

微生物由来アセチルコリンエステラーゼの 大量発現とその利用

鳥取大学 農学部
生物資源環境学科
教授 森 信寛

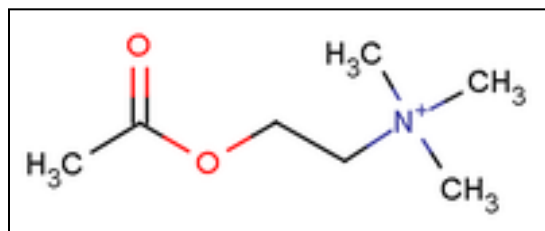
コリンエステラーゼ (ChE)

(1) アセチルコリンエステラーゼ (AChE; 真性コリンエステラーゼ)

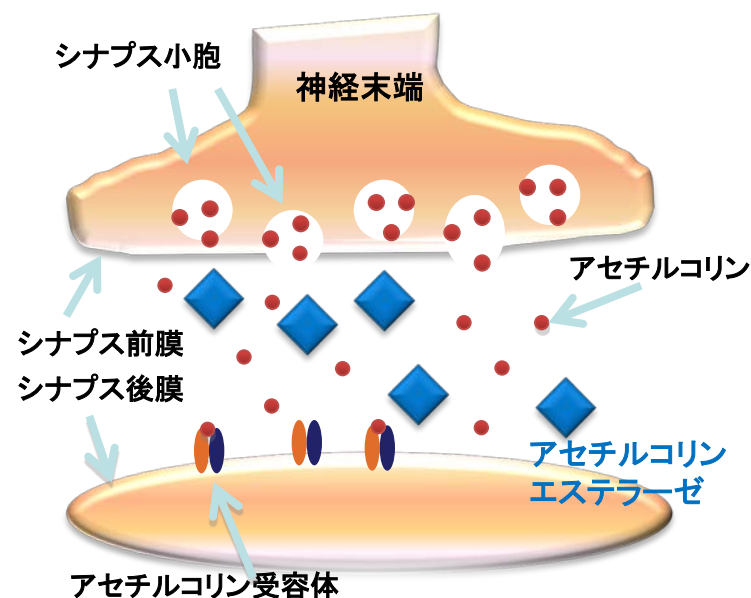
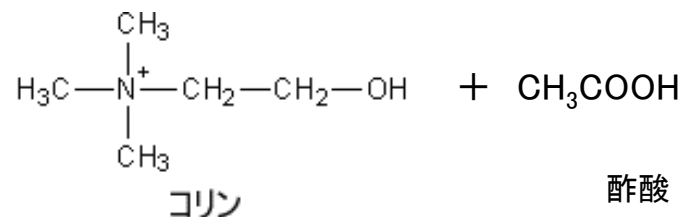
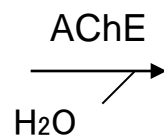
神経組織、赤血球などに存在する。

EC 3.1.1.7

コリン作動性神経(副交感神経, 運動神経, 交感神経の中枢~神経節)の神経伝達物質アセチルコリン(ACh)を酢酸とコリンに分解する。



アセチルコリン

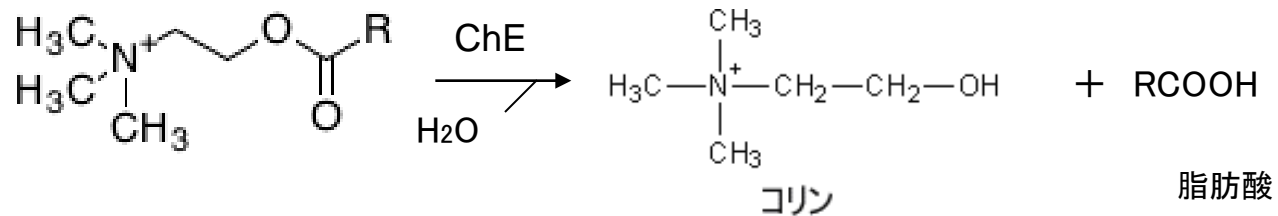


コリンエステラーゼ (ChE)

(2) ブチリルコリンエステラーゼ (BuChE; 偽コリンエステラーゼ)

肝臓、血清などに存在する。AChを含む様々なコリンエステル類を分解する。

健康診断の検査項目: 高値の場合はネフローゼ症候群, 脂肪肝など、低値の場合は肝硬変, 肝炎, 有機リン系薬物中毒(有機リン系の農薬中毒, サリンなどの神経ガス中毒)などが疑われる。



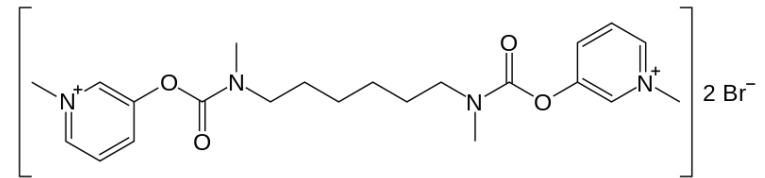
コリンエステラーゼ阻害剤

(1) 可逆性 : 医薬品, 生理活性物質

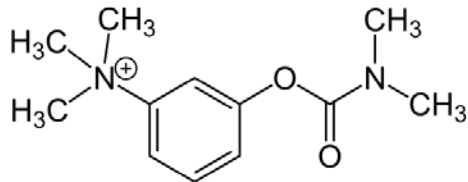
(2) 不可逆性 : 殺虫剤, 農薬

(1) 可逆性

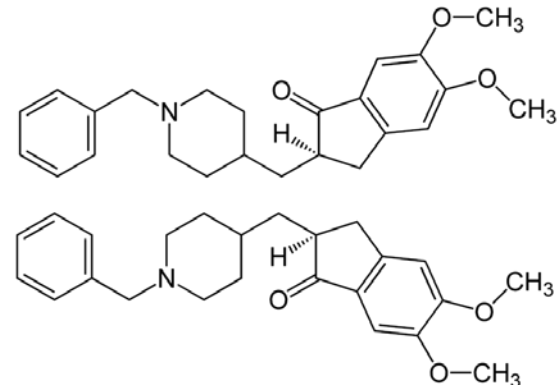
・ジスチグミン: 低緊張性膀胱による排尿困難の改善薬, 重症筋無力症



・ネオスチグミン: 筋弛緩薬



・ドネペジル: アルツハイマー病改善薬



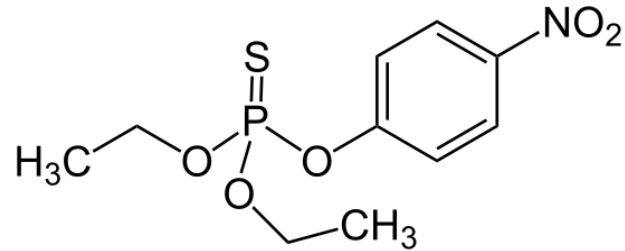
コリンエステラーゼ阻害剤

(1) 可逆性 : 医薬品, 生理活性物質

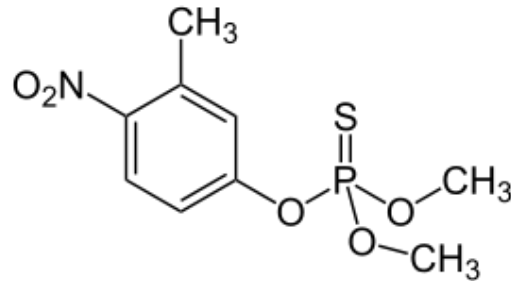
(2) 不可逆性: 殺虫剤, 農薬

(2) 不可逆性

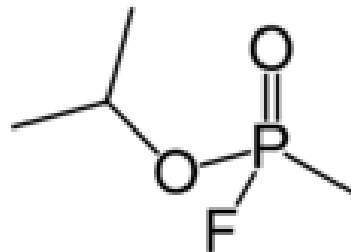
・パラチオン: 殺虫剤



・フェニトロチオン: 殺虫剤



・サリン: 毒ガス



アセチルコリンエステラーゼ(AChE)の比較

起源	分子質量 (kDa)	サブユニット 構造	文献
動物	60-450	多型	BRENDA (http://www.brenda-enzymes.org/)
トウモロコシ (単子葉植物)	88	ホモ二量体	Plant Physiol. (2005) 138: 1359-1371
牧草サイラトロ (双子葉植物)	125	ホモ三量体	Planta (2008) 227: 809-822
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> A-16 (細菌)	30	単量体	Agric. Biol. Chem. (1975) 39: 1287-1294

コリンエステラーゼの利用

* 残留農薬分析キット

* 農薬センサー

「酵素活性阻害を利用した農薬センサー」; バイオセンサーの先端技術と応用

(民谷栄一監修), シーエムシー出版, pp. 281-288, 2007

* DL- カルニチンの光学分割

Biotechnology and Bioengineering (1984), 26: 911-915

* 微生物由来コリンエステラーゼ阻害剤の探索

Journal of Antibiotics (1974), 27: 343-345

Journal of Antibiotics (1976), 29: 526-531

Journal of Antibiotics (1995), 48: 745-746

微生物由来AChE

* AChEの精製

(*Agr. Biol. Chem.*, 39, 1287-1294, 1975 *Pseudomonas aeruginosa* A-16)

酵素精製の総括表

精製ステップ	全タンパク質 (mg)	全酵素活性 (unit)	比活性 (unit/mg protein)
粗抽出液	717,327	32,898	0.05
塩化マンガン処理	250,354	27,023	0.11
硫安分画	96,999	26,939	0.28
CM-セファデックス(1回目)	2,578	18,096	7.02
CM-セファデックス(2回目)	108	10,483	97.1
ヒドロキシアパタイト	11	5,670	515.5
セファデックス G-75	9	5,000	557.6

精製酵素9mg; 550 リットル培養分の菌体

分子質量: 30 kDa

等電点: 8.1

微生物由来AChEの基質特異性と阻害剤

基質特異性

基質	Km値 (mM)
アセチルコリン	0.19
アセチルチオコリン	0.15
プロピオニルコリン	0.23
プロピオニルチオコリン	0.22
アセチル- β -メチルコリン	0.48
<i>p</i> -ニトロフェニル酢酸	1.25
フェニル酢酸	1.96
トリアセチン	3.70
<i>n</i> -アミル酢酸	0.87
イソアミル酢酸	1.14

可逆阻害

化合物	Ki値 (M)	阻害形式
アトロピン	7.9×10^{-4}	混合型
L-ヒヨスチアミン	1.6×10^{-3}	混合型
スコポラミン	3.2×10^{-4}	混合型
DL-カルニチン	3.2	非拮抗型

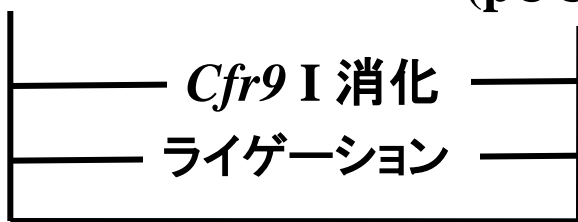
不可逆阻害

化合物	I ₅₀ 値(mM)
ネオスチグミン	4.2
カルバミルコリン	5.9
エゼリン	2.1
DIPF	3.1

DIPF: ジイソプロピルホスホフルオリデート

微生物由来AChE遺伝子のクローニング

Pseudomonas
aeruginosa PAO1 プラスミドDNA
ゲノム DNA (pUC18)



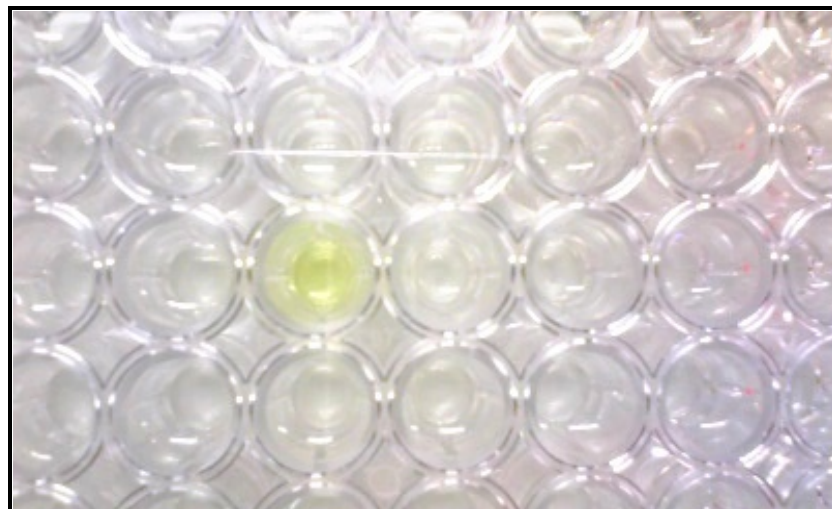
形質転換 (*E. coli* DH5 α)

形質転換体
(2,000菌株)

酵素活性による選抜

AChE活性保有菌株
(*E. coli* AEA株)

挿入DNA: 約7 kbp



AChE 生産性の比較

菌株名	酵素活性 (unit/l 培養液)	比活性 (unit/mg protein)
PAO1株	15.4	0.0039
AEA株	26.0	31.0

微生物由来AChE遺伝子の塩基配列

挿入DNA(約7 kbp)の全塩基配列を決定

1個のORFが存在

PA4921の塩基配列と一致

ORF名	塩基数 (bp)	GC含量 (%)	アミノ酸 残基数	分子質量 (Da)	pI	推定 タンパク質
PA4921	924	70	307	33,540	8.5	機能未知 タンパク

PA4921がアセチルコリンエステラーゼであることが明らかとなった。

AChEのアミノ酸配列

1	MRTRLPALLL	GVLLAGQACG	HTSPLLAPVR	QIHAFGDSYS	40
41	DNGESQRLTR	EMLAKGIAGA	QALPGEVYWQ	GRWSNGPTAV	80
81	EVLARQLGAQ	LADHAVGGAK	SGADNYYGWM	SAYRHTGLAG	120
121	QVDAYLATLD	GKPVDGQALH	FIFVSANDFE	EHEDFAGEQP	160
161	LEQLAGSSVA	NIRAAVQRLG	EAGARRFLVV	SSTDLSVPA	200
201	VVAGNRVERA	QRYLQAVNAS	LPIQLAALRK	TRGLELSWFD	240
241	HLTFSRHLRR	NPARYGLVEL	DAPCQPTQPS	VRPACANPDQ	280
281	YYFWDEWHPT	RRVHQLAGEA	MAARYAR		307

P. aeruginosa PAO1のAChEはLipase-GDSL-familyに属する

大量発現系の構築 (I)

pET24b, pCold TFベクターの特徴

① pET24b

- ・バクテリオファージT7シグナル
- ・His-tag (翻訳後 分子量 0.93 kDa)
- ・常温(25°C)で発現誘導可能

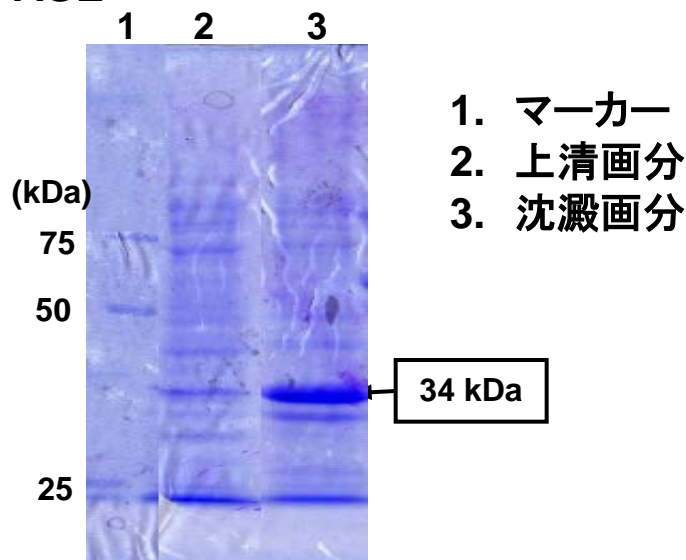
② pCold TF

- ・コールドショックベクター
 - ・His-tag (翻訳後 分子量 0.93 kDa)
 - ・可溶化タグ (翻訳後 分子量 48 kDa)
- 融合型タンパク質
- ・低温で発現(15°C)

結果

- ① pET24b: 大量発現したが不溶性タンパク質となり活性を有する酵素は得られなかった。

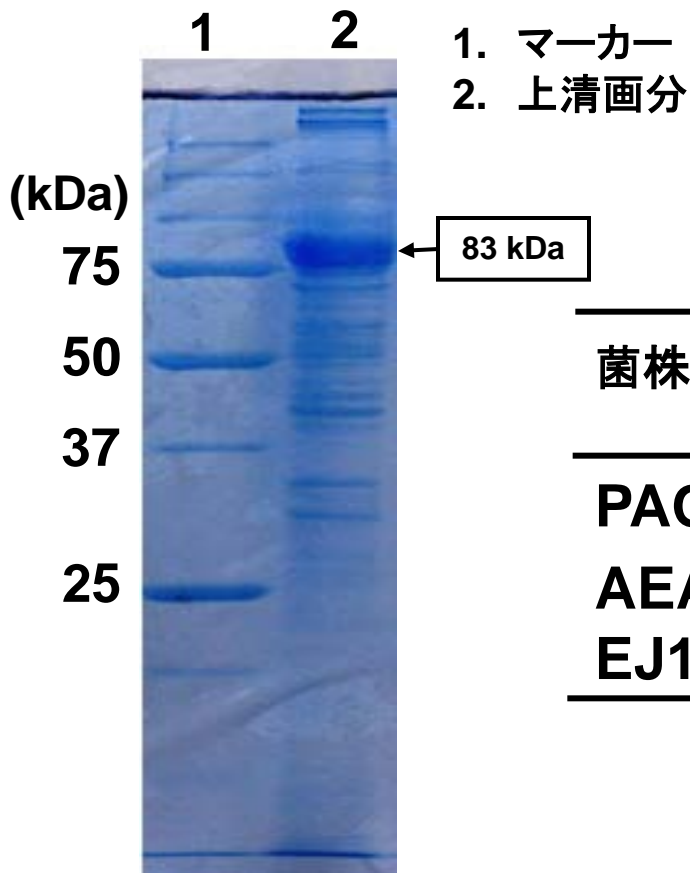
SDS-PAGE



大量発現系の構築(Ⅱ)

結果

② pCold TF: 大量発現し, 活性を有する可溶性融合タンパク質
(分子質量: 84 kDa)として得られた.



AChE 生産性の比較

菌株名	酵素活性 (unit/l 培養液)	比活性 (unit/mg protein)
PAO1株	15.4	0.0039
AEA株	26.0	31.0
EJ1株	33680	184.6

基質特異性の比較

基質	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A-16	
	相対活性 (%)	Km値 (mM)	相対活性 (%)	Km値 (mM)
アセチルチオコリン	100	0.086	100	0.15
プロピオニルチオコリン	140	0.094	85	0.22
ブチリルチオコリン	1.4	-	-	-
アセチルコリン	69	0.125	94	0.19
プロピオニルコリン	92	0.118	80	0.23
ブチリルコリン	0.9	-	-	-
4-ニトロフェニル酢酸	16	-	-	-
4-ニトロフェニルプロピオン酸	99	-	-	-
4-ニトロフェニル酪酸	3	-	-	-
4-ニトロフェニルオクタン酸	+	-	-	-
4-ニトロフェニルパルミチン酸	なし	-	-	-

-; テストせず +; 微弱

AChE基質特異性の比較

由来生物	相対活性(%)			
	アセチル チオコリン	プロピオニル チオコリン	アセチル コリン	プロピオニル コリン
細菌 (<i>P. aeruginosa</i> PAO1)	100	140	69	92
細菌 (<i>P. aeruginosa</i> A-16)	100	85	94	80
電気ウナギ (<i>E. electricus</i>)	100	41	380	147
単子葉植物 (トウモロコシ)	100	114	10	8
双子葉植物 (牧草)	100	157	2	2

結果

- * *Pseudomonas aeruginosa* PAO1のAChE遺伝子のクローニングに成功し, PA4921であることを明らかにした.
- * 大量発現系を構築し, 1リットルの培養菌体から約3万ユニットの酵素活性が得られた.
- * 本酵素はアセチルコリン, プロピオニルコリン, アセチルチオコリン, プロピオニルチオコリン, 4-ニトロフェニルプロピオン酸を加水分解した.

想定される用途

- * 本酵素は残留農薬分析キットや農薬センサーに利用できる。
- * 新たなコリンエステラーゼ阻害剤の探索に利用できる。
- * DL-カルニチンの光学分割に利用できる。

想定される業界

- * 医薬，農薬，機能性食品製造業界
- * 新薬などの新奇機能性物質の創成・開発研究

本技術に関する知的財産権

- ・ 発明の名称 : アセチルコリンエステラーゼ遺伝子
- ・ 出願番号 : 特願2010-27470
- ・ 出願人 : 国立大学法人 鳥取大学
- ・ 発明者 : 森 信寛

産学連携の経歴

- ・ 2003年-2004年 旭化成株式会社と共同研究実施
- ・ 2008年-2009年 白雪食品株式会社と共同研究実施

お問い合わせ先

鳥取大学 農学部 生物資源環境学科

微生物工学分野・教授 森 信寛

TEL:0857-31-5443

FAX: 0857-31-5347

e-mail: morinobu@muses.tottori-u.ac.jp

鳥取大学 産学・地域連携推進機構

知的財産管理運用部門長・教授 三須 幸一郎

TEL:0857-31-6000

FAX:0857-31-5474

e-mail: chizai@adm.tottori-u.ac.jp