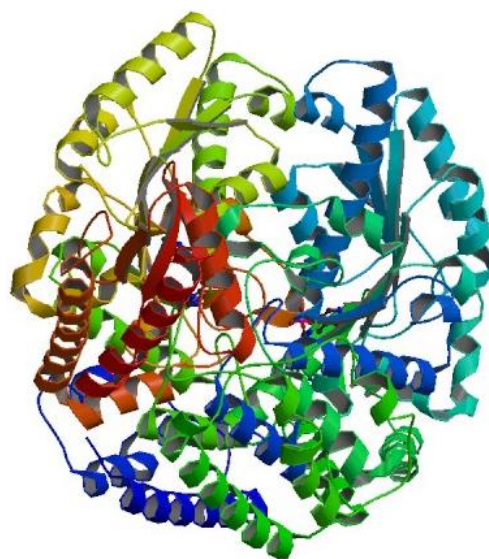
* Fold type, PLP 酵素の構造分類 ; Group, アミノ酸脱炭酸酵素の配列分類。

中でも Group IIは最もよく特徴が分かっているグループであり、ホモ二量体あるいは多量体を形成する⁹⁻¹¹⁾。二量体ごとに活性中心を2つ持っており、活性部位は二量体界面に位置する。各単量体の重要な残基が互いの活性中心に寄与している (Fig. 2)。各単量体は3つのドメイン (大ドメイン, 小ドメイン (C末端ドメイン), N末端ドメイン) を有する。大ドメインは PLP 結合部位を含み、7つの β -ストランドが8つの α -ヘリックスに囲まれた構造であり、N末端ドメインは二量体構造形成に寄与し、3つの α -ヘリックスによって形成されている。

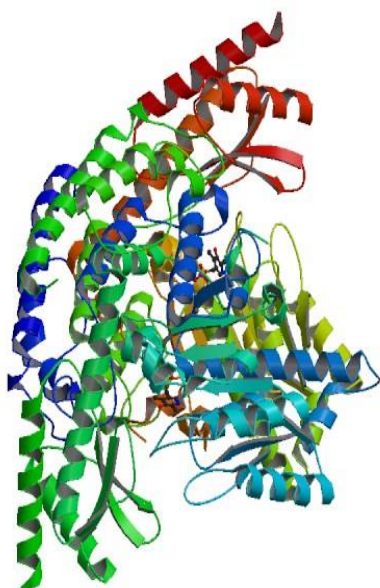
A



B



C



D

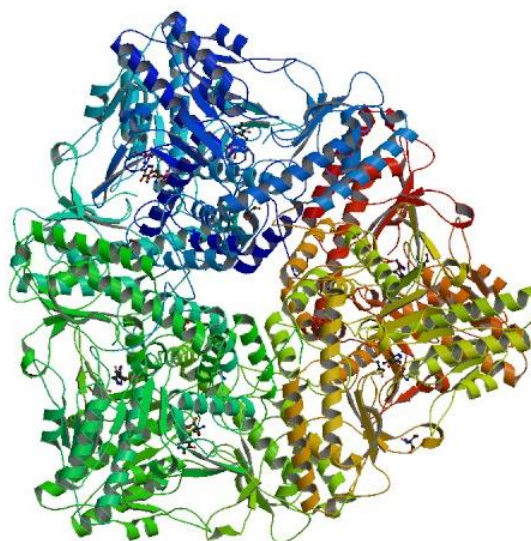
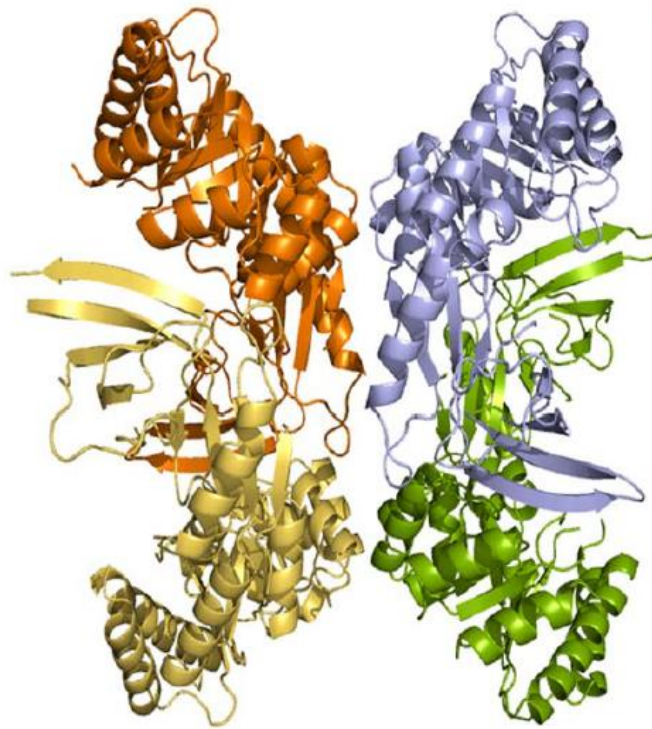


Fig. 2. Group IIIに属する PLP 依存性アミノ酸脱炭酸酵素の 4 次構造.

(A) *Methanocaldococcus jannaschii* 由来 L-チロシン脱炭酸酵素 (PDB ID: 3F9T) ; (B) ヒト由来 L-ヒスチジン脱炭酸酵素 (L-ヒスチジンメチルエステルとの共結晶) (PDB ID: 4E1O)⁴⁾ ; (C) *Sus scrofa* 由来 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) 脱炭酸酵素 (PDB ID: 1JS6)¹²⁾ ; (D) *Escherichia coli* 由来 L-グルタミン酸脱炭酸酵素 (中性 pH) (PDB ID: 1PMO)¹³⁾.

A



B

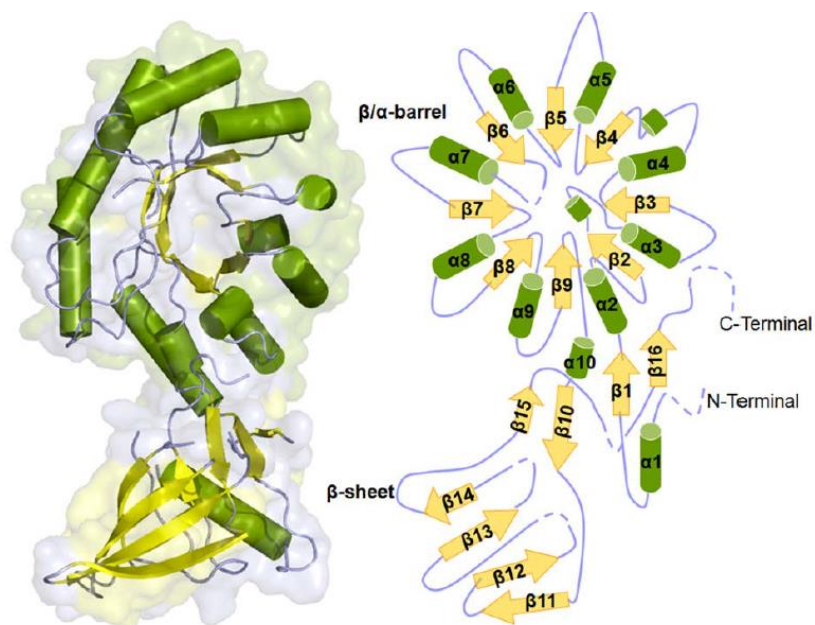


Fig. 3. Group IIIに属する PLP 依存性アミノ酸脱炭酸酵素, *Entamoeba histolytica* 由来 L-オルニチン脱炭酸酵素の (A) 4 次構造と (B) サブユニット構造 (PDB ID: 4AIB)
14).

第2節 L-メチオニン脱炭酸酵素

L-メチオニン脱炭酸酵素 (MetDC) (EC 4.1.1.57) は, L-メチオニン (L-Met) の脱炭酸を触媒して, 3-メチルチオプロピルアミンおよび CO_2 を生じる反応を触媒する^{15,16)} (Fig. 4). ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) を補酵素とするビタミン B_6 酵素である.

L-メチオニン脱炭酸酵素が初めて発見されたのは 1959 年で, Mazelis がキャベツの葉や西洋ワサビの過酸化物が生成する際の酵素システムの一部として発見した^{17,18)}. ただし, これは L-メチオニン「酸化的」脱炭酸酵素であった. 1968 年になり, 協和発酵工業株式会社の萩野と中山によって, L-メチオニン「非酸化的」脱炭酸酵素 (MetDC) の存在が放線菌 *Streptomyces* 中で発見された. この放線菌株を L-Met を添加した培地で培養すると, 培養液中にアミンが集積することがわかり, 後にこのアミンが MetDC 反応の反応生成物の 3-メチルチオプロピルアミンであると同定された^{15,19)}. このことから, この放線菌株は培地への L-Met 添加で誘導されて, L-Met の脱炭酸を触媒する酵素を生産することが明らかになった^{15,19)}. その後, 京都大学化学研究所の Misono, Soda らによって放線菌由来 MetDC が部分精製され, 本酵素が PLP を補酵素とするビタミン B_6 酵素であることが示された¹⁶⁾.

MetDC はいままで 3 種の生物種において報告されており, 1960 年代に放線菌 *Streptomyces* sp.^{15,20)} で初めて見いだされ, 1970 年代にシダ植物 *Dryopteris filix-mas*^{21,22)}, 1990 年代に海産渦鞭毛藻 *Cryptocodinium cohnii*²³⁾ が生産することがわかった. 本酵素の生理的意義は諸説あり未だ解明されていない.

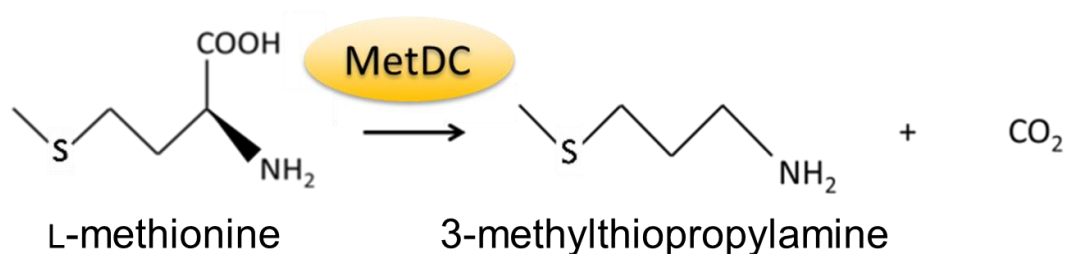


Fig. 4. MetDC が触媒する反応¹⁶⁾.

ただ、海産渦鞭毛藻に由来する MetDC においてのみ、海洋中の硫黄サイクルの重要な物質である硫化ジメチルの合成への関与を示唆する報告がなされている²³⁾ (Fig. 5)。海産渦鞭毛藻由来 MetDC は、メチオニン代謝経路において、ジメチルスルホニオプロピオネート (dimethylsulfoniopropionate, DMSP) を生合成する鍵酵素と考えられている。メチオニン代謝経路は、L-Met から 3-メチルチオプロピルアミン (3-methylthiopropylamine, MTPA, 3-MTPA)、3-メチルチオプロピオン酸 (3-methylthiopropionate, MTP) を経由して、DMSP を合成する経路である。まず、L-Met が脱炭酸されて 3-MTPA が合成される。次に 3-MTPA が脱アミノ化され、MTP が合成される。最後に MTP がメチル化され、DMSP が合成される。Kitaguchi らによれば²³⁾、DMSP は硫化ジメチル (dimethylsulfide, DMS) の前駆体であり、この物質は海洋中から大気中へ放出される主要な硫黄化合物である。したがって、海産渦鞭毛藻由来 MetDC は世界の硫黄サイクルの中核を担っている可能性がある。

アミン類は、すべての生物にとって、核酸およびタンパク質を生合成するために必須の化合物である²⁴⁾。3-メチルチオプロピルアミンは、ポリアミン代謝経路における必須物質である S-アデノシルメチオニン脱炭酸化物と構造の一部を共有している²⁵⁾。したがって、MetDC は、放線菌 *Streptomyces* sp. 590 のアミン代謝経路に関連している可能性がある。Knowles らおよび Floris らによるアミノキシダーゼの研究は、MetDC およびアミノキシダーゼが、L-Met から 3-MTPA を経由して 3-メチルチオプロピルアルデヒドを生合成する代謝に関与する可能性があることを示唆した^{26,27)}。このことから、アミノキシダーゼは、*Streptomyces* sp. 590 由来 MetDC の生理的意義を解明するための鍵酵素なのかもしれない。

MetDCを生産する放線菌、シダ植物、海産渦鞭毛藻の共通点を考えたところ、孢子形成を行う生活環を有することが挙げられる。芽胞を形成することでよく知られている *Bacillus subtilis* は、栄養体時に含硫アミノ酸の大部分を L-Met で保持している一方で、孢子体時には含硫アミノ酸の 2/3 を L-システイン (L-Cys) (あるいは 2 量体のシスチン) で保持しているという報告がある²⁸⁾。報告によれば、L-Met は孢子の中心部に、L-Cys は孢子の外殻に局在するという。したがって、MetDC 生産性の放線菌やシダ植物、海産渦鞭毛藻もまた、孢子外殻の形成に重要な L-Cys を生合成するために MetDC を生産しているのかもしれない。また、仮に MetDC が L-Met を L-Cys へ変換するために使用さ

れるのだとすれば、ヒトをはじめとする生物が保有し、システインやグルタチオンの生合成に関与するメチオニン代謝経路の補強あるいはおよび代替の代謝経路として働くのかもしれない。

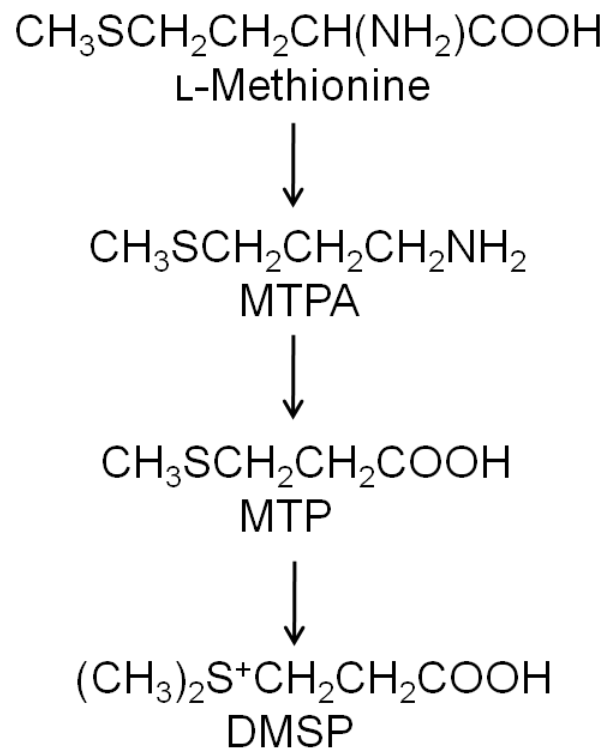


Fig. 5. 海産渦鞭毛藻における推定上のメチオニン代謝経路²³⁾. MTPA: 3-メチルチオプロピルアミン (3-MTPA), MTP: 3-メチルチオプロピオン酸, DMSP: ジメチルスルホニオプロピオネート

現在報告されている 3 種の生物由来の MetDC を比較してみると、3 つに共通した特徴として、同一サブユニットからなるダイマー構造であること、PLP を補酵素とすることが挙げられる (Table 2)。最適 pH は中性から酸性であり、熱に弱い。

また、比活性や基質親和力が最も高いのは、放線菌 *Streptomyces* sp. 由来の MetDC である。

Table 2. これまでに報告された MetDC の主な特徴.

	<i>Streptomyces</i> sp. (放線菌) 由来 MetDC ^{16, 20)}	<i>Dryopteris filix-mas</i> (シダ植物) 由来 MetDC ^{21, 22)}	<i>Cryptocodinium cohnii</i> (海産渦鞭毛藻) 由来 MetDC ²³⁾
分子質量 (Da)	120,000	100,000	204,000
サブユニット (Da)	59,000	57,000	100,000
サブユニット組成	ホモダイマー	ホモダイマー	ホモダイマー
補因子	PLP	PLP	PLP
最適 pH	6.9	5.0	7.3
最適温度 (°C)	40	-	30
比活性 ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$)	29.7	20	4.5
K_m (mM)	5	48	-
基質	L-メチオニン S-エチルシステイン L-ノルバリン L-ロイシン L-イソロイシン L-ノルロイシン L-エチオニン	L-メチオニン S-エチルシステイン L-ノルバリン L-ロイシン L-イソロイシン L-ノルロイシン L-バリン	L-メチオニン

第3節 本研究の目的および論文の構成

L-メチオニン脱炭酸酵素 (MetDC) (EC 4.1.1.57) に関する本研究は、数少ない L-メチオニンの代謝酵素の知見の一つとして、また、アミノ酸脱炭酸反応を触媒する酵素の一つとして、さらには、PLP 酵素の反応機構の理解の一助になることが期待される。

しかし、いずれの生物における MetDC についても酵素発現量が少なく、酵素の精製が難しいという問題点があり、これが基礎・応用の研究の進展を長年にわたり困難にさせてきた。

本酵素の基礎および応用の研究を推進するため、本研究では、*Streptomyces* sp. 590 由来 MetDC の遺伝子クローニング、組換え発現、精製および酵素化学的な性質検討を主とする基礎研究と L-Met 定量や抗腫瘍酵素に関する応用研究を行った。

本学位論文の構成は、研究内容が次の3つの章から成り（第2章「*Streptomyces* sp. 590 由来 L-メチオニン脱炭酸酵素遺伝子のクローニングおよび配列解析」、第3章「L-メチオニン脱炭酸酵素の大腸菌発現系構築による酵素生産と均一精製、機能解析および抗腫瘍性の検討」、第4章「L-メチオニン脱炭酸酵素を用いた L-メチオニン酵素的定量法の開発」）、最後に、第5章「総括および今後の展望」とした。

第2章 *Streptomyces* sp. 590 由来 L-メチオニン脱炭酸酵素遺伝子のクローニングおよび配列解析

第1節 背景および目的

L-メチオニン脱炭酸酵素 (MetDC) (EC 4.1.1.57) は、ピリドキサール 5'-リン酸 (PLP)^{15,16)} に依存して、L-メチオニンの非酸化的脱カルボキシル化を触媒して 3-メチルチオプロピルアミンおよび二酸化炭素を生成する。Mazelis らは、キャベツ葉ペルオキシダーゼおよび西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)^{17,18,29)} によるメチオニンの酸化的脱カルボキシル化を最初に報告した。この反応生成物は 3-メチルチオプロピルアミドであり、非酸化的脱カルボキシル化による反応生成物の 3-メチルチオプロピルアミンではなかった。一方、Hagino ら¹⁹⁾ は、土壌由来の放線菌株 *Streptomyces* sp. によって生産される L-メチオニン非酸化的脱炭酸酵素 (MetDC) を最初に報告した。この放線菌株を DL-メチオニン含有培地で培養したとき、MetDC が培養上清中に 3-メチルチオプロピルアミンを蓄積させることを、彼らは示した。さらに、彼らは、アセトン乾燥細胞および放線菌株の粗精製物を用いて、MetDC のいくつかの特性を明らかにした¹⁵⁾。DL-メチオニンで培養した放線菌細胞は、L-メチオニンのみを脱カルボキシル化し、D-メチオニンは脱カルボキシル化しなかった。この基質特異性から、MetDC は L-メチオニン濃度を定量するセンサーとしての能力を有すると期待されてきた。Misono ら¹⁶⁾ は、MetDC 部分精製酵素を用いて MetDC のいくつかの特性を報告した。分子量、最適 pH、PLP の影響、L-メチオニンと 19 の標準アミノ酸および多くの L-メチオニン類似体に対する基質特異性、ならびに L-メチオニン、L-ノルロイシン、S-エチル-L-システインのミカエリス定数 (それぞれ 5, 16, 44 mM)。放線菌をはじめとして、MetDC を産生する生物がいくつか報告されている (*Streptomyces* sp.^{15,20)}、シダ植物 *Dryopteris filix-mas*²¹⁾、海産渦鞭毛藻 *Cryptocodinium cohnii*²³⁾)。

報告によると^{15,16)}、*Streptomyces* sp. 590 は、L-メチオニンの定量またはメチオニン飢餓による抗腫瘍薬剤への利用に有望な酵素であると考えられた。これまで、*Streptomyces* sp. 590 の菌体からネイティブ MetDC を大量に精製・取得することは困難であり、このことが過去数十年間の基礎研究上かつ応用研究上の両面において MetDC に関する研究の進展を妨げてきた¹⁶⁾。

この章では、*Streptomyces* sp. 590 由来 MetDC の新規酵素活性測定法の開発、*Streptomyces* sp. 590 の培養、MetDC の精製、腫瘍細胞に対する MetDC の細胞毒性の検討を行い、ゲノム DNA における MetDC 遺伝子の同定および MetDC の 1 次配列の同定を行った。

第2節 実験材料および方法

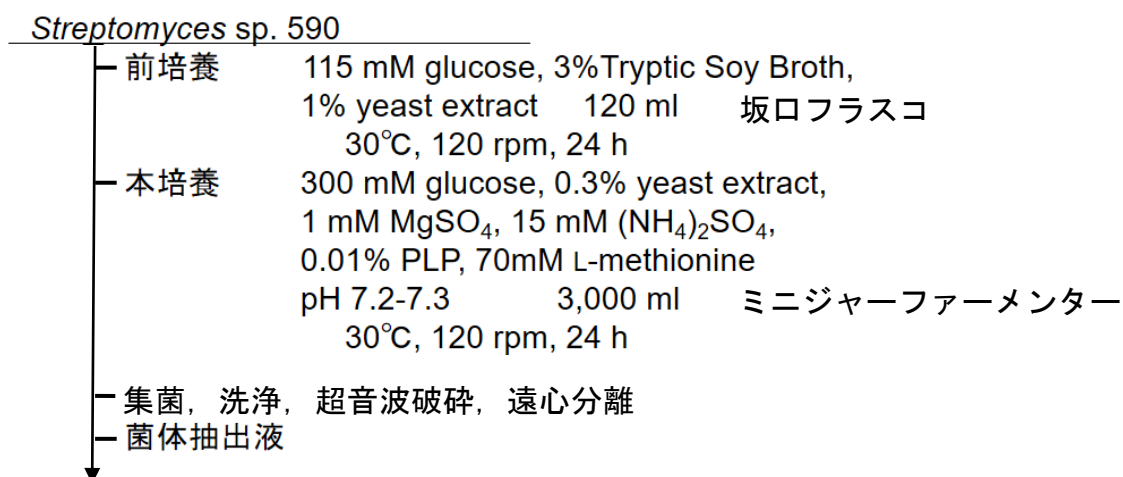
2-2-1 使用菌株

放線菌 (*Streptomyces* sp. 590) は協和発酵工業から譲渡され、ネイティブ MetDC の精製およびゲノム DNA の調製に使用した。

2-2-2 培地および培養方法

前培養では 1 L の坂口フラスコを 1 本用い、120 ml の培地で行った (Scheme 1)。115 mM グルコース、および 3% トリプティックソイブロー、1% 酵母エキスを含む培地を作成して綿栓で封をし、オートクレーブにより滅菌した。この培地に、放線菌 *Streptomyces* sp. 590 の孢子懸濁液を十分量植菌し、30°C、120 rpm、約 24 時間培養した。本培養はミニジャーファーマンターにて 3 L で培養を行った。300 mM グルコース、0.3% 酵母エキス、1 mM MgSO₄、15 mM (NH₄)₂SO₄、0.01% PLP、70 mM L-メチオニンを含む培地 3,000 ml を 2 M の NaOH にて pH 7.2-7.3 に調整し、3 L 用ミニジャーファーマンター内で滅菌し、使用した。前培養液を加えた後、本培養は 30°C、120 rpm、約 24 時間通気培養した。菌が十分に生育したところで培養を終了し、菌体は遠心分離 (6,000 rpm、15 min、4°C) によって回収し、0.85% NaCl 溶液で 2 回洗浄し、使用するまで -30°C のフリーザーで保存した。

Scheme 1. 放線菌 *Streptomyces* sp. 590 の培地および培養方法。



2-2-3 アミノキシダーゼを用いた L-メチオニン脱炭酸酵素の新規活性測定法の開発

Arthrobacter globiformis 由来の銅アミノキシダーゼ³⁰⁾, フェノール, 4-アミノアンチピリンおよび西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼを用いた発色法を用いて, 過酸化水素を検出することにより, MetDC の酵素活性を測定した (Fig. 6). 過酸化水素は, L-メチオニンの脱カルボキシル化合物である 3-メチルチオプロピルアミンを, アミノキシダーゼにより酸化的脱アミノ化反応を経て生成した. 過酸化水素をペルオキシダーゼによりフェノールおよび 4-アミノアンチピリンと組み合わせ, 赤色のイミン化合物[1,5-ジメチル-4-(4-オキソ-シクロヘキサ-2,5-ジエニリデンアミノ)-2-フェニル-1,2-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン]を生成した. このイミン化合物は, 反応溶液の発色を引き起こし, 505 nm において極大吸収波長を示した. MetDC 活性 (U) は, 1 分間に 1 μ mol の 3-メチルチオプロピルアミンを生じる反応を触媒する酵素量として定義した.

100 mM KPB (pH 6.6), 200 mM L-メチオニンおよび 40 μ M PLP を含む反応混合物 (950 μ l) を, 1.5 ml チューブ中で 55°C, 5 分間プレインキュベートした (Scheme 2). 反応液に酵素液 (50 μ l) を加えた. 55°C, 5 分間インキュベートした後, 反応液 1 ml を沸騰水中またはヒートブロック中で 80°C, 5 分間加熱して酵素反応を停止させた. 4°C, 10,000 rpm, 3 分間の遠心分離後, 上清 900 μ l を 1.5 ml チューブに移した. 50 mM フェノール 43 μ l, 15 mM 4-アミノアンチピリン 43 μ l, 300 mU/ml ペルオキシダーゼ 43 μ l および 14.3 mU/ml アミノキシダーゼ 1 μ l を含有する呈色用混合試薬 (130 μ l) を, 900 μ l の上清に添加した後, 混合液を 37°C で 60 分間インキュベートした. 吸光度は, 分光光度計 Shimadzu UVmini-1240 UV-VIS (島津) により 505 nm で測定した.

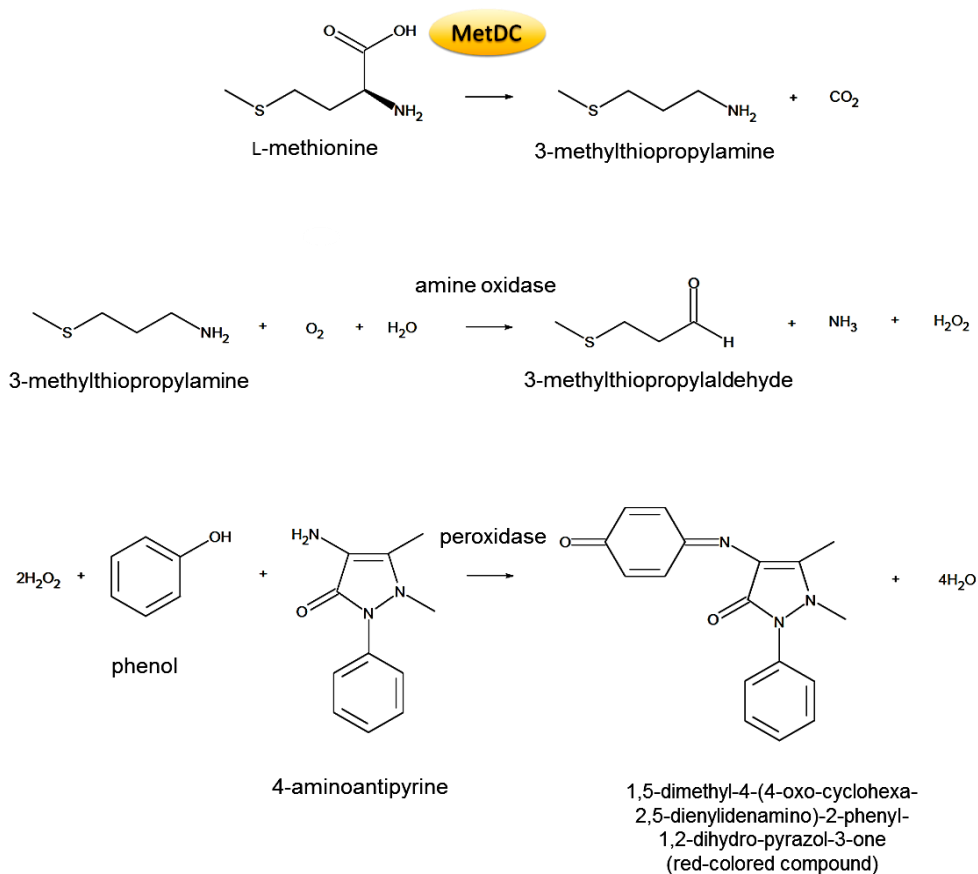


Fig. 6. アミノオキシダーゼおよび4-アミノアンチピリン法を利用したMetDCの活性測定法に関わる反応.

Scheme 2. L-メチオニン脱炭酸酵素の新規活性測定法の実験手順.

	100 mM KPb (pH 6.6), 40 μM PLP	950 μl
—	プレインキュベート	55°C, 5 min
—	MetDC サンプル 添加	50 μl
—	インキュベート	55°C, 5 min
—	反応停止	80°C, 5 min
—	遠心分離	10,000 rpm, 3 min, 4°C
	●アミノオキシダーゼを用いたアミンの定量	
—	MetDC 反応液 遠心上清採取	900 μl
—	混合試薬 添加	130 μl
	・ 50 mM フェノール	(内 43 μl)
	・ 15 mM 4-アミノアンチピリン	(内 43 μl)
	・ 300 mU/ml ペルオキシダーゼ	(内 43 μl)
	・ 14.3 mU/ml アミノオキシダーゼ	(内 1 μl)
—	インキュベート	37°C, 60 min
—	呈色反応後, 505 nm における吸光度を測定	

2-2-4 L-メチオニン脱炭酸酵素の部分精製

すべての精製過程において、酵素溶液の温度を 0-4°C に保った。

1) 無細胞抽出液の調製

Streptomyces sp. 590 の集菌した菌体を、湿菌体重量の 3 倍容量の破碎用緩衝液 (100 mM KPB (pH 7.0), 0.25 mM EDTA, 0.01% 2-メルカプトエタノール, 50 μ M PLP) で懸濁後、カップソニケーターを用いた超音波破碎機 (Insonicator 201M, クボタ) により超音波破碎した (150 W, 20 min, 氷水還流下)。遠心分離後の上清を無細胞抽出液として回収した。

2) 硫安分画

氷中で無細胞抽出液に、25% 飽和硫安となるような量の硫酸アンモニウムを加え、アンモニアで pH 7.0 に調整し、1 時間攪拌後、一晩静置した。遠心分離によって上清を回収し、さらに、氷中で 50% 飽和硫安になるように硫酸アンモニウムを加え、アンモニアで pH 7.0 に調整後、2 時間攪拌後、2 時間静置した。その後、遠心分離により沈殿を回収し、これを緩衝液 (20 mM KPB (pH 7.0), 0.25 mM EDTA, 0.01% 2-メルカプトエタノール, 50 μ M PLP) に溶解させた。さらに同じ緩衝液で一晩透析することで脱塩し、これを硫安分画 (25-50% 飽和硫安) とした。硫安分画 (25-50% 飽和硫安) の溶液を DEAE-Toyopearl 650M 陰イオン交換カラムクロマトグラフィーに供した。

3) DEAE-Toyopearl 650M 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

サンプルのタンパク質量 5 mg あたり DEAE-Toyopearl 650 M 担体 1 ml をカラムに充填し、担体の 5 倍量の緩衝液 (20 mM KPB (pH 7.0), 0.25 mM EDTA, 0.01% 2-メルカプトエタノール, 50 μ M PLP) で担体を平衡化した。その後、上記の硫安分画 (25-50% 飽和硫安) の溶液をカラムクロマトグラフィーに供した。まず 0 mM, 次いで、100 mM の NaCl を含む同組成の緩衝液で非吸着タンパク質を溶出させ、100-300 mM NaCl の直線濃度勾配にて目的のタンパク質を溶出させた。溶出液は 200 drop ずつ (約 6 ml) 試験管に分取し、タンパク質濃度は各画分の OD₂₈₀ を測定することにより決定した。それぞれのピークに合わせて活性測定を行い、活性の高い画分を集めて濃縮

後、緩衝液 (20 mM KPB (pH 7.0), 0.25 mM EDTA, 50 μ M PLP, 0.01% 2-メルカプトエタノール, 20% (NH₄)₂SO₄) で透析を行い、これを DEAE-Toyopearl 650 M とした。DEAE-Toyopearl 650 M の活性画分を Phenyl-Toyopearl 650M 疎水カラムクロマトグラフィーに供した。

4) Phenyl-Toyopearl 650M 疎水カラムクロマトグラフィー

サンプルのタンパク質量 5 mg あたり Phenyl-Toyopearl 650 M 担体 1 ml をカラムに充填し、担体の 5 倍量の緩衝液 (20 mM KPB (pH 7.0), 0.25 mM EDTA, 50 μ M PLP, 0.01% 2-メルカプトエタノール, 20% (NH₄)₂SO₄) で平衡化した。その後、上記の DEAE-Toyopearl 650 M の活性画分をカラムクロマトグラフィーに供し、同緩衝液で非吸着タンパク質を溶出させた。次に 20-0% 飽和硫酸アンモニウム直線濃度勾配にて目的タンパク質を溶出させた。溶出液は 200 drop ずつ (約 6 ml) 試験管に分取し、タンパク質濃度は各画分の OD₂₈₀ を測定することにより決定した。それぞれのピークに合わせて活性測定を行い、活性の高い画分を集めて濃縮後、緩衝液 (20 mM KPB (pH 7.0), 0.25 mM EDTA, 50 μ M PLP, 0.01% 2-メルカプトエタノール, 0.1 mM NaCl) で透析を行い、これを Phenyl-Toyopearl 650M とした。Phenyl-Toyopearl 650M の活性画分を Sephacryl S-300 HR ゲルろ過カラムクロマトグラフィーに供した。

5) Sephacryl S-300 HR ゲルろ過カラムクロマトグラフィー

約 700 ml の Sephacryl S-300 HR 担体をカラムに充填し、担体容量の 1-4% 容量となるようにサンプルを濃縮した。担体の 2 倍量の緩衝液 (20 mM KPB (pH 7.0), 0.25 mM EDTA, 50 μ M PLP, 0.01% 2-メルカプトエタノール, 0.1 mM NaCl) で、1 ml/min の流速で平衡化を行った。その後、Phenyl-Toyopearl 650M の活性画分を供し、同緩衝液を用いて、流速は一定のまま溶出を行った。溶出液は 100 drop ずつ (約 3 ml) 分取し、タンパク質濃度は各画分の OD₂₈₀ を測定することにより決定した。それぞれのピークに合わせて活性測定を行い、活性の高い画分を集めて濃縮し、-80°C で凍結保存した。

2-2-5 タンパク質定量法

タンパク質濃度の測定は、Bio-Rad Protein Assay kit（バイオラッド）を用いた Bradford 法により測定した。試料溶液 800 μ l に対して、200 μ l のキット試薬溶液を添加し、ボルテックスあるいは転倒混和でよく混合し、30°C で 30 分間静置した後、595 nm における溶液の吸光度を測定した。ブランクは、タンパク質を含まない同組成のバッファー 800 μ l に 200 μ l のキット試薬溶液を添加して作製した。標準タンパク質としてウシ血清アルブミン（BSA）を用いて、検量線を作成した。

2-2-6 ポリアクリルアミドゲル電気泳動

1) SDS-PAGE ゲルの作製

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動は、Laemmli 法に基づいて行った。目的のタンパク質の精製度を視覚的に確認するために、SDS 存在下で電気泳動を行った。

まず、泳動板、シリコンチューブ、コームを 70% 2-プロパノールあるいは 70% エタノール存在下で拭き取り、分析の障害となるタンパク質を除去した。泳動板のスペーサーの周りにシリコンチューブを添わせ、スペーサー部分をクリップで固定してゲル板を組み立てた。12% アクリルアミド含有の分離ゲルのゾル（Table 3）を調製し、長いゲル板の上から約 3 cm の位置が水面となるように流し込んだ。すみやかに滅菌蒸留水 1 ml を重層し、室温で 15-20 分間放置して重合させた。重合後、滅菌蒸留水を除き、3% アクリルアミド含有の濃縮ゲルのゾル（Table 4）を調製し、分離ゲルの上に重層した。コームを差し込みそのまま 20 分間以上静置することにより重合させた。これを SDS-PAGE 用のゲルとして用いた。

2) サンプルの調製

2 mg/ml のタンパク質溶液に対して、2 \times サンプルバッファー（0.125 M Tris-HCl（pH 6.8）、4% SDS、10% スクロース、0.01% ブロモフェノールブルー（BPB）、10% 2-メルカプトエタノール）を等量で混合し、1 mg/ml のタンパク質サンプルとした（Native-PAGE 用の 2 \times サンプルバッファーは SDS と 2-メルカプトエタノールを含まない）。SDS-PAGE 用の混合液は、沸騰水中で 100°C、3 min あるいはヒートブロックで 80°C、5 min ボイルし、タンパク質を完全に変性させて、SDS-PAGE 用のサ

ンプルとした (Native-PAGE 用の混合液はボイルを行わない)。

3) 電気泳動

ゲル板を泳動槽にセットし、30 ml の 10x 電気泳動用緩衝液 (150 mM Tris base, 1.92 M グリシン, 1% SDS) をミリ Q 水により 10 倍に希釈し、1x 緩衝液 300 ml を泳動槽に注いだ。上記のように調製した 1 mg/ml のタンパク質溶液 10 μ l をウェルに供し (タンパク質量 10 μ g/well), 300-400 V, 20 mA の定電流条件 (ゲル板が 2 枚の場合は 40 mA) で約 90 分間泳動した。マーカータンパク質は、SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range (#161-0304, バイオラッド) を用いた。

サンプルバッファーに含まれる BPB の青い色のラインがゲル下端から 5-10 mm 程度となったところで泳動を停止した。泳動後のゲルをゲル板から取り外し、軽く水道水でゲル表面を洗ったのち、タッパなどの適当な容器内で、クマシーブリリアントブルー-R-250 (CBB) 染色液 (0.25% CBB R250, 5% エタノール, 7.5% 酢酸) 中で数時間から 1 日程度、振とうしてタンパク質の染色を行った。染色後、水道水でゲル表面の染色液を洗浄し、容器内に水道水およびキムワイプを入れ、数時間から 2 日程度、振とうさせて脱色した。SDS-PAGE の場合、脱色時に、容器内の水道水を電子レンジで十分沸騰させた上で、脱色した。

4) Native-PAGE ゲルの作製, サンプルの調製, 電気泳動

SDS, 2-メルカプトエタノールの非存在下で、ゲルの作製、サンプル調製および電気泳動を行った。2x サンプルバッファー、8% アクリルアミド含有の分離ゲルのゾル (Table 5)、3% アクリルアミド含有の濃縮ゲルのゾル (Table 6) および泳動用緩衝液は SDS を加えずに作製した。2 mg/ml に希釈したタンパク質溶液に対して、2x サンプルバッファー (0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 10% スクロース, 0.01% BPB) を等量で混合し、1 mg/ml の Native-PAGE 用のタンパク質サンプルとした。SDS を含まない 30 ml の 10x 電気泳動用緩衝液 (150 mM Tris base, 1.92 M グリシン) をミリ Q 水により 10 倍に希釈して用いた。タンパク質溶液はボイルせず、タンパク質溶液および電気泳動中は 4°C に保ち、非加熱で脱色を行ったが、それ以外の条件や操作は全て SDS-PAGE と同様に行った。

Table 3. SDS-PAGE 用分離ゲル組成
(12% アクリルアミド).

30% Acrylamide mix	3 ml
H ₂ O (sterilized MilliQ water)	0.625 ml
0.75 M Tris-HCl (pH 8.8)	3.75 ml
10% SDS	75 μ l
25% ammonium persulfate (APS)	25 μ l
TEMED	6 μ l

Table 4. SDS-PAGE 用濃縮ゲル組成
(3% アクリルアミド).

30% Acrylamide mix	0.375 ml
H ₂ O (sterilized MilliQ water)	1.45 ml
0.25 M Tris-HCl (pH 6.8)	2.5 ml
10% SDS	37.5 μ l
25% APS	12.5 μ l
TEMED	3 μ l

※ 「30% Acrylamide mix」: 1% N,N'-メチレンビスアクリルアミド 2 g, 29% アクリルアミド 58 g を, ミリ Q 水で 200 ml にメスアップ.

Table 5. Native-PAGE 用分離ゲル組成
(8% アクリルアミド).

30% Acrylamide mix	2 ml
H ₂ O (sterilized MilliQ water)	1.75 ml
0.75 M Tris-HCl (pH 8.8)	3.75 ml
25% APS	30 μ l
TEMED	6 μ l

Table 6. Native-PAGE 用濃縮ゲル組成
(3% アクリルアミド).

30% Acrylamide mix	0.375 ml
H ₂ O (sterilized MilliQ water)	1.45 ml
0.25 M Tris-HCl (pH 6.8)	1.875 ml
25% APS	20 μ l
TEMED	3 μ l

※ 「30% Acrylamide mix」: 1% N,N'-メチレンビスアクリルアミド 2 g, 29% アクリルアミド 58 g を, ミリ Q 水で 200 ml にメスアップ.

2-2-7 細胞毒性の評価

前培養した HeLa (ヒト子宮頸ガン細胞 Human cervical cancer cell line) および RERF-LC-AI (ヒト肺ガン細胞 Human squamous lung cancer cell line) に対して, MetDC の添加/非添加の後に 4 日間培養したときの各細胞の生存率を MTT アッセイ (Fig. 7) および顕微鏡写真により評価した (Scheme 3).

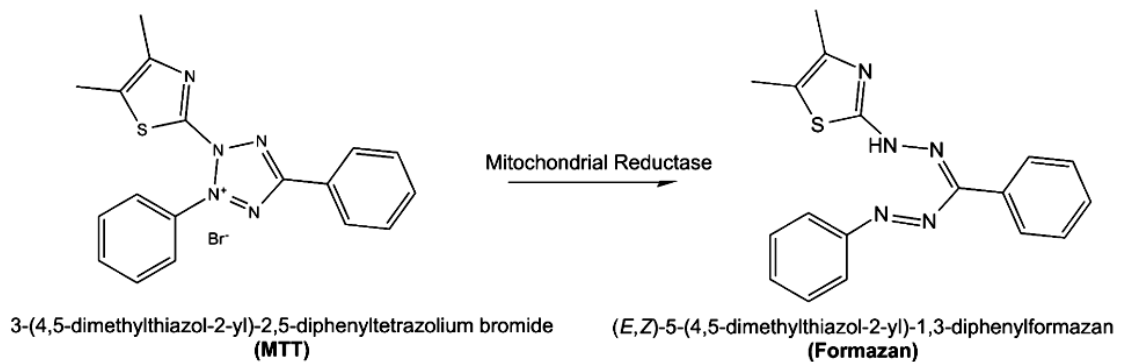


Fig. 7. MetDC の抗腫瘍性試験の評価における MTT アッセイの原理.

ヒト細胞中のミトコンドリアレダクターゼの作用で 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) を Formazan に還元する. 生きているヒト細胞が多いと, Formazan への変換率が高く, 生存率が高いと判定される.

Scheme 3. 腫瘍細胞を用いた L-メチオニン脱炭酸酵素の細胞毒性試験.

Tumor cells (HeLa, RERF-LC-AI)

- Cells were seeded in 96-well plate
[HeLa: 1×10^4 , RERF-LC-AI: 1×10^3 (cells/well)]
- Cells were cultured at 37°C for 24 h
under 5% CO₂ and 20% O₂ in a humidified chamber
- MetDC was added to the cultured cells.
- After incubation for 4 days,
the cell viability was examined by MTT assay.
(measure the absorbance at 570 nm).
- (MTT assay Cell Proliferation Kit I, Sigma-Aldrich)

2-2-8 N末端アミノ酸配列解析

Streptomyces sp. 590 由来 MetDC のタンパク質バンドを 2次元ゲル電気泳動により単離し、MetDC の N 末端アミノ酸配列を決定した。一次元目に等電点電気泳動、二次元目に SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。2次元電気泳動の後、ゲルを CBB R-250 で染色し、ブロッキング緩衝液 (25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 192 mM グリシン, 20%メタノール) に 1 時間浸漬した。ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜を含んだゲルを 100 V, 350 mA, 1 時間エレクトロブロッキングした。PVDF 膜上のタンパク質スポットの N 末端アミノ酸配列をペプチドシーケンサー (Applied Biosystems Model 477A, Foster City, CA, USA) によって分析した。

アミノ酸配列相同性検索には Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いた

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。類縁酵素とのアミノ酸配列アライメントには ClustalW を使用した (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>)。シグナルペプチドの有無、膜貫通領域の予測及び細胞内局在性予測には SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), PSORT (<http://psort.hgc.jp/>) を用いた。

2-2-9 ゲノム DNA の調製

Streptomyces sp. 590 の培養菌体を 5 ml の SET 緩衝液 (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 75 mM NaCl, 25 mM EDTA) で懸濁した。この懸濁液に、20 μ l の 10 mg/ml RNase および 100 μ l の 50 mg/ml リゾチームを添加し、37°C で 2 時間インキュベートした。次に、20 mg/ml プロテイナーゼ K 140 μ l および 10% SDS 600 μ l と混合した後、溶液を 55°C で 2 時間インキュベートした。この溶液に 2 ml の 5 M NaCl を加え穏やかに混合し、37°C まで冷却した。この溶液に 5 μ l のクロロホルムに加え、室温で 30 分間穏やかに混合した。遠心分離 (6,000 rpm, 15 min, 20°C) 後、上清を新しいチューブに移し、上清の 0.6 倍容量の 2-プロパノールを加え穏やかに混合した。3 分後、沈殿した DNA をガラス棒またはパストゥールピペットで採取した。DNA を 70% エタノールで 10 秒間洗浄し、風乾させ、55°C の滅菌水 1 ml に溶解した。最後に、DNA の分解を防ぐため、DNA 溶液に 5 μ l のクロロホルム / 3-メチル-L-ブタノール (イソアミルアルコール) を添加した。

2-2-10 核酸定量法

100 μ l 容石英セル内にて、DNA 溶液 5 μ l を滅菌ミリ Q 水あるいは TE バッファー 95 μ l で 20 倍に希釈し、分光光度計 UV-1200 によってその吸光度を測定した。二本鎖 DNA の濃度は A_{260} の値に、ファクター 50 と希釈倍率 20 を掛けることにより算出した。その単位は ng/ μ l とした。また、 A_{260} の値を A_{280} で割ることで純度を求め、実験に使用するのは純度が 1.6-2.0 の範囲内にあるものであった。

2-2-11 アガロースゲル電気泳動法

0.85-1.0% アガロースゲル (Agarose S, ニッポンジーン) を使用した。0.85-1.0% アガロースゲルを作製する際、1.7 g のアガロースを 200 ml の 1x TAE buffer で懸濁し、電子レンジで溶解させた。粗熱をとり、6 μ l の 10 mg/ml エチジウムブロマイドを添加したゲル (終濃度 0.3 μ g/ml) を作製した。5 μ l の DNA 試料に 1-2 μ l の 6x Loading Dye (東洋紡) を混合し、アガロースゲル電気泳動に供した。DNA の分子量マーカーには、Quick-Load 1 kb DNA Ladder (#N0468S, New England Biolabs) および/あるいは Wide-Range DNA Ladder (100-2,000 bp) (Code 3427A, タカラバイオ) を使用した。

2-2-12 次世代シーケンサーによるゲノム DNA 塩基配列の決定

Streptomyces sp. 590 のゲノム塩基配列決定を行った。次世代シーケンサー 454GS FLX+ (Roche 社) を使用した。ショットガンライブラリーは、マニュアルに従い GS FLX +ライブラリー調製キット (Roche) を用いて調製した。*Streptomyces* sp. 590 のゲノムのフラグメントランを 1/4 プレート分行った³¹⁾。得られたデータを付属のアセンブラーソフトである Newbler ver 2.8 にて解析した。

2-2-13 L-メチオニン脱炭酸酵素遺伝子の決定

次世代シーケンサーにより得られた *Streptomyces* sp. 590 のゲノム DNA ドラフト配列を用いて、*mdc* 遺伝子を検索した。BLAST により、MetDC の N 末端アミノ酸配列をクエリーとして使用して決定した。プライマー 1 [AAGAAG GAGATATACATGAGCCCGACCGCCTT C] およびプライマー 2 [GTGGTGGTGGTG CCCCAGGATCAC] のように、一対のプライマーを用いて PCR に

より *mdc* 遺伝子をクローニングした。PCR は以下の条件下で行った：94°Cで 2 分間; 98°Cで 10 秒間の 25 サイクル; 68°Cで 1 分間。他の PCR 条件は、KOD FX Neo キット（東洋紡, 日本）のマニュアルの指示書に記載された方法に従った。

第3節 結果および考察

2-3-1 L-メチオニン脱炭酸酵素の細胞毒性評価

放線菌由来 MetDC の部分精製酵素 (Table 7, Fig. 8) を用いた実験により, L-メチオニン分解性の抗腫瘍性酵素として知られる L-メチオニン γ -リアーゼ (MGL) と同様に, 2種の腫瘍細胞 HeLa (ヒト子宮頸ガン細胞 Human cervical cancer cell line) および RERF-LC-AI (ヒト肺ガン細胞 Human squamous lung cancer cell line) に対する抗腫瘍性を持つことが明らかとなった (Fig. 9). MGL は同一の基質を複数の反応で触媒する多機能酵素であり, 一方 MetDC は L-メチオニンの脱炭酸のみであると考えられるので, 制御しやすい抗腫瘍酵素として今後の利用が期待できると考えた.

Table 7. 放線菌 *Streptomyces* sp. 590 由来の L-メチオニン脱炭酸酵素の精製表.

	全タンパク質量 (mg)	全活性 (U)	比活性 (U/mg)	回収率 (%)	精製度 (fold)
無細胞抽出液	2,720	135	0.050	100	1.0
硫酸分画 (25-50%)	1,120	63	0.060	47	1.2
DEAE-Toyopearl 650M	121	57	0.50	42	10
Phenyl-Toyopearl 650M	6.0	8.6	1.4	6.3	28
Sephacryl S-300 HR	0.45	4.0	9.0	3.0	180

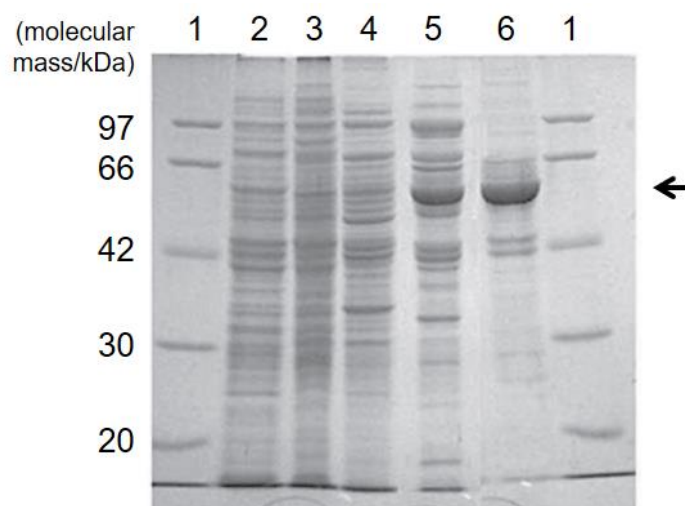


Fig. 8. 放線菌 *Streptomyces* sp. 590 由来の L-メチオニン脱炭酸酵素の精製の各段階における SDS-PAGE.

レーン 1, 分子質量マーカー; 2, 無細胞抽出液; 3, 硫酸分画 (25-50%飽和硫酸); 4, DEAE-Toyopearl 650M カラムクロマトグラフィー; 5, Phenyl-Toyopearl 650M カラムクロマトグラフィー; 6, Sephacryl S-300 HR カラムクロマトグラフィー

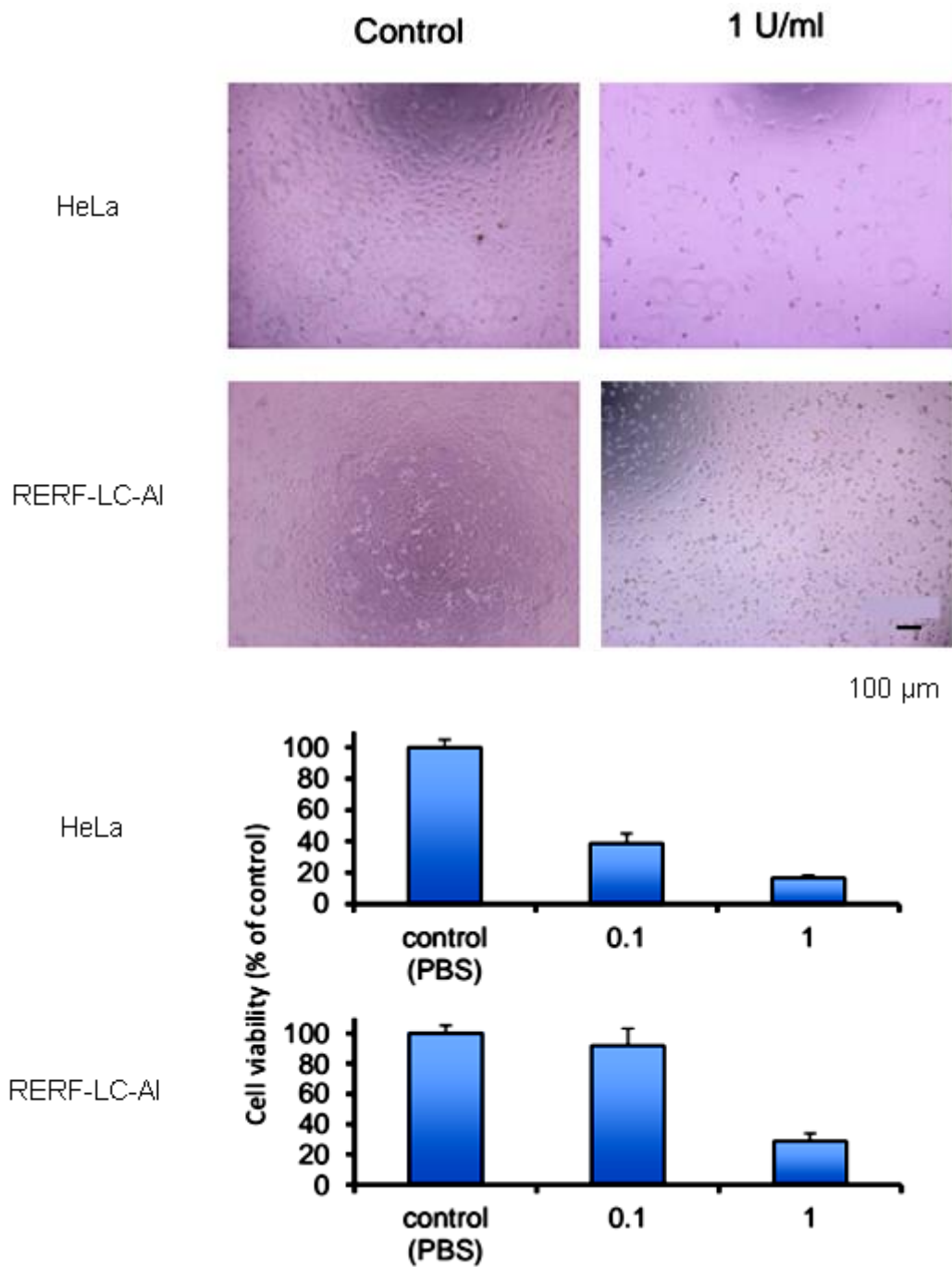


Fig. 9. 腫瘍細胞に対するL-メチオニン脱炭酸酵素の細胞毒性.

HeLa（ヒト子宮頸ガン細胞）およびRERF-LC-AI（ヒト肺ガン細胞）を培養後，MetDCの添加（コントロールは代わりにPBSを添加）の後に4日間培養したときの各細胞の生存率をMTTアッセイおよび顕微鏡写真により評価した．MTTアッセイの結果のグラフについて，縦軸は細胞生存率，横軸はL-メチオニン脱炭酸酵素活性濃度（終濃度）を示している．各試験は3回行った．

2-3-2 N末端アミノ酸配列の決定

部分的精製された *Streptomyces* sp. 590 由来 MetDC (Table 7, Fig. 8) を用いて、酵素の N 末端アミノ酸配列を分析した。2次元電気泳動、エレクトロブロットティングおよびエドマン分解法によるペプチド配列解析の結果に基づいて、我々は、MetDC の N 末端配列：ATAVDPGPELDGGDFA の 16 アミノ酸残基を決定した。NCBI データベースの BLAST 検索を使用して検索したところ、MetDC の N 末端配列と相同性のあるタンパク質の配列を見出すことはできなかった。したがって、MetDC は新規なアミノ酸配列を有する酵素であることがわかった。

2-3-3 放線菌 *Streptomyces* sp. 590 のゲノム DNA の塩基配列の決定

酵素遺伝子の完全長配列を決定するために、我々は *Streptomyces* sp. 590 のゲノム DNA のドラフト配列を決定した。そのために、次世代ゲノムシーケンサー Roche 454 GS FLX + を使用した。

その結果、*Streptomyces* sp. 590 のゲノム DNA のドラフト配列を決定した。1 kb 以上のコンティグ 117 個から成り、合計鎖長 8,025,937 bp から成り立っていた。平均塩基鎖長、N50 塩基鎖長、および最長塩基鎖長の長さは、それぞれ 68,597 bp、153,344 bp および 511,022 bp であった。

2-3-4 L-メチオニン脱炭酸酵素遺伝子の塩基配列の決定

私は、N 末端の 16 アミノ酸残基を用いて、*Streptomyces* sp. 590 のドラフトゲノム配列上で BLAST 検索を行い、最終的に 557 個のアミノ酸残基をコードする 1,674 bp からなる MetDC 遺伝子 (*mdc*) を同定した (Fig. 10)。MetDC の遺伝子の塩基配列情報およびタンパク質のアミノ酸配列情報は、DDBJ データベースから取得できる (accession number: AB970471)。ドラフトゲノム配列上に *mdc* ホモログは観察されなかったことから、*Streptomyces* sp. 590 は、1 ゲノムあたり単一コピーの *mdc* を保持していることがわかった。

ATGAGCCCGACCGCCTTCCCCGCCGCCGAGACCGCGACCGCGCCCGCGACCGCCGTCGATCCCGGTCCGGAGCTGGACGGCGGTGACTTC 90
 M S P T A F P A A E T A T A P A T A V D P G P E L D G G D F →
 1 5 10 15 20 25 30
 GCCCTCCCCGAGGGCGGCTGGACGACGACCGCGGGCTGCGCGCGCTCGACGCCGTGGACGAGTACCTGACCCGCAAGCGCAAGCACCTG 180
 A L P E G G L D D D R R L R A L D A V D E Y L T R K R K H L →
 35 40 45 50 55 60
 GTCGGCTACCAGGCCACCCAGGACATGACAGGGCACCGCACTGGACCTCGCCCGGTTTCATGCCGAACAACATCAACAACCTCGGCGACCCG 270
 V G Y Q A T Q D M Q G T A L D L A R F M P N N I N N L G D P →
 65 70 75 80 85 90
 TTCCAGAGCGGGGATACAAGCCCAACACCAAGGTCGTGAGCGGGCGGTGCTCGACTACTACGCGAAGCTCTGGCACGCCGAGCGCCG 360
 F Q S G G Y K P N T K V V E R A V L D Y Y A K L W H A E R P →
 95 100 105 110 115 120
 CACGACCCGGCGACCCGGAGTCTGACTGGGGCTACATGCTGTCCATGGGCTCGACCGAGGGCAACATGTACGCCCTCTGGAACGCCAGG 450
 H D P A D P E S Y W G Y M L S M G S T E G N M Y A L W N A R →
 125 130 135 140 145 150
 GACTACCTGAGCGGCAAGGCGCTGATCCAGCCGCCGACCGCCCTTCGACGCGGTGCGCTACGTCAAGGCCGACCCCGACCGACGGAAC 540
 D Y L S G K A L I Q P P T A P F D A V R Y V K A D P D R R N →
 155 160 165 170 175 180
 CCGAACGCCCCACCACCGGTGGCCTTCTACTCCGAGGACACCCACTACTCCTTCGCGAAGGCCGTGGCCGCTCTCGGCGTGGAGACCTTC 630
 P N A H H P V A F Y S E D T H Y S F A K A V A V L G V E T F →
 185 190 195 200 205 210
 CACGCGTTCGGCCTGGAGAAGTACGCGCAGAGTCCCGCTGGTTCGACCCGGTGACCGGGCTGCGCACCTGGCCACCAGGTTGCCCTCC 720
 H A V G L E K Y A D E C P L V D P V T G L R T W P T E V P S →
 215 220 225 230 235 240
 CGCCGGGTCGCTCCGGCCTGTCTGGGACGGCCCCGGGAGATAGACGTCGACGCCCTCGCCGACTCGTGAAGTTCTTCGCCGCCAAG 810
 R P G P S G L S W D G P G E I D V D A L A V L V E F F A A K →
 245 250 255 260 265 270
 GGTCACCCGGTCTTGTCAACCTCAACCTCGGCAGCACCTTCAAGGGCGCCACGACGACGTCGCGCGCTCTGCGAGCGCTTGTGCTCGG 900
 G H P V F V N L N L G S T F K G A H D D V R A V C E R L L P →
 275 280 285 290 295 300
 ATCTTCGAGCGGCACGGGCTCGTCCAGCGCGAGGTGGTCTACGGCAGCTGCCCGCAGACCGGCCGGCCGCTGGTGGACGTGCGCCCGGGC 990
 I F E R H G L V Q R E V V Y G S C P Q T G R P L V D V R R G →
 305 310 315 320 325 330
 TTCTGGATCCACGTGGACGGCGCGCTCGGCGCCGGCTACGCGCCGTTCTGCGGCTGGCCGCCGAGGACCCGGGAAGGGTACGGCTGGACG 1080
 F W I H V D G A L G A G Y A P F L R L A A E D P E G Y G W T →
 335 340 345 350 355 360
 CCGGAGGCGGAGCTGCCGAGTTCGACTTCGGCCTGCGGCTGCCACCGCCGGGACGGCGAGGTGGACATGGTCTCCTCGATCGCGATG 1170
 P E A E L P E F D F G L R L P T A G H G E V D M V S S I A M →
 365 370 375 380 385 390
 AGCGGCCACAAGTGGGCCGGCGCGCGTGGCCGTGCGGCATCTACATGACCAAGGTGAAGTACCAGATCTCGCCGCGCTCCAGCCGGAC 1260
 S G H K W A G A P W P C G I Y M T K V K Y Q I S P P S Q P D →
 395 400 405 410 415 420
 TACATCGGCGCCCGGACACCACCTTCGCGGCTCCCGCAACGGCTTCTCCCGCTGATCCTCTGGGACCACCTGTCCCGGTACTCCTAC 1350
 Y I G A P D T T F A G S R N G F S P L I L W D H L S R Y S Y →
 425 430 435 440 445 450
 CGGGACAGGTGGAGCGGATCCGCGAGGCCAGGAGCTGGCCGCTACCTGGAGCGGCGGCTGACCGCCATGGAGCGCGAACTCGGCGTC 1440
 R D Q V E R I R E A Q E L A A Y L E R R L T A M E R E L G V →
 455 460 465 470 475 480
 GAGCTCTGGCCGGCCGTACCCCGGGCGCGCTCACCGTACGGTTCGCAAGCCGAGCGCGAGCTGGTGGCCAAAGTGGTGGCTGTCTCCTC 1530
 E L W P A R T P G A V T V R F R K P S A E L V A K W S L S S →
 485 490 495 500 505 510
 CAGGACGTGCTGATGGTCCCGGGCGACGAGACCACCCGGCGCAGCTACGTGCACGTCTTCTGATGCCCTCGGTCGACCGGGCCAAGCTG 1620
 Q D V L M V P G D E T T R R S Y V H V F V M P S V D R A K L →
 515 520 525 530 535 540
 GACGCGTGTGCGCGAAGTCCGCGAGGACCCGGTATCCTGGGCGCACCGTAG 1674
 D A L L A E L A E D P V I L G A P ■
 545 550 555

Fig. 10. *Streptomyces* sp. 590 由来 MetDC の完全長の塩基配列およびタンパク質配列.

アミノ酸配列は塩基配列より推定した。四角で囲まれた領域，アミノ酸配列解析により決定された MetDC の N 末端 16 アミノ酸残基。アスタリスク，Asp336, Ser387, Lys394 は MetDC 活性に重要と考えられる。上部傍線，GroupII に属する PLP 依存性アミノ酸脱炭酸酵素にみられるコンセンサス配列。MetDC の遺伝子の塩基配列情報およびタンパク質のアミノ酸配列情報は，DDBJ データベースから取得できる (accession number: AB970471)。

2-3-5 類縁酵素の系統解析

Streptomyces sp. 590 由来 MetDC のアミノ酸配列は、L-ヒスチジンデカルボキシラーゼ (HisDC), L-バリンデカルボキシラーゼ (ValDC) および L-グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GluDC, GAD) のアミノ酸配列と類似していた。MetDC と 43-48% の配列同一性を共有するアミノ酸脱炭酸酵素は、以下の値で相同性を示した：(1) **HisDC** from *Streptomyces* sp. NRRL S-337 (48%), *Streptomyces aureofaciens* (47%), *Photobacterium* sp. AK15 (47%), *Streptomyces scabrisporus* (46%), *Fischerella* sp. PCC 9431 (46%), *Bacillus chagannorensis* (45%), *Streptomyces* sp. Mg1 (45%), *Streptomyces clavuligerus* (44%), *Streptacidiphilus albus* (44%), *Alkaliphilus transvaalensis* (43%) and *Streptomyces* sp. NRRL F-2580 (43%); (2) **ValDC** from *Streptomyces viridifaciens* (47%), *Kitasatospora setae* (45%) and *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 (45%); (3) **GluDC** from five strains of *Vibrio vulnificus* (43%)。

さらに、ClustalW³²⁻⁴⁰⁾ を用いた MetDC およびこれらの脱炭酸酵素のタンパク質配列を用いた系統解析を行った (Fig. 11)。 *Streptomyces* sp. 590 由来 MetDC は、*Streptomyces* 属菌由来 HisDC や ValDC と高い配列相同性を有していることがわかった。

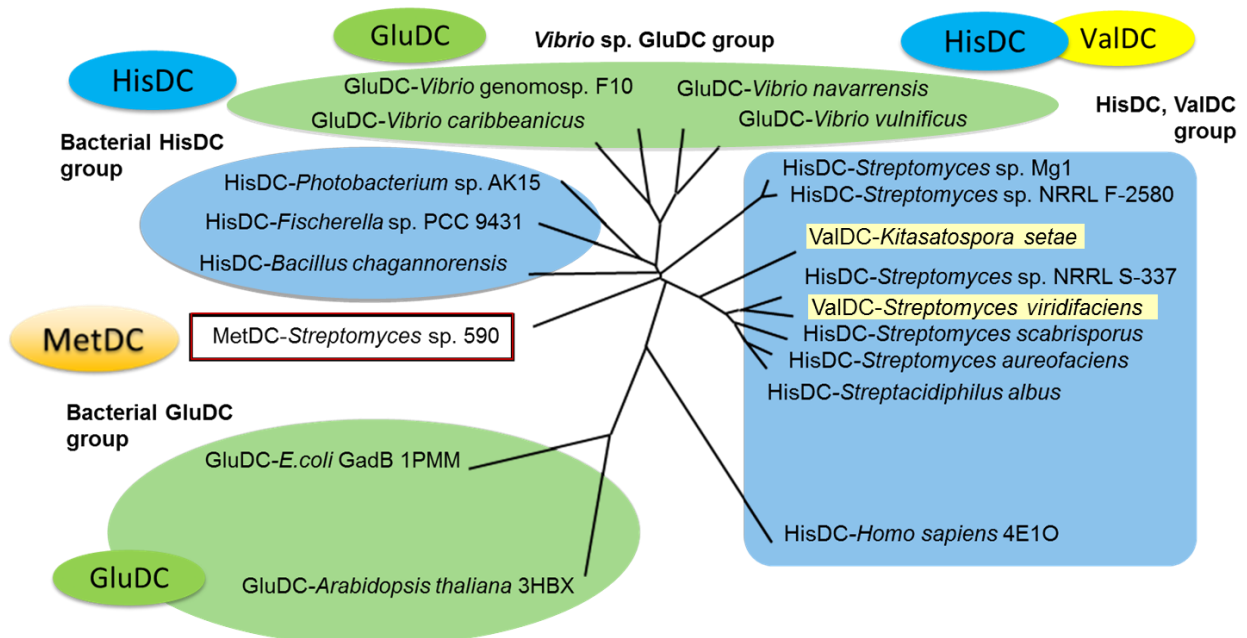


Fig. 11. 様々なアミノ酸脱炭酸酵素のアミノ酸配列に基づいた系統樹。

MetDC, HisDC, ValDC, GluDC における系統解析は、ClustalW を用いて行った (URL: <http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>)³²⁻⁴⁰⁾。

2-3-6 アミノ酸配列中の重要残基の推定

L-ヒスチジンデカルボキシラーゼ (HisDC), L-バリンデカルボキシラーゼ (ValDC) および L-グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GluDC, GAD) との比較により, Asn85, Ala112, Gly131, Glu140, Gly281, His334, Asp336, Ala338, Ser387 および Lys394 の 10 アミノ酸残基がこれらの脱炭酸酵素間で高度に保存されていることが同定された (Fig. 10, Fig. 12). 特に, GluDC^{41,42)} および HisDC³⁹⁾ の研究によれば, Asp336, Ser387 および Lys394 は GroupII に属する PLP 依存性アミノ酸脱炭酸酵素において, 触媒作用に重要である可能性が高い. 各残基は以下のような役割を果たす可能性がある.

Asp336 は GroupII の PLP 依存性アミノ酸脱炭酸酵素の短いコンセンサス配列に共通して観察され, PLP 上のピリジニウム環 N と相互作用することにより, 酵素活性部位における PLP の保持に寄与する. 残基が基質結合ポケットの一部を形成するため, おそらく Ser387 は基質特異性の重要な残基である. Lys394 はその ϵ -アミノ基を介して, PLP のアミノ基と結合し, 酵素と PLP の内部アルジミンの形成に寄与すると考えられる.

これらの所見により, MetDC が GroupII に属する PLP 依存性アミノ酸脱炭酸酵素であることを確認し, MetDC が活性を発揮するために PLP を必要とすることを示した.

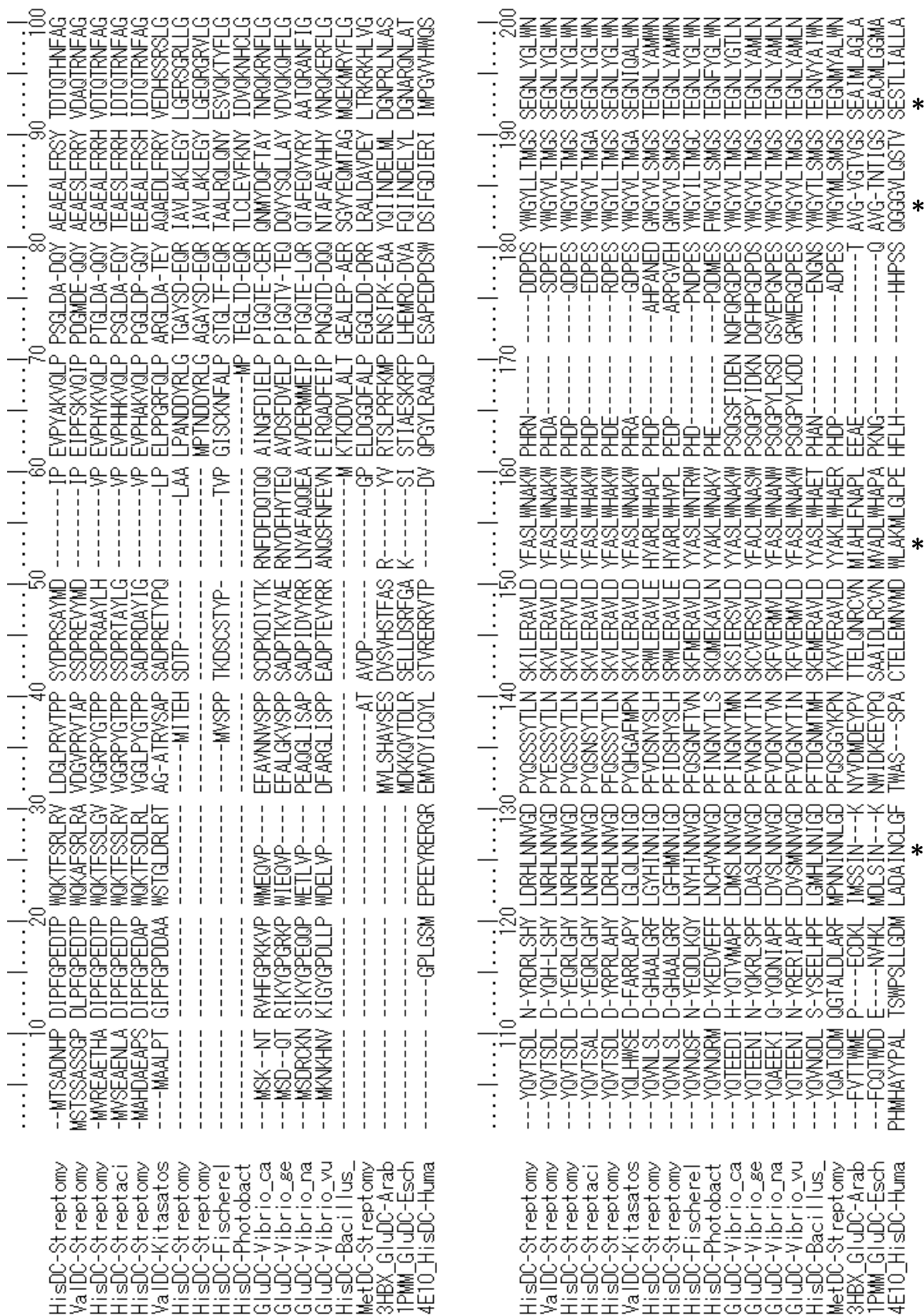


Fig. 12. MetDC (N 末端 15 アミノ酸残基を除く) と、類似脱炭酸酵素 (HisDC, ValDC, GluDC) との配列のアライメント (ClustalW, URL: <http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>). 掲載したすべての脱炭酸酵素で保存されている 10 のアミノ酸残基をアスタリスク (*) で示した³²⁻⁴⁰⁾.

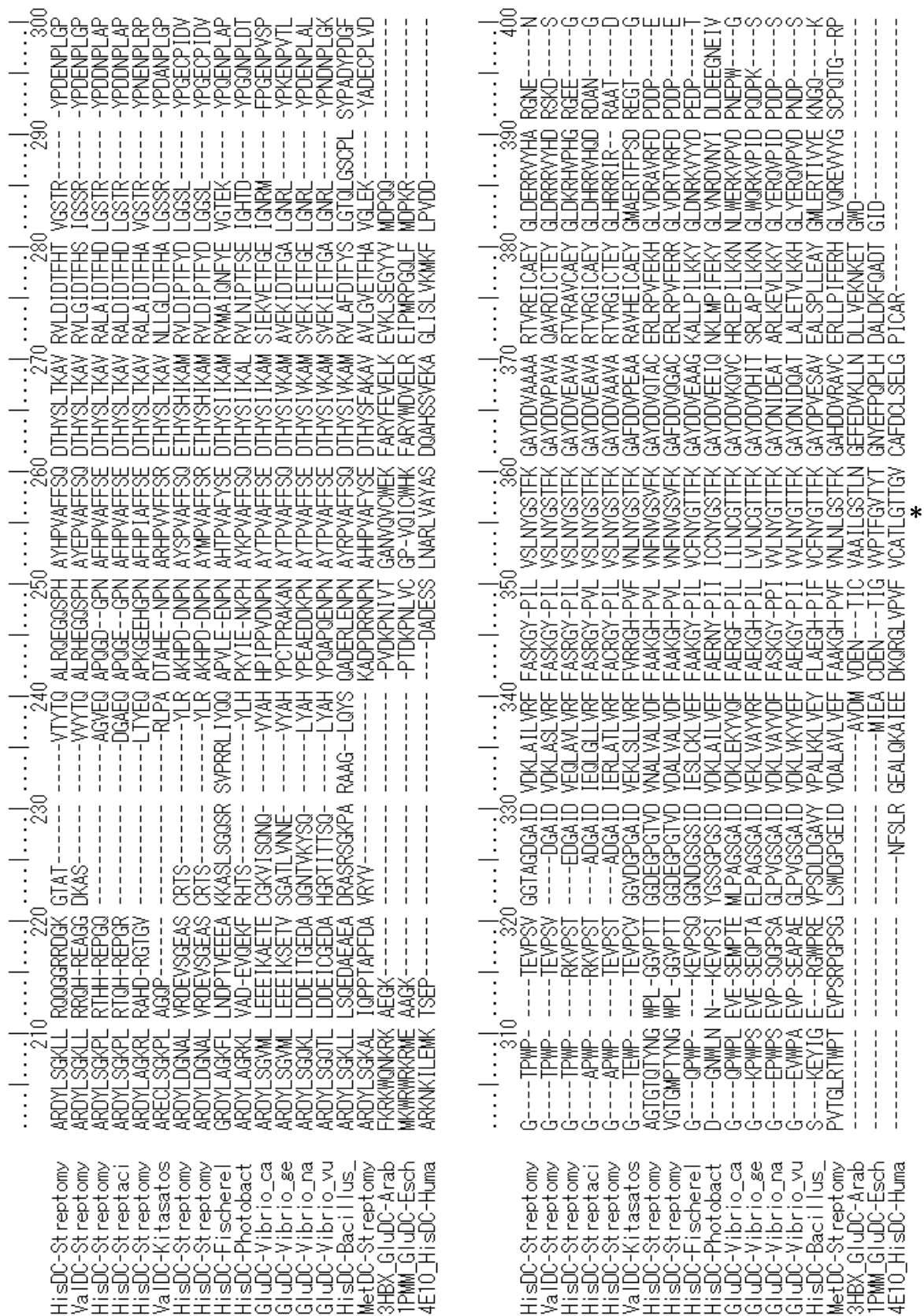


Fig. 12. (続き)

	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
HisDC-Streptomy	DLVRKYLSS	E-TLRVDGEE	RT YVHL YAMKHL	TRELIDELVR	DLRQPGAF	AGALEGEAWA	GVIDALGRPD	PDGTYAGALS	APASGPRSED	
Ya1DC-Streptomy	DIVRKYSLSC	E-TVYEDNEQ	RT YVHL YAVPHL	TRELVDDELVR	DLRQPGAFIN					
HisDC-Streptomy	DIVRRYSLAS	E-SVHYDGTGTA	RA YVHL YVMRHL	TRERYDELID	ELRQPGAFTP					
HisDC-Streptaci	DIVRRYSLAC	E-TVQVDGAA	RT YVHL YAMRHL	TRGRYDELIG	ELRQPGAFAP					
HisDC-Streptomy	EIVHRYSLAG	E-TVPYNGVP	RT YVHL YVMRHL	SRELVDELIA	DLHRPGAFPP	E				
Ya1DC-Kitasatos	AILRRYSLAY	E-TLLVDGVE	RP YAHLYVMPHY	TEGLIDALLR	DLGQPGAFAG	GAAA				
HisDC-Streptomy	EIARKYSLAC	V-PLNLGGRR	HD YSHYVMPHY	TQELIDELLD	DLSRPGAFDR	LPQR				
HisDC-Streptomy	DIARKYSLAC	M-PLNLGGRR	HD YSHYVMPHY	TQQLIDELLA	DLSPGF					
HisDC-Fischerel	DIVFKYSLSG	E-TLYWGGQK	RE YSHIFIMAHV	TALIDELIQ	DLSPGFAPK	QEEEOPELEA	DDIYVTHKPK	KLIHMPHTGR	GFK	
HisDC-Photobact	PIINKYSLSC	E-SLKVHGDV	RH YVHIYIMPST	SKEITDKLVD	ELKQDGT					
GludC-Vibrio_ca	DIVFRYSLAK	E-SSTIKSIE	DGKEVERVRH	YVHLFTMMNV	DKSMIDALCL	ELKSEKADE	SMLLSYKRVE	SQKPRVTNAV	ROLKPLRGR	SFR
GludC-Vibrio_ge	EIVFRYSLAK	E-SMSFGGQD	IQQRH YVHLFTMMG	DKSLIDNLCH	DLKQPGAFDP	ALFESIKRSE	VSKPRVANTIL	KGIRLPLKGR	SFR	
GludC-Vibrio_na	DILFKYSLAK	E-EIRDPNDP	T QTRK YVHMTIMDV	NEELDKLGG	DLMSDNAFSP	CDFVPLKNVC	HTRKLPKNG	RLVKMPJKGR	SFR	
GludC-Vibrio_vu	DILFKYSLAK	E-EIDEPNPE	TG RKTRK YVHMTIMDV	TEKLIDELCD	DLKADDAFNV	ADFKPLTNVR	RTROLPHSSA	HLVKLPLKGR	SFR	
HisDC-Bacillus	DIVDTYSLSC	E-ALYYDGEK	RH YAHLFAMKHV	SRELLDTLAE	DLRGEQAFPC	RET				
MetDC-Streptomy	ELVAKMSLSS	QDVLMPGDE	TTR RS YVHVMPVS	DRAKLDALLA	ELAEQVILG	AP				
3HBX_GludC-Arab	DMLRRYGWTV	P-AYTMPNNA	QH IT VLRWVIREDF	SRTLAERLVI	DIEKVMRELD	ELPSRVTHKI	SLGGEKSESN	SDNLMTVKK	SDIDKQRDI	
1PMM_GludC-Esch	ERLRLRGWQV	P-AFTLGGEA	TD IV VMRIMCRRGF	EMDFAEELLE	DYKASLKYLS	DHP	KLQ	GIAQQNSFKH	T	
4E10_HisDC-Huma	KAGRLFLIPA	T	IQD KLIIIRFTVTS	QFTTRDDILR	DMNLIRDAAT	LILSQ				

	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
HisDC-Streptomy
Ya1DC-Streptomy
HisDC-Streptomy
HisDC-Streptaci
HisDC-Streptomy
Ya1DC-Kitasatos
HisDC-Streptomy
HisDC-Fischerel
HisDC-Photobact
GludC-Vibrio_ca
GludC-Vibrio_ge
GludC-Vibrio_na
GludC-Vibrio_vu
HisDC-Bacillus
MetDC-Streptomy
3HBX_GludC-Arab
1PMM_GludC-Esch
4E10_HisDC-Huma

Fig. 12. (続前)

第3章 L-メチオニン脱炭酸酵素の大腸菌発現系構築による酵素生産と均一精製，機能解析および抗腫瘍性の検討

第1節 背景および目的

これまで，放線菌 *Streptomyces* sp. 590 から L-メチオニン脱炭酸酵素（MetDC）を大量に取得し，酵素を精製することは困難であった．このことが，過去数十年間の基礎研究および応用研究における MetDC に関する研究の進展を妨げてきた¹⁶⁾．

この章では，放線菌 *Streptomyces* sp. 590 由来 MetDC 遺伝子のクローニング，大腸菌を用いた MetDC の異種発現系の構築，酵素精製および基礎研究における MetDC のいくつかの酵素化学的特性（分子質量，サブユニット組成，最適温度，耐熱性，最適 pH，pH 耐性，基質特異性，反応速度論，PLP 依存性，阻害剤の影響，腫瘍細胞と正常細胞を用いた抗腫瘍性）を記述する．

第2節 実験材料および方法

3-2-1 使用菌株およびベクター

Escherichia coli Top10（Invitrogen）あるいは *E. coli* JM109 を，MetDC 遺伝子（*mdc*）を含む組換えプラスミドの増幅のための宿主株として用いた．*E. coli* BL21（DE3）（Invitrogen）を組換え酵素の発現のための宿主株として使用した．*mdc* を含む組換えプラスミドとして，pET-28a（+）ベクター（カナマイシン耐性遺伝子含有）および pET-52b（+）ベクター（アンピシリン耐性遺伝子含有）を使用した．

E. coli Top10 および *E. coli* BL21（DE3）の遺伝的背景について以下に列挙した．

E. coli Top10

【F⁻, *mcrA*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15, Δ *lacX74*, *recA1*, *araD139*, Δ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL* (Str^R), *endA1*, *nupG*】

E. coli BL21 (DE3)

【F-, *ompT*, *hsdS* (rB- mB-) *gal*, *dcm*, *lacI*, *lacUV5-T7 gene 1*, *ind1*, *sam7*, *nin5*)】

3-2-2 使用試薬

MetDC 発現用プラスミドの構築には、GeneArt を用いた。クローニング、サブクローニング用の DNA 断片を作製するため、制限酵素および PCR 試薬を用いた。制限酵素は、タカラバイオ、ニッポンジーンあるいは和光純薬から購入し用いた。PCR 試薬は、KOD plus neo (東洋紡) あるいは KOD plus (東洋紡) を用いた。クローニング・サブクローニングの成否を確認する際は、短時間で目的断片を増幅できる KOD Fx neo (東洋紡) を用いた。抗生物質は、カナマイシンおよびアンピシリンを用いた。その他の試薬は、基本的にナカライテスクや和光から供給される特級試薬を用いた。

3-2-3 培地および培養方法

pET-28a (+) ベクター (カナマイシン耐性遺伝子含有) を導入した大腸菌 *E. coli* BL21 (DE3) をカナマイシン 50 µg/ml を含有する LB 培地 15 ml 中で 37°C, 230 rpm で 16 時間継代培養した。これを前培養液とした。カナマイシン 50 µg/ml を含む modified TB 液体培地 (1.2% ポリペプトン, 2.4% 酵母エキス, 1.25% K₂HPO₄, 0.23% KH₂PO₄, 2% グリセロールおよび 0.05% ポリエチレングリコール) 1000 ml に前培養液 10 ml を接種した後、大腸菌形質転換体を対数増殖期前期 (OD₆₀₀ = 0.3-0.4) まで 230 rpm, 37°C で増殖させた。培養物液に終濃度 1 mM となるように IPTG を添加後、37°C, 130-150 rpm でさらに 6 時間インキュベートし、C 末端 His₆-Tag 融合 MetDC タンパク質の発現を誘導した。遠心分離 (6,000 rpm, 15 min, 4°C) により、培養菌体を回収し、破碎バッファー I (0.25 mM EDTA, 0.1 mM PLP, 1 mM PMSF および 0.5 mM DTT を含有する 100 mM KPB (pH 6.6)) で菌体を 2 回洗浄した。菌体を使用するまで -30°C で保存した。

pET-52b (+) ベクター (アンピシリン耐性遺伝子含有) を導入した大腸菌 *E. coli* BL21 (DE3) をアンピシリン 100 µg/ml を含有する LB 液体培地 50 ml 中で 37°C, 230 rpm で対数増殖期 (OD₆₀₀ = 0.5-1.0) まで培養した。これを前培養液とした。アンピシリン 100 µg/ml を含む LB 液体培地ある

いは modified TB 液体培地 (1.2% ポリペプトン, 2.4% 酵母エキス, 1.25% K_2HPO_4 , 0.23% KH_2PO_4 , 2% グリセロールおよび 0.05% ポリエチレングリコール) 1,000 ml に前培養液 20 ml を接種 (2% 接種) した後, 大腸菌形質転換体を対数増殖期前期 ($OD_{600} = 0.4-0.6$) まで 130-150 rpm で 37°C あるいは 25°C で増殖させた. 終濃度 1 mM となるように IPTG の添加後, 培養液を 37°C, 130-150 rpm でさらに 6 時間インキュベート, あるいは, 氷水で急冷後, 25°C, 130-150 rpm でさらに 13-15 時間インキュベートし, C 末端 His₁₀-Tag 融合 MetDC タンパク質の発現を誘導した. 遠心分離 (6,000 rpm, 15 min, 4°C) により, 培養菌体を回収し, 破碎バッファーII (0.1 あるいは 1 mM PLP, 1 あるいは 10 mM PMSF, および 0.5 mM DTT を含む, 100 mM KPB (pH 6.6) あるいは 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)) あるいは 10 mM イミダゾールを含有する Ni-NTA agarose 用精製バッファー (20 mM NaH_2PO_4 (pH 8.0-8.3), 500 mM NaCl, 50 μ M PLP) で菌体を 1 回洗浄した. 菌体を使用するまで -30 あるいは 4°C で保存した.

3-2-4 プラスミドの調製

pET-28a (+) ベクター (カナマイシン耐性遺伝子含有) および pET-52b (+) ベクター (アンピシリン耐性遺伝子含有) を使用した.

pET-28a (+) ベクターは, 制限酵素 *Nco* I および *Xho* I を用いて開環し, PCR により調製した MetDC 遺伝子 (*mdc*) を挿入した. *mdc* の 3' 末端の終始コドン を削除し, 3' 末端のプロリン残基 (P) の 3' 側にグリシン残基 (G) を付加するため塩基 GG を付加するよう PCR により調製した後, GeneArt キットにより, ベクタープラスミドと連結させた (pET-28a (+) -*mdc*).

pET-52b (+) ベクターは, 制限酵素 *Nco* I および *Sac* I を用いて開環し, pET-28a (+) -*mdc* から PCR により調製した *mdc* を挿入した. *mdc* の 3' 末端の終始コドン を削除し, 3' 末端をプロリン残基 (P) となるよう調製した後, GeneArt キットにより, ベクタープラスミドと連結させた (pET-52b (+) -*mdc*). このとき, *Sac* I サイトが消失した.

mdc を含む組換えプラスミド (pET-28a (+) -*mdc* あるいは pET-52b (+) -*mdc*) を保有する *E. coli* Top10 あるいは *E. coli* JM109 を, LB 液体培地 (pH 7.0) 中で, 好氣的に増殖させた (37°C, 230 rpm, 12-16 h). これにより, 組換えプラスミドを増幅, 取得した. プラスミドの精製は, Quantum Prep

Plasmid Miniprep Kit (バイオラッド) あるいは Quantum Prep Plasmid Midiprep Kit (バイオラッド) を用いて行った。

3-2-5 PCR 法による MetDC 遺伝子の増幅

PCR 反応試薬は、KOD plus neo (東洋紡), KOD plus (東洋紡) あるいは KOD Fx neo (東洋紡) を用いた。クローニング, サブクローニングあるいはシーケンスの準備のために適切に使い分けた。クローニングおよびサブクローニングに用いたプライマー配列は以下に示した (Table 8)。

Table 8. クローニング, サブクローニングおよびシーケンスに用いたプライマー配列。Fw, フォワードプライマー; Rv, リバースプライマー。

クローニング用プライマー (C 末端 His ₆ -Tag 融合 MetDC 用)
Fw : 5'-AAGAAGGAGATATACATGAGCCCGACCGCCTTC-3' (33 bp)
Rv : 5'-GTGGTGGTGGTGCCCCGGTGCGCCCAGGATCAC-3' (33 bp)
サブクローニング用プライマー (C 末端 His ₁₀ -Tag 融合 MetDC 用)
Fw : 5'-AGGAGATATACCATGAGCCCGACCGCCTTCCCC-3' (33 bp)
Rv : 5'-CCGGTGATCCTGGGCGCACCCGCTCTGGTGCCACG-3' (35 bp)
シーケンス用プライマー
Fw : 5'-GCAGCAGCCAACTCAGCTTC-3' (20 bp)
Rv : 5'-AGGGGAATTGTGAGCGGATAAC-3' (22 bp)

3-2-6 GeneArt による DNA 断片の連結

GeneArt Seamless Cloning and Assembly Kit (ライフテクノロジーズ) を使用した。目的遺伝子を増幅する各プライマーの 5'末端には線状化ベクターの末端 15 塩基と相同性を持つ配列を付加し、プライマーは 30-40 塩基になるよう設計した。インサートはゲノム DNA を鋳型とし、PCR により目的遺伝子を増幅した。

その他の基本的なプライマーの設計基準について以下に記述する。GC 含量は 40-60% (特に 45-55%) とする。5'末端を A か T あるいはそれらの混在で、3'末端を C か G あるいはそれらの混在で、1-2 塩基連続する配列を選ぶ。T_m 値を 60-70°C とする。同一塩基、A と T、あるいは G と C のそれぞれが 3 塩基以上連続する配列を避ける (特に G と C)。同一塩基、A と T、あるいは G と C のそれぞれが、配列中で極端に一部分に集中している配列を避ける。

3-2-7 プラスミドの抽出および精製

Quantum Prep Mini Prep Kit (バイオラッド) を使用した。プラスミドを保有する菌体を 5 ml の LB 培地(抗生物質含有)に植菌し、一晩培養した。培養液 1-4 ml を 1.5 ml チューブに集菌(12,000×g, 1 min, 25°C)した。上清除去後、沈殿に Resuspension Solution を 200 μl 添加し、ボルテックスあるいはピペティングで均一になるまで懸濁した。懸濁液に Lysis Solution を 250 μl 添加し、1.5 ml チューブを穏やかに数回転倒混和後、Neutralization Solution を 250 μl 添加して穏やかに数回転倒混和した。出現した綿状の沈殿を除くため遠心分離 (12,000×g, 5 min, 25°C) し、タンパク質を沈殿させた。2 ml 容の Collection Tube にセットしたスピンフィルターへ上清を移して、事前によく懸濁した Quantum Matrix を 200 μl 添加し、ピペティングによりよく混和した。遠心分離 (12,000×g, 1 min, 25°C) を行い、スピンフィルターを外して流出液を廃棄した後、スピンフィルター上へ Wash buffer を 500 μl 添加し遠心分離 (12,000×g, 1 min, 25°C) を行った。流出液廃棄後、スピンフィルター上へ再度 Wash buffer を 500 μl 添加し遠心分離 (12,000×g, 2 min, 25°C) を行った。流出液廃棄後、スピンフィルターを 1.5 ml チューブへ移し、ふたを開けたまま、70°C で加熱したヒートブロック上で 2-3 min 保持し、残存した Wash buffer に含まれているエタノールを除去した。事前に 70°C で約 5 min 保温した滅菌ミリ Q 水あるいは TE バッファーを 100 μl 添加後、遠心分離 (12,000×g, 1

min, 25°C) を行った。得られた溶液をプラスミド溶液として-30°Cで保存した。

3-2-8 大腸菌コンピテントセルの作製

以下全て、クリーンベンチを用いた無菌条件下で行った。宿主大腸菌 *E. coli* Top10, *E. coli* JM109 あるいは *E. coli* BL21 (DE3) のグリセロールストックから、抗生物質を含まない LB 寒天培地に画線し、37°Cで 12-16 時間、静置培養した。培養後、大腸菌シングルコロニーを LB 培地 50 ml に植菌し、37°C, 230 rpm で 12-16 時間培養した。これを前培養液とした。50 ml の SOB 培地 (2% ポリペプトン, 0.5% 酵母エキス, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, pH 7) に 1 M MgCl₂ および 1 M MgSO₄ をそれぞれ 500 μl ずつ (あるいは 1 M MgCl₂・1 M MgSO₄ を 500 μl) 添加し、前培養液を 50 μl 接種した。37°C, 230 rpm で OD₆₀₀ = 0.4-0.6 になるまで約 1-3 時間培養し、50 ml のファルコンチューブにて培養液を遠心分離した (6,000 rpm, 15 min, 4°C)。上清を破棄し、ペレットに 17 ml の氷冷 Transformation Buffer を加え、氷上で緩やかに転倒混和した。(Transformation Buffer の組成は 10 mM PIPES (pH 6.7-6.8), 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂ であり、まず MnCl₂ 以外の試薬を測り、ミリ Q 水を加え、5 N KOH を用いて pH 6.7-6.8 に調整した。MnCl₂ を加えた後、メスアップし、フィルター滅菌を行い、使用するまで 4°C 保存した)。氷上に 10 分間静置した後、遠心分離 (6,000 rpm, 15 min, 4°C) 後、上清を破棄し、ペレットを 500 μl の氷冷 Transformation buffer で懸濁し氷上で、終濃度 7% となるように常温のジメチルスルホキシド (DMSO) を 50 μl 添加した。氷上に 10 分間静置後、100 μl ずつ約 7 本の 1.5 ml エッペンドルフチューブに分注して、液体窒素で瞬間的に急冷した後、速やかに -80°C で保存した。これを大腸菌コンピテントセルとした。

3-2-9 L-メチオニン脱炭酸酵素遺伝子含有プラスミドを用いた大腸菌の形質転換

大腸菌組換え MetDC を発現させるために、プラスミド pET-28a (+) -*mdc* あるいは pET-52b (+) -*mdc* を大腸菌宿主 *E. coli* BL21 (DE3) に導入した。

市販あるいは上記の方法で作製した大腸菌コンピテントセル (50 あるいは 100 μl) にプラスミド含む溶液をコンピテントセル容量の最大 1/20 量 (2-5 μl) 添加し、10 μl チップで 1-2 回ピペティングした後、氷上で 30 分間インキュベートした。42°C で 30 秒間ヒートショックを与え、氷上で 2

分間冷却した後，SOC 培地（SOB 培地 50 ml に対して 1 M グルコース 500 μ l を添加したもの）500 μ l あるいは 900 μ l を添加した。37°C，230 rpm，1-2 h 培養した後，遠心分離（8,000 あるいは 10,000 rpm，1 min，25°C）し，デカントにより上清を破棄し，残存した上清を用いてペレットをピペティングにより懸濁した。約 100 μ l の大腸菌懸濁液のうち，50 μ l を，導入プラスミドに適した抗生物質を含む LB 寒天培地上にスプレッドした。LB 寒天培地 2 枚に対して，火炎滅菌を経ずに連続でスプレッドした後，37°C で 16-24 時間静置培養した。シングルコロニーが観察できる LB 寒天培地を選択し，アルミホイルで遮光して 4°C 保存した。

3-2-10 組換え L-メチオニン脱炭酸酵素の精製

すべての精製手順は 0-4°C で行った。MetDC 遺伝子 (*mdc*) を導入した大腸菌 BL21 (DE3) 形質転換体のうち，C 末端 His₆-Tag 融合 MetDC タンパク質を発現する pET-28a (+) -*mdc* 保有の大腸菌ペレットは，破碎バッファー I（0.25 mM EDTA，0.1 mM PLP，1 mM PMSF および 0.5 mM DTT を含む 100 mM KPB (pH 6.6)）で懸濁した。懸濁バッファー量は，湿菌体重量の 3 倍容量を用いた。懸濁液中の大腸菌菌体は，カップソニケーターを用いた超音波破碎機（Insonicator 201M，クボタ）により超音波破碎した（150 W，15 min，2 回，氷水還流下）。破碎液を遠心分離（8,000-10,000 rpm，60-120 min，4°C）し，上清を細胞抽出液として得た。細胞抽出液を 50 mM NaCl を含有する DEAE-Toyopearl 用精製バッファー（0.25 mM EDTA，0.01% 2-メルカプトエタノール，50 μ M PLP，20 mM KPB (pH 6.6)）で透析した。DEAE-Toyopearl 用精製バッファーにより，DEAE-Toyopearl 650M 担体を平衡化した。透析した細胞抽出液を DEAE-Toyopearl 650M 担体に通過させた。カラムを 100 mM NaCl を含む DEAE-Toyopearl 用精製バッファーで洗浄した。300 mM NaCl を含む DEAE-Toyopearl 用精製バッファーで酵素を溶出した。活性画分を，10 mM イミダゾールを含有する Ni-NTA agarose 用精製バッファー（50 mM NaH₂PO₄ (pH 8.0-8.3)，300 mM NaCl，50 μ M PLP）で透析した。10 mM イミダゾールを含有する Ni-NTA agarose 用精製バッファーを Ni-NTA agarose 担体に通過させた。透析した活性画分を Ni-NTA agarose 担体に通過させた。カラムを 10 mM イミダゾールを含有する Ni-NTA agarose 用精製バッファーで洗浄した後，40 mM イミダゾールを含有する Ni-NTA agarose 用精製バッファーで洗浄した。最終的に，組換え酵素は 200 mM イミダゾールを

有する Ni-NTA agarose 用精製バッファーで溶出し, Amicon Ultra-15 遠心フィルター (Molecular Weight Cut-Off, 30,000; メルク) で濃縮し, 続いて 40 μ M PLP を含む 100 mM KPB (pH 6.6) で透析した.

C 末端 His₁₀-Tag 融合 MetDC タンパク質を発現する pET-52b (+) *-mdc* 保有の大腸菌ペレットは, 破碎バッファーII (0.1 あるいは 1 mM PLP, 1 あるいは 10 mM PMSF, および 0.5 mM DTT を含む, 100 mM KPB (pH 6.6) あるいは 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)) あるいは 10 mM イミダゾールを含有する Ni-NTA agarose 用精製バッファー (20 mM NaH₂PO₄ (pH 8.0-8.3), 500 mM NaCl, 50 μ M PLP) で懸濁した. 懸濁バッファー量は, 湿菌体重量の 10 倍容量で行った. 懸濁液中の大腸菌菌体は, 超音波破碎機 (Insonicator 201M, クボタ) により超音波破碎した (150 W, 15 min, 2 回, 氷水還流下). 破碎液を遠心分離 (8,000-10,000 rpm, 60-120 min, 4°C) し, 上清を細胞抽出液として得た. 10 mM イミダゾールを含有する Ni-NTA agarose 用精製バッファーにより, Ni-NTA agarose 担体を平衡化した. 細胞抽出液を Ni-NTA agarose 担体に通過させた. カラムを 10 mM イミダゾールを含有する Ni-NTA agarose 用精製バッファーで洗浄した後, 50 mM イミダゾールを含有する Ni-NTA agarose 用精製バッファーで洗浄した. 最終的に, 組換え酵素は 500 mM イミダゾールを含有する Ni-NTA agarose 用精製バッファーで溶出し, Amicon Ultra-15 遠心フィルター (Molecular Weight Cut-Off, 30,000; メルク) で濃縮し, 続いて 0.1, 0.5 あるいは 1 mM PLP を含む 100 mM MES-NaOH/HCl (pH 7.0) で透析した. 精製酵素は, 使用するまで, -30°C あるいは 4°C で保存した.

Ni-NTA agarose 担体の使用前準備は以下の様に行った. Ni-NTA agarose Resin (Mat. No. 1018244, QIAGEN) は, タンパク質 50 mg あたり 1 ml を使用した. まず, 任意量の Ni-NTA agarose 担体 (20% エタノール中で保存) を内径 1.5 cm のカラムに充填した. 充填速度は, 使用時の流速の約 3 倍とした (3 ml/min, 3 滴/1-2 秒). 3 M NaCl を担体の 10 倍量以上流した後, 5 mM NiSO₄ を担体の 2 倍量以上流した. これにより, 担体を活性化させ, His-Tag 融合タンパク質に対する吸着力を回復させた. 最後に, 500 mM イミダゾールを含有する Ni-NTA agarose 用精製バッファーを担体の 10 倍量以上流して洗浄し, 10 mM イミダゾールを含有する Ni-NTA agarose 用精製バッファーを担体の 10 倍量以上流して平衡化した. その後, 流速を 1 ml/min (1 滴/1-2 秒) に調整した.

Ni-NTA agarose 担体の使用後の処理は以下の様に行った. 0.5 M NaCl / 0.5 M EDTA を担体の 10

倍量以上流して洗浄し、担体に結合している Ni²⁺を脱離させた。MilliQ 水を担体の 10 倍量以上流して洗浄し、最後に 20%エタノールを担体の 2 倍量以上流して、次回の使用まで 4°Cで保存した。

3-2-1 1 ゲルろ過 HPLC 法による分子質量およびサブユニット組成の推定

精製した組換え MetDC の機能形態における分子質量を測定するため、ゲルろ過 HPLC 法を用いた。カラムは TSKgel G3000SW (05103, 東ソー) を用いた。マーカートンパク質は、Gel Filtration Standard (#151-1901, バイオラッド) 用いた。マーカートンパク質の分子質量を以下に示す。thyroglobulin (bovine), γ -globulin (bovine), ovalbumin (chicken) および myoglobin (horse) : 670,000, 158,000, 44,000 および 17,000 Da.

3-2-1 2 酵素中の PLP 量の定量

組換え MetDC に結合した PLP は、フェニルヒドラジン法により定量した (Scheme 4) 。フェニルヒドラジンは、典型的な PLP 酵素阻害剤であり、PLP と結合して不活性の PLP 複合体を形成するが、フェニルヒドラジン-PLP 複合体は酵素-PLP や遊離 PLP と比べて、強い黄色を呈し、その極大吸収波長は 410 nm である。したがって、フェニルヒドラジン法により、溶液中の PLP 濃度を定量することができる。

PLP 量の定量は以下の論文を参考に、本酵素用に改変した⁴³⁾。まず、酵素のホロ化のため、組換え MetDC を、1 mM PLP を含む 100 mM KPB (pH 6.6) で 30°C, 30 min インキュベートした後、同バッファーにて 4°Cで一晩透析した。その後、遊離 PLP を除去するため、組換え MetDC を、PLP を含まない 100 mM KPB (pH 6.6) にて 4°Cで一晩透析した。最後に、スキームに示す通り、組換え MetDC に結合した PLP の定量を行った。

Scheme 4. フェニルヒドラジン法による PLP 定量の実験手順.

呈色試薬 (フェニルヒドラジン液) (10 ml)	
10 N (5 M) H ₂ SO ₄	10 ml
フェニルヒドラジン塩酸塩	400 mg
(Phenylhydrazine hydrochloride)	

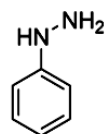
10 N (5 M) H ₂ SO ₄	(10 ml)
97% H ₂ SO ₄	5.1 g (約 3 ml)
ミリ Q 水	6 ml
10 ml にメスアップ	

PLP 溶液 (酵素希釈液) 0.9 ml

(※ガラス試験管を使用.
1.5 ml プラスチックチューブは,
生成色素が吸着するので不可)

プレインキュベート 30°C, 5 min
フェニルヒドラジン液 添加 0.1 ml
(ブランク・試験区)

インキュベート 30°C, 10 min
呈色反応後, 410 nmにおける吸光度を測定
(※石英セルで測定. プラスチックセルは,
生成色素が吸着するので不可)



500 nM - 20,000 nMにおいて,
OD₄₁₀ = 0.010 - 0.300の範囲内で,
PLP を定量できる

フェニルヒドラジン

3-2-13 PLP 依存性の検討

組換え MetDC への PLP のホロ化およびアポ化は、以下に示した試薬および実験スキームに従って行った (Scheme 5).

Scheme 5. MetDC のホロ酵素, アポ酵素, および再ホロ酵素の調製と, 各酵素の比活性と吸収スペクトルの測定.

○PLP-free バッファー: 100 mM KPB (pH 6.6)
○PLP 添加バッファー: 100 mM KPB (pH 6.6), 1 mM PLP
○ヒドロキシルアミン添加バッファー: 100 mM KPB (pH 6.6), 10 mM hydroxylamine

○PLP 除去試薬: ヒドロキシルアミン
PLP-free バッファーにて 100 mM に調製後,
サンプル溶液の 1/10 量を添加して, 終濃度を 10 mM とした.
○PLP 再添加液: ミリ Q 水にて, 0, 50, 500, 5,000 μ M の PLP 水溶液を調製後,
サンプル溶液の 1/4 量を添加して,
それぞれの終濃度を 0, 10, 100, 1,000 μ M とした.

1. MetDC 溶液のバッファーを限外ろ過により, PLP 添加バッファーに置換した (5,000 xg, 4°C, 60 min x 3) (x 1,000 倍).
 2. MetDC 溶液のバッファーを PLP-free バッファーに置換した (5,000 xg, 4°C, 60 min x 3) (x 1,000 倍).
 3. MetDC 溶液のバッファーをヒドロキシルアミン添加バッファーに置換し, 30°C, 30 min インキュベートした.
 4. MetDC 溶液のバッファーを PLP-free バッファーに置換した (5,000 xg, 4°C, 60 min x 3) (x 1,000 倍).
 5. 活性測定, 吸収スペクトル測定 (x 10 希釈)
 6. MetDC 溶液に PLP を終濃度 0, 10, 100, 1,000 μ M になるよう再添加し, 30°C, 30 min インキュベートした.
 7. 活性測定
- ※コントロールは終始, PLP-free バッファーでバッファーを置換し, ヒドロキシルアミンの代わりに PLP-free バッファー添加後, インキュベートを行った.

○吸収スペクトル解析:

希釈バッファー 450 μ l

オートゼロ

酵素溶液 添加 50 μ l (10 倍希釈)

吸収スペクトル測定 (200 - 500 nm) (常温)

(JASCO V-630ST UV/Vis/NIR spectrophotometer [日本分光])

3-2-14 阻害剤の影響

以下の試薬を阻害剤として、反応基質溶液に混合した (Table 9)。今回、ほとんどの試薬を 100 mM の高濃度試薬溶液として調製し、終濃度は 1 mM とした。終濃度の 100 倍の濃度の高濃度試薬溶液を反応基質溶液の 100 分の 1 量添加した。

試薬は基本的にミリ Q 水で溶解させ、水に溶解しないものは DMSO で溶解させた。ただし、L-システイン塩酸塩は溶解させるのが困難であったので、終濃度 0.125 mM で用いた。

p-chloromercuriphenylsulfonic acid は、既に 100 mM に調製されていたため、そのまま使用した (溶媒不明)。4-chloromercuribenzoic acid は、DMSO で溶解した。使用した MetDC 量は、1 反応系あたり 6.2×10^{-3} units であった。

Table 9. 阻害剤として用いた試薬とその阻害様式⁴⁴⁾。

阻害剤	阻害様式
<i>p</i> -クロロ水銀ベンゼンスルホン酸 (<i>p</i> -chloromercuriphenylsulfonic acid)	チオール基の不可逆的修飾
<i>N</i> -エチルマレイミド	チオール基の不可逆的修飾
ジエチルピロカルボン酸	ヒスチジン残基との共有結合修飾
ヨードアセトアミド	チオール基の不可逆的修飾
<i>p</i> -クロロ水銀安息香酸 (4-chloromercuribenzoic acid)	チオール基の不可逆的修飾
L-システイン	PLP 不活性化 (PLP と thiazolidine ring を形成)
D,L-ペニシラミン	PLP 不活性化 (PLP と thiazolidine ring を形成)
ヒドロキシルアミン	PLP 不活性化 (PLP のカルボニル基との縮合)

3-2-15 抗腫瘍性の検討

組換え MetDC の抗腫瘍性を調べるために、2 種類のヒト腫瘍細胞 A431 (ヒト扁平上皮ガン細胞 Human epidermoid ovarian carcinoma cell line) および MDA-MB-231 (ヒト乳腺ガン細胞 Human breast cancer cell line), および 1 種類のヒト正常細胞 NHDF-Neo (新生児正常ヒト皮膚繊維芽細胞 Normal human dermal fibroblast cell line from neonatal foreskins) を, MetDC の存在下または非存在下で培養した.

腫瘍細胞 (A431, MDA-MB-231) および正常細胞 (NHDF-Neo) を 96 ウェルプレート (1×10^5 cells/well, 100 μ l /well) に播種し, 湿式 CO₂ インキュベーター (アステック) 内において 5% CO₂ および 20% O₂ の雰囲気下で, 37°C, 24 時間培養した. 培養後, A431, MDA-MB-231 および NHDF-Neo 細胞に, 放線菌から均一精製した組換え MetDC (0, 7.5, 15 または 30 U/ml) を添加した. 3 日間のインキュベーション後, MTS アッセイキット CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (プロメガ) (Fig. 13, 14) を用いて細胞生存率を調べた. MTS アッセイキットの原理は, 真核細胞中のミトコンドリア由来レダクターゼが, 試薬中の 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5- (3-carboxymethoxyphenyl) -2- (4-sulfophenyl) - 2H-tetrazolium (MTS) を還元することにより Formazan を生ずることを利用している. 反応液の吸光度を 490 nm において測定することで, Formazan の生成量を測定し, これを細胞生存の指標とした. 細胞生存率は, 未処理細胞での反応混合物中の MetDC 処理細胞との反応混合物中の吸光度の百分率として表した. 各処理区における試験は少なくとも 3 回繰り返した. 3 日間のインキュベーション後, 逆位相差顕微鏡 (オリンパス, IX71) で撮影した.

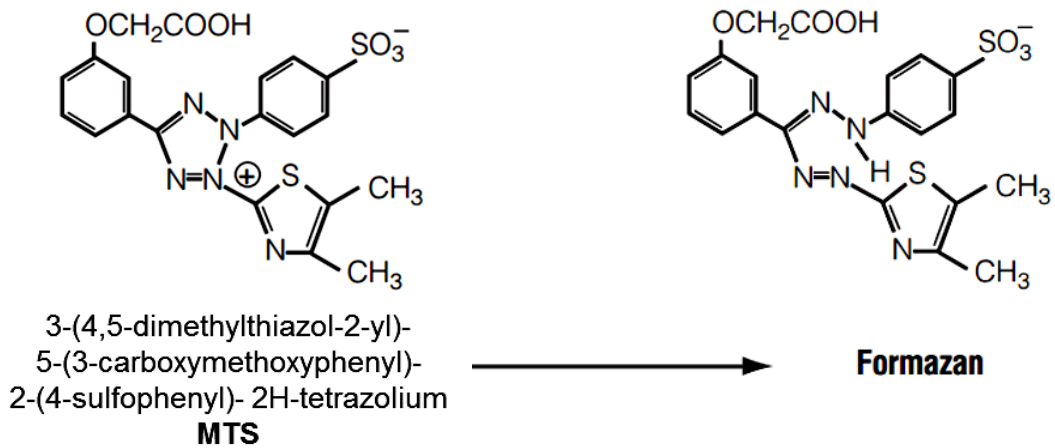


Fig. 13. MetDC の抗腫瘍作用試験の評価における MTS アッセイの原理.

ヒト細胞中のミトコンドリアレダクターゼの作用で 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) を Formazan に還元する。生きているヒト細胞が多いと、Formazan への変換率が高く、生存率が高いと判定される。

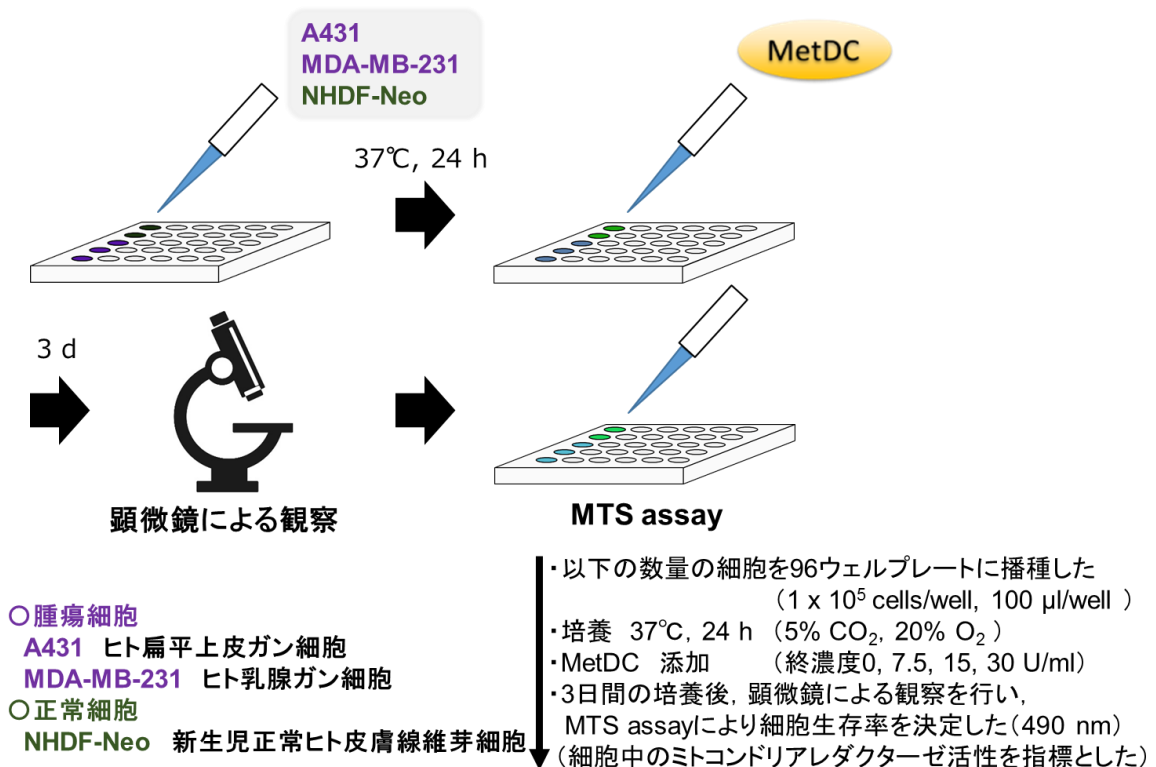


Fig. 14. MetDC の抗腫瘍作用試験の作業手順.

培養, 顕微鏡による観察, MTS assay について示した.

第3節 結果および考察

3-3-1 酵素発現プラスミドの構築

先行研究では、放線菌 *Streptomyces* sp. 590 から大量の MetDC を取得し、また均一に精製することは困難であった。今後の基礎研究および応用研究の進展のために、発現酵素量を増加させ、精製を容易にすることが必要であった。これを達成するために、目的タンパク質の C 末端にポリヒスチジン残基からなるアフィニティータグ、すなわちヒスタグ (His₆-Tag あるいは His₁₀-Tag) を融合して組換え酵素を発現させるプラスミド pET-28a (+) ベクター (His₆-Tag) (Fig. 15) あるいは pET-52b (+) ベクター (His₁₀-Tag) (Fig. 16) を用いて、組換え MetDC を *E. coli* BL21 (DE3) により異種発現した。

大腸菌により組換え MetDC を過剰発現させるために、MetDC 遺伝子 (*mdc*) を *Streptomyces* sp. 590 のゲノムから増幅した。*mdc* を PCR で増幅し、制限酵素処理後の pET-28a (+) あるいは PCR 増幅後の pET-52b (+) に導入することで、pET-28a (+) -*mdc* あるいは pET-52b (+) -*mdc* を構築した (Fig. 17)。構築したプラスミドは、設計通り、MetDC をコードする *mdc* の 3' 側に 1 つあるいは複数個のリンカーアミノ酸のコード配列を介して、ヘキサヒスチジンタグのコード配列を有していた (Fig. 18)。pET-28a (+) -*mdc* あるいは pET-52b (+) -*mdc* を、*E. coli* BL21 (DE3) に形質転換し、MetDC を大腸菌体内で可溶的に発現させた。

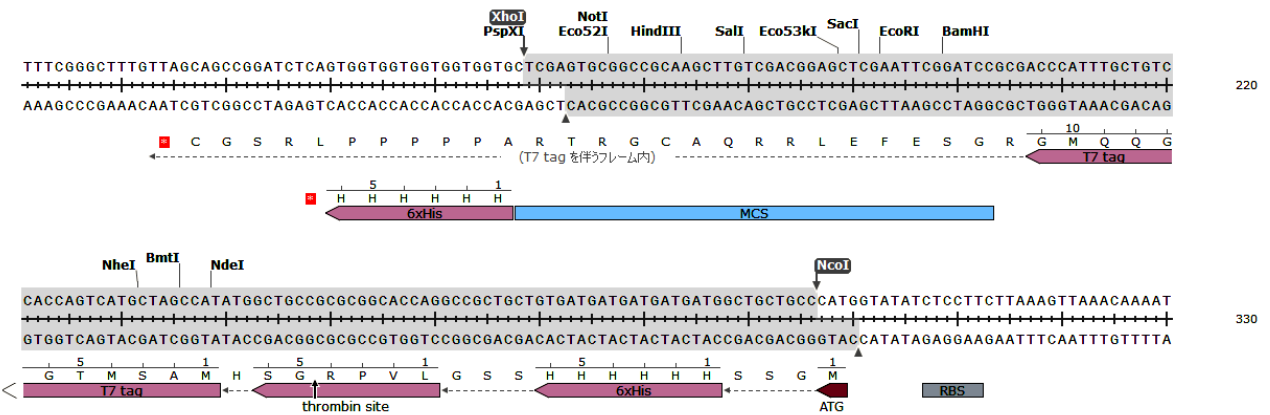
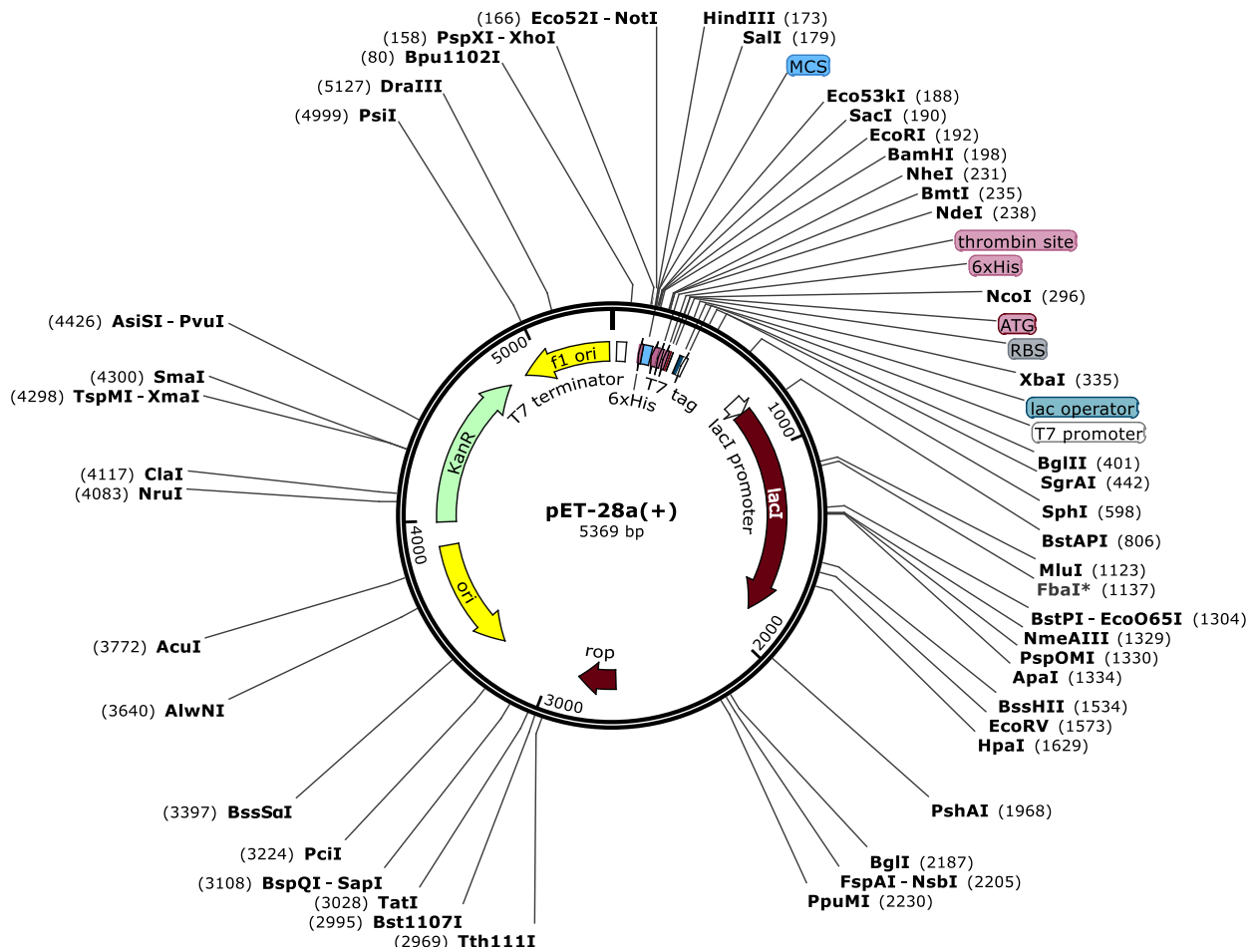


Fig. 15. プラスミドベクターpET-28a (+) とクローニングに用いた制限酵素処理サイト。Nco I および Xho I を用いた制限酵素処理によって除去された部分を、灰色で示した。

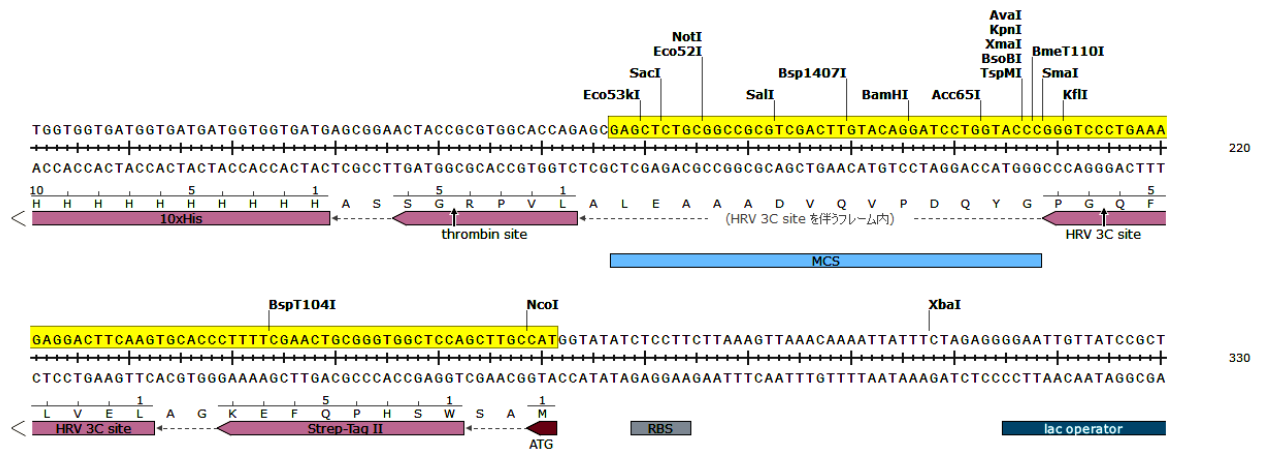
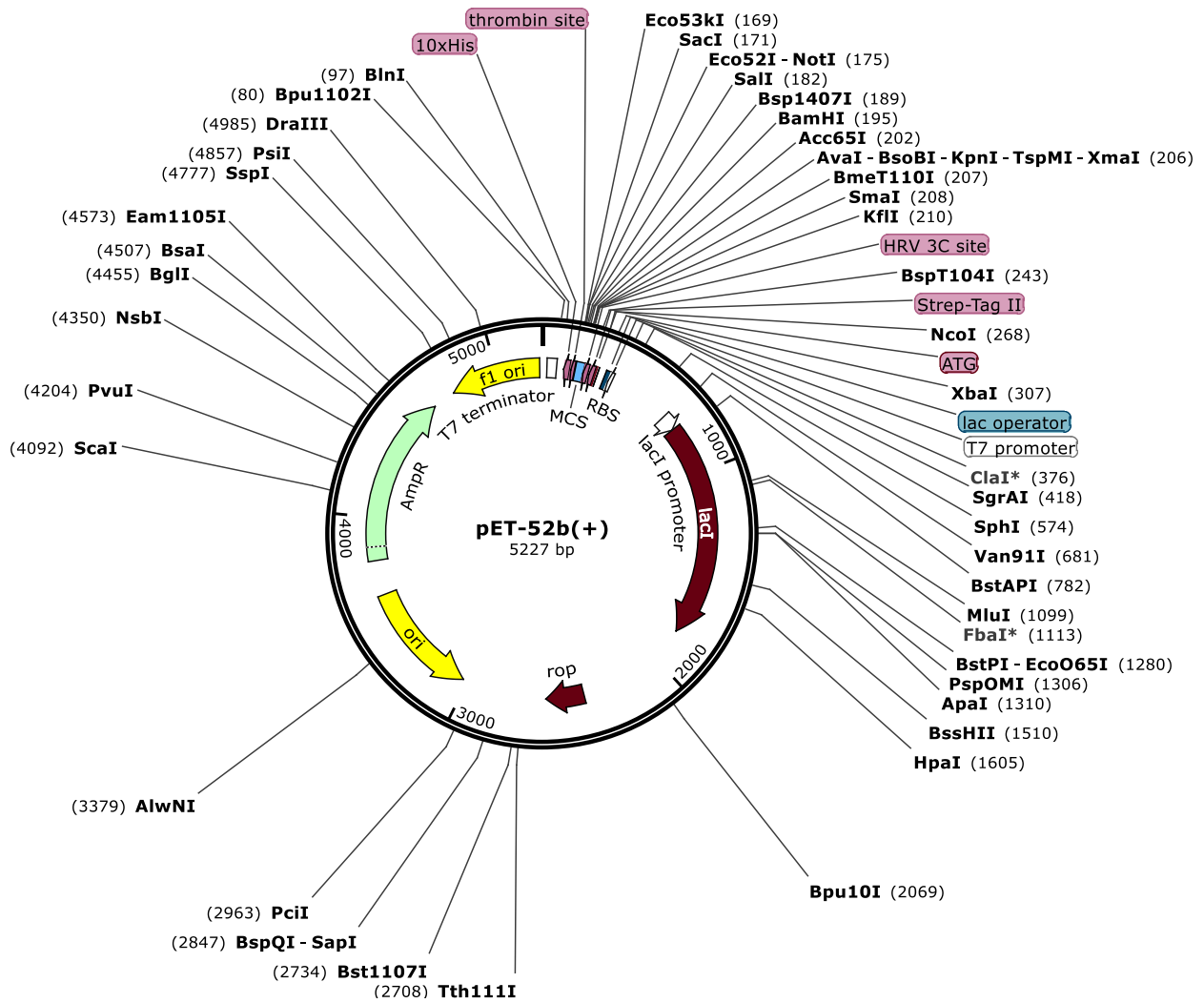


Fig. 16. プラスミドベクターpET-52b(+)とサブクローニングに用いたPCR増幅断片。
*Nco*Iおよび*Sac*Iを用いた制限酵素処理によって除去された部分を、黄色で示した。

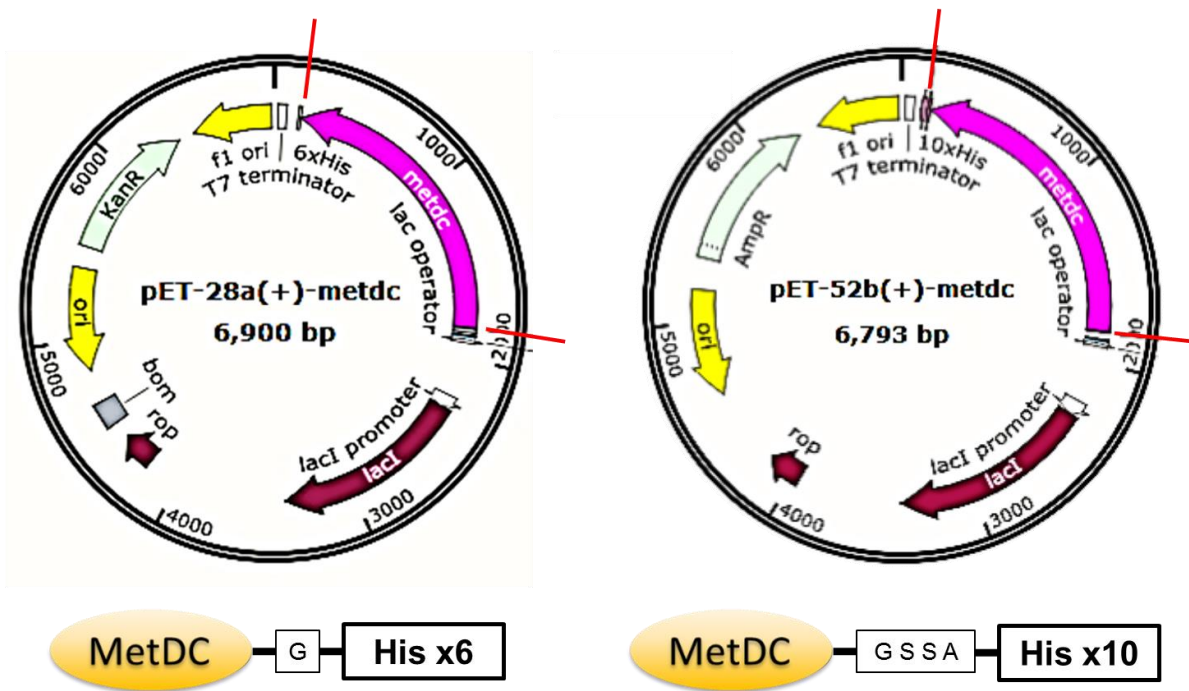


Fig. 17. 構築したプラスミドベクター-pET-28a (+) -*mdc* (左), pET-52b (+) -*mdc* (右), およびプラスミド上の遺伝子がコードする組換え MetDC の一次配列の模式図.

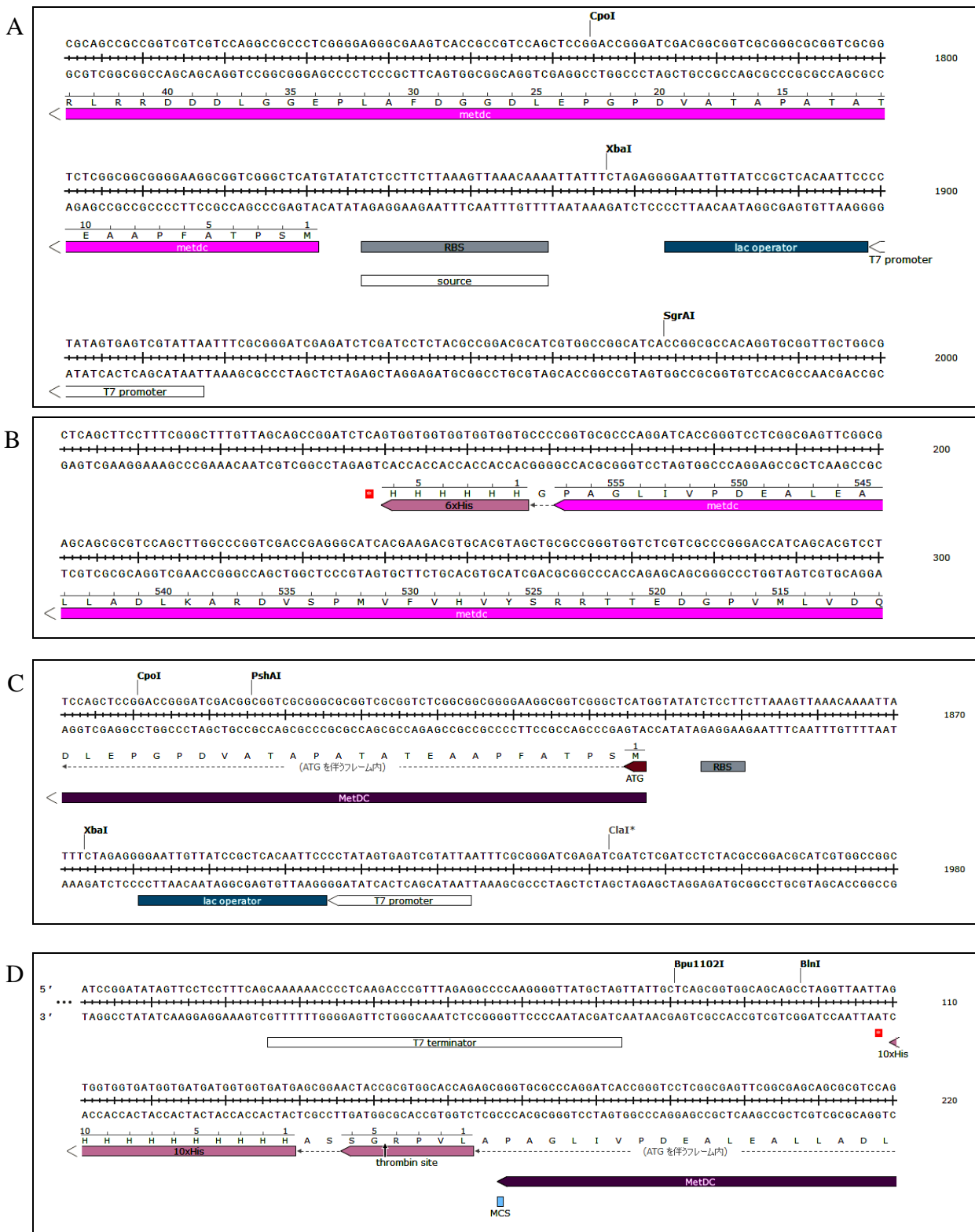


Fig. 18. 本研究で構築したプラスミドベクター2種と MetDC 遺伝子 (*mdc*) との結合部位。

(A) pET-28a (+) -*mdc* 中の MetDC の N 末端側に相当するコード配列の周辺。 (B) pET-28a (+) -*mdc* 中の MetDC の C 末端側に相当するコード配列の周辺。 (C) pET-52b (+) -*mdc* 中の MetDC の N 末端側に相当するコード配列の周辺。 (D) pET-52b (+) -*mdc* 中の MetDC の C 末端側に相当するコード配列の周辺。

3-3-2 組換え L-メチオニン脱炭酸酵素の精製

構築したプラスミド pET-28a (+) *-mdc* あるいは pET-52b (+) *-mdc* を, *E. coli* BL21 (DE3) に導入した. 形質転換した *E. coli* BL21 (DE3) は, 活性を有する組換え MetDC を細胞内で可溶的に発現した. *E. coli* BL21 (DE3) / pET-28a (+) *-mdc* 形質転換体が生産した組換え MetDC (C 末端 His₆-Tag) は, 以下に示す 2 段階のカラムクロマトグラフィーにより均一に精製した: DEAE-Toyopearl 650M, Ni-NTA agarose (Table 10, Fig. 19). また, *E. coli* BL21 (DE3) / pET-52b (+) *-mdc* 形質転換体が生産した組換え MetDC (C 末端 His₁₀-Tag) は, 1 段階のカラムクロマトグラフィーにより均一に精製した: Ni-NTA agarose (Table 11, Fig. 20). Native-PAGE において, メインバンドの他に, うすいバンドが確認された. このうすいバンドが生じる理由については明確ではないが, 後に述べるゲルろ過クロマトグラフィーの結果 (Fig. 21) と総合すると, MetDC アミノ酸配列中に存在するシステイン残基のチオール基の影響と考える. つまり, チオール基を介して分子間ジスルフィドを形成することで, MetDC 同士が非機能的に凝集し, 不活性型になったのだと推測する. その原因は不明であり, 今後, 酵素の精製や保存および Native-PAGE の過程で, MetDC を凝集させる条件があるのかどうか検討すべきだと考える.

Streptomyces sp. 590 由来 MetDC は, 発現量が少なく, 精製も困難であった. そこで, アフィニティータグを融合した組換え MetDC 遺伝子のベクターとして pET-28a (+) および pET-52b (+) を, 異種発現宿主として *E. coli* BL21 (DE3) を用いることにより, 先行研究に比べて, 大量の MetDC タンパク質を生産し, 容易に均一精製することに成功した. 例えば, 培養液 1 L から精製された組換え酵素 (C 末端 His₆-Tag) の量は, 培養液 110 L から部分精製されたネイティブ酵素の量と同等であった¹⁶⁾. さらに, アフィニティータグを伸長した組換え酵素 (C 末端 His₁₀-Tag) を用いた結果, 精製における酵素回収量を, His₆-Tag 使用時の 5.5 倍に増加させることに成功した.

これまでに, 組換え MetDC の遺伝子クローニングと精製に関する報告はなかった. 本研究では, MetDC の遺伝子配列およびタンパク質配列をはじめて解明し, 組換え MetDC を異種発現し, 均一精製した.

Table 10. pET-28a (+) を用いて発現した組換え MetDC (C 末端 His₆-Tag) の精製表.

	全タンパク質量 (mg)	全活性 (U)	比活性 (U/mg)	回収率 (%)	精製度 (fold)
無細胞抽出液	960	5.6x10 ³	5.9	100	1.0
DEAE-Toyopearl 650M	31	564	18	10	3.1
Ni-NTA agarose	2.4	188	78	3.3	13

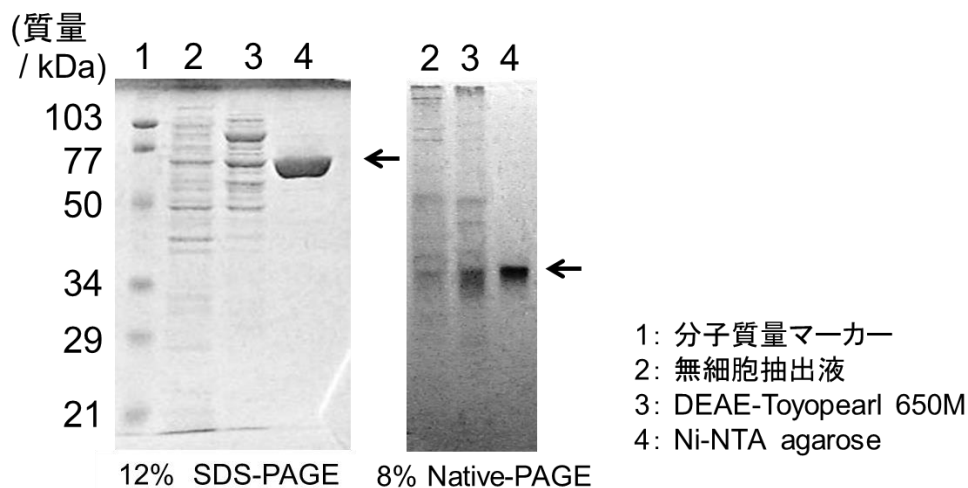


Fig. 19. pET-28a (+) を用いて発現した組換え MetDC (C 末端 His₆-Tag) の精製過程における SDS-PAGE, Native-PAGE. 1 レーンにつき, 10 μg のタンパク質を供した.

Table 11. pET-52b (+) を用いて発現した組換え MetDC (C 末端 His₁₀-Tag) の精製表.

	全タンパク質量 (mg)	全活性 (U)	比活性 (U/mg)	回収率 (%)	精製度 (fold)
無細胞抽出液	2.3x10 ³	2.1x10 ³	0.93	100	1.0
Ni-NTA agarose	21	1.2x10 ³	60	59	65

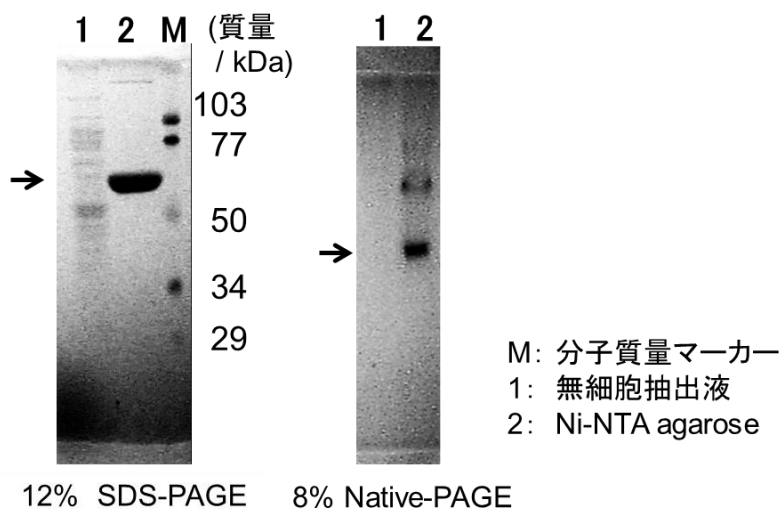


Fig. 20. pET-52b (+) を用いて発現した組換え MetDC (C 末端 His₁₀-Tag) の精製過程における SDS-PAGE, Native-PAGE. 1 レーンにつき, 10 μg のタンパク質を供した.

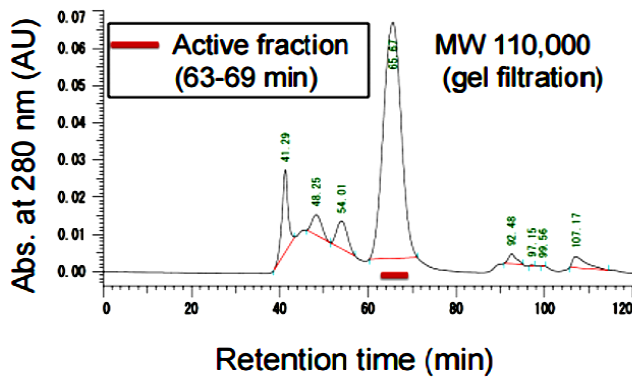
3-3-3 分子質量およびサブユニット組成

精製組換え MetDC の N 末端アミノ酸配列は MSPT であり、これは天然酵素 (ATAVDPGP) よりも 15 残基長いことがわかった (Fig. 10). N 末端の 15 アミノ酸残基は、*Streptomyces* sp. 590 由来ネイティブ MetDC におけるシグナルペプチドあるいはプレタンパク質の可能性はある。

MetDC が膜局在性のために N 末端配列を有すると仮定した場合、以下に示す考察がなされる。*Bacillus subtilis* が、生活環において栄養体から芽胞を形成する際に、細胞内の L-Met を L-システイン (L-Cys) に変換するという報告がある²⁸⁾。L-Cys は、芽胞内部と比べて芽胞表層により多く存在すると考えられている。MetDC を生産する生物 (*Streptomyces* sp.^{16,20)}、*Dryopteris filix-mas*²¹⁾、および *Cryptocodinium cohnii*²³⁾ の共通点として、芽胞を形成する生活環を有する。このことから、MetDC は、L-Met を L-Cys に変換させ、L-Cys を芽胞表層に集積させるために役立つのかもしれない。

ゲルろ過-HPLC および SDS-PAGE により解析した結果、非変性で機能型の組換え MetDC の見かけの分子質量は約 110,000 Da であり、分子質量が約 61,000 Da のサブユニットを有することがわかった (Fig. 21)。このことから、活性を有する MetDC の最小単位は、同一サブユニット 2 つからなるホモダイマーであることが示唆された。組換え MetDC の分子質量は、*Streptomyces* sp. 590 由来のネイティブ MetDC の分子質量と一致した (Table 2)。

また、*Streptomyces* sp.^{16,20)}、*Dryopteris filix-mas*²¹⁾、および *Cryptocodinium cohnii*²³⁾ 由来 MetDC の報告とも一致している。MetDC と同様に PLP 酵素である L-グルタミン酸脱炭酸酵素 (GluDC, GAD) の大半は、ホモダイマーあるいはホモヘキサマーなどの多量体構造をとり、L-ヒスチジン脱炭酸酵素 (HisDC) はホモダイマーであると報告されている³³⁻³⁶⁾。L-バリン脱炭酸酵素 (ValDC) のサブユニット組成は不明である。



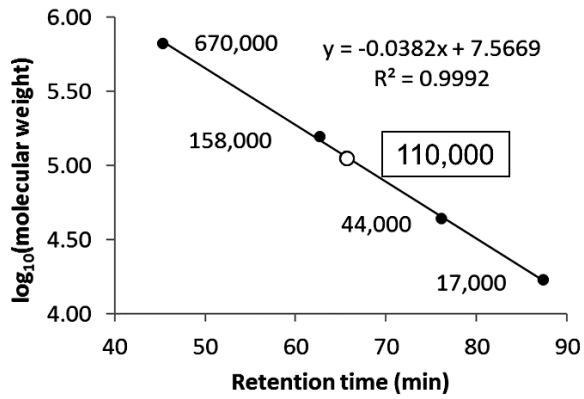
ゲルろ過-HPLC

カラム:

TSKgel G3000SW (東ソー)

マーカートンパク質:

Gel Filtration Standard (バイオラッド)



ゲルろ過	110,000 Da
SDS-PAGE	61,000 Da
算出値(推定アミノ酸配列)	61,390 Da

Fig. 21. ゲルろ過法を用いた組換え MetDC の分子質量の測定.

3-3-4 最適温度, 耐熱性, 最適 pH, pH 耐性

組換え MetDC の酵素活性について, 最適温度は 45-55°C, 30°C以下で耐熱性を示し, 最適 pH は pH 6.6, pH 4.6-7.0 で pH 耐性を示すことがわかった (Fig. 22). この結果は, ネイティブ MetDC を用いた先行研究と一致している¹⁶⁾.

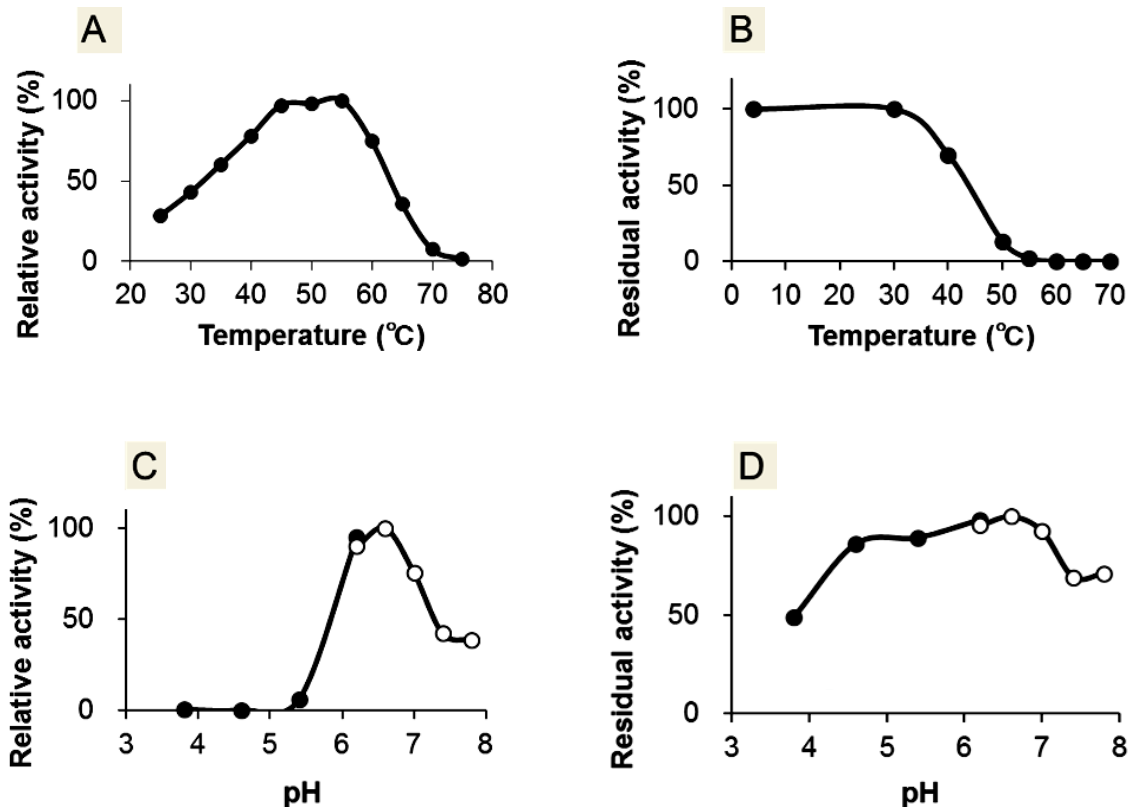


Fig. 22. 組換え MetDC の活性および安定性に及ぼす温度・pH の影響.

(A) 最適温度. 酵素活性は, さまざまな温度において, 100 mM KPB (pH 6.6) 中で測定した. (B) 耐熱性. 酵素は, 100 mM KPB (pH 6.6) 中で 30 min の熱処理に供した. その後, 酵素溶液を冷却し, 残存活性を評価した. (C) 最適 pH. 酵素活性は, さまざまな pH において, 100 mM リン酸-クエン酸ナトリウム緩衝液 (●) (pH 3.8-6.2) あるいは 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (○) (pH 6.2-7.8) 中で測定した.

(D) pH 耐性. 酵素は, さまざまな pH の 100 mM リン酸-クエン酸ナトリウム緩衝液 (●) (pH 3.8-6.2) あるいは 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (○) (pH 6.2-7.8) 中で, 氷上で 30 min, 前処理をした. その後, 残存活性は, 55°C, pH 6.6 (100 mM KPB) で測定した. 各試験は 3 回行った.

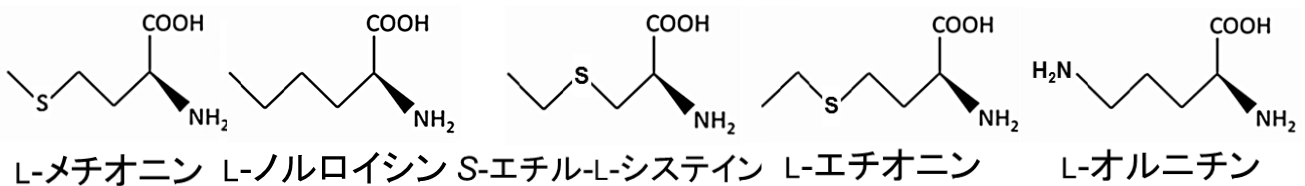
3-3-5 基質特異性

組換え MetDC の基質特異性は、L-メチオニンを含む 20 種の標準アミノ酸、ならびに L-オルニチンと 10 種の非タンパク質性アミノ酸を含む L-メチオニン類似体を用いて調べた。その結果、この酵素は L-メチオニンおよび L-ノルロイシンに対して高い活性を示した (Table 12)。一方、S-メチル-L-システイン、L-ロイシン、DL-ノルバリンおよび S-エチル-L-システインに対してはほとんど活性を示さず、D-メチオニンを含む非タンパク質性アミノ酸や、グリシンを含む他の標準アミノ酸に対しては活性を示さなかった。この結果は、MetDC が、以下のような特徴をもつ基質に対して、その脱カルボキシル化反応を触媒することを示唆した。(1) 側鎖は疎水性であり、長さは活性に影響する。(2) 側鎖に硫黄原子を含み、その位置は活性に影響する。

ネイティブ MetDC と組換え MetDC との間の基質特異性の差異は、N 末端の 15 アミノ酸および/または C 末端 His タグの配列の差異あるいは用いた酵素活性測定法を反映している可能性がある。

Table 12. 様々な生物種における MetDC の基質特異性.

Substrate	<i>Streptomyces</i>			<i>Dryopteris filix-mas</i> MetDC ²¹⁾
	sp. 590 recombinant MetDC	sp. 590 native MetDC ¹⁶⁾	sp. ATCC 21020 MetDC ²⁰⁾	
L-methionine	100	100	100	100
L-norleucine	44	63	45	40
S-methyl-L-cysteine	6	13	-	-
L-leucine	4	15	5	40
DL-norvaline	4	34	22	55
S-ethyl-L-cysteine	< 2	61	29	12
D-methionine	0	0	-	0
L-ethionine	0	19	8	0
L-ornithine	0	0	-	-
α -methyl-DL-methionine	0	0	-	-
L-methionine sulfoxide	0	0	-	-



3-3-6 酵素反応速度論解析

組換え MetDC の反応速度論パラメーターを, L-メチオニンおよび L-ノルロイシンについて決定した (Fig. 23, Table 13). L-メチオニンおよび L-ノルロイシンに対する *Streptomyces* sp. 590 由来組換え MetDC の K_m 値はそれぞれ 30 mM および 73 mM であった. これらの値は, *Dryopteris filix-mas* 由来 MetDC (L-メチオニンに対する K_m 値, 48 mM) よりも低かった²¹⁾. しかし, L-メチオニンおよび L-ノルロイシンに対する *Streptomyces* sp. 590 由来 MetDC の K_m 値は, それぞれ 5.0 mM および 16.0 mM であると報告されている¹⁶⁾. L-メチオニンおよび L-ノルロイシンに対する *Streptomyces* sp. 590 由来組換え MetDC の V_{max} 値はそれぞれ 117 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ および 30 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$, k_{cat} 値は 215/s および 55/s であり, L-メチオニンに対する k_{cat} 値は, *Dryopteris filix-mas* 由来 MetDC の値よりも高かった²¹⁾.

基質特異性の差異と同じく, ネイティブ MetDC と組換え MetDC との間のおよび K_m 値の差異は, N 末端の 15 アミノ酸および/または C 末端 His タグの配列の差異あるいは用いた酵素活性測定法を反映している可能性がある.

Table 13. 組換え MetDC の反応速度論パラメーター.

基質	V_{max} ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
L-メチオニン	117	215	30	7.2×10^3
L-ノルロイシン	30	55	73	7.5×10^2

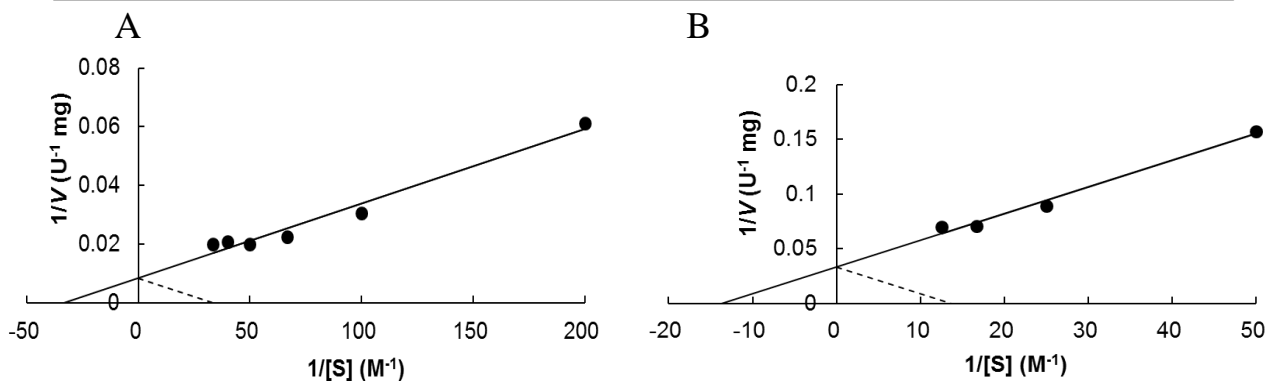


Fig. 23. 組換え MetDC の反応速度論パラメーター.

(A) L-メチオニンに対する組換え MetDC の反応速度論パラメーター. (B) L-ノルロイシンに対する組換え MetDC の反応速度論パラメーター. Michaelis-Menten Plot を Lineweaver-Burk Plot に変換することで表した. 各試験は 3 回行った.

3-3-7 PLP 依存性の検討

実験の結果、PLP の依存的な比活性の変化、すなわち PLP の添加による酵素の活性化、PLP 酵素の阻害剤であるヒドロキシルアミンによる失活、および PLP の再添加による活性の全回復を確認した。さらに、PLP 依存的な吸収スペクトルの変化、すなわち 330、420 nm における 2 つの極大吸収帯の値の変化を確認した。

私は、ネイティブ MetDC と同様に、組換え MetDC が活性を発揮するために PLP を必要とするかどうかについて調べた (Table 14)。過剰の PLP により調製したホロ酵素は、PLP を含まない 50 mM KPB (pH 6.6) での一晚透析により、処理前の比活性の 73% を維持したが、10 mM ヒドロキシルアミンを含む同緩衝液での透析 (かつ、その後の、ヒドロキシルアミンや PLP-ヒドロキシルアミン複合体を除くための、PLP を含まない緩衝液での透析) によって失活を引き起こした (Table 14)。10 μ M PLP を含む緩衝液による透析は、酵素の活性を 89% まで回復させ、100 μ M PLP での透析は、組換え MetDC の酵素活性を処理前と同等に完全に回復させた (Table 14)。一方で、別の試験区では、酵素活性の回復は 68% にとどまり、タンパク質濃度の顕著な低下がみられた (データ示さず)。このことから、透析により長時間 PLP が不在条件下では、組換え MetDC は不安定となり、崩壊あるいは PLP 存在下でも活性型に戻れない可能性がある。一般的に、PLP 酵素は PLP 非存在下で、活性を失うだけでなく、PLP 存在下と比べて不安定となる。

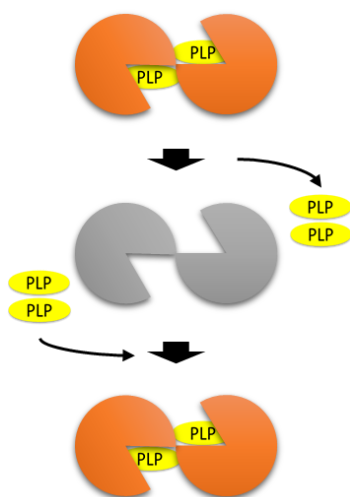
組換え酵素の 250-500 nm における吸収スペクトルを Fig. 24, 25 に示す。ピークは 280 nm, 330 nm および 420 nm に観察され、 $A_{280} : A_{400}$ の比は 9 : 1 であり (Fig. 24-1)、 $A_{280} : A_{420}$ の比は 16 : 1 であった (Fig. 25-2)。吸収スペクトルのパターンは、*Lactobacillus brevis* の L-グルタミン酸脱炭酸酵素 (GluDC, GAD) の吸収スペクトルと似ていた⁴⁵⁾。PLP と酵素のピリドキシルリシン残基との間のアルジミン結合から生じる 420 nm のピークは、おそらく PLP 依存性酵素にとって典型的なものである⁴⁶⁾。このピークは、10 mM ヒドロキシルアミンを含み PLP を含まない緩衝液で透析した (後、PLP を含まない緩衝液で透析した) 組換え MetDC では消失したことから (Fig. 24-2, 25-3)、これは PLP が Schiff 塩基を介して酵素への結合 (内部アルジミンの形成) をしていないことを示唆している。この処理によって、酵素活性の喪失および 420 nm での吸収極大の消失がみられたため、組換え MetDC はその触媒活性の補因子として PLP を必要とすることが確認された。し

かし、再ホロ化によって、初発ホロ化時の酵素活性の 68%まで回復した組換え MetDC において、420 nm での吸収極大の回復は観察されなかった (Fig. 25-2,4)。この理由は定かではないが、タンパク質濃度が極端に低いためかもしれない。今後は透析処理後のタンパク質濃度を揃えて、吸収スペクトルを測定すべきだと考える。

フェニルヒドラジン法により、PLP を 500 nM - 20 μ M という広範囲の濃度で定量することができた (Fig. 26)。この方法を用いて、透析により遊離の PLP を除いた MetDC が酵素中に保持する PLP の量について調べた。その結果、1 mol の MetDC が、1.4-2.0 mol の PLP を酵素の立体構造中に保持している可能性が高いことがわかった (データ示さず)。Group II の PLP 酵素のうち、1 mol の MetDC に対して、HisDC は 2 mol の PLP、GluDC は 6 mol の PLP を保持しているといわれている^{4,13}。今回は、サンプル量の不足に加えて、透析によりタンパク質量が大きく減少したことから 1 回しか試行できなかった。今後、試行回数を重ねて、1 mol の MetDC が何 mol の PLP を保持しているのか、に関してより正確な数値を得る必要がある。

Table 14. MetDC の PLP 要求性.

	比活性 (U/mg)	相対活性 (%)
ホロ酵素 (100 μ M PLP)	11.4	100
ホロ酵素 (PLPフリーで一晩透析)	8.3	73
アポ酵素 (ヒドロキシルアミン処理)	0.501	4.4
アポ酵素 + 10 μ M PLP	10.2	89
アポ酵素 + 100 μ M PLP	11.4	100



ヒドロキシルアミン処理酵素は、PLP 未添加で 10 mM ヒドロキシルアミンを含む 50 mM KPB (pH 6.6) による透析により調製した。その後、ヒドロキシルアミン処理酵素は、10 あるいは 100 μ M PLP を含む 50 mM KPB (pH 6.6) により透析した。その後、活性測定およびタンパク質濃度測定を行い、比活性を算出した。

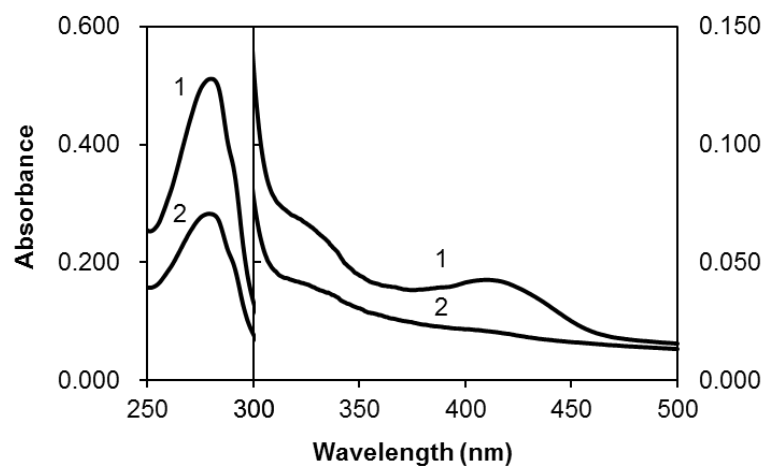


Fig. 24 MetDC の吸収スペクトル.

Curve 1, 100 μ M PLP を含む 50 mM KPB (pH 6.6) により透析した MetDC (ホロ酵素, 0.99 mg/ml) ; Curve 2, PLP 未添加で 10 mM ヒドロキシルアミンを含む 50 mM KPB (pH 6.6) により透析した MetDC (アポ酵素, 0.27 mg/ml). 250-500 nm の吸収スペクトルは UV-Vis spectrophotometer により測定した.

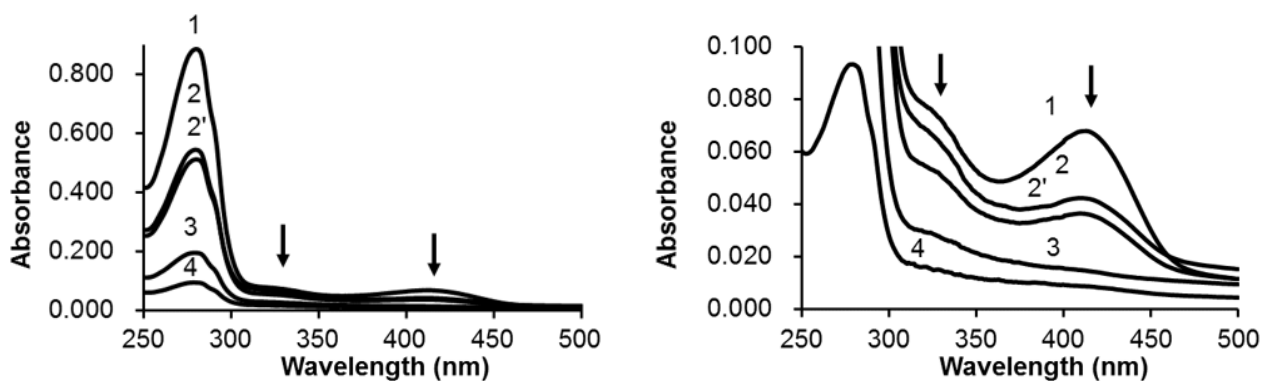


Fig. 25. ホロ化・アポ化・再ホロ化による MetDC の吸収スペクトルの変化.

Curve 1, 100 μ M PLP を含む 50 mM KPB (pH 6.6) により透析した直後の MetDC (5.8 mg/ml) ; Curve 2, 2', 1 を, PLP を含まない 50 mM KPB (pH 6.6) により透析して遊離の PLP を除いた MetDC (ホロ酵素, 3.6 mg/ml) ; Curve 3, 2 を, PLP 未添加で 10 mM ヒドロキシルアミンを含む 50 mM KPB (pH 6.6) により透析した MetDC (アポ酵素, 1.5 mg/ml) ; Curve 4, 3 を, 100 μ M PLP を含む 50 mM KPB (pH 6.6) により透析した MetDC (再活性化酵素 0.51 mg/ml). 250-500 nm の吸収スペクトルは UV-Vis spectrophotometer により測定した.

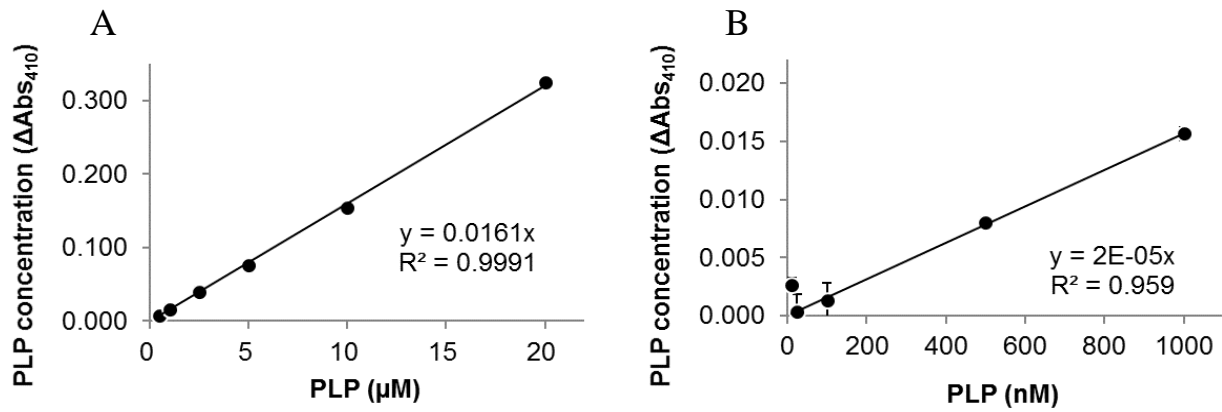


Fig. 26. フェニルヒドラジン法を用いた PLP の検量線.

(A) 0.50-20 μM PLP の範囲における検量線. (B) 10-1,000 nM PLP の範囲における検量線. 各試験は 3 回行った.

3-3-8 酵素活性に及ぼす阻害剤の影響

組換え MetDC の活性は、典型的な PLP 酵素の阻害剤であるヒドロキシルアミンやペニシラミンにより顕著に抑えられることがわかった (Table 15, Fig. 27) . PLP 酵素阻害剤は、PLP と結合し不活性型の PLP 複合体を生じることで、PLP が PLP 酵素中の特定のリシン残基 (ピリドキシルリシン) と結合し内部アルジミンを形成することを防ぐと考えられている。また、チオール基やイミダゾール基の不活性化をもたらす阻害剤の影響はうけなかったことから、システイン残基やヒスチジン残基が MetDC の活性に重要ではないことがわかった。

これらの結果は、代表的な Group II に属する PLP 依存性アミノ酸脱炭酸酵素である L-グルタミン酸脱炭酸酵素 (GluDC, GAD)¹³⁾ や L-ヒスチジン脱炭酸酵素 (HisDC)⁴⁾ の酵素活性に関与すると考えられているアスパラギン酸残基、セリン残基あるいはリシン残基とは異なっており、矛盾しない。

注目すべきは、システインの存在下でも、組換え MetDC の L-メチオニン検出性は低下した。これは、従来は L-メチオニンとこれらの阻害剤は構造が類似したアナログ同士であるため、MetDC の活性中心に競合的に存在するためであると考えてきた。ただし、これらの阻害剤は、PLP と結合して、不活性型の PLP を生じる可能性も考えられる。したがって、MetDC と Schiff 塩基を形成し内部アルジミンの状態にある PLP と、システインやホモシステインの結合に関して、反応条件を整えれば、阻害を受けにくくすることができると思う。例えば、PLP 量を反応系に過剰に添加するなどである。私の実験では、組換え MetDC ホロ酵素の酵素活性は、40 μ M から 1 mM の PLP 濃度の範囲内において、プラトーに達しているため、MetDC の PLP 結合部位に PLP が飽和していると思う。今後は、各種 PLP 酵素阻害剤下において、組換え MetDC による L-メチオニンの検出性能を安定化させるため、高濃度 PLP 下での L-メチオニンの定量性試験が必要である。

また、MetDC のタンパク質の立体構造の解析が急務である。今までに、MetDC の結晶は再現よく得られてはいるものの、結晶は脆く、X 線結晶構造解析に必要な強度が不足しており、構造解析までには至っていない。

Table 15. MetDC 活性へ及ぼす各種阻害剤の影響.

	MetDC活性 (U/ml)	相対活性 (%)
コントロール	116.5±1.47	100
<i>p</i> -クロロ水銀ベンゼンスルホン酸	115.0±2.06	99
<i>N</i> -エチルマレイミド	113.6±2.21	98
ジエチルピロカルボン酸	112.1±2.51	97
ヨードアセトアミド	110.6±2.95	95
<i>p</i> -クロロ水銀安息香酸	109.1±2.65	94
L-システイン	90.0±3.24	77
D-ペニシラミン	16.2±1.92	14
L-ペニシラミン	14.7±6.19	13
ヒドロキシルアミン	0.841±0.0826	0.72

※阻害剤はL-システインを除き、終濃度1 mM で用いた。L-システインのみ終濃度0.125 mM で用いた。

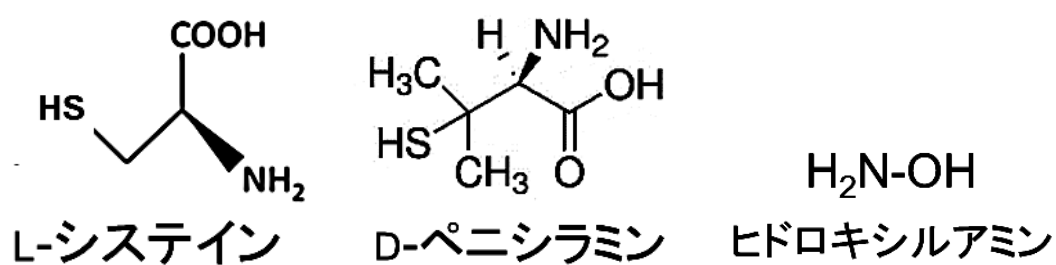


Fig. 27. L-システイン, D-ペニシラミンおよびヒドロキシルアミンの構造式.

3-3-9 抗腫瘍性の検討

第2章「*Streptomyces* sp. 590 由来 L-メチオニン脱炭酸酵素遺伝子のクローニングおよび配列解析」で述べた通り、私は、*Streptomyces* sp. 590 由来 MetDC が2種の腫瘍細胞 HeLa（ヒト子宮頸ガン細胞 Human cervical cancer cell line）および RERF-LC-AI（ヒト肺ガン細胞 Human squamous lung cancer cell line）に対する細胞毒性を有することを明らかとした。この試験では、ヒト腫瘍細胞に対する生育抑制作用を示したものの、MetDC がヒト正常細胞に及ぼす生育抑制作用についての試験は、いままで行われていなかった。

そこで、組換え MetDC を用いて、*in vitro* で2種類のヒト腫瘍細胞（A431, MDA-MB-231）およびヒト正常細胞（NHDF-Neo）に対する生育抑制作用について試験した。均一精製された MetDC の存在下または非存在下における細胞生存率を、逆位相差顕微鏡写真および MTS アッセイによって分析した。

これらの写真に示されているように、腫瘍細胞（A431, MDA-MB-231）のほとんどが終濃度 7.5-30 U/ml MetDC において死滅した（Fig. 28-A）。このときの腫瘍細胞の細胞生存率は、A431 で30%まで、MDA-MB-231 で20%まで低下した（Fig. 28-B）。組換え MetDC は、腫瘍細胞の死を強く引き起こし、腫瘍細胞生存率を顕著に減少させた。しかし一方で、30 U/ml MetDC であっても、ヒト正常細胞 NHDF-Neo は生存していた（Fig. 28-A）。生存率はある程度減少し、コントロールと比較して64.1%の細胞生存率を維持した（Fig. 28-B）。2種の腫瘍細胞は、正常細胞よりも MetDC に対して感受性が高かった。この結果は、MetDC が腫瘍細胞に対してより強力な生育抑制作用を発揮することを示している。したがって、MetDC は有望な抗腫瘍酵素となる可能性がある。

腫瘍細胞は一般に、正常細胞よりも、急速に増殖し多くのタンパク質を産生するので、生育のため L-メチオニンを大量に必要とする⁴⁷⁾。したがって、L-メチオニンの不足、すなわち「メチオニン飢餓」は、細胞タンパク質合成を選択的に抑制し、腫瘍の遺伝子のメチル化および細胞周期移行を制御する。Tanら^{48,49)}は *Pseudomonas putida* 由来の L-メチオニン γ -リアーゼの抗腫瘍活性が、メチオニン飢餓から生じるものであることを報告した。この酵素は、L-メチオニンの α , β -脱離を触媒して、メタンチオール、アンモニアおよび α -ケト酪酸を生成するが⁵⁰⁻⁵²⁾、MetDC は脱カルボキシル化による L-メチオニンの分解を触媒し、その生成物は 3-メチルチオプロピルアミンおよびニ

酸化炭素である。L-メチオニンの酵素分解による主生成物の3-メチルチオプロピルアミンは、細胞内のアミノキシダーゼによって分解されると考えられている⁵³⁻⁵⁵⁾。双方の酵素の基質は同じL-メチオニンであるが、反応生成物が異なる。このことから、このセクションおよび先行研究における一連の実験結果は、メチオニン飢餓が正常細胞よりも優先的に腫瘍細胞の死を引き起こすという理論を支持するものであった。

今後は、MetDC 処理前後における培地中の L-Met 量を化学的に定量することによって、MetDC の生育抑制作用が MGL と同様に、細胞環境中の L-Met 量の低減をもたらす「メチオニン飢餓」による抗腫瘍性によるものであるかどうかを詳細に確認する必要がある。

さらに、*in vivo* での腫瘍細胞・正常細胞に対する MetDC の生育抑制作用を検討する必要がある。生体内では、患部に特異的に届く性質を付加する技術が必要である。たとえば、腫瘍細胞に特異的に発現している抗原に対する抗体あるいはポリヒスチジン鎖を付加した「腫瘍細胞親和性タンパク質」の創製⁵⁶⁾ や、あるいは人工膜小胞「リポソーム」を用いた拒絶反応の少ないドラッグデリバリーシステムの開発が望まれる。

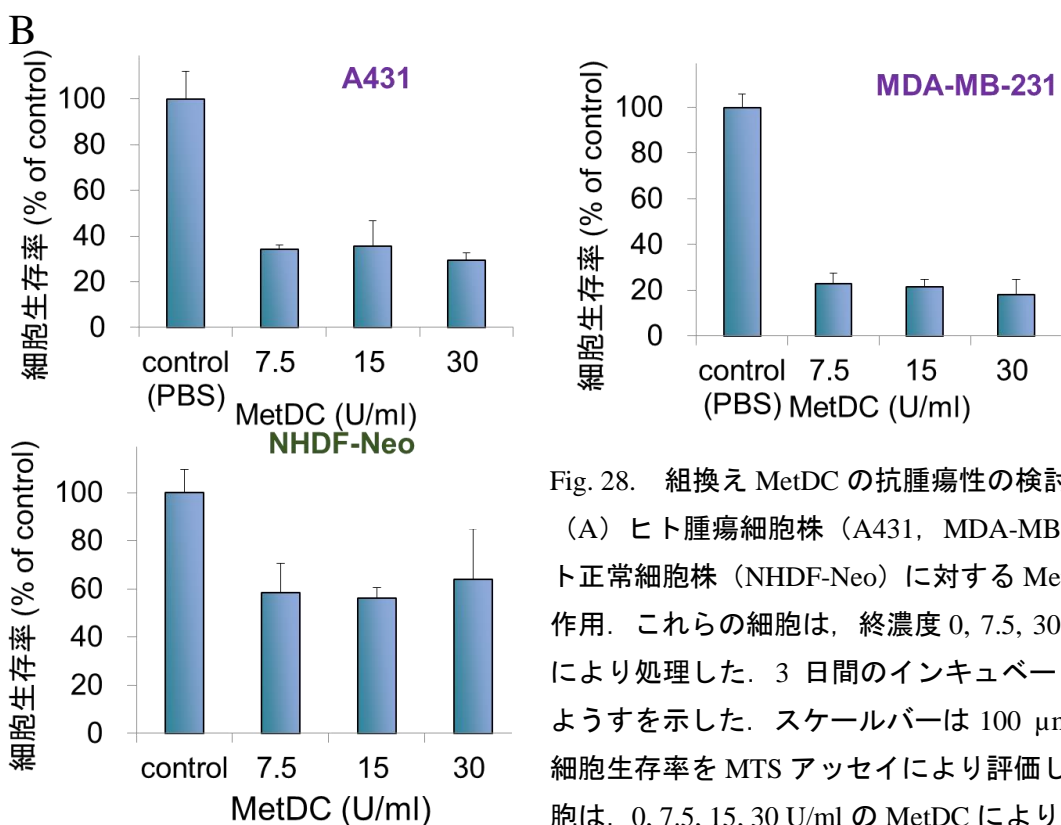
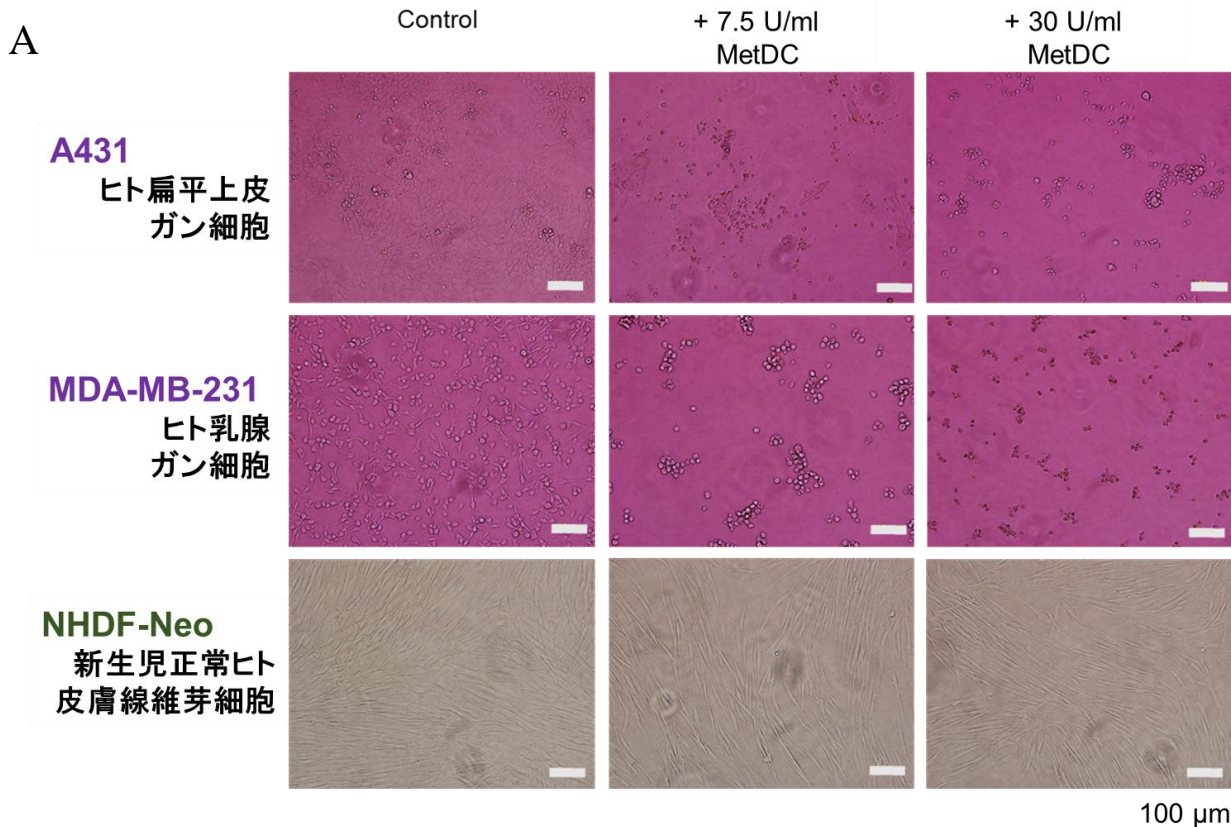


Fig. 28. 組換え MetDC の抗腫瘍性の検討.

(A) ヒト腫瘍細胞株 (A431, MDA-MB-231) およびヒト正常細胞株 (NHDF-Neo) に対する MetDC の生育抑制作用. これらの細胞は, 終濃度 0, 7.5, 30 U/ml の MetDC により処理した. 3 日間のインキュベートの後の細胞のようすを示した. スケールバーは 100 μ m を表す. (B) 細胞生存率を MTS アッセイにより評価した. これらの細胞は, 0, 7.5, 15, 30 U/ml の MetDC により処理した. 細胞生存率はコントロールの細胞 (同量のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を添加した) の生存率に対する試験区の細胞の生存率を百分率で示した. 各試験は, 3 回ずつ行い, mean \pm SD で示した.

第4章 L-メチオニン脱炭酸酵素を用いたL-メチオニン酵素的定量法の開発

第1節 背景および目的

これまで述べてきたように、組換え酵素の取得により、MetDCの基礎研究を推進することが可能となり、MetDCの酵素化学的な特性を明らかにすることができた。加えて、関連する酵素の知見の集積に寄与したと考える。その要因には、酵素発現量の増加や精製の簡便、高収量化のほかに、活性測定法の改良を行ったことが大きく関わっている。従来、MetDCの活性測定には、水銀を用いたワルブルグ検圧器による少量、閉鎖系、危険で煩雑な定量系が利用されてきた¹⁶⁾。本研究では、MetDCに適した簡便な酵素活性測定法を開発したことにより、従来よりも研究を進展させやすくした (Fig. 6)。本章では、MetDCの酵素化学的特性の応用を試みた。

L-Metはヒトにとって必須アミノ酸であり、メチオニン代謝経路を経て、L-Cysやシスチン (L-Cysの2量体)、グルタチオンを生合成するために利用される。L-Metは生命維持のため、常に体外から摂取する必要があるが、メチオニン代謝経路の代謝関連酵素に、先天的あるいは後天的に異常が生じることがある (Fig. 29)⁵⁷⁾。その結果、細胞内のL-Met濃度およびL-ホモシステイン濃度が上昇し、血中のL-Met濃度およびホモシスチン濃度が上昇すると考えられている。

健常ヒト血しょう中L-Met濃度は13.5-36.8 μM であり、高濃度患者では1.5-20 mMにも及ぶ。血中L-Met量の増加と、先天性メチオニン代謝異常症、若年性血栓症 (心筋梗塞、脳梗塞)、中枢神経系症 (けいれん、脳梗塞)、水晶体の脱臼および骨粗鬆症には関連性があると考えられている。

したがって、医学的観点において、低濃度から高濃度まで、特に低濃度におけるL-Metの正確な定量が求められる。また、もし生鮮食品、加工食品、サプリメント、医薬品などの食品、医薬品におけるL-Metの簡便、正確な定量が可能となれば、商品、製品の品質保持や供給の安定性向上に寄与することも可能となると考える。

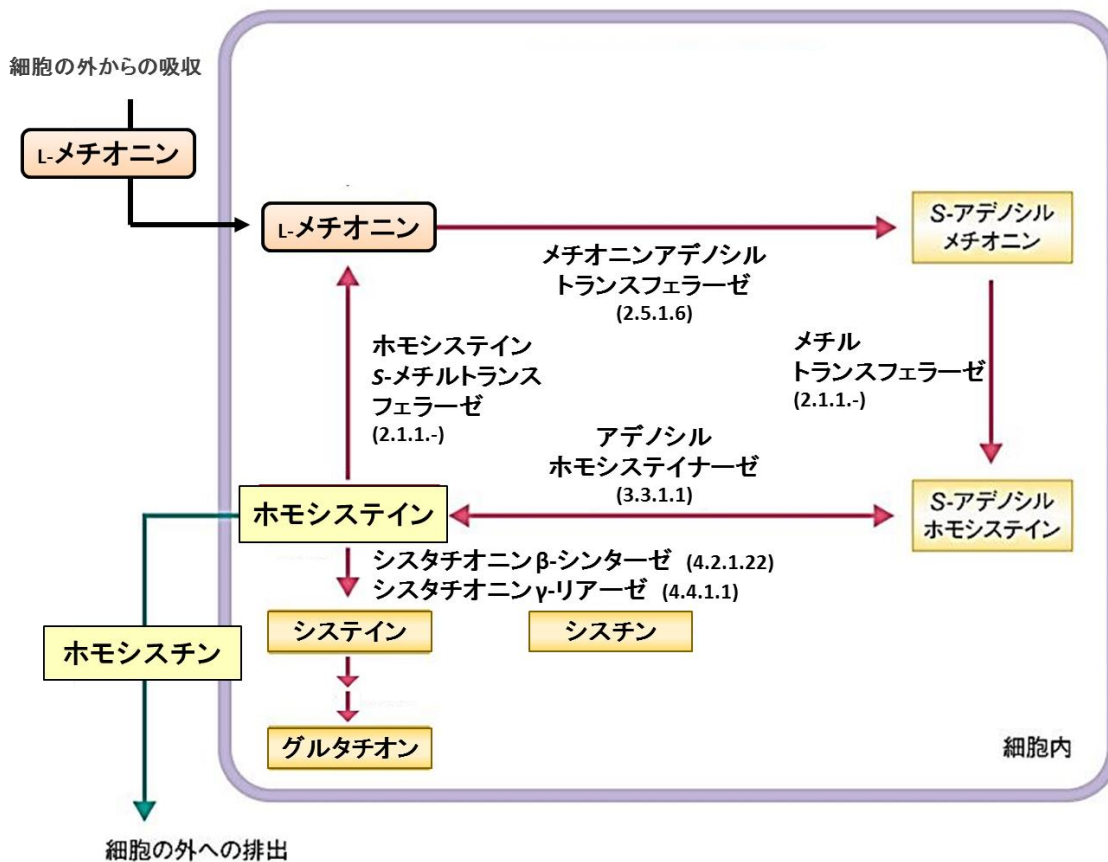


Fig. 29. 細胞内のメチオニン代謝経路における代謝関連物質および代謝関連酵素⁵⁷⁾.

代表的なアミノ酸の定量法として、HPLC や LC/MS を用いた化学的定量法や酵素的定量法が知られている。化学的定量法は、高い精度と再現性で定量が可能である一方で、一度に一つのサンプルのみしか測定できず、高価な装置と高度な訓練を要する。また、有機溶媒等の使用による環境負荷の影響も懸念される。それらの問題を解決するために近年、酵素特有の基質特異性、反応特異性を利用した「酵素的定量法」により、アミノ酸をより簡便、短時間で測定しようとする試みが盛んに行われている。酵素の基質特異性を目的に合致するよう調整することで、高精度、高再現性でアミノ酸を定量することが求められる。

酵素的定量法を実用化するにあたっての懸念事項は、血液や尿のような生体サンプルや食品サンプル中に含まれる夾雑アミノ酸、血清、血しょう成分が、酵素による目的のアミノ酸である L-Met の定量性に影響を及ぼす可能性があることである。夾雑物質の作用としては、MetDC 反応の増強や

呈色反応の強化によって、L-Met の検出性を引き上げたり、MetDC 反応や呈色反応の阻害によって、L-Met の検出性を抑制したりすることがあると考えられる。

酵素的定量において、夾雑物質の存在下で目的物質を定量するにあたって、通常、次の 2 つの方法を用いる。1 つは、酵素に変異を導入し、基質特異性を改変すること。もう 1 つは、反応条件を調整することである。酵素への変異導入は成功しさえすれば、有用な方法であるが、変異導入の過程で一定の時間を要するデメリットがある。特に、MetDC のような新規酵素を用いた研究では、配列や構造のデータが不足することが多く、類似の酵素タンパク質に関するデータベース上の情報が得られないことがある。また、構造解析が未完了の酵素は、酵素活性や基質特異性に重要な残基が特定できないため、試行錯誤を頼りとする非効率的な手法を取らざるを得ない。そこで、今回、もう 1 つの「反応条件の改良」の観点から、望ましくない夾雑物質が及ぼす MetDC 反応、呈色反応の強化、抑制を防ぐ方法を検討した。

今までに、L-Met の酵素的定量法として MGL (Fig. 30, 31)⁵⁸⁾ や変異型フェニルアラニン脱水素酵素 (PheDH) (Fig. 32)⁵⁹⁾、アデノシルメチオニンシンターゼ (AdoMetS) (Fig. 33)⁶⁰⁾ が研究されてきた。これら定量法の原理やメリット、デメリット等を図に示している。

MGL は当研究室で研究を行ってきた酵素であり⁵⁸⁾、 α 、 γ -脱離反応および γ -置換反応の 2 つの反応で L-Met および L-ホモシステイン (L-Hcy) を触媒する多機能酵素であることが知られている。MGL と MBTH 法を利用することで、MGL 反応によりアミノ酸から生じた α -ケト酪酸を定量することで、L-Met を定量することができる。MBTH 法は、 α -ケト酸の有するカルボニル基が 3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン (MBTH) と複合体を形成することを利用している。複合体が 320 nm に極大吸収波長をもつため、UV 定量により α -ケト酸を定量できる。

MGL はアミノ酸の定量用酵素キットとして市販されてきた。MGL と MBTH 法により、たしかに L-Met を定量することができる。しかし、前述の MGL の多機能性に起因して、L-Met の α 、 γ -脱離反応の進行に伴い、 γ -置換反応の頻度が増加する。その結果、反応時間の増加と L-Met の検出性が正比例しない (Fig. 31)。また、L-Met の初発濃度の違いにより、検量線の傾きが大きく異なる。これらの問題は MGL の多機能性、つまり、MGL が L-Met の分解を上記の 2 種類の経路で行うことに起因しているものと考えられる。当研究室では、 α 、 γ -脱離反応および γ -置換反応を考慮して、測

定値のプロットにより得られる弓型の検量線を直線に変換する変換式を考案，運用しているが，その適用は本法の煩雑さを増加させ，L-Met 定量における簡便さを減ずる．さらに，MGL は L-Met および L-Hcy に対して，同程度の比活性を有することから，両基質の総量を定量することができる一方で，それぞれの基質を分別的に定量することは困難である．したがって，検量線が線形近似できる，かつ，L-Met および L-Hcy を分別的に定量できる酵素的定量法の開発が望まれてきた．

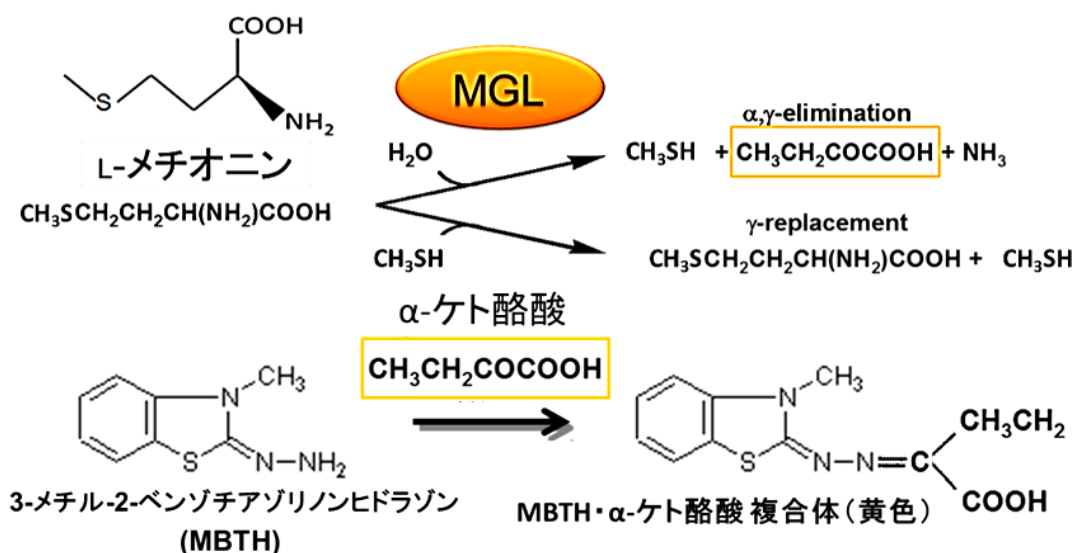


Fig. 30. L-メチオニン γ -リアーゼ (MGL) の酵素反応と α -ケト酪酸の反応 (MBTH 法) ⁵⁸⁾.

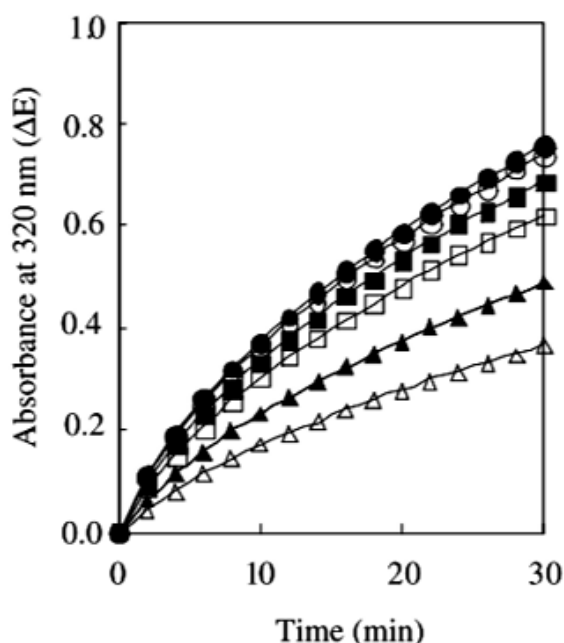


Fig. 31. MGL と MBTH 法を利用した L-Met の酵素的定量法により得られる検量線 ⁵⁸⁾. 各濃度の L-Met において，MGL の各反応時間の経過時に得られる吸光度の値をプロットした. L-Met 基質濃度：50 mM (●)，25 mM (○)，10 mM (■)，5 mM (□)，2 mM (▲)，1 mM (Δ).

変異型 PheDH と AdoMetS を用いた L-Met の定量法は、富山県立大学の浅野らの研究グループにより行われてきた研究である。変異型 PheDH は 5 重変異により基質特異性を改変したことで、標準アミノ酸の中では、L-Met に対して最もよく反応し、定量範囲も広がった (Fig. 30)⁵⁹⁾。しかし、依然として、L-Leu, L-Val や L-Ile などの分岐鎖アミノ酸に対しても比較的高い活性を有するため、これらを特異的に分解する酵素 (分岐鎖アミノ酸トランスアミナーゼ) を用いた前処理が必要である。

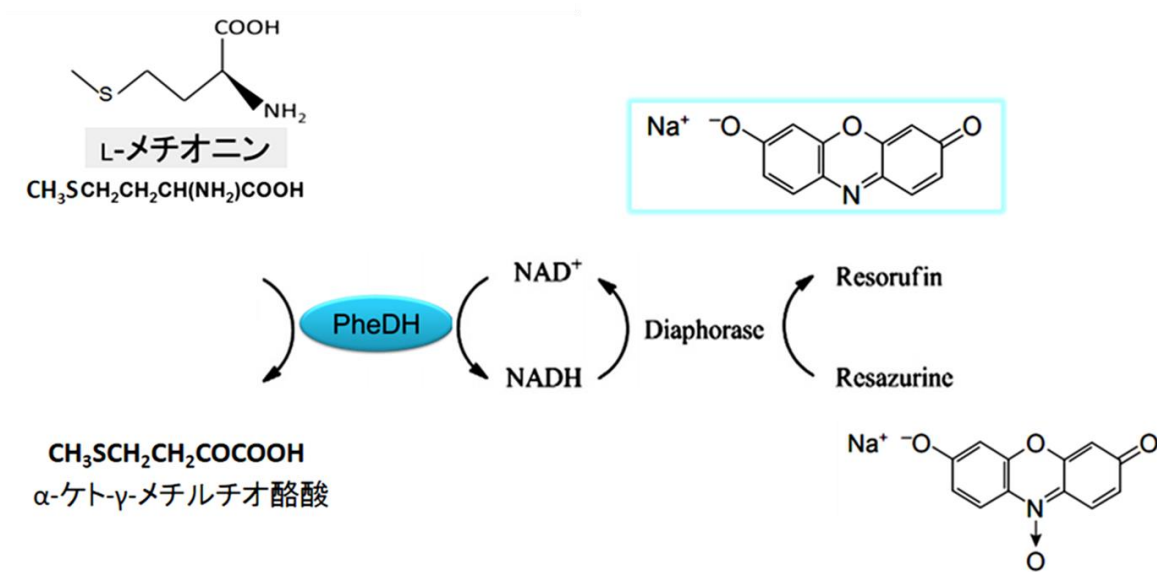


Fig. 32. 変異型フェニルアラニン脱水素酵素 (PheDH) と Diaphorase 法を用いた L-Met の定量法にかかわる酵素反応⁵⁹⁾。

PheDH が L-Met を脱水素する時に得られたプロトンおよび還元力を NAD^+ に渡す。Diaphorase がプロトンおよび還元力を Resazurine に渡した結果、Resorufin を生じる。Resorufin は 545 nm の波長の光で励起し、590 nm の波長の蛍光を発する。これを利用して、L-Met を蛍光定量する。

一方, AdoMetS による方法では, ピロリン酸ピルビン酸ジキナーゼ (PPDK) および乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) を用いて, L-Met を定量する (Fig. 33) ⁶⁰. AdoMetS が L-Met と ATP から S-アデノシル-L-メチオニン, リン酸 (Pi) とともに, ピロリン酸 (PPi) と AMP を生じる. その後, PPDK および LDH の作用で, ピロリン酸 (PPi) と AMP から, ピルビン酸を経て, ピルビン酸から乳酸を生じるときに消費される NADH 量の減少量を 340 nm における吸光度の減少として測定することで, L-Met を定量する. 反応時間が 5-10 分程度と短く, UV 定量法, 比色定量法, 蛍光定量法のうち, 蛍光定量法はヒト血しょうを用いると正確に定量できない. UV 定量法では直線範囲 0-200 μM , 検出限界 7 μM の PPi を定量し, 比色定量法では直線範囲 0-100 μM , 検出限界 0.3 μM の PPi を定量した. UV 定量法は, L-Met と PPi の検量線の高い相関性を示している.

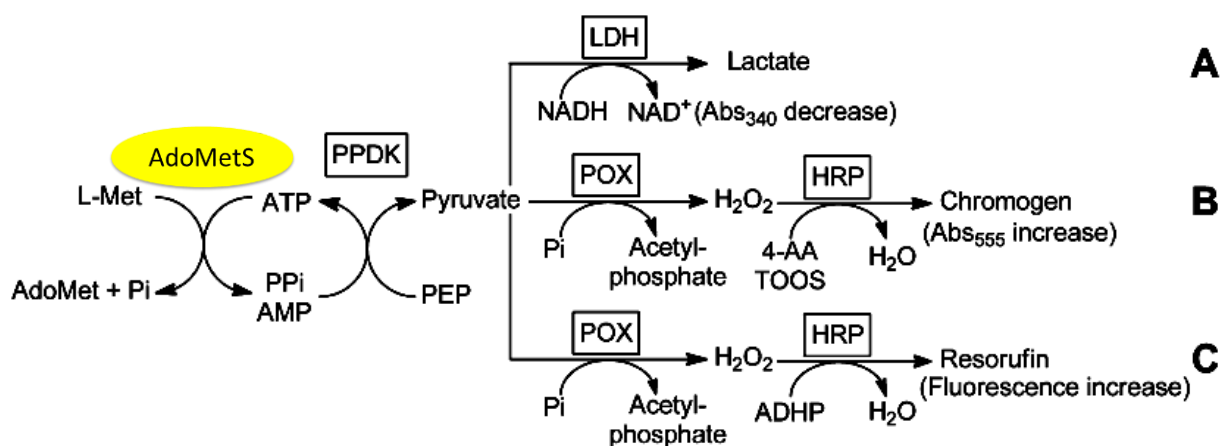


Fig. 33. アデノシルメチオニンシンターゼ (AdoMetS) とピロリン酸ピルビン酸ジキナーゼ (PPDK) を利用した L-Met の各種定量法の反応スキーム ⁶⁰ .

(A) UV アッセイ UV assay, (B) 比色アッセイ colorimetric assay, および (C) 蛍光アッセイ fluorescence assay. LDH : 乳酸デヒドロゲナーゼ, POX : ピルビン酸オキシダーゼ, HRP : 西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ, 4-AA : 4-アミノアンチピリン.

今までに実際に利用，あるいは研究されてきた L-Met の酵素的定量法に対して，MetDC による L-Met の酵素的定量法は比色定量法であって，予備実験においても検量線が直線を呈し，L-Met に対する基質特異性が比較的高いこと，さらには低濃度域では 1 μ M 程度の L-Met を定量することができたことなど，関連する研究に匹敵するあるいは凌駕する点がみられた．その後，私は，定量時間の短縮や，夾雑アミノ酸あるいは血清や血しょうの存在下での L-Met の定量性について，検討を進めてきた．

本章では，組換え MetDC の応用研究として，L-Met の定量性（検出感度，検出精度）の向上，夾雑アミノ酸による定量性の低下の防止や改善，さらに血液などの生体試料中の簡便，正確，短時間で行える L-Met の酵素的定量法の開発，確立のために検討を行った．

第2節 実験材料および方法

4-2-1 L-メチオニン脱炭酸酵素とアミノキシダーゼを併用したL-メチオニンの酵素的定量法

組換え MetDC (His₁₀-Tag 融合タンパク質) を用いた L-Met の定量に関する原理は Fig. 6 に示すとおりである。組換え MetDC を用いた L-Met の酵素的定量法は、MetDC の活性測定法 (Fig. 6, Scheme 2) および改良法を利用することで行った。改良法として、L-Met 定量の至適条件を決定するため、反応条件の検討を行った。

反応条件の検討は、まず、反応温度 (30, 37°C) と反応時間 (5, 10, 15, 30 min) について行った。実際に検討した L-Met 濃度、反応温度、反応時間の条件を、時系列順に以下に示す。

- ・ 反応条件 1)

L-Met 濃度 : 0, 10, 25, 50 μM.

反応温度, 反応時間 : 37°C, 10 min ; 37°C, 30 min.

- ・ 反応条件 2)

L-Met 濃度 : 0, 10, 25, 50 μM.

反応温度, 反応時間 : 30°C, 5 min ; 30°C, 10 min.

- ・ 反応条件 3)

L-Met 濃度 : 0, 5, 10, 25, 50 μM.

反応温度, 反応時間 : 37°C, 5 min ; 37°C, 10 min ; 35°C, 10 min ; 40°C, 10 min.

- ・ 反応条件 4)

L-Met 濃度 : 0, 5, 10, 25, 50 μM.

反応温度, 反応時間 : 37°C, 15 min ; 37°C, 30 min ; 37°C, 30 min.

次に、反応緩衝液、反応 pH、MetDC 酵素量の検討を以下の条件について行った。反応緩衝液 (100 mM リン酸カリウム緩衝液[KPB], 100 mM tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride buffer [Tris 緩衝液], 100 mM ホウ酸カリウム緩衝液), 反応 pH (pH 6, 7, 8, 9), MetDC 酵素量 (0, 0.014, 0.070, 0.14, 0.28, 0.56, 0.70, 1.1 units/反応系)。

これらの反応条件の検討により、L-Met 定量の至適条件を決定した。

最終的に、L-Met 定量の至適条件において、定量可能な基質 (L-Met) 濃度範囲 (0, 0.25, 0.50, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 25, 50, 100, 250, 500 μ M) を決定した。L-Met の酵素的定量法は、従来、MetDC の活性測定法で用いてきた、MetDC 反応と呈色反応を別々に行う「2段階法」と、MetDC 反応と呈色反応を同時に行う「1段階法」について検討した。「1段階法」は、L-Met 定量における煩雑さの軽減および所要時間の短縮のために検討した。

4-2-2 ヒト血清, ヒト血しょうを用いた L-メチオニンの酵素的定量試験

健常ヒト血清 ワコー C&C (和光) および健常ヒト血しょう (コスモ・バイオ) を用いた。ヒト血清およびヒト血しょうは、100 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM PLP で、それぞれ終濃度 10, 25, 50, 75% に希釈し、100% と併せて用いた。その後、シリンジを用いて孔径 0.22 μ m のメンブレンフィルターでろ過をした後、遠心分離 (11,000 rpm, 10 min, 4°C) し、上清を回収し、血清サンプルおよび血しょうサンプルを準備した。

1段階法を用いて、L-Met の酵素的定量試験を行った (Scheme 8)。850 μ l の 100 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM PLP に、100 μ l の 10x L-Met サンプルを添加した。10x サンプルとは、終濃度の 10 倍濃度のサンプルである。反応系における各サンプルの終濃度を以下に示す (L-Met サンプル (終濃度 0, 0.25, 0.50, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 25, 50 μ M), 血清サンプル (終濃度 0, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10%), 血しょうサンプル (終濃度 0, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10%))。そこに、130 μ l の呈色試薬 (50 mM フェノール 43 μ l, 15 mM 4-アミノアンチピリン 43 μ l, 300 mU/ml ペルオキシダーゼ 43 μ l, 14.3 mU/ml アミノキシダーゼ 1 μ l) を添加し、37°C, 5 min でインキュベートした。50 μ l の MetDC を添加し、酵素反応開始時から 600 sec までの 505 nm における吸光度の変化をスキャンし、直線範囲のスタートポイントからエンドポイント (600 sec) の吸光度の差を取ることで、サンプル中に含まれる L-Met を算出した。

ヒト血しょう存在下に添加した L-Met の添加回収試験を行った。血しょう 5% あるいは 10% 含むバッファーを調製した。0-50 μ M の L-Met を含む緩衝液を作製し、そこに終濃度 5% となるように市販血しょう LEVEL 3 (#289, Liquichek Homocysteine Control, バイオラッド) を添加した。同様に、

5-50 μM の L-Met を含む緩衝液を作製し、そこに終濃度 10%となるように血しょうサンプル 2 種(ヤマサ検体サンプル (A) GLO431395 あるいは (C) NGO315379) を添加した。双方、2 段階法 (Scheme 7) で L-Met の定量を行い、血しょう存在下で、添加した L-Met を正しく定量できるかどうか、すなわち、MetDC が 5 あるいは 10%血しょう中の L-Met 添加回収が可能であるかどうかを試験した。

MetDC 酵素量は、8 日間で 0.70 units/反応系であった。反応緩衝液・反応 pH は、100 mM Tris 緩衝液 (pH 8) , 1 mM PLP. MetDC 反応は、37°C, 30 min で行った。

4-2-3 呈色用混合試薬の冷蔵保存性の検討

呈色試薬 Reagent 2 (R2) (15 mM 4-アミノアンチピリン 43 μl , 300 mU/ml ペルオキシダーゼ 43 μl , 14.3 mU/ml アミノキシダーゼ 1 μl) を混合し、計 87 μl の R2 を、任意の倍率で一括作製し、4°C で長期間保存した。4°C保存して 8, 24, 60 日目の時点での R2 に、フェノールを加えて完成した呈色試薬混合液、および MetDC を用いて行った L-Met の定量と、すべて当日調製した呈色試薬混合液 (0 日目) を用いて行った L-Met の定量の結果を比較した。

L-Met の基質濃度は、0, 5, 10, 25, 50 μM であった。MetDC 酵素量は、8 日間で 0.34 units/反応系、24 日間で 0.20 units/反応系、60 日間で 0.34 units/反応系であった。反応緩衝液・反応 pH は、100 mM Tris 緩衝液 (pH 8) , 40 μM PLP. MetDC 反応は、37°C, 30 min で行った。

4-2-4 L-メチオニンの完全分解条件の検討およびL-メチオニン，L-ホモシステイン混合液からのアミノ酸の分別的定量法の検討

MetDC がどの程度の量の L-Met を完全分解できるのか，また，完全分解条件に及ぼす酵素量，基質量，反応 pH，反応時間を調べるため実験を行った．酵素量は，1 反応系あたり 1.4 units (24 μ g)．基質量は，50，100，200，400 nmol L-Met (反応液量は 1 ml)．反応緩衝液の組成と pH は，100 mM Tris 緩衝液 (pH 8)，1 mM PLP．MetDC の反応温度は 37°C で，反応時間は，0，10，30，60 min．呈色反応は，2 段階法で，37°C，60 min で行った．MetDC の L-Met 分解活性は 4-アミノアンチピリン法により定量した．

L-Hcy 存在下における L-Met の検出性を向上させるような MetDC の反応条件を検討するため，次の実験を行った．酵素量は，1 反応系あたり 0.34 units．基質量は，5，10，25，50 μ M L-Met (反応液量は 1 ml)．L-Hcy 添加量は，0，10，15，50，100 μ M L-Hcy．反応緩衝液の組成と pH は，100 mM KPB (pH 7)，40 μ M PLP；100 mM Tris 緩衝液 (pH 8)，40 μ M PLP；および 100 mM ホウ酸カリウム緩衝液 (pH 9)，40 μ M PLP．MetDC の反応温度は 37°C で，反応時間は 30 min．呈色反応は，2 段階法で，37°C，60 min で行った．MetDC の L-Met 分解活性は 4-アミノアンチピリン法により定量した．

MetDC が L-Hcy を分解するのかどうかを調べるため、次の実験を行った。ここでは、MGL と、MGL を用いた L-Hcy の定量法であるメチレンブルー法、および L-Met と L-Hcy の定量法である MBTH 法を用いた。

MGL は我々の研究室が主体的に研究を行ってきた酵素であり⁵⁸⁾、 α 、 γ -脱離反応および γ -置換反応の 2 つの反応で L-Met および L-Hcy を触媒する多機能酵素である。組換え MGL とメチレンブルー法を利用した L-Hcy の酵素的定量法の原理は以下のとおりである (Fig. 34)⁶¹⁾。

MGL とメチレンブルー法を利用することで、硫化水素 (H_2S) 量から L-Hcy 量を定量することができる。メチレンブルー法は、1 分子の H_2S が 3 価の鉄イオン (Fe^{3+}) の存在下で 2 分子の *N,N*-ジメチル-*p*-フェニレンジアミンと複合体を形成し、メチレンブルーを生じる。メチレンブルーが 650 nm に極大吸収波長をもつことを利用して、比色定量により H_2S を定量する。

MBTH 法 (Fig. 30) とは異なり、L-Hcy の定量性は MGL の多機能性に影響されない。その理由として、L-Hcy の α 、 γ -脱離反応および γ -置換反応の両反応において、 H_2S が生じることにある。その結果、反応時間の増加と L-Hcy の検出性が正比例し、検量線が直線となる。また、MGL は L-Met および L-Hcy に対して、同程度の比活性を有するが、メチレンブルー法では L-Met はほとんど影響

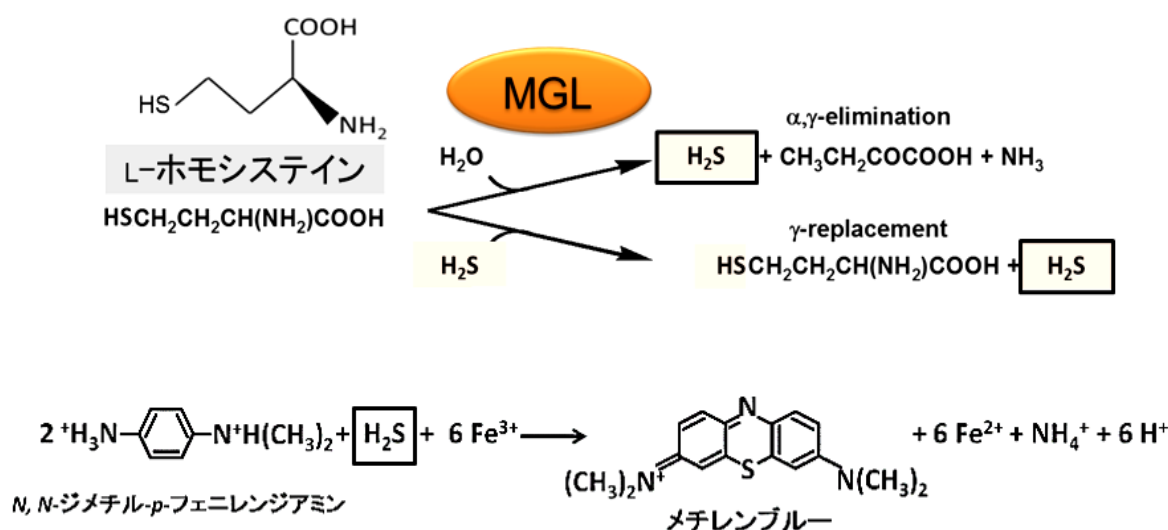


Fig. 34. MGL とメチレンブルー法による L-Hcy の定量の原理⁶¹⁾。

しないことが私の実験で確認されている。それぞれの基質を酵素的に分別的に定量する L-Met, L-Hcy の分別的定量法は, MetDC により L-Met の定量と完全分解を行った後に, MGL により L-Hcy を定量することができると考えている。

MGL とメチレンブルー法を用いた L-Hcy の定量は, 以下の反応試薬, 作業手順に従って行った。L-Hcy 基質溶液, 組換え MGL 精製酵素 12.5 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$, MGL 反応停止試薬 2.5 N NaOH, 呈色試薬 30 mM FeCl_3 (1.2 N HCl) および 20 mM *N, N*-ジメチル-*p*-フェニレンジアミン (5 N HCl) 。

まず, L-Hcy 基質溶液 250 μl を 37°C, 5 min プレヒートする。MGL 溶液 50 μl を添加し, 37°C, 30 min 酵素反応させる。2.5 N NaOH を 200 μl 添加し, 酵素反応停止させる。30 mM FeCl_3 および 20 mM *N, N*-ジメチル-*p*-フェニレンジアミンを各 250 μl 添加する。30°C, 30 min, 暗黒下でインキュベートし, 呈色させる。650 nm における溶液の吸光度を測定することで, 生じた H_2S から L-Hcy を定量する。

L-Met, L-Hcy の分別的定量法においては, L-Met, L-Hcy 基質溶液に MetDC 処理を加えたものを, MGL とメチレンブルー法で処理する。これにより, MetDC により L-Met の定量と完全分解を行った後に, MGL により L-Hcy を定量することができる考える。

MetDC が L-Hcy を分解するかどうかについて検討するため, L-Hcy 基質溶液を用いて, MetDC 処理および未処理を加えたものを, それぞれ MGL とメチレンブルー法で処理する。(MetDC 未処理サンプルの L-Hcy 量) から (MetDC 処理サンプルの L-Hcy 量) を差し引くと, MetDC による L-Hcy の分解量を定量することができる。

MGL を用いた L-Met の定量に関する原理は Fig. 30 のとおりである⁵⁸⁾。基質に L-Hcy を用いることによって、同様の方法で、MGL を用いて L-Hcy を定量することができる。MGL を用いた L-Met、L-Hcy の定量は、以下の反応試薬、作業手順に従って行った。

MGL と MBTH 法を用いた L-Met、L-Hcy の定量は、以下の反応試薬、作業手順に従って行った。L-Met、L-Hcy あるいは L-Met、L-Hcy 基質溶液、組換え MGL 精製酵素 12.5 µg/50 µl、MGL 反応停止試薬 50% トリクロロ酢酸、呈色試薬 1 M 酢酸ナトリウムおよび 0.1% MBTH。

まず、L-Met、L-Hcy あるいは L-Met、L-Hcy 基質溶液 950 µl をガラス試験管（1.5 ml エッペンドルフチューブは不可）に準備した後、37°C、5 min プレヒートする。MGL 溶液 50 µl を添加し、パラフィルムを押し付けてシールし、37°C、60 min 酵素反応させる。50% トリクロロ酢酸を 100 µl 添加し、酵素反応を停止させる。反応液 800 µl を新しいガラス試験管にとり、1 M 酢酸ナトリウムを 1.6 ml、0.1% MBTH を 0.6 ml 添加する。パラフィルムを押し付けてシールした後、50°C、30 min インキュベートする。石英セルを用いて 320 nm における溶液の吸光度を測定することで、生じた α -ケト酸量から L-Met 量 あるいは／および L-Hcy 量を定量する。 α -ケト酸と MBTH の複合体は、プラスチックに吸着する性質をもつため、MBTH 法においては、反応液のインキュベートおよび吸光度の測定は、ガラス試験管および石英セルを用いて行った。

メチレンブルー法と同様に、L-Met、L-Hcy の分別的定量法においては、L-Met、L-Hcy 基質溶液に MetDC 処理を加えたものを、MGL と MBTH 法で処理する。これにより、MetDC により L-Met の定量と完全分解を行った後に、MGL により L-Hcy を定量できると考える。

MetDC が L-Hcy を分解するかどうかについて検討するため、L-Hcy 基質溶液を用いて、MetDC 処理および未処理を加えたものを、それぞれ MGL と MBTH 法で処理する。（MetDC 未処理サンプルの L-Hcy 量）から（MetDC 処理サンプルの L-Hcy 量）を差し引くと、MetDC による L-Hcy の分解量を定量することができる。

各 pH における MetDC の L-Met 分解活性と L-Hcy 分解活性を調べた。

酵素量は、1 反応系あたり 0.34 units. 基質量は、10 mM L-Met (反応液量は 1 ml), 10 mM L-Hcy (DL-Hcy にて 20 mM 使用). 反応緩衝液の組成と pH は、広域緩衝液 Britton-Robinson buffer (pH 6, 7, 8, 9), 40 μ M PLP. MetDC の反応温度は 55°C で、反応時間は 10 min. 呈色反応は、2 段階法で、37°C, 60 min で行った. MetDC の L-Met 分解活性は 4-アミノアンチピリン法により定量した. L-Hcy 分解活性は MetDC 処理および未処理サンプルを、MGL とメチレンブルー法で定量した.

L-Hcy 添加時における MetDC の L-Met の検出性に及ぼす反応緩衝液および反応 pH の影響を調べた.

酵素量は、1 反応系あたり 0.34 units. 基質量は、5, 10, 25, 50 μ M L-Met (反応液量は 1 ml). L-Hcy 添加量は、0, 10, 15, 50, 100 μ M L-Hcy. 反応緩衝液の組成と pH は、100 mM KPB (pH 7), 40 μ M PLP; 100 mM Tris 緩衝液 (pH 7), 40 μ M PLP; および 100 mM Tris 緩衝液 (pH 8), 40 μ M PLP. MetDC の反応温度は 37°C で、反応時間は 30 min. 呈色反応は、2 段階法で、37°C, 60 min で行った. MetDC の L-Met 分解活性は 4-アミノアンチピリン法により定量した.

4-2-5 過酸化水素処理および加熱処理による L-ホモシステインの影響の除去と L-メチオニン検出精度の向上の検討

L-Hcy を酸化させることにより影響を除去し、L-Met 検出精度の向上が可能かどうかを調べた。

まずは、L-Hcy の酸化に必要な過酸化水素の量を求めた。2 mM DL-Hcy を含むリン酸カリウム緩衝液 (KPB) (100 mM KPB (pH 7.0), 40 μ M PLP) を 1.2 ml 作製し、そこに過酸化水素を終濃度 0, 2, 10 mM となるように加え (2 mM: 100 mM H₂O₂ 24 μ l, 10 mM: 500 mM H₂O₂ 24 μ l), 37°C, 30 min インキュベートした。十分量のカタラーゼ (36,000 U/ml を 20 μ l, 1 反応系あたり 720 U [理論上必要な量の 60-300 倍量], SIGMA bovine liver) を加え、37°C, 5 min インキュベートにより、過酸化水素を分解した。その後、80°C, 5 min の加熱によりカタラーゼを失活させた。冷却後、0, 2, 10 mM の H₂O₂ で処理をした 2 mM DL-Hcy 225 μ l を、0, 5, 10, 25, 50 μ M の L-Met を含む KPB (100 mM KPB (pH 7.0), 40 μ M PLP) 4.5 ml に添加し、終濃度 100 μ M DL-Hcy とした。各濃度の L-Met および 100 μ M DL-Hcy を含む L-Met, DL-Hcy 混合溶液 950 μ l を 4 本作製した。その後は通常通り、L-Met の定量を行った。1 反応系における MetDC 量は 0.34 units であった。MetDC 反応 37°C, 30 min の後、呈色反応を 37°C, 60 min で行った。

次に、L-Met の酸化が起こらない過酸化水素量を求めた。2 mM L-Met を含む KPB (100 mM KPB (pH 7.0), 40 μ M PLP) を 1.2 ml 作製し、そこに過酸化水素を終濃度 0, 5, 7.5, 10 mM となるように加え (5 mM: 250 mM H₂O₂ 24 μ l, 7.5 mM: 375 mM H₂O₂ 24 μ l, 10 mM: 500 mM H₂O₂ 24 μ l), 37°C, 30 min インキュベートした。十分量のカタラーゼ (1 反応系あたり 720 U) を加え、37°C, 5 min インキュベートにより、過酸化水素を分解した。その後、80°C, 5 min の加熱によりカタラーゼを失活させた。冷却後、0, 5, 7.5, 10 mM の過酸化水素で処理をした各 2 mM L-Met から 0, 5, 10, 25, 50 μ M の L-Met を、KPB (100 mM KPB [pH 7.0], 40 μ M PLP) を用いて段階希釈により作製した。各濃度の L-Met 溶液 950 μ l を 4 本作製した。その後は通常通り、L-Met の定量を行った。MetDC 量および酵素反応条件や時間は上記と同様に行った。

第3節 結果および考察

4-3-1 L-メチオニンの酵素的定量法の確立

ヒト血しょう中 L-Met 濃度は、13.5-36.8 μM であると考えられており、軽度の高メチオニン血症ではその20倍程度以上の濃度となり、代表的な高メチオニン症のホモシスチン尿症では1.3-20 mM に及ぶと考えられている。

反応条件の検討は、まず、反応温度（30, 37°C）と反応時間（5, 10, 15, 30 min）について行った。MetDC の最適温度は55°Cであるが、30 min は活性を維持できない（Fig. 22-B）。55°C, 5 min は MetDC の活性測定で用いてきた条件であるが、10 min 反応でも検出値が変わらないことから、失活していることが推測される。55°C, 5 min における予備実験では、MetDC はヒト血しょう中 L-Met 濃度に相当する 10-40 μM の L-Met を検出できないことがわかった。

したがって、酵素が活性をもつ期間を延長させつつ、定量に必要な活性を維持できる反応温度を検討した。反応温度の検討を最適温度 55°C よりも低い温度で行い、反応時間の検討を 5 min よりも長い時間で行った。

その結果、37°C, 30 min がもっとも低い温度かつ短い時間で、直線性の高い検量線が、高い再現性で得られる反応条件であることがわかった。MetDC (0.34 units) は、55°C, 5 min では 250 μM - 7.5 mM (Fig. 35), 37°C, 30 min では 5 - 50 μM (Fig. 36) の L-Met を定量可能であることがわかった。

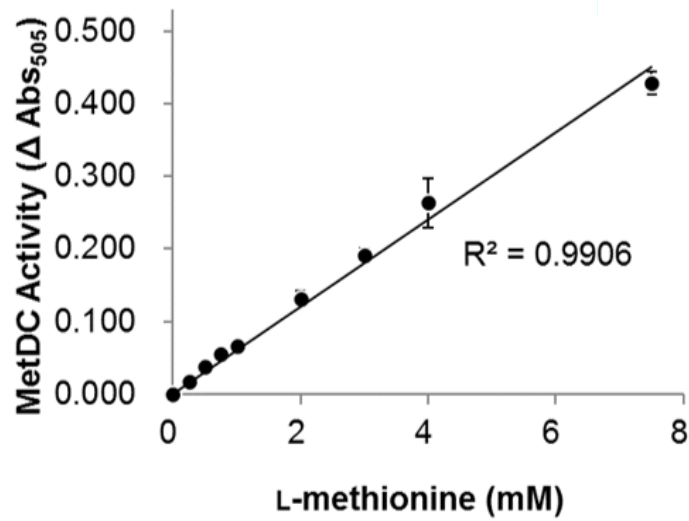


Fig. 35. MetDC を用いた L-Met の検量線. MetDC 反応 55°C, 5 min. 100 mM KPB (pH 6.6), 40 μM PLP. MetDC 量は 1 反応系あたり 0.34 units. L-Met 定量の手順については, 次ページの Scheme 6 を参照のこと. 各試験区における実験は, 3 回以上繰り返し行った.

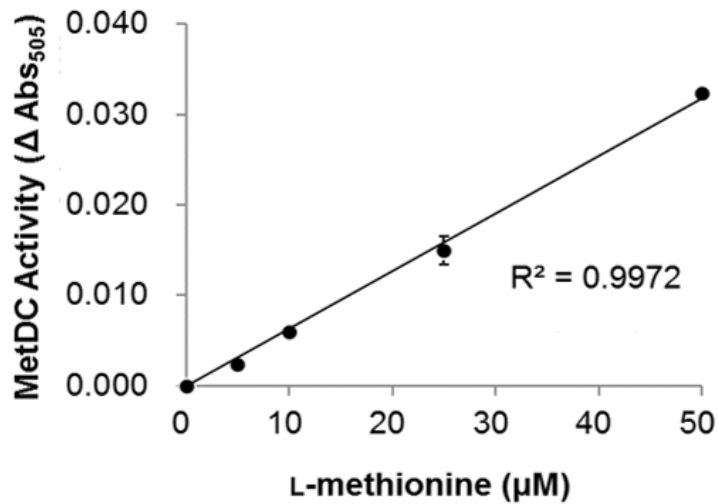


Fig. 36. MetDC を用いた L-Met の検量線. MetDC 反応 37°C, 30 min. 100 mM KPB (pH 6.6), 40 μM PLP. MetDC 量は 1 反応系あたり 0.34 units. 各試験区における実験は, 3 回繰り返し行って行った.

Scheme 6. MetDC 活性測定法 (2 段階法).

MetDC 酵素量 : 0.34 units/1 反応系. バッファー : 100 mM KPB (pH 6.6), 40 μ M PLP.

基質 : L-Met (0.25-15 mM). MetDC 反応温度・反応時間 : 55°C, 5 min. 呈色酵素の
反応温度・反応時間 : 37°C, 60 min.

950 μ l 100 mM KPB (pH 6.6)
40 μ M PLP
0.25-15 mM L-メチオニン

- ・プレインキュベート 55°C, 5 min
- ・MetDC 添加 50 μ l
- ・インキュベート 55°C, 5 min
- ・反応停止 80°C, 5 min
- ・遠心分離

- ・MetDC反応液 上清採取
- ・混合試薬 添加 130 μ l
 - 50 mM フェノール 43 μ l
 - 15 mM 4-アミノアンチピリン 43 μ l
 - 300 mU/ml ペルオキシダーゼ 43 μ l
 - 14.3 mU/ml アミンオキシダーゼ 1 μ l
- ・インキュベート 37°C, 60 min
- ・呈色反応後, 505 nmにおける吸光度を測定
- ・L-メチオニン量の算出

次に、反応緩衝液、反応 pH、MetDC 酵素量の検討を行い、至適化を行った (Fig. 37)。その結果、反応緩衝液、反応 pH を Tris-HCl (pH 8) とした。MetDC の L-Met 定量範囲を拡大し、また、本定量法で定量できる L-Met 濃度の検出上限および検出下限を決定するため、過剰量の MetDC を加えたところ、L-Met 定量範囲の上限はおおむね 500 μ M であることがわかった。そこで、L-Met を十分に分解できる、かつ、本定量法を用いて吸光度の値が安定して得られる濃度を 500 μ M の半分の 250 μ M と見なして、その濃度の L-Met を分解するのに必要な最小の MetDC 量を調べた。その結果、1 ml の 1 反応系あたり 0.70 および 1.1 units の MetDC を添加することで、L-Met を最大限検出できることがわかった (Fig. 37)。よって、MetDC の至適化酵素量を 0.70 units と決定した。

酵素量を至適化した MetDC を用いて、改めて、L-Met の定量可能範囲を 0.25-500 μ M の L-Met を用いて試験した結果、2 段階法において、L-Met を 1-500 μ M の範囲で定量できた (Fig. 38)。さらに、1 段階法の検討、MetDC 反応および呈色反応を同時に行う検討を行った。試薬の種類および量は 2 段階法と同様であるが、添加する順番やタイミングを変更した。まず、基質溶液に呈色試薬を混合し、37°C に保温した分光光度計で経時的に吸光度をモニタリングした。その結果、L-Met の定量所要時間は 2 段階法 (1-500 μ M) で 90 分であったが、1 段階法で約 10 分 (650 秒) に短縮できた (Fig. 39)。L-Met 定量範囲は、血しょう中の L-Met 濃度をカバーする 1-50 μ M であった。

本研究で確立した MetDC による L-Met の酵素的定量法の一覧を示した (Table 16)。

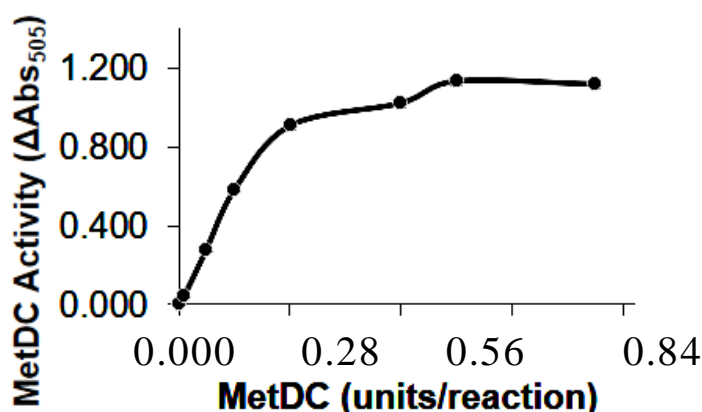


Fig. 37. L-Met 定量における 1 反応系あたりの MetDC の酵素量の至適化 (2 段階法). L-Met : 250 μ M. バッファー : 100 mM Tris 緩衝液 (pH 8), 1 mM PLP. MetDC 反応 37°C, 30 min. 各試験区における実験は、3 回繰り返して行った。

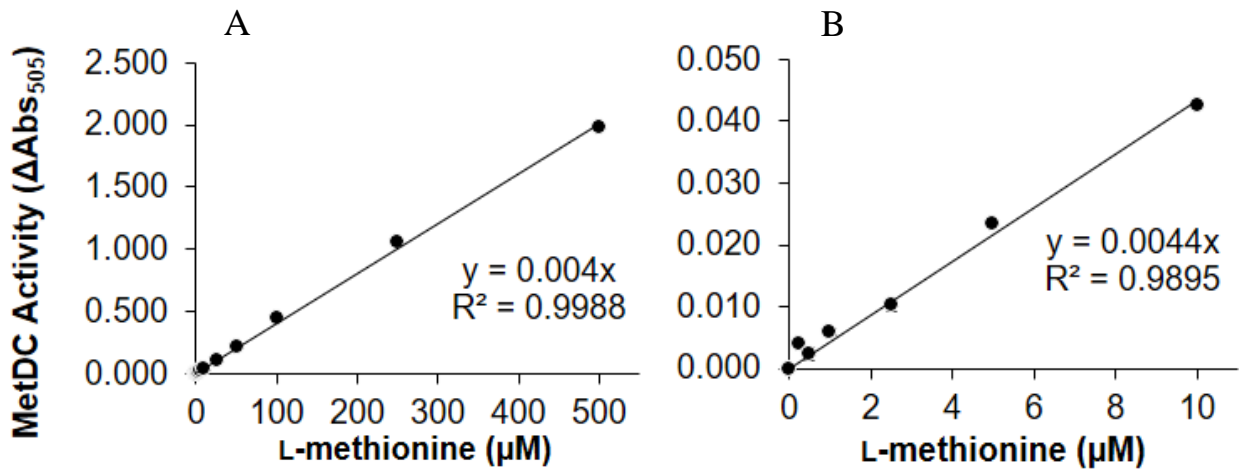


Fig. 38. L-Met 定量における至適バッファーおよび至適化酵素量条件下での, MetDC による L-Met の酵素的定量法 (2 段階法). (A) L-Met 濃度範囲 0-500 μM における検量線. (B) L-Met 濃度範囲 0-10 μM における検量線. MetDC 量: 1 反応系あたり 0.70 units. バッファー: 100 mM Tris 緩衝液 (pH 8), 1 mM PLP. MetDC 反応 37°C, 30 min. 各試験区における実験は, 3 回繰り返して行った. L-Met 定量の手順については, 次ページの Scheme 7 を参照のこと.

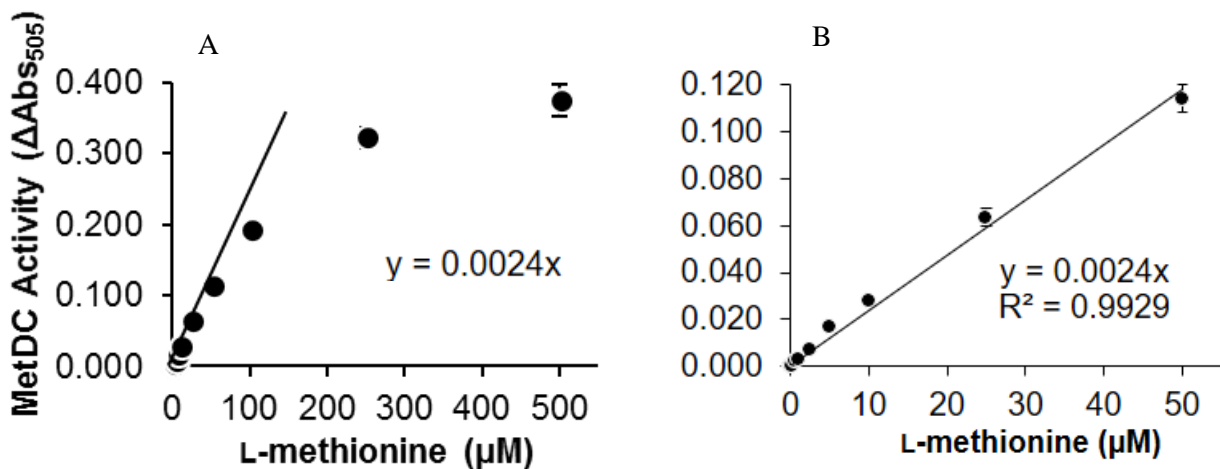
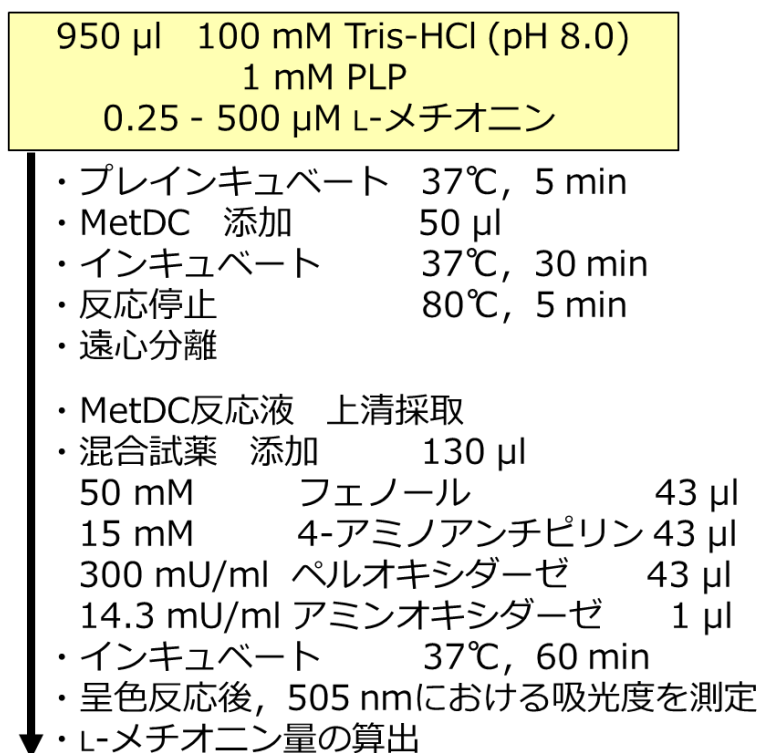


Fig. 39. L-Met 定量における至適バッファーおよび至適化酵素量条件下での, MetDC による L-Met の酵素的定量法 (1 段階法). (A) L-Met 濃度範囲 0-500 μM における検量線. (B) L-Met 濃度範囲 0-50 μM における検量線. MetDC 量: 1 反応系あたり 0.70 units. バッファー: 100 mM Tris 緩衝液 (pH 8), 1 mM PLP. MetDC 反応 37°C, 650 sec. 各試験区における実験は, 3 回繰り返して行った. L-Met 定量の手順については, 次ページの Scheme 8 を参照のこと.

Scheme 7. MetDC による L-Met の酵素的定量法 (2 段階法).

MetDC 酵素量 : 0.70 units/反応系. バッファー : 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8), 1 mM PLP. 基質 : L-Met (0, 0.25, 0.50, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 25, 50, 100, 250, 500 μ M).
MetDC 反応温度・反応時間 : 37°C, 30 min. 呈色酵素の反応温度・反応時間 : 37°C, 60 min.



Scheme 8. MetDC による L-Met の酵素的定量法 (1 段階法).

MetDC 酵素量 : 0.70 units/反応系. バッファー : 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8), 1 mM

PLP. 基質 : L-Met (0, 0.25, 0.50, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 25, 50, 100, 250, 500 μ M).

MetDC 反応・呈色酵素の反応温度・反応時間 : 37°C, 600 sec あるいは 650 sec.

950 μ l 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)		
1 mM PLP		
0.25 - 500 μ M L-メチオニン		
130 μ l 混合試薬		
50 mM	フェノール	43 μ l
15 mM	4-アミノアンチピリン	43 μ l
300 mU/ml	ペルオキシダーゼ	43 μ l
14.3 mU/ml	アミノキシダーゼ	1 μ l

- プレインキュベート 37°C, 5 min
- セルと共に 37°C に保温した分光光度計内のセルに溶液を移す
- MetDC 添加 50 μ l
(ブランクは, 同容量のバッファーを添加)
- 添加直後, 速やかに『オートゼロ』『スキャン開始』
呈色反応中の 505 nm における吸光度の変化を経時的にスキャンする
- 開始 0 sec から一貫した直線性を保っている,
最大のインキュベート時間 (600 sec あるいは 650 sec) における
吸光度変化の値を使用して, 検量線を作成する

Table 16. 本研究で確立した MetDC による L-Met の酵素的定量法の反応条件と L-Met の定量可能範囲.

	2段階法		1段階法
	KPB pH 6.6	Tris-HCl pH 8.0	Tris-HCl pH 8.0
MetDC 反応	55°C, 5 min	37°C, 30 min	37°C, 10 min
呈色反応	37°C, 60 min	37°C, 60 min	
L-Met 定量範囲	0.25 – 7.5 mM	1 – 500 μ M	1 – 50 μ M

4-3-2 ヒト血清, ヒト血しょうサンプル中の L-メチオニンの酵素的定量

1 段階法を用いて, L-Met の酵素的定量試験を行った (Scheme 8). 実験の結果, 血しょう中の L-Met は検出感度および検出精度が低く, L-Met の定量には至らなかった. しかし, 血清については 10% 血清サンプルを用いたとき, LC/MS の実測値から算出される L-Met 濃度と, MetDC の酵素的定量法で定量された L-Met 濃度がほぼ一致した (Table 17). ただし, 検量線のばらつきが大きく, 吸光度の値が検出限界に近かった. また, それより, 低濃度の血清サンプル中の L-Met 濃度を定量することはできなかった.

今後は, 血清中の検出精度を高め, 血しょう中の検出感度を高めるため, 呈色試薬の最適化が必要であると考え. 例えば, 呈色試薬の濃度を上昇させ, 微量な 3-メチルチオプロピルアミンを高感度で検出し, 検出精度を高める方法である.

Table 17. 本研究で確立した MetDC による L-Met の酵素的定量法 (1 段階法) を用いた血清中の L-Met の定量.

血清濃度	L-Met (LC/MS)	L-Met (MetDC)
100%	10.4 μM (実測値)	-
10%	1.0 μM	1.1 μM
7.5%	0.8 μM	1.1 μM
5.0%	0.5 μM	1.1 μM

ヒト血しょう存在下に添加した L-Met の添加回収試験を行った。5 あるいは 10%の血しょう含有バッファーにて、L-Met の添加回収試験を行ったところ、5-50 μM の範囲で、添加した L-Met を正確に検出することができた (Fig. 40)。

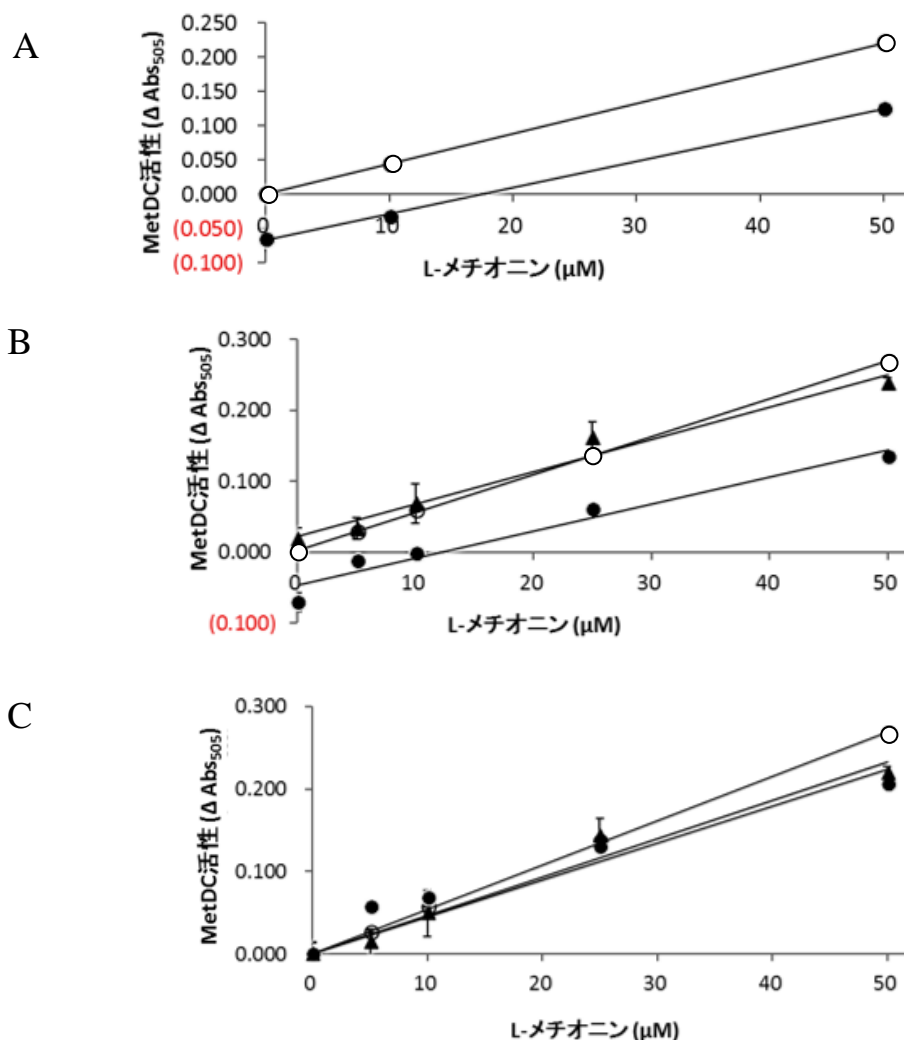


Fig. 40. L-Met 定量における至適バッファーおよび至適化酵素量条件下でのヒト血しょう存在下における L-Met 添加回収試験 (2 段階法).

(A) 5%血しょう含有 (市販血しょう LEVEL 3) バッファーでの L-Met 添加回収試験 [○血しょうなし, ●5%血しょう含有]. (B) 10%血しょう含有 (ヤマサ検体サンプル I : GLO431395 あるいは II : NGO315379) バッファーでの L-Met 添加回収試験 (測定値) [○血しょうなし, ●10%血しょう含有 (I), ▲10%血しょう含有 (II)]. (C) は (B) の y 切片を 0 にするように、測定値全体をタテ方向に平行移動したもの. MetDC 量 : 1 反応系あたり 0.70 units. バッファー : 100 mM Tris 緩衝液 (pH 8), 1 mM PLP. MetDC 反応 37°C, 30 min.

4-3-3 呈色用混合試薬の冷蔵保存性の検討

MetDC を L-Met 定量用キットとして利用する場合、定量に用いる試薬類は冷蔵保存下における長期の保存性が求められる。MetDC およびフェノール以外の呈色用混合試薬の 4°C 保存下での保存性について調べた。

その結果、8 日目、24 日目の呈色用混合試薬は、当日調製のものと比較して、L-Met の検出性に大きな違いはみられなかった (Fig. 41)。しかし、当日調製に対する 60 日目の呈色用混合試薬を用いたときの L-Met の検出性は、70% 程度に低下した。よって、呈色用混合試薬の動作保証期間は 1 ヶ月程度であると考えられる。

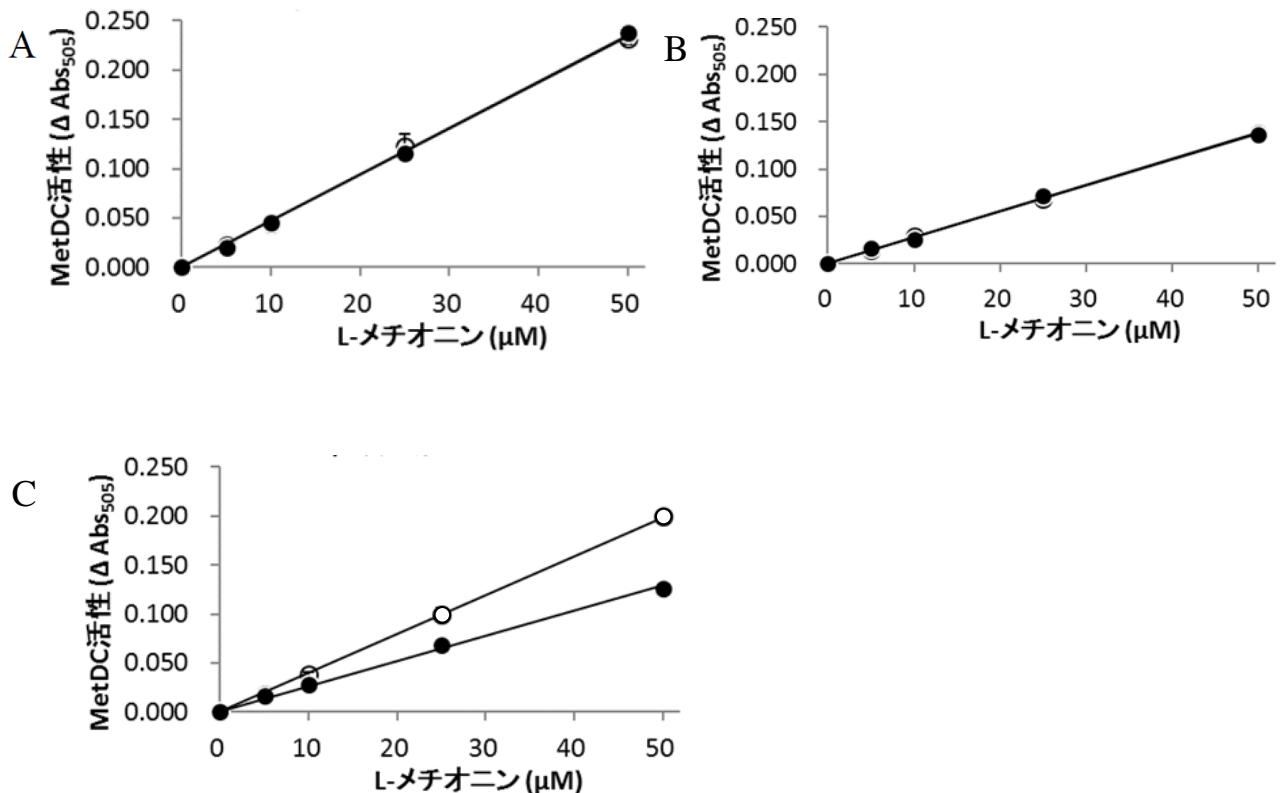


Fig. 41. L-Met 定量における混合試薬の冷蔵保存性の検討 (2 段階法)。

(A) 8 日間 (MetDC : 0.34 units/反応系) [○コントロール, ●8 日目], (B) 24 日間 (MetDC : 0.20 units/反応系) [○コントロール, ●24 日目], (C) 60 日間 (MetDC : 0.34 units/反応系) [○コントロール, ●60 日目]. 計 87 μl の呈色用混合試薬 (15 mM 4-アミノアンチピリン 43 μl, 300 mU/ml ペルオキシダーゼ 43 μl, 14.3 mU/ml アミノオキシダーゼ 1 μl) を作製後、上記の期間で 4°C 保存し、MetDC による L-Met の定量性を調べた。試験当日、フェノールを添加し呈色用混合試薬を完成させた。バッファー : 100 mM Tris 緩衝液 (pH 8), 40 μM PLP. MetDC 反応 37°C, 30 min.

4-3-4 L-メチオニンの完全分解条件の検討およびL-メチオニン, L-ホモシステイン混合液からのアミノ酸の分別的定量法の検討

MetDC および L-メチオニン γ -リアーゼ (MGL) を用いて, L-Met, L-Hcy 混合液からのアミノ酸の分別的定量を行いたいと考えている. つまり, L-Met, L-Hcy 混合液から MetDC により L-Met を完全分解し, 後に MGL により L-Hcy を定量する方法を開発したい. そこで, L-Met の完全分解条件を検討するため, 次の実験を行った.

実験の結果, 1 反応系あたり 24 μ g (1.4 units) の MetDC を用いて, 37°C で反応させた結果, 反応液 1 ml に含まれる 100 nmol の L-Met を 10 分以内に完全分解できることがわかった (Fig. 42). この反応条件を用いて, L-Met, L-Hcy 混合液からのアミノ酸の分別的定量条件の検討を行おうと考えている.

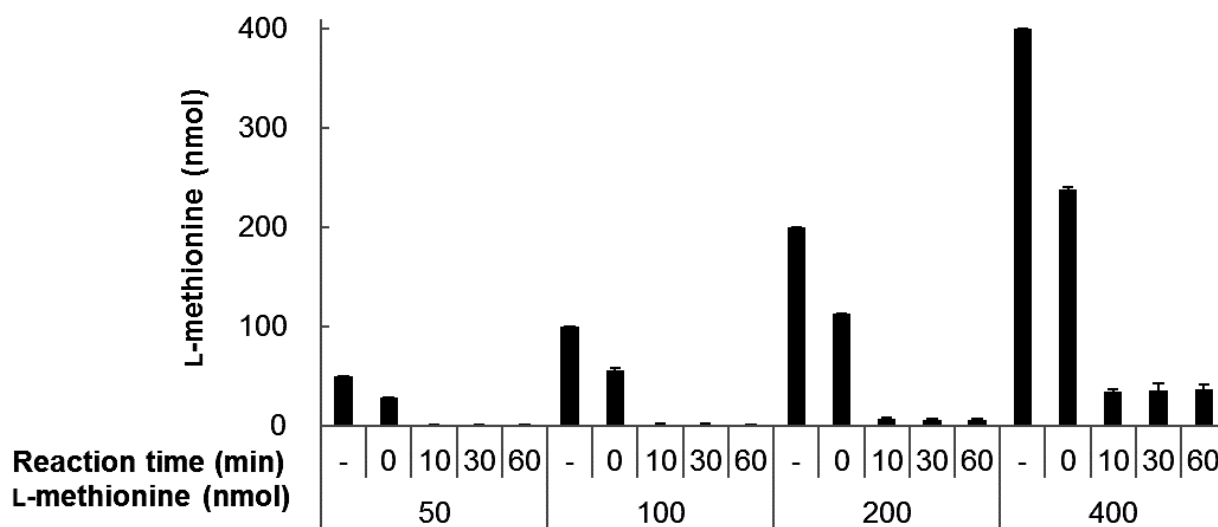


Fig. 42. MetDC による L-Met の完全分解条件に及ぼす酵素量, 基質量, 反応 pH, 反応時間の影響の評価. 酵素量: 1 反応系あたり 1.4 units (24 μ g). 基質量: 50, 100, 200, 400 nmol L-Met. 反応液量: 1 ml. 反応バッファー組成・pH: 100 mM Tris 緩衝液 (pH 8), 1 mM PLP. 反応時間: 0, 10, 30, 60 min. MetDC の L-Met 分解活性は 4-アミノアンチピリン法により定量した.

次に、L-Hcy 存在下における L-Met の検出性を向上させるような MetDC の反応条件を検討するため、次の実験を行った。

MetDC がヒト血しょう中に相当する濃度の L-Met を定量できることがわかった (Table 17, Fig. 39)。一方で、L-Met のアナログである L-Hcy の存在下では、KPB (pH 7) 条件下で、MetDC による L-Met の検出性が低下することがわかった (Fig. 43-A)。これは、L-Hcy が MetDC の L-Met に対する酵素反応を阻害しているからだと考える。MetDC が活性を有する pH 範囲は弱酸性から中性であるが、L-Hcy のチオール基の pK_a を考慮して、pH を変更することで解決を試みた。Tris 緩衝液 (pH 8) (Fig. 43-B)、ホウ酸カリウム緩衝液 (pH 9) (Fig. 43-C) を検討した。なお、pH 10 では MetDC の L-Met 活性はみられなかった。その結果、Tris 緩衝液 (pH 8)、ホウ酸カリウム緩衝液 (pH 9) では、KPB (pH 7) と比較して、L-Hcy の存在下での、MetDC による L-Met の検出性の低下が抑えられた。

広域緩衝液 Britton-Robinson buffer を用いて、pH 6, 7, 8, 9 における MetDC の L-Met および L-Hcy の反応性を調べた。L-Hcy の分解活性は、MGL を用いて調べた (Fig. 44)。その結果、pH 7 と比べて pH 8 で L-Hcy の分解活性が減少した。このことから、pH が 7 から 8 にシフトしたことにより、L-Hcy の一部がチオール (-SH) からプロトンが解離して、チオレートアニオン (-S⁻) を生じることにより、MetDC と L-Hcy の相互作用が抑えられていると考える。pH が影響を及ぼすことは、pH 7 および 8 の Tris 緩衝液を用いた実験からも支持される (Fig. 45)。

メチオニンの側鎖の末端は、非解離性で疎水性のメチルチオ基 (-S-CH₃) である。MetDC の基質特異性試験の結果より (Table 12)、MetDC は疎水性アミノ酸に高い基質特異性をもつことがわかる。これらのことを総合すると、チオレートアニオン (-S⁻) を有する状態の L-Hcy は、MetDC の活性部位を妨げないことが推測される。L-Hcy の脱炭酸生成物である 3-アミノ-1-プロパンチオールが、アミノキシダーゼの阻害剤となり、アミノキシダーゼの反応を抑えている可能性があるため、その点について今後、検討する必要がある。

また、Tris 緩衝液 (pH 8) は、KPB (pH 7) やホウ酸カリウム緩衝液 (pH 9) よりも、検出値の値自体が高かった (Fig. 43)。この理由として、呈色反応に用いているペルオキシダーゼの熱安定性が、高濃度 (200 mM) の KPB 下では同濃度の Tris 緩衝液に劣るという報告がある⁶²⁾。Tris 緩衝液では、低濃度 (10 mM) と高濃度 (200 mM) に大きな違いはないが、KPB では低濃度 (10 mM)

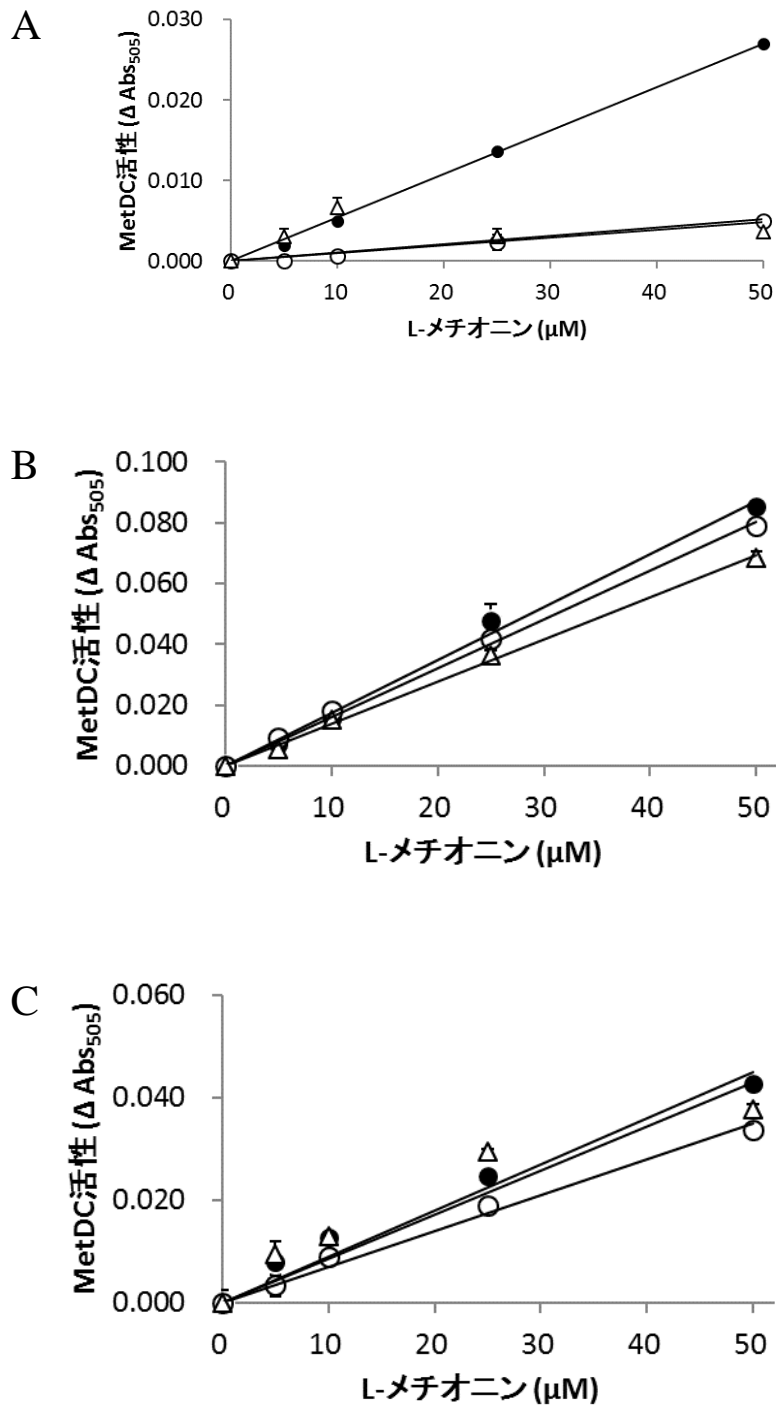


Fig. 43. L-Hcy 添加時における各種緩衝液における MetDC の L-Met の検量線。
 (A) 100 mM KPB (pH 7) (●0, ○10, △50 μM L-Hcy), (B) 100 mM Tris 緩衝液 (pH 8) (●0, ○15, △100 μM L-Hcy), (C) 100 mM ホウ酸カリウム緩衝液 (pH 9) (●0, ○15, △100 μM L-Hcy). 使用した MetDC 量は 1 反応系あたり 0.34 units であった. 各試験は 3 回行った.

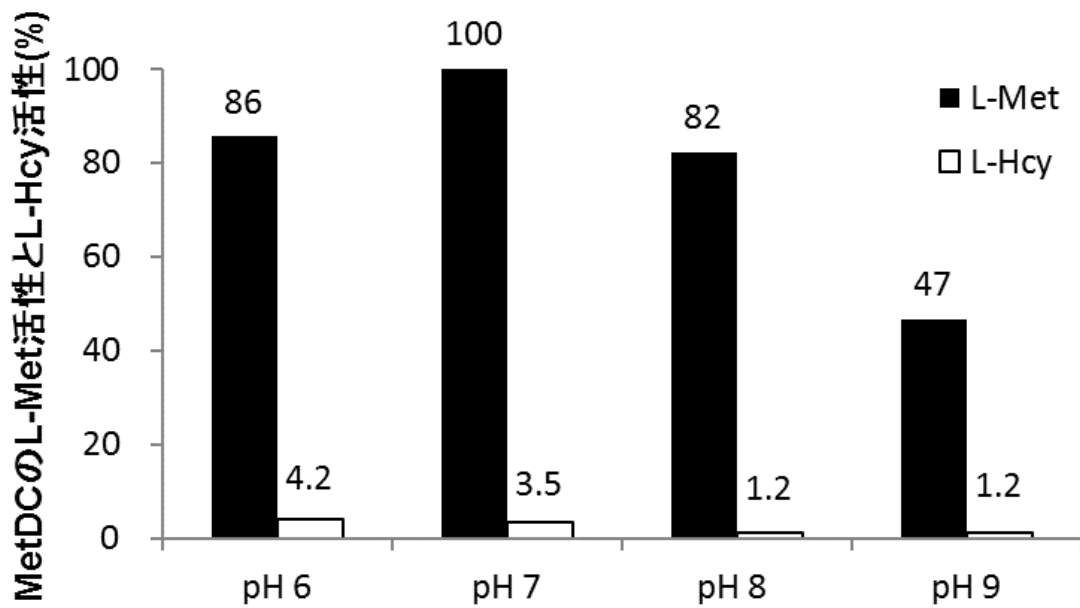


Fig. 44. 各 pH における MetDC の L-Met 分解活性と L-Hcy 分解活性. pH 7 における MetDC の L-Met 活性を 100% としたときの相対活性で表している. バッファーは, 広域緩衝液 Britton-Robinson buffer (pH 6, 7, 8, 9), 40 μ M PLP を用いた. MetDC の L-Met 活性は, アミノオキシダーゼ, 4-アミノアンチピリン法で定量し, L-Hcy 活性は MetDC 処理および未処理サンプルを, MGL とメチレンブルー法で定量した. MetDC 反応 55°C, 10 min. L-Met 量: 10 mM, L-Hcy 量: 10 mM (DL-Hcy にて 20 mM 使用). MetDC 反応 37°C, 30 min. MetDC 量は 1 反応系あたり 0.34 units を用いた. 各試験は 3 回行った.

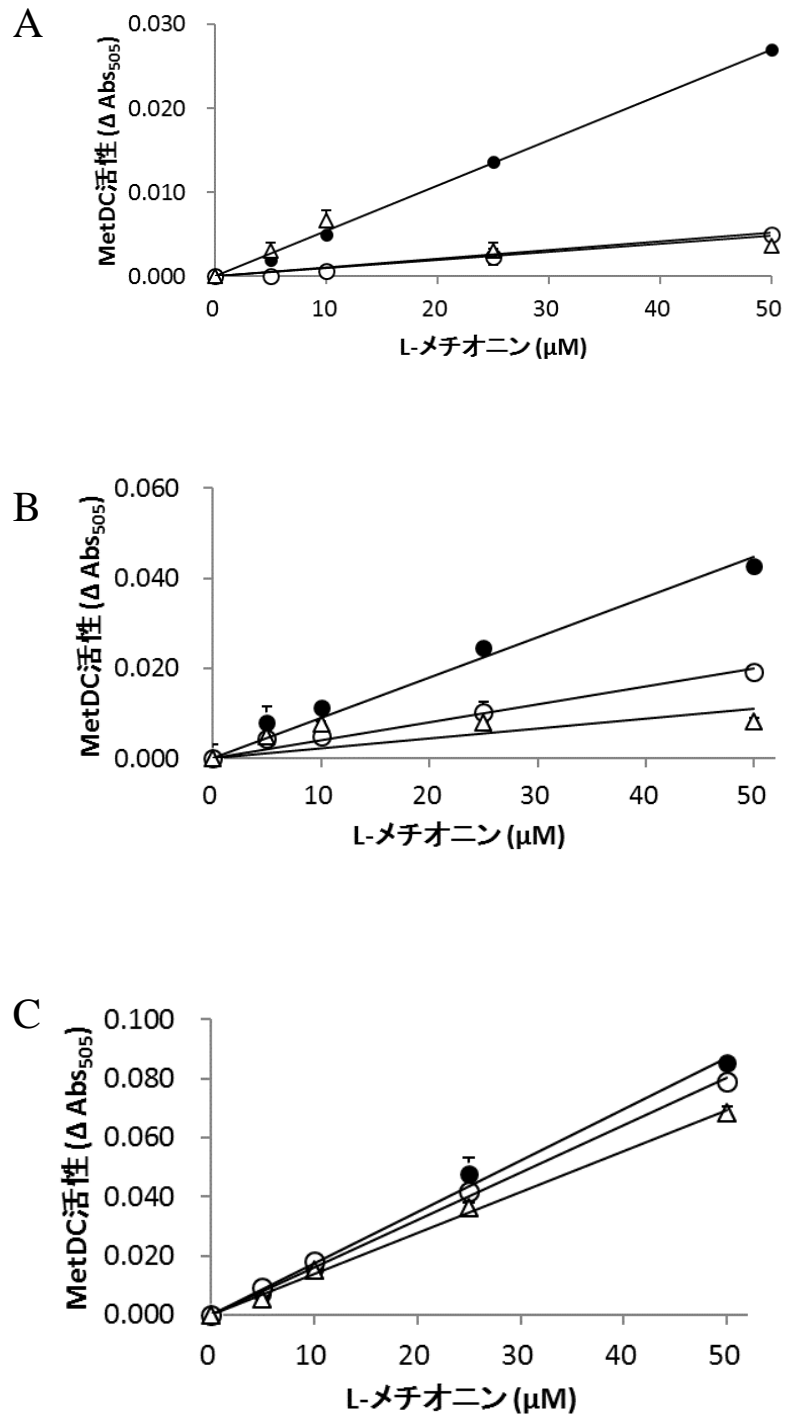


Fig. 45. L-Hcy 添加時における MetDC の L-Met の定量に及ぼす pH の影響.
 (A) 100 mM KPB (pH 7) (●0, ○10, △50 μM L-Hcy), (B) 100 mM Tris 緩衝液 (pH 7) (●0, ○15, △100 μM L-Hcy), (C) 100 mM Tris 緩衝液 (pH 8) (●0, ○15, △100 μM L-Hcy). MetDC 量は 1 反応系あたり 0.34 units を用いた. 各試験は 3 回行った.

での酵素の半減期が高濃度（200 mM）のときの 2.6 倍の長さとなった。酵素の立体構造の内部にあるトリプトファン残基は、タンパク質の変性に伴って外部に露出する。トリプトファン残基を、ある波長の光で励起させた後、放出される蛍光を測定することによって、蛍光の強弱で変性の程度を知ることができる。その結果、高濃度の KPB のほうが低濃度よりも、低い温度で変性がはじまった。これは、低濃度の KPB が酵素をよりコンパクトな状態にする一方で、高濃度でより乱雑にすることでトリプトファン残基を含む微小環境を変化させていることに起因する^{63,64}。

結果的に、高濃度のリン酸イオンがペルオキシダーゼを、安定な構造から可逆的な構造変化を経て、不可逆的な失活に導くことを促進していることがあげられる。低濃度の KPB に KCl を添加して行った実験では、ペルオキシダーゼの熱安定性に影響を与えなかった。つまり、一価の金属イオンが影響しているというよりも、やはり、リン酸イオンがタンパク質の熱安定性に影響を与えている可能性が高い。

なお、本研究により、ホウ酸カリウム緩衝液を用いたときの方が、Tris 緩衝液よりも検出値自体が低かったことから、ホウ酸イオンもまた、リン酸イオンと同様にペルオキシダーゼの熱安定性に影響を与えていると考える。ペルオキシダーゼを用いた実験の多くは、KPB をはじめとするリン酸緩衝液を用いることが多い。これは、他の多くの酵素の使用時にもみられるように、生体内の環境を再現し、酵素の挙動を模倣するためだと考える。本試験の結果は、生体が作り出す体内環境が、生体により生産される酵素の最適な緩衝液ではないことを示すものであり、生化学的実験において、ある pH における異なる緩衝液での酵素活性の最適化を図るべきであることを示した。

今後は、L-Met の定量において、MetDC の酵素活性を保ちながら、L-Hcy の阻害を防ぐため、反応 pH を pH 8 とする。また、ペルオキシダーゼの熱安定性の向上のため、緩衝液をリン酸系緩衝液ではなく、Tris 緩衝液を使用する。それらに加えて、将来的には、KPB 濃度を現行の 100 mM から 10 mM までの範囲まで下げたときの、L-Met の定量性についての検討が必要になると考えている。

4-3-5 過酸化水素処理および加熱処理による L-ホモシステインの影響の除去と L-メチオニン検出精度の向上の検討

MetDC は、通常の条件、特に KPB をバッファーとした条件では、L-Met, L-Hcy 混合溶液中から L-Met を定量できない可能性が示された。過去の報告に、L-Met と L-Cys をカタラーゼ存在下かつ過酸化水素下によって定量的に酸化し、酵素の反応性の差を利用することで、L-Met を定量しようとした実験がある⁶⁵⁾。

本実験では、MetDC が L-Met, L-Hcy 混合溶液中から L-Met のみを再現性よく定量できるようにするために、基質に類似したアミノ酸である L-Hcy を完全に酸化して非ジスルフィド的酸化型 Hcy (たとえばホモシステイン酸)あるいはジスルフィド形成による二量体のホモシスチンとするような過酸化水素濃度を定めようとした。そして、過酸化水素による L-Hcy の酸化によって L-Met 検出性の向上ができるかどうかを調べた。

過酸化水素処理を行わないとき、L-Met の検出値が低く、検量性の直線性が低かった (Fig. 46)。しかし、2 および 10 mM の過酸化水素処理により、濃度依存的に L-Met の検出値が改善し、検量性の直線性も高くなった。結果的に、10 mM 過酸化水素処理により、L-Hcy 未添加時と同じ程度の L-Met の検出量がみられた。したがって、L-Hcy の完全酸化に必要な過酸化水素濃度は、2-10 mM にあると考えられた。

本法の興味深い点として、過酸化水素が L-Hcy を酸化した場合、L-ホモシステイン酸あるいはホモシスチンのどちらが生じるのか、ということである。なぜなら、MGL は L-ホモシステイン酸およびホモシスチンの基質になった場合、MBTH 法では α -ケト酸を検出するので、原理的には双方の基質が検出・定量される可能性がある。一方、メチレンブルー法では H_2S を検出するので、L-ホモシステイン酸は L-Hcy と同様にチオール基を有するので検出される可能性があるが、ホモシスチンはジスルフィドを形成しているため検出されない可能性がある。後者の場合、MetDC により L-Met を完全分解した後に、L-Hcy を MGL により定量できる可能性が高い。

そのため今後、HPLC あるいは薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて、L-Hcy, 過酸化水素処理をした L-Hcy, L-ホモシステイン酸, ホモシスチンの計 4 サンプルを分析し、過酸化水素の酸化作用によって生じた酸化型 L-Hcy がどのような形態をしているのかを調べる必要がある。

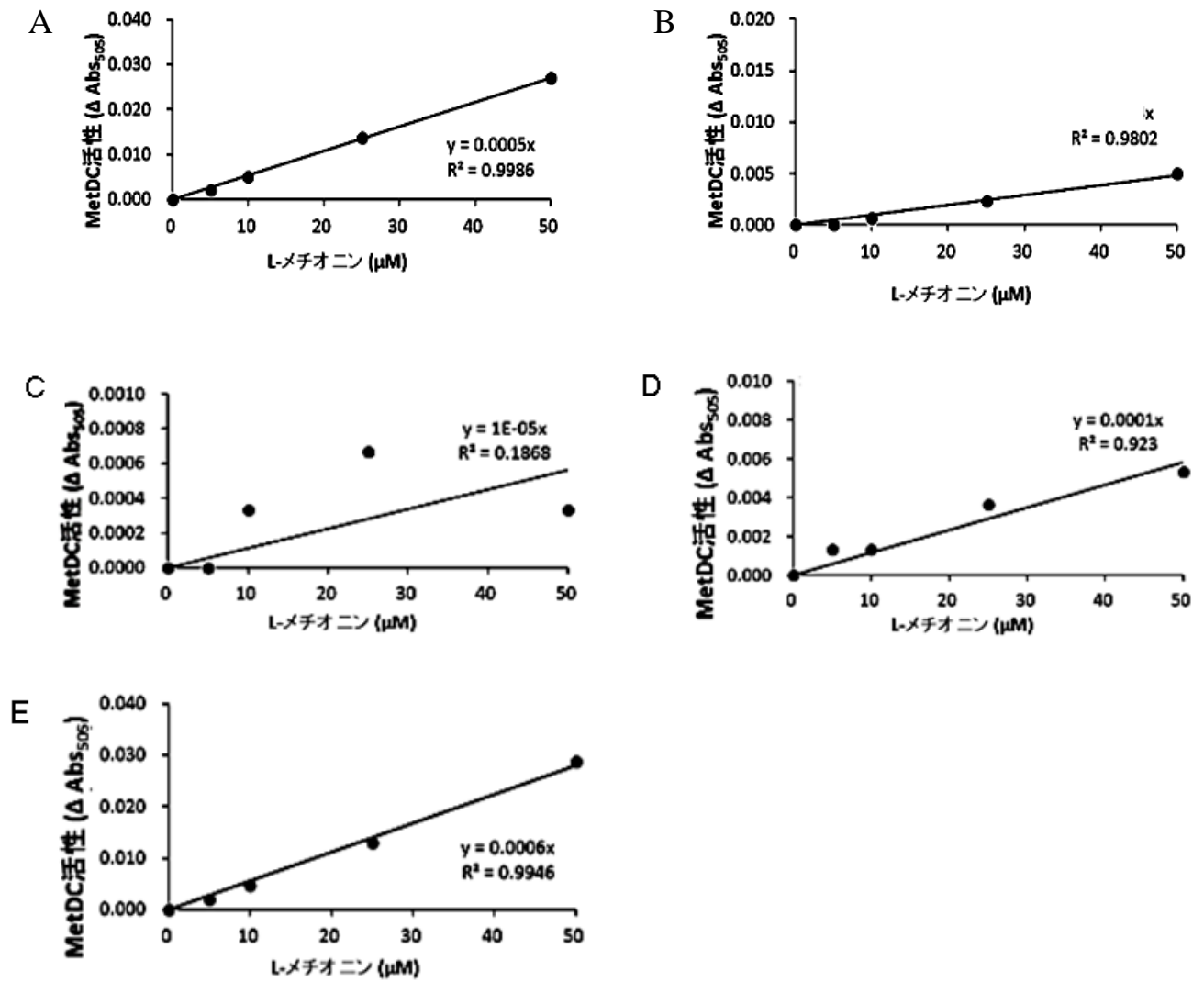


Fig. 46. MetDC の L-Met 検出性に及ぼす過酸化水素による L-Hcy 酸化条件の検討.
 バッファー : KPB (pH 7) . (A) 0 μM L-Hcy, (B) 10 μM L-Hcy, (C) 50 μM
 L-Hcy, (D) 50 μM L-Hcy, 2 mM H_2O_2 , (E) 50 μM L-Hcy, 10 mM H_2O_2 . MetDC
 反応 37°C, 30 min. MetDC 量は 1 反応系あたり 0.34 units を用いた.

本法のデメリットとして、それほど煩雑ではないが、過酸化水素処理やカタラーゼ処理で時間が40分程度多くかかってしまう点がある。また、もし過酸化水素が分解しきれなかった場合、L-Met 検出量として値を上昇させてしまう可能性が考えられる。そのため、この方法の用いる際には、慎重な検討を要する。

処理時間が増大してしまう問題に対する打開策として、現在、「加熱」を検討している。ある実験では、L-Hcy 基質溶液の MetDC 反応後、加熱により MetDC を失活させ、冷却後、MGL により残存した L-Hcy を定量しようとした。その結果、検出値がほぼ 0 となり、MGL の L-Hcy 分解活性が検出されなくなった（データ示さず）。これは、MetDC により L-Met の完全分解（Fig. 42）を行った後に、L-Met, L-Hcy の双方に分解活性をもつ MGL により残存した L-Hcy を定量しようと試みた実験であった。自然に考えれば MetDC が L-Hcy の分解活性を有しているのだろう。しかし、MetDC の L-Hcy 分解活性はほとんど検出されなかった（Fig. 44）。

この結果から、L-Hcy は加熱に弱く、加熱により MGL が触媒できない状態となることが推測された。このとき、同時に MetDC の活性中心に L-Hcy が入ることを防ぐのだと考える。ところが、今回の実験においては、加熱操作により L-Hcy を MetDC が触媒できない状態にしたとはいえなかった（Fig. 46-C）。この理由として、バッファー組成と pH が異なっていたことが挙げられる。

今回は KPB (pH 7) であり、別の検討では Tris 緩衝液 (pH 8) である。特に pH について、チオール基の pK_a が 8.4 (L-Cys) であることから、Tris 緩衝液 (pH 8) 環境下では、L-Hcy の一部はチオール (-SH) からプロトンが解離して、チオレートアニオン ($-S^-$) を生じていると考える。メチオニンの側鎖の末端は、非解離性で疎水性のメチルチオ基 (-S-CH₃) である。MetDC の基質特異性の結果より (Table 12), MetDC は疎水性アミノ酸に高い基質特異性をもつことがわかる。これらのことを総合すると、チオレートアニオン ($-S^-$) を有する状態の L-Hcy は、MetDC の活性部位を妨げないことが推測される。また、加熱による酸化耐性も、pH 7 よりも pH 8 の方が低いと考えられる。

今後、MetDC により L-Met の定量と完全分解を行った後に、L-Met, L-Hcy の双方に分解活性をもつ MGL により L-Hcy を定量するためには、KPB (pH 7) ではなく、Tris 緩衝液 (pH 8) を用いるべきであることがわかった。また、MetDC 反応後に、一部酸化した L-Hcy を還元するために、酵

素反応時に、ジチオスレイトール (DTT) などの還元剤の使用を検討する。

DTT の濃度検討の一環として、DTT 存在下における L-Met の検出感度について調べた。その結果、DTT の添加により、組換え MetDC による L-Met の検出感度は著しく低下し、終濃度 1 mM DTT を定量試薬に用いた場合、全く検出されなくなった (データ示さず)。この理由は定かではないが、DTT のチオール基の酸化により、呈色に必要な H_2O_2 が還元されて消費され、最終的に L-Met の分解により生じた H_2O_2 が検出されなくなったためだと推測する。

よって、L-Met, L-Hcy の分別的定量を行うときは、以下のような実験スキームで行い、加熱条件や還元剤の濃度検討を行う必要があることが示された。1) Tris 緩衝液 (pH 8) における加熱により、L-Met を酸化させずに L-Hcy を酸化させる。2) MetDC により、L-Met を完全分解して L-Met を定量する。3) MetDC 反応液の一部は L-Hcy の定量のために用い、DTT 等の還元剤を添加し、L-Hcy を還元した後、MGL により定量する。

本章では、L-Met の酵素的定量法として、L-メチオニン γ -リアーゼ (MGL)⁵⁸⁾ や変異型フェニルアラニン脱水素酵素 (PheDH)⁵⁹⁾、アデノシルメチオニンシンターゼ (AdoMetS)⁶⁰⁾ が研究されてきた。MetDC は、MGL と比べ直線性の高い検量線が得られ、変異型 PheDH と比べロイシン、バリンのような疎水性アミノ酸の影響を受けづらいという長所がある。MetDC による L-Met の定量性について検討したところ、本研究で開発した MetDC/アミノキシダーゼ/4-アミノアンチピリン法 (2 段階法) により、L-Met を最大 1-500 μ M の範囲で定量できる方法を確立した。2 段階法は、変異型 PheDH に匹敵する定量性を示した。また、1 段階法の検討により、血しょう中の L-Met 量をカバーできる 1-50 μ M の L-Met の定量が可能であることがわかり、定量所要時間を 90 分から約 10 分 (650 秒) まで短縮することができた。

AdoMetS は 10 分で 0-100 μ M L-Met を定量することができるが、MetDC を用いた L-Met の定量を、同程度の所要時間で行うことができるようになった。今後、L-Met 定量可能範囲の拡大のためさらなる検討が必要である。さらに、5 あるいは 10% の血しょう含有バッファーにて、L-Met の添加回収試験を行ったところ、5-50 μ M の範囲で、添加した L-Met を正確に検出した。

今後は、血しょうあるいは血清中の L-Met を正確に、広い定量範囲で、短時間で検出するため、1 段階法にて、詳細な反応条件を検討する必要がある。また、HPLC 法との L-Met 定量性の比較により、MetDC による酵素的定量法の信頼性について検討する必要がある。

第5章 総括および今後の展望

L-アミノ酸脱炭酸酵素 (EC 4.1.1) は, L-アミノ酸に作用して アミン と CO_2 を生成する反応を触媒する酵素であり, 微生物, 動物, 植物に幅広く分布している. 20 種類の標準アミノ酸に対しては, 主に L-ヒスチジン脱炭酸酵素 (HisDC), L-グルタミン酸脱炭酸酵素 (GluDC), L-バリン脱炭酸酵素 (ValDC), L-リシン脱炭酸酵素および L-チロシン脱炭酸酵素等が知られている. L-アミノ酸脱炭酸酵素の役割は諸説あるが, 生体アミンの生産や生育環境の pH の低下を防止する役割も考えられている. 特に, HisDC はヒスタミン, GluDC は γ -アミノ酪酸 (GABA) を産生し, これらの生体アミンは体内で神経伝達物質やその前駆体として働くとされている.

L-メチオニン脱炭酸酵素 (L-methionine decarboxylase, MetDC) (EC 4.1.1.57) は, L-メチオニンの脱炭酸を触媒して, 3-メチルチオプロピルアミンおよび CO_2 を生じる反応を触媒する. 1960 年代に放線菌 *Streptomyces* sp. で発見され, シダ植物 *Dryopteris filix-mas* (1970 年代) や海産渦鞭毛藻 *Cryptocodinium cohnii* (1990 年代) で確認された. ただし, 触媒反応や補酵素, その他の性質検討に関する従来の研究は, 生菌や乾燥菌体, 部分精製酵素を用いた検討に留まっていた.

3 種の MetDC 生産生物において, L-メチオニンへの基質特異性が比較的高く, 酵素的定量法への利用が期待できると考えられたため, 放線菌 *Streptomyces* sp. 590 由来 MetDC を本研究で対象とした. 代表的な抗腫瘍酵素 L-メチオニン γ -リアーゼ (MGL) と同様に, MetDC はメチオニン飢餓による抗腫瘍性をもつことも推測された. MetDC は臨床診断への利用性が高いと考えられたが, 酵素発現量が少なく, 酵素精製が難しいという問題点があり, 100 L スケールの大量培養および多段階のカラムクロマトグラフィーを用いても, 均一な精製酵素を得ることができなかった. そのため, 均一酵素を用いた機能解析や, 臨床診断への活用は困難であった.

本研究では, *Streptomyces* sp. 590 由来 MetDC を用いて, 1) 遺伝子クローニング, 2) 組換え酵素の生産と均一精製, 3) 均一精製酵素を用いた機能解析と抗腫瘍性の検討, 4) L-メチオニンの酵素的定量法の開発を行った.

1. L-メチオニン脱炭酸酵素遺伝子のクローニングおよび配列解析

ネイティブ MetDC を、ジャーファーメンターを用いた大量培養で得られた菌体から、カラムクロマトグラフィーを含む 4 段階の精製工程によって、部分精製した。従来 MetDC の活性測定には水銀を使用するワルブルグ検圧計による危険で煩雑な定量法が用いられてきた。本研究では、MetDC の新規酵素活性測定法として、酵素反応で生成するアミンを、アミノキシダーゼを用いて測定する酵素アッセイ法を考案し使用した。酵素活性測定法の改善により、精製及び性質検討を迅速に行えるようになった。

MetDC が腫瘍細胞に対する生育抑制作用をもつかどうかを調べた。部分精製酵素は、2 種の腫瘍細胞（HeLa ヒト子宮頸ガン細胞、RERF-LC-AI ヒト肺ガン細胞）に生育抑制作用を示した。MGL は同じ L-メチオニンを分解する酵素であるが、転移反応など複数の反応を触媒する。他方 MetDC は脱炭酸反応のみ確認されているため、制御しやすい抗腫瘍酵素として今後の利用が期待できる。

酵素発現量の増加と酵素精製の簡便化を図るため、MetDC 遺伝子 (*mdc*) の同定、クローニング、配列解析を行った。部分精製酵素の N 末端の 16 アミノ酸残基を決定した。この配列と相同性のあるタンパク質はデータベース上ではみられなかったため、MetDC は新規なアミノ酸配列を有することがわかった。*Streptomyces* sp. 590 のゲノム配列を次世代ゲノムシーケンサーにより解析した。部分精製酵素の N 末端配列を参照して、ゲノムのドラフト配列を検索し、*mdc* 遺伝子を同定した。*mdc* は、557 アミノ酸残基をコードする 1,674 bp からなる遺伝子であった。*mdc* の塩基配列および MetDC のアミノ酸配列は DDBJ データベース上で利用可能である (accession number: AB970471)。MetDC は、GluDC および *Streptomyces* 属菌由来の HisDC や ValDC と比較的高い相同性を示した (最大 48%)。また L-アミノ酸脱炭酸酵素 19 種の間で共通して保存されている残基を 10 か所特定した。

2. L-メチオニン脱炭酸酵素の大腸菌発現系構築による組換え酵素の生産と均一精製

取得した *mdc* 遺伝子を用いて MetDC の大腸菌異種発現系の構築による組換え酵素の生産および均一精製を行った。酵素タンパク質の C 末端にポリヒスチジン残基からなるアフィニティータグ His-Tag を融合した組換え酵素を発現させるプラスミド pET-28a ベクターを用いて、組換え MetDC

を *E. coli* BL21 (DE3) の菌体内で可溶的に異種発現させた。これにより、従来の 1/110 量の培養液から同量の酵素を取得可能となった。さらに、His-Tag の改良により、精製時の酵素回収量を 5.5 倍に増加させることに成功した。ネイティブ酵素を対象とした先行研究では均一精製は困難であったが、組換え酵素は最短 1 回のカラムクロマトグラフィーにより均一に精製することができた。高純度の酵素を短期間で大量に取得可能となったため、本酵素の機能解析と応用研究を容易に行えるようになった。

3. L-メチオニン脱炭酸酵素の機能解析および抗腫瘍性の検討

組換え MetDC を用いて、酵素化学的諸性質の検討を行った。ゲルろ過-HPLC により、組換え酵素の分子質量は約 110,000 Da, SDS-PAGE によりサブユニットは約 61,000 Da であったことから、MetDC は同一サブユニット 2 つからなるホモダイマーであることが分かった。酵素活性に及ぼす温度と pH の影響を調べたところ、最適温度は 45-55°C, 30°C 以下で熱安定性を示し、最適 pH は 6.6, pH 4.6-7.0 の範囲で pH 安定性を示した。これらの性質は放線菌から部分精製した酵素の性質とほぼ一致していた。基質特異性の検討の結果、L-メチオニンと L-ノルロイシンに対して高い活性を示し、S-メチル-L-システイン、L-ロイシン、DL-ノルバリンおよび S-エチル-L-システインに対してはほとんど活性を示さなかった。吸収スペクトル測定の結果、400 nm 付近にピリドキサール 5'-リン酸 (PLP) 酵素に特有の吸収が観察された。また、ヒドロキシルアミン処理により PLP に基づく吸収が消失し、活性も消失したが、PLP の再添加により比活性はほぼ 100% まで回復した。ペニシラミンなどの典型的な PLP 酵素阻害剤で活性が低下し、チオール基やイミダゾール基の阻害剤では活性は低下しなかった。高純度の組換え酵素を容易に取得できたことで、上記のような酵素化学的な知見の解明に寄与できた。

ネイティブ酵素で観察された腫瘍細胞に対する生育抑制作用について、組換え酵素を用いて検討した。その結果、MetDC の生育抑制作用は正常細胞 (NHDF-Neo 新生児正常ヒト皮膚繊維芽細胞) と比較して、腫瘍細胞 (A431 ヒト扁平上皮ガン細胞, MDA-MB-231 ヒト乳腺ガン細胞) に優先的に作用することを確認した。この結果は、MetDC によるがん細胞への生育抑制作用が、MGL と同様、細胞周辺の L-メチオニンの枯渇いわゆる「メチオニン飢餓」によるものであると考えられる。

4. L-メチオニン脱炭酸酵素を用いた L-メチオニンの酵素的定量法の開発

MetDC の臨床診断への活用のため、組換え MetDC を用いて L-メチオニンの酵素的定量法を検討した。

血中 L-メチオニン量の増加と、先天性メチオニン代謝異常症、若年性血栓症（心筋梗塞・脳梗塞）、中枢神経系症（けいれん、認知症）、水晶体の脱臼および骨粗鬆症に関連性があると考えられている。健常ヒト血しょう中 L-メチオニン濃度は 13.5-36.8 μM であり、高濃度では 1.5 mM から 20 mM にも達する。また、食品、医薬品の品質保持や安定供給に寄与すると考えられることから、低濃度から高濃度における L-メチオニンの迅速・簡便・正確な定量が求められている。

アミノ酸の定量法として、HPLC 法や酵素的定量法が知られている。HPLC 法は、高い精度と再現性で定量が可能である一方で、一度に一つのサンプルしか測定できず、高価な装置と高度な訓練を要する。また、有機溶媒による環境への影響も懸念される。それらの問題を解決するために近年、酵素的定量法によりアミノ酸を迅速・簡便で測定しようとする試みがなされている。酵素特有の基質特異性を生かした迅速で正確な定量が望まれる。

L-メチオニン酵素的定量法の酵素としては、当研究室で研究を行ってきた MGL をはじめ、変異型フェニルアラニン脱水素酵素（PheDH）やアデノシルメチオニンシンターゼ（AdoMetS）が用いられてきた。検討の結果 MetDC は、MGL と比べ直線性の高い検量線を得ることができ、変異型 PheDH と比べ L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシンなどの分岐鎖アミノ酸の影響を受けにくいということが判明した。

MetDC による L-メチオニンの定量性を検討した。MetDC の反応温度・反応時間・反応緩衝液・反応 pH・酵素量を、L-メチオニン定量のために最適化した。その結果、MetDC 活性測定法を応用した方法により、L-メチオニンを低濃度の 1-500 μM の範囲と、高濃度の 0.25-7.5 mM の範囲で正確に定量できた。この定量法は、変異型 PheDH を用いた方法と同程度の感度で L-メチオニンを定量することができた。

また、反応試薬を全て混合し MetDC 反応とアミノキシダーゼ反応、呈色反応を連鎖的に行う「1段階法」を検討した結果、血しょう中の L-メチオニン量に相当する 1-50 μM の L-メチオニ

ンを定量可能であった。また定量に要する時間を 90 分から 10 分に短縮することができた。さらに、5%あるいは10%の血しょう含有バッファーに対して、L-メチオニンを添加後に定量する実験を行ったところ、5-50 μM の範囲で、添加した L-メチオニンを正確に検出できた。

本研究で MetDC を用いた L-メチオニンの酵素的定量法を開発することができた。本研究は、血しょう中の L-メチオニンを迅速、簡便、正確、広範囲で検出する方法として、MetDC による L-メチオニンの酵素的定量法（1 段階法）の有用性を示すものである。

以上のように、本研究では MetDC の酵素機能を遺伝子及びタンパク質レベルで明らかにするとともに、本酵素の持つ機能を抗腫瘍性酵素や L-メチオニン定量用酵素として活用、実用化する基盤を確立した。

参考文献

1. 日本生化学会 『生化学実験講座11 アミノ酸代謝と生体アミン(上)』 第1版 東京化学同人 354p (1976)
2. 大島 泰郎ほか 『生化学辞典』 第4版 東京化学同人 1,616p (2007)
3. Gut, H., Pennacchietti, E., John, A. R., Bossa, F., Capitani, G., Biase, D. D., and Grutter, G. M. (2006) *Escherichia coli* acid resistance: pH-sensing, activation by chloride and autoinhibition in GadB. *EMBO J.* **25**, 2643-2651
4. Komori, H., Nitta, Y., Ueno, H., and Higuchi, Y. Structural study reveals that Ser-354 determines substrate specificity on human histidine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* **287**, 29175-29183 (2012)
5. Sandmeier, E., Hare, I. T., and Christen, P. Multiple evolutionary origin of pyridoxal-5'-phosphate-dependent amino acid decarboxylases. *Eur. J. Biochem.* **221**, 997-1002 (1994)
6. Jansonius, J. N. Structure, evolution and action of vitamin B₆-dependent enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 759-769 (1998)
7. Eliot, C.A. and Kirsch, F. J. Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 383-415 (2004)
8. El-Sayed, A. S. A. and Shindia, A. A. PLP-Dependent enzymes: apotent therapeutic approach for cancer and cardiovascular diseases. *Targets in Gene Therapy* Prof. Yongping You (Ed.), 119-146 (2011)
9. Schneider, G., Kack, H., and Lindqvist, Y. The manifold of vitamin B₆ dependent enzymes. *Structure* **8**, 1-6 (2000)
10. Giardina, G., Montioli, R., Gianni, S., Cellini, B., Paiardini, A., Voltattorni, B. C., and Cutruzzola, F. Open conformation of human DOPA decarboxylase reveals the mechanism of PLP addition to Group II decarboxylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 20514-20519 (2011)

11. Capitani, G., Tramonti, A., Bossa, F., Grutter, G. M., and Biase, D. D. The critical structural role of a highly conserved histidine residue in Group II amino acid decarboxylases. *FEBS Lett.* **554**, 41-44 (2003)
12. Burkhard, P., Dominici, P., Borri-Voltattorni, C., Jansonius, N. J., and Malashkevich, N. V. Structural insight into Parkinson's disease treatment from drug-inhibited DOPA decarboxylase. *nature structural biology* **8**, 963-967 (2001)
13. Capitani, G., Biase, D. D., Aurizi, C., Gut, H., Bossa, F., and Grutter, M. G. Crystal structure and functional analysis of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase. *EMBO J.* **22**, 4027-4037 (2003)
14. Preeti, Tapas, S., Kumar, P., Madhubala, R., and Tomar, S. Structural Insight into DFMO Resistant Ornithine Decarboxylase from *Entamoeba histolytica*: An Inkling to Adaptive Evolution. *PLOS ONE* **8**, 1-12 (2013)
15. Hagino, H. and Nakayama, K. Amino acid metabolism in microorganisms Part IV L-methionine decarboxylase produced by a *Streptomyces* strain. *Agr. Biol. Chem.* **32**, 727-733 (1968)
16. Misono, H., Kawabata, Y., Toyosato, M., Yamamoto, T. and Soda, K. Purification and properties of L-methionine decarboxylase of *Streptomyces* sp. *Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.* **58**, 323-333 (1980)
17. Mazelis, M. Enzymatic degradation of adenosine triphosphate to adenine by cabbage leaf preparations. *J. Plant Physiol.* **34**, 153-158 (1959)
18. Mazelis, M. The Pyridoxal Phosphate-dependent oxidative decarboxylation of methionine by peroxidase: I. characteristics and properties of the reaction. *J. Biol. Chem.* **237**, 104-108 (1962)
19. Hagino, H., and Nakayama, K. Amino acid metabolism in microorganisms Part II. production of 3-methylthiopropylamine from methionine by certain strains of *Streptomyces*. *Agr. Biol. Chem.* **31**, 1367-1371 (1967)
20. Stevenson, D. E., Akhtar, M. and Gani, D. *Streptomyces* L-methionine decarboxylase: purification and properties of the enzyme and stereochemical course of substrate decarboxylation. *Biochemistry* **29**, 7660-7666 (1990)

21. Stevenson, D. E., Akhtar, M. and Gani, D. L-Methionine decarboxylase from *Dryopteris filix-mas*: purification, characterization, substrate specificity, abortive transamination of the coenzyme, and stereochemical courses of substrate decarboxylation and coenzyme transamination. *Biochemistry* **29**, 7631-7647 (1990)
22. Akhtar, M., Stevenson, D. E., and Gani, D. Fern L-methionine decarboxylase: kinetic and mechanism of decarboxylation and abortive transamination. *Biochemistry* **29**, 7648-7660 (1990)
23. Kitaguchi, H., Uchida, A. and Ishida, Y. Purification and characterization of L-methionine decarboxylase from *Cryptocodinium cohnii*. *Fish. Sci.* **65**, 613-617 (1999)
24. Gerner, E. W. and Meyskens, F. L. Jr. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 781-792 (2004)
25. Hibasami, H., Maekawa, S., Murata, T. and Nakashima, K. Inhibition by polyamines of methylthiopropylamine-induced ornithine decarboxylase in human lymphoid leukemia Molt 4B cells. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 3673-3676 (1989)
26. Knowles, P. F. and Dooley, D. M. Amine oxidases. *Metal Ions in Biological Systems* (Sigel, H. and Sigel, A., eds.) **30**, 361-403 (1994)
27. Floris, G. and Mondovi, B., eds. Copper amine oxidases. structures, catalytic mechanisms, and role in pathophysiology, CRC Press. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL (2009)
28. 門田 元, 内田 有恒 *Bacillus subtilis*の孢子形成時におけるイオウ化合物の代謝 (第1報) 細胞内におけるイオウ化合物の消長. 日本農芸化学会誌 **41**, 485-491 (1967)
29. Mazelis, M., Ingraham, L. L. and Weston, W. J. The pyridoxal phosphate-dependent oxidative decarboxylation of methionine by peroxidase: II. identification of 3-methylthiopropionamide as a product of the reaction. *J. Biol. Chem.* **237**, 109-112 (1962)
30. Matsuzaki, R., Fukui, T., Sato, H., Ozaki, Y., and Tanizawa, K. Generation of the topa quinone cofactor in bacterial monoamine oxidase by cupric iondependent autooxidation of a specific tyrosyl residue. *FEBS Lett.* **351**, 360364 (1994)

31. Rothberg, M. J. and Leamon, H. J. The development and impact of 454 sequencing. *Nature Biotechnology* **26**, 1117-1124 (2008)
32. Papakonstantinou, T., Law, R. H. P., Gardiner, P., Rowley, M. J. and Mackay, I. R. Comparative expression and purification of human glutamic acid decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Enzyme Microbial Technol.* **26**, 645-652 (2000)
33. Kato, Y., Furukawa, K. and Hara, S. Cloning and nucleotide sequence of the glutamate decarboxylase-encoding gene *gadA* from *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 2600-2605 (2002)
34. Takahashi, H., Kimura, B., Yoshikawa, M. and Fujii, T. Cloning and sequencing of the histidine decarboxylase genes of gram-negative, histamine-producing bacteria and their application in detection and identification of these organisms in fish. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2568-2579 (2003)
35. Martin, M. C., Fernandez, M., Linares, D. M. and Alvarez, M. A. Sequencing, characterization and transcriptional analysis of the histidine decarboxylase operon of *Lactobacillus buchneri*. *Microbiol. Sgm.* **151**, 1219-1228 (2005)
36. Morii, H., Kasama, K. and Herrera-Espinoza, R. Cloning and Sequencing of the histidine decarboxylase gene from *Photobacterium phosphoreum* and its functional expression in *Escherichia coli*. *J. Food Protect.* **69**, 1768-1776 (2006)
37. Kanki, M., Yoda, T., Tsukamoto, T. and Baba, E. Histidine decarboxylases and their role in accumulation of histamine in tuna and dried saury. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1467-1473 (2007)
38. Park, K. B. and Oh, S. H. Cloning, sequencing and expression of a novel glutamate decarboxylase gene from a newly isolated lactic acid bacterium, *Lactobacillus brevis* OPK-3. *Bioresour. Technol.* **98**, 312-319 (2007)
39. De Las Rivas, B., Rodriguez, H., Carrascosa, A. V. and Munoz, R. Molecular cloning and functional characterization of a histidine decarboxylase from *Staphylococcus capitis*. *J. Appl. Microbiol.* **104**, 194-203 (2008)

40. Ferrario, C., Borgo, F., de las Rivas, B., Munoz, R., Ricci, G. and Fortina, M. G. Sequencing, characterization, and gene expression analysis of the histidine decarboxylase gene cluster of *Morganella morganii*. *Current Microbiol.* **68**, 404-411 (2014)
41. Gut, H., Dominici, P., Pilati, S., Astegno, A., Petoukhov, M. V., Svergun, D. I., Grutter, M. G. and Capitani, G. A common structural basis for pH- and calmodulin-mediated regulation in plant glutamate decarboxylase. *J. Mol. Biol.* **392**, 334-351 (2009)
42. Lee, E. S., Kim, H. W., Kim, D. E., Kim, Y. H., Nam, S. W., Kim, B. W. and Jeon, S. J. Gene expression and characterization of thermostable glutamate decarboxylase from *Pyrococcus furiosus*. *Biotech. Bioprocess Eng.* **18**, 375-381 (2013)
43. Ishikawa, K., Kaneko, E., and Ichiyama, A. Pyridoxal 5'-phosphate binding of a recombinant rat serine: pyruvate/alanine: glyoxylate aminotransferase. *J. Biochem.* **119**, 970-978 (1996)
44. Matsuda, N., Hayashi, H., Miyatake, S., Kuroiwa, T., and Kagamiyama, H. Instability of the apo form of aromatic L-amino acid decarboxylase *in vivo* and *in vitro*: Implications for the involvement of the flexible loop that covers the active site. *J. Biochem.* **135**, 33-42 (2004)
45. Ueno, Y., Hayakawa, K., Takahashi, S., and Oda, K. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 1168-1171 (1997)
46. Esaki, N. and Walsh, C. T. Biosynthetic alanine racemase of *Salmonella typhimurium*: purification and characterization of the enzyme encoded by the *alr* gene. *Biochemistry* **25**, 3261-3267 (1986)
47. Kokkinakis, D. M. Methionine-stress: a pleiotropic approach in enhancing the activity of chemotherapy. *Cancer letters* **233**, 195-207 (2006)
48. Tan, Y., Zavala, J. SR., Xu, M., Zavala, J. JR. and Hoffman, R. M. Serum methionine depletion without side effects by methioninase in metastatic breast cancer patients. *Anticancer Res.* **16**, 3937-3942 (1996)

49. Tan, Y., Zavala, J. SR., Han, Q., Xu, M., Sun, X., Tan, XU., Tan, XI., Magana, R., Geller, J. and Hoffman, R. M. Recombinant methioninase infusion reduces the biochemical endpoint of serum methionine with minimal toxicity in high-stage cancer patients. *Anticancer Res.* **17**, 3857-3860 (1997)
50. Tanaka, H., Esaki, N. and Soda, K. A versatile bacterial enzyme: L-methionine γ -lyase. *Enzym. Microbial Technol.* **7**, 530-537 (1985)
51. Inoue, H., Inagaki, K., Sugimoto, M., Esaki, N., Soda, K. and Tanaka, H. Structural analysis of the L-methionine γ -lyase gene from *Pseudomonas putida*. *J. Biochem.* **117**, 1120-1125 (1995)
52. Kudou, D., Misaki, S., Yamashita, M., Tamura, T., Esaki, N. and Inagaki, K. The role of cysteine 116 in the active site of the antitumor enzyme L-methionine gamma-lyase from *Pseudomonas putida*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 1722-1730 (2008)
53. Fukumoto, M., Kudou, D., Murano, S., Shiba, T., Sato, D., Tamura, T., Harada, S. and Inagaki, K. The role of amino acid residues in the active site of L-methionine gamma-lyase from *Pseudomonas putida*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 1275-1284 (2012)
54. Nagano, Y., Samejima, H. and Kinoshita, S. Antioxidant activity of 3-methylthiopropylamine hydrochloride. *Agr. Biol. Chem.* **32**, 846-850 (1968)
55. Benedetti, M. S., Tipton, K. F., Whomsley, R., and Baltes, E. Factors affecting the relative importance of amine oxidases and monooxygenases in the *in vivo* metabolism of xenobiotic amine in humans. *J. Neural. Transm.* **114**, 787-791 (2007)
56. Iwasaki, T., Tokuda, Y., Kotake, A., Okada H., Takeda, S., Kawano, T., and Nakayama, Y. Cellular uptake and *in vivo* distribution of polyhistidine peptides. *J. Control Release* **210**, 115-124 (2015)
57. Shiraki, N., Shiraki, Y., Tsuyama, T., Obata, F., Miura, M., Nagae, G., Aburatani, H., Kume, K., Endo, F., and Kume, S. Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Metab.* **19**, 780-794 (2014)

58. Takakura, T., Mitsushima, K., Yagi, S., Inagaki, K., Tanaka, H., Esaki, N., Soda, K., and Takimoto, A. Assay method for antitumor L-methionine gamma-lyase: comprehensive kinetic analysis of the complex reaction with L-methionine. *Anal. Biochem.* **327**, 233-240 (2004)
59. Yamasaki-Yashiki, S., Tachibana, S., and Asano, Y. Determination of L-methionine using methionine-specific dehydrogenase for diagnosis of homocystinuria due to cystathionine β -synthase deficiency. *Anal. Biochem.* **428**, 143-149 (2012)
60. Kameya, M., Himi, M., and Asano, Y. Rapid and selective enzymatic assay for L-methionine based on a pyrophosphate detection system. *Anal. Biochem.* **447**, 33-38 (2014)
61. Tokoro, M., Asai, T., Kobayashi, S., Takeuchi, T., and Nozaki, T. Identification and characterization of two isoenzymes of methionine gamma-lyase from *Entamoeba histolytica*: a key enzyme of sulfur-amino acid degradation in an anaerobic parasitic protist that lacks forward and reverse trans-sulfuration pathways. *J. Biol. Chem.* **278**, 42717-42727 (2003)
62. Asad, S., Torabi, S. F., Fathi-Roudsari, M., Ghaemi, N., and Khajeh, K. Phosphate buffer effects on thermal stability and H₂O₂-resistance of horseradish peroxidase. *Int. J. Biol. Macromol.* **48**, 566-570 (2011)
63. Chattopadhyay, K. and Mazumdar, S. Structural and conformational stability of horseradish peroxidase: effect of temperature and pH. *Biochemistry* **39**, 263-270 (2000)
64. Pina, D. G., Shnyrova, A. V., Gavilanes, F., Rodríguez, A., Leal, F., Roig, M. G., Sakharov, I. Y., Zhadan, G. G., Villar, E., and Shnyrov, V. L. *Eur. J. Biochem.* **268**, 120-126 (2001)
65. 田中 英彦, 今原 廣次, 江崎 信芳, 左右田健次 細菌のL-Methionine γ -LyaseによるMethionineの定量. 含硫アミノ酸 **2**, 313-322 (1979)

謝辞

本研究は、岡山大学大学院環境生命科学研究科において行ったものである。

岡山大学大学院 環境生命科学研究科 農生命科学専攻 微生物遺伝子化学研究室の稲垣賢二教授は、正指導教員として、研究活動全般、論文作成ならびに生活面にわたって一方ならぬご指導・ご鞭撻を賜りました。心より御礼申し上げます。

岡山大学大学院 環境生命科学研究科 農生命科学専攻 微生物遺伝子化学研究室の田村隆教授は、副指導教員として、研究活動全般ならびに論文作成にわたってご指導・ご鞭撻を賜りました。心より御礼申し上げます。

岡山大学大学院 環境生命科学研究科 農生命科学専攻 微生物機能学研究室の上村一雄教授は、副指導教員として、研究活動全般ならびに論文作成にわたりご指導くださいました。感謝致します。

岡山大学大学院 環境生命科学研究科 農生命科学専攻 生物情報化学研究室の村田芳行教授には、博士学位論文の主査として、研究遂行のための建設的なご意見を賜りました。御礼申し上げます。

共同研究者として、京都工芸繊維大学 構造生物学研究室の原田繁春教授、志波智生准教授、佐藤暖博士および細木志穂氏は、本研究の酵素結晶作製と結晶構造解析において、並々ならぬご尽力を賜りました。また、本研究のアミノ酸酵素的定量法の開発に関して、ニプロ株式会社 酵素センターの木村隆氏および菊池可菜子氏には大変お世話になりました。

本研究に関連して、左右田健次京都大学名誉教授、稲垣純子助教、工藤大蔵博士および根本理子特任助教には、論文作成や実験などの実務に関して、誠に具体的で建設的なご意見を幾度となく頂戴いたしました。感謝申し上げます。

当研究の前任者の内富久美子氏、日下知香氏、前村知美氏および岡田茜氏は、酵素の性質検討と組換え酵素の作製に関して、有益なデータの蓄積に貢献してくださいました。感謝いたしております。

微生物遺伝子化学研究室の学生の皆様とは何時も同じ場所で苦楽を共にしました。互いに励ましあい、助け合うことのできる最強のメンバーです。ありがとうございました。

現研究室が所属する岡山大学 農学部 農芸化学コースの教員の皆様は、博士前期課程まで他コースに在籍していた私を温かく迎え入れ、いつでも気に掛けてくださいました。

学士課程・博士前期課程時に在籍した岡山大学 農学部 応用動物科学コース 旧・畜産食品機能学研究室の宮本拓教授、荒川健佑助教および原和志氏、ならびに研究室の皆様は、私が大学に入っではじめて大学に来た意味を知った大切な場所でした。ありがとうございました。

最後に、博士後期課程に進学し、科学者の夢を追求する私を信じて寄り添ってくれた家族・親族に、この博士学位論文を捧げます。