

大腸菌による組換えヒスタミンオキシダーゼの発現

化学技術部 生物工学チーム 廣井 哲也
資源・生活技術部 環境安全チーム 天谷 努

ヒスタミン中毒の原因物質であるヒスタミンを簡便かつ迅速にモニタリングするための酵素センサー構築を目的として、大腸菌による組換えヒスタミンオキシダーゼ発現系の構築を行なった。発現ベクターとして pCold I を用いた系で組換えヒスタミンオキシダーゼを発現した場合に野生株と比較して約 260 倍の活性効率が得られた。

キーワード：ヒスタミンオキシダーゼ、ヒスタミンセンサー、大腸菌、*Arthrobacter crystallopoietes* KAIT-B-007

1 はじめに

ヒスタミン中毒はヒスチジンの脱炭酸で生じる有害なヒスタミンにより引き起こされる食中毒である。食後すぐに顔面紅潮、頭痛、吐き気等の症状を示し、比較的軽症であるが、他の既往症と重なると重症になることもある。ヒスタミンの測定は蛍光定量法¹⁾や高速液体クロマトグラフィ(HPLC)法²⁾等で行われているが、従来法では試料処理や分析に時間を要する等、リアルタイムにモニタリングするための最適な検査方法とはいえない。

本研究では、ヒスタミンを簡便かつ迅速にモニタリングする方法としてヒスタミンオキシダーゼ(HOD)³⁾を利用した酵素センサーの構築を目的として、大腸菌による組換えHODの発現系の構築を行なった。

2 方法

2.1 供試菌株・ゲノムDNAの調製

菌は神奈川県立松本大学松本教授より分譲された *A. crystallopoietes* KAIT-B-007 を用いた。供試菌を *Arthrobacter* 属細菌増殖培地 (0.03% ペプトン、0.2% K_2HPO_4 、0.1% KH_2PO_4 、0.2% NaCl、0.05% イーストエキストラクト、10 μ M $CuSO_4$ 、0.05% $MgSO_4$) で培養後、遠心分離により菌体を回収し DNeasy Tissue Kit (キアゲン社製) を用いてゲノムDNAを調製した。

2.2 HOD 遺伝子のクローニングと発現ベクターの構築

大腸菌による組換えタンパク質発現ベクターとして、異なるプロモーターを持つ3種のベクター pET101、pTrcHisA、pCold I を用いた (図1)。HOD 全長遺伝子配列情報 (GeneBank Accession No. AB240436) に基づき、プライマーを作成し、PCR 法により遺伝子全長を増幅した。組換え HOD の発現系は、作製した HOD 発現ベクターで大腸菌株 BL21star(DE3) を形質転換して作製した。

2.3 組換え HOD の発現と HOD 活性

形質転換した大腸菌を培養後、pET101-HOD 発現系及

び pTrcHisA-HOD 発現系では、IPTG を添加して組換え HOD を誘導した。また pCold I-HOD 発現系では、15°C で 30 分間冷却し、IPTG を添加後 15°C でさらに培養を行い組換え HOD を誘導した。HOD は銅イオンを補欠金属として含むため、培地には必要に応じ $CuSO_4$ を添加した。HOD 活性は反応液 (5U/ml ペルオキシダーゼ、1.5mM 4-アミノアンチピリン、1mM DAOS、0.05% トリトン X-100、1mM ヒスタミン) 1ml に試験液 0.1ml を添加し、37°C で 5 分間反応後、停止液 (0.5% SDS) 2ml を加え、波長 600nm の吸光度により測定した。

3 結果

3.1 組換え HOD の誘導と HOD 活性評価

IPTG 誘導後の大腸菌から調製した可溶画分及び不溶画分の 7.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動結果を図2に、HOD 活性の結果を表1に示した。

図2より pTrcHisA-HOD、pCold I-HOD では、発現された HOD が菌体内の可溶画分として得られた。最も濃いバンドが得られたのは、pCold I-HOD であった。また、pET101-HOD では、菌体内不溶画分に組換え HOD と考えられるバンド (矢印) が得られた。

また、pTrcHisA-HOD、pCold I-HOD の可溶画分の HOD 活性を測定したところ、野生株 (*A. crystallopoietes* KAIT-B-007) と比較して培地一定量当たり、pTrcHisA-HOD で約 100 倍、pCold I-HOD で約 260 倍、活性効率が上がった。pET101-HOD の場合、可溶画分、不溶画分いずれにも HOD 活性は確認されなかった。

4 まとめ

A. crystallopoietes KAIT-B-007 の生産する HOD 遺伝子をプロモーターの異なる3種のベクターを用いて大腸菌に組み込み、組換え HOD を発現した。その結果、野生株と比較し 100~260 倍効率が上がり、発現量の最も優れている pCold I-HOD が最適なものと結論した。

文献

- 1) W. F. Staruszk ewicz ; *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 1977 60 1125.
- 2) H. Yanaka, M. Matsumoto ; *Journal of Food*

Hygienics Society of Japan, 1989 30 397.

- 3) Y. Sekiguchi, A. Nishikawa, H. Makita, A. Yamamura, K.i Matusmoto, N. Kiba ; *Analytical Science*, 2001 17 1161.

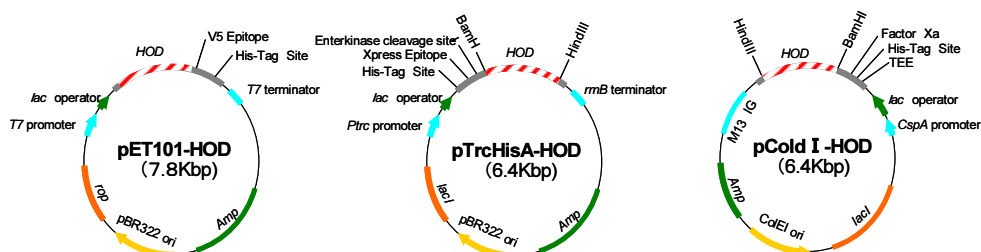


図1 検討した発現ベクター

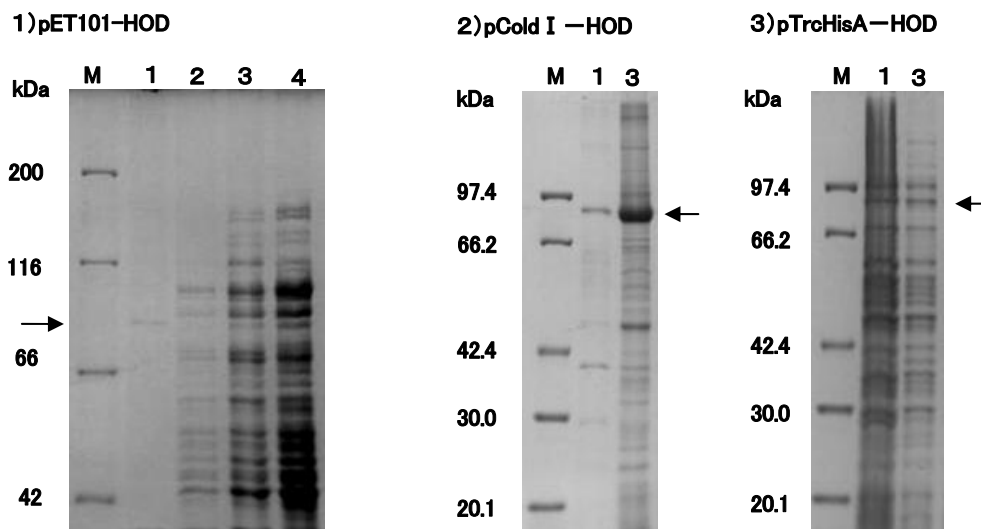


図2 組換え HOD の SDS-電気泳動による検出
M:分子量マーカー、1:不溶画分 (誘導) 2: 不溶画分 (未誘導)
3:可溶画分 (誘導)、4:可溶画分 (未誘導)

表1 組換え HOD の活性

菌株	全活性 (U/ml·Medium)	全タンパク質量 (mg)	比活性 (U/mg)	活性効率*
野生株 (KAIT-B-007)	0.0038	0.020	0.19	1
大腸菌 (pCold I-HOD)	1.00	0.27	3.70	263
大腸菌 (pTrcHisA-HOD)	0.37	0.95	0.39	97

*活性効率：組換え HOD の全活性の野生株に対する効率