

# 深海由来の好冷好圧細菌の

## イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の加圧下における活性について

○濱島 裕輝 (立教大学大学院理学研究科), 佐藤 孝子・加藤 千明  
(海洋研究開発機構), 今井 竹夫 (立教大学大学院理学研究科)

### 【目的】

深海由来の好冷好圧細菌と近縁種の常圧菌から 3-isopropylmalate dehydrogenase (IPMDH) を抽出・精製し、加圧下における活性を比較した。結果、200 MPa における活性を比較すると、常圧菌 *Shewanella oneidensis* の IPMDH は、圧力感受性が高く加圧下における活性が低い酵素である。好圧菌 3 種類の酵素は至適生育圧力が高い株ほど加圧下の活性が高くなり、至適生育圧力が 30 MPa の *S. violacea* では 58%、至適生育圧力が 50 MPa の *S. benthica* DB6705 では 61%、至適生育圧力が 70 MPa の *S. benthica* DB21 MT-2 では 65 % と至適生育圧力と酵素の加圧下における活性との間に相関がみられた。本研究では、このような加圧下における活性の差異が、いかなる構造的な違いに起因しているのか研究をするため、加圧下の活性の最も高い *S. benthica* DB21 MT-2 と低い *S. oneidensis* の IPMDH の N 末端側と C 末端側をそれぞれ入れ替えたキメラ酵素の作成を行い、加圧下における活性を比較した。

### 【実験方法】

N 末端側、C 末端側を入れ替えたキメラを作成するため、*S. benthica* DB21 MT-2 と *S. oneidensis* の IPMDH をコードする *leuB* 遺伝子をそれぞれ含むプラスミドを、作成するキメラに合わせて制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動後、切り出しを行い、DNA を入れ替えて *S. benthica* DB21 MT-2 と *S. oneidensis* のキメラ *leuB* 遺伝子を作成した。作成したキメラ *leuB* 遺伝子を持つ組み換え体プラスミドを *E. coli* HB101 株に導入後、LB 培地にアンピシリンと IPTG を加えて 30°C でそれぞれ培養をした。その後、菌体を凍結融解により破碎、それぞれの酵素の特性に従いキメラ IPMDH を精製した。IPMDH の加圧下での活性の測定は高圧分光光度計を用いて行った。

### 【結果】

元の配列から N 末端側、C 末端側、両端を変えたものでは加圧下における活性に関して大きな影響は見られず、グラフは加圧下の活性が 60% 以上と 40% 以下の二つに分かれた。以上の結果から、IPMDH の加圧下における活性に関しては、N 末端側、C 末端側の外側に近い部分ではなく、中央部分に位置する活性中心に近い配列が関係している。

### 【今後の展望】

現在、圧力以外にも、熱安定性、至適温度、至適 pH などの測定を行い、キメラ IPMDH の性質について研究を行っている。今後は、中央の活性中心に近い配列をポイントミュレーションで交換することで、どの部分のアミノ酸が耐圧性に関与しているか明らかにしたいと考えている。