

微生物由来ステロイドスルファターゼ遺伝子のクローニング

バイオスタッフ 室伏敬太 太田俊也

Cloning of steroid sulfatase genes of *Flavobacterium* sp. MS-3

Keita Murofushi and Toshiya Ohta

1. 緒言

沼津工業技術支援センターで保有する微生物 *Flavobacterium* sp. MS-3 株¹⁾は、2種類のステロイドスルファターゼSTS1およびSTS2をわずかな量であるが生産することがこれまでの研究で分かっている。ステロイドスルファターゼは硫酸ステロイド化合物の硫酸基を加水分解する酵素であり、ヒトの体内ではホルモン物質の調整、古くなった角質細胞の剥離作用など重要な役割を担っている。ステロイドスルファターゼ活性阻害物質は乳がん治療薬としての効果が認められており、ある種の遺伝性皮膚疾患に対してはステロイドスルファターゼの塗布による症状緩和が報告されるなど、ステロイドスルファターゼに関する様々な研究が行われている^{2), 3)}。

そこで本研究では、MS-3株由来ステロイドスルファターゼを大腸菌に生産させることを目的として、ステロイドスルファターゼ遺伝子配列の解析を試みた。大腸菌に生産させることでステロイドスルファターゼの収量は飛躍的に増え、精製工程は非常に簡便になる。また、遺伝子配列の操作によるステロイドスルファターゼの機能改良も可能になり、ステロイドスルファターゼの応用研究の発展に貢献すると期待される。

2. 実験操作

2.1 ショットガンクローニング法

MS-3株の染色体遺伝子を種々の制限酵素で切断してプラスミドベクターpUC19に組み込み、大腸菌へ導入した。STS1は発色基質p-ニトロフェニル硫酸 (PNP-S) を分解して黄色物質を生じるため、PNP-Sを添加した寒天培地上で培養することでSTS1遺伝子が導入された大腸菌が形成するコロニー

周辺が黄色に染まると予想した。

2.2 PCRクローニング法

既に公開されている他の微生物由来のスルファターゼ遺伝子配列を参考にして、スルファターゼの保存領域に対応するPCRプライマーを作成した。MS-3株染色体遺伝子を鋳型とするPCR反応を行い、特徴的な増幅を示した遺伝子断片の配列をDNAシーケンサーで解析することでスルファターゼ遺伝子配列の獲得を試みた。

3. 結果と考察

MS-3株は増殖とともに多量の粘性物質を産生するため、市販の遺伝子抽出キットを使用するとフィルターが目詰まりしてしまい遺伝子を抽出することができなかった。そこで、フェノールクロロホルムを用いる一般的な手法⁴⁾による精製を検討した。リゾチウム・プロテアーゼ処理を長時間かけて丁寧に行う、フェノールクロロホルム抽出操作を何度も繰り返すなどの改良を加えることで、粘性物質を含むMS-3株から純度の高い染色体遺伝子を回収することができた。(図1、レーン①)

ショットガンクローニング法の結果を以下に示す。MS-3株染色体遺伝子に対して制限酵素Sau3AI、EcoRI、BamHI、HindIII、PstI、XbaIおよびKpnI処理を施し、染色体遺伝子を適当な大きさの遺伝子断片に切断した(図1、レーン②-⑧)。ステロイドスルファターゼ遺伝子およびプロモーター配列を含むと予測される約2,000~8,000塩基長の遺伝子断片を回収して大腸菌へ導入した。合計で 9×10^4 程度の大腸菌を評価したが(表1)、ステロイドスルファターゼSTS1を生産してコロニー周辺に黄色を呈する大腸菌株は現れなかった。

【ノート】

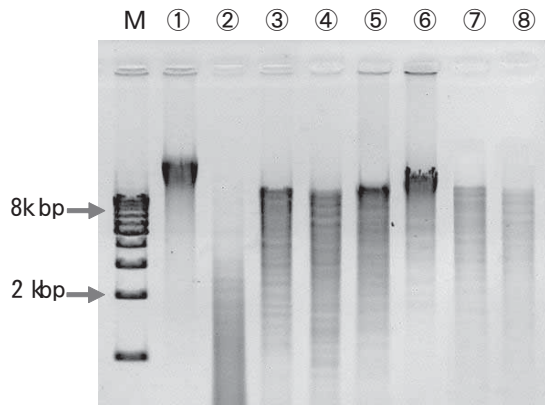


図1 MS-3株染色体遺伝子に対する各種制限酵素処理

表1 クローニングに用いた制限酵素と評価したコロニー数

使用した制限酵素	評価したコロニー数
Sau3AI	1 × 10 ⁴
EcoRI	2 × 10 ⁴
BamHI	2 × 10 ⁴
HindIII	2 × 10 ⁴
PstI	5 × 10 ³
XbaI	5 × 10 ³
KpnI	1 × 10 ⁴
合計	9 × 10 ⁴

ショットガンクローニング法ではステロイドスルファターゼのクローニングを行うことができなかった。MS-3株と大腸菌では生物種が異なるために、MS-3株の由来のステロイドスルファターゼ遺伝子とプロモーター配列をそのまま大腸菌へ導入しても発現が起こりにくいことが理由として考えられる。

一方、PCRクローニング法の結果を以下に示す。DDBJ等のDNAデータベースで公開されている様々な微生物種由来のスルファターゼ遺伝子配列を比較したところ、保存性の高い遺伝子配列領域が存在することが判明した。保存領域に対応する遺伝子配列をPCR用プライマーとして作製して（データ非公開）、MS-3株染色体遺伝子を鋳型とするPCR反応を行ったところ、プライマーの組合せに応じた遺伝子の増幅が確認された（図2、レーン①-⑯）。特に強い増幅を示した遺伝子断片を精製して、DNAシーケンサーによる遺伝子配列解析を網羅的に行ったところ、STS1およびSTS2と推定される遺伝子配列を決定することに成功した。STS1とSTS2の遺伝子配列はこれまで報告されている他の微生物種由来

のスルファターゼと相同性が低く、2つのステロイドスルファターゼは共に新規性の高い遺伝子配列を有していることが分かった（データ非公開）。

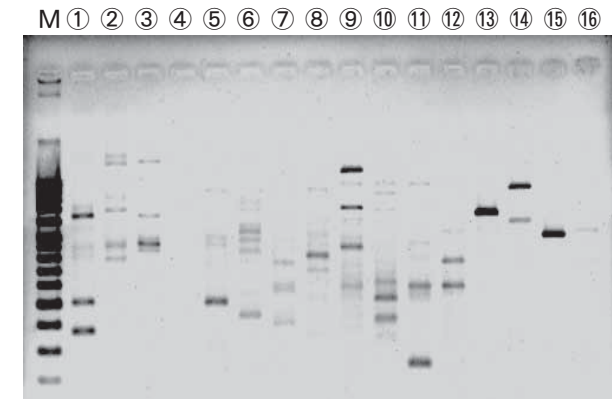


図2 クローニング用プライマーを用いたPCR結果

4. まとめ

PCRクローニング法によってMS-3株由来ステロイドスルファターゼSTS1およびSTS2の遺伝子配列解析に成功した。現在は2種のステロイドスルファターゼ遺伝子を大腸菌へ導入して大量発現系の構築を試みている。

参考文献

- 1) 山岸政昭, 大石一男, 太田俊也, 戸塚好之, 田村真有子, 芳野恭士: 海洋性細菌の生産するスルファターゼの探索, 静岡県沼津工業技術センター研究報告, 4, 15-18 (1996).
- 2) Stanway SJ, Purohit A, Woo LW, Sufi S, Vigushin D, Ward R, Wilson RH, Stanczyk FZ, Dobbs N, Kulinskaya E, Elliott M, Potter BV, Reed MJ, Coombes RC. (2006) Phase I study of STX 64 (667 Coumate) in breast cancer patients: the first study of a steroid sulfatase inhibitor, Clin Cancer Res, 1; 12(5): 1585-92.
- 3) T. Yoshiike, T. Matsui, T. Kimura, H. Yamada and H. Ogawa (1985) The effect of steroid sulphatase on stratum corneum shedding in patients with X-linked ichthyosis, Br. J. Dermatol, 113, 641-643.
- 4) 生物学実験書改定版 (2002), 培風館, 160-162.