

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	Haloarcula japonica 由来 3-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ LeuB の性質検討および leuB 遺伝子の栄養要求性マーカーとしての利用
Title(English)	
著者(和文)	長岡真太郎
Author(English)	Shintaro Nagaoka
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12108号, 授与年月日:2021年9月24日, 学位の種別:課程博士, 審査員:八波 利恵,和地 正明,福居 俊昭,蒲池 利章,平沢 敬,中村 聡
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12108号, Conferred date:2021/9/24, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(工学)
学生氏名： Student's Name	長岡 真太郎		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	八波 利恵	准教授
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)		

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

3-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (IPMDH) はロイシン生合成系に關与する酵素である。これまでに種々の生物から単離されており、種間で立体構造の類似性が高いことから、酵素研究のモデルとして着目されてきた。一方で、これまでに高度好塩性古細菌由来 IPMDH に関する知見はごくわずかだった。

先行研究において、高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* のゲノム上に、IPMDH をコードする *leuB* 遺伝子が見出された。以降、本遺伝子産物を LeuB と呼称する。本研究では、高度好塩性古細菌由来 IPMDH についての知見を得ることを目的に、*Ha. japonica* 由来組換え LeuB の性質検討を行った。

これまでに、類縁菌由来のプラスミドベクターを用いた *Ha. japonica* の形質転換系が確立されている。一方で、本菌に適用可能な遺伝子工学的実験手法は限定的であり、*Ha. japonica* に応用可能な選択マーカーはごくわずかであった。*leuB* 遺伝子の欠損株はロイシン要求性を示すが、この株に *leuB* 遺伝子を有するプラスミドを形質転換することでロイシン要求性が相補される。この性質から、*leuB* 遺伝子の栄養要求性マーカーとしての応用が期待される。本研究では、*Ha. japonica* における新規選択マーカーの開発を目指し、*leuB* 遺伝子の栄養要求性マーカーとしての利用を試みた。

Ha. japonica が生産した組換え LeuB の性質検討

Ha. japonica に組換え LeuB を生産させ、Ni-アフィニティクロマトグラフィーによって精製標品を取得した。性質検討を行った結果、LeuB は反応至適 pH を pH 8.5、反応至適温度を 50-60 °C に有することがわかった。また、KCl 濃度の低い条件では活性が低下する一方で、KCl 濃度の上昇に伴い活性が向上し、LeuB は反応至適 KCl 濃度を 3.0 M に有することが示された。一方で、0-4.0 M の NaCl 存在下ではほとんど活性を示さなかった。以上のことから LeuB は KCl 濃度依存的な好塩酵素であることが示唆された。

一般的な生物由来 IPMDH は主にホモ 2 量体として存在する。活性部位が単量体同士の接合面に形成されることから、単量体への解離は失活に直結する。種々の KCl 濃度条件における LeuB の多量体形成について調べるため、超遠心分析を行った。その結果、1.0 M 以上の KCl 濃度ではほとんどがホモ 4 量体として存在するが、0.5 M 以下では単量体への解離が生じることが示された。特に、0.1 M ではほぼ全ての

分子が単量体へ解離した。このことから低 KCl 濃度での活性低下には、単量体への解離が関わりと推察された。

好塩酵素は塩濃度の上昇に伴い安定化する性質があることが報告されている。昇温を伴う 222 nm の CD 測定から、種々の KCl 濃度における LeuB の α -ヘリックスの熱変性を観察した。その結果、LeuB の変性温度は KCl 濃度上昇に伴い向上した。また、KCl 濃度 0.1 M から 0.5 M の間で、変性温度がとりわけ上昇した。これは KCl 濃度の上昇により 4 量体が形成されたことで、分子のエンタルピーが上昇したためだと考えられた。以上のことから LeuB は KCl 濃度上昇に伴いより安定な構造をとることが示唆された。

一般的な生物由来の IPMDH はほとんどが 2 量体構造をとることから、4 量体化と酵素の好塩・耐塩機構に相関があると推測された。今後は 2 量体構造を形成する変異型 LeuB の取得、ならびに性質検討から、その相関の解明が期待される。

leuB 遺伝子を栄養要求性マーカーとする *Ha. japonica* 宿主-ベクター系の構築

leuB 遺伝子を栄養要求性マーカーとする宿主-ベクター系の構築を目指し、まず *Ha. japonica leuB* 遺伝子欠損株 $\Delta leuB$ を作製した。次に抗生物質耐性遺伝子と、*leuB* 遺伝子を有するプラスミドベクター pJML を作製した。 $\Delta leuB$ の pJML 形質転換体を、最小培地 (MM 培地) において、栄養要求性での選抜により取得した。また pJML 形質転換体を、従来法である薬剤耐性と、栄養要求性でそれぞれ選抜した際の形質転換効率を調べた結果、ほぼ同等であることがわかった。

外来遺伝子発現用プラスミドベクターとして、抗生物質耐性遺伝子を除去し、*leuB* 遺伝子と置き換えた pJleuB を作製した。液体 MM 培地において、pJleuB 形質転換体 $\Delta leuB$ [pJleuB] と *Ha. japonica* 野生株の増殖はほぼ同等だった。この結果から、*leuB* 遺伝子を栄養要求性マーカーとして使用する宿主-ベクター系が、従来の薬剤耐性マーカーを使用する系の代替として利用可能であると考えられる。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ (T2R2) にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース：生命理工学 系
Department of, Graduate major in 生命理工学 コース
学生氏名：長岡 真太郎
Student's Name

申請学位(専攻分野)：博士 (工学)
Academic Degree Requested Doctor of

指導教員(主)：八波 利恵 准教授
Academic Supervisor(main)
指導教員(副)：
Academic Supervisor(sub)

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

3-Isopropylmalate dehydrogenase (IPMDH) encoded by *leuB* gene is an enzyme involved in leucine biosynthesis. In this study, *leuB* gene from extremely halophilic archaea *Haloarcula japonica* was cloned, and the gene product LeuB was characterized. In addition, applicable selection markers for *Ha. japonica* were very limited. *leuB* gene has been used as a auxotrophic selection marker for some organisms. In this study, new host-vector system for *Ha. japonica* using *leuB* gene as a selection marker was constructed.

Characterization of LeuB

The recombinant LeuB was produced in *Ha. japonica*, and purified by Ni-affinity chromatography. The optimal pH was pH 8.5, and maximum activity was observed at 50–60 °C. Relatively low activity of LeuB was observed at low KCl concentration, but the activity increased as the KCl concentration increased, and the maximum activity was observed at 3.0 M. This indicates that LeuB is a halophilic enzyme.

Some previous studies revealed that IPMDHs form a homodimer and an active site is formed at the monomer-monomer interface. Therefore a dissociation is considered to lead to inactivation of IPMDHs. Analytical ultracentrifugation revealed that LeuB forms homotetramer in high KCl concentrations, and it dissociates to monomers in a low KCl concentration. These results indicate that the dissociation might be related to the decrease in LeuB activity at a low KCl concentration.

Further, The denaturation temperature of LeuB was increased as the KCl concentration increased. This indicated that the structure of LeuB was thermally stabilized at high KCl concentrations.

Application of *leuB* gene to an auxotrophic selection marker

Ha. japonica leuB gene disruptant ($\Delta leuB$), and plasmid vector pJleuB were constructed. pJleuB harbors *leuB* gene as a selection marker. Transformants $\Delta leuB$ [pJleuB] was obtained on minimum medium (MM) plate. $\Delta leuB$ [pJleuB] showed almost the same growth to wild type strain on liquid MM. These results showed that *leuB* gene can be applied as a auxotrophic selection marker.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).