

コイ アセチルコリンエステラーゼの酵母における発現

環境生物化学研究室 佐藤 了平

指導教官 解良 芳夫、山田 良平、高橋 祥司

1. 序論

アセチルコリンエステラーゼ（以下 AChE）は、シナプス間隙において神経伝達物質アセチルコリンを加水分解し、その作用を消去させることが主な生理機能である。殺虫剤の成分として用いられている有機リン系およびカルバメート系化合物は、この AChE の働きを強く阻害する。したがって、魚類の脳や筋組織における AChE の比活性の減少は、水環境における有機リン系化合物曝露に対する有用なバイオマーカーとして利用され、多くの野外調査で様々な魚類の AChE の酵素活性が調べられている。しかしながら、現在用いられている組織重量あるいは組織総タンパク量あたりの比活性は個体差に影響されるため正確な評価が困難である。これを改善するために当研究室では、免疫学的手法により求めた AChE 量に基づく比活性を利用した評価法の開発を目指している。免疫学的手法には、コイ AChE に対する抗体が必要となるため、コイ筋組織由来の AChE 精製標品を用いて、ウサギでの抗体作製を試みたが、用いたコイ AChE 精製標品の量が少なかったため抗体は得られなかった。そこで、本研究では、コイ AChE を多量に得るために、コイ筋組織から AChE 遺伝子を単離し、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いて本酵素を大量発現させることにした。

2. 実験

2005 年に修了した当研究室の松本により、コイ AChE 遺伝子のクローニングが行われ、コイ本酵素遺伝子の配列が明らかになり、異種細胞における本酵素の大量発現を行うことを可能とした [1]。まず、本酵素の培養液への分泌効率を考え、3 種のコイ本酵素遺伝子コンストラクトを作成し、酵母発現ベクターを構築した。これらを相同組換えにより酵母のゲノムに組込んだ。そして、本酵素を効率良く分泌している酵母形質転換体がどれかを確認するために、コピー数を揃えた各種形質転換体における本酵素の発現を考えた。半定量 PCR とサザンブロット解析を行い、1 コピーの本酵素遺伝子を有する各種形質転換体を獲得した。この獲得した各種酵母形質転換体において、本酵素の発現を行っ

た。また、各種酵母形質転換体の培養はEasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Invitrogen ; Carlsbad, California) の方法に準じた。

3. 結果と考察

(1) コイ AChE 遺伝子発現ベクターによる酵母 *P. pastoris* の形質転換

酵母におけるコイ AChE 発現のため、コイ本酵素遺伝子を用いて、3 種の酵母発現ベクターを構築した (Figure 1) 。

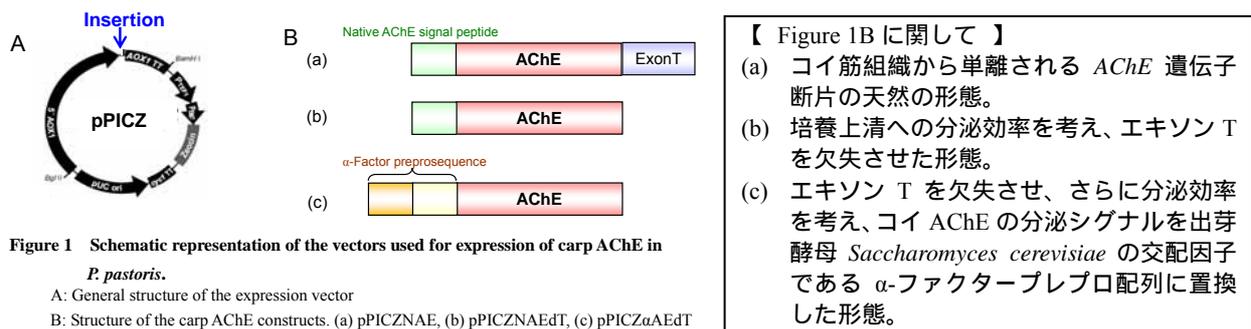


Figure 1 Schematic representation of the vectors used for expression of carp AChE in *P. pastoris*.

A: General structure of the expression vector

B: Structure of the carp AChE constructs. (a) pPICZNAE, (b) pPICZNAEdT, (c) pPICZ α AEdT

これら酵母発現ベクターを制限酵素処理により線状化した後、酵母 *P. pastoris* を形質転換した。

(2) 半定量 PCR とサザンプロット解析による形質転換体に存在する AChE 遺伝子のコピー数解析

得られた各形質転換体のゲノム DNA を用いた AChE 遺伝子の半定量 PCR の結果を Figure 2A、サザンプロット解析の結果を Figure 2B に示した (Figure 2) 。

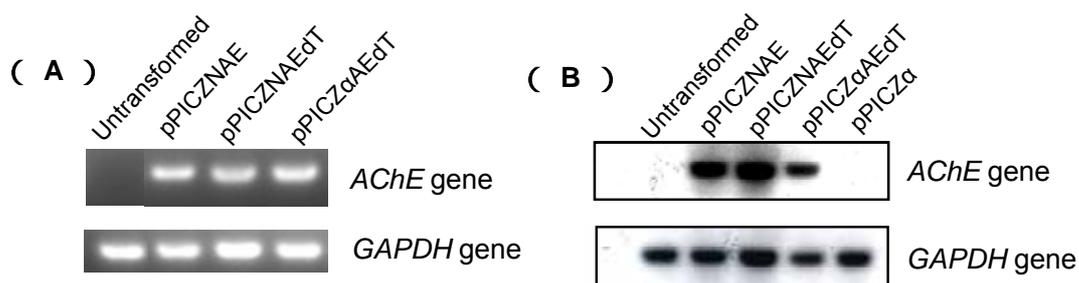


Figure 2 Semi-quantitative PCR and Southern blot analysis of genomic DNA from *P. pastoris* transformants.

検出した AChE 遺伝子と 1 コピーの基準としたグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 遺伝子の DNA バンドのピーク面積を画像解析ソフト Scion Image (Scion Corporation ; Frederick, MD) により解析したところ、ほぼ同じピ

ーク面積を示した。したがって、解析した各種形質転換体は1コピーのAChE遺伝子を有することが示された。

(3) 1コピーのAChE遺伝子を持つ各種形質転換体によるコイAChE発現

1コピーのAChE遺伝子を持つ各種形質転換体を10日間培養し、培養液中のAChE活性を経時的に解析した。なお、酵母形質転換体の培養温度は、30℃（Figure 3、塗りつぶし）と15℃（Figure 3、白抜き）で行った。グラフの値は3回の培養を行った平均値と標準偏差を示した（Figure 3）。

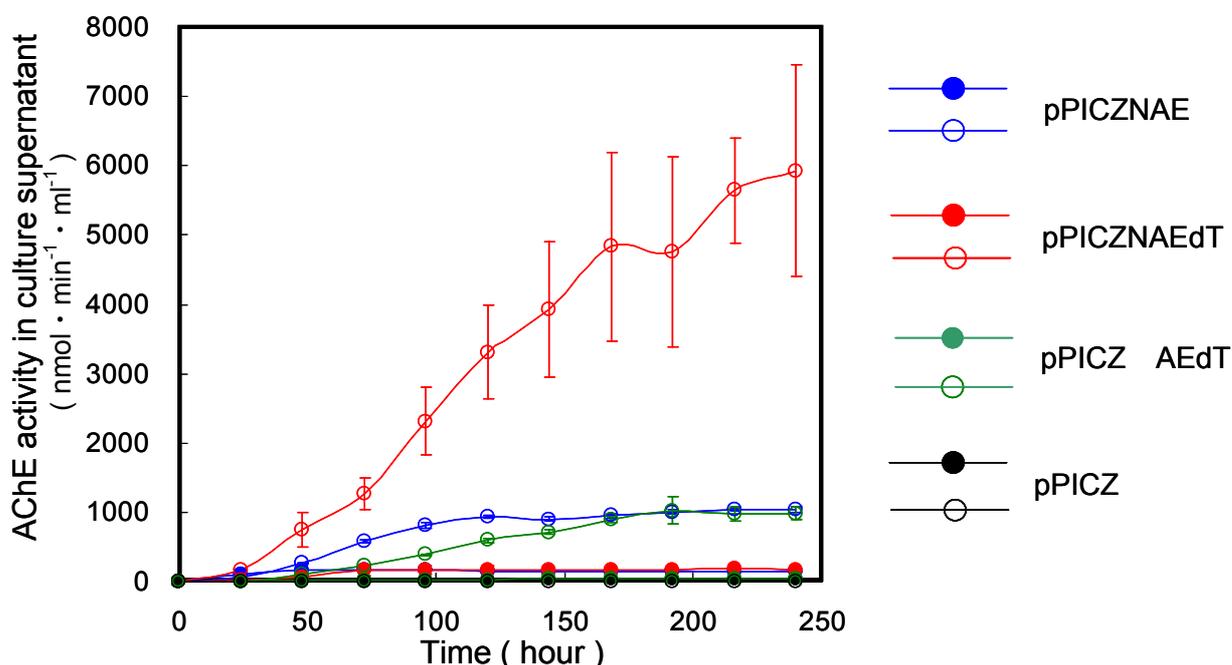


Figure 3 Expression of carp AChE by *P. pastoris* transformants.

30℃での培養では、エキソン T を含む AChE を発現させる pPICZNAE 形質転換体（Figure 3、青塗りつぶし）と培養液中への分泌効率を高めるためにエキソン T を欠失させた形態の AChE 変異体を発現させる pPICZNAEdT 形質転換体（Figure 3、赤塗りつぶし）の培養液中の最大 AChE 活性値はほぼ同じだった。一方、培養液中へ効率的に分泌させるために、エキソン T を欠失させ、AChE の分泌シグナルを酵母の分泌シグナルである α -ファクタープレプロ配列に置換した形態の AChE 変異体を発現する pPICZ α AEdT 形質転換体（Figure 3、緑塗りつぶし）の培養液中の AChE 活性は上記の 2 株と比較するとかなり低かった。これらの AChE 活性値は、コイと同じ脊椎動物であるラット AChE を *P. pastoris* で発現させた論文で報告され

ている活性値より明らかに低かったため [2]、培養条件を検討している論文を参考にして [3]、15 °C での培養を検討した。15 °C での培養では、30 °C での培養結果と異なり、pPICZNAEdT 形質転換体 (Figure 3, 赤白抜き) における AChE 活性値が最も高かった。また、pPICZNAE 形質転換体 (Figure 3, 青白抜き) と pPICZ α AEdT 形質転換体 (Figure 3, 緑白抜き) の活性値はほぼ同じであった。この 15 °C での結果は、ラット AChE を発現させた論文の結果と傾向が一致した [2]。また、培養温度に関係なく、 α -ファクタープレプロ配列による活性値の増加はみられなかった。今回の培養実験において、pPICZNAEdT 形質転換体における活性値の挙動が実に興味深い。30 °C では他の形質転換体と活性値がほぼ同じであったにもかかわらず、15 °C では群を抜いて活性値が高くなった。これは、エキソン T を欠失させたことにより、30 °C では、発現産物の分子安定性が保てず、変性した可能性がある。この可能性を証明するためには、培養液中に分泌された、コイ AChE の SDS-PAGE 解析とウエスタンブロット解析を行う必要があると考えられる。その結果から、発現産物の変性しているかどうか議論することができるはずである。また、エキソン T を含む AChE を発現させた結果は、ラット AChE で報告されている結果と一致していることから [2]、発現産物が酵母の細胞膜に結合することにより培養液中に分泌されなかったと考えられる。

4. まとめ

単離された *AChE* 遺伝子が導入された各種酵母形質転換体において、その培養液中に AChE 活性を確認できたことから、単離した遺伝子が AChE をコードしていることがわかった。

5. 参考文献

- [1] 松本徹、山田良平、解良芳夫、高橋祥司 修士論文 (2005).
- [2] Nathalie Morel, Jean Massoulie, *Biochem. J.*, 328, 121-129. (1997).
- [3] Xianzong Shi, Tammy Karkut, Mahmood Chamankhah, Michelle Alting-Mees, Sean M. Hemmingsen, Dwayne Hegedus., *Prot. Exp. Puri.*, 28, 321-330 (2003).