

26P-pm256

キメラ酵素を用いたウサギアルデヒドオキシダーゼの基質特異性に関する研究
○吹谷 研介¹, 岸羽 暁子¹, 安達 麻祐子¹, 伊藤 邦郎¹, 田中 頼久¹(¹東北薬大)

【目的】アルデヒドオキシダーゼ(AO)はキサンチンオキシダーゼと同様にサイトソル局在性のモリブデン含有酵素で、主に含窒素複素環化合物の酸化的代謝に関与している。AOの活性には著しい種差が存在するとともに、用いる基質によって動物種間で活性が逆転する例が知られている。Methotrexate (MTX)や cinchonidine においては一般に AO 活性が高いとされるヒト、サル等の霊長類と比較し、ウサギは 100 倍以上高い酸化活性を示す。本研究では、この現象が AO の基質特異性に関する解析に有用であると考え、大腸菌発現系を用いてウサギとサル間でキメラ AO タンパク質を作製し、cinchonidine を基質としてキネティックパラメータを求めた。

【方法】ウサギ及びサル、それぞれの全長の AO cDNA クローンに、site-directed mutagenesis (SDM)を用いて基質結合部位である Molybdenum Cofactor ドメインの適当な位置に制限酵素サイトを導入し、酵素処理で生じた断片を組み換え、キメラ AO cDNA クローンを作製した。各クローンを導入した大腸菌発現系により得られたキメラタンパク質を、Ni カラムを用いて精製後、活性測定に用いた。

【結果及び考察】得られたキネティックパラメータから、ウサギ AO の cinchonidine に対する高い活性には、Ala994 から Val1087 のアミノ酸領域が関与していることが明らかとなった。また、サル AO タンパク質のこの領域のみをウサギの配列にしたキメラ AO タンパク質は、ウサギ AO タンパク質と同様に MTX にも高い活性を示したことから、MTX の結合にも cinchonidine と同じアミノ酸残基が関与している可能性が示唆された。現在、SDM を用いウサギとサルで異なるアミノ酸残基について、個々の寄与を検討している。