

# 22PO-am258

ユーグレナにおけるチアミンピロホスホキナーゼ cDNA の単離と発現

○林 麻利亜<sup>1</sup>, 森本 奈々<sup>1</sup>, 遠藤 祐里奈<sup>1</sup>, 内山 良介<sup>1</sup>, 石川 孝博<sup>2</sup>, 野坂 和人<sup>1</sup> (<sup>1</sup>武庫川女大薬, <sup>2</sup>鳥根大生物資源科学)

【背景・目的】チアミン (ビタミン B<sub>1</sub>) は全ての生物に必須の微量栄養素であり、その生理作用としてチアミンピロリン酸 (TPP) による補酵素としての作用が知られている。真核生物では、TPP はチアミンからチアミンピロホスホキナーゼ (TPK) によって生成される。ユーグレナ (*Euglena gracilis*) は、動物と植物の両方の性質を持つ単細胞真核生物である。ユーグレナは菌体内にビタミン、アミノ酸、不飽和脂肪酸を含み、最近ではサプリメントとしても活用されている。しかし、未だユーグレナの染色体の塩基配列は解読されておらず、チアミンを含む栄養物質代謝には不明な点が多い。今回、シロイヌナズナの TPK (Ajjawi I *et al. Plant Mol Biol* 65, 151-162. 2007) と相同性のある配列 (EgTPK) がユーグレナの cDNA に存在したので、その cDNA の翻訳産物の酵素学的性質を検討した。また、EgTPK タンパク質の発現に及ぼす培地中チアミン濃度の影響を検討した。

【方法】ユーグレナの cDNA から PCR 法によって単離した EgTPK cDNA を大腸菌で発現させて、His-tag に対するアフィニティークロマトグラフィーでタンパク質を精製した。TPK 活性は、チアミンから生成するチアミンピロリン酸をチオクローム化し、その蛍光を HPLC で分離定量して測定した。EgTPK タンパク質の発現は、作成したポリクローナル抗体を用いてウエスタン法で解析した。

【結果・考察】精製 EgTPK タンパク質に TPK 活性が認められ、ユーグレナの本酵素 cDNA を同定することができた。TPK 活性の最適 pH と最適温度はそれぞれ 8.0、50℃であり、チアミンと ATP に対する  $K_m$  値はそれぞれ 0.73  $\mu$ M、0.45 mM であった。また、EgTPK タンパク質の発現は培地中のチアミン濃度に影響を受けないことが示唆された。