

博士論文

原生生物におけるフォスファゲンキナーゼの進化と機能

平成 30 年 3 月

高知大学大学院 総合人間自然科学研究科

応用自然科学専攻

矢野 大地

目次

第一章	ヨツヒメゾウリムシの AK3 酵素の基質阻害メカニズムの解明	1
	要旨	2
	序論	4
	材料と方法	6
	結果	11
	考察	13
	図表	19
第二章	原生生物のフォスファゲンキナーゼの分布と酵素特性	28
	要旨	29
	序論	31
	材料と方法	32
	結果と考察	33
	図表	39
第三章	環形動物フォスファゲンキナーゼの分布と酵素特性	46
	要旨	47
	序論	48
	材料と方法	49
	結果と考察	50
	図表	54
	謝辞	60
	引用文献	61
	付録 1 テクニカルノート	68
	付録 2 遺伝子合成時に使用したプライマー	80
	付録 3 参考論文及び発表論文のリストとコピー	94

第一章

ヨツヒメゾウリムシの AK3 酵素の基質阻害メカニズ ムの解明

要約

フォスファゲンキナーゼ(PK)とは ATP の γ -リン酸基をグアニジド化合物に転移し、ADP とグアニジドリノ酸化合物(フォスファゲン)を産生する反応を触媒する酵素である。PK は多くの動物で見いだされており、細胞内の ATP 濃度の調節や輸送を担っていると考えられている。

原生生物であるヨツヒメゾウリムシ (*Paramecium tetraurelia*) では、ゲノム上に PK の一種である、アルギニン基質とするアルギニンキナーゼ(AK)が見いだされている。ヨツヒメゾウリムシはゲノム上で AK が 4 種類存在していた。これらの AK (AK1-AK4)の酵素パラメーターは既に決定されているが、そのうちの AK3 は高濃度の基質アルギニンに対して顕著な活性の低下が見られる。この現象は基質アルギニン自身による阻害、すなわち基質阻害であると考えられる。基質阻害は基質が本来の結合部位に加えて、さらに別の部位に結合することによって活性が阻害される現象である。AK においてこのような基質阻害は初の発見であった。

今回の研究では AK3 の基質阻害のメカニズムの詳細な解析を行った。AK3 の基質阻害は、予備的に最も簡単な反応機構モデルで解析されていたが、基質濃度と酵素反応速度の関係が実測値と理論値で大きく異なる部分が見られた。これは、基質阻害のメカニズムが簡単なモデルでは説明できない事を示している。

そこで AK3 の反応機構を詳細に解析するため、これまでのモデルに加え、新たに 2 種類の反応機構モデルを使って解析を行った。3 種類のモデルを用いて酵素パラメーターを決定し、それぞれのモデルにおいて、実測値との一致度を示す絶対係数(R^2)、赤池情報量基準(AICc)、及び残差の標準偏差を示す $S_{y,x}$ の三つの統計パラメーターを比較した。結果として、最適なモデルは、第二の結合部位への基質の結合が第一結合部位の結合後のみに起こると仮定し、酵素反応は酵素基質複合体である ES と SES の 2 つの反応経路がある、第 2 モデルであると示唆された。また、得られた酵素パラメーターから、それぞれのモデルにおけるアルギニン基質濃度[S]と酵素状態の[E], [ES], [SES], [SE]の関係をシミュレートした。この結果、第 1 モデルのみで仮定した[SE]は最大でも 3%しか存在しないことが分かった。このことから、第 2 モデルを使用する妥当性が支持される。

第 2 モデルの酵素パラメーターから、AK3 の基質阻害の酵素特性を考察した。ES 複合体の最大反応速度を V_{\max}^{ES} とし、第一及び第二のアルギニン基質結合時(SES 複合体)の最大反応速度を V_{\max}^{SES} としたとき、 V_{\max}^{SES} ($30.37 \mu\text{moles Pi min}^{-1}\text{mg protein}^{-1}$)は V_{\max}^{ES} (241.7)の 8 分の 1 に低下していた。また、ES 複合体の解離定数($K_m^{ES} = 0.607 \text{ mM}$)は、SES が ES に解離する解離定数($K_i^{SES} = 0.34 \text{ mM}$)のおよそ 2 倍であった。これは、第一部位にアルギニンが結合すると、第二部位にアルギニンが結合しやすくなることを示している。アルギニン基質濃度と[ES]及び[SES]の関係をシミュレートした結果、アルギニン濃度の上昇に伴い[SES]が[ES]よりも極端に高くなっていた。

また、ヨツヒメゾウリムシの生体内アルギニン濃度が、同じ繊毛虫であるテトラヒメナの生体内アルギニン濃度(6~15 mM)と同程度と仮定すると、生体内では常に基質阻害が起こる状態でAK3が機能していると考えられる。

AK3の基質阻害の解明のために、すでに6種類の変異体が作製されており、その内のS79A, S80A, V81A変異体において、詳細な酵素活性測定を行い3種類のモデルを用いた解析を行った。この結果、AK3のアミノ酸残基S79は基質阻害のメカニズムに深く関与していると示唆された。アミノ酸Q80は基質阻害に関与している可能性が低く、アミノ酸V81は基質阻害に関与していると示唆された。

節足動物のカブトガニやエビなどでは、AKの立体構造や基質アルギニンの結合部位が判明している。今回はAK3の第二アルギニン結合部位を特定するためにAK3の結晶化を試みた。基質を添加していないApoAK3では、0.2 M 酢酸ナトリウム(pH 9.0)と沈殿剤となる20% PEG10000存在下で結晶化し、ADPとアルギニンの基質を添加したAK3基質複合体においては、0.2 M 硫酸アンモニウム (pH 10.0)の緩衝液中、沈殿剤となる20% PEG1000~10000存在下で結晶が得られた。いずれの結晶も針状結晶であった。現在結晶化条件を最適化中である。

序論

フォスファゲンキナーゼ(PK)とは ATP の γ -リン酸基をグアニジド化合物に転移し, ADP とグアニジドリノ酸化合物を産生する反応を触媒する酵素である (Morrison and James, 1965).

PK



PK は様々な動物において分布しており, 細胞内の ATP の濃度調節や輸送に関与していると考えられている(Ellington, 2001). 脊椎動物においてはPKとして, クレアチンをグアニジド化合物の基質とするクレアチンキナーゼ(CK)のみ分布しているが, 非脊椎動物ではCKに加えて, アルギニンキナーゼ(AK), グリコシアミンキナーゼ(GK), ロンブリシンキナーゼ(LK), タウロシアミンキナーゼ(TK), ハイポタウロシアミンキナーゼ(HTK), オフェリンキナーゼ(OK)などが分布している (Uda et al., 2005a; Van Thoi et al., 1966; Ellington, 2001).

AK は単細胞生物においても見いだされており, 細菌である *Desulfotalea psychrophila* や繊毛虫であるテトラヒメナ(*Tetrahymena pyriformis*)等で報告されている (Suzuki et al., 2013; Andrews et al., 2008; Michibata et al., 2014). また近年では, 原生物の不等毛植物門に属する疫病菌(*Phytophthora infestans*)やシオミドロにおいてTKが見いだされた (Uda et al., 2013; Palmar et al., 2013; 八重尾 2016). 祖先型PKとしてはAKが有力である (Andrews et al., 2008; Suzuki et al., 2013).

本研究で用いられた繊毛虫ヨツヒメゾウリムシ(*Paramecium tetraurelia*)は, 2006年に全ゲノム配列が解読された(Aury et al., 2006). ヨツヒメゾウリムシでは, 植物や酵母においてよく見られるゲノム倍加が3度起きている(Aury et al., 2006). この全ゲノム配列には, AK遺伝子に類似した配列が約8種類存在している. その中で機能ドメインを完全に保持しているのは4種類 (AK1~AK4)である (Uda et al., 2006; Magida and Fraga, 2007).

ヨツヒメゾウリムシの4種類のAKの酵素パラメーターは既に決定されている(Yano et al., 2017). そのうちのAK3においては, 高濃度の基質アルギニンに対して顕著な活性の低下が見られる. この現象は基質アルギニンに対する基質阻害によるものと考えられる. 基質阻害とは酵素が基質と結合後, さらに別の部位に基質が結合し活性を阻害する現象である. 現在までに発見された酵素の約20%は高濃度の基質中で基質阻害が起こると考えられている(Chaplin et al., 1990). また, 基質阻害は生体内で, 生成物の濃度調節を担うなど重要な生物学的意義を持つ場合があることが知られている (Reed et al., 2010). PKにおける基質阻害の報告としては, ヒトにおけるCKの逆反応(ATP合成の方向)において, クレアチンリン酸による基質阻害が知られている(Szasz et al., 1976). その後, イヌ心臓CK, マウスCK, 及びウシ心臓CKにおいて同様な阻害が報告されている(Mickelson et al., 1985). ま

た、タマシキゴカイ (*Arenicola brasiliensis*) のミトコンドリア型 TK では、K95Y 変異体において、AK3 と同様な TK の正反応において、基質タウロシアミンによる基質阻害が報告されている (Tanaka et al., 2011).

今回の研究では野生型 AK3 の基質阻害の詳細な解析を行った。AK3 の基質阻害は、予備的に簡単な反応機構モデルで解析されていたが、基質濃度と酵素反応速度の関係が実測値と理論値で大きく異なる部分が見られた。これは AK3 の反応機構が、簡単な基質阻害のモデルでは説明できない事を示している。

AK3 の反応機構を詳細に解析するため、3 種類の反応機構モデルを用いて解析を行った。以下では、本来のアルギニン結合部位を第一結合部位、別の部位のアルギニン結合部位を第二結合部位とする。第 1 の反応機構モデルは、酵素 (E) と基質 (S) の結合時に、第一結合部位に結合状態を ES、第二部位結合状態を SE の両方がランダムに結合し、基質が第一結合部位のみに結合しても (ES)、また第一と第二の両方に基質が結合した状態 (SES)、酵素反応が起こると仮定したモデルである (Lin et al., 2001)。第 2 のモデルは、第二の結合部位への基質の結合が第一結合部位の結合後のみに起こると仮定しており (SE が存在しない)、酵素反応は第 1 モデルと同様に起こる。第 3 のモデルは、第二部位への結合が第一部位への結合後のみに起こり、かつ第二部位に結合した場合の酵素基質複合体は反応しないと仮定している最も簡単なモデルである。これら 3 種類のモデルを用いて酵素パラメーターを決定し、それぞれのモデルにおいて、実測値との一致度を示す絶対係数 (R^2)、赤池情報量基準 (AICc)、及び残差の標準偏差を示す $S_{y,x}$ の三つの統計パラメーターを比較した。

AK3 の基質阻害の解明のために、AK3 の変異体が 6 種類 (D77A, D78A, S79A, Q80A, V81A, Q80S) 作製され、それぞれは最も簡単なモデルで解析されている (鈴木貴也 2015; Yano et al., 2017)。今回はその内 S79A, S80A, 及び V81A 変異体において詳細な酵素活性測定を行い、3 種類のモデルを用いた解析を行った。

AK の結晶立体構造解析はカプトガニ AK で初めて行われ、基質であるアルギニンや ATP の結合部位が決定された (Zhou et al., 1998)。その後、クモ AK, トリパノソーマ AK, バナメイエビ AK, ナマコ AK, 及びイソギンチャク AK の結晶構造解析が行われた (Wu et al., 2010; Wang et al., 2015; López-Zavala et al., 2013; Laino et al., 2017)。今回は、ヨツヒメゾウリムシ AK3 の第二結合部位を特定するために、その結晶化を試みた。

材料と方法

1. 298 位の変異体作製及び酵素パラメーターの決定

ヨツヒメゾウリムシの AK3 と AK4 の遺伝子は、既に作製されたプラスミドを使用した(弘川 2014, 矢野 2015). この二つのプラスミドに部位特異的変異導入を行った(テクニカルノート参照). 変異体作製時に使用したプライマーは Table1-1 に示した. また変異を導入した部位は Fig. 1-1 で示した. その後, それぞれの変異体のリコンビナントタンパク質を大腸菌に発現させ, His-tag を用いた精製を行った(テクニカルノート参照). 精製した変異体を用いて酵素活性測定を行い, 酵素パラメーターを Sigma Plot12 を使って算出した.

2. 基質阻害における方程式の導出

AK3 の基質阻害の解析を行うために三つの反応機構モデルにおける反応速度式を導出した.

(A) 第 1 モデルの反応速度式の導出

第 1 の反応機構モデルでは, 酵素が基質との結合時, 第一結合, 第二結合の順序が決まっておらずランダムに結合し, 基質が第一結合部位のみに結合した場合と, 第一と第二の両方に結合した場合に酵素反応が起こると仮定したモデルである (Lin et al. 2001).

第 1 モデルの反応機構を図は Fig. 1-2 で示した.

それぞれのパラメーターは

V_{\max}^{ES} : 基質が第一結合部位のみに結合した時の最大反応速度

V_{\max}^{SES} : 基質が第一結合部位と第二結合部位の両方に結合した時の最大反応速度

K_m^{ES} : 酵素と本来の基質複合体(ES)の解離定数

K_{di}^{SE} : 酵素と第二アルギニン結合複合体(SE)の解離定数

K_{ss}^{SES} : 酵素基質複合体(SES)が SE に解離する時の解離定数

K_i^{SES} : 酵素基質複合体(SES)が ES に解離する時の解離定数

である.

図において, それぞれの過程の解離定数は, 以下の様に表される.

$$K_m = [E][S]/[ES]$$

$$K_{di} = [E][S]/[SE]$$

$$K_i = [ES][S]/[SES]$$

$$K_{ss} = [SE][S]/[SES]$$

以上の関係から

$$K_{ss}/K_m = K_i/K_{di}$$

となるので、これを α とおく事ができる。

一方、酵素の保存式は

$$[E_0] = [E] + [ES] + [SE] + [SES]$$

[E], [SE], [SES]を、解離定数と[ES]を使って表すと

$$[E] = K_m[ES]/[S]$$

$$[SE] = [E][S]/K_{di}$$

$$[SES] = [ES][S]/K_i$$

これを酵素の保存式に代入し、[ES]を求めると

$$[ES] = [E_0]/(K_m/S + 1 + S/K_i + K_m/K_{di})$$

ES 複合体の反応速度を v_1 とし、その反応速度定数を k_1 とすれば、

$$v_1 = k_1 [ES]$$

また、SES 複合体の反応速度を v_2 とし、その反応速度定数を k_2 とすれば

$$v_2 = k_2 [SES]$$

[SES]を[ES]を使って表すと

$$v_2 = k_2 [ES][S]/K_i$$

ここで $V_{\max}^{ES} = k_1[E_0]$, $V_{\max}^{SES} = k_2[E_0]$

であるので全体の反応速度 v は以下の式で表される。

$$\begin{aligned} v &= v_1 + v_2 = k_1[ES] + k_2[ES][S]/K_i \\ &= k_1[E_0]/(K_m/[S] + 1 + [S]/K_i + K_m/K_{di}) + k_2[E_0]/(K_m/[S] + 1 + [S]/K_i + K_m/K_{di})([S]/K_i) \quad \text{---①} \end{aligned}$$

上記の式を、 $V_{\max}^{ES} = k_1[E_0]$, $V_{\max}^{SES} = k_2[E_0]$ を使って表すと

$$v = (V_{\max}^{ES} + V_{\max}^{SES}[S]/K_i)/(K_m/[S] + 1 + [S]/K_i + K_m/K_{di}) \quad \text{---②}$$

(B)第2モデルの反応速度式の導出

第2モデルは、第二アルギニン結合部位への結合が、第一結合部位への結合後にのみ起こる場合であり、酵素反応は第一モデルと同様に起こると仮定している。

第2モデルは、第1モデルの K_{di} が K_m よりも十分大きいときに成り立つ。

第2モデルの反応機構を図は Fig. 1-3 で示した。

第2モデルの反応機構は以下の通りである。

②式において、 $K_{di} = \infty$ とみると

$$v = (V_{\max}^{ES} + V_{\max}^{SES}[S]/K_i)/(1 + K_m/[S] + [S]/K_i) \quad \text{---③}$$

(C)第3モデルの反応速度式の導出

第3モデルは第二部位への結合が第一部位への結合後にのみ起こる場合で、最も簡単なモデルとなり、第二部位に結合した場合酵素基質複合体は反応しない。

第3モデルの反応機構を図は Fig. 1-4 で示した。

第3モデルの反応機構は以下の通りである。

③式において、 $V_{max}^{SES}=0$ とおくと

$$v=V_{max}^{ES}/(K_m/S+1+[S]/K_i)$$

3. Sigma Plot を用いての各モデル酵素パラメーターの計算方法

第1モデルと第2モデルに対する Sigma Plot の Enzyme Kinetics の反応方程式が存在しないため、すでに存在する第3モデルの方程式を改変し、新しい反応速度式を入力した。入力方法は Sigma Plot のファイルに存在する Enzyme Kinetics notebook (.jnb) ファイルを開き、第3モデルの式(Sigma Plot ではその名称は Substrate Inhibition (Uncompetitive)) を選択後 Edit code をクリックし、改変を行った。

第1モデルでは Equation の枠に

$$v=(V_{max}*(1/K_s+beta*S/(alpha*K_s*K_i)))/(1/S+1/K_s+1/K_i+S/(alpha*K_s*K_i))$$

fit v to V

"fit v to V with weight reciprocal_V

"fit v to V with weight reciprocal_Vsquare

Initial parameters の枠に

$V_{max} = \text{if}(\text{max}(S) > \text{xatymax}(S, V, 0.1), \text{max}(V) * \text{xatymax}(S, V, 0.1), 2 * \text{max}(V))$ "Auto

$K_s = \text{if}(\text{max}(S) > \text{xatymax}(S, V, 0.1), \text{xatymax}(S, V, 0.1), \text{x}50(S, V, 0.1))$ "Auto

$K_i = \text{if}(\text{xatymax}(S, V, 0.1) = 0, \text{max}(S)/10, \text{xatymax}(S, V, 0.1))$ "Auto

$\alpha = 0.08$ "Auto {{previous: 0.475381}}

$\beta = 0.1$ "Auto {{previous: 0.475381}}

Variables の枠に

$S = \text{col}(1)$

$V = \text{col}(2)$

' Weighting Functions

```
reciprocal_V=if(V<=0, 0/0, 1/V)
reciprocal_Vsquare=if(V<=0, 0/0, 1/V^2)
```

constraints の枠に

```
Vmax>0
```

```
Ks>0
```

```
Ki>0
```

```
alpha>0
```

```
beta>0
```

これらをそれぞれ入力後, Save as をクリックして保存した.

第2モデルでは

Equation の枠に

```
v=(Vmaxs+Vmaxi*S/Ki)/(1+Km/S+S/Ki)
```

```
fit v to V
```

```
"fit v to V with weight reciprocal_V
```

```
"fit v to V with weight reciprocal_Vsquare
```

Initial parameters の枠に

```
Vmaxs = if(max(S)>xatymax(S,V,0.1),max(V)*xatymax(S,V,0.1),2*max(V)) "Auto
```

```
Vmaxi = if(max(S)>xatymax(S,V,0.1),max(V)*xatymax(S,V,0.1),2*max(V)) "Auto
```

```
Km = if(max(S)>xatymax(S,V,0.1), xatymax(S,V,0.1), x50(S,V,0.1)) "Auto
```

```
Ki = if(xatymax(S,V,0.1)=0, max(S)/10, xatymax(S,V,0.1)) "Auto
```

Variables の枠に

```
S=col(1)
```

```
V=col(2)
```

```
' Weighting Functions
```

```
reciprocal_V=if(V<=0, 0/0, 1/V)
```

```
reciprocal_Vsquare=if(V<=0, 0/0, 1/V^2)
```

constraints の枠に

```
Vmaxs>0
```

```
Vmaxi>0
```

```
Km>0
```

```
Ki>0
```

それぞれを入力し **Save as** をクリックして保存した。

4. 野生型 AK3 における 3 種類のモデル検定と酵素パラメーターの決定

Sigma Plot12 あるいは 13 を使い、それぞれのモデルの酵素パラメーターを算出した。以前測定した 24 点の野生型 AK の測定結果 (矢野 2015) をデータとして使用した。またパラメーター算出時に **Sigma Plot** によるモデル検定を行った。

5. AK3 変異体におけるモデル検定と酵素パラメーターの再決定

AK3 変異体が 6 種類作製されているが (鈴木貴也 2015, Yano et al., 2017), その中の S79A, Q80A, V81A において、酵素活性の再測定を行った(テクニカルノート参照)。その後、3 種類のモデルを用いて、それぞれの酵素パラメーターを決定した。また変異を導入した部位は Fig. 1-1 で示した。

6. 結晶構造解析用リコンビナント AK3 の準備

リコンビナント AK3 を発現させ、His-tag を利用したアフィニティークロマトグラフィーにより精製をした(テクニカルノート参照)。精製後の AK3 濃度は約 1 mg/ml であり、10 mM Tris-HCl pH 8.0 バッファーに置換するために透析を行った。その後、限外ろ過膜を用いて AK 酵素を濃縮した。濃縮後の濃度は 10 ~18 mg/ml に調整し、-80°C で保存した。

7. AK3 の結晶化条件の検討

解凍した AK3 を使って、Apo AK3, AK3・アルギニン複合体, AK3・アルギニン・ADP 複合体のそれぞれで結晶化を試みた。AK3・アルギニン複合体においては 40 条件, ApoAK3 と、AK3・アルギニン・ADP 複合体においては 96 条件で結晶化の検討を行った。結晶化の条件は Table1-2 及び 1-3 に示した。Apo AK3 及び AK3・アルギニン・ADP 複合体は 12°C で、AK3・アルギニン複合体は 20°C で結晶化を行った。1 週間後、結晶を実体顕微鏡で観察した。

結果

1. 298 位アミノ酸変異体の作製及び酵素パラメーターの決定

AK3/G298R と AK4/R298G 変異体を作製し、精製した変異体リコンビナントタンパク質を用いて酵素活性測定を行った。精製した酵素を SDS-PAGE により確認した(Fig. 1-5, 1-6)。測定結果からそれぞれの変異体のパラメーターを第 3 モデルで算出し、野生型と比較した(Table 1-4, Fig. 1-7, 1-8)に示した。このパラメーターを野生型と比較すると、AK3 変異体では基質阻害が消失した。野生型と活性が低下し(野生型 AK3 $appV_{max}$ 93.0 $\mu\text{moles}/\text{min}\cdot\text{mg protein}$, AK3/G298R 4.15), 野生型 AK4 の特性とほぼ同じになった(Table 1-4)。逆に AK4 変異体では、基質阻害が現れると共に活性の低下が見られ、一方で活性は上昇し野生型 AK3 と同様になった(野生型 AK4 $appV_{max}$ 4.15, AK4/R298G $appV_{max}$ 91.2) (Table 1-4)。アルギニンの基質親和性を示す K_m は、変異体と野生型を比較しても、ほとんど変化せず変異の影響は見られなかった(AK3 K_m 0.076 mM, AK3/G298R 0.124, AK4 K_m 0.386 mM, AK4/R298G 0.284) (Table 1-4)。

2. 基質阻害における 3 種類の酵素反応式の導出, AK3 野生型のモデル検定及び酵素パラメーターの決定

AK3 の反応機構を詳細に解析するため、これまでのモデルに加え、新たに 2 種類の反応機構モデルを使って解析を行った。第 1 モデルと第 2 モデルの酵素反応式を導出し、酵素パラメーターを算出した。モデル検定のために実測値と理論値の誤差を示す絶対係数(R^2)を初めとして、赤池情報量基準(AICc) 及び残差の標準偏差である $Sy.x$ を比較した(Table 1-5)。絶対係数は値が 1 に近づくほどモデルに一致していることを示す。絶対係数は第 3 モデルが最も値が低く($R^2=0.91181$), 第 1 モデルと第 2 モデルは同じ値を示した($R^2=0.98905$) (Table 1-5)。赤池情報量基準(AICc)は、値が低いほどモデルが適正であると考えられる。AICc は第 2 モデルがもっとも値が低くなった(第 1 モデル AICc= 35.024, 第 2 モデル AICc= 31.417, 第 3 モデル AICc= 78.257) (Table 1-5)。 $Sy.x$ は残差の標準偏差であり、値が低いほどモデルが適正であると考えられる。 $Sy.x$ は第 2 モデルがもっとも値が低くなった(第 1 モデル $Sy.x= 1.63811$, 第 2 モデル $Sy.x= 1.59665$, 第 3 モデル $Sy.x= 4.422$) (Table 1-5)。

これらの結果から、第 2 モデルの反応機構が最も適正であると考えられる。第 2 のモデルは、第二部位へのアルギニンの結合が、第一結合部位への結合後にのみ起こると仮定しており、酵素反応は第一モデルと同様に起こる。このモデルによる理論値は、実測値と良く一致していた(Fig. 1-9)。

3 種類の反応機構モデルを用いて、それぞれのモデルにおける AK3 の酵素パラメーターを算出した(Table 1-6)。第 2 及び第 3 モデルにおいては、酵素パラメーターの誤差も算出されたが、第 1 モデル においては、実測値の不足、式の複雑さ、及びソフトウェアの問題などから誤差算出ができなかった(Table 1-6)。そこで全実測点 24 の内、ランダムに 15 点を抽

出し酵素パラメーターの算出を計 10 回行い、その平均と誤差を算出した(Table 1-6)。また三種類のモデルにおけるそれぞれの酵素パラメーターを元に理論曲線を計算し、実測値と比較した(Fig. 1-9)。

3. AK3 変異体 S79A, S80A, V81A の酵素活性測定と 3 種類のモデルにおける酵素パラメーターの決定

AK3 の基質阻害メカニズムの解明のために、変異体が 6 種類作成されている(鈴木貴也 2015, Yano et al., 2017)。その内 S79A, S80A, 及び V81A において詳細な酵素活性測定を行い、三種類のモデルを用いた解析を行った(Table 1-7 及び 1-8)。モデル検定のために実測値と理論値の誤差を示す絶対係数(R^2)を初めとして、赤池情報量基準(AICc) 及び残差の標準偏差である $Sy.x$ を比較した(Table 1-7)。3 種類の変異体 AK3 では絶対係数(R^2)の値は第 3 モデルが最も値が低く、第 1 モデルと第 2 モデルは同じ値を示した(Table 1-7)。赤池情報量基準(AICc)は全ての変異体で第 2 モデルがもっとも値が低くなった(Table 1-7)。3 種類の変異体では $Sy.x$ の値は第 2 モデルがもっとも値が低くなった(Table 1-7)。これらの結果から、3 種類の変異体においても第 2 モデルの反応機構が最も適切であると判断された(Table 1-7)。

3 種類の反応機構モデルを用いて、酵素パラメーターを算出した(Table 1-8)。第 2 及び第 3 モデルにおいては、酵素パラメーターの計算において、誤差も算出されたが、第 1 モデルにおいては、野生型と同様に誤差算出ができなかった。そこで全実測点 24 点の内、ランダム 15 点を抽出し酵素パラメーターの算出を計 10 回行い、その平均と誤差を算出した。酵素パラメーターの比較を Table 1-8 に示す。また三種類のモデルにおけるそれぞれの酵素パラメーターを元に理論曲線を計算し、実測値と比較した(Fig. 1-10, 1-11 及び 1-12)。

4. リコンビナント AK3 の結晶化

濃縮した AK3 を準備し、SDS-PAGE によりリコンビナント AK3 の精製度を確かめた(Fig. 1-13)。その結果、AK3 が精製し、濃縮されたことを確認した。濃縮した AK3 を用いて蒸気拡散法により、Apo AK3, AK3・アルギニン複合体, AK3・アルギニン・ADP 複合体のそれぞれで結晶化を試みた。AK3・アルギニンにおいては AK3 とアルギニン濃度のモル比を 1:1, 1:25, 1:3000, 1:10000 に変動させた。また、AK3・アルギニン複合体の 1:10000 においては、AK3 濃度が他のモル比よりも低いため、タンパク質を濃縮した後、結晶化を行った。計 5 種の AK3・アルギニン複合体の結晶化を 40 条件で行ったが、結晶は現れなかった。それぞれの条件による結果は Table 1-9 にまとめた。一方、Apo AK3 では 0.2 M 酢酸ナトリウム(pH 9.0)と沈殿剤となる 20% PEG10000 存在下で結晶化し、AK3 に ADP とアルギニンの基質を添加した AK3 基質複合体においては 0.2 M 硫酸アンモニウム (pH 10.0) の緩衝液中で沈殿剤となる 20% PEG1000~10000 存在下において結晶が得られた(Fig. 1-14)。いずれの結晶も針状結晶であった。現在結晶化条件を最適化中である。

考察

1. 変異体 298 の作成及び酵素パラメーターの決定と野生型との比較

AK3 と AK4 のアミノ酸一致率は 93% と非常に高い。しかしその酵素活性は大きく異なっており、AK3 と AK4 の appV_{max} を比較すると、AK4 の appV_{max} (4.38) は AK3 の appV_{max} (93.0) は約 4% まで減少している (Table 1-4)。そこで AK3 と AK4 でアミノ酸が異なる部分を探索してみると (Fig. 1-1)、AK3 の 298 番目グリシン残基が AK4 においてはアルギニン残基に置換されていた。この置換されていた部分を四角の枠で示した (Fig. 1-1)。この部位付近にはアルギニン結合部位である 293 番目のシステイン残基が存在し (Zhou et al., 1998)、AK の活性中心であるとされている (Brevet et al., 1975)。AK4 ではこのような重要な部位付近に変異が入っており、この変異のために活性が低下していると考えられる。

AK3/G298R と AK4/R298G の酵素パラメーターを野生型と比較すると、AK3 変異体では基質阻害が消失するとともに、活性が低下し (野生型 AK3 appV_{max} 93.0, AK3/G298R 4.15)、野生型 AK4 の特性とほぼ同じになった (野生型 AK4 appV_{max} 4.15) (Table 1-4)。逆に AK4 変異体では、基質阻害が現れる一方で活性は上昇し (野生型 AK4 appV_{max} 4.15, AK4/R298G appV_{max} 91.2) 野生型 AK3 と同様になった (野生型 AK3 appV_{max} 93.0) (Table 1-4)。アルギニンの基質親和性を示す K_m は、ほとんど変化せず変異の影響は見られなかった。これらの結果から、AK3 の 298 番目のグリシンは酵素活性と基質阻害時の反応機構に重要であると考えられる。

2. AK3 の基質阻害に対する 3 種類のモデルの構築とモデル検定

AK3 の反応機構を詳細に解析するため、3 種類の反応機構モデルを用いて解析を行った。AK3 の基質阻害時の酵素パラメーターは最も簡単なモデルで決定されていたが (Yano et al., 2017)、このときの基質濃度と酵素反応速度の関係を比較すると (Fig 1-9)、実測値と理論値で大きく異なる部分が見られた。特に、基質が高濃度になるほど酵素活性が減少していくが、AK3 においては通常の基質阻害のモデルで推察されるほどの活性の低下は見られなかった。これは AK3 の基質阻害メカニズムが複雑である可能性を示している。そのために、第 1 及び第 2 モデルを使用した。

3 種類のモデルの検定のためには、実測値と理論値の誤差を示す絶対係数 (R^2) や赤池情報量基準 (AICc) を残差の標準偏差を示す $Sy.x$ の三つのパラメーターを比較した (Table 1-5)。モデル検定の結果、最も適正な反応機構モデルは、第 2 モデルであると考えられる。第 2 のモデルは、第二部位へのアルギニンの結合が、第一結合部位への結合後にのみ起こると仮定しており、酵素反応は第一モデルと同様に起こる。

AK3 の基質阻害時の反応機構は、第 1 モデルで考えられる [SE] の酵素状態は存在せず、AK3 では基質と酵素の結合の順序が決まっている (定常機構) と考えられる。酵素反応は通常の基質阻害の反応機構モデルである第 3 モデルでは考えられていない、酵素状態 [SES] でも

反応すると考えられる。それぞれのモデルにおける酵素パラメーターを元に理論曲線を計算し、実測値と比較した。第 2 モデルによる理論値のグラフは酵素測定時の実測値と良く一致していた(Fig. 1-7)。このことから、AK3 は第 2 モデルの反応機構であると考えられる。

基質阻害の反応においては、24 点の異なる基質アルギニン濃度で測定を行っている。第 1 及び第 2 モデルのような複雑な速度式を使い複数の解離定数を決定するためには、多くの実測値が必要である。例えば、AK4/R298G 変異体は、12 点の異なるアルギニン濃度で二回測定しているが、このデータからは、第 1 及び第 2 モデルの酵素パラメーターを計算することはできなかった。これは、第二結合部位の解離定数である K_{di}^{SE} や V_{max}^{SES} を算出するためには、同じ濃度で複数回測定するよりも、異なる基質濃度を多く測定することが重要であることを示している。

酵素測定は酵素精製後、約三時間以内に行った。AK3 は変異型を含めて失活しやすいため、長時間かけての測定を行うと測定誤差が無視できなくなる。長時間かけて測定し、測定点を増やすことにより、第 1 モデルの誤差は算出される可能性がある。しかし、長時間による測定による失活を考慮し、24 点の異なる基質アルギニン濃度で測定を行っている。

第 1 モデルにおいては酵素パラメーターの誤差を出すことが出来なかった。この原因としては、測定点が少ないことやソフトウェアの問題点挙げられる。第 1 モデルは今回の三種類のモデルの中では最も複雑なモデルである。このような複雑なモデルでは計算が複雑となり、パラメーターの絶対値は収束するものの、その誤差が上手く計算されていない可能性がある。また今回は Sigma Plot において速度式を手入力し、反応速度式は第 3 モデルの式の設定を改変したものである。第 2 モデルでは V_{max}^{SES} を追加した以外は改変していないが、第 1 モデルでは新たに α と $\beta(=V_{max}^{SES} / V_{max}^{ES})$ を変数として追加している。今回のモデルにおいては、 α の初期値は 0.08、 β の初期値は 0.1 と設定した。初期値の設定により計算結果が影響を受ける可能性がある。実際に、 α と β の初期値を変動させると異なる値が算出される。しかし、誤差は算出されていなかった。

α は [ES] と [SE] 状態から、[SES] となる結合時の親和性の変化を表したものである。 $\alpha=1$ の時は第一結合部位と第二結合部位は独立に結合し、 α が 1 から変動すると第一結合部位と第二結合部位はどちらかに基質結合後の相互作用の存在を示している。AK3 では変異体を含めても、 α は 1 より小さくなっている。このことから、AK3 の第一結合部位と第二結合部位は基質結合時に相互作用を示す可能性がある。Lin らの報告では、 α は 1 よりも大きくなると定義されている(Lin et al., 2001)。 α の値が 1 よりも大きいときは、[ES] と [SE] 状態から、[SES] となる結合時の親和性が低下することを示し、 α の値が 1 よりも小さいときは [ES] と [SE] 状態から、[SES] となる結合時の親和性が上昇することを示す。AK3 は変異体を含めても、 α の値は 1 よりも小さくなった。このことから AK3 では [ES] 状態から [SES] 状態になる結合は、[E] から [ES] になる結合よりも親和性が高いと考えられる。実際に最も適正であると考えられた第 2 モデルの [E] から [ES] になる結合の親和性を示す K_m^{ES} (0.61

mM)は[ES]状態から[SES]状態になる結合の親和性を示す K_i^{SES} (0.34 mM)よりも値が大き
く、 K_i^{SES} は K_m^{ES} よりも親和性が2倍高いことを示している(Table 1-6). このことから、
AK3の反応機構はLinらによって導出された第1モデルや通常の基質阻害時のモデルである
第3モデルの反応機構とは異なる可能性がある。

3. 3種類のモデルにおけるAK3の基質阻害の詳細

3種類の反応機構モデルを用いて、それぞれのモデルにおけるAK3の酵素パラメーター
を算出し、比較した(Table 1-6). 第1及び第2モデルの V_{max}^{ES} (第1モデル 292.2, 第2モ
デル 241.7)は V_{max}^{SES} (第1モデル 30.4, 第2モデル 30.4)の約10倍であり、第2結合部
位にアルギニンが結合した状態ではと活性が極端に低下することを示している(Table 1-6).
さらに、第1及び第2モデルでは、 K_i^{SES} (0.34 mM)は K_m^{ES} (0.61 mM)の約半分程度に減
少している。これは第1部位にアルギニンが結合すると、第2部位にアルギニンが前者の2
倍結合しやすくなることを示している。

基質阻害が存在する場合と、存在しない場合の酵素反応曲線の違いを確認するために、
本研究で決定された第2モデルの酵素パラメーターを元に反応曲線を作製し、比較をした
(Fig. 1-15). この反応曲線を比較すると、アルギニン濃度2 mM以上の領域において、阻害
が存在する場合は3倍以上速度低下が起こることを示している。織毛虫であるテトラヒメ
ナにおいて、生体内のアルギニン濃度(6~15 mM)が測定されている(Chung and James.,
1956; 山城 2014). この濃度を同じ織毛虫であるヨツヒメゾウリムシでも同程度だと考慮
すると、AK3は生体内では常に基質阻害が起こる状態で機能していると考えられる。

次に、第1モデルと第2モデルの酵素パラメーターから、 V_{max}^{ES} と V_{max}^{SES} のアルギニ
ン濃度に対する寄与を算出し、比較した(Fig. 1-16). この寄与を比較すると、第1モデルと
第2モデル共に、アルギニン濃度2.8 mMまでは V_{max}^{ES} の寄与が大きい、それ以上では
 V_{max}^{SES} の割合が高くなっていくと考えられる。そして、アルギニン濃度が8 mM以上にな
ると、80%以上が V_{max}^{SES} の反応が寄与し、残り20%が V_{max}^{ES} の寄与になると予想された
(Fig. 1-16). この予想では、生体内では V_{max}^{SES} の反応が主に寄与していると考えられる。

また、得られた酵素パラメーターから、それぞれのモデルにおけるアルギニン基質濃度
とそれぞれの酵素状態[E], [ES], [SES], [SE]の関係をシミュレートした。この結果、第1
モデルのみで仮定した[SE]は最大でも3%しか存在しないことが分かった(Fig. 1-17). 第1
モデルは僅かに第2モデルよりも値が適正ではないと判断されているが(Table 1-5), このシ
ミュレートの結果からも、[SE]の酵素状態は僅かしか存在しないことから、第1モデルの
反応機構モデルは適正でないと考えられる。このことから、第二モデルを使用する妥当
性が支持される。

4. AK3変異体S79A, S80A, V81Aを用いた、AK3の基質阻害の解明

三種類の変異体 (S79A, S80A, V81A)の変異導入部位は(Fig. 1-1)は、PKの基質認識部

位と考えられている GS 領域内にある(Suzuki et al., 1997). AK においては節足動物であるカブトガニ AK の基質結合部位が決定されており(Zhou et al., 1998), Fig. 1-1 ではアルギニン結合部位は青色で示している. GS 領域中のアルギニン結合部位は, アラインメントのナンバリングで 85 番目のセリン, 86 番目のグリシン, 及び 87 番目のバリンである. AK3 のアルギニン結合部位は残基 85 番目のセリン, 86 番目のグルタミン, 及び 87 番目のバリンに相当する.

GS 領域に変異導入すると, 基質親和性や反応速度が大きく変化することが知られている(Tanaka et al., 2011). タマシキゴカイ(*Arenicola brasiliensis*) のミトコンドリア型 TK では, K95Y 変異体において基質阻害が報告されている. この基質阻害を起こす K95Y 変異体にさらに GS 領域に変異を加えて, 酵素測定が行われている. その結果, タマシキゴカイのミトコンドリア型 TK の GS 領域中のカブトガニ AK の基質結合部位に相当する 69 番目のリシンと 71 番目のバリンに変異を導入すると, 基質阻害が消失したことが, 報告されている(Tanaka et al., 2011). 変異体でありかつ基質が異なるが, タマシキゴカイミトコンドリア型 TK では変異体で基質阻害が消失したので, AK3 においても GS 領域中のアルギニン基質結合部位が基質阻害に関与していると予想された. そして, この部位に変異導入され, それぞれは最も簡単なモデルで解析されている(鈴木貴也 2015; Yano et al., 2017).

本研究では, この内の S79A, Q80A, 及び V81A の酵素活性の再測定を行い, モデル検定(Table 1-7)及び酵素パラメーターを決定した(Table 1-8). モデル検定の結果を比較すると, 全ての変異体で, 第 2 モデルのモデル検定の値が最も適正だと判断された(Table 1-7). この結果, 第 2 モデルの反応機構が最も適切であると判断された. また, 得られた酵素パラメーターから, それぞれのモデルにおけるアルギニン基質濃度とそれぞれの酵素状態[E], [ES], [SES], [SE]の関係をシミュレートした(Fig. 1-18, 1-19, 1-20). この結果, S79A 変異体では第 1 モデルのみで仮定した[SE]が最大 24%存在していた. これは α が実測値の第 1 モデルでは 1 以上であり, [ES]と[SE]状態から, [SES]となる結合時の親和性が低下している. このため, [ES]と[SE]状態から, [SES]となる基質の結合が野生型よりも行われないため, [SES]の酵素状態は基質アルギニンが上昇しても上昇せず, [SE]と[ES]が上昇していくと予想されている. この状態がアルギニン濃度 2 mM までは続くがアルギニン濃度が 2 mM 以上になると[SES]の濃度が上昇していくと考えられる. これらのことから, S79A は野生型とは異なり K_i^{SES} は K_m^{ES} よりも親和性が低いと考えられる. 一方 Q80A 及び V81A 変異体では最大でも 3%しか存在しなかった. これらの変異体では, 反応機構は野生型と同じでないと考えられる.

4-1 野生型 AK3 と S79A 変異体の酵素パラメーターの比較

野生型と S79A 変異体の酵素パラメーターを比較すると, 第 2 モデルの V_{max}^{ES} (80.42) が野生型の 1/3(241.7)に減少していたが, V_{max}^{SES} (野生型 30.4: S79A 変異体 29.81)に変化は見られなかった(Table 1-8). AK3 のアミノ酸 S79 残基は, 通常酵素活性に関与してい

るが基質阻害には関与していないと考えられる。変異体の K_m^{ES} は、第 2 モデルでは野生型と同程度だった (Table 1-8)。また、第 2 モデルの野生型の $K_i^{SES}(0.34)$ と変異体の $K_i^{SES}(3.62)$ を比較すると、変異体で 10 倍以上増加しており (Table 1-8)、第 2 結合部位のアルギニンとの親和性が大きく低下していることを示している。これらの結果は、アミノ酸 S79 残基は基質阻害のメカニズムに深く関与している可能性が高いことを示唆する。

タマシキゴカイのミトコンドリア型 TK では、K95Y 変異体に 69 番目のリシンに変異を加えた変異体では、基質阻害が消失したことが、報告されている (Tanaka et al., 2011)。変異体でありかつ基質が異なるが、タマシキゴカイミトコンドリア型 TK の 69 番目のリシン残基と AK3 の S79 残基はカプトガニ AK の GS 領域中に存在するアルギニン結合部位に位置している。これらのことから PK では基質阻害に関わる部位は、変異体であり基質が異なるが、GS 領域中のアミノ酸が関与している可能性がある。

4-2 野生型 AK3 と Q80A 変異体の酵素パラメーターの比較

野生型と Q80A 変異体の酵素パラメーターを比較すると、第 2 モデルでは V_{max}^{ES} (96.26) と V_{max}^{SES} (13.02) が野生型の $1/2(V_{max}^{ES} 241.7 : V_{max}^{SES} 30.4)$ に減少した (Table 1-8)。AK3 のアミノ酸 Q80 残基は、通常の酵素活性と基質阻害の活性発現の両方に関与していると考えられる。また、第 2 モデルの野生型の $K_i^{SES}(0.34)$ と変異体の $K_i^{SES}(0.64)$ を比較すると増加していた (Table 1-8)。これらの結果、アミノ酸 Q80 残基は基質阻害に関与している可能性が低いことが示唆された。

4-3 野生型 AK3 と V81A 変異体の酵素パラメーターの比較

野生型と V81A 変異体の酵素パラメーターを比較すると、第 2 モデルの V_{max}^{ES} (83.00) が野生型の $1/3(241.7)$ に減少し、 V_{max}^{SES} (野生型 30.4: V81A 変異体 14.86) も減少している (Table 1-8)。AK3 のアミノ酸 V81 残基は、通常の酵素活性と基質阻害の活性発現の両方に関与していると考えられる。また、第 2 モデルの K_m^{ES} (0.61) はと変異体の $K_m^{ES}(1.02)$ を比較すると、野生型の 1.6 倍程度に上昇した (Table 1-8)。この比較から変異体 V81A では第一結合部位の親和性が低下していると考えられる。第 2 モデルの野生型の $K_i^{SES}(0.34)$ と変異体の $K_i^{SES}(2.16)$ を比較すると 6 倍以上増加している (Table 1-8)。この比較から変異体 V81A では第二結合部位の親和性が低下していると考えられる。これらの結果、アミノ酸 V81 残基は、基質阻害にある程度関与している可能性が高く、通常時の結合部にも関与していることが示唆された。

5. AK3 の結晶化

計 5 種の AK3・アルギニン複合体の結晶化を 40 条件で行ったが、結晶は現れなかった。結晶化の際に、亜鉛イオン存在下、また pH 3.5~5.5 の範囲の全てにおいて沈殿が見られた。AK3 は pH 3.5~5.5 の範囲では、変性している可能性がある。これを踏まえて、Apo AK3

と AK3・アルギニン・ADP 複合体においては、二価の金属イオンを除きかつ pH7.0~10.0 の 96 条件で結晶化を試みた。この結果、多くの場合では AK3 の沈殿は見られなかった。Apo AK3 では、0.2 M 酢酸ナトリウム(pH 9.0)と沈殿剤となる 20% PEG10000 存在下で結晶化した。ADP とアルギニンの基質を添加した AK3 基質複合体においては、0.2 M 硫酸アンモニウム (pH 10.0) の緩衝液中、沈殿剤となる 20% PEG1000~10000 存在下で結晶が得られた。

Apo AK3 と AK3・アルギニン・ADP 複合体において得られた結晶はすべて針状結晶であった。結晶のサイズは 0.2 mm×0.05 mm であった。現在、結晶化条件を最適化中である。

6. AK3 の基質阻害の生理学的意義

繊毛虫であるテトラヒメナにおいて、生体内のアルギニン濃度(6~15 mM)が測定されている(Chung and James., 1956; 山城 2014)。この濃度を同じ繊毛虫であるヨツヒメゾウリムシでも同程度だと考慮すると、AK3 は生体内では常に基質阻害が起こる状態で機能していると考えられる。一方で、ゾウリムシ(*Paramecium caudatum*)においては AK の反応によって生産されるアルギニンリン酸の濃度(0.4 mM)が測定されている(Noguchi et al., 2001)。生体内ではアルギニンとアルギニンリン酸濃度が 15 倍以上異なっている可能性がある。この濃度比率を維持するために AK3 の基質阻害が存在するかもしれない。

Table1-1 AK3G298R と AK4R298G 変異体作製用プライマーとその配列

Primer Name	Sequence
AK3G298R F	ATGCGTACCGGTAAACGTCAGTCTATCCTGG
AK3G298R R	GTTGGTCGGGCAAGTGGTGATAATGCCGTAA (TTTACGGCATTATCACCACTGCCCGACCAA
AK4R298G F	ATGGGCACTGGTAAGCGTCAGTCTATCCTGG
AK4R298G R	GTTGGTCGGGCAGGTGGTAATAATGCCAAA (GTTTTTGGCATTATTACCACCTGCCCGACCA

Table 1-2 AK3・アルギニン複合体の結晶化の40条件

番号	塩	Buffer	沈殿剤1	沈殿剤2
1		0.1M TRIS hydrochloride pH8.5	2.0M Ammonium sulfate	
2	0.2M Magnesium chloride hexahydrate	0.1M TRIS hydrochloride pH8.5	30% Polyethylene glycol 4,000	
3	0.2M Ammonium acetate	0.1M Sodium citrate tribasic dihydrate pH5.6	30% Polyethylene glycol 4,000	
4	0.2M Ammonium acetate	0.1M Sodium acetate trihydrate pH4.6	30% Polyethylene glycol 4,000	
5	0.2M Sodium citrate tribasic dihydrate	0.1M TRIS hydrochloride pH8.5	30% Polyethylene glycol 400	
6	0.2M Calcium chloride dihydrate	0.1M HEPES sodium pH7.5	28% Polyethylene glycol 400	
7	0.2M Ammonium sulfate	0.1M Sodium cacodylate trihydrate pH6.5	30% Polyethylene glycol 8,000	
8	0.2M Lithium sulfate monohydrate	0.1M TRIS hydrochloride pH8.5	30% Polyethylene glycol 4,000	
9	0.2M Magnesium acetate tetrahydrate	0.1M Sodium cacodylate trihydrate pH6.5	20% Polyethylene glycol 8,000	
10	0.2M Ammonium sulfate	0.1M Sodium acetate trihydrate pH4.6	25% Polyethylene glycol 4,000	
11	0.2M Sodium acetate trihydrate	0.1M TRIS hydrochloride pH8.5	30% Polyethylene glycol 4,000	
12	0.2M Magnesium chloride hexahydrate	0.1M HEPES sodium pH7.5	30% Polyethylene glycol 400	
13	0.2M Sodium acetate trihydrate	0.1M Sodium cacodylate trihydrate pH6.5	30% Polyethylene glycol 8,000	
14	0.2M Ammonium sulfate		30% Polyethylene glycol 8,000	
15	0.2M Ammonium sulfate		30% Polyethylene glycol 4,000	
16		0.1M Sodium acetate trihydrate pH4.6	2.0M Sodium formate	
17		0.1M HEPES sodium pH7.5	0.8M Sodium phosphate monobasic monohydrate	0.8M Potassium phosphate monobasic
18		0.1M HEPES sodium pH7.5	1.4M Sodium citrate tribasic dihydrate	
19		0.1M HEPES sodium pH7.5	2% Polyethylene glycol 400	2.0M Ammonium sulfate
20	0.05M Potassium phosphate monobasic		20% Polyethylene glycol 8,000	
21			30% Polyethylene glycol 1,500	
22	0.2M Zinc acetate dihydrate	0.1M Sodium cacodylate trihydrate pH6.5	18% Polyethylene glycol 8,000	
23	0.2M Calcium acetate hydrate	0.1M Sodium cacodylate trihydrate pH6.5	18% Polyethylene glycol 8,000	
24		0.1M Sodium acetate trihydrate pH4.6	2.0M Ammonium sulfate	
25		0.1M TRIS hydrochloride pH8.5	2.0M Ammonium phosphate monobasic	
26	0.5M Lithium sulfate monohydrate		15% Polyethylene glycol 8,000	
27			10% Polyethylene glycol 1,000	10% Polyethylene glycol 8,000
28	0.1M Cadmium chloride hydrate	0.1M Sodium acetate trihydrate pH4.6	30% Polyethylene glycol 400	
29	0.2M Ammonium sulfate	0.1M Sodium acetate trihydrate pH4.6	30% Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000	
30	0.2M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	0.1M Sodium citrate tribasic dihydrate pH5.6	2.0M Ammonium sulfate	
31	0.5M Ammonium sulfate	0.1M Sodium citrate tribasic dihydrate pH5.6	1.0M Lithium sulfate monohydrate	
32		0.1M MES monohydrate pH6.5	1.6M Magnesium sulfate heptahydrate	
33	0.01M Cobalt(II) chloride hexahydrate	0.1M MES monohydrate pH6.5	1.8M Ammonium sulfate	
34	0.2M Ammonium sulfate	0.1M MES monohydrate pH6.5	30% Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000	
35	0.01M Zinc sulfate heptahydrate	0.1M MES monohydrate pH6.5	25% Polyethylene glycol monomethyl ether 550	
36			1.6M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 6.5	
37	0.1M Sodium chloride	0.1M HEPES pH7.5	1.6M Ammonium sulfate	
38		0.1M HEPES pH7.5	2.0M Ammonium formate	
39		0.1M HEPES pH7.5	20% Polyethylene glycol 10,000	
39	0.2M Magnesium chloride hexahydrate	0.1M Tris pH8.5	3.4M 1,6-Hexanediol	
40	0.01M Nickel(II) chloride hexahydrate	0.1M Tris pH8.5	20% Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000	

Table 1-3 Apo AK3とアルギニン・ADP・AK3複合体における結晶化条件

24の条件でそれぞれBufferのpHをpH 7.0, pH 8.0, pH 9.0, pH 10.0に変動させ計96条件で結晶化を試みた.

番号	Buffer	沈殿剤
1	0.1 M TRIS hydrochloride	20% PEG1000
2	0.1 M TRIS hydrochloride	20% PEG4000
3	0.1 M TRIS hydrochloride	20% PEG8000
4	0.1 M TRIS hydrochloride	20% PEG10000
5	0.2 M Na-acetate	20% PEG1000
6	0.2 M Na-acetate	20% PEG4000
7	0.2 M Na-acetate	20% PEG8000
8	0.2 M Na-acetate	20% PEG10000
9	0.2 M Li-sulfate	20% PEG1000
10	0.2 M Li-sulfate	20% PEG4000
11	0.2 M Li-sulfate	20% PEG8000
12	0.2 M Li-sulfate	20% PEG10000
13	0.2 M NH ₄ -sulfate	20% PEG1000
14	0.2 M NH ₄ -sulfate	20% PEG4000
15	0.2 M NH ₄ -sulfate	20% PEG8000
16	0.2 M NH ₄ -sulfate	20% PEG10000
17	0.2 M NaCl	20% PEG1000
18	0.2 M NaCl	20% PEG4000
19	0.2 M NaCl	20% PEG8000
20	0.2 M NaCl	20% PEG10000
21	2.0 M NH ₄ -sulfate	
22	1.75 M NH ₄ -sulfate	1.25 M Li-sulfate
23	2.5 M Li-sulfate	
24	1.5 M Na-Citrate	

結晶化条件

合計 96条件

Table 1-4 AK3/G298R 及びAK4/R298G 変異体とそれぞれの野生型の酵素パラメーターの比較

		Km [mM]	Ki [mM]	appVmax [$\mu\text{moles Pi min}^{-1}\text{mg protein}^{-1}$]
AK3	WT	0.076 ± 0.03	4.36 ± 0.71	93.0 ± 6.42
	G298R	0.124 ± 0.01		4.15 ± 0.03
AK4	WT	0.386 ± 0.05		4.38 ± 0.15
	R298G	0.284 ± 0.03	16.5 ± 2.81	91.2 ± 3.91

酵素活性測定はATP濃度4.76 mM の条件で測定した.

Table 1-5 AK3野生型における3種類のモデルの統計パラメータ

	R^2	AICc	Sy.x
Model 1	0.98905	35.024	1.63811
Model 2	0.98905	31.417	1.59665
Model 3	0.91181	78.257	4.422

Table 1-6 AK3 野生型における3種類の阻害モデルの酵素パラメーター

	V_{max}^{ES}	V_{max}^{SES}	K_m^{ES} [mM]	K_{di}^{SE} [mM]	K_{ss}^{SES} [mM]	K_i^{SES} [mM]	alpha	beta	備考
Model 1	292.2	30.4	0.73	3.52	0.04	0.27	0.08	0.104	24点実測値
Model 1	300.8 ± 14.9	30.4 ± 5.54	0.76 ± 0.05	3.63 ± 0.14	0.05 ± 0.004	0.28 ± 0.01	0.08 ± 0.008	0.102 ± 0.004	15点抽出による平均と誤差
Model 2	241.7 ± 61.2	30.4 ± 1.43	0.61 ± 0.21			0.34 ± 0.13			
Model 3	92.94 ± 6.42		0.08 ± 0.03			4.36 ± 0.71			

Table 1-7 AK3の変異体の3種類の基質阻害モデルの統計パラメータの比較

S79A

	R ²	AICc	Sy.x
Model 1	0.98440	24.545	1.31682
Model 2	0.98440	20.937	1.28348
Model 3	0.98070	22.813	1.39308

Q80A

	R ²	AICc	Sy.x
Model 1	0.99197	10.904	0.99107
Model 2	0.99197	7.296	0.96598
Model 3	0.96499	41.386	2.05125

V81A

	R ²	AICc	Sy.x
Model 1	0.98599	1.089	0.80779
Model 2	0.98599	-2.519	0.78734
Model 3	0.97449	8.639	1.03688

Table 1-8 AK3の変異体AK3の3種類の阻害モデルの酵素パラメーター

S79A

	V_{max}^{ES}	V_{max}^{SES}	K_m^{ES} [mM]	K_{di}^{SE} [mM]	K_{ss}^{SES} [mM]	K_i^{SES} [mM]	alpha	beta	備考
model1	147.4	29.47	1.45	1.73	1.653	1.97	1.14	0.2	24点実測値
Model 1	147.0 ± 8.34	30.86 ± 1.75	1.75 ± 0.08	2.20 ± 0.17	1.22 ± 0.06	1.78 ± 0.14	0.81 ± 0.08	0.22 ± 0.01	15点抽出による平均と誤差
Model 2	80.42 ± 6.15	29.81 ± 5.41	0.79 ± 0.11			3.62 ± 1.77			
Model 3	71.54 ± 2.52		0.62 ± 0.05			14.5 ± 1.70			

Q80A

	V_{max}^{ES}	V_{max}^{SES}	K_m^{ES} [mM]	K_{di}^{SE} [mM]	K_{ss}^{SES} [mM]	K_i^{SES} [mM]	alpha	beta	備考
Model 1	108.8	14.86	0.33	2.54	0.07	0.56	0.22	0.12	24点実測値
Model 1	114.1 ± 9.64	13.12 ± 1.10	0.36 ± 0.05	2.61 ± 0.08	0.09 ± 0.01	0.63 ± 0.02	0.24 ± 0.03	0.11 ± 0.006	15点抽出による平均と誤差
Model 2	96.26 ± 13.3	13.02 ± 0.90	0.29 ± 0.07			0.64 ± 0.16			
Model 3	53.86 ± 3.00		0.06 ± 0.02			3.64 ± 0.45			

V81A

	V_{max}^{ES}	V_{max}^{SES}	K_m^{ES} [mM]	K_{di}^{SE} [mM]	K_{ss}^{SES} [mM]	K_i^{SES} [mM]	alpha	beta	備考
Model 1	102.1	14.86	1.25	5.45	0.404	1.75	0.32	0.14	24点実測値
Model 1	108.8 ± 4.33	14.47 ± 0.57	1.35 ± 0.07	5.24 ± 0.36	0.49 ± 0.02	1.90 ± 0.13	0.36 ± 0.05	0.13 ± 0.003	15点抽出による平均と誤差
Model 2	83.00 ± 7.75	14.86 ± 2.07	1.02 ± 0.15			2.16 ± 0.57			
Model 3	64.30 ± 2.63		0.67 ± 0.05			6.64 ± 0.59			

Table 1-9 計5種のAK3・アルギニン複合体の結晶化の結果
結晶化の40条件はTable 1-2で示した.

番号	モル比AK:Arg= 1:1 AK 10 mg/ml	モル比AK:Arg= 1:3000 AK 10mg/ml	モル比AK:Arg= 1:25 AK 10mg/ml	モル比AK:Arg= 1:10000 AK 3.5mg/ml	モル比AK:Arg= 1:10000(濃縮) AK 10mg/ml
1	透明	透明	透明	透明	透明
2	沈殿 粒子状20%	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状 100%	透明	透明
3	沈殿 粒子状50%	沈殿 粒子状40%	沈殿 粒子状 40%	沈殿 粒子状20%	沈殿 粒子状40%
4	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状60%	沈殿 粒子状100%
5	透明	透明	透明	透明	透明
6	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状100%	透明	透明
7	沈殿 粒子状20%	沈殿 粒子状20%	沈殿 粒子状20%	沈殿 粒子状10%	沈殿 粒子状10%
8	沈殿 粒子状30%	沈殿 粒子状30%	底に沈殿 20%	透明	透明
9	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状30%	沈殿 粒子状30%
10	底に沈殿 100%	底に沈殿 100%	底に沈殿 100%	沈殿 粒子状60%	底に沈殿 60%
11	沈殿 粒子状20%	沈殿 粒子状10%	沈殿 粒子状10%	沈殿 粒子状60%	底に沈殿 60%
12	底に沈殿 50%	底に沈殿 50%	底に沈殿 70%	透明	沈殿 粒子状20%
13	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状60%	沈殿 粒子状60%	沈殿 粒子状30%	沈殿 粒子状30%
14	底に沈殿 60%	底に沈殿 60%	底に沈殿 60%	透明	底に沈殿 60%
15	底に沈殿 80%	底に沈殿 80%	底に沈殿 80%	茶色沈殿 30%	底に沈殿 80%
16	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状40%	沈殿 粒子状100%
17	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状30%	沈殿 粒子状100%
18	底に沈殿 50%	底に沈殿 50%	底に沈殿 50%	透明	底に沈殿 20%
19	透明	透明	透明	透明	透明
20	透明	透明	透明	透明	透明
21	透明	透明	透明	透明	透明
22	底に沈殿 100%	底に沈殿 100%	底に沈殿 100%	底に沈殿 30%	底に沈殿 80%
23	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状100%	透明	透明
24	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状100%	透明	底に沈殿 100%
25	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状30%	沈殿 粒子状100%
26	茶色沈殿 80%	茶色沈殿 80%	茶色沈殿 80%	沈殿 粒子状30%	茶色沈殿 60%
27	透明	透明	透明	透明	透明
28	沈殿 粒子状100%	透明	透明	底に沈殿 50%	底に沈殿 40%
29	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状100%
30	透明	透明	透明	透明	透明
31	透明	透明	透明	透明	透明
32	透明	透明	透明	透明	透明
33	透明	透明	透明	透明	透明
34	沈殿 粒子状50%	沈殿 粒子状40%	沈殿 粒子状40%	透明	透明
35	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状100%
36	底に沈殿 10%	底に沈殿 40%	底に沈殿 60%	透明	底に沈殿 10%
37	透明	透明	透明	透明	透明
38	底に沈殿 5%	底に沈殿 10%	底に沈殿 10%	透明	透明
39	沈殿 粒子状20%	沈殿 粒子状40%	沈殿 粒子状30%	沈殿 粒子状10%	透明
40	底に沈殿 10%	沈殿 粒子状100%	沈殿 粒子状100%	透明	透明

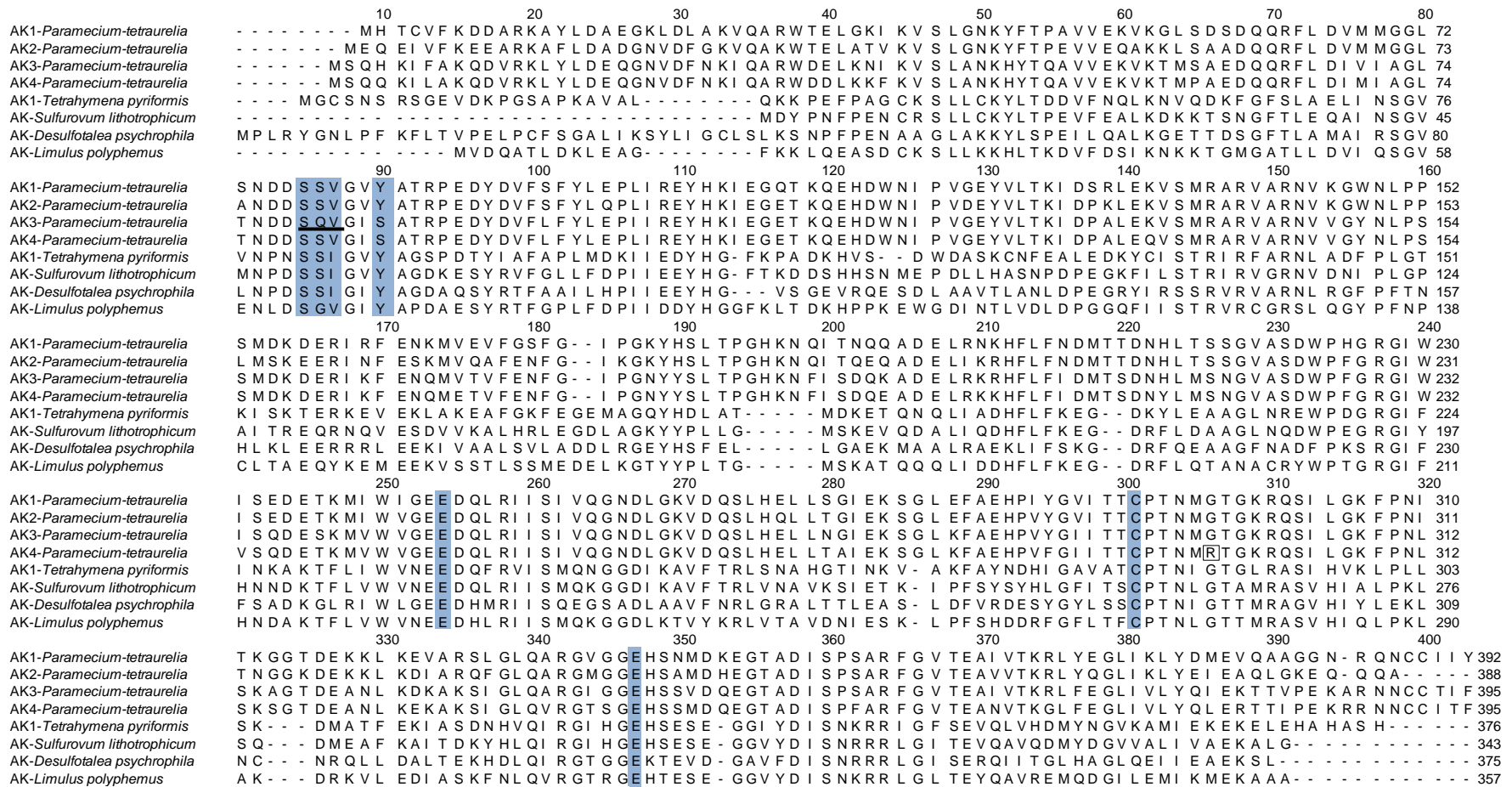


Fig. 1-1 ヨツヒメゾウリムシ AK と他の AK のアミノ酸配列の比較

4 種類のヨツヒメゾウリムシ AK, テトラヒメナ AK1, 細菌 AK, 及びカブトガニ AK アミノ酸配列を, MEGA5 中の ClustalW 法によりアラインメントした. アルギニン結合部位は青色で示している. 枠線の部分は AK4 の 298 番目のアミノ酸である. 下線は変異導入部位である.

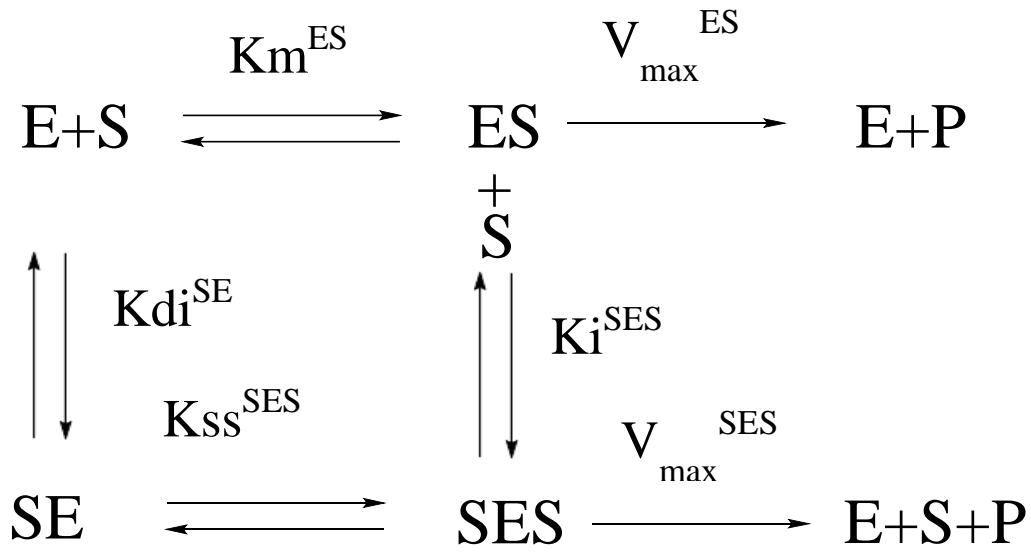


Fig. 1-2 第1モデルの反応機構図

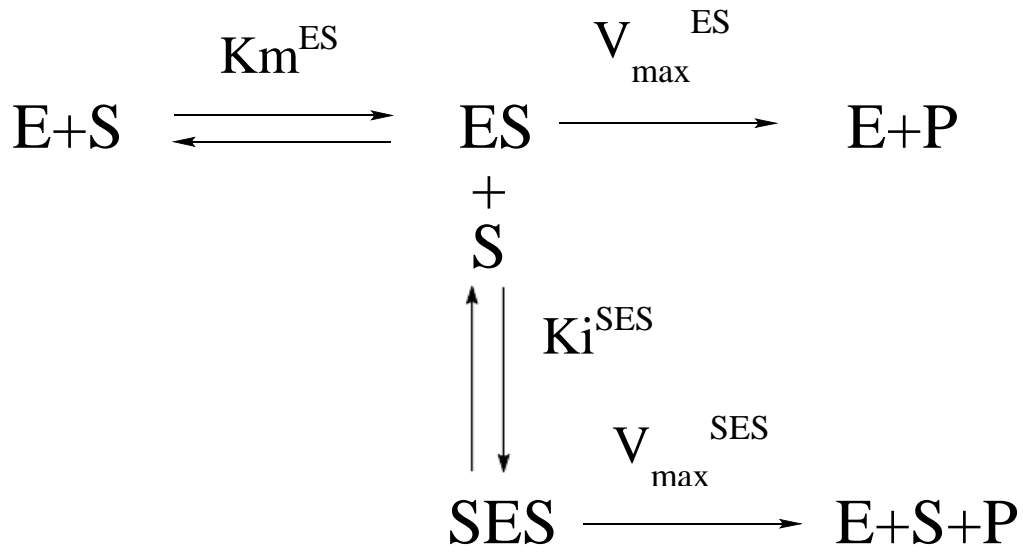


Fig. 1-3 第2モデルの反応機構図

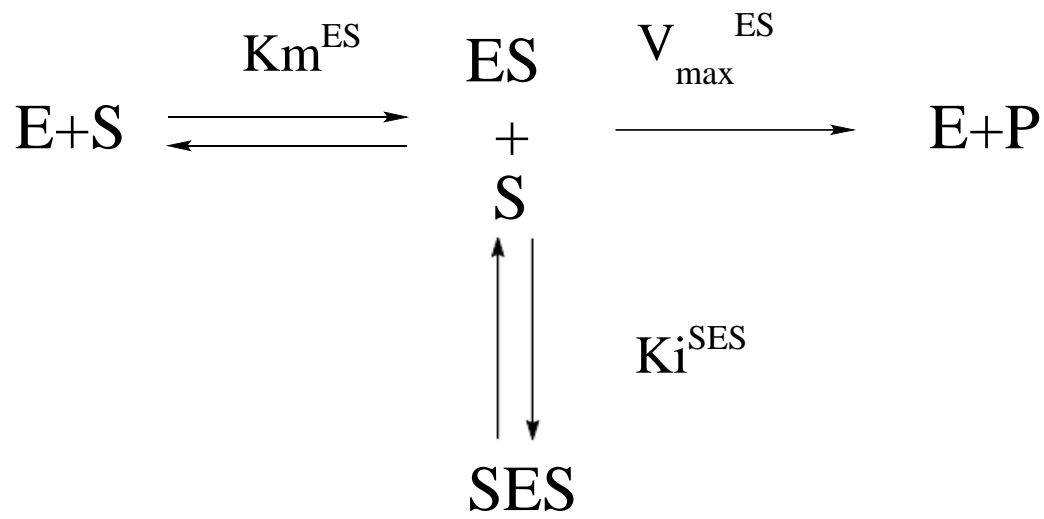


Fig. 1-4 第3モデルの反応機構図

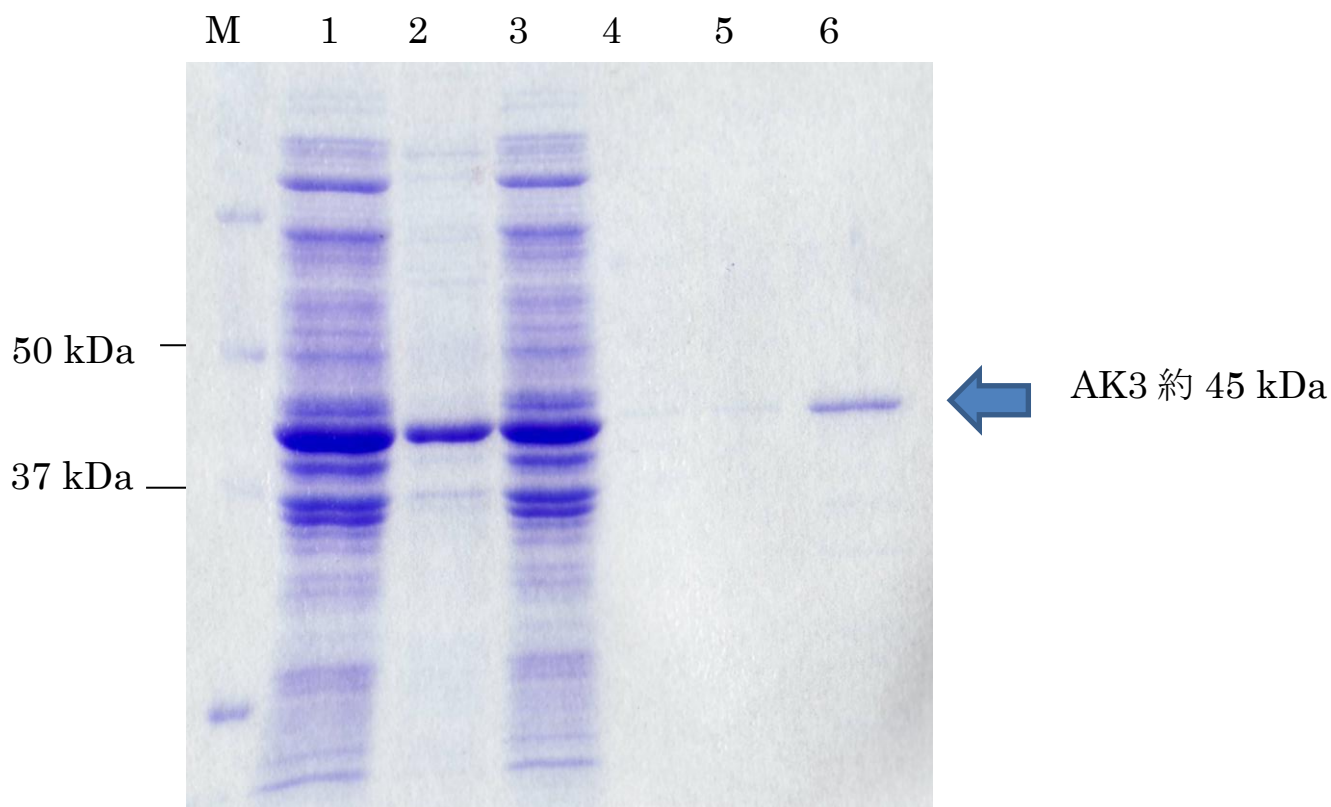


Fig. 1-5 変異体 AK3/G298R の SDS-PAGE による精製度の確認

M : 分子量マーカー

1 : 可溶性画分

2 : 不溶性画分

3 : アフィニティカラムの未吸着画分

4 : Wash Buffer A 溶出画分

5 : 20 mM イミダゾール溶出画分

6 : 150 mM イミダゾール溶出画分

発現条件は16 °C, 48時間, IPTGの最終濃度0.5 mM.

酵素活性測定には 6 の画分を使用した.

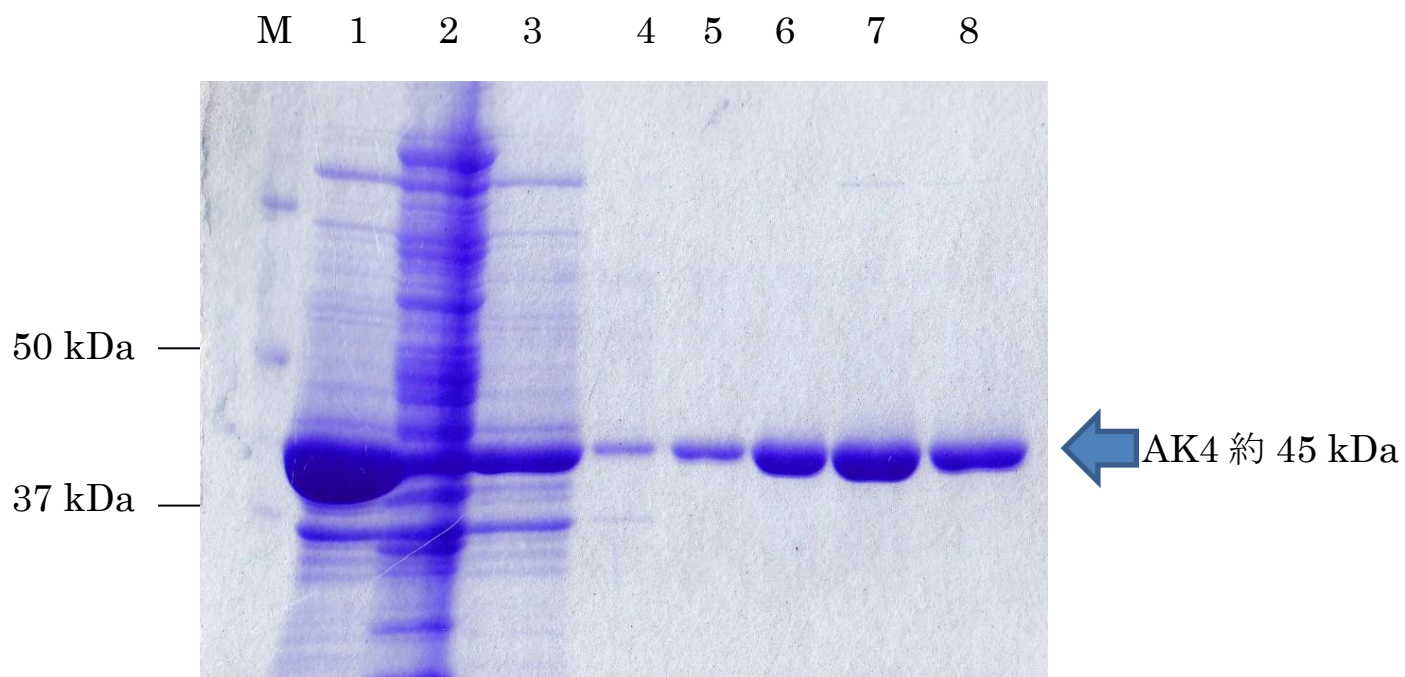


Fig. 1-6 変異体 AK4/R298G の SDS-PAGE による精製度の確認

M : 分子量マーカー

1 : 可溶性画分

2 : 不溶性画分

3 : アフィニティカラムの未吸着画分

4 : Wash Buffer A 溶出画分

5 : 20 mM イミダゾール溶出画分

6 : 150 mM イミダゾール溶出画分

発現条件は16 °C, 48時間, IPTGの最終濃度0.5 mM.

酵素活性測定には6の画分を使用した.

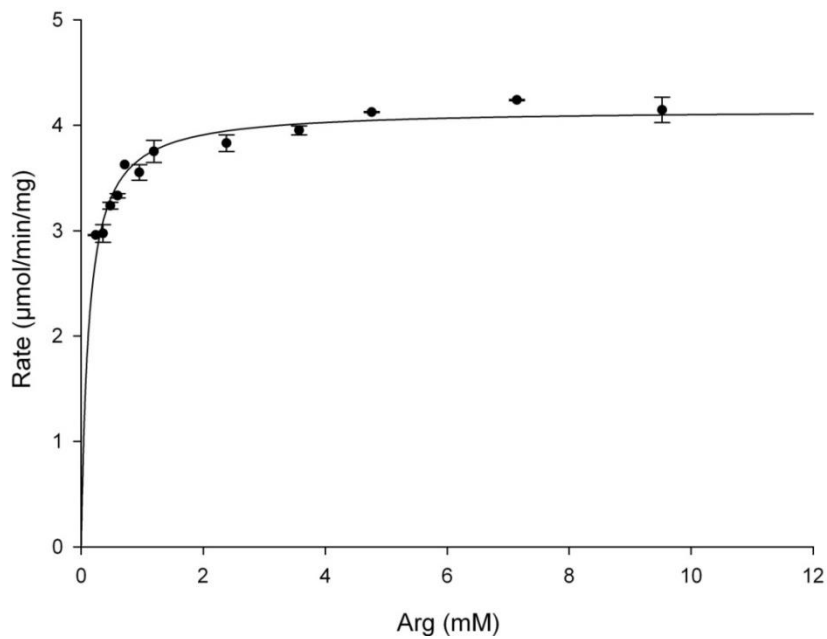


Fig. 1-7 AK3/G298R のミカエリス・メンテンプロット

測定は ATP 濃度 4.76 mM の条件で測定した.

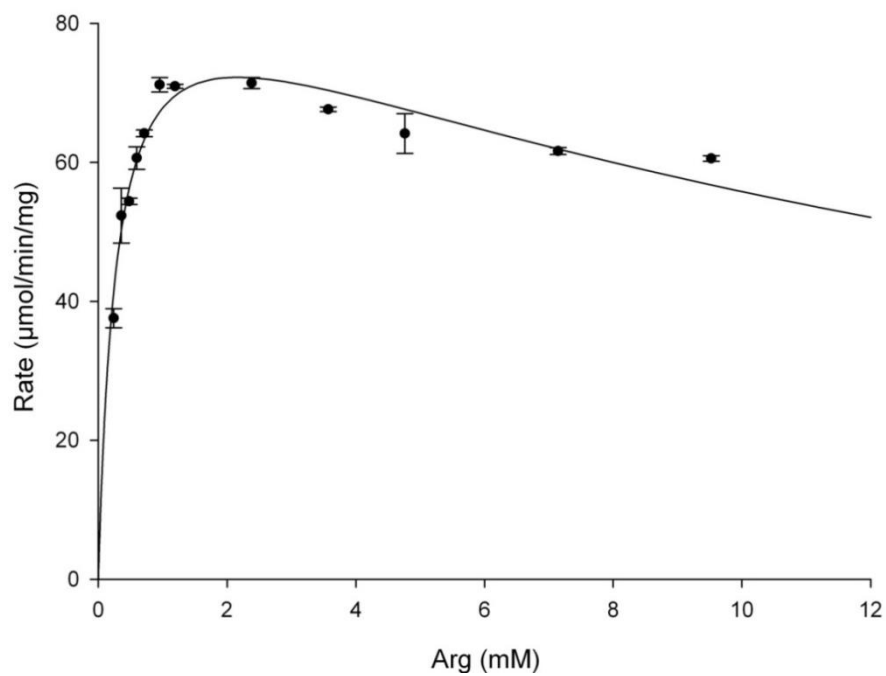
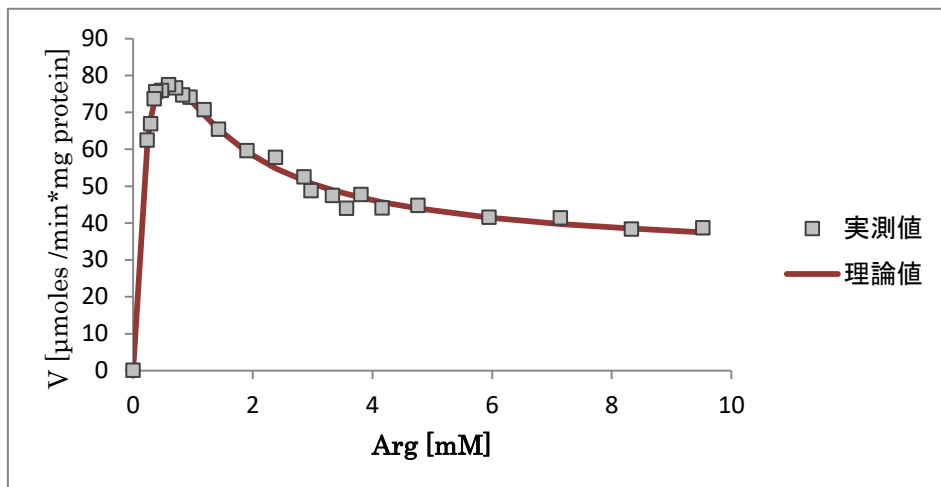


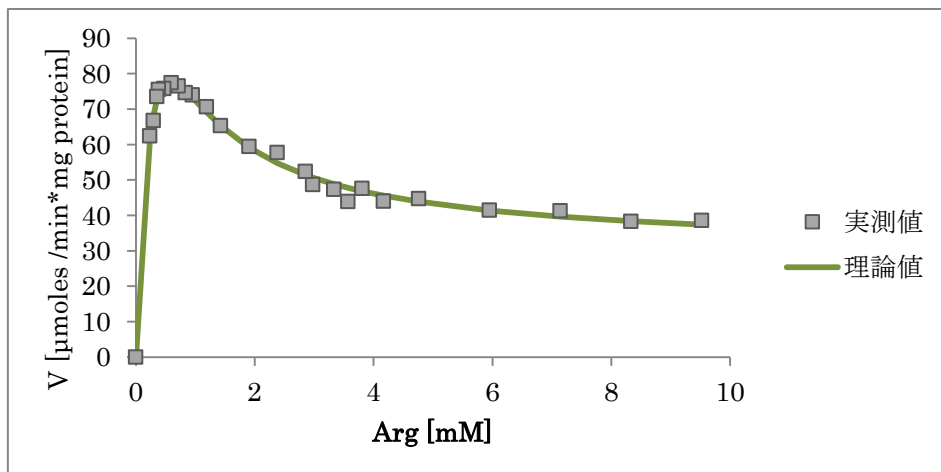
Fig. 1-8 AK4/R298G のミカエリス・メンテンプロット

測定は ATP 濃度 4.76 mM の条件で測定した.

第1モデル



第2モデル



第3モデル

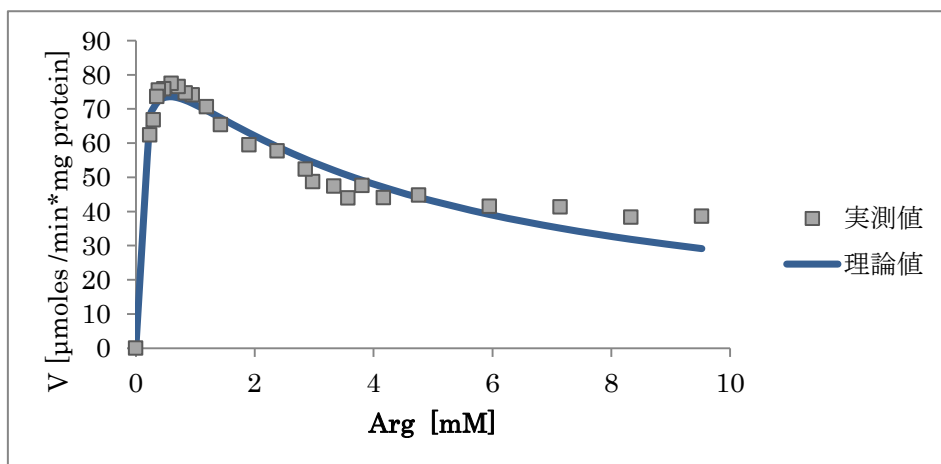
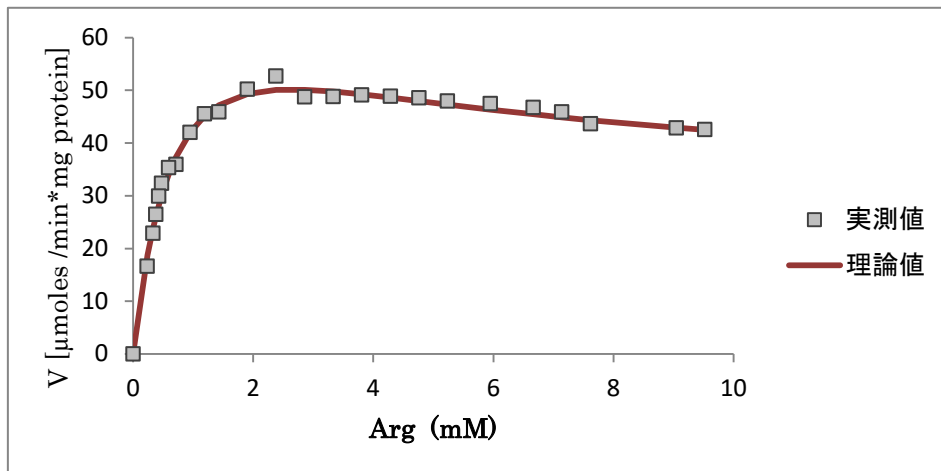
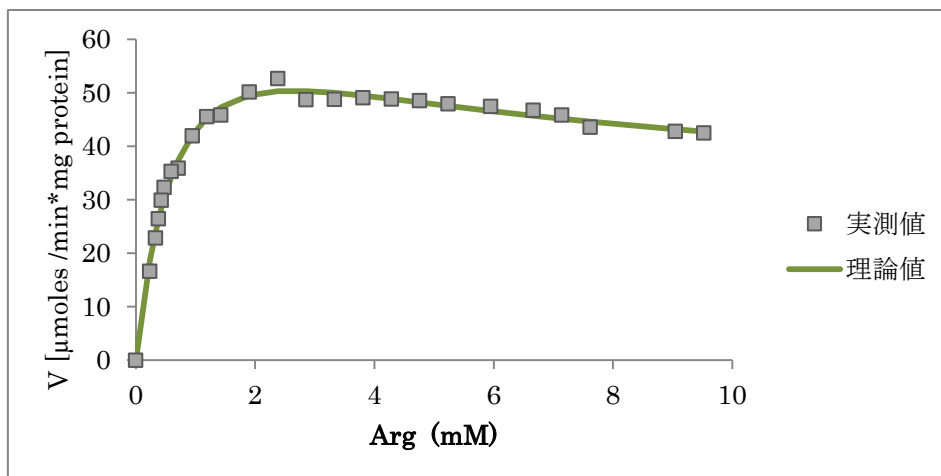


Fig. 1-9 3種類の基質阻害モデルの理論値と実測値の比較

第1モデル



第2モデル



第3モデル

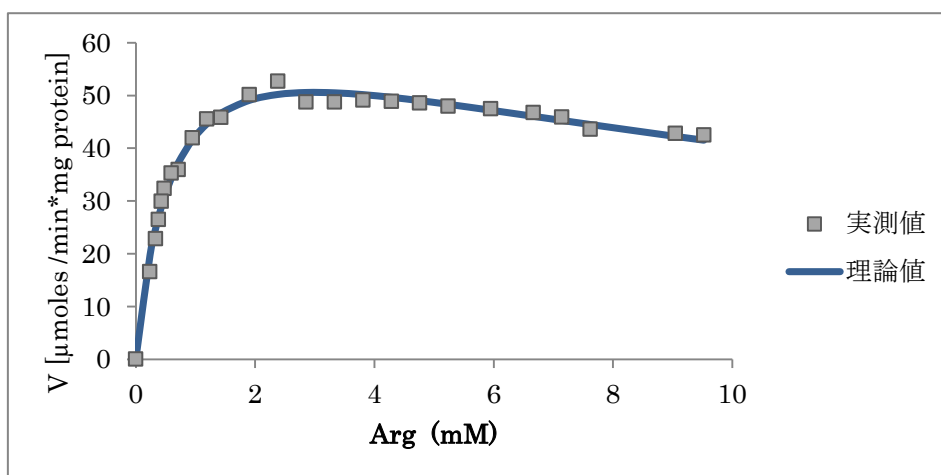
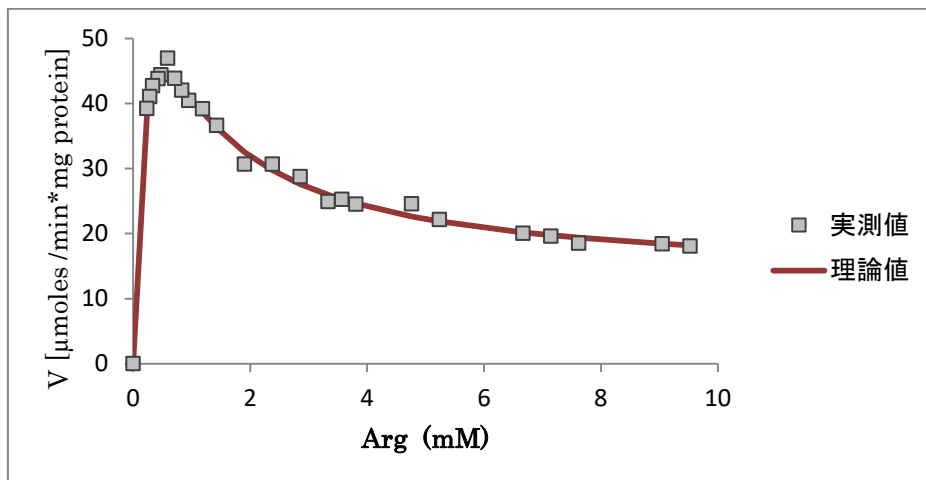
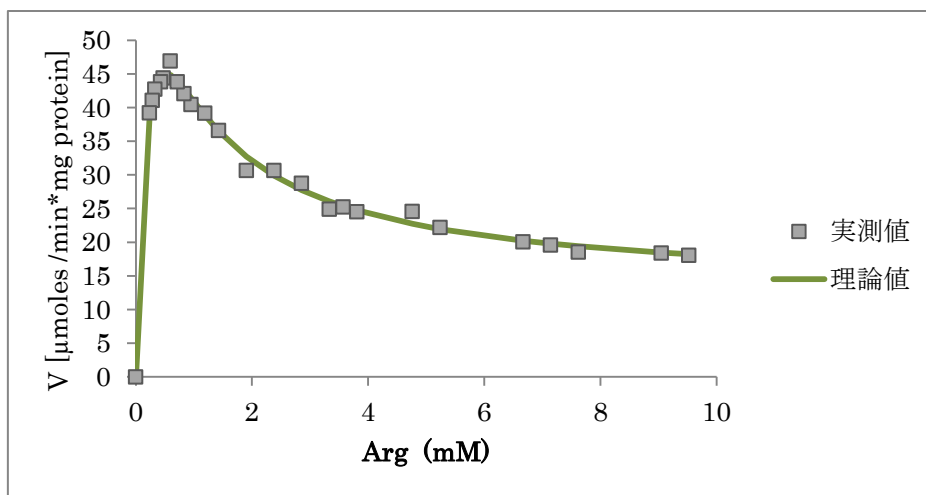


Fig. 1-10 変異体 S79A における基質阻害モデルにおける理論値と実測値の比較

第1モデル



第2モデル



第3モデル

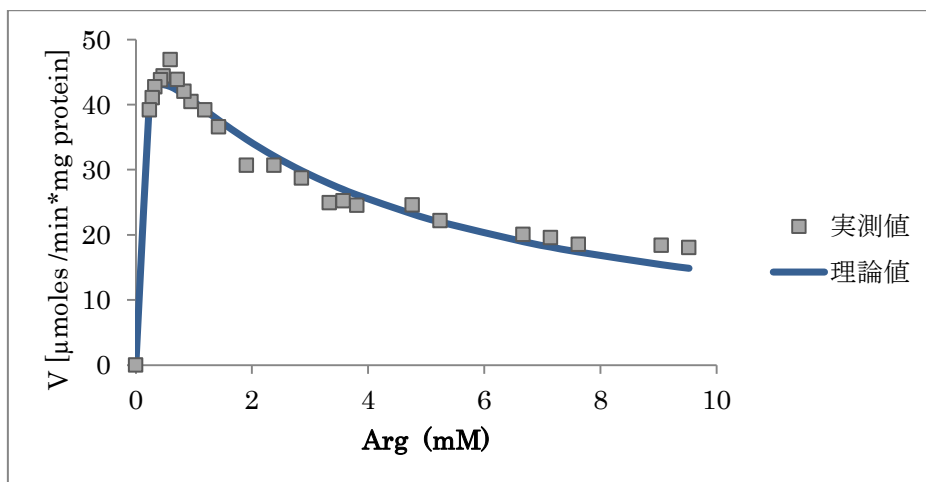
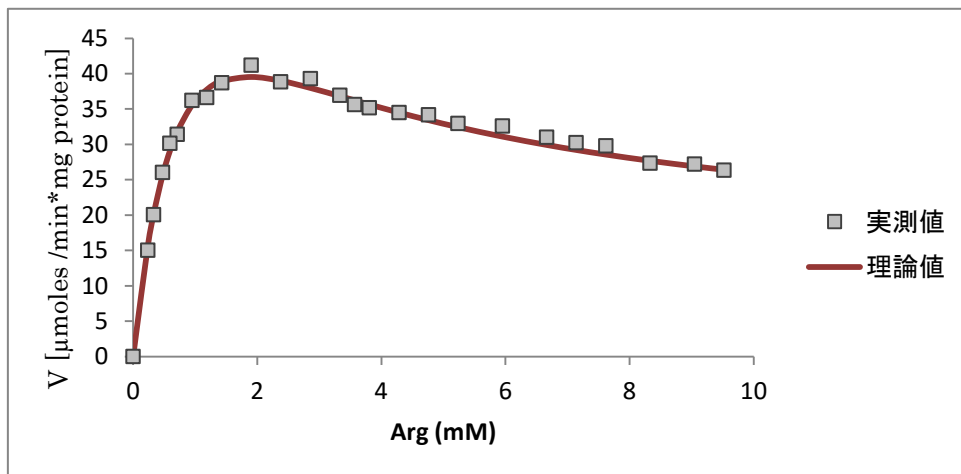
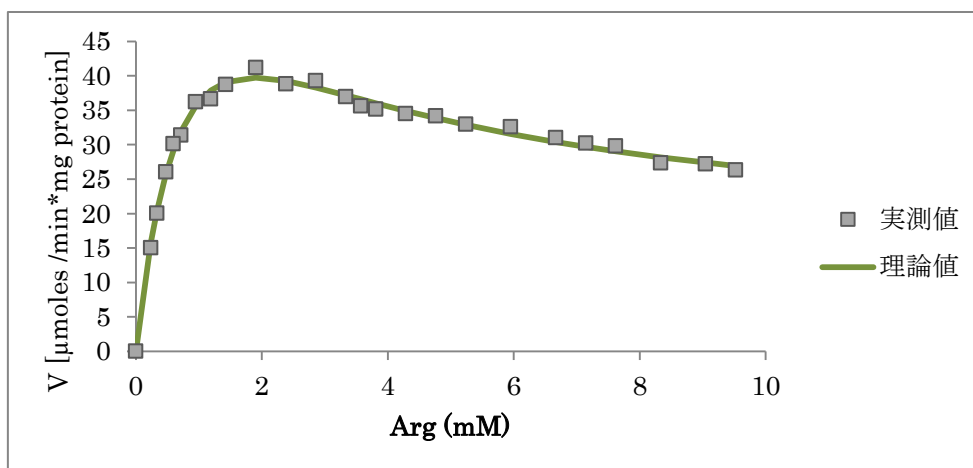


Fig. 1-11 変異体 Q80A における基質阻害モデルにおける理論値と実測値の比較

第1モデル



第2モデル



第3モデル

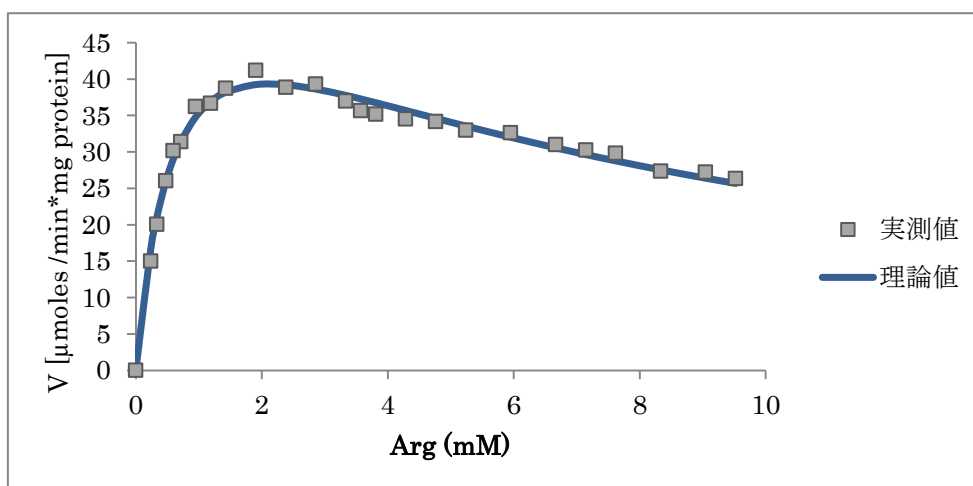


Fig. 1-12 変異体 V81A における基質阻害モデルにおける理論値と実測値の比較

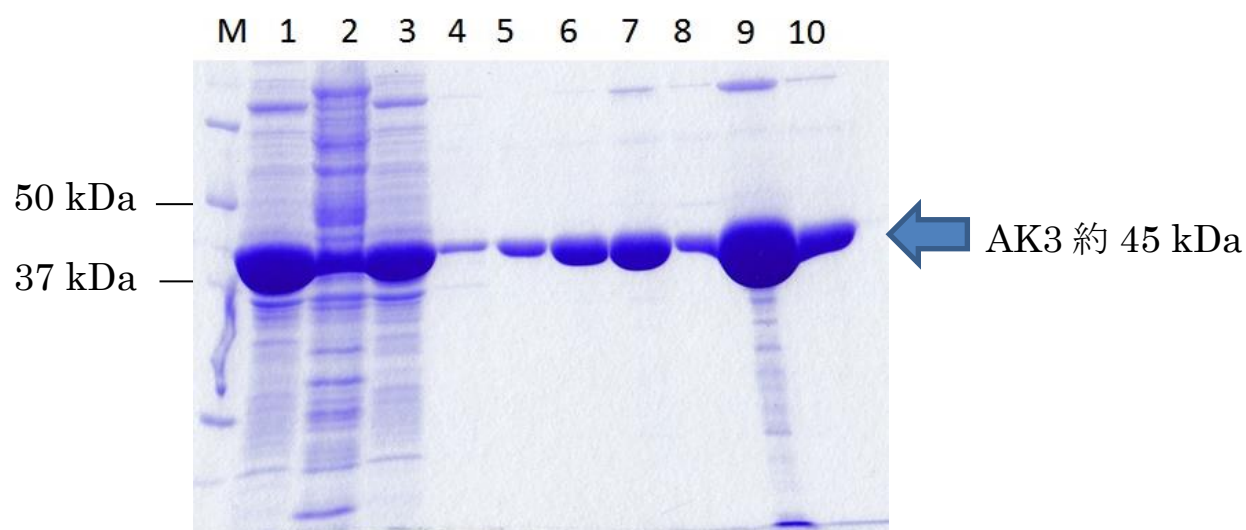


Fig. 1-13 AK3 結晶化用サンプルの SDS-PAGE による精製度の確認

M : 分子量マーカー

1 : 可溶性画分

2 : 不溶性画分

3 : アフィニティカラムの未吸着画分

4 : Wash Buffer A 溶出画分

5 : 20 mM イミダゾール溶出画分

6 : 50 mM イミダゾール溶出液画分

7 : 100 mM イミダゾール溶出画分

8 : 150 mM イミダゾール溶出画分

9 : 濃縮後 AK3

10 : 透析後 AK3

発現条件は20 °C, 24時間, IPTGの最終濃度0.5 mM.

結晶化には9の画分を使用した.



Fig. 1-14 Apo AK3 結晶写真

ApoAK3を0.2 M 酢酸ナトリウム(pH 9.0)と沈殿剤となる20% PEG10000の存在下で結晶させた.

結晶のサイズは0.2 mm×0.05 mm

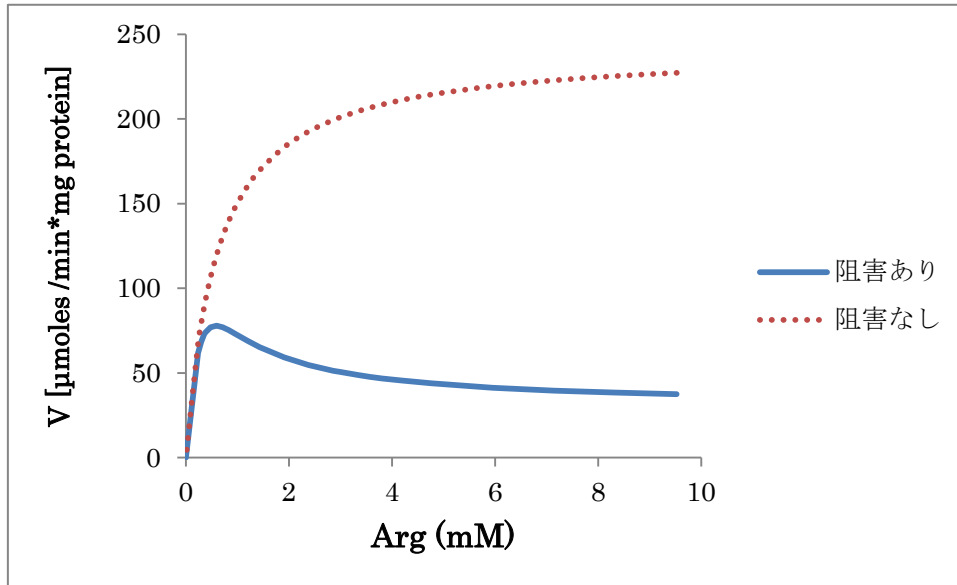
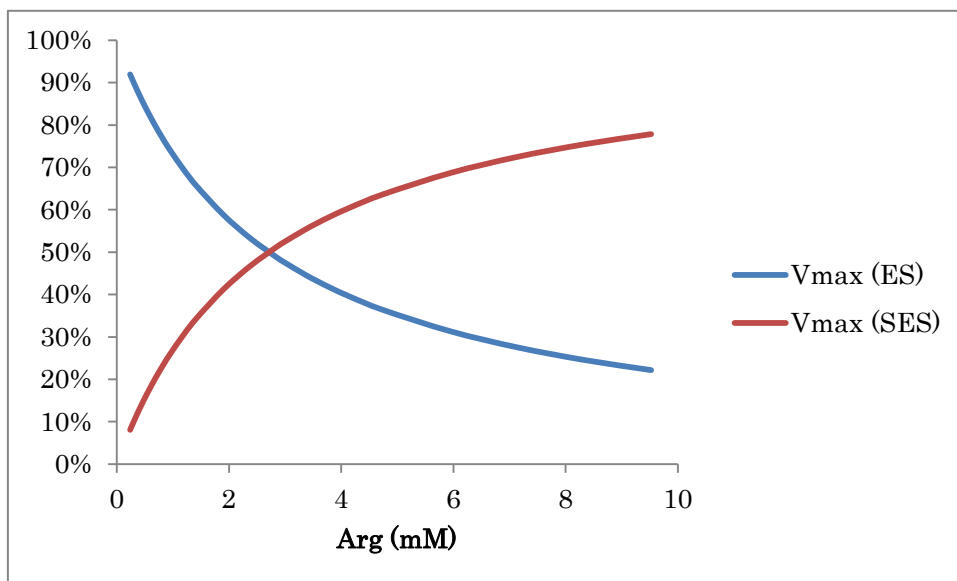


Fig. 1-15 基質阻害が存在する場合と、存在しない場合の酵素反応曲線の比較

両曲線は第2モデルの酵素パラメーターから作成した。

第1モデル



第2モデル

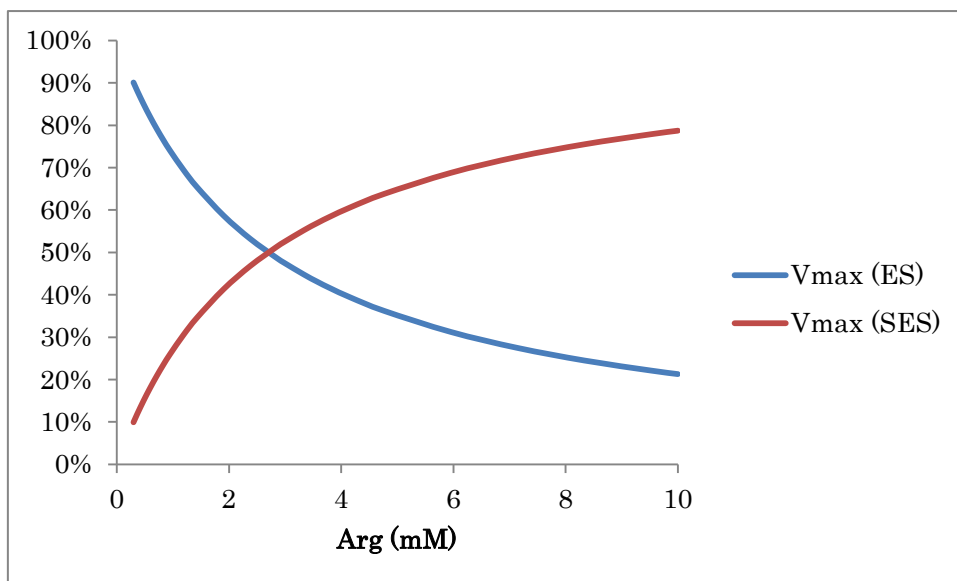
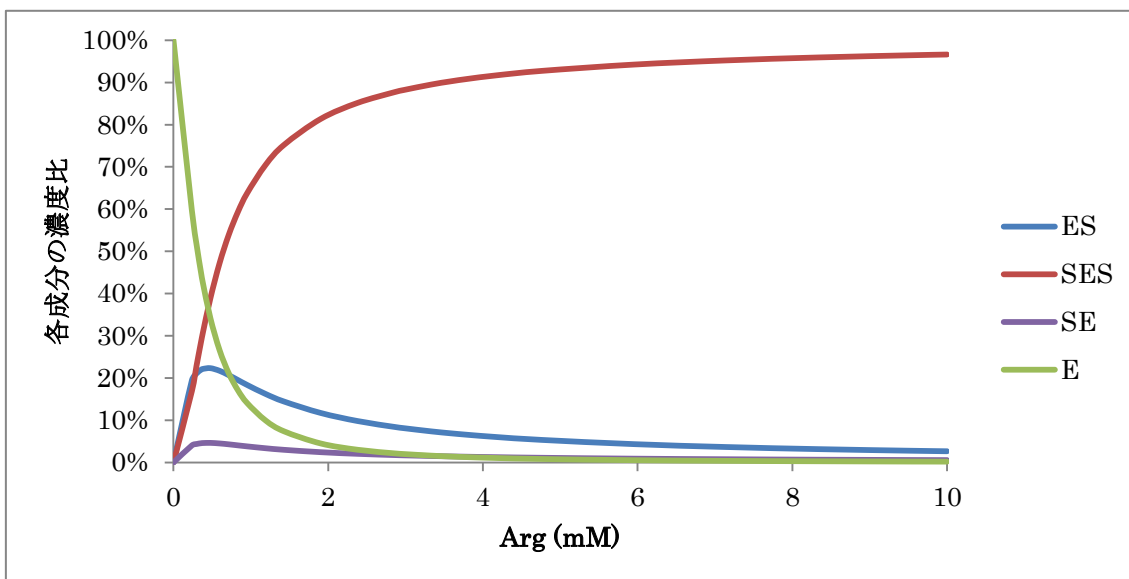


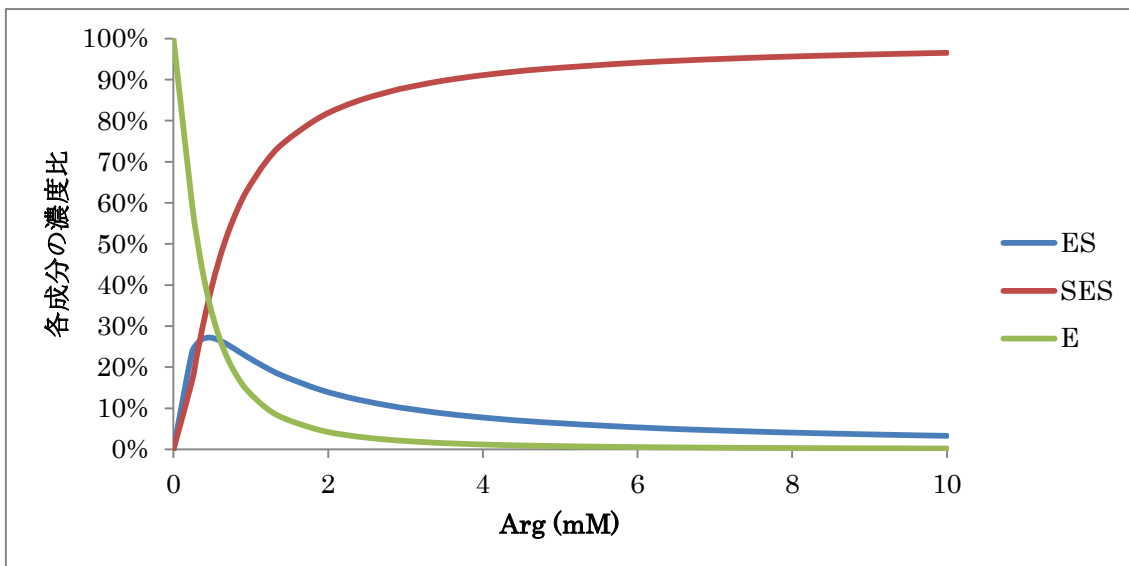
Fig. 1-16 第1モデルと第2モデルにおける，アルギニン濃度に対する V_{\max}^{ES} と V_{\max}^{SES} の寄与の比較

第1モデルと第2モデルにおけるそれぞれの酵素パラメーターを用いて作成した。

第1モデル



第2モデル



第3モデル

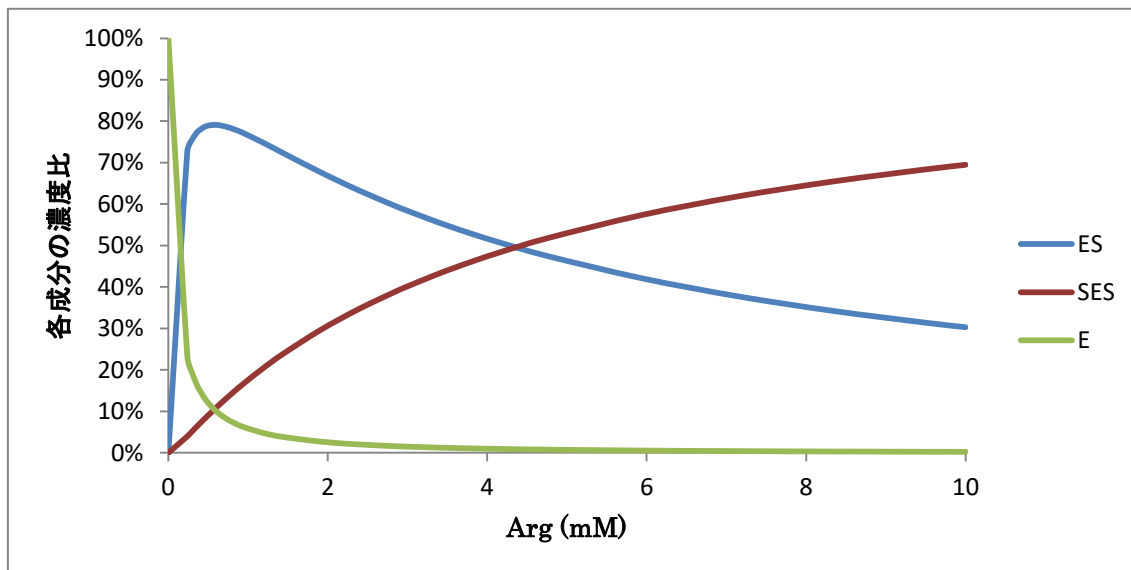


Fig. 1-17 3種類のモデルにおけるアルギニン基質濃度と[E], [ES], [SES], [SE]の関係

各成分濃度は以下の様に表される.

第1モデル

$$[ES] = [E_0] / (K_m/S + 1 + S/K_i + K_m/K_{di})$$

$$[E] = K_m [ES] / [S]$$

$$[SES] = [ES][S] / K_i$$

$$[SE] = K_m [ES] / K_{di}$$

第2モデル

$$[ES] = [E_0] / (K_m/S + 1 + S/K_i)$$

$$[E] = K_m [ES] / [S]$$

$$[SES] = [ES][S] / K_i$$

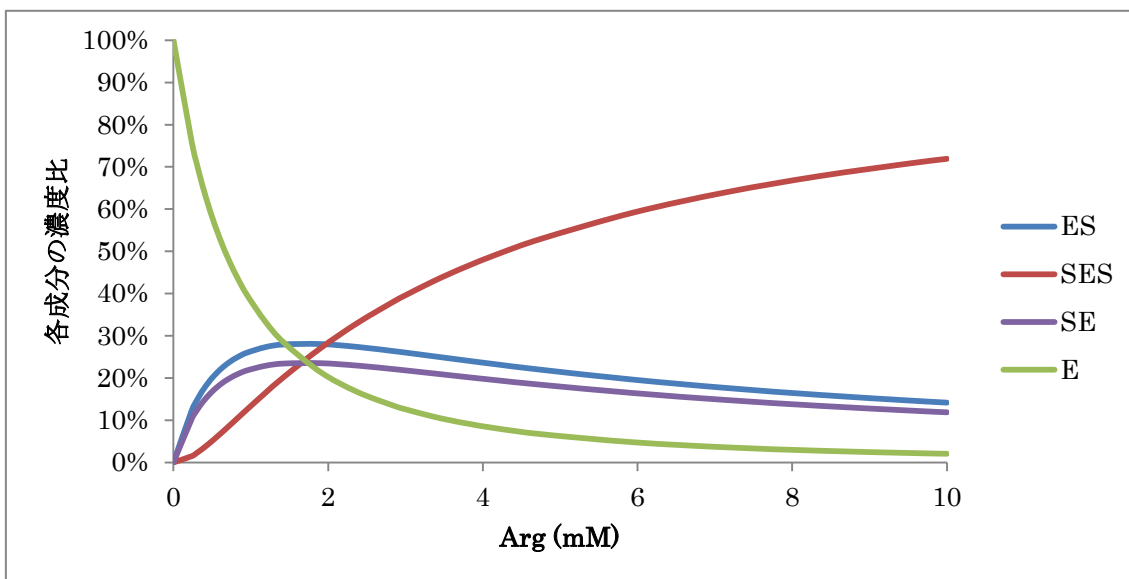
第3モデル

$$[ES] = [E_0] / (K_m/S + 1 + S/K_i)$$

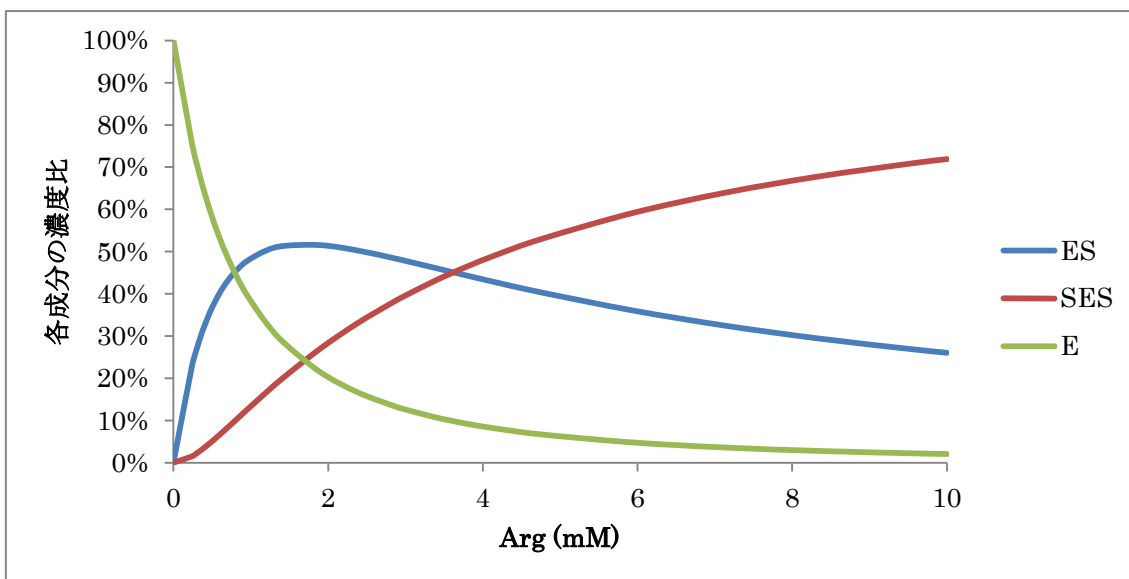
$$[E] = K_m [ES] / [S]$$

$$[SES] = [ES][S] / K_i$$

第1モデル(S79A)



第2モデル(S79A)



第3モデル(S79A)

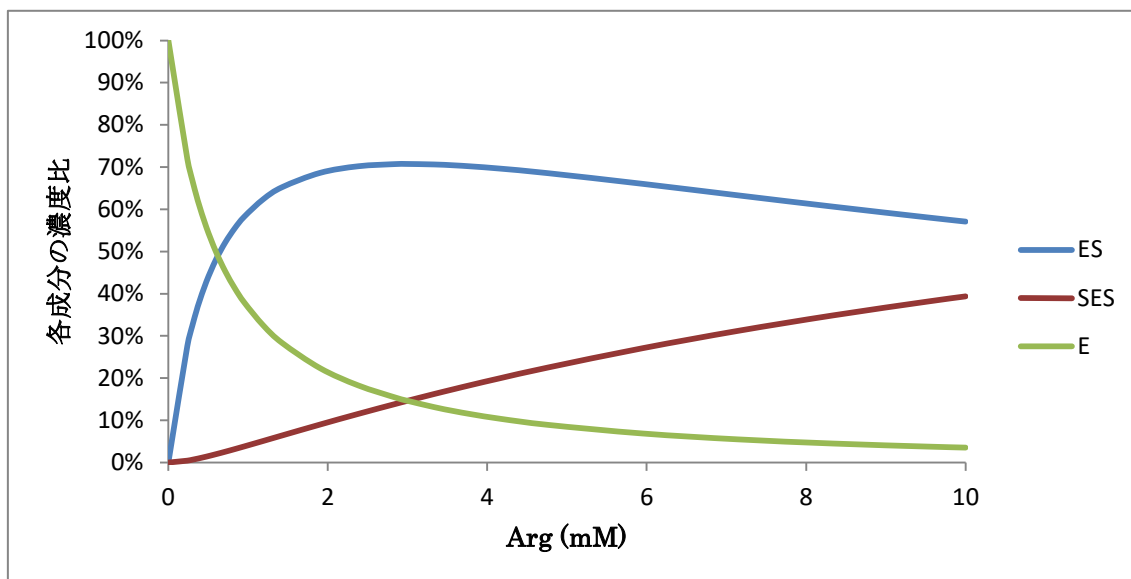
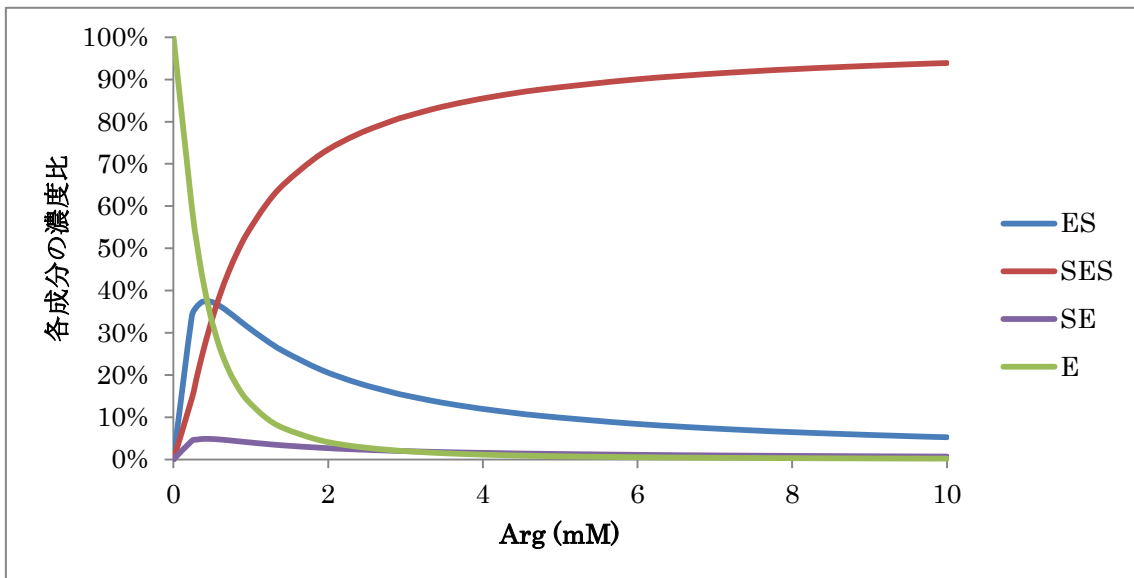
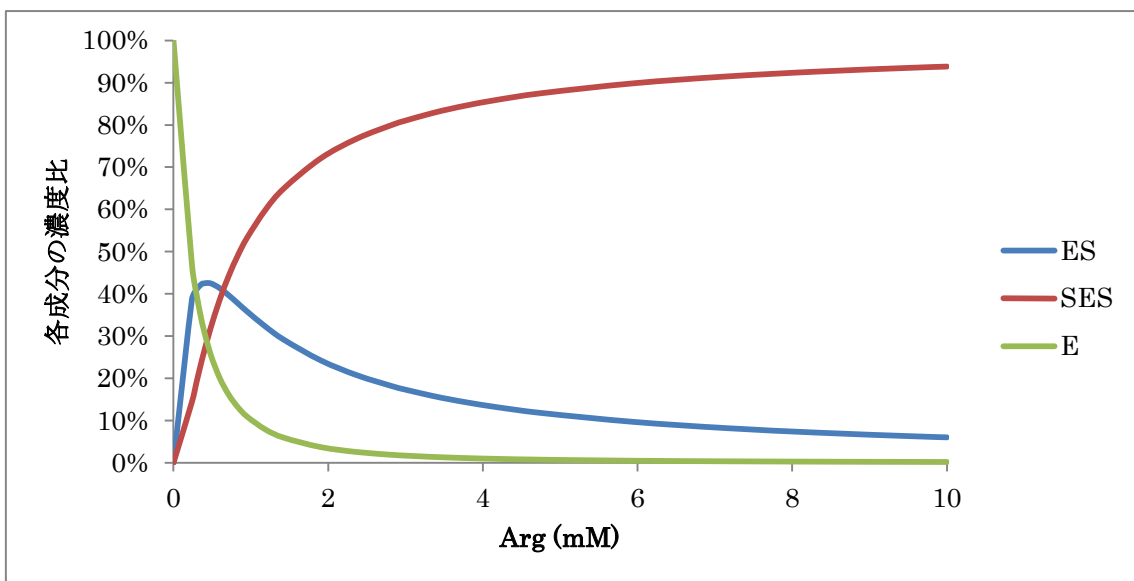


Fig. 1-18 変異体 S79A における 3 種類の基質阻害モデルにおけるアルギニン基質濃度と [E], [ES], [SES], [SE] の関係

第1モデル(Q80A)



第2モデル(Q80A)



第3モデル(Q80A)

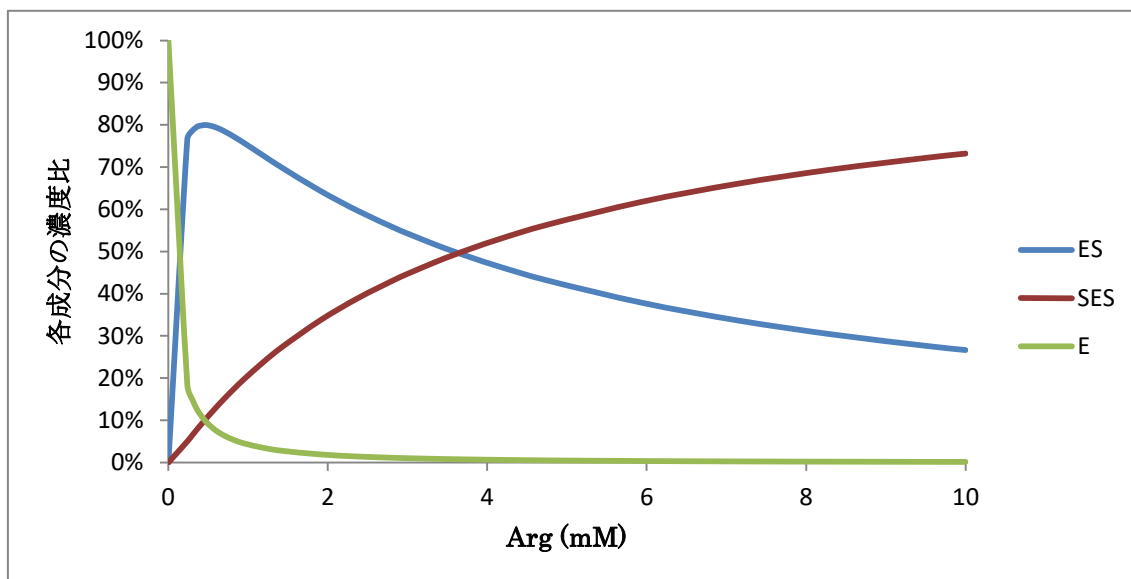
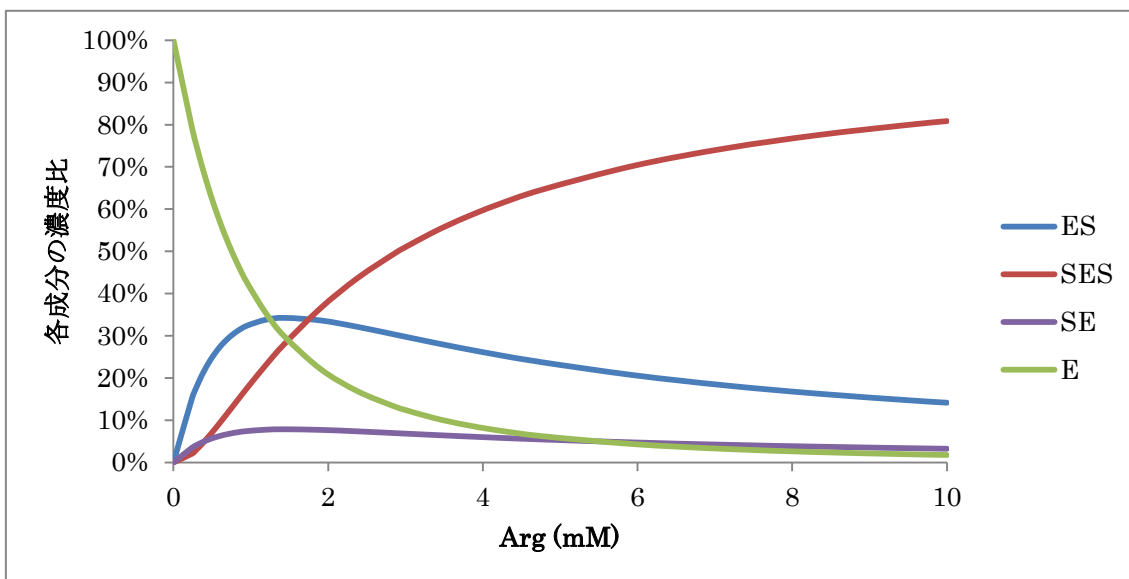
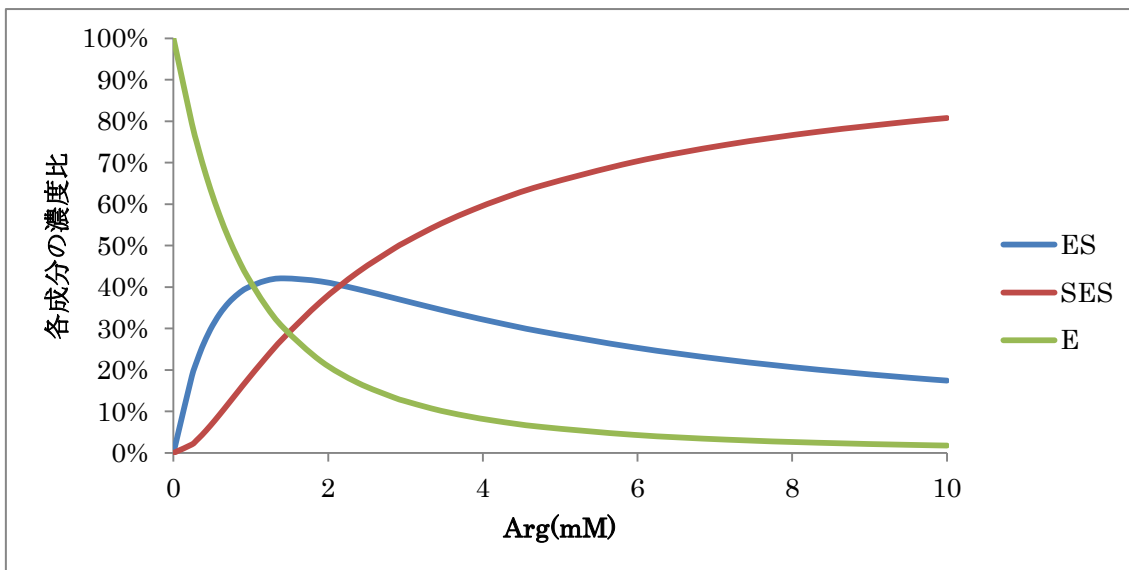


Fig. 1-19 変異体 Q80A における 3 種類の基質阻害モデルにおけるアルギニン基質濃度と [E], [ES], [SES], [SE] の関係

第1モデル(V81A)



第2モデル(V81A)



第3モデル(V81A)

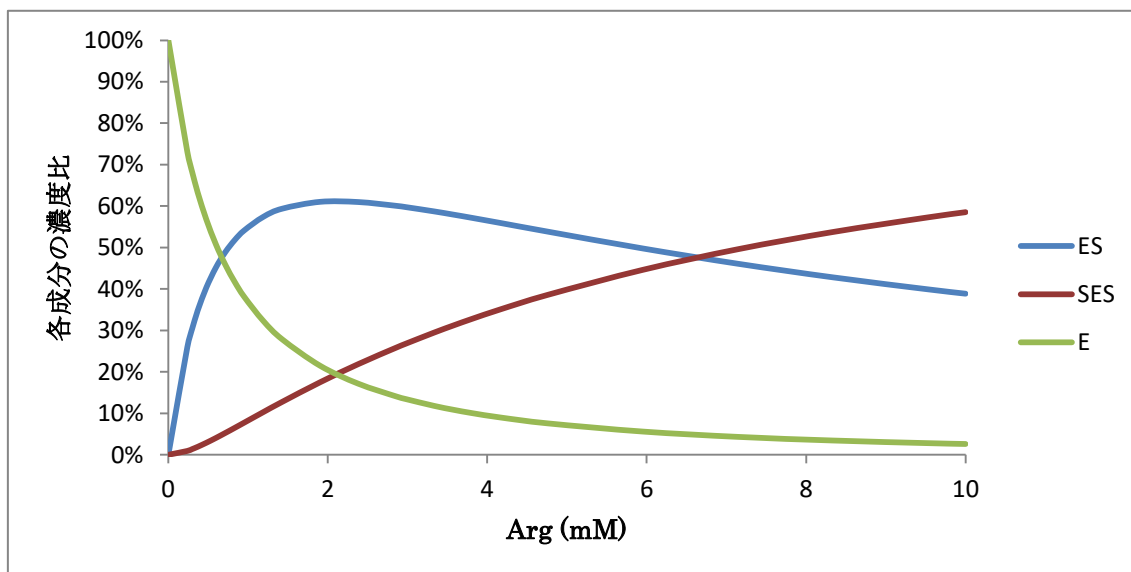


Fig. 1-20 変異体 V81A における 3 種類の基質阻害モデルにおけるアルギニン基質濃度と [E], [ES], [SES], [SE] の関係

第二章

原生生物のフォスファゲンキナーゼの分布と酵素特性

要旨

PK は近年、細菌や原生生物においても見いだされており、細菌である *Desulfotalea psychrophila*, 繊毛虫であるテトラヒメナ(*Tetrahymena pyriformis*), ヨツヒメゾウリムシ(*Paramecium tetraurelia*)等では AK が見いだされている。一方で、原生生物の卵菌類に分類される疫病菌(*Phytophthora infestans*)や褐藻であるシオミドロ(*Ectocarpus siliculosus*)においては、タウロシアミンを基質とするタウロシアミンキナーゼ(TK)が報告されている。また、軟体動物に寄生するパーキンサス原虫(*Perkinsus marinus*)や脊椎動物に感染するクリプトスポリジウム(*Cryptosporidium muris*)には CK が存在する。この様に原生生物では三種類の PK (AK, TK, CK)が分布しているが、他の原生生物における PK の詳しい分布は明らかになっていない。PK の分子進化を理解する上で、その初期進化を知ることは非常に重要であり、PK の祖先型を知る手がかりになる。そこで今回の研究では、原生生物における PK の分布とその酵素特性を詳細に調べた。

本研究はデータベース上で新たに見いだされた原生生物 9 種の PK 酵素の遺伝子を合成し、それらのリコンビナント酵素を発現させた後に、酵素特性を決定した。今回扱った原生生物は、ストラメノパイルに属し葉緑体を持たない卵菌類が二種、ストラメノパイルに属し不等毛藻類のシオミドロ、クリプト藻植物門のクリプト藻類とアルベオラータに分類される繊毛虫が二種、マラリア原虫やトキソプラズマが属するアピコンプレクサ門に属するクロメラ類藻類二種と襟鞭毛虫門に属する襟鞭毛虫である。

それぞれの酵素活性測定の結果、襟鞭毛虫、繊毛虫、及びクロメラ類の PK は、基質をアルギニンとする AK であった。クロメラ類では初めての AK の発見である。また、襟鞭毛虫とクロメラ類の AK においては、高濃度のアルギニンに対して基質阻害が見られた。これらの基質阻害におけるアルギニンの第二結合部位の解離定数を示す K_i^{SES} は、ヨツヒメゾウリムシ AK3 よりも 5~15 倍大きかった。そのため、AK3 ほど基質阻害による反応速度の低下が見られなかった。

クリプト藻類、シオミドロ、及び卵菌類で見いだされた PK は、基質をタウロシアミンとする TK であった。クリプト藻類においては初めての TK の発見である。この TK では基質タウロシアミンに対する基質阻害が見られた。クリプト藻類 TK の基質阻害時の詳細は、第一章で記述したモデル 2 で説明されるタイプである。

見いだされた 9 種類の PK を加えて、原生生物における PK のアミノ酸配列から分子系統解析を行った。この結果、原生生物 PK は 3 種類のクラスターと CK グループに分類された。AK は二つのクラスターに分かれ、一方のクラスターには襟鞭毛虫、繊毛虫、及びクロメラ類の AK が(AK クラスター1)、他方には繊毛虫であるテトラヒメナの AK が含まれた(AK クラスター2)。残りのクラスターには、卵菌類やクリプト藻類の TK が含まれ、原生生物 CK は多細胞生物 CK クラスターに近縁であった。襟鞭毛虫、繊毛虫、及びクロメラ類の AK は酵素特性として、他の AK では見られない基質阻害を持つ。これらが含まれる AK

クラスター1は多細胞生物 AK と近縁である。この AK クラスターは、AK クラスター2とは異なる系統であり、両者は進化の早い段階で二方向に分岐した可能性がある。原生生物 CK は、多細胞生物 CK クラスターや、二量体 CK 遺伝子から進化してきたと考えられている環形動物 PK クラスターに含まれていた。したがって、原生生物 CK と脊椎動物 CK は共通の祖先から進化してきた可能性がある。TK は環形動物や扁形動物に独立に見いだされているが、分子系統解析において原生生物 TK は前 2 者とは異なる起源を持つ可能性が示された。

現在においては陸上植物や緑藻では PK の存在は報告されていない。葉緑体を持つ原生生物であるクラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*)でも PK 遺伝子は存在していない。一方で、葉緑体を持つ褐藻やクリプト藻類では TK が、クロメラ類では AK が存在している。この分布は、二次細胞内共生における葉緑体の取り込みと関連があるかも知れない。二次細胞内共生の際の葉緑体には紅藻由来と緑藻類の二種類が存在し、それぞれが独立に進化してきたと考えられている。興味深いことに、紅藻由来の葉緑体を持つ褐藻、クリプト藻類、及びクロメラ類でのみで PK が見いだされている。

原生生物において PK は三種類(AK, TK, CK)分布しているがその起源は未だ不明である。ただ、原生生物 PK は独自かつ多様性に富んだ PK を保持しており、グアニジド基質の多様性から、原生生物の初期の段階で PK を保持していたと考えられる。クリプト藻類や繊毛虫などの単細胞生物においても PK が分布していることは PK の進化の起源を考える上で重要な意味を持つ。

序論

PK は近年、細菌や原生生物においても見いだされており、細菌である *Desulfotalea psychrophila* (Andrew et al., 2008), や襟鞭毛虫 *Monosiga* sp. (Conejo et al., 2008), ミドリムシ *Euglena gracilis* (Piccinni and Coppellotti, 1977), トリパノソーマ (*Trypanosoma* sp.) 繊毛虫であるテトラヒメナ (*Tetrahymena pyriformis*) やヨツヒメゾウリムシ (*Paramecium tetraurelia*) には AK が存在する (Watts and Bannister, 1970; Michibata et al., 2014; Uda et al., 2006). また、原生生物のハプト藻類である *Emiliana huxleyi* では AK が見いだされている (星島 2012; 渡邊 2016). 一方、原生生物卵菌類に分類される疫病菌 (*Phytophthora infestans*) や褐藻であるシオミドロ (*Ectocarpus siliculosus*) においては TK が発現している (Uda et al., 2013; Palmar et al., 2013; 八重尾 2016). また、軟体動物に寄生することが知られるパーキンサス原虫 (*Perkinsus marinus*) やアピコンプレクサ門に属し、脊椎動物に感染するクリプトスポリジウム (*Cryptosporidium muris*) では CK が見いだされている. 一方、トリパノソーマ AK は節足動物 AK とアミノ酸配列一致率が高い. また、分子系統解析においても明瞭に節足動物のグループに属していることから、トリパノソーマ AK の由来は、宿主の節足動物からの典型的な遺伝子の水平伝搬の例であるとされる (Pereira et al., 2000).

AK のアミノ酸配列は、分子系統解析において二つのクラスターに分けられる. 一つ目のクラスターには、繊毛虫のテトラヒメナ、海綿、及び刺胞動物の AK が属している. 二つ目には、多くの無脊椎動物 AK, ヨツヒメゾウリムシ、及び襟鞭毛虫の AK が含まれる (Conejo et al., 2008; Suzuki et al., 2013). これらの結果を含めて、Andrews et al. (2008) らは、細菌 AK の起源として遺伝子の水平伝搬の可能性を提唱している.

この様に、原生生物においては 3 種類の PK (AK, CK, TK) が分布しているが、より多くの原生生物における PK の分布は明らかになっていない. PK の初期の進化を知ることは非常に興味深いことであるが、その祖先型は今のところ明らかになっていない. そこで本研究では原生生物における PK の分布を詳細に調べ、またそれらの酵素特性を決定することにした.

データベース上で新たに見いだされた 9 種類の原生生物の PK, すなわちアルベオラータに分類される繊毛虫 *Anophryoides haemophila* と *Pseudocohnilembus persalinushe*, ストラメノパイルに属し葉緑体を持たない卵菌類 *Albugo candida* と *Aphanomyces invadans*, 不等毛藻類に属するシオミドロ *Ectocarpus siliculosus*, クリプト藻植物門に属するクリプト藻類 *Guillardia theta*, マラリア原虫やトキソプラズマが属するアピコンプレクサ門に属するクロメラ類藻類 (*Chromera velia*) とビトレラ (*Vitrella brassicaformis*) 2 種と襟鞭毛虫門に属する襟鞭毛虫 *Monosiga brevicollis* からのものである.

材料と方法

1. オーバーラップエクステンション PCR による遺伝子合成と酵素発現用プラスミドの作成

9 種類の PK 遺伝子は、オーバーラップエクステンション PCR によりその遺伝子を合成した。この合成の際に、C 末端側に **Strep-tag** 配列を付加した。使用したプライマーは付録 2 の Table1~Table9 に示した。合成した遺伝子は pGEM-T Easy ベクターに組み込み、塩基配列を確認した。その後、合成した遺伝子は pET30b ベクターに載せ替えた。方法はテクニカルノートの記述通りに行った。

2. 9 種類の PK のリコンビナントタンパク質の発現、精製及び酵素活性測定

9 種類 PK をリコンビナントタンパク質として発現させ、**Strep-tag** を利用したアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。酵素濃度は 280 nm の吸光度を元に推定した。酵素活性測定の方法はテクニカルノートの記述通りである。

3. 分子系統解析

原生物 PK と既知の PK のアミノ酸配列を MUSCLE 法によりアラインメントし、MEGA7.0 の最尤法を用いて分子系統樹を作成した(Kumar et al., 2016)。ブーツストラップ検定は 100 回行った。

結果と考察

1. 9種類のPKリコンビナント酵素の基質特異性の決定と活性測定

データベース上で新たに見いだされた9種類の原生生物のPK, すなわちアルベオラータに分類される繊毛虫 *Anophryoides haemophila* と *Pseudocohnilembus persalinushe*, ストラメノパイルに属し葉緑体を持たない卵菌類 *Albugo candida* と *Aphanomyces invadans*, 不等毛藻類に属するシオミドロ *Ectocarpus siliculosus*, クリプト藻植物門に属するクリプト藻類 *Guillardia theta*, マラリア原虫やトキソプラズマが属するアピコンプレクサ門に属するクロメラ類藻類 (*Chromera velia*) とビトレラ (*Vitrella brassicaformis*) 2種と襟鞭毛虫門に属する襟鞭毛虫 *Monosiga brevicollis* からのものである。

これら9種類のPK遺伝子をオーバーラップエクステンションPCRによって全合成を行い, それらの塩基配列を確認後, pET30bベクターに組み込んだ。そして大腸菌によるリコンビナントタンパク質として発現させた。これら9種類のリコンビナント酵素のうち, 卵菌類の *A. invadans* PK1 以外は全て可溶化したので, SDS-PAGEにより精製度の確認を行った(Fig. 2-1~9)。可溶化した8種類のPKの酵素活性を, 4種類の基質(アルギニン, クレアチン, タウロシアミン, グリコシアミン)を用いて測定した。8種類のPKの基質決定後, その基質濃度を変動させて, 酵素活性測定を行い, ミカエリスメンテンのグラフを作成した(Fig. 2-10~16)。 *A. haemophila* と *M. brevicollis* PKは, 基質アルギニンを使って測定を行った。それぞれの基質に対する酵素活性を表で示した(Table 2-1)。そして, PKの主基質を表のように決定した(Table 2-2)。

酵素活性測定の結果, *A. haemophila* と *M. brevicollis* PKは, 基質アルギニンに対して活性を示し, (活性の値を記入)この二種類のPKはAKであった(Table 2-2)。繊毛虫 *P. persalinushe*, 及びクロメラ類(*V. brassicaformis* と *C. velia*)の3種類のPKは, アルギニンに活性を示した(*P. persalinushe* 305.4 $\mu\text{moles /min} \cdot \text{mg protein}$, *V. brassicaformis* 3.61, *C. velia* 3.66)(Table 2-1)。この3種類のPKは基質をL-アルギニンとするAKと考えられる。クロメラ類では初めてのAKの発見である。また, *V. brassicaformis* と *C. velia* AKはL-アルギニン活性に対して, クレアチンに対する活性が3%程見られた(*V. brassicaformis* 0.79, *C. velia* 0.81)(Table 2-1)。 *A. haemophila* と *P. persalinushe* では他の基質に対する活性は見られなかった。また, 襟鞭毛虫とクロメラ類のAKにおいては, 高濃度のL-アルギニンに対して基質阻害が見られた(Fig. 2-12~14)。

一方, クリプト藻類(*G. theta*), シオミドロ(*E. siliculosus*), 及び卵菌類(*A. candida*)で見いだされたPKは, 基質タウロシアミンに対して活性を示した(*G. theta* 6.15, *E. siliculosus* 6.93, *A. candida* 2.05)(Table 2-1)。この3種のPKは基質をタウロシアミンとするTKであった。クリプト藻類においては初めてのTKの発見である。(Table 2-1, 2-2)。

*G. theta*TKと *E. siliculosus* ではタウロシアミンに対する活性に対して, 10%ほどのア

ルギニンに対する活性が見られた(*G. theta* 0.61, *E. siliculosus* 0.69) (Table 2-1). 原生生物疫病菌の近縁種である *Phytophthora sojae* TK では本来の基質以外にグリコシアミンに対する活性が報告されている(Palmar et al., 2013). これらのことから, 原生生物 TK は基質特異性が厳密ではない可能性がある.

G. theta TK は, 基質タウロシアミンに対する強い基質阻害が見られた(Fig. 2-17). *G. theta* TK の基質阻害時メカニズムは, 第一章で記述したモデル検定を行った結果, 第 2 モデルで説明された (Table 2-6). *G. theta* TK のそれぞれのモデルにおける酵素パラメーターを決定した(Table 2-7). また, 酵素パラメーターを元に理論値を計算し, 測定点と比較した (Fig. 2-17).

2. 8 種類の原生生物 PK 酵素特性の比較

2-1 通常型 AK

今回の研究で扱った AK の内, 基質阻害が見られなかったものは, 繊毛虫 *A. haemophila* AK1 と *P. persalinushe* AK1 である. この 2 種類の AK と他の AK とアミノ酸配列を比較した(Fig. 2-18). カプトガニ AK では AK の機能に重要な ATP 結合部位とアルギニン結合部位が決定されている. (Zhou et al., 1998). ATP 結合部位はオレンジ, アルギニン結合部位は青色で示している. また, グアニジド基質に特異的なアミノ酸配列であり緑で示している. (Edmiston et al., 2001; Tanaka and Suzuki, 2004). *A. haemophila* AK と *P. persalinushe* AK ではアルギニン結合部位であるアラインメント番号 115 番目のグリシンが, *A. haemophila* ではイソロイシンに, *P. persalinushe* ではグルタミンに置換していたが, それ以外は保存されていた. 基質阻害が見られなかった 2 種類の AK(*A. haemophila* と *P. persalinushe*)の酵素パラメーターを ATP 濃度 4.76 mM の条件下で決定した(Table 2-3, Fig. 2-10, 2-11). *A. haemophila* AK と *P. persalinushe* AK の K_m^{Arg} 値(0.21~0.24 mM)は, 原生生物であるハプト藻類 *Emiliania huxleyi* AK, テトラヒメナ AK1, 及びヨツヒメゾウリムシ AK2 とほぼ同様の値(0.18~0.26 mM)を示し, 他の多細胞生物 AK の K_m^{Arg} (0.38~1.44 mM)よりもアルギニンに対する親和性が比較的高かった(Table 2-3). *P. persalinushe* AK1 の V_{max} (313.27 $\mu\text{moles Pi min}^{-1}\text{mg protein}^{-1}$)は, ミナミヌマエビ AK2 (300)と同様に他の AK よりも高い (Table 2-3). また, 触媒効率 V_{max}/K_m (1448.31)も, 他の AK よりも (24.3~797.00)高かった. この結果から, *P. persalinushe* AK は非常に活性が高いと考えられる. 一方で *A. haemophila* AK1 の V_{max} (60.12)は, 同じ繊毛虫 AK の値(60.4~156)と同程度であった(Table 2-3). *A. haemophila* AK1 は他の繊毛虫と同様の酵素特性を示した.

2-2 基質阻害を示す AK

基質阻害を起こす AK は, 襟鞭毛虫の *M. brevicollis* AK, クロメラ類の *V. brassicaformis* AK2D1, 及びクロメラ類である *C. velia* AK1 であった. この 3 種類の AK と他の AK とア

ミノ酸配列を比較した(Fig. 2-18). *V. brassicaformis* AK では, アルギニン結合部位であるアラインメント番号 115 番目のグリシンがセリンに置換していたが, それ以外は保存されていた. *M. brevicollis* AK と *C. velia* AK ではアルギニン結合部位は全て保存されていた.

基質阻害が存在した 3 種類の AK (*M. brevicollis*, *V. brassicaformis*, 及び *C. velia*) については第一章で述べた第 3 モデルで解析し (Table 2-4), また, これら 3 種の AK の反応速度と基質濃度の関係を (Fig. 2-12~14)に示した. これらの 3 種類の AK と強い基質阻害を示すヨツヒメゾウリムシ AK3 の酵素パラメーターを比較したところ(Table 2-4), 前者の基質阻害による活性の低下は, ヨツヒメゾウリムシ AK3 よりも最も小さかったため, 第 3 モデルで解析した. *M. brevicollis* AK の V_{max} (2.05)は, 他の AK のものよりも低い一方で, クロメラ類 AK の V_{max} は(*V. brassicaformis* AK2D1, 167.62; *C. velia* AK, 318.27) ヨツヒメゾウリムシ AK3 (93.0)よりも高かった(Table 2-4). これらの基質阻害を示す AK の第二アルギニン結合部位の解離定数 K_i は, ヨツヒメゾウリムシ AK3 (model3, 4.73mM) よりも大きく(24.3~72.4), この部位に対するアルギニン親和性が低いことを示している (Table 2-4). この結果は, AK3 ほど基質阻害による大きな反応速度の低下が見られないことに一致する.

2-3 通常 TK

今回の研究で扱った TK の内で基質阻害が見られなかったものは, 卵菌類 *A. candida* TK と褐藻類 *E. siliculosus* TK2 である. この 2 種類の TK と, 他の生物由来の TK や環形動物 PK のアミノ酸配列を比較した(Fig. 2-19). 原生生物 TK では, グアニジド基質に特異的なアミノ酸は(緑で示した 95 番目)はトリプトファンであるが, *A. candida* TK と *E. siliculosus* TK2 でもこのアミノ酸は保存されていた. GS 領域は主基質によりアミノ酸の欠損が報告されており, GK では欠損なし, CK では 1 残基欠損, TK, LK, では 5 アミノ酸残基の欠損, 扁形動物 TK では 6 アミノ酸残基の欠損が見られる(Fig. 2-19). *A. candida* TK と *E. siliculosus* TK2 では他の原生生物 TK と同様に 5 残基の欠損が見られた. *A. candida* TK の GS 領域近辺のアミノ酸配列は, 原生生物 TK 特異的な配列が保存されていた. 一方 *E. siliculosus* TK2 の GS 領域近辺のアミノ酸 124 番目のアミノ酸が他の原生生物ではアスパラギン酸であるが, メチオニンに置換されていた. シマミミズ(*Eisenia foetida*)-LK やタマシキゴカイ(*Arenicola brasiliensis*)TK では, GS 領域内に変異を加えた変異体において, 基質特異性が変動することが知られている (Tanaka and Suzuki, 2004; Tanaka et al., 2011). *E. siliculosus* TK2 では, この置換によって基質特異性が若干低くなりアルギニンに活性を示した可能性があり, 基質特異性の厳密性に関与している可能性がある.

E. siliculosus TK2 の V_{max} (10.8)は, 他の原生生物 TK のもの(36.1~70.3)と比較すると減少してるが, 環形動物 TK のもの(14.1~60)と同程度であった(Table 2-5). タウロシアミンに対する親和性を示す K_m^{Tau} の値(1.4)は, 他の原生生物 TK(0.26~0.969)よりも比較的高く, 環形動物 TK(0.57~4.01)と同程度であった. 触媒効率を示す V_{max}/K_m (7.71)は

原生生物 TK(62.24~266.76)と比較して大きく減少していた(Table 2-5). これはの GS 領域近辺のアミノ酸 124 番目のアスパラギン酸がメチオニンに置換していることに起因しているかもしれない. 一方で, *A. candida* TK の V_{max} (90.7)は, 他の原生生物 TK の値(36.1~70.3)と同程度であった. K_m^{Tau} の値(0.34)は, 他の原生生物 TK(0.26~0.969)と同程度であった(Table 2-5). *A. candida* TK は他の原生生物 TK と同様の酵素特性を示した.

2-4 基質阻害を示す TK

本研究で扱った TK の内で, 基質阻害が見られたものは *G. theta* TK である. *G. theta* TK と, 他の生物由来の TK や環形動物 PK のアミノ酸配列を比較した(Fig. 2-19). 原生生物 TK ではグアニジド基質に特異的なアミノ酸(95 番目)はトリプトファンであるが, *G. theta* TK でもこの残基は保存されていた. GS 領域では他の原生生物 TK と同様に 5 残基の欠損が見られた. また, GS 領域近辺のアミノ酸 124 番目のアミノ酸が他の原生生物ではアスパラギン酸であるが, ロイシンに置換されていた. また, 125 番目のアミノ酸は他の TK では極性を持たないアミノ酸であるのに対して *G. theta* TK では, 正電荷の側鎖を持つ, リシンに置換していた. 基質であるタウロシアミンは負電荷の部分を持ち, この部分とリシンが結合しているかもしれない.

G. theta TK では, 比較的基質阻害による活性の低下が大きいため, 第一章で述べた三つのモデル検証を行い, 絶対係数(R^2), 赤池情報量基準(AICc) 及び残差の標準偏差である $Sy.x$ の三つのパラメーターを比較した (Table 2-6). その結果, 絶対係数は第 3 モデルが最も値が低く, 第 1 モデルと第 2 モデルは同じ値を示した. 赤池情報量基準(AICc)は第 2 モデルが最も値が低くなった. $Sy.x$ は第 2 モデルがもっとも値が低くなった. これらの結果から, 第 2 モデルの反応機構が最も適正であると考えられる. 第 2 のモデルは, 第二部位へのタウロシアミンの結合が, 第一結合部位への結合後にのみ起こると仮定しており, 酵素反応は第 1 モデルと同様に起こる. このモデルによる理論値は, 実測値とよく一致していた(Fig. 2-17).

最適なモデルと示唆された第 2 モデルの酵素パラメーターから, *G. theta* TK の基質阻害の酵素特性を考察した(Table 2-7). 第一タウロシアミン基質結合時(ES 複合体)の最大反応速度を V_{max}^{ES} とし, 第二のタウロシアミン基質結合時の最大反応速度(SES 複合体)を V_{max}^{SES} としたとき, V_{max}^{SES} (31.98 $\mu\text{moles Pi min}^{-1}\text{mg protein}^{-1}$)は V_{max}^{ES} (102.22)の 3 分の 1 に低下していた(Table 2-7). また ES 複合体の解離定数 ($K_m^{ES} = 0.19 \text{ mM}$)は, SES が ES に解離する解離定数($K_i^{SES} = 1.87 \text{ mM}$) の約 10 分の 1 であった. 第一部位へのタウロシアミン結合が, 第二の部位のよりも強いことが示している(Table 2-7). これは, 基質が異なるが, 第一章で述べたヨツヒメゾウリムシ AK3 では第一結合部位よりも, 第二部位の親和性が高い. *G. theta* TK は AK3 とは逆の基質親和性を示しており, 基質阻害の結合部位や親和性が大きく異なる可能性がある. また, 得られた酵素パラメーターから, タウロシアミン濃度と [E], [ES], [SES], [SE]の関係をシミュレートした. このシミュレーション

ンではタウロシアミン濃度が 2 mM までは ES の割合は SES よりも多いが、それ以上では SES の割合が逆転する(Fig. 2-20).

次に、得られた酵素パラメーターから、基質阻害が存在する場合と、しない場合の酵素反応曲線を比較をした(Fig. 2-21). この結果は、タウロシアミン濃度 4 mM 以上の領域において、阻害が存在する場合は 2 倍以上速度低下が起こることを示している. 次に、第 1 及び第 2 モデルにおいて酵素パラメーターから V_{\max}^{ES} と V_{\max}^{SES} のタウロシアミン濃度に対する寄与を比較した(Fig. 2-22). 第 1 モデルでは、タウロシアミン濃度が約 9 mM までは V_{\max}^{ES} の寄与が大きいが、それ以上では V_{\max}^{SES} の割合が高くなっていくと考えられる. 第 2 モデルでは、タウロシアミン濃度 6 mM までは V_{\max}^{ES} の寄与が大きいが、それ以上では V_{\max}^{SES} の割合が高くなっていくと考えられる.

3. 分子系統解析

今回見いだされた 9 種類の PK を加えてアラインメントを作成し、原生生物の進化的位置に注目して、PK の分子系統解析を行った(Fig. 2-23). この結果、原生生物 PK は 3 種類のクラスターと CK グループに分かれた. 分子系統樹では原生生物 AK クラスターを赤で、原生生物 TK クラスターを緑、原生生物 CK クラスターを青で示した. AK は二つのクラスターに分かれ、一方のクラスターには襟鞭毛虫、繊毛虫、及びクロメラ類の AK が(AK クラスター1), 他方には繊毛虫テトラヒメナと *Stylonychia* の AK が含まれた(AK クラスター2). AK クラスター1 に属する(襟鞭毛虫、繊毛虫、及びクロメラ類の AK) は酵素特性として、他の AK では見られない基質阻害を持つ. これらの結果から、原生生物 AK は AK の祖先型から、進化の早い段階で二方向に分岐した可能性がある. TK は環形動物や扁形動物に独立に見いだされているが、分子系統解析において原生生物 TK はこれらの TK とは異なる系統に属している. また、原生生物 AK クラスターとも異なる系統であった. 原生生物 TK は既知の PK とは異なる起源を持つ可能性がある. 原生生物 CK は、多細胞生物 CK クラスターや、二量体 CK 遺伝子から進化してきたと考えられている環形動物 PK クラスターに含まれていた. 原生生物 CK は脊椎動物 CK と共通の祖先から進化してきた可能性がある.

このような真核生物における PK の分布を Fig.2-24 に示した. 真核生物では多細胞生物において PK が見いだされているのは、後生動物のみである. 原生生物では、トリパノソーマを含むエクスカバータ、卵菌類や褐藻を含む不等毛植物門、繊毛虫やクロメラ類を含むアルベオラータ、ハプト藻類、クリプト藻類、襟鞭毛虫で見いだされている. この Fig. 2-24 を見てみると葉緑体を持つもので PK が多く見いだされている. しかし、陸上植物や緑藻では PK の存在は報告されていない. 葉緑体を持つ原生生物であるクラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) では PK 遺伝子は存在しない. 一方で、葉緑体を持つ褐藻やクリプト藻類では TK が、クロメラ類では AK が存在している. この分布は、二次細胞内共生における葉緑体の取り込みと関連があるかもしれない. 陸上植物は葉緑体をシアノバク

テリアから一次細胞内共生により獲得していると考えられている。その後、葉緑体を獲得した真核生物は紅藻と緑藻に独立に進化してきた。二次細胞内共生とは、この一次細胞内共生により、葉緑体を獲得した紅藻や緑藻をさらに共生し、獲得することである。二次細胞内共生の際の葉緑体には、紅藻由来と緑藻類の二種類が存在し、それぞれが独立に進化してきたと考えられている(Keeling, 2010)。興味深いことに、紅藻由来の葉緑体を持つ褐藻、クリプト藻類、及びクロメラ類でのみ PK が見いだされている。これらのことから、PK の分布から見た葉緑体の獲得を考察し、その予想を Fig. 2-25 に示した。祖先的な真核生物から一次細胞内共生により、葉緑体を獲得した生物(現在の陸上植物や緑藻)は PK が存在しない。この一次細胞内共生の時点では PK は存在していないか、その後進化の過程で失われていったと考えられる。次に、二次細胞内共生により緑藻由来の葉緑体を獲得した生物(クロラユニオン藻類)では PK は見いだされていない。これらの生物では PK は存在していないか、失われてしまったと考えられる。そして紅藻由来の葉緑体を獲得した生物であるアルベオラータ、不等毛植物、ハプト藻類、クリプト藻類では PK が見いだされている。このことから、紅藻由来の葉緑体を共生を行った祖先真核生物には PK が存在していた可能性がある。

一方で、葉緑体を持つミドリムシ *Euglena gracilis* では AK が見いだされている(Piccinni and Coppellotti, 1977)。しかし、ミドリムシの葉緑体は、最初に紅藻由来の葉緑体を持つ黄色藻類との共生により獲得後、一度葉緑体を喪失した。その後、ミドリムシの捕食性の生物が緑藻と二次細胞内共生を行い、緑藻類由来の葉緑体を持つミドリムシが誕生したと考えられている(Maruyama et al., 2011; Yang et al., 2011)。ミドリムシでは葉緑体の交換が起きているが、緑藻類由来の葉緑体は後から入手していることから、緑藻類由来の葉緑体を持つミドリムシでは AK を保持しているのかもしれない。また、珪藻では遺伝子は見いだされたが、PK の酵素活性は見られなかった(百本 2014)。紅藻由来の葉緑体を持つ原生生物はすべての種が PK を保持していないことが考えられる。

原生生物において PK は三種類(AK, TK, CK)分布しているがその起源は未だ不明である。ただ、原生生物 PK は独自かつ多様性に富んだ PK を保持しており、グアニジド基質の多様性から、原生生物の初期の段階で PK を保持していたと考えられる。このような多様性を持つ PK は環形動物 PK が存在する。環形動物 PK は AK, TK, CK に加え、GK, LK, OK が見出されている(Van Thoai et al., 1966; Ellington, 2001)。これらの環形動物 PK は分子系統解析から、ミトコンドリア型 CK から進化してきたと考えられている(Uda et al., 2012)。環形動物 PK は非常に多様性を保持している一方で、基質の特異性が一つのアミノ酸の置換によって変化することが報告されている(Tanaka and Suzuki 2004; Tanaka et al., 2011)。原生生物 PK では *Phytophthora sojae* TK では他の基質であるグリコシアミンに活性を示し(Palmer et al., 2013)、本研究では *G. theta* TK と *E. siliculosus* TK2 では他の基質であるアルギニンに対する活性が示された。PK ではこの基質特異性の柔軟な能力が、基質の選択に重要であり、原生生物 PK ではこの柔軟性により PK が多様化した可能性がある。

Table 2-1 6種類の原生生物PKのそれぞれの基質に対する活性

基質濃度 (mM)		<i>Pseudocohnilembus persalinushe</i> AK1	<i>Chromera velia</i> AK1	<i>Vitrella brassicaformis</i> AK1	<i>Ectocarpus siliculosus</i> TK2	<i>Albugo candida</i> TK	<i>Guillardia theta</i> TK
1.19	L-Arg	305.4 ± 63.8	3.66 ± 1.54	3.61 ± 1.52	0.69 ± 0.08	0.14 ± 0.04	0.61 ± 0.07
1.19	D-Arg	3.31 ± 0.43	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.14 ± 0.05	0.15 ± 0.03	0.13 ± 0.04
1.19	Creatine	2.73 ± 0.62	0.81 ± 0.01	0.79 ± 0.01	0.47 ± 0.03	0.10 ± 0.03	0.42 ± 0.03
1.19	Glycocyamine	3.20 ± 1.43	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.20 ± 0.04	0.28 ± 0.01
1.19	Taurocyamine	1.19 ± 0.22	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.02	6.93 ± 0.87	2.05 ± 0.07	6.15 ± 0.77
	control (Tris-HCl)	4.31 ± 0.78	0.71 ± 0.02	0.70 ± 0.03	0.24 ± 0.03	0.40 ± 0.09	0.21 ± 0.03

Table 2-2 9種のPKの基質特異性

分類	種名	PKの分類
繊毛虫	<i>Anophryoides haemophila</i>	AK
繊毛虫	<i>Pseudocohnilembus persalinushe</i>	AK
襟鞭毛虫	<i>Monosiga brevicollis</i>	AK
クロメラ類	<i>Vitrella brassicaformis</i>	AK
クロメラ類	<i>Chromera velia</i>	AK
卵菌類	<i>Aphanomyces invadans</i>	未決定
卵菌類	<i>Albugo candida</i>	TK
クリプト藻類	<i>Guillardia theta</i>	TK
褐藻	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	TK

Table 2-3 織毛虫 *A. haemophila* AKと *P. persalinushe* AKと他のAKの酵素パラメーターの比較

分類群		Reference	Vmax[umoles Pi min ⁻¹ mg protein ⁻¹]	Km[mM]	Vmax/Km
織毛虫	<i>Anophryoides haemophila</i> AK1	This work	60.12 ± 0.86	0.25 ± 0.05	242.9
織毛虫	<i>Pseudocohnilembus persalinushe</i> AK1	This work	313.3 ± 5.07	0.21 ± 0.01	1448.3
節足動物	<i>Neocaridina denticulata</i> AK2	Iwanami et al., 2009	300.0 ± 7.8	0.38 ± 0.03	797.0
軟体動物	<i>Crassostrea gigas</i> AK	Fuzimoto et al., 2005	108.2 ± 11.3	1.44 ± 0.28	75.2
細菌	<i>Sulfurovum lithotrophicum</i> AK	Suzuki et al. 2013	132.0 ± 8.05	0.40 ± 0.10	330
細菌	<i>Desulfotalea psychrophila</i> AK	Andrews et al. 2008	4.71 ± 0.18	0.07 ± 0.01	67.2
織毛虫	<i>Tetrahymena pyriformis</i> AK1	Michibata et al., 2014	156.0 ± 2.0	0.26 ± 0.07	600.0
織毛虫	<i>Paramecium tetraurelia</i> AK2	Yano et al., 2017	60.40 ± 1.27	0.18 ± 0.02	335.6
ハプト藻	<i>Emiliana huxleyi</i>	渡邊 2016	4.86 ± 0.15	0.20 ± 0.02	24.3

測定はATP濃度4.76 mM の条件で測定した。

Table 2-4 基質阻害が存在する原生生物AKとヨツヒメゾウリムシAK3の酵素パラメーターの比較

分類群	Reference	Vmax[$\mu\text{moles Pi min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$]	Km [mM]	Ki [mM]
襟鞭毛虫 <i>Monosiga brevicollis</i> AK	This work	2.05 ± 0.02	0.04 ± 0.004	72.4 ± 11.4
クロメラ類 <i>Vitrella brassicaformis</i> AK2D1	This work	167.6 ± 4.32	0.13 ± 0.02	37.5 ± 7.61
クロメラ類 <i>Chromera velia</i> AK1	This work	318.3 ± 13.2	0.28 ± 0.04	24.6 ± 5.61
繊毛虫 <i>Paramecium tetraurelia</i> AK3	Yano et al., 2017	93.0 ± 6.42	0.08 ± 0.03	4.36 ± 0.71

測定はATP濃度4.76 mM の条件で測定した。

Table 2-5 原生生物TKと他動物由来のTKの酵素パラメーターの比較

分類群	Reference	Vmax[$\mu\text{moles Pi min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$]	Km [mM]	Vmax/Km
卵菌類 <i>Albugo candida</i> TK	This work	90.7 \pm 1.53	0.34 \pm 0.03	266.8
褐藻 <i>Ectocarpus siliculosus</i> TK2	This work	10.8 \pm 0.7	1.40 \pm 0.23	7.7
卵菌類 <i>Phytophthora infestans</i> TK1	Uda et al., 2013	45.7 \pm 1.83	0.27 \pm 0.05	169.9
卵菌類 <i>Phytophthora infestans</i> TK2	Uda et al., 2013	70.3 \pm 2.52	0.97 \pm 0.09	72.5
褐藻 <i>Ectocarpus siliculosus</i> TK1	八重尾 2016	36.1 \pm 0.71	0.58 \pm 0.04	62.2
環形動物 <i>Arenicola brasiliensis</i> cytoplasmic TK	Uda et al., 2005b	14.1 \pm 0.68	4.01 \pm 0.42	3.5
環形動物 <i>Arenicola brasiliensis</i> mitochondrial TK	Tanaka et al., 2011	43.1 \pm 2.15	0.91 \pm 0.12	47.2
環形動物 <i>Riftia pachyptila</i> mitochondrial TK	Uda et al., 2005b	18.8 \pm 2.28	2.12 \pm 0.46	8.9
扁形動物 <i>Paragonimus westermani</i> TK	Jarilla et al., 2009	60.0 \pm 3.01	0.57 \pm 0.1	105.3

測定はATP濃度4.76 mM の条件で測定した。

Table 2-6 *Guillardia theta* TKの基質阻害モデルの統計パラメーターの比較

	R ²	AICc	Sy.x
Model 1	0.97552	31.761	1.53045
Model 2	0.97552	28.153	1.49169
Model 3	0.92621	51.401	2.52716

Table 2-7 *Guillardia theta* TKにおける3種類の反応機構モデルの酵素パラメーター

	V_{\max}^{ES}	V_{\max}^{SES}	K_{m}^{ES} [mM]	$K_{\text{di}}^{\text{SE}}$ [mM]	$K_{\text{ss}}^{\text{SES}}$ [mM]	$K_{\text{i}}^{\text{SES}}$ [mM]	alpha	beta	備考
Model 1	107.24	32.17	0.2	4.17	0.054	1.79	0.43	0.3	24点実測値
Model 2	102.22 ± 7.40	31.98 ± 2.31	0.19 ± 0.04			1.87 ± 0.49			
Model 3	78.5 ± 2.63		0.08 ± 0.02			10.2 ± 1.03			

第1モデルは誤差が算出されなかった。

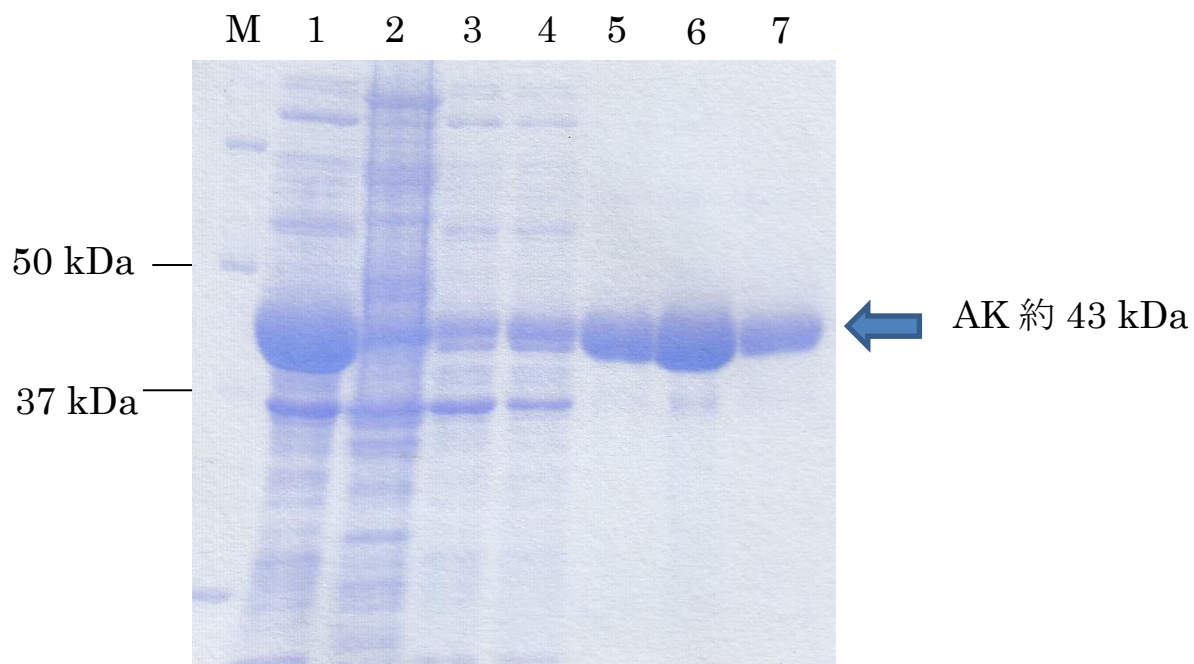


Fig. 2-1 *Anophryoides haemophila* AK1 の SDS-PAGE による精製度の確認

M : 分子量マーカー

1 : 可溶性画分

2 : 不溶性画分

3 : アフィニティカラムの未吸着画分

4 : Buffer W 溶出画分

5 : Buffer E 1 ml 溶出画分

6 : Buffer E 2 ml 溶出画分

7 : Buffer E 3 ml 溶出画分

発現条件は16°C, 48時間, IPTGの最終濃度0.5mM.

酵素活性測定には6の画分を使用した.

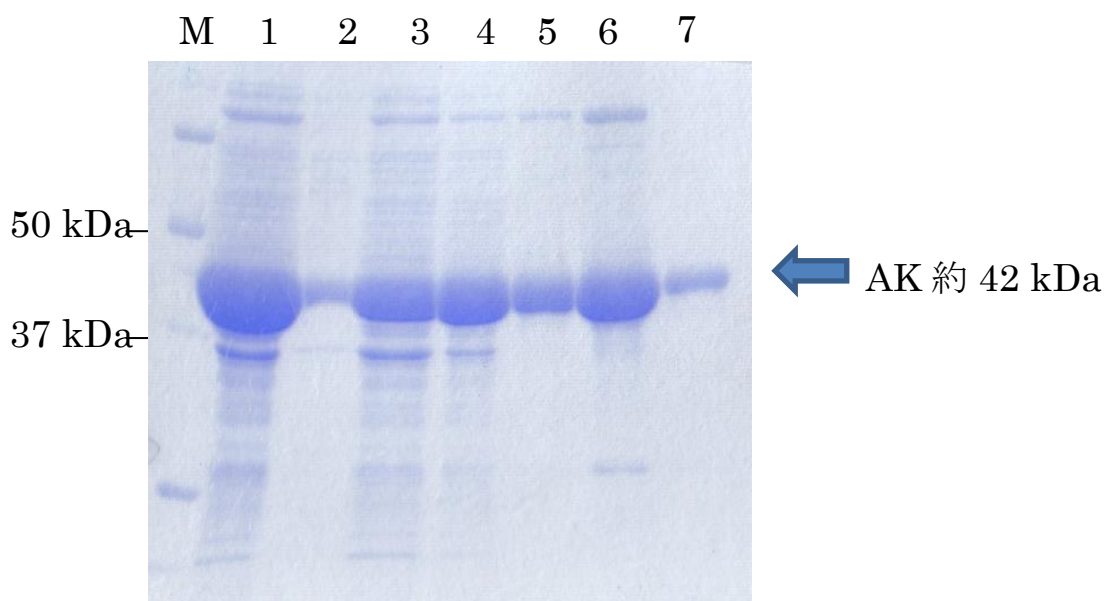


Fig. 2-2 *Pseudocohnilembus persalinus* AK1 の SDS-PAGE による精製度の確認

M : 分子量マーカー

1 : 可溶性画分

2 : 不溶性画分

3 : アフィニティカラムの未吸着画分

4 : Buffer W 溶出画分

5 : Buffer E 1 ml 溶出画分

6 : Buffer E 2 ml 溶出画分

7 : Buffer E 3 ml 溶出画分

発現条件は16°C, 48時間, IPTGの最終濃度0.5 mM.

酵素活性測定には 6 の画分を使用した.

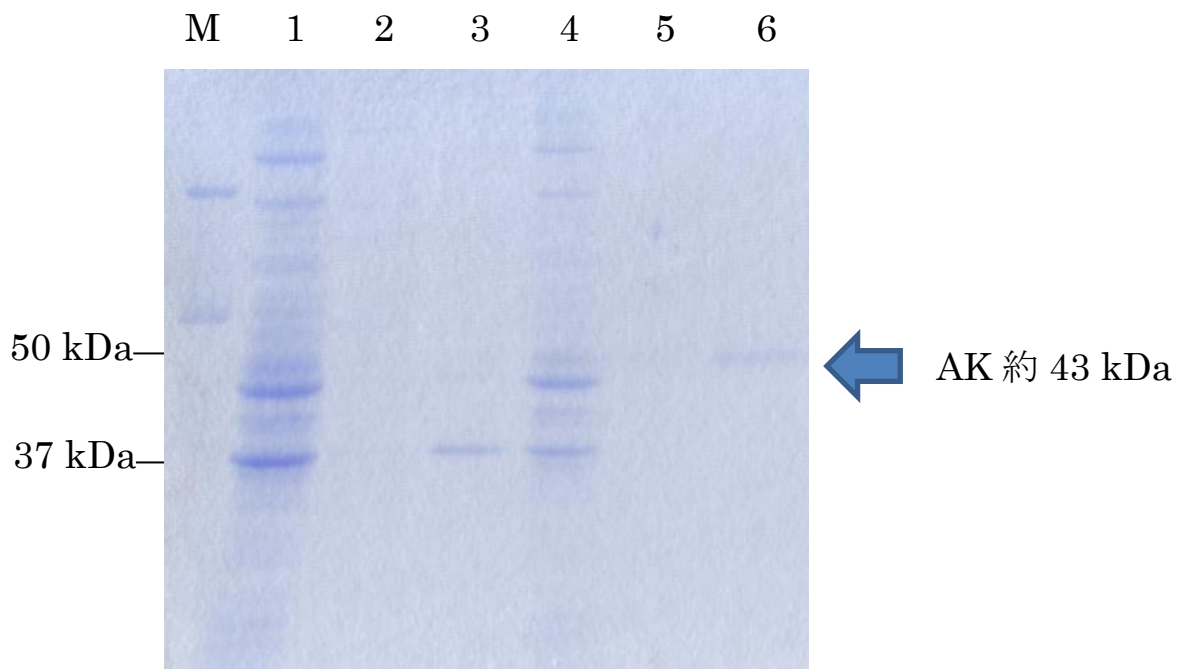


Fig. 2-3 *Monosiga brevicollis* AK の SDS-PAGE による精製度の確認

M : 分子量マーカー

1 : 可溶性画分

2 : 不溶性画分

3 : アフィニティカラムの未吸着画分

4 : Buffer W 溶出画分

5 : Buffer E 溶出画分

6 : Buffer E 溶出画分 3 倍量

発現条件は16°C, 48時間, IPTGの最終濃度0.5 mM.

酵素活性測定には 6 の画分を使用した.

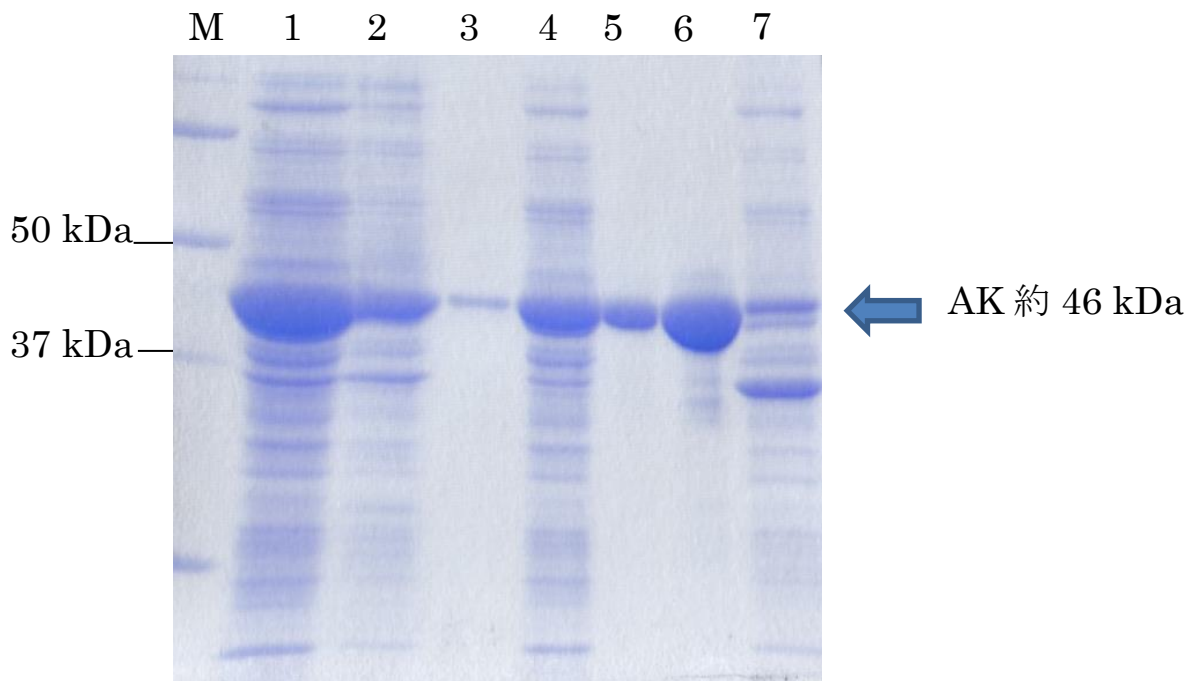


Fig. 2-4 *Chromera velia* AK1 の SDS-PAGE による精製度の確認

M : 分子量マーカー

1 : 可溶性画分

2 : 不溶性画分

3 : アフィニティカラムの未吸着画分

4 : Buffer W 溶出画分

5 : Buffer E 1 ml 溶出画分

6 : Buffer E 2 ml 溶出画分

7 : Buffer E 3 ml 溶出画分

発現条件は16°C, 48時間, IPTGの最終濃度0.5 mM.

酵素活性測定には6の画分を使用した.

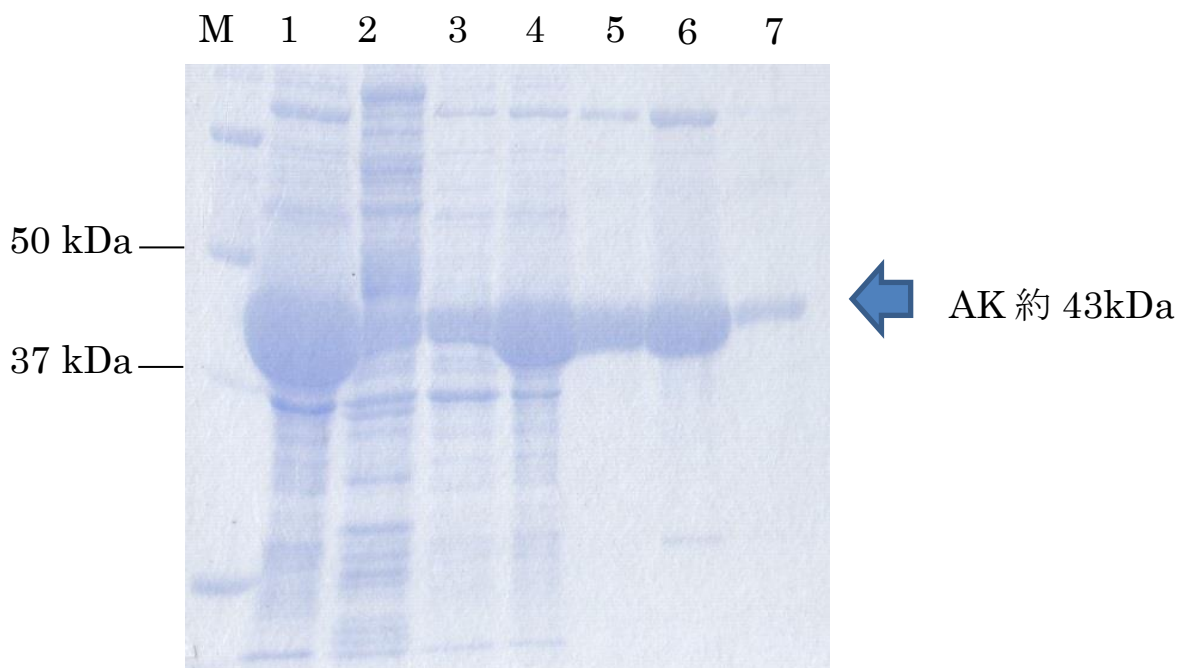


Fig. 2-5 *Vitrella brassicaformis* AK2D1-の SDS-PAGE による精製度の確認

M : 分子量マーカー

1 : 可溶性画分

2 : 不溶性画分

3 : アフィニティカラムの未吸着画分

4 : Buffer W 溶出画分

5 : Buffer E 1 ml 溶出画分

6 : Buffer E 2 ml 溶出画分

7 : Buffer E 3 ml 溶出画分

発現条件は16°C, 48時間, IPTGの最終濃度0.5 mM.

酵素活性測定には 6 の画分を使用した.

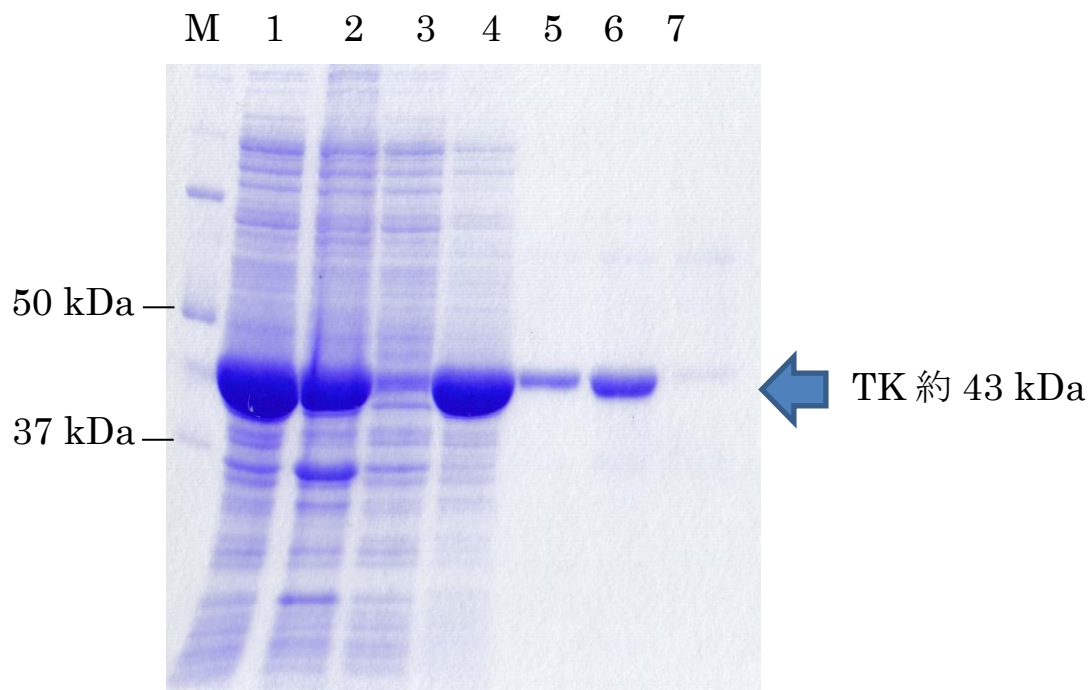


Fig. 2-6 *Ectocarpus siliculosus* TK2 の SDS-PAGE による精製度の確認

M : 分子量マーカー

1 : 可溶性画分

2 : 不溶性画分

3 : アフィニティカラムの未吸着画分

4 : Buffer W 溶出画分

5 : Buffer E 1 ml 溶出画分

6 : Buffer E 2 ml 溶出画分

7 : Buffer E 3 ml 溶出画分

発現条件は16°C, 48時間, IPTGの最終濃度0.5 mM.

酵素活性測定には6の画分を使用した.

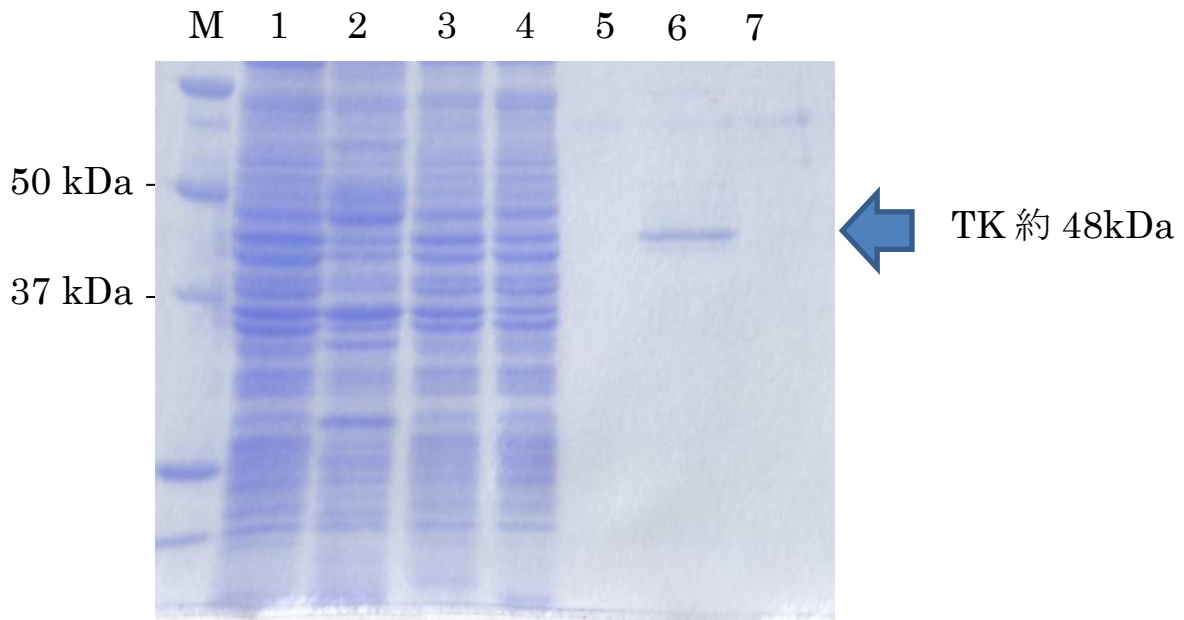


Fig. 2-7 *Albugo candida* TK の SDS-PAGE による精製度の確認

M : 分子量マーカー

1 : 可溶性画分

2 : 不溶性画分

3 : アフィニティカラムの未吸着画分

4 : Buffer W 溶出画分

5 : Buffer E 1 ml 溶出画分

6 : Buffer E 2 ml 溶出画分

7 : Buffer E 3 ml 溶出画分

発現条件は16°C, 48時間, IPTGの最終濃度0.5 mM.

酵素活性測定には 6 の画分を使用した.

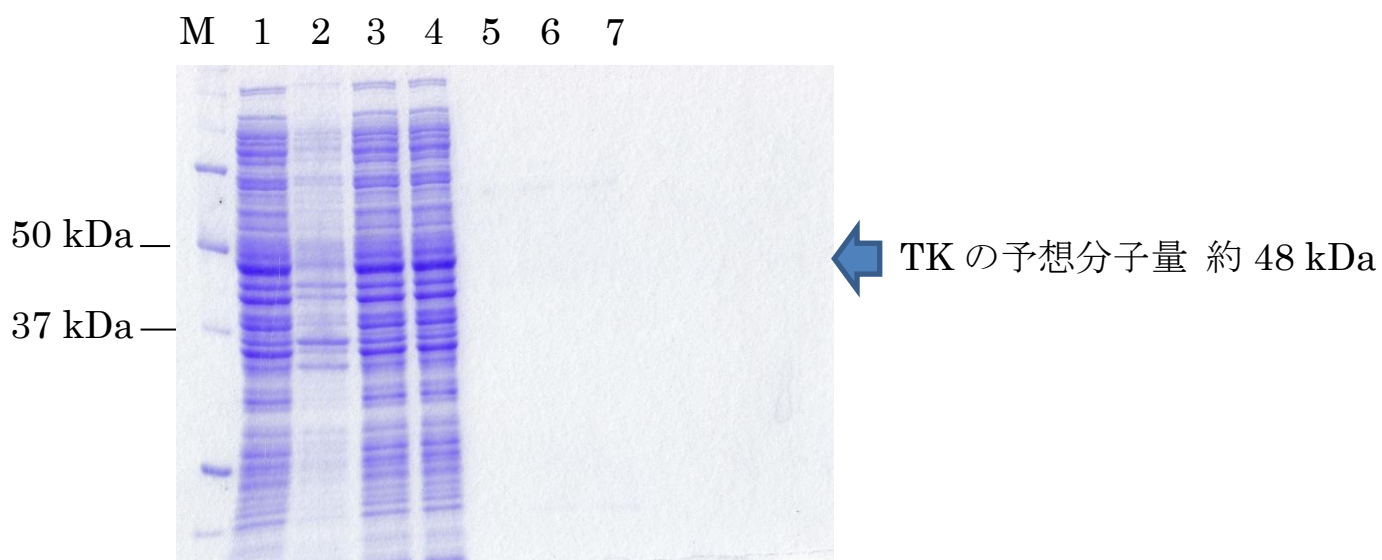


Fig. 2-8 *Aphanomyces invadans* PK1 の SDSPAGE による精製度の確認

M : 分子量マーカー

1 : 可溶性画分

2 : 不溶性画分

3 : アフィニティカラムの未吸着画分

4 : Buffer W 溶出画分

5 : Buffer E 1 ml 溶出画分

6 : Buffer E 2 ml 溶出画分

7 : Buffer E 3 ml 溶出画分

発現条件は16°C, 48時間, IPTGの最終濃度0.5 mM.

PK1-*Aphanomyces invadans* は可溶化されなかった.

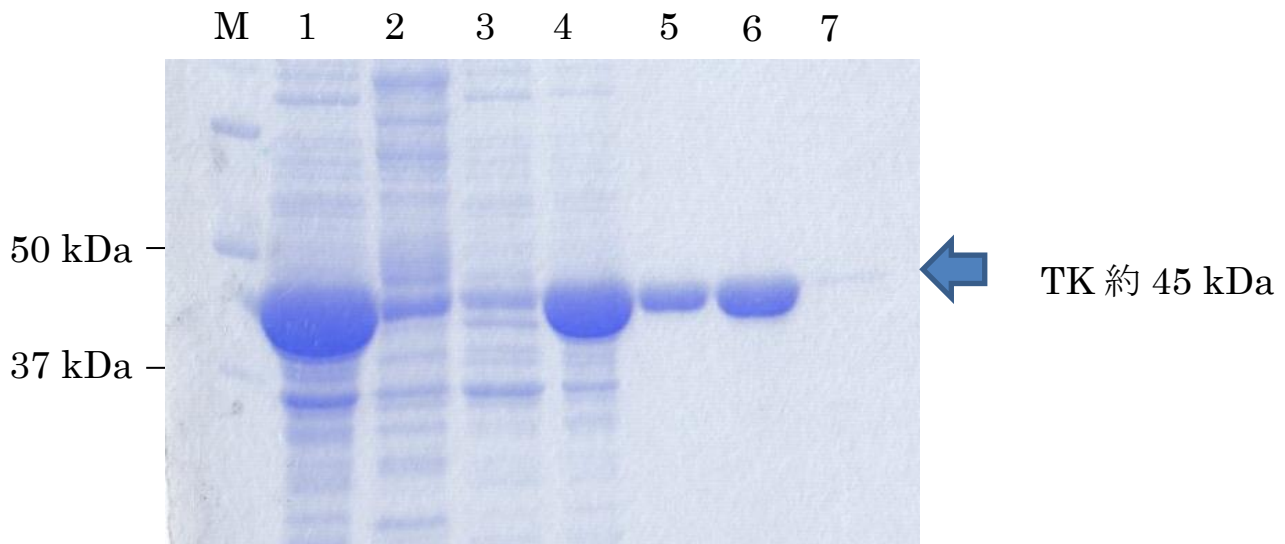


Fig. 2-9 *Guillardia theta* TK1 の SDS-PAGE による精製度の確認

M : 分子量マーカー

1 : 可溶性画分

2 : 不溶性画分

3 : アフィニティカラムの未吸着画分

4 : Buffer W 溶出画分

5 : Buffer E 1 ml 溶出画分

6 : Buffer E 2 ml 溶出画分

7 : Buffer E 3 ml 溶出画分

発現条件は16°C, 48時間, IPTGの最終濃度0.5 mM.

酵素活性測定には6の画分を使用した.

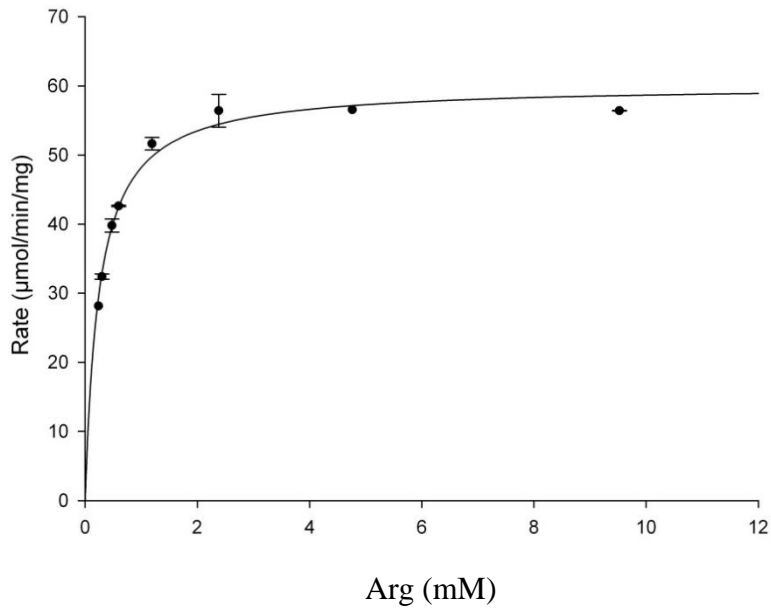


Fig. 2-10 *Anophryoides haemophila* AK1 のミカエリス・メンテンプロット

測定は ATP 濃度 4.76 mM の条件で測定した.

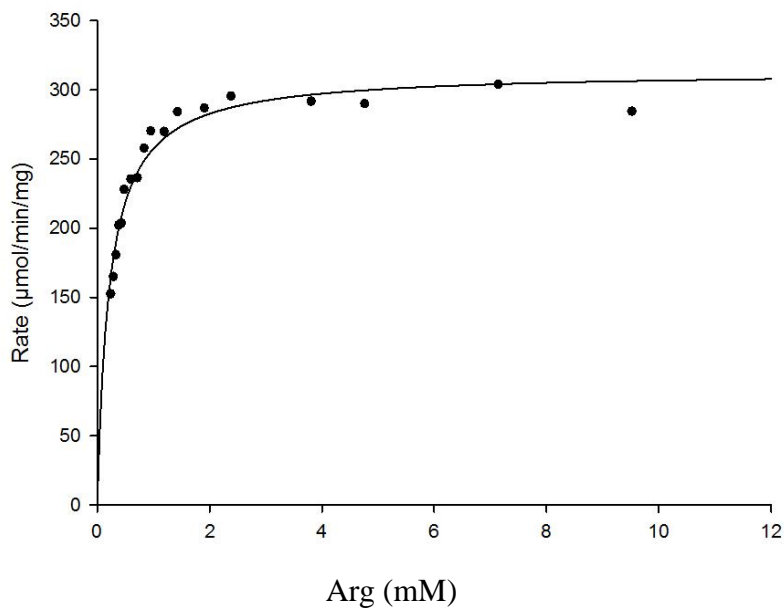


Fig. 2-11 *Pseudocohnilembus persalinushe* AK1-のミカエリス・メンテンプロット

測定は ATP 濃度 4.76 mM の条件で測定した.

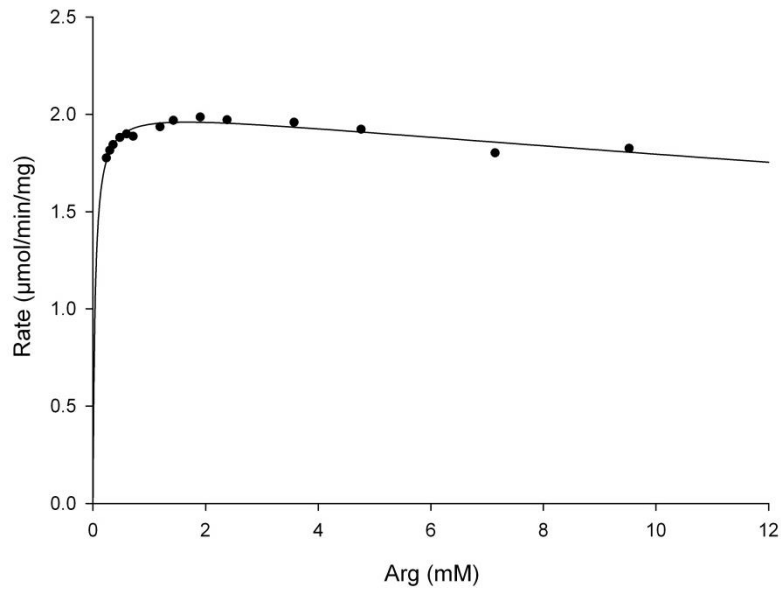


Fig. 2-12 *Monosiga brevicollis* AK のミカエリス・メンテンプロット

測定は ATP 濃度 4.76 mM の条件で測定した.

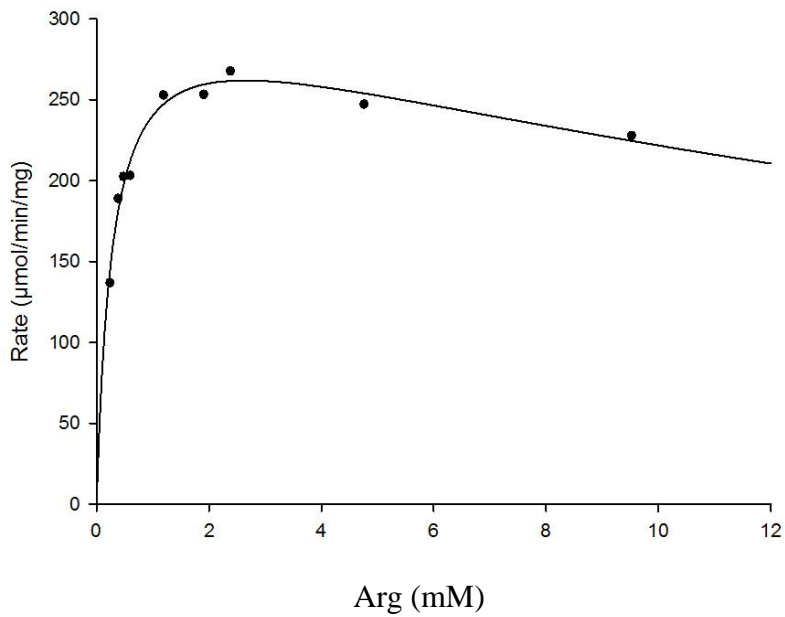


Fig. 2-13 *Chromera velia* AK1 のミカエリス・メンテンプロット

測定は ATP 濃度 4.76 mM の条件で測定した.

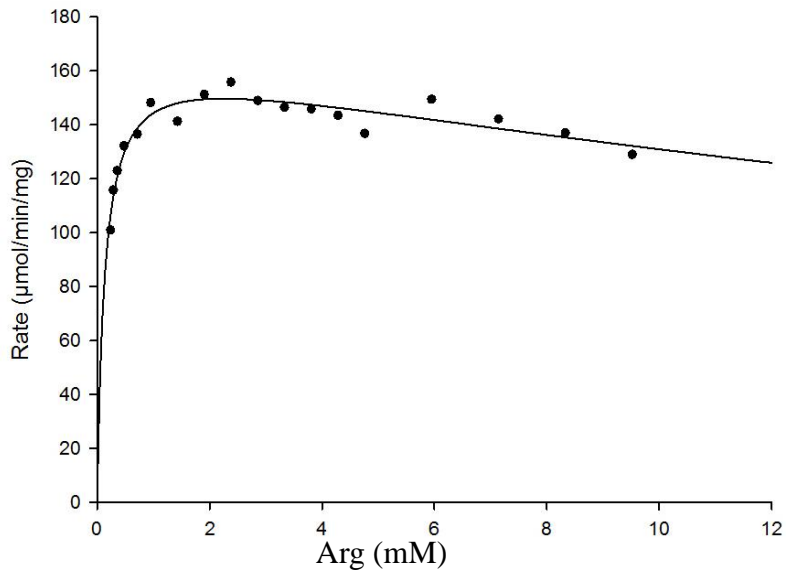


Fig. 2-14 *Vitrella brassicaformis* AK2D1-のミカエリス・メンテンプロット

測定は ATP 濃度 4.76 mM の条件で測定した.

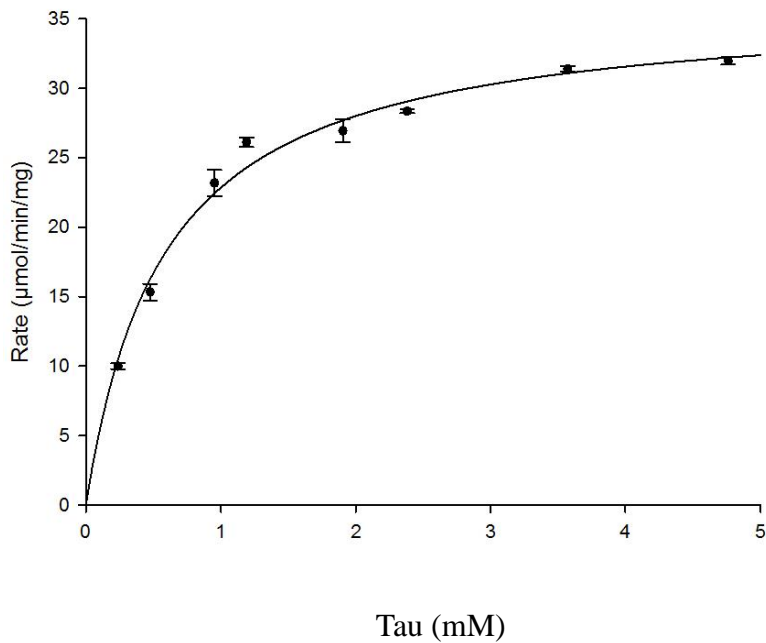


Fig. 2-15 *Ectocarpus siliculosus* TK2 のミカエリス・メンテンプロット

測定は ATP 濃度 4.76 mM の条件で測定した.

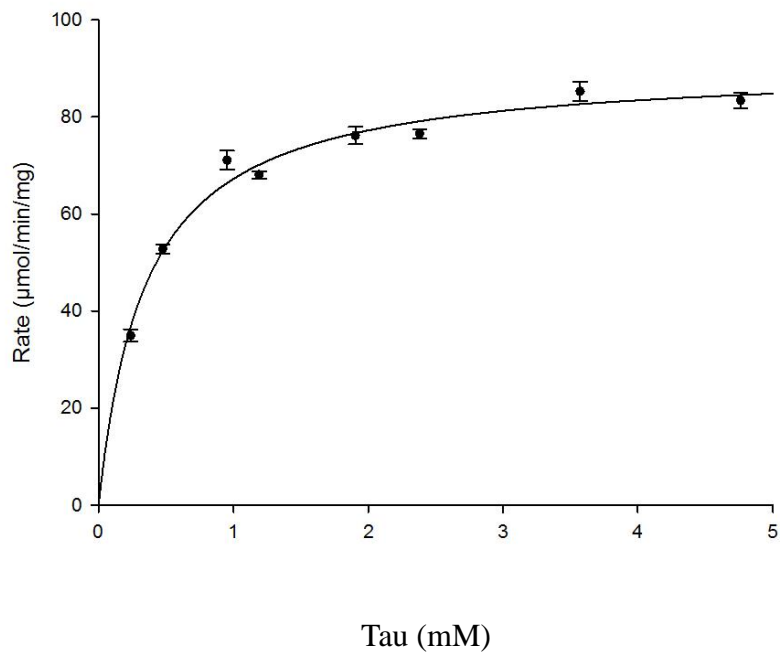
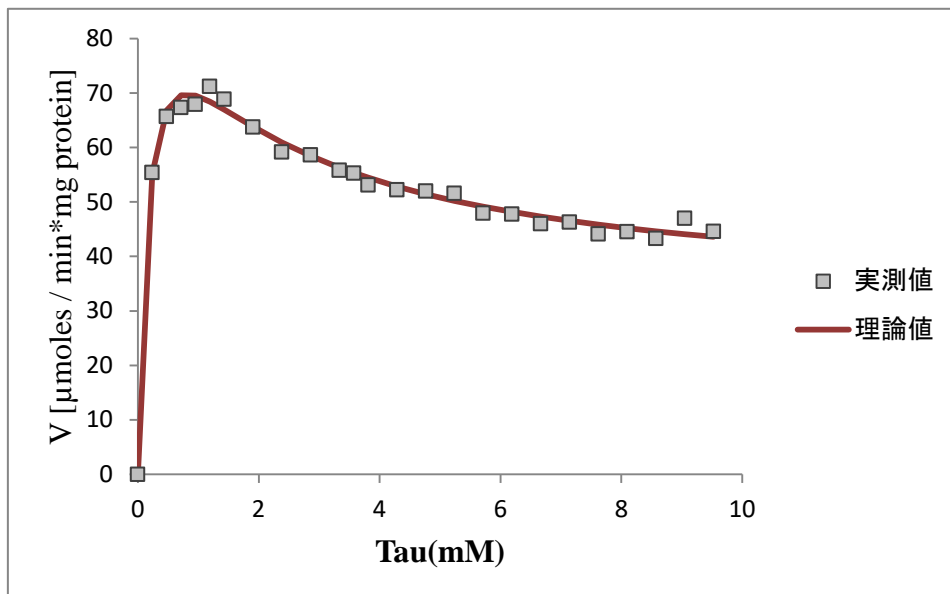


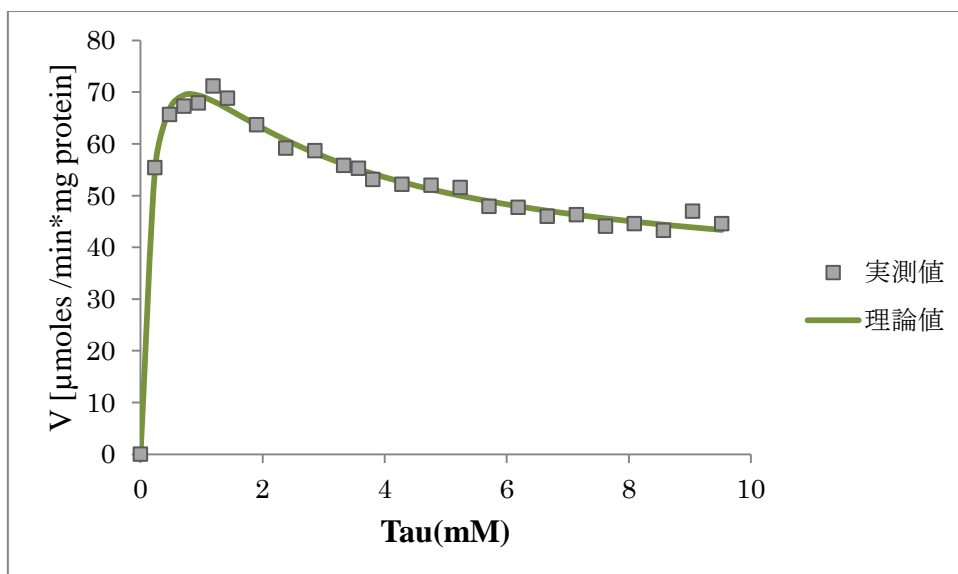
Fig. 2-16 *Albugo candida* TK のミカエリス・メンテンプロット

測定は ATP 濃度 4.76 mM の条件で測定した.

第1モデル



第2モデル



第3モデル

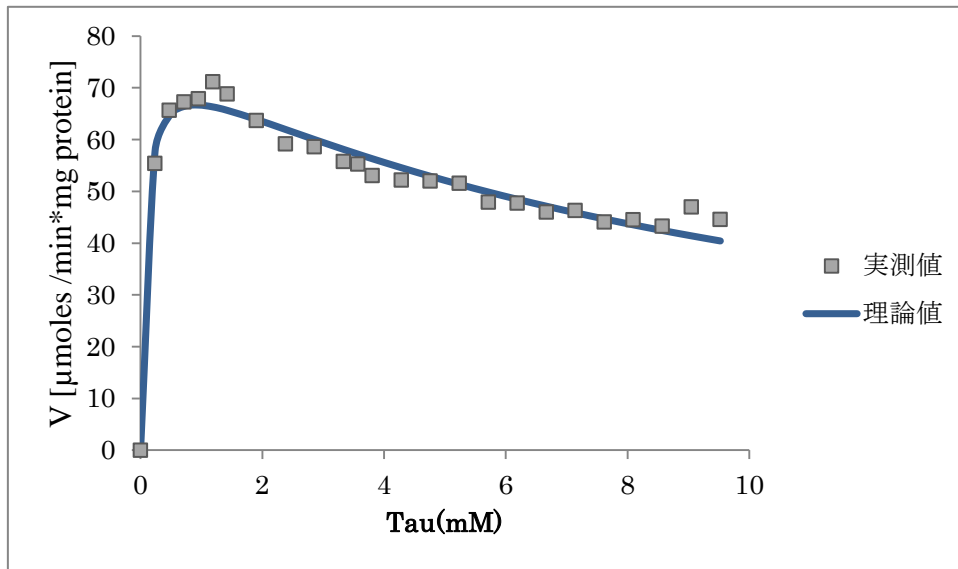


Fig. 2-17 *Guillardia theta* TK1 の3種類の基質阻害モデルの理論値と実測値の比較

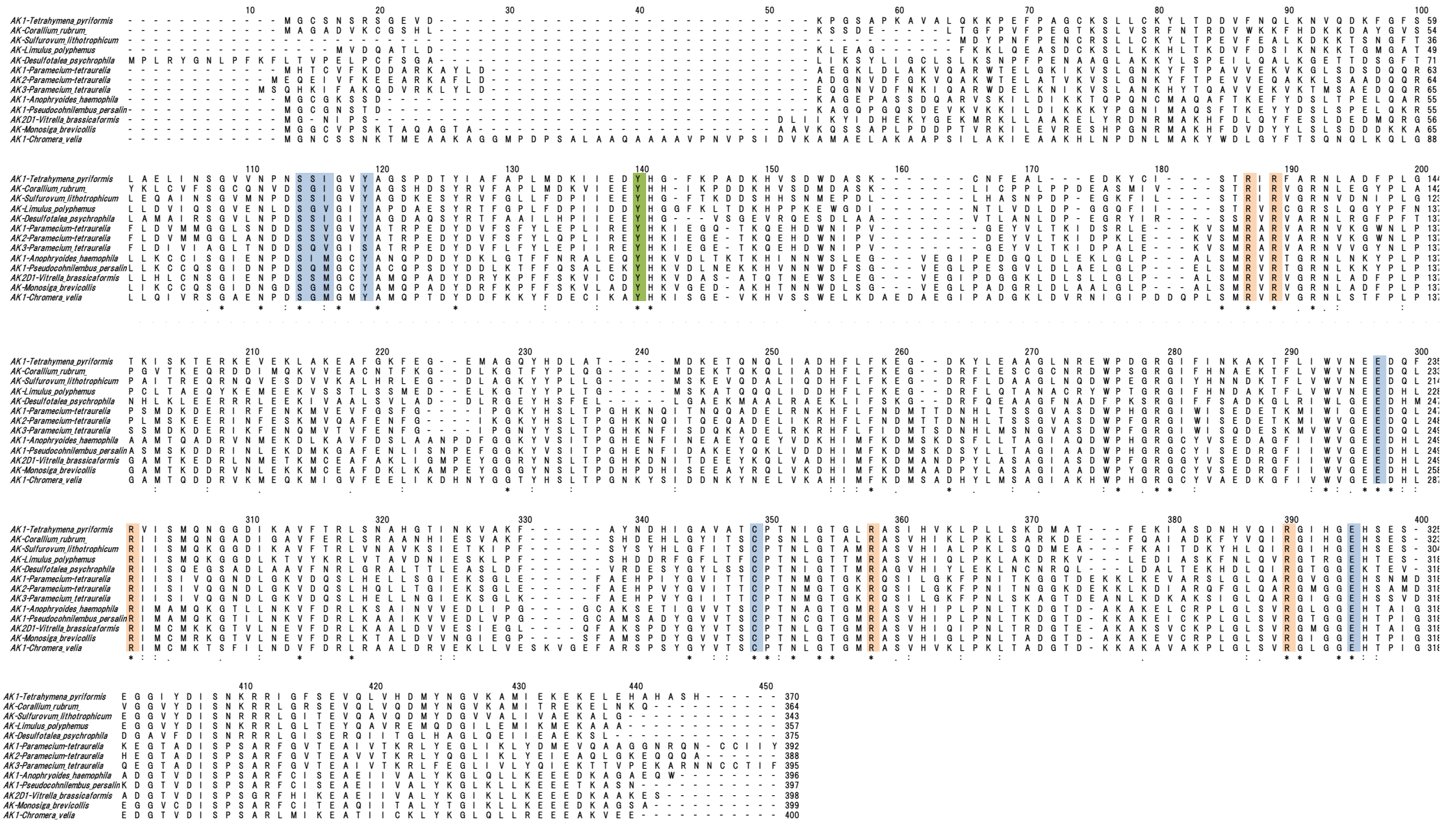


Fig. 2-18 5種類の原生物AKと他のAKのアミノ酸配列の比較

MEGA5 中の ClustalW 法によりアラインメントした。

ATP 結合部位はオレンジ、アルギニン結合部位は青色で示している。 グアニジド化合物基質に特有なアミノ酸は緑で示している。

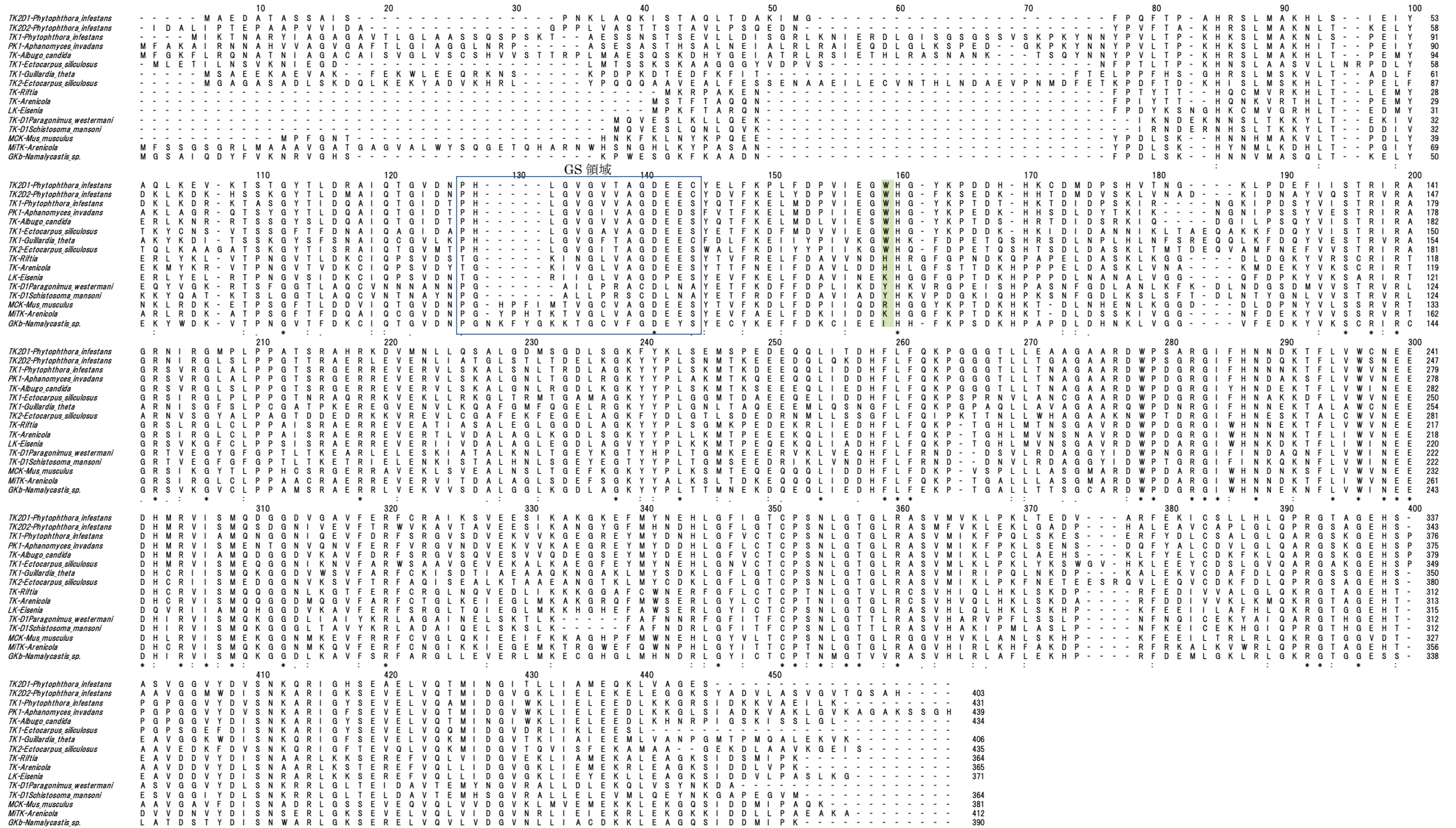
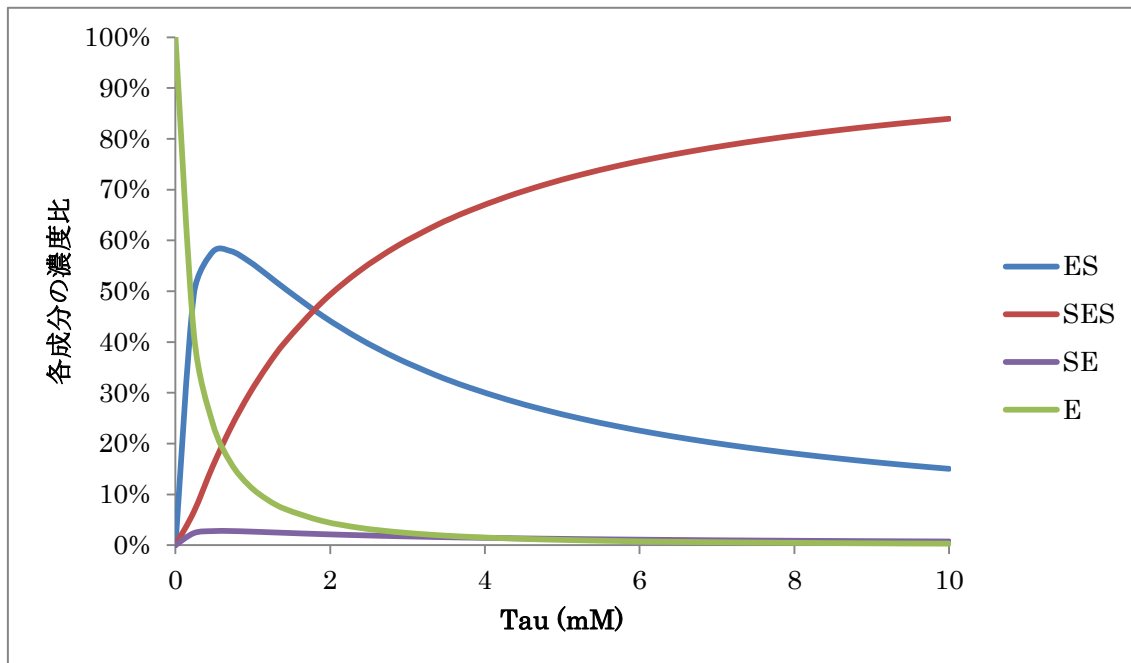


Fig. 2-19 原生生物 TK と他の生物 TK や環形動物 PK のアミノ酸配列の比較

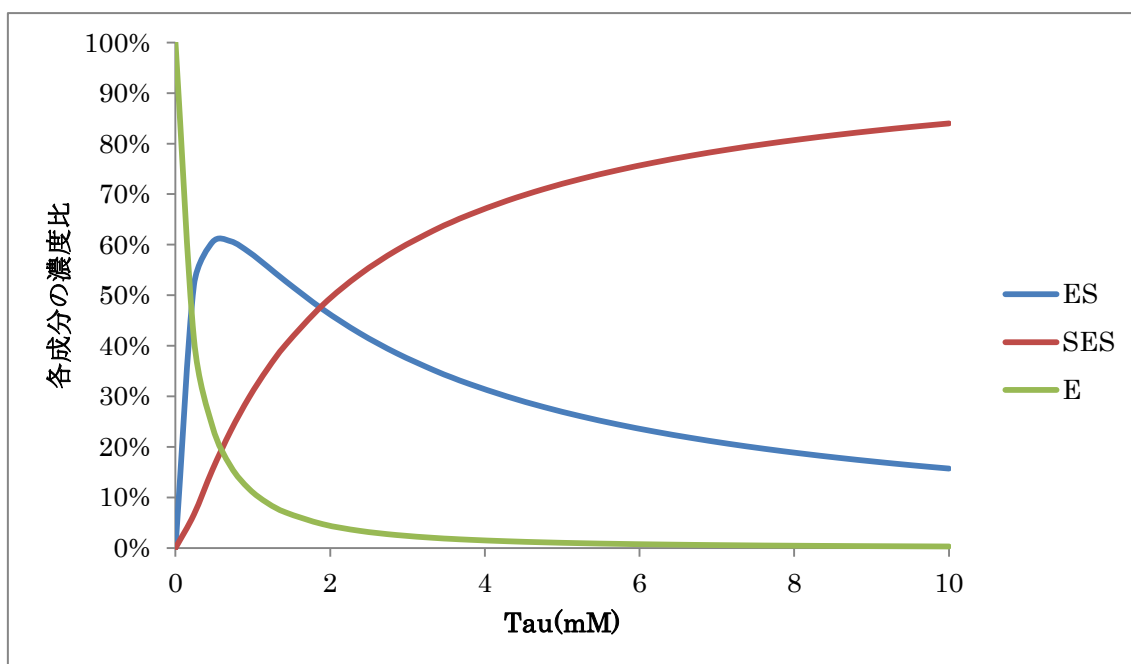
MEGA5 中の ClustalW 法によりアラインメントした。

グアニジド化合物基質に特有なアミノ酸は緑で示している。青い枠で囲っている部分は GS 領域である。

第1モデル



第2モデル



第3モデル

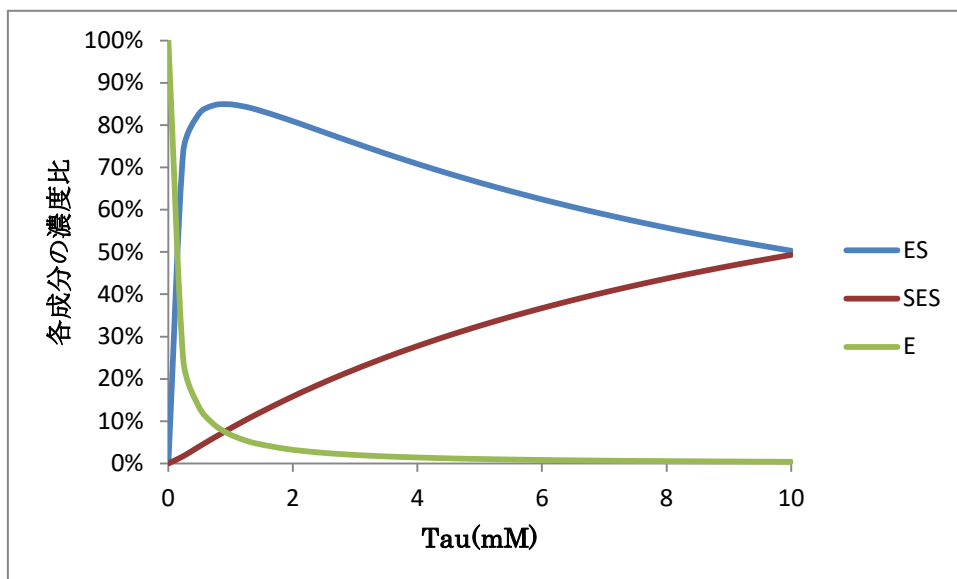


Fig. 2-20 3種類のモデルにおけるタウロシミン基質濃度と[E], [ES], [SES], [SE]の関係(*Guillardia theta* TK1)

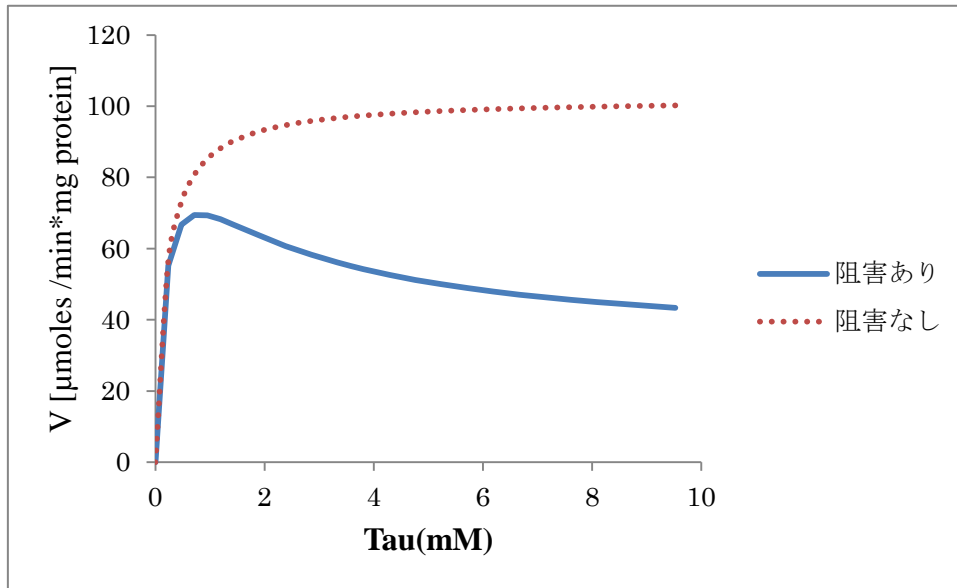
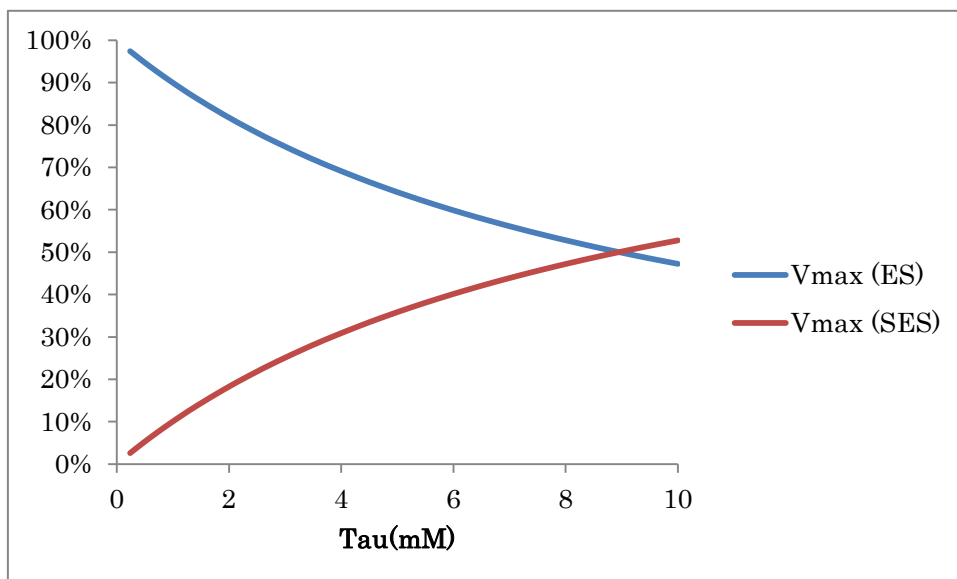


Fig. 2-21 基質阻害が存在する場合と，存在しない場合の酵素反応曲線の比較 (*Guillardia theta* TK1)

両曲線は第2モデルの酵素パラメーターから作成した。

第1モデル



第2モデル

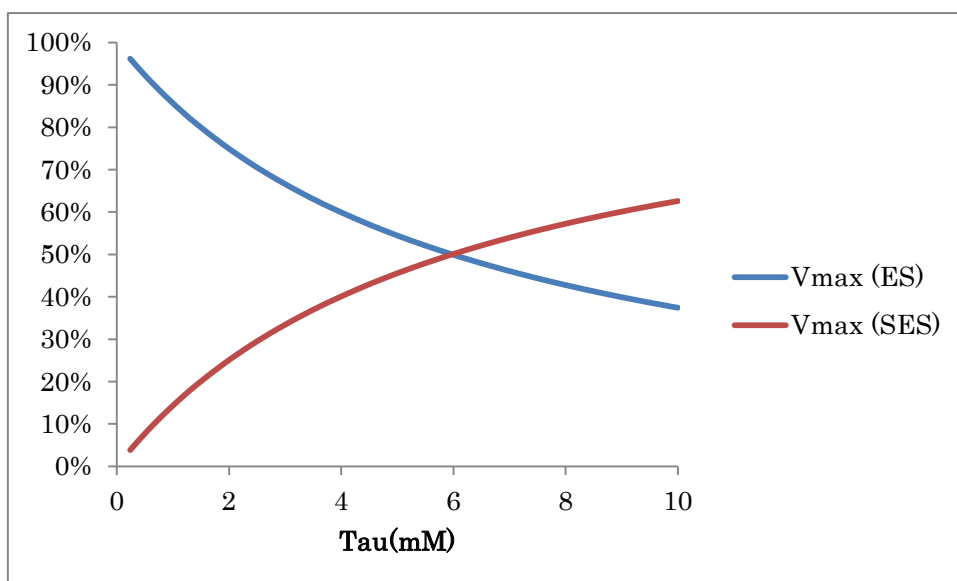


Fig. 2-22 第1モデルと第2モデルにおける、タウロシアミン濃度に対する V_{\max}^{ES} と V_{\max}^{SES} の寄与の比較(*Guillardia theta* TK1)

第1モデルと第2モデルにおけるそれぞれの酵素パラメーターを用いて作成した。

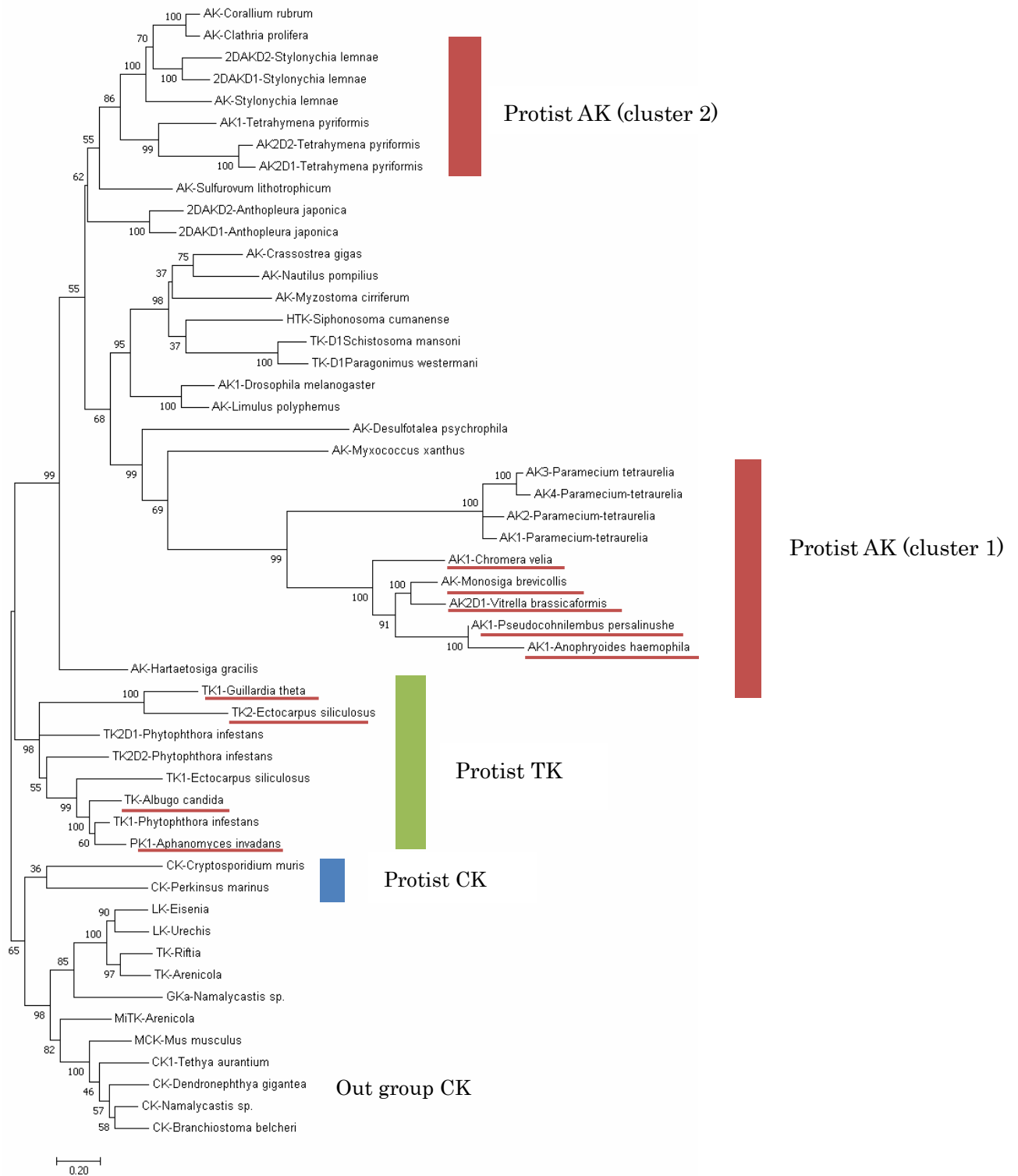


Fig. 2-23 見いだされた9種類の原生生物PKと既知のPKの分子系統樹

MEGA7.0を用いてによって最尤法を用いて分子系統樹を作成した(Kumar et al., 2016).

系統樹の信頼度を確かめるためにブーツストラップ検定を100回行った。

赤線を引いたPKは本研究で見いだされたPKである。

真核生物のPKの分布

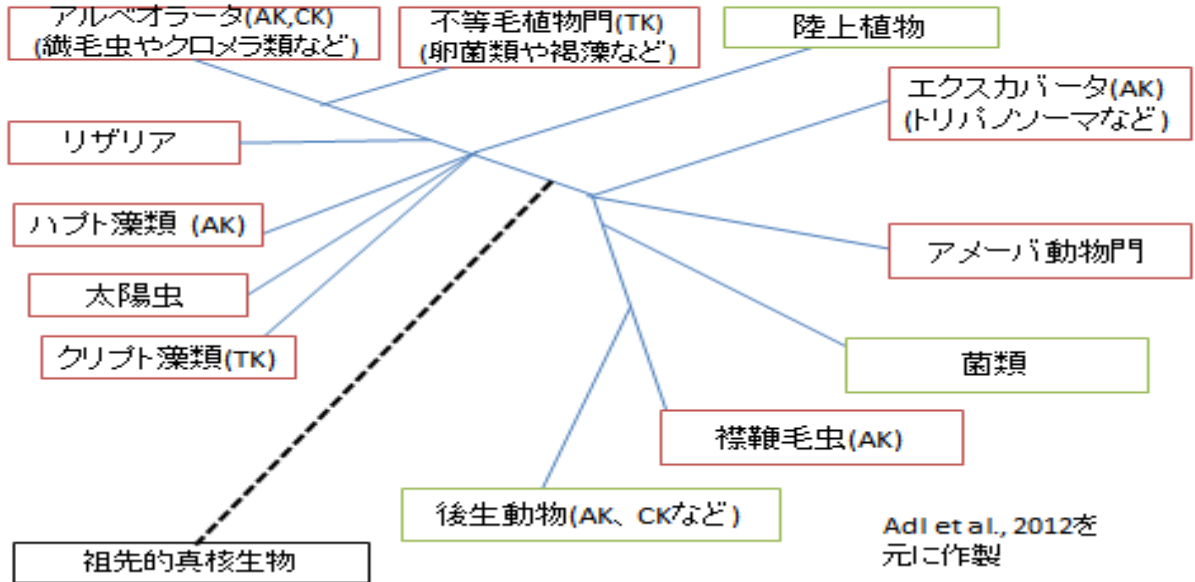


Fig.2-24 真核生物における PK の分布

真核生物における PK の分布を示した. 真核生物の分布は Adl et al., 2012 を元に作製をした.

PKの分布から見た葉緑体の獲得と原生生物

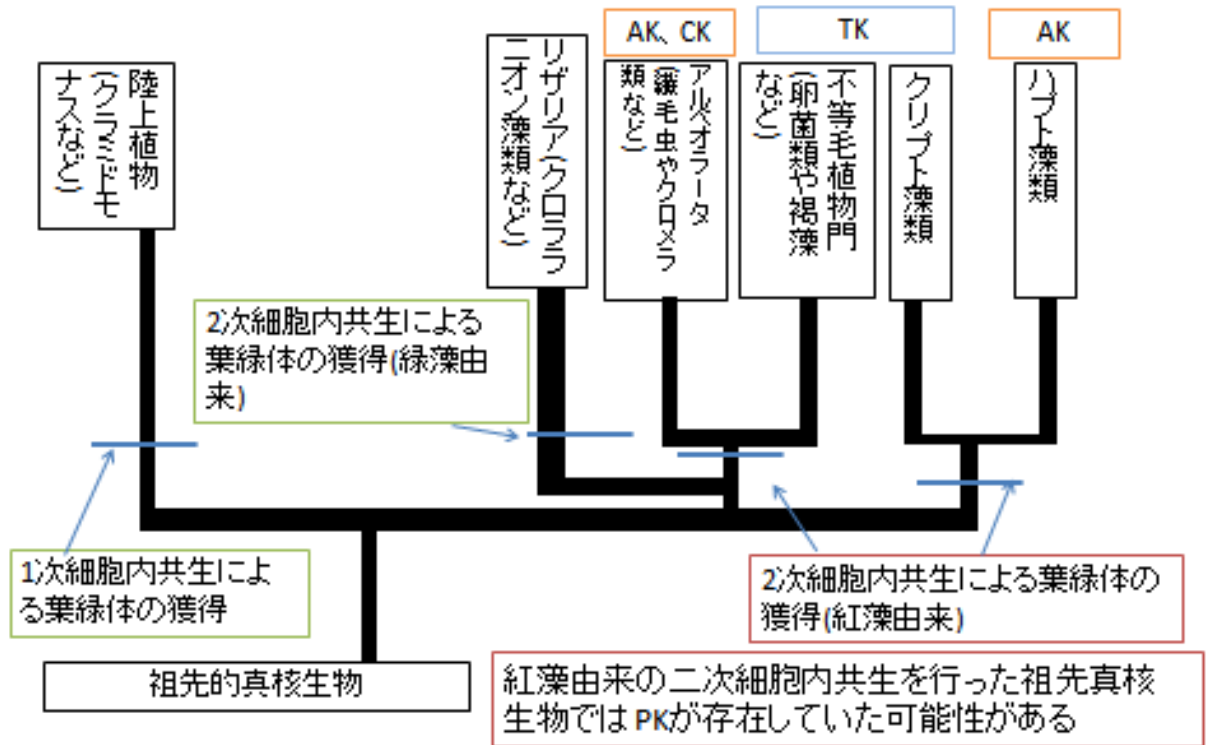


Fig. 2-25 PK の分布から見た葉緑体の獲得と PK の分布の予想

PK の分布から葉緑体の獲得と PK の分布を予想した. 眞核生物の分布は Adl et al., 2012 を元に作製した.

第三章

環形動物フォスファゲンキナーゼの分布と酵素特性

要旨

環形動物の祖先型と考えられているスイクチムシ綱に属する *Myzostoma cirriferum* と、オフエリアゴカイ科に属する *Ophelina sp.* において、EST データベース上でそれぞれ 1 種類と 5 種類の PK 遺伝子が見いだされた。本研究では、スイクチムシで見いだされた PK とオフエリアゴカイ科で初めて見いだされた PK 遺伝子の基質の決定と酵素特性の決定を目的とした。また、環形動物のオフエリアゴカイ科に属する *Thoracophelia sp.* を採集し、RNA-seq から PK 遺伝子の探索を目的とした。

M. cirriferum の PK は、基質をアルギニンとする AK であった。この AK の酵素特性をケヤリや節足動物の AK と比較すると、後者に類似していた。また分子系統解析の結果は、*M. cirriferum* AK は、二量体 CK 遺伝子から進化してきたケヤリ AK とは異なり、無脊椎動物 AK の系統に属していることが示唆された。このことから、*M. cirriferum* AK 遺伝子は無脊椎動物由来の遺伝子であり、他の環形動物では進化の早い段階で失われてしまったと推測される。

また、*Ophelina sp.* の 5 種の PK としては、TK 及び CK がそれぞれ二種類ずつあることが分かった。残りの PK は、リコンビナント酵素が可溶化されなかったためその活性は不明である。環形動物 LK や OK はタウロシアミンに対しても活性を示すが、その K_m の値は非常に大きな値(15~50 mM)を示し、その親和性が低い。本研究で決定した *Ophelina sp.* の 2 種類の TK は、タウロシアミンに対する K_m が 0.8 ~1.8 mM であり、OK の可能性は低い。今回の研究では、*Ophelina sp.* の PK 遺伝子からは OK は見いだされなかった。

Thoracophelia sp. の RNA-seq の結果から、5 種類の PK (PK1~PK5)が見いだされた。これらのアミノ酸配列と既知の環形動物 PK の配列を用いて分子系統解析を行った結果、PK1 と PK2 は、TK, LK, または OK である可能性が示唆された。PK3 は、環形動物 PK クラスターに含まれず、予想される基質特異性は不明である。PK4 と PK5 は CK である可能性が高かった。

序論

環形動物は CK, AK, TK などに加え, 特異的な PK として GK, LK, 及び OK を発現している. この様に環形動物には非常に多様な PK が分布している. PK のアミノ酸配列における分子系統解析では, AK グループと CK グループの二つのグループに大別される. CK グループには, 脊椎及び無脊椎動物に存在する CK, 棘皮動物に存在する CK 遺伝子から進化してきた特殊な AK そして CK 遺伝子から進化してきたと考えられる環形動物 PK 等が含まれる (Suzuki et al., 2009; Uda et al., 2012).

環形動物は大きく多毛類, 貧毛類, 及びヒル類に分類される. 主に多毛類では CK, AK, TK, LK 及び OK が, 貧毛類では LK が, そしてヒル類では PK の存在は確認されていない. TK でアミノ酸配列が判明しているのはチューブワームの一種であるガラパゴスハオリムシやタマシキゴカイのものである. この TK には, 細胞質型 TK とミトコンドリア型 MiTK がある (Uda, et al., 2005b, 2005c). LK でアミノ酸配列が判明しているのは貧毛類であるシマミズやユムシで見いだされている (Tanaka and Suzuki, 2004; Ellington and Bush, 2002). AK は多毛類ケヤリムシでのみ発見されており, この AK は D-Arg にも活性を示す特異な AK である (Uda et al., 2010). OK は, オフェリアゴカイ科に属する *Ophelia negelecta* の一種のみにおいてその発現が確認されている (Van Thoai et al., 1966) が, そのアミノ酸配列は決定されていない. また, 環形動物に近縁な星口動物である *Sipunculus nudus* やスジホシムシモドキ (*Siphonosoma cumanense*) では HTK が見出されている (Thiem et al., 1975; Uda et al., 2005a). このスジホシムシモドキ HTK は分子系統解析では環形動物 PK とは異なる系統であることが示唆されている.

環形動物の祖先型と考えられているスイクチムシ綱に属する *Myzostoma cirriferum* と, オフェリアゴカイ科に属する *Ophelina* sp. の 2 種において EST データベース上で PK 遺伝子が見いだされた. *M. cirriferum* の PK 遺伝子は 1 種類, *Ophelina* sp. の PK は 5 種類存在していた. 後者は, GS 領域のアミノ酸配列から CK と MiCK, そして GS 領域のアミノ酸配列からは基質特異性が不明な PK1, PK2, PK3 が見いだされた. 今回の研究では, これらの PK の酵素特性を決定し, *Ophelina* sp. の PK1, PK2, PK3 が OK である可能性を検証した. また, 高知県に生息するオフェリアゴカイ科に属する *Thoracophelia* sp. の RNA-seq をおこない, PK 遺伝子の探索を行った.

材料と方法

1. オーバーラップエクステンション PCR による遺伝子合成と酵素発現用プラスミドの作製

4 種の *Ophelina* sp. の PK 遺伝子 (PK1, PK2, PK4, PK5) はオーバーラップエクステンション PCR により合成した。この合成の際に、C 末端側に His-tag 配列を付加した。使用したプライマーは付録 2 の Table10~Table13 に示した。合成した遺伝子は pGEM-T Easy ベクターに組み込み、塩基配列を確認した後、pET30b ベクターに載せ替えた。方法はテクニカルノートの記述通り行った。また、*M. cirriferum* AK の遺伝子は三村(2015)によって全合成され、pET30b ベクターに組み込まれたものを、*Ophelina* sp. の PK3 は鈴木美優紀(2015)によって全合成され、pET ベクターに組み込まれたものを使用した。

2. *Myzostoma cirriferum* AK と 5 種の *Ophelina* sp. の PK のリコンビナントタンパク質の発現と精製及び酵素活性測定

6 種類の PK をリコンビナントタンパク質として発現させ、His-tag を利用したアフィニティークロマトグラフィーによる精製を行い、それを用いて酵素活性測定を行った。方法はテクニカルノートの記述通りに行った。

3. *M. cirriferum* AK のゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分子量の推定

M. cirriferum AK の分子量は、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより推定した。使用したカラムは Superdex 200 (10 mm x 300 mm; GE Healthcare)、移動相には 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM KCl を用い、流速は 0.5 ml/min, 検出は 280 nm で行った。分子量の推定に用いた標準タンパク質は、サツマイモ由来の β -amylase (200 kDa)、酵母由来の alcohol dehydrogenase (150 kDa)、bovine serum albumin (66 kDa)、ヨツヒメゾウリムシ arginine kinase 2 (44 kDa)、ウシ炭酸脱水酵素 (29 kDa)、ウマシトクロム c (12.4 kDa) である。

4. *Thoracophelia* sp. の採集と RNA 抽出

Thoracophelia sp. は、高知県幡多郡黒潮町入野の土佐西南大規模公園の砂浜において採集した。採集後、-80°C 液体窒素による凍結や RNA later に浸し、RNA の分解を防いだ。その後、RNA 抽出と RNA-seq のサンプル作製は生化学研究室の宇田幸司講師に依頼した。

5. 分子系統解析

今回見いだされた PK と既知の PK のアミノ酸配列を MUSCLE 法によりアラインメントし、MEGA7.0 の最尤法を用いて分子系統樹を作成した (Kumar et al., 2016)。ブーツストラップ検定は 100 回行った。

結果と考察

1. *Myzostoma cirriferum* PK のリコンビナント酵素の基質特異性の決定と活性測定

M. cirriferum PK は可溶化したので、SDS-PAGE により精製度の確認を行った(Fig. 3-1), *M. cirriferum* PK に対して様々な基質を用いて酵素活性を測定し、基質特異性を測定した。*M. cirriferum* PK のそれぞれの基質に対する酵素活性を表に示した(Table 3-1)。*M. cirriferum* PK はアルギニンに対して活性を示し(*M. cirriferum* PK 98.7), 他の基質では L-アルギニン活性に対して、L-アルギニンの鏡像異性体である D-アルギニンに対する活性が 1% 程見られた(*M. cirriferum* PK 0.97) (Table 3-1)。この結果、*M. cirriferum* PK は AK である。

次に、*M. cirriferum* AK とカブトガニ及びケヤリ AK のアミノ酸配列を比較した(Fig. 3-2)。*M. cirriferum* AK のアミノ酸配列は、単量体であるカブトガニ AK と約 50% のアミノ酸一致率を示したが、ケヤリ AK とは 38 % の一致率であった。カブトガニ AK では、AK の機能に重要な ATP 結合部位とアルギニン結合部位が決定されている(Zhou et al., 1998)。ATP 結合部位はオレンジ、アルギニン結合部位は青色で示してある。また、グアニジド基質に特異的なアミノ酸配列は緑で示している。(Edmiston et al., 2001; Tanaka and Suzuki, 2004)。*M. cirriferum* AK では、アルギニン結合部位である 68 残基のバリンがシステインに置換している。それ以外の部位は他の AK と同様に保存されていた(Fig. 3-2)。

M. cirriferum AK に対しては基質である L-アルギニン 8 点と ATP を 9 点をそれぞれ濃度を変動させて、完全な酵素パラメーターを決定した(Table 3-2, Fig. 3-3)。*M. cirriferum* AK の酵素パラメーターを他の単量体 AK (細菌, 節足動物, 繊毛虫, 線形動物, 及び軟体動物) 及び二量体 AK (環形動物と棘皮動物) のものと比較した(Table 3-2)。*M. cirriferum* AK の基質との親和性を示す K_m^{Arg} , K_m^{ATP} , K_d^{Arg} , 及び K_d^{ATP} は単量体 AK と同様であった。触媒効率を示す k_{cat} も単量体 AK と同様であった。これらのことから、*M. cirriferum* AK は単量体 AK である可能性がある。そこで *M. cirriferum* AK の量を推定するため、*M. cirriferum* AK の分子量をゲルろ過カラムクロマトグラフィーで推定した。その結果、AK の分子量は約 33kDa と推定された(Fig. 3-4)。これはアミノ酸配列から計算される分子量 (39kDa) の 85% に相当する。一方、SDS-PAGE ではこの AK は約 38kDa と見積もられた(Fig. 3-1)。環形動物 PK は二量体ミトコンドリア型 CK 遺伝子から進化してきたと考えられている(Ellington and Suzuki, 2006)が、*M. cirriferum* AK は単量体であり、環形動物 PK とは系統が異なると思われる。

単量体 AK と二量体 AK との違いを見るため、それぞれの K_m^{Arg} , K_m^{ATP} , D-Arg に対する活性、及び GS 領域等を比較した(Table 3-3)。カブトガニ AK, *M. cirriferum* AK 及び二量体ナマコ AK は、 K_a^{Arg} や D-アルギニン活性は類似しており、GS 領域の欠損数も一致している。一方で、ケヤリ AK は、L-アルギニンに対する低い親和性及び D-アルギニンに対する新規活性発現によって示されるように、他の 3 種類の AK とは大きく異なる。*M.*

cirriferum AKは環形動物で見いだされているケヤリ AKとは酵素特性の違いとアミノ酸配列の違い、及び量体の違いから大きく異なり、節足動物 AK と酵素特性が類似していると考えられる。

2. 5種の *Ophelina* sp. の PK の基質決定と酵素特性の比較

2-1 5種の *Ophelina* sp. の PK のリコンビナント酵素の基質特異性の決定と活性測定

5種類のリコンビナント酵素の内、*Ophelina* sp.の PK2 以外は全て可溶化したので、SDS-PAGEにより精製度の確認を行った(Fig. 3-5~8)。OKは現在、オフエリアゴカイ科に属する *Ophelia negelecta* においてのみその発現が確認されている(Van Thoai et al., 1966)。今回は同じオフエリアゴカイ科に属する *Ophelina* sp.の中に、アミノ酸配列の比較やGS領域からOKである可能性があるPK1とPK3が存在していることから、この二種類のPKの基質特異性を探った。5種類のPKの内 *Ophelina* sp. PK1 に対して様々な基質を用いて酵素活性を測定し、基質特異性を測定した。それぞれの基質に対する酵素活性を Table3-4 に示した。*Ophelina* sp. PK3 はすでに TK であると確認されている(鈴木美由紀 2015)。*Ophelina* sp. PK4 と *Ophelina* sp. PK5 については、アミノ酸配列の比較やGS領域からCKと予想されたため、クレアチンを用いて活性を測定を行った。

Ophelina sp. PK1 はタウロシアミンに対して活性を示した(*Ophelina* sp. PK1 42.0) (Table 3-4)。しかし、他の基質に対する活性は見られなかったため、*Ophelina* sp. PK1 はTK であると考えられる。PK3(TK3)は、基質グリコシアミンに対して約 10 %活性を示すことが報告されている(鈴木美優紀 2015)。PK3は *Ophelina* sp. PK4 と *Ophelina* sp. PK5 はクレアチンに対して活性を示したため、両者はCK であると考えられる。それぞれのPKの種類を Table 3-5 に示した。また、4種類のPKの基質決定後、その基質濃度を変動させて、酵素活性測定を行い、ミカエリスメンテンのグラフを作成した(Fig. 3-9~12)。

2-2 *Ophelina* sp. PK1 (TK1)と PK3 (TK3)酵素特性の比較

次に *Ophelina* sp. PK1 (PK1)と PK3 (TK3)のアミノ酸配列を、他の環形動物 PK 等と比較した(Fig. 3-13)。PKの基質認識部位と考えられているGS領域(Suzuki et al., 1997)は四角で囲んだ。GS領域は特徴的なアミノ酸の欠損が報告されており、GKでは欠損なし、CKでは1残基欠損、AK, TK, LK, HTKでは5残基の欠損が見られる。*Ophelina* sp. PK1 (TK1), PK2 ではGS領域に5アミノ酸残基の欠損が、*Ophelina* sp. PK3 (TK3)では4残基の欠損が見られた。この結果から、PK2はCKやGKではない可能性が高い。GS領域近辺のアミノ酸を比較すると、*Ophelina* sp. PK1 (TK1)とPK2は環形動物 LK のアミノ酸配列とほぼ一致しているが、*Ophelina* sp. PK3 (TK3)は既知の配列とは大きく異なっていた。グアニジド基質に特異的なアミノ酸では、GKではイソロイシン、AK, HTK, 扁形動物 TK ではチロシン、原生生物 TK ではトリプトファン、環形動物 TK ではヒスチジン、環形動物 LK ではリシンである(Fig. 3-13)。一方で、*Ophelina* sp. PK1 (TK1), PK2, 及び PK3 (TK3)

においてはリシンであり、この3種のPKは、既知の環形動物TKのものとは異なる。

Ophelina sp. PK1 (TK1)とPK3 (TK3)の酵素パラメーターを、他の環形動物PK等と比較した(Table 3-6)。 *Ophelina* sp. PK1 (TK1)の V_{max} (4.73)は、他のTK, LK, OK(10.9~134)と比較すると低い。タウロシアミンに対する親和性を示す K_m^{Tau} の値(1.8)は、原生生物TK (0.27~0.81)よりも比較的高く、環形動物TK (0.57~4.01)と同程度であった。一方で、*Ophelina* sp. PK3 (TK3)の V_{max} (82.3)は、他のTKの値(4.73~43.1)と比較すると大きく、 K_m^{Tau} 値(0.81)は、原生生物TK (0.27~4.01)と同程度であった。また、*Ophelina* sp. PK1 (TK1)とPK3 (TK3)の K_m^{Tau} 値は、環形動物LKとOKのタウロシアミンに対する K_m (*Eisenia foetida* LK: 15.3, *Ophelia negelecta* OK: 50)よりも小さく、タウロシアミンに対する親和性が高い。これらの結果から、*Ophelina* sp. TK1とTK3はTKである可能性が高く、OKの可能性は低いと考えられる。

2-3 *Ophelina* sp. PK4 (CK) 及び PK5 (MiCK)の酵素特性の比較

Ophelina sp. PK4 (CK)及びPK5 (MiCK)のアミノ酸配列を他のCKと比較した(Fig. 3-14)シビレエイ(*Torpedo californica*)CKでは、CKの機能に重要なATP結合部位とクレアチン結合部位が決定されている(Lahri et al., 2002)。ATP結合部位はオレンジ、クレアチン結合部位は青色で示してある。また、グアニジド基質に特異的なアミノ酸は緑で示している。(Edmiston et al., 2001; Tanaka and Suzuki, 2004)。*Ophelina* sp. PK4 (CK)では、シビレエイCKで重要な結合部位は全て保存されていた。PK5 (MiCK)では、クレアチン結合部位のバリン(Fig. 3-15の106番目のアミノ酸)がシステインに置換しているが他は保存されていた(Fig. 3-14)。

Ophelina sp. PK4 (CK)とPK5 (MiCK)の酵素パラメーターを、他の細胞質型及びミトコンドリア型MiCKと比較した(Table 3-7)。*Ophelina* sp. PK4 (CK)の V_{max} (126)は、他の細胞質型CKと(40.2~102)と同程度であった。クレアチンに対する親和性を示す K_m の値(8.91)も、他の細胞質型CK (9.38~51.0)と同程度であった。触媒効率 V_{max}/K_m (14.1)は、他の細胞質型CKより高かった。*Ophelina* sp. PK5 (MiCK)の V_{max} (1.37)は、他のミトコンドリア型CKと(22.5~83.7)の5%程度だった。クレアチンに対する親和性を示す K_m の値(15.3)は、他のミトコンドリア型CK (4.30~62.0)と同程度であった。触媒効率 V_{max}/K_m (0.09)は、他の細胞質型CKの10%程度であった。これは、クレアチン結合部位のバリンがシステインに置換していることに起因しているのかもしれない。

2-6. *Thoracophelia* sp. の RNA-seq

Thoracophelia sp. の RNA-seq の結果、PK遺伝子は5種類(PK1, PK2, PK3, PK4, PK5)見いだされた。PK4は開始メチオニンが存在するものとししないもの、類似した2種類の配列が見いだされた。これらをPK4a及びPK4bとした。二種のアミノ酸一致率は95%であった。これらの塩基配列とアミノ酸配列をそれぞれ図に示した(Fig. 3-15)。

PK1, PK2, 及び PK3 のアミノ酸配列を他の環形動物 PK 等と比較した(Fig. 3-13). *Thoracophelia* sp. PK1, PK2, PK3 では, GS 領域に 5 アミノ酸残基の欠損が見られた. PK3 では, GS 領域の欠損位置が環形動物 PK とは異なっていた(Fig. 3-13). PK1 の GS 領域のアミノ酸配列は, 環形動物 LK と良く一致していた. 一方, PK2 と PK3 については既知の配列とは大きく異なっていた. グアニジド基質に特異的なアミノ酸は, PK1, PK2, 及び PK3 ともにリシンであった(Fig. 3-13).

PK4, PK5 のアミノ酸配列を他の CK と比較した(Fig. 3-14). *Thoracophelia* sp. PK5 では, シビレエイ CK で重要な結合部位は全て保存されていた. 一方, *Thoracophelia* sp. PK4a, PK4b では, クレアチン結合部位であるバリンがシステインに置換していたが, それ以外の部位は保存されていた(Fig. 3-14).

3. 分子系統解析

分子系統解析の結果は Fig. 3-16 に示した. 図で赤線を引いた PK は本研究で見いだされた PK である. *M. cirriferum* AK は軟体動物 AK などが含まれる無脊椎動物 AK クラスタに属している. 同じ環形動物 AK であるケヤリ AK は環形動物 PK グループに属している. *M. cirriferum* AK は異なることが分かる. 環形動物に系統的に近縁とされる星口動物のスジホシムシモドキ HTK は, *M. cirriferum* AK と同じグループに属しており, スジホシムシモドキ HTK とは比較的近縁であると考えられる. このことから, *M. cirriferum* AK 遺伝子は無脊椎動物由来の遺伝子であり, 他の環形動物では進化の早い段階で失われてしまったと推測される. ミトコンドリア型 CK 遺伝子から二次的に進化してきたケヤリ AK とは異なると結論された.

Ophelina sp. PK 5 種の内 *Ophelina* sp. PK4 (CK) 及び PK5 (MiCK) は, それぞれ細胞質型 CK 及び MiCK クラスタに属している. *Thoracophelia* sp. の PK1 は, *Ophelina* sp. PK1 (TK1), PK3 (TK3) とクラスタを, PK2 は *Ophelina* sp. PK2 とクラスタをそれぞれ形成している. *Thoracophelia* sp. の PK1, PK2 は, TK である可能性がある. *Thoracophelia* sp. の PK4a と PK4b は MiCK クラスタに, PK5 は細胞質型 CK クラスタに属している. GS 領域のアミノ酸の欠損と分子系統解析からも, これらの PK は CK である可能性が高い. *Thoracophelia* sp. PK3 は, 環形動物 PK クラスタに含まれず, 無脊椎動物 AK グループにも属していない. GS 領域や分子系統解析からの結果では, この PK に対して予想される基質は不明である. PK3 は OK である可能性がある.

Table 3-1 *Myzostoma cirriferum* AKのそれぞれの基質に対する活性

基質濃度 (mM)		PK act[umoles /min*mg protein]
9.5	L-Arg	98.7 ± 0.33
9.5	D-Arg	0.97 ± 0.02
2.4	Creatine	0.71 ± 0.08
1.2	Glycocyamine	0.72 ± 0.08
4.8	Taurocyamine	0.70 ± 0.03
100	control (Tris-HCl)	0.61 ± 0.06

Table 3-2 *M. cirriferum* AK, 単量体AK, 及び二量体AKの酵素パラメーターの比較

AK form	分類群	Reference	k_{cat} (1/s)	K_aArg (mM)	K_{iaArg} (mM)	K_aATP (mM)	K_{iaATP} (mM)	K_{ia}/K_a	k_{cat}/K_aATP K_{iaArg}	K_aArg/K_aATP	
単量体	細菌	<i>Sulfurovum lithotrophicum</i>	Suzuki et al. (2013)	88 ± 5.37	0.401 ± 0.10	0.64 ± 0.10	0.07 ± 0.008	0.11 ± 0.03	1.59	1932	5.62
	繊毛虫	<i>Tetrahyena pyriformis</i> (AK1)	Michibata et al. (2014)	104 ± 3.1	0.26 ± 0.07	0.65 ± 0.15	0.73 ± 0.06	1.86 ± 0.8	2.56	219	0.36
	環形動物	<i>Myzostoma cirriferum</i>	This work	38.9 ± 4.6	0.72 ± 0.21	1.5 ± 0.32	1.19 ± 0.28	2.49 ± 0.69	2.1	22	0.6
	節足動物	<i>Neocaridina denticulata</i> (AK2)	Suzuki and Kanou (2014)	217 ± 12.6	0.34 ± 0.08	0.47 ± 0.13	0.38 ± 0.05	0.52 ± 0.17	1.24	1225	0.91
	線形動物	<i>Toxocara canis</i>	Wickramasinghe et al. (2007)	29.2 ± 0.19	0.12 ± 0.003	0.23 ± 0.03	0.30 ± 0.04	0.60 ± 0.07	1.96	423	0.4
軟体動物	<i>Crassostrea gigas</i>	Fujimoto et al. (2005)	79.7 ± 3.4	0.35 ± 0.01	0.82 ± 0.37	0.97 ± 0.25	2.26 ± 0.59	2.34	100	0.36	
二量体 (CK遺伝子由来)	環形動物	<i>Sabellastarte indica</i> (AK2, for l-arginine)	Uda et al. (2010); Uda and Suzuki, unpublished	46.0 ± 3.4	3.69 ± 0.20	23.3 ± 1.5	0.68 ± 0.07	4.28 ± 0.42	6.31	2.9	5.43
	環形動物	<i>Sabellastarte indica</i> (AK2, for d-arginine)	Uda et al. (2010); Uda and Suzuki, unpublished	40.8 ± 5.1	9.00 ± 0.39	17.9 ± 1.4	2.07 ± 0.22	4.11 ± 0.44	1.99	1.1	4.35
	棘皮動物	<i>Stichopus japonicus</i>	Uda and Suzuki (2004)	25.6 ± 1.26	0.41 ± 0.06	1.25 ± 0.23	0.81 ± 0.03	2.46 ± 0.1	3.05	25	0.51
	棘皮動物	<i>Tropiometra afra macrodiscus</i> (AK2)	Chouno et al. (2015)	38.5 ± 0.62	0.16 ± 0.01	0.72 ± 0.08	0.33 ± 0.02	1.46 ± 0.19	4.5	162	0.48

Table 3-3 単量体AKと二量体AKの K_m^{Arg} , K_m^{ATP} , D-Arg活性, サブユニット構造, 及びGS領域の欠損の比較

Reference	AK gene-derived (AK-supercluster)		CK gene-derived (CK-supercluster)	
	<i>Limulus</i> (Arthropoda)	<i>Myzostoma</i> (Annelida)	<i>Sabellastarte</i> (Annelida)	<i>Stichopus</i> (Echinodermata)
	Matsumoto and Suzuki, unpublished data	This work	Uda et al., 2010	Uda and Suzuki, 2004
Ka L-Arg (mM)	0.952	0.715	3.69	0.41
Ka ATP (mM)	1.78	1.19	0.68	0.81
Ratio of Ka D-Arg / KaATP	0.53	0.6	5.43	0.51
D-Arg 活性	No	No	Strong	No
サブユニット構造	単量体	単量体	二量体	二量体
GS領域の欠損	5	5	2	5

Table 3-4 *Ophelina* sp. PK1 (TK1)のそれぞれの基質に対する活性

基質濃度 (mM)		PK act[umoles /min*mg protein]
9.5	L-Arg	0.08 ± 0.02
2.4	Creatine	0.08 ± 0.006
1.2	Glycocyanine	0.11 ± 0.004
4.8	Taurocyanine	42.0 ± 1.62
100	control (Tris-HCl)	0.07 ± 0.004

Table 3-5 *Ophelina* sp. PK5種の種類

	PKの分類
<i>Ophelina</i> sp. PK1	TK
<i>Ophelina</i> sp. PK2	未決定
<i>Ophelina</i> sp. PK3	TK
<i>Ophelina</i> sp. PK4	CK
<i>Ophelina</i> sp. PK5	CK

Table 3-6 *Ophelina* sp. PK1 (TK1)とPK3 (TK3), 及び他のTKの酵素パラメーターの比較

分類群	Reference	Vmax[$\mu\text{moles Pi min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$]	Km [mM]	Vmax/Km
環形動物 <i>Ophelina</i> sp. PK1 (TK1)	This work	4.73 ± 0.17	1.80 ± 0.13	2.62
環形動物 <i>Ophelina</i> sp. PK3 (TK3)	This work	82.3 ± 2.03	0.81 ± 0.09	101.44
卵菌類 <i>Phytophthora infestans</i> TK1	Uda et al., 2013	45.7 ± 1.83	0.27 ± 0.05	169.89
褐藻 <i>Ectocarpus siliculosus</i> TK1	八重尾 2016	36.1 ± 0.71	0.58 ± 0.04	62.24
環形動物 <i>Arenicola brasiliensis</i> cytoplasmic TK	Uda et al., 2005b	14.1 ± 0.68	4.01 ± 0.42	3.52
環形動物 <i>Arenicola brasiliensis</i> mitochondrial TK	Tanaka et al., 2011	43.1 ± 2.15	0.91 ± 0.12	47.21
扁形動物 <i>Paragonimus westermani</i> TK	Jarilla et al., 2009	60.0 ± 3.01	0.57 ± 0.10	105.26
環形動物 <i>Eisenia foetida</i> LK	Tanaka and Suzuki (2004)	10.9 ± 0.67	15.3 ± 0.75	0.71
環形動物 <i>Ophelia neglecta</i> OK	Van Thoai et al, 1966	134	50	2.68

Table 3-7 今回決定した*Ophelina* sp. CKとMiCK, 及び他のCKの酵素パラメーターの比較

分類群	CyCK	Reference	Vmax [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	KmCr (mM)	Vmax/Km
刺胞動物	<i>Nematostella</i> CyCK	Uda et al., 2012	75.5 \pm 3.9	26.0 \pm 2.0	2.90
脊椎動物	Sperm Whale CK	Iwanami et al., 2009	54.6 \pm 1.95	9.38 \pm 1.16	5.82
脊椎動物	<i>Danio reio</i> CK	Uda et al., 2009	102 \pm 5.48	51.0 \pm 12.1	2.00
環形動物	<i>Neanthes</i> CK	Matsushima et al., 2006	41.9 \pm 2.90	10.8 \pm 0.86	3.88
環形動物	<i>Ophelina</i> sp. CK	This work	126 \pm 4.29	8.91 \pm 0.74	14.12
環形動物	<i>Namalycastis</i> CK	Mizuta et al., 2005	40.2 \pm 1.35	19.4 \pm 0.71	2.07
MiCK					
刺胞動物	<i>Dendronephthya</i> MiCK	Matsushima et al., 2006	62.0 \pm 3.51	20.2 \pm 0.93	3.06
刺胞動物	<i>Nematostella</i> MiCK	Uda et al., 2012	83.7 \pm 7.1	11.4 \pm 2.3	7.34
脊椎動物	Sperm Whale MiCK	Iwanami et al., 2009	57.6 \pm 1.5	4.30 \pm 0.25	13.40
棘皮動物	<i>Strongylocentrotus</i> MiCK	Tombes and Shapiro, 1987	49.5	62.0 \pm 3	0.80
環形動物	<i>Ophelina</i> sp. MiCK	This work	15.3 \pm 1.1	1.37 \pm 0.05	0.09
環形動物	<i>Neanthes</i> MiCK	Matsushima et al., 2006	22.5 \pm 1.77	25.5 \pm 2.54	0.89

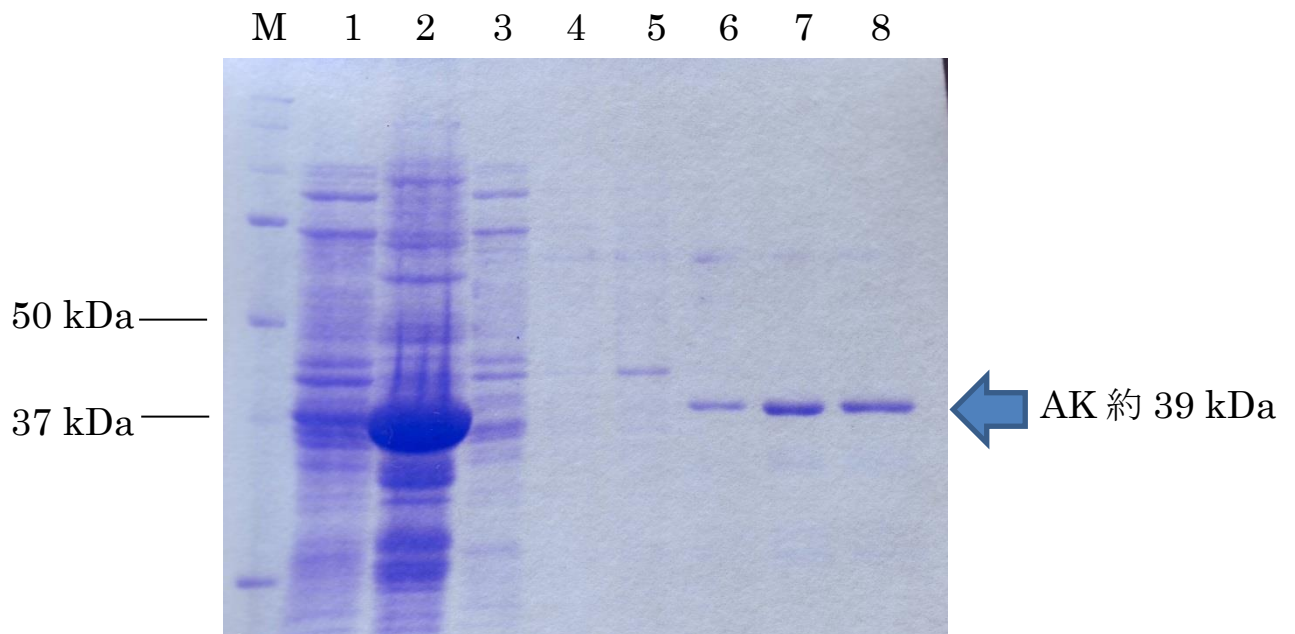


Fig. 3-1 *Myzostoma cirriferum* AK の SDS-PAGE による精製度の確認

M : 分子量マーカー

1 : 可溶性画分

2 : 不溶性画分

3 : アフィニティカラムの未吸着画分

4 : Wash Buffer A 溶出画分

5 : 20 mM イミダゾール溶出画分

6 : 50 mM イミダゾール溶出画分

7 : 100 mM イミダゾール溶出画分

8 : 150 mM イミダゾール溶出画分

発現条件は16 °C, 48時間, IPTGの最終濃度0.5 mM.

酵素活性測定には7の画分を使用した.

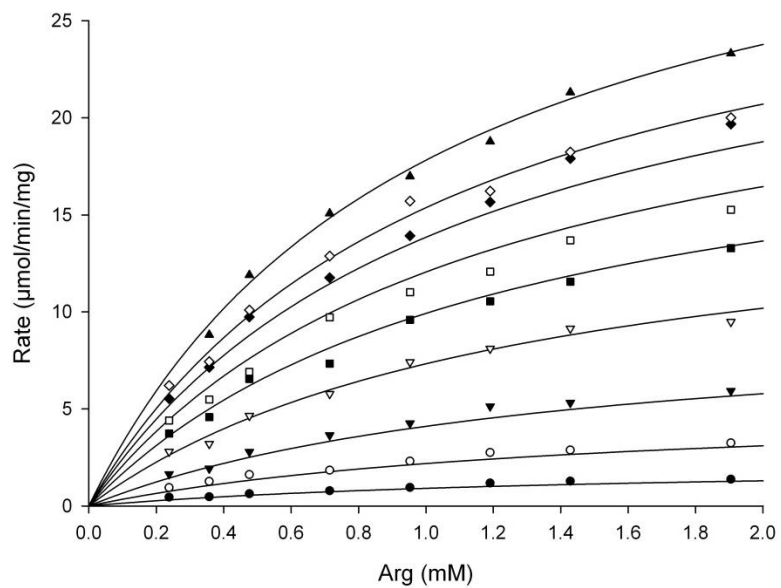
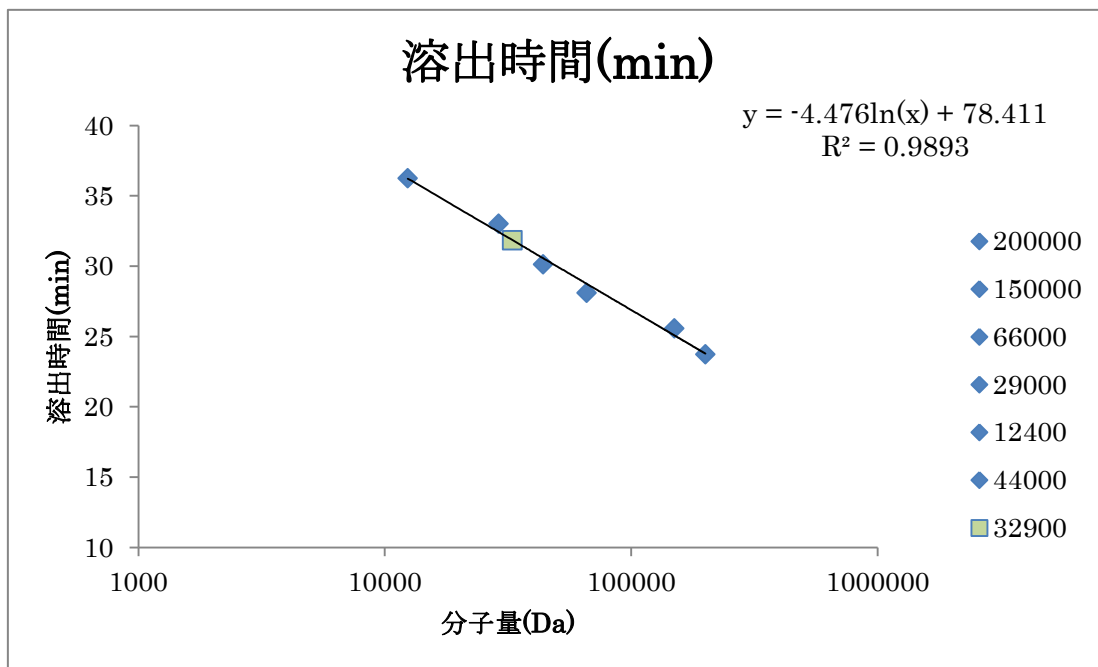


Fig. 3-3 *Myzostoma cirriferum* AK のミカエリス・メンテンプロット

- ▲は ATP 濃度 1.90 mM
 - ◇は ATP 濃度 1.42 mM
 - ◆は ATP 濃度 1.19 mM
 - は ATP 濃度 0.95 mM
 - は ATP 濃度 0.71 mM
 - ▽は ATP 濃度 0.47 mM
 - ▼は ATP 濃度 0.24 mM
 - は ATP 濃度 0.11 mM
 - は ATP 濃度 0.04 mM
- をそれぞれ示す.



	分子量 Da	溶出時間(min)
β -amylase	200000	23.6
Alcohol Dehydrogenase,	150000	25.54
Albumin, bovine serum,	66000	27.97
Carbonic Anhydrase, bovine erythrocytes	29000	32.85
Cytochrome c, horse heart	12400	36.06
<i>Paramecium</i> AK2	44000	30.13
<i>M. cirriiferum</i> AK	32900	31.85

Fig. 3-4 *M. cirriiferum* AK のゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分子量の推定

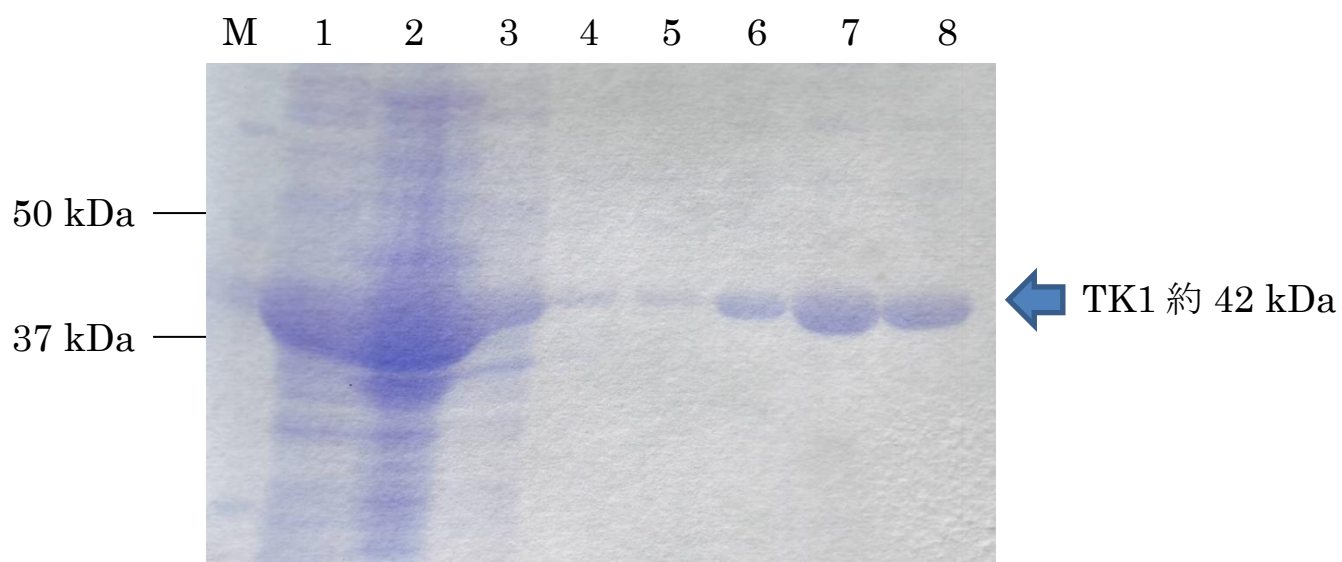


Fig. 3-5 *Ophelina* sp. PK1 (TK1) の SDS-PAGE による精製度の確認

M : 分子量マーカー

1 : 可溶性画分

2 : 不溶性画分

3 : アフィニティカラムの未吸着画分

4 : Wash Buffer A 溶出画分

5 : 20 mM イミダゾール溶出画分

6 : 50 mM イミダゾール溶出画分

7 : 100 mM イミダゾール溶出画分

8 : 150 mM イミダゾール溶出画分

発現条件は16℃, 48時間, IPTGの最終濃度0.5 mM.

酵素活性測定には7の画分を使用した.

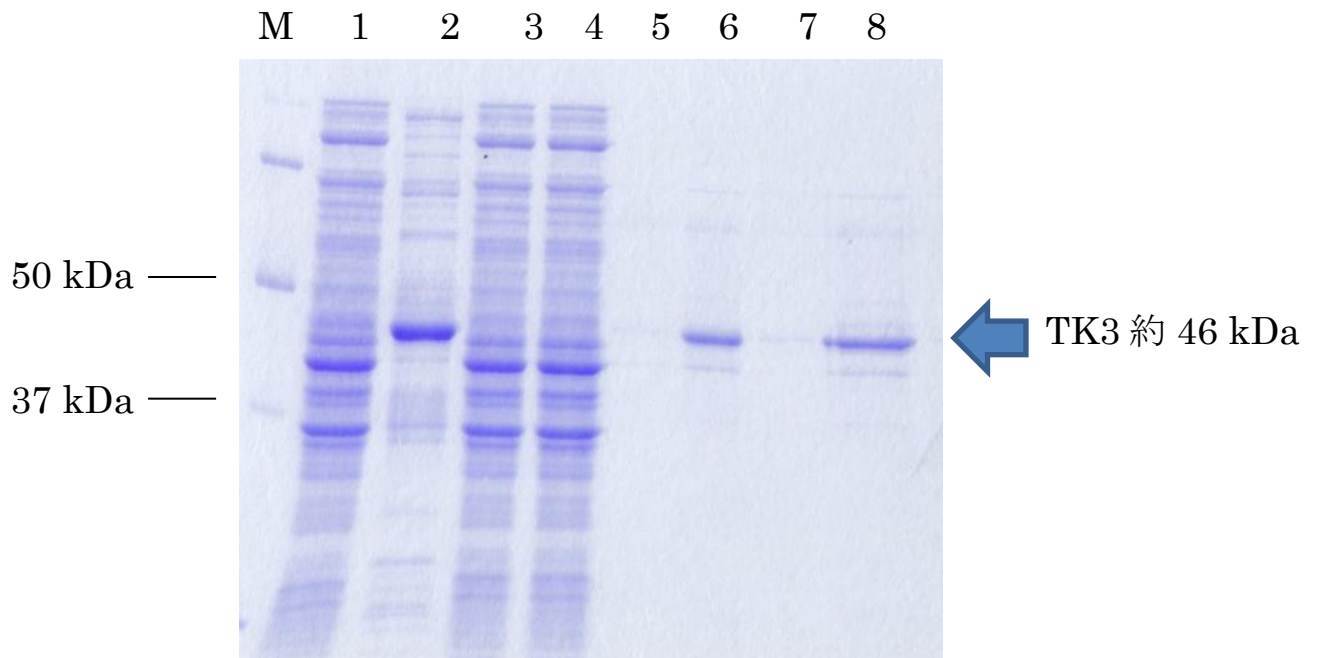


Fig. 3-6 *Ophelina* sp. PK3 (TK3) の SDS-PAGE による精製度の確認

M : 分子量マーカー

1 : 可溶性画分

2 : 不溶性画分

3 : アフィニティカラムの未吸着画分

4 : Wash Buffer A 溶出画分

5 : 20 mM イミダゾール溶出画分

6 : 50 mM イミダゾール溶出画分

7 : 100 mM イミダゾール溶出画分

8 : 150 mM イミダゾール溶出画分

発現条件は16 °C, 48時間, IPTGの最終濃度0.5 mM.

酵素活性測定には7の画分を使用した.

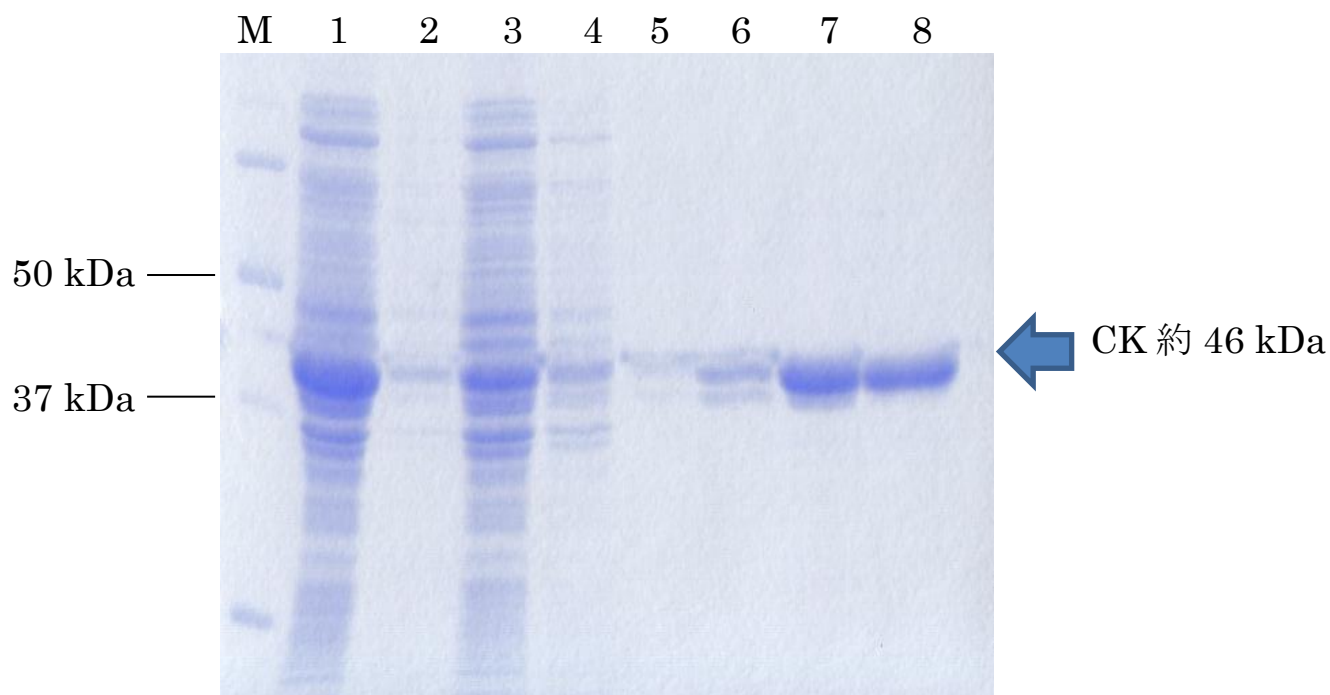


Fig. 3-7 *Ophelina* sp. PK4 (CK)の SDS-PAGE による精製度の確認

M : 分子量マーカー

1 : 可溶性画分

2 : 不溶性画分

3 : アフィニティカラムの未吸着画分

4 : Wash Buffer A 溶出画分

5 : 20 mM イミダゾール溶出画分

6 : 50 mM イミダゾール溶出画分

7 : 100 mM イミダゾール溶出画分

8 : 150 mM イミダゾール溶出画分

発現条件は16℃, 48時間, 1 PTGの最終濃度0.5 mM.

酵素活性測定には7の画分を使用した.

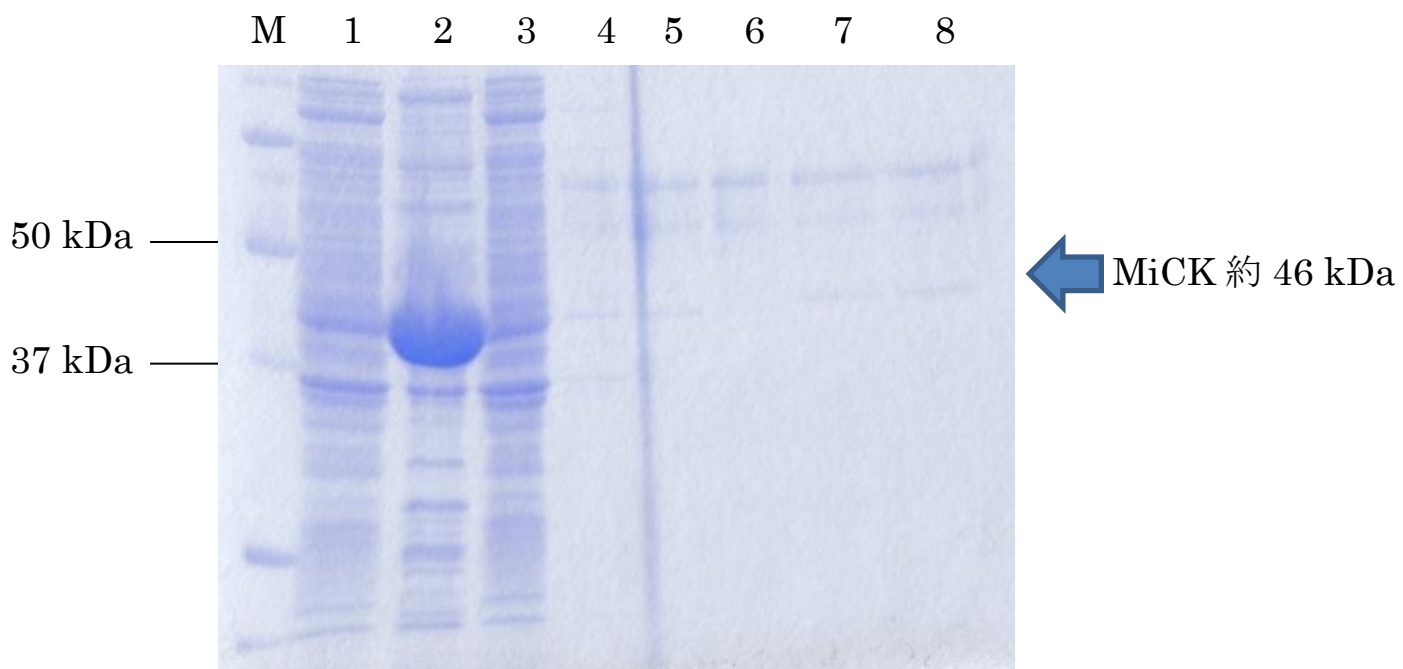


Fig. 3-8 *Ophelina* sp. PK5 (MiCK)の SDS-PAGE による精製度の確認

M : 分子量マーカー

1 : 可溶性画分

2 : 不溶性画分

3 : アフィニティカラムの未吸着画分

4 : Wash Buffer A 溶出画分

5 : 20 mM イミダゾール溶出画分

6 : 50 mM イミダゾール溶出画分

7 : 100 mM イミダゾール溶出画分

8 : 150 mM イミダゾール溶出画分

発現条件は16 °C, 48時間, IPTGの最終濃度0.5 mM.

酵素活性測定には 8 の画分を使用した.

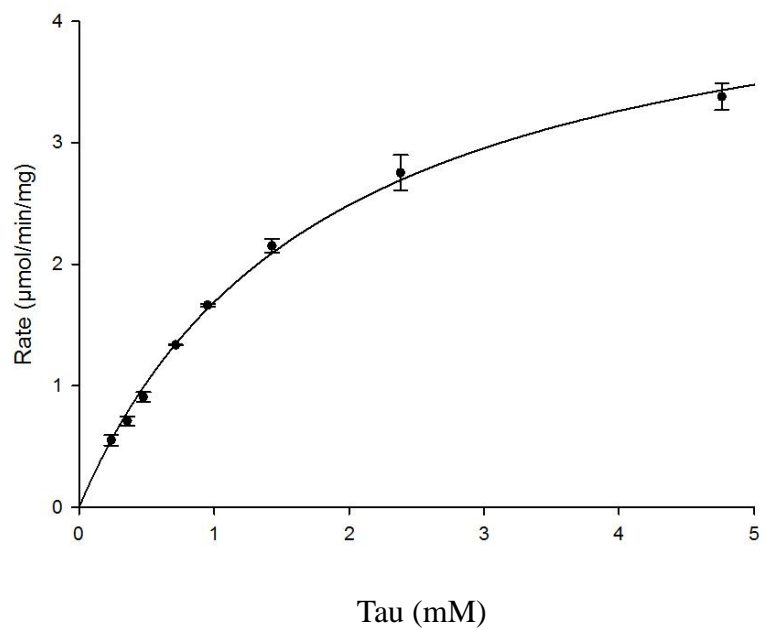


Fig. 3-9 *Ophelina* sp. PK1 (TK1)のミカエリス・メンテンプロット

測定は ATP 濃度 4.76 mM の条件で測定した.

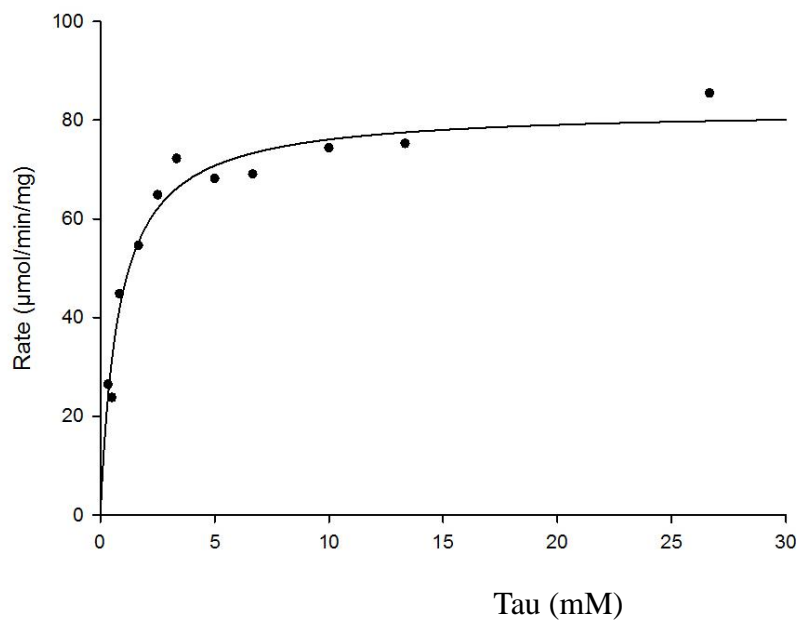


Fig. 3-10 *Ophelina* sp. PK3 (TK3)のミカエリス・メンテンプロット

酵素活性測定は ATP 濃度 4.76 mM の条件で測定した.

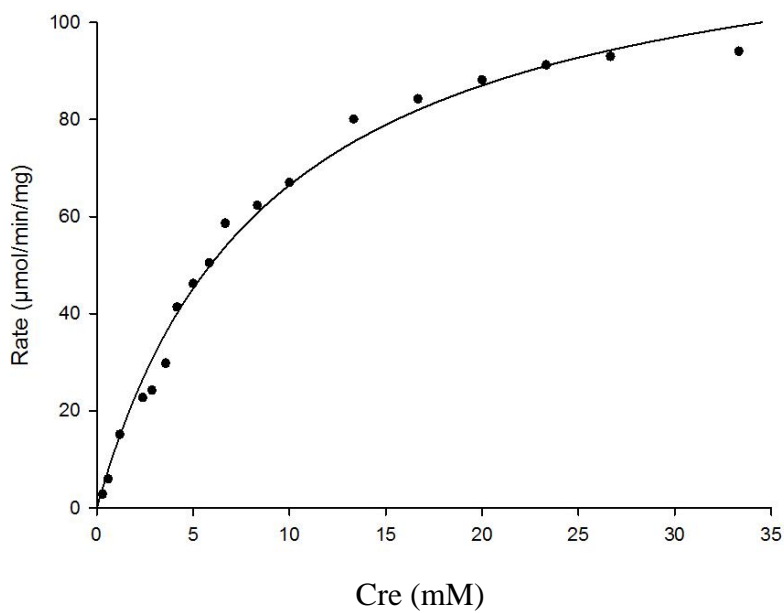


Fig. 3-11 *Ophelina* sp. PK4 (CK)のミカエリス・メンテンプロット

測定は ATP 濃度 4.76 mM の条件で測定した.

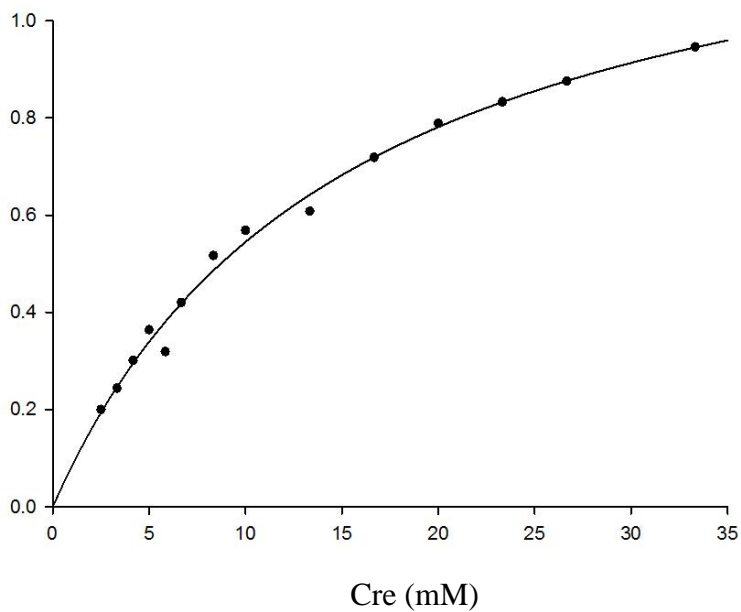


Fig. 3-12 *Ophelina* sp. PK5 (MiCK)のミカエリス・メンテンプロット

測定は ATP 濃度 4.76 mM の条件で測定した.

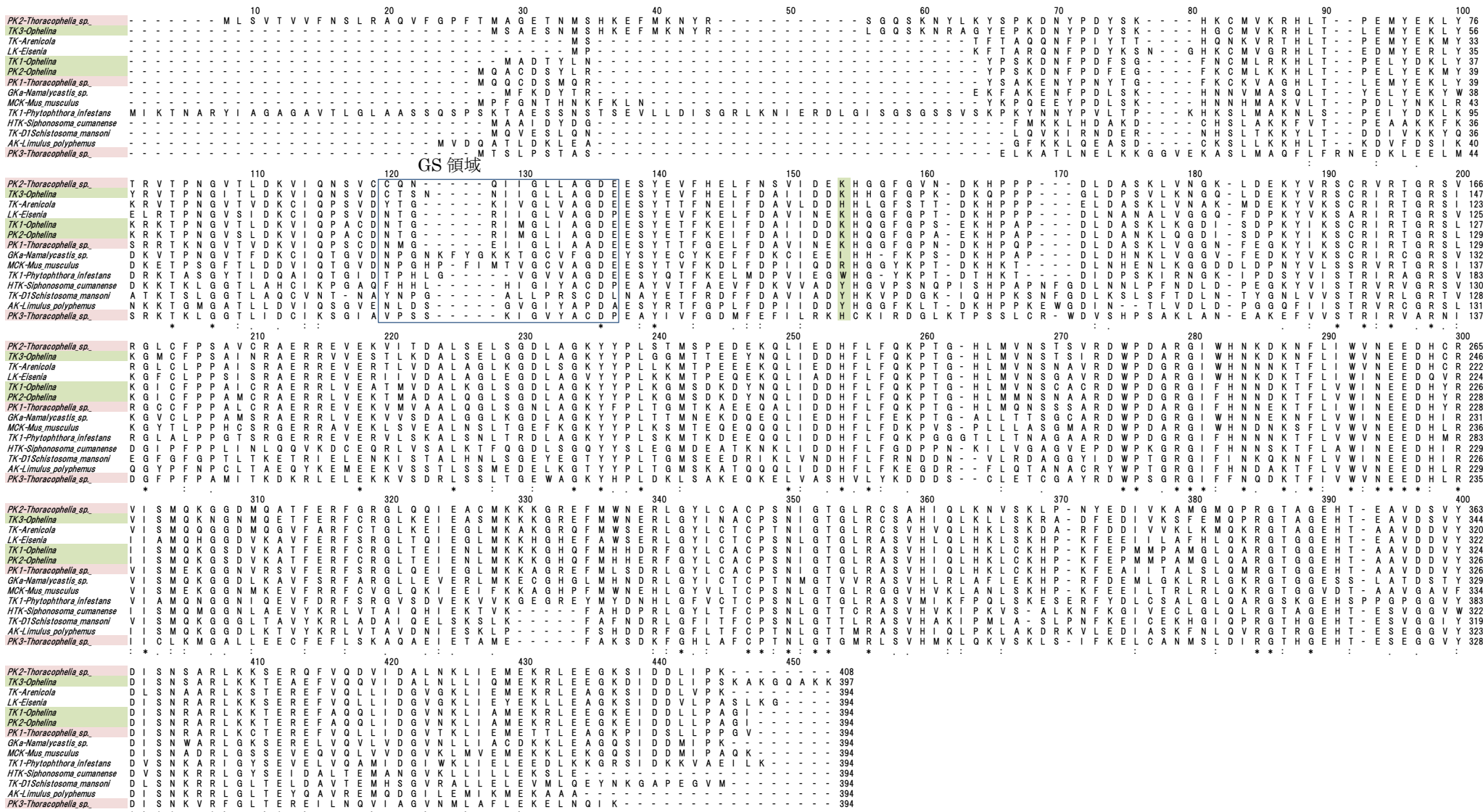


Fig. 3-13 *Ophelina* sp. TK 1, PK2, TK3, *Thoracophelia* sp. PK1, PK2, PK3, 環形動物 PK 及び他の TK とアミノ酸配列の比較
 グアニジド化合物基質に特有なアミノ酸は緑で示している。青い枠で囲っている部分は GS 領域である。
 アラインメントの名前で *Ophelina* sp. PK は赤い色で、*Thoracophelia* sp. PK は緑色で示している。

		10			20			30			40			50		
CK-Ophelina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PK5-Thoracophelia.sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CK-Namalycastis.sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MCK-Torpedo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PK4a-Thoracophelia.sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PK4b-Thoracophelia.sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MICK-Ophelina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MICK-Mus_musculus	M	A	G	P	F	S	R	L	L	S	A	R	P	G	L	
		60			70			80			90			100		
CK-Ophelina	E	E	D	F	P	D	L	T	K	H	N	N	N	W	M	
PK5-Thoracophelia.sp.	E	E	D	F	P	D	L	T	K	H	N	N	N	W	M	
CK-Namalycastis.sp.	D	E	D	F	P	D	L	T	K	H	N	N	N	W	M	
MCK-Torpedo	A	E	E	F	P	D	L	T	K	H	N	N	N	W	M	
PK4a-Thoracophelia.sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PK4b-Thoracophelia.sp.	S	A	N	F	P	N	L	R	K	H	N	N	N	W	M	
MICK-Ophelina	S	A	N	F	P	N	L	R	K	H	N	N	N	W	M	
MICK-Mus_musculus	S	A	E	Y	P	D	L	R	K	H	N	N	N	W	M	
		110			120			130			140			150		
CK-Ophelina	P	F	I	Y	T	V	G	C	V	A	G	D	E	E	S	
PK5-Thoracophelia.sp.	P	F	I	Y	T	V	G	C	V	A	G	D	E	E	S	
CK-Namalycastis.sp.	P	F	I	M	T	V	G	C	V	A	G	D	E	E	S	
MCK-Torpedo	P	F	I	S	T	V	G	C	V	A	G	D	E	E	S	
PK4a-Thoracophelia.sp.	P	F	I	S	T	V	G	C	V	A	G	D	E	E	S	
PK4b-Thoracophelia.sp.	P	F	I	S	T	V	G	C	V	A	G	D	E	E	S	
MICK-Ophelina	P	F	I	S	T	V	G	C	V	A	G	D	E	E	S	
MICK-Mus_musculus	P	F	I	K	T	V	G	C	V	A	G	D	E	E	S	
		160			170			180			190			200		
CK-Ophelina	K	G	G	Q	-	-	-	-	L	D	E	K	Y	V	L	
PK5-Thoracophelia.sp.	Q	G	G	E	-	-	-	-	F	D	P	K	Y	V	L	
CK-Namalycastis.sp.	V	G	G	D	E	K	A	D	D	P	K	Y	V	L	S	
MCK-Torpedo	K	G	G	D	-	-	-	-	D	L	D	P	K	Y	V	
PK4a-Thoracophelia.sp.	K	G	G	R	-	-	-	-	F	D	P	K	Y	V	L	
PK4b-Thoracophelia.sp.	K	G	G	R	-	-	-	-	F	D	P	K	Y	V	L	
MICK-Ophelina	R	S	G	H	-	-	-	-	F	D	P	K	Y	V	L	
MICK-Mus_musculus	R	S	G	Y	-	-	-	-	F	D	P	K	Y	V	L	
		210			220			230			240			250		
CK-Ophelina	L	D	S	L	S	G	E	F	S	H	G	K	Y	P	L	
PK5-Thoracophelia.sp.	L	D	S	L	S	G	E	F	S	H	G	K	Y	P	L	
CK-Namalycastis.sp.	L	D	S	L	S	G	E	F	S	H	G	K	Y	P	L	
MCK-Torpedo	L	D	S	L	S	G	E	F	S	H	G	K	Y	P	L	
PK4a-Thoracophelia.sp.	L	A	N	L	K	D	E	F	Q	G	T	Y	P	L	S	
PK4b-Thoracophelia.sp.	L	A	N	L	K	D	E	F	Q	G	T	Y	P	L	S	
MICK-Ophelina	L	A	N	L	K	D	E	F	Q	G	T	Y	P	L	S	
MICK-Mus_musculus	L	A	E	L	D	G	E	F	N	G	K	R	Y	P	L	
		260			270			280			290			300		
CK-Ophelina	P	D	A	R	G	I	W	H	N	D	N	K	T	F	L	
PK5-Thoracophelia.sp.	P	D	A	R	G	I	W	H	N	D	N	K	T	F	L	
CK-Namalycastis.sp.	P	D	A	R	G	I	W	H	N	D	N	K	T	F	L	
MCK-Torpedo	P	D	A	R	G	I	W	H	N	D	N	K	T	F	L	
PK4a-Thoracophelia.sp.	P	D	A	R	G	I	W	H	N	D	N	K	T	F	L	
PK4b-Thoracophelia.sp.	P	D	A	R	G	I	W	H	N	D	N	K	T	F	L	
MICK-Ophelina	P	D	A	R	G	I	W	H	N	D	N	K	T	F	L	
MICK-Mus_musculus	P	D	A	R	G	I	W	H	N	D	N	K	T	F	L	
		310			320			330			340			350		
CK-Ophelina	E	A	M	K	K	Q	G	A	Q	S	Y	M	W	N	E	
PK5-Thoracophelia.sp.	E	A	M	K	K	Q	G	A	Q	S	Y	M	W	N	E	
CK-Namalycastis.sp.	E	A	M	K	K	Q	G	A	Q	S	Y	M	W	N	E	
MCK-Torpedo	D	I	F	V	K	A	G	R	G	F	S	R	S	E	H	
PK4a-Thoracophelia.sp.	D	E	I	Q	K	K	G	W	E	F	S	R	S	E	H	
PK4b-Thoracophelia.sp.	D	E	I	Q	K	K	G	W	E	F	S	R	S	E	H	
MICK-Ophelina	G	K	I	Q	K	K	G	W	E	F	S	R	S	E	H	
MICK-Mus_musculus	K	L	I	Q	E	R	G	W	E	F	M	W	N	E	R	
		360			370			380			390			400		
CK-Ophelina	I	L	E	K	L	R	L	Q	K	R	G	T	G	G	V	
PK5-Thoracophelia.sp.	M	L	D	K	L	R	L	Q	K	R	G	T	G	G	V	
CK-Namalycastis.sp.	I	L	D	K	L	R	L	Q	K	R	G	T	G	G	V	
MCK-Torpedo	V	L	K	R	T	R	L	Q	K	R	G	T	G	G	V	
PK4a-Thoracophelia.sp.	I	L	K	A	M	K	L	Q	K	R	G	T	G	G	V	
PK4b-Thoracophelia.sp.	I	L	K	A	M	K	L	Q	K	R	G	T	G	G	V	
MICK-Ophelina	I	L	K	E	M	K	L	Q	K	R	G	T	G	G	V	
MICK-Mus_musculus	I	L	E	N	L	R	L	Q	K	R	G	T	G	G	V	
		410			420			430			440			450		
CK-Ophelina	V	E	M	E	K	K	L	E	A	G	E	A	S	N	P	
PK5-Thoracophelia.sp.	V	E	M	E	K	K	L	E	A	G	E	S	I	D	A	
CK-Namalycastis.sp.	I	Q	M	E	K	K	L	E	K	G	E	P	I	E	S	
MCK-Torpedo	V	E	M	E	K	K	L	E	K	G	E	S	I	D	A	
PK4a-Thoracophelia.sp.	I	E	M	E	K	K	L	E	K	G	E	S	I	D	A	
PK4b-Thoracophelia.sp.	I	E	M	E	K	K	L	E	K	G	E	S	I	D	A	
MICK-Ophelina	V	D	M	E	K	K	L	E	K	G	E	S	I	D	A	
MICK-Mus_musculus	I	D	C	E	R	R	L	E	K	G	E	S	I	D	A	

Fig. 3-14 *Ophelina* sp. PK4(CK), PK5(MiCK), *Thoracophelia* sp. PK4a, PK4b, PK5, 及び他の CK とアミノ酸配列の比較

配列は MEGA5 中の ClustalW 法によりアラインメントした。ATP 結合部位はオレンジ，クレアチン結合部位は青色で示している。グアニジド化合物基質に特有なアミノ酸は緑で示している。アラインメントの名前で *Ophelina* sp. PK は赤い色で，*Thoracophelia* sp. PK は緑色で示している。

PK1- *Thoracophelia* sp.

atgcagcagtgcgacagcatgcagaggtactctgccaaggagaactaccccaactacact
M Q Q C D S M Q R Y S A K E N Y P N Y T
ggcttcaagtgttaaggctgccggccatctcacctcgagatgtacgagaagctgtacagc
G F K C K V A G H L T L E M Y E K L Y S
aggaggactaagaatggcgtgaccgtcgacaaagtcacccagccgtcctgtgacaacatg
R R T K N G V T V D K V I Q P S C D N M
ggcgaaatcatcggccttatcgctgctgatgaggagtcttacacgacttttggcgagctg
G E I I G L I A A D E E S Y T T F G E L
ttcgacgctgttatcaacgagaagcacggaggttttggccccaacgacaagcacccccag
F D A V I N E K H G G F G P N D K H P Q
cccgacttggatgcttccaagctggttggcggcaactttgaaggcaagtacatcaagtcc
P D L D A S K L V G G N F E G K Y I K S
tgccgtattcgtaccgggcttccctgagaggctgctgcttccccccagccctctgccgt
C R I R T G R S L R G C C F P P A L C R
ggcgagcgtcgtgaggctcgagaaggtcatggtcggccctccaggcctgtctggtaac
A E R R E V E K V M V A A L Q G L S G N
ctggccggcaagtacttccctctcacccgcatgaccaaagccgaggaacaggcgtcatt
L A G K Y F P L T G M T K A E E Q A L I
gatgaccacttctgttccaaaagcccactggacacttgatgcagaactccagctctgcc
D D H F L F Q K P T G H L M Q N S S S A
agggactggcccgatgccagaggtatcttccacaacaacgagaagacttttctgatctgg
R D W P D A R G I F H N N E K T F L I W
atcaacgaggaggatcactatcgcgtgatctccatggagaagggtggaatgtaggtct
I N E E D H Y R V I S M E K G G N V R S
gtcttcgagaggttctctaggggctacaagagatcgaaggtctgatgaagaaggccgga
V F E R F S R G L Q E I E G L M K K A G
cgcgagttcatgctgagcagaccgtctgggctacctgtgtgcctgcccacccaacatcggc
R E F M L S D R L G Y L C A C P S N I G
accgggctgcgtgcctccgtgcacatccagctccacaagctgtgcaagcaccccaagttc
T G L R A S V H I Q L H K L C K H P K F
gaggccatcatcaccgccttgagcctgcagatgcgtggaaccggtggcgagcacaccgct
E A I I T A L S L Q M R G T G G E H T A
gocgtgatgatgtctacgacatctccaaccgtgcccgcttaaagtgcaccgagcgtgag
A V D D V Y D I S N R A R L K C T E R E
tttgttcagctcctgatcgtatggtgtgaccaagctgatcgagatggagacgactttggag

F V Q L L I D G V T K L I E M E T T L E
gccggcaagcccatcgacagtctgctgcccccggtgtctaaa
A G K P I D S L L P P G V -

PK2 *Thoracophelia* sp.

atgctctccgtcaccgtcgtctttaactctctcagggcacaagtatttggcccttcacc
M L S V T V V F N S L R A Q V F G P F T
atggctggggaaacgaatatgagtcacaaggagttcatgaagaactatagatccgggcag
M A G E T N M S H K E F M K N Y R S G Q
tctaaaaactacttgaagtacagcccaaaagacaactaccccgattacagcaaacacaaa
S K N Y L K Y S P K D N Y P D Y S K H K
tgtatggttaagcgtcaccttacaccgaaatgtacgagaagctgtacactcgggtgact
C M V K R H L T P E M Y E K L Y T R V T
ccaaacggcgtgaccttggacaaggttatccagaactcgggtgtgctgccaaaaccaaatc
P N G V T L D K V I Q N S V C C Q N Q I
atcgggctgctcgcggagacgaggaatcctacgaggtattccacgagctctttaactcg
I G L L A G D E E S Y E V F H E L F N S
gttattgatgagaaacacggagggttcggagtcagtacaagcaccaccggatctg
V I D E K H G G F G V N D K H P P P D L
gatgcctccaagctggatgaatgggaagctggacgagaagctgagatcgtgtcgtgtg
D A S K L V N G K L D E K Y V R S C R V
aggaccggtcgcagcgtgagggggctctgctttccctccgccgtctgccgtgccgagcgc
R T G R S V R G L C F P S A V C R A E R
cgcgaggtggagaaggtgatcactgacgccctgagcagctgagcggtgacctggccggc
R E V E K V I T D A L S E L S G D L A G
aagtactaccgctctccaccatgtcaccggagcagagaagcaactcatcgaggatcac
K Y Y P L S T M S P E D E K Q L I E D H
ttcttgttccaaaaaccaaccggacacttgatggatgaactctacgtctgtaagagactgg
F L F Q K P T G H L M V N S T S V R D W
ccgatgcccggtggaatctggcacaacaaagacaagaacttctgatttgggtgaacgag
P D A R G I W H N K D K N F L I W V N E
gaggatcactgtcgtcatctccatgcagaagggcggagacatgcaagccaccttcgag
E D H C R V I S M Q K G G D M Q A T F E
aggttoggcaggggcctacagcagatcgaagcgtgcatgaagaagaagggtcgtgagttt

R F G R G L Q Q I E A C M K K K G R E F
atgtggaacgagcgtctcggatacctctgcgcttgcccatccaacatcggcactggcctc
M W N E R L G Y L C A C P S N I G T G L
cgctgtagtgtcacattcagctgaaaaacgtctccaagcttcccaactatgaggacatc
R C S A H I Q L K N V S K L P N Y E D I
gtgaaggcgtgggcatgcagccccgcggaactgccggcgagcacaccgaggccgtcgac
V K A M G M Q P R G T A G E H T E A V D
agtgtctacgatatctccaactccgccaggctcaagaaatccgagcgtcaatttgtacag
S V Y D I S N S A R L K K S E R Q F V Q
gagctcattgacgccttgaacaaattgatcgagatggagaagagactggaggaaggcaag
D V I D A L N K L I E M E K R L E E G K
tccatcgatgacctgattcccaagtaaa
S I D D L I P K -

PK3 *Thoracophelia* sp.

atgacttctttaccaagcactgcaagcgagttgaaagcgactctgaatgagttgaagaaa
M T S L P S T A S E L K A T L N E L K K
ggtggcgtggagaaaagcctcgtctaatggctcagttccttttccgaaatgaagataagctg
G G V E K A S L M A Q F L F R N E D K L
gaggagctcatgtcgaggaagacaaaacttggcggaaacctcattgactgcatcaagtca
E E L M S R K T K L G G T L I D C I K S
gggattgctgtgccgtcgagtaaaaataggagtgtatgcgtgtgatccagaggcatacatt
G I A V P S S K I G V Y A C D P E A Y I
gtattcggcgacatgtttgaatttatttctaagaaaacactgcaaaatccgcgacggcttg
V F G D M F E F I L R K H C K I R D G L
aaaactccttccagtctctgtcgttgggacgtatctcaccgtccgcaaaattggccaac
K T P S S L C R W D V S H P S A K L A N
gaggccaaagagtttgtcgtttctaccaggatcagggtggccaggaatatcgatggtttt
E A K E F V V S T R I R V A R N I D G F
cgttttctgccatgattacaaaggacaaaaggtttagagctggagaagaaagtgtctgat
P F P A M I T K D K R L E L E K K V S D
cgctctcogagtctgactggagagtgggccggaaaatatcaccactcgataagctgagt
R L S S L T G E W A G K Y H P L D K L S
gcaaaggaacagaaaagagttggtggcaagtcacgttctctacaaggacgacgactcctgt

A K E Q K E L V A S H V L Y K D D D S C
ctagaaacttgtgggtgcatacagggactggccaagcggctcgtggcatcttcttcaaccag
L E T C G A Y R D W P S G R G I F F N Q
gacaagacctttattgtctgggtgaatgaagaggaccacttgcgaatcatttgcctgaaa
D K T F I V W V N E E D H L R I I C L K
atgggtgcccttttggaggagtgccttgaattccttagtaaggccaagctgaaatcgag
M G A L L E E C F E F L S K A Q A E I E
actgcaatggaatttggccaagtcagacaagtttggccatttggcattctgtccgactaac
T A M E F A K S D K F G H L A F C P T N
ttaggaacgggaatgcgactcagcgttcacatgaagctgcagaaagtgagcaaactgtcg
L G T G M R L S V H M K L Q K V S K L S
atcttcaaggaattgtgtgccaacatgagtttagacatcagaggaaccttgagagcac
I F K E L C A N M S L D I R G T H G E H
acagaatctgagggaggagtgtatgatatctccaacaaggtacgttttggattgacagag
T E S E G G V Y D I S N K V R F G L T E
agggagattctcaaccaggtcattgctggtgtcaacatgttggctttcttagaaaaagag
R E I L N Q V I A G V N M L A F L E K E
ctaaaccagataaaaataa
L N Q I K -

PK4a *Thoracophelia* sp.

cgctggggtaagccttgc

R W G K P S

ctacgaggctcaaacacttgcctccgattgcttacagatctacgccgagctgcgtgacaag
L R G S T L A S D C L Q I Y A E L R D K
gtcaccccaatggagtcaccctggatcagtgatccagaccggcgtcgacaaccctggt
V T P N G V T L D Q C I Q T G V D N P G
caccctacatcagcacctgcgggattgtcgccggggacgaggagtcctacgaggtcttc
H P Y I S T C G I V A G D E E S Y E V F
gctcccctcttgcagccatcatcgccaagaagcatggcggctacggcccgaaggataag
A P L F D A I I A K K H G G Y G P K D K
caccctactgatttagacgcctccaagctcaaggggggtcggttcgacgacaagtatgtt
H P T D L D A S K L K G G R F D D K Y V
ctgagcagccgtgtccgtacggggagggtccatccgtggcttgaccctgcctccggtctgc
L S S R V R T G R S I R G L T L P P V C

agccgtgccgagcgcgaggtggagaaggtggtcaccgaggcgtggccaacctgaag
S R A E R R E V E K V V T E A L A N L K
gacgagttccaggggacctactaccactggatgggatgactgaggctgagcaagacaag
D E F Q G T Y Y P L D G M T E A E Q D K
ctcattgatgatcacttctgtttgacaagcccgtctccccctgctgctggccagcggc
L I D D H F L F D K P V S P L L L A S G
atggcccgtgactggcccgcgcccggcatctggcacaactacagcaagaagttcctg
M A R D W P D A R G I W H N Y S K K F L
gtctggatcaacgaagaggaccacatgctgtgatatccatggaaaaggaggtgatatg
V W I N E E D H M R V I S M E K G G D M
cgatcagtcttcgagcgattctgcagcggactgaaacaggtcgaggatgagatacagaag
R S V F E R F C S G L K Q V E D E I Q K
aaggcctgggagtttagcagaagtgaacatctcggttatatcctaacttgcgaccaac
K G W E F S R S E H L G Y I L T C P T N
ctgggcaccgggatacgtgctggagttcatgtcaaaactgcctaagctgggagagaatccc
L G T G I R A G V H V K L P K L G E N P
aaattcaatgatattctgaaggcgtgaaattgcagaaaagaggaaccggtggcgtcgac
K F N D I L K A M K L Q K R G T G G V D
acagctgccgtgggcccgaaccttcgatatttcgaacgcagaacgtctcggaaaatctgaa
T A A V G G T F D I S N A E R L G K S E
gtgcagttggccaactgggtggtcgtggtgtcaacaagctgatcgagatggagaaacgc
V Q L V Q L V V D G V N K L I E M E K R
ctggagaagggaaagtccatcgccgacctcattcccaaactgcctagatcactgatcaa
L E K G K S I A D L I P K S A -

PK4b *Thoracophelia* sp.

atgtttgcaaaaactgcgatgaagcttgctggggccgctgctggcctggttagct
M F A K T A M K L A G A A A G L V A
gccgcccgtgctgctactttcggctacggcgcggcagagcgttagaaactggcagagcacg
A A G A A T F G Y G A Q S A R N W Q S T
gggcatttgaaattccccgcctccgccaactttccaacctgaaaggccacaacaacacc
G H L K F P A S A N F P N L K G H N N T
atggccgaatgcttgactcctacgatctacgccgagctgctgacaaggtcaccaccaat
M A E C L T P T I Y A E L R D K V T P N

ggagtcaccctggatcagtgtatccagaccggcgtcgacaaccctggtcaccctacatc
G V T L D Q C I Q T G V D N P G H P Y I
agcacctgtggattgtcgccggggacgaggagtctctacgaggtcttcgctcccctcttc
S T C G I V A G D E E S Y E V F A P L F
gacgccatcatcgccaagaagcatggcggctacggcccgaaggataagcaccctgat
D A I I A K K H G G Y G P K D K H P T D
ttagacgcctccaagctcaaggggggtcggttcgatgacaagtatgttctgagcagccgt
L D A S K L K G G R F D D K Y V L S S R
gtccgtacggggaggtccatccgcggcctgaccctgcctccggtgtgcagccgtgccgag
V R T G R S I R G L T L P P V C S R A E
cgacgcgaggtggagaaggtggtcaccgaggcgtggccaacctgaaggacgagttccag
R R E V E K V V T E A L A N L K D E F Q
gggacctactaccactggatgggatgactgaggctgagcaagacaagctcattgatgat
G T Y Y P L D G M T E A E Q D K L I D D
cacttctgtttgacaagcccgtctccccctgctgctggccagcggcatggcccgtgac
H F L F D K P V S P L L L A S G M A R D
tggcccgcgcccgcggcatctggcacaactacagcaagaagttcctggtctggataaac
W P D A R G I W H N Y S K K F L V W I N
gaggaggaccacatgctgtgatatccatggaaaaggaggtgatatgcatcagttcttc
E E D H M R V I S M E K G G D M R S V F
gagcgattctgcagtgactgaaacaggttgaggatgagatacagaagaaggctgggag
E R F C S G L K Q V E D E I Q K K G W E
tttagcagaagtgaacatctcggttatatacttacctgtccaaccaacctgggcaccggg
F S R S E H L G Y I L T C P T N L G T G
atacgtgctggagtgcattgtcaaaactacctaagctgggagagaatcccaaattcaatgat
I R A G V H V K L P K L G E N P K F N D
attctgaaggcgatgaaattgcagaaaagaggaaccggcggcgtcgacacagctgccgtg
I L K A M K L Q K R G T G G V D T A A V
ggcggaaaccttcgatatttcgaacgcagaacgtctcggaaaatctgaagtgcagttggtc
G G T F D I S N A E R L G K S E V Q L V
caactgggtggctgatgggtgtcaacaagctgatcgagatggagaaacgcctggagaaggga
Q L V V D G V N K L I E M E K R L E K G
aagtccatcgccgacctcattcccaaattctgcctagatcactgatcaaccaagatgtgg
K S I A D L I P K S A -

PK5 *Thoracophelia* sp.

atgcctgggaatgcaaacaaaagaatttcaagccggaagag
M P G N A N Q K N F K P E E
gacttcccagacctctcaaagcacaataattggatggcaaaagtactcacacctgcaatt
D F P D L S K H N N W M A K V L T P A I
tatgctaaatatagagatgtctgcaccccaagtggatacaattttgatggcgctattcaa
Y A K Y R D V C T P S G Y N F D G A I Q
acaggagtggacaatccaggtcacccttttatcttcaactgtgggatgtgtagctggtgat
T G V D N P G H P F I F T V G C V A G D
gaagaaacctatgagggttcaaagatttctttgatccagtcattgacaagcgccatggg
E E T Y E V F K D F F D P V I D K R H G
ggttatgctccagatgctaagcataagactgacttggatttcacaaaagttcaagtgga
G Y A P D A K H K T D L D F T K V Q G G
gaatttgatccaaagtatgtcatcagtagccgtgtacgtactggacgcagcatcaaaggc
E F D P K Y V I S S R V R T G R S I K G
ttatgcctgcctccacactgcaccagagctgaaagaagagctgttgaaagaatctctgtt
L C L P P H C T R A E R R A V E R I S V
gaagccttggctacacttgatgggtgagttccatggaaaatattaccctctcaacaagatg
E A L A T L D G E F H G K Y Y P L N K M
actgaggcagaacaagatcagctgattgatgaccacttcttgtttgacaagcctgtctcg
T E A E Q D Q L I D D H F L F D K P V S
cccttactaacctgtgctggcatggcccagattggcctgatgccaggggtatttggcat
P L L T C A G M A R D W P D A R G I W H
aatgacaacaaaacatttttagtctggatcaatgaagaagaccatttgagagttatttca
N D N K T F L V W I N E E D H L R V I S
atgcagaaggatggtaacatcaagcaagcttccaaaggttttgcgaaggactgagcaag
M Q K D G N I K Q V F Q R F C E G L S K
gttgaagcagccatgaaggaaaagggtgcttcatacatgtggaatgaacatcttggctat
V E A A M K E K G A S Y M W N E H L G Y
gtottaacctgtccaagcaacttaggtacaggtctaagagctgggtgtacatgtaaaactg
V L T C P S N L G T G L R A G V H V K L
cctaatttggctaaggatgagaagcgcttggatgacatgctgggaaagctacgcctgcaa
P N L A K D E K R L D D M L G K L R L Q
aaacgtggaacaggtgggtgttgacactgcatctactgatggaacctatgatgtctcaaac
K R G T G G V D T A S T D G T Y D V S N
tctgaccgcctgggatttctcagaggttgagctgattcagtttgggtggatggagtcaac

S D R L G F S E V E L I Q F V V D G V N
ctcttggtagaaatggaaaagaaattggaaaaaggcgagagcatcgatgccatgatgcct
L L V E M E K K L E K G E S I D A M M P
gctcagaagtaatcctgttctggaaaagtggccacaaatgtttaacagcattagtgtttt
A Q K -

Fig 3-15 *Thoracophelia* sp.で見出された 5 種の PK のアミノ酸配列と塩基配列

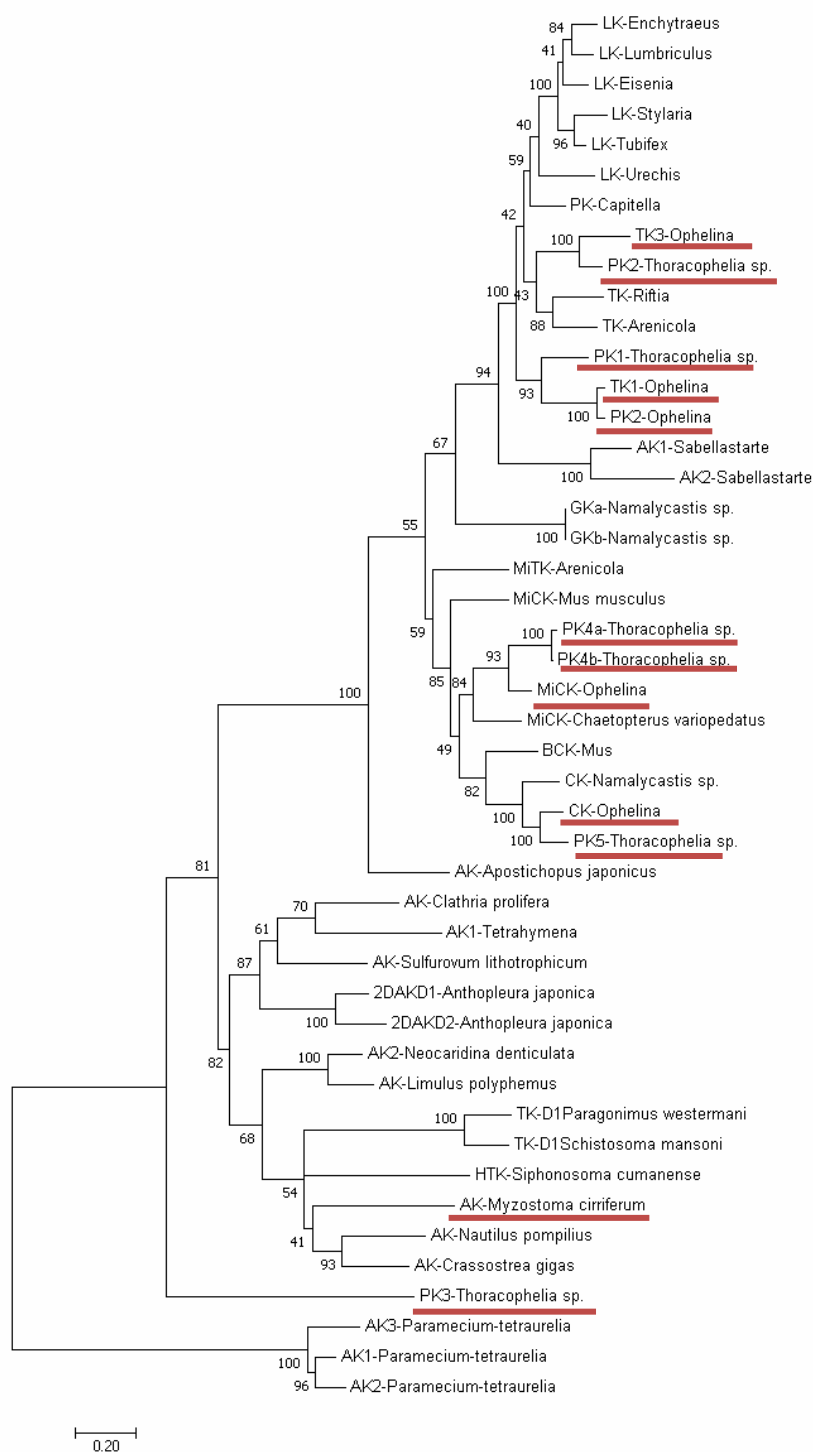


Fig. 3-16 見出された環形動物 PK と既知の PK との分子系統樹

MEGA7.0 用いて最尤法を用いて分子系統樹を作成した(Kumar et al., 2016). 系統樹の信頼度を確認するためにブーツストラップ検定を 100 回行った. 赤線を引いた PK は本研究で見いだされた PK である.

謝辞

本研究を行うに当たって、ご指導いただきました先生方に厚くお礼申し上げます。

生化学研究室の湯浅創准教授、宇田幸司講師には研究室内での様々な場面において、アドバイスを頂いたことを深く感謝致します。

第一章の AK3 の結晶化では、高知大学工学部の杉山成教授、第三章の *Thoracophelia* sp. の採取については、奈良正和教授にご協力頂いたことを深く感謝致します。

また、本論文をご校閲頂き、数多くの助言をいただいた細胞分子工学研究室の藤原滋樹教授、動物生理学研究室の松岡達臣教授には大変感謝いたします。

指導教員である生化学研究室の鈴木知彦教授には合計 6 年間という長い間、多くのディスカッションや研究指導、そして素晴らしい研究テーマを与えていただき、心より感謝申し上げます。

最後に、今まで暖かく支援していただいた両親に深く感謝いたします。

引用文献

Adl, S.M., Simpson, A.G., Lane, C.E., Lukes, J., Bass, D., Bowser, S.S., et al. 2012. The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59, 429–493.

Andrews, L.D., Graham, J., Snider, M.J., Fraga, D., 2008. Characterization of a novel bacterial arginine kinase from *Desulfotalea psychrophila*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 150, 312-319.

Aury, J-M, Jaillon, O., Duret, L., Noel, B., Jubin, C., Porcel, B.M., et al. 2006. Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*. *Nature.* 444, 171-8.

Brevet, A., Zeitoun, Y., Pradel, L.A., 1975. Comparative structural studies of the active site of ATP: guanidine phosphotransferases. The essential cysteine tryptic peptide of taurocyamine kinase from *Arenicola marina*. *Biochim. Biophys. Acta* 393, 1-9.

Chaplin, M., Bucke, C., 1990. *Enzyme Technology* (Chapter 1: Fundamentals of Enzyme Kinetics), Cambridge University Press, Cambridge,

Chouno, K., Yano, D., Uda, K., Fujita, T., Iwasaki, I., Suzuki, T., 2015. Arginine kinases from the marine feather star *Tropiometra afra* macrodiscus: the first finding of a prenylation signal sequence in metazoan phosphagen kinases. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 187, 55-64.

Chung, W., James, F.H., 1956. Free and nonprotein amino acids of *Tetrahymena pyriformis*. *Arch Biochem Biophys.* 62(1), 70-77.

Conejo, M., Bertin, M., Pomponi, S.A., Ellington, W.R., 2008. The early evolution of the phosphagen kinases—insights from choanoflagellate and poriferan arginine kinases. *J. Mol. Evol.* 66, 11-20.

Edmiston, P.L., Schavolt, K.L., Kersteen, E.A., Moore, N.R., Borders, C.L., 2001. Creatine kinase: a role for arginine-95 in creatine binding and active site organization. *Biochim. Biophys. Acta* 1546, 291-298.

Ellington, W.R., 2001. Evolution and physiological roles of phosphagen systems. *Ann. Rev. Physiol.* 63, 289-325.

Ellington, W.R. and Bush, J., 2002. Cloning and Expression of a lombricine kinase from an Echiuroid worm: insights into structural correlates of substrate specificity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 291, 939-944

Ellington, W.R., Suzuki, T., 2006. Evolution and divergence of creatine kinase genes. In: Vial, C. (Ed.), *Molecular Anatomy and Physiology of Proteins: Creatine Kinase*. Nova Science, New York, pp. 1–27

Fujimoto, N., Tanaka, K., Suzuki, T., 2005. Amino acid residues 62 and 193 play the key role in regulating the synergism of substrate binding in oyster arginine kinase. *FEBS Lett.* 579, 1688-1692.

Iwanami, K., Iseno, S., Uda, K., Suzuki, T., 2009. A novel arginine kinase from the shrimp *Neocaridina denticulata*: the fourth arginine kinase gene lineage. *Gene* 437, 80-87.

Jarilla, B.R., Tokuhira, S., Nagataki, M., Hong, S.-J., Uda, K., Suzuki, T., Agatsuma, T., 2009. Molecular characterization and kinetic properties of a novel two-domain taurocyamine kinase from the lung fluke *Paragonimus westermani*. *FEBS Lett.* 583, 2218-2224.

Keeling, P. J., 2010. The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B Biol. Sci.*, 365, 729–748.

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33:1870-1874

Lahiri, S.D., Wang, P.F., Babbitt, P.C., McLeish, M.J., Kenyon, G.L., Allen, K.N., 2002. The 2.1 Å structure of *Torpedo californica* creatine kinase complexed with the ADP-Mg²⁺-NO₃⁻-creatine transition-state analogue complex. *Biochemistry* 41,13861-13867.

Laino, A., Lopez-Zavala, A.A., Garcia-Orozco, K.D., Carrasco-Miranda, J.S., Santana, M., Stojanoff, V., Sotelo-Mundo, R.R., Garcia, C.F., 2017. Biochemical and structural characterization of a novel arginine kinase from the spider *Polybetes pythagoricus*. *PeerJ.* 11, 5:e3787.

Lin, Y., Lu, P., Tang, C., Mei, Q., Sandig, G., Rodrigues, A.D., Rushmore, T.H., Shou, M., 2001. Substrate inhibition kinetics for cytochrome P450-catalyzed reactions. *Drug Metab Dispos.* 29, 368-74.

- López-Zavala, A.A., García-Orozco, K.D., Carrasco-Miranda, J.S., Sugich-Miranda, R., Velázquez-Contreras, E.F., Criscitiello, M.F., Brieba, L.G., Rudiño-Piñera, E., Sotelo-Mundo, R.R., 2013. Crystal structure of shrimp arginine kinase in binary complex with arginine—a molecular view of the phosphagen precursor binding to the enzyme. *J Bioenerg Biomembr.* 45(6), 511-18.
- Magida, L., Fraga, D., 2007. Using RNAi to determine the role of individual members of the arginine kinase family in *Paramecium tetraurelia*. *FASEB J.* 21, Page A299
- Matsushima, K., Uda, K., Ishida, K., Kokufuta, C., Iwasaki, N., Suzuki, T., 2006. Comparison of kinetic constants of creatine kinase isoforms. *Int. J. Biol. Macromol.* 38, 83-88.
- Maruyama, S., Suzaki, T., Weber, A. P. M., Archibald, J. M., Nozaki, H. 2011. Eukaryote-to-eukaryote gene transfer gives rise to genome mosaicism in euglenids. *BMC. Evol. Biol.* 11, 105.
- Michibata, J., Okazaki, N., Motomura, S., Uda, K., Fujiwara, S., Suzuki, T., 2014. Two arginine kinases of *Tetrahymena pyriformis*: characterization and localization. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 171, 34-41.
- Mickelson, J.K., Carlson, C.J., Kaysen, G.A., Rapaport, E., 1985. Creatine kinase: purification, characterization, and tissue distribution of the MM subtypes. *Clin Chim Acta.* 153(3), 181-90.
- Morrison, J.F., James, E., 1965. The mechanism of the reaction catalyzed by adenosine triphosphate–creatine phosphotransferase. *Biochem. J.* 97, 37-52.
- Mizuta, C., Tanaka, K., Suzuki, T., 2005. Isolation, characterization and cDNA-derived amino acid sequence of glycoamine kinase from the tropical marine worm *Namalycastis* sp. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 140, 387-393.
- Noguchi, M., Sawada, T., Akazawa, T., 2001. ATP-regenerating system in the cilia of *Paramecium caudatum*. *J. Exp. Biol.* 204, 1063-1071.
- Palmer, A., Begres, B.N., Van Houten, J.M., Snider, M.J., Fraga, D., 2013. Characterization of a putative oomycete taurocyamine kinase: Implications for the evolution of the phosphagen kinase family. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 166, 173-181.

Pereira, C., Alonso, G., Paveto, M., Iribarren, A., Cabanas, M., Torres, H., Flawia, M., 2000. Trypanosoma cruzi arginine kinase characterization and cloning. A novel energetic pathway in protozoan parasites. *J. Biol. Chem.* 275, 1495-1501.

Piccinni, E., Coppelotti, O., 1977. Inorganic phosphatases and phosphagen kinase in *Euglena gracilis*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Comp. Biochem.* 57, 281-284.

Reed, M. C., Lieb, A., Nijhout, H.F., 2010. The biological significance of substrateinhibition: a mechanism with diverse functions, *Bioessays.* 32, 422-429.

Suzuki, T., Kawasaki, Y., Furukohri, T., Ellington, W.R., 1997. Evolution of phosphagenkinase. VI. Isolation characterization and cDNA-derived aminoacid sequence of lombricine kinase from earthworm *Eisenia foetida*, and identification of possible candidate for guanidine substrate recognition site, *Biochim. Biophys. Acta* 1348, 152-159.

Suzuki, T., Uda, K., Adachi, M., Sanada, H., Tanaka, K., Mizuta, C., Ishida, K., Ellington, W.R., 2009. Evolution of the diverse array of phosphagen systems present in annelids. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 152, 60-66.

Suzuki, T., Soga, S., Inoue, M., Uda, K., 2013. Characterization and origin of bacterial arginine kinases. *Int. J. Biol. Macromol.* 57, 273-277.

Suzuki, T., Kanou, Y., 2014. Two distinct arginine kinases in *Neocaridina denticulate*: psychrophilic and mesophilic enzymes. *Int. J. Biol. Macromol.* 67, 433-438.

Szasz, G., Gruber, W., Bernt, E., 1976. Creatine kinase in serum: 1. Determination of optimum reaction conditions. *Clin. Chem.* 22(5), 650-6.

Thiem, N.V., Lacombe, G., Van Thoai, N., 1975. Comparative study of two ATP : L-arginine phosphotransferases of molecular weight 84000. *Biochim. Biophys. Acta.* 377, 95-102.

Tanaka, K., Suzuki, T., 2004. Role of amino acid residue 95 in substrate specificity of phosphagen kinases. *FEBS Lett.* 573, 78-82.

Tanaka, K., Matsumoto, T., Suzuki, T., 2011. Identification of amino acid residues responsible for taurocyamine binding in mitochondrial taurocyamine kinase from *Arenicola brasiliensis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1814, 1219-1225.

Tombes, R.M., Shapiro, B.M., 1987. Enzyme termini of a phosphocreatine shuttle. Purification and characterization of two creatine kinase isozymes from sea urchin sperm. *J. Biol. Chem.* 262, 16011-16019.

Uda, K., Suzuki, T., 2004. Role of amino acid residues on the GS region of *Stichopus* arginine kinase and *Danio* creatine kinase. *Protein J.* 23, 53-64.

Uda, K., Iwai, A., Suzuki, T., 2005a. Hypotaurocyamine kinase evolved from a gene for arginine kinase. *FEBS Lett.* 579, 6756-6762.

Uda, K., Tanaka, K., Bailly, X., Zal, F., Suzuki, T., 2005b. Phosphagen kinase of the giant tubeworm *Riftia pachyptila*. Cloning and expression of cytoplasmic and mitochondrial isoforms of taurocyamine kinase. *Int. J. Biol. Macromol.* 37, 54-60.

Uda, K., Saishoji, N., Ichinari, S., Ellington, W.R., Suzuki, T., 2005c. Origin and properties of cytoplasmic and mitochondrial isoforms of taurocyamine kinase, *FEBS J.* 272, 3521-3530.

Uda, K., Fujimoto, N., Akiyama, Y., Mizuta, K., Tanaka, K., Ellington, W.R., Suzuki, T., 2006. Evolution of the arginine kinase gene family. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* 1, 209-218.

Uda, K., Matsumoto, A., Suzuki, T., 2010. Identification of key amino acid residues distinguishing chiral guanidino substrates (D- and L-arginine) in *Sabellastarte* arginine kinase. *J. Mol. Catal.* 64, 75-80.

Uda, K., Ellington, W.R., Suzuki, T., 2012. A diverse array of creatine kinase and arginine kinase isoform genes is present in the starlet sea anemone *Nematostella vectensis*, a cnidarian model system for studying developmental evolution. *Gene* 497, 214-227.

Uda, K., Hoshijima, M., Suzuki, T., 2013. A novel taurocyamine kinase found in the protist *Phytophthora infestans*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 165, 42-48.

Van Thoai, N., Di Jeso, F., Robin, Y. Der Terrossian, E. 1966. *Biochim. Biophys. Acta*, 113, 542-550.

Watts, D.C., Bannister, L.H., 1970. Location of arginine kinase in the cilia of *Tetrahymena pyriformis*. *Nature*. 226, 450-451.

Wickramasinghe, S., Uda, K., Nagataki, M., Yatawara, L., Rajapakse, R.P.V.J., Watanabe, Y., Suzuki, T., Agatsuma, T., 2007. *Toxocara canis*: molecular cloning, characterization, expression and comparison of the kinetics of cDNA-derived arginine kinase. *Exp. Parasitol.* 117, 124-132.

Wu, X., Ye, S., Guo, S., Yan, W., Bartlam, M., Rao, Z., 2010. Structural basis for a reciprocating mechanism of negative cooperativity in dimeric phosphagen kinase activity. *FASEB J.* 24(1), 242-52.

Wang, Z., Qiao, Z., Ye, S., Zhang, R., 2015. Structure of a double-domain phosphagen kinase reveals an asymmetric arrangement of the tandem domains. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 71(Pt 4), 779-89.

Yang, Y., Maruyama, S., Sekimoto, H., Sakayama, H. and Nozaki, H. 2011. An extended phylogenetic analysis reveals ancient origin of "non-green" phosphoribulokinase genes from two lineages of "green" secondary photosynthetic eukaryotes: Euglenophyta and Chlorarachniophyta. *BMC. Res. Notes.* 4, 330.

Yano, D., Suzuki, T., Hirokawa, S., Fuke, K., Suzuki, T., 2017 Characterization of four arginine kinases in the ciliate *Paramecium tetraurelia*: investigation on the substrate inhibition mechanism. *Int. J. Biol. Macromol.* 101, 653-659

Zhou, G., Somasundaram, T., Blanc, E., Parthasarathy, G., Ellington, W.R., Chapman, M.S., 1998. Transition state structure of arginine kinase: implications for catalysis of bimolecular reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 8449-54.

星島 陸宏 (2012) 円石藻類 *Emiliana huxleyi* とフハイカビ類 *Phytophthora infestans* に存在するフォスファゲンキナーゼ遺伝子の酵素機能解析 高知大学理学応用理学科卒業論文

山城由也 (2014) テトラヒメナ(*Tetrahymena thermophila*)に存在するセリンラセマーゼホモログの酵素機能解析 高知大学高知大学大学院総合人間自然科学研究科理学専攻修士論文

弘川沙樹 (2014) ヨツヒメゾウリムシ (*Paramecium tetraurelia*) の4種類のアルギニンキナーゼ (AK) ~AK4 の遺伝子合成とその異常に低い酵素活性 高知大学理学応用理学科卒業論文

百本伊吹 (2014) 単細胞生物・珪藻 (*Phaeodactylum tricornutum*) にフォスファゲンキナーゼは必要なのか? 高知大学理学応用理学科卒業論文

矢野大地(2015) ヨツヒメゾウリムシの繊毛運動とアルギニンキナーゼ(AK): アルギニンリン酸シャトル機構の詳細 高知大学高知大学大学院総合人間自然科学研究科理学専攻修士論文

三村紗代 (2015) 環形動物 *Myzostoma cirriferum* のアルギニンキナーゼ遺伝子の合成と酵素活性 高知大学理学応用理学科卒業論文

鈴木貴也 (2015) ヨツヒメゾウリムシ(*Paramecium tetraurelia*)アルギニンキナーゼ 3 の基質阻害の解明 高知大学理学応用理学科卒業論文

鈴木 美優紀 (2015) 環形動物 *Ophelina sp.* の細胞質型フォスファゲンキナーゼ (PK3) の遺伝子合成と酵素活性 高知大学理学応用理学科卒業論文

八重尾 ひより(2016) シオミドロ *Ectocarpus siliculosus* のホスファゲンキナーゼ(PK) の酵素活性 高知大学理学応用理学科卒業論文

渡邊 晃規(2016) 円石藻類 *Emiliania huxleyi* アルギニンキナーゼの酵素活性の詳細 高知大学理学応用理学科卒業論文

付録 1

テクニカルノート

1. Inverse PCR による部位特異的変異導入

(1) KOD⁺ Neo DNA Polymerase(Toyobo,Osaka,Japan)を用い, 以下の条件で Inverse PCR を行った.

<Reaction mixture>

KOD ⁺ Neo	0.5 μ l
10 \times KOD ⁺ Neo buffer	2.5 μ l
2 mM dNTPs Mixture	2 μ l
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	1.25 μ l
25 mM MgSO ₄	1 μ l
Forward Primer (100 pmols/ μ l)	1 μ l
Reverse Primer (100 pmols/ μ l)	1 μ l
Template	1 μ l
H ₂ O	14.75 μ l
Total	25 μ l

<Cycle>

	94°C	2 min	} 35 Cycles
Denaturation	96°C	15 sec	
Annealing	60°C	30 sec	
Extension	68°C	6 min	
	4°C	∞	

(2) PCR 溶液に *Dpn* I 1 μ l 加えて 37 °C で 2 時間テンプレート DNA を消化した.

(3)アガロースゲル電気泳動で目的のバンドを切り出した.

2.ガラスビーズ法による目的 DNA の回収

(1) 切り出したゲルを 1.5 ml チューブに入れた.

(2) 500 μ l の NaI 溶液を加え, 65°C で 3 分間ゲルを加熱し, 溶かした.

NaI 溶液は以下の通りに作製した.

NaI 90.8 g

Na₂SO₄ 1.5 g

H₂O up to 100 ml

濾過後, 0.5 g の Na₂SO₃ を加え 4°C で遮光で保存した.

(3) ガラスミルクを解凍し、ガラスミルクを 5 μ l 加え、よくピペッティングで攪拌させた。

ガラスミルクの作製法

a. 石英砂に水を加え、乳鉢で碎き粒子を細かくした。

b. 水を加え全量を 500 ml にし、スターラーで一時間攪拌した。

c. 20 分ほど静置し、上清を回収した。

d. 回収した上清を遠心によって沈殿させ均一な粒子を回収した。

e. 集めたガラスに 200 ml の水を加えて懸濁し、等量の硝酸を加えドラフト内で沸騰直前まで加熱した。

f. 室温になるまで静置した後、遠心してガラスを回収した。

g. 水を加え攪拌後、再度遠心してガラスを回収した。

f. g を 4, 5 回繰り返す。最終的に等量の水に懸濁して 4°C で保存した。

(4) 氷中で 5 分間静置した。ときどきタッピングを行い、ガラスミルクが沈殿しないようにした。

(5) 13,400 rpm で 30 秒間遠心し、上澄みを取り除いた。

(6) 1 ml の NEW WASH 溶液を加え、ガラスビーズを懸濁した。

NEW WASH 溶液

50% エタノール

0.1 M NaCl,

10 mM Tris/HCl (pH 7.5),

10 mM EDTA

この組成の溶液を作成し NEW WASH 溶液とした。

(7) 13,400 rpm で 30 秒間遠心し、上澄みを取り除いた。

(8) 再度、1 ml の NEW WASH 溶液を加え、ガラスビーズを懸濁し、遠心し上清を除いた。

(9) 13,400 rpm で 30 秒間遠心し、上清を取り除いた。

(10) スピンドアウンを行い、上清を完全に取り除いた。

(11) 滅菌蒸留水を 5 μ l 加えて、懸濁した。

(12) 65°C で 2 分間加熱し、1 分間遠心して上清を 5 μ l 回収した。

(13) (12) を再び行い、1 分間遠心して上清を 5 μ l 回収した。

(14) 上清を 1 μ l 使用して、アガロースゲル電気泳動で DNA の回収を確認した。

3. DNA 断片末端のリン酸化とライゲーション

(1) DNA 断片末端のリン酸化を次の条件で行った。

10× Kinase Buffer 2 μ l

T4 Polynucleotide kinase 0.5 μ l

100 mM ATP	1.5 μ l
DNA 溶液	9 μ l
滅菌蒸留水	8 μ l
Total	30 μ l

37 °C で 1 時間静置した.

(2)ガラスビーズ法で DNA 溶液 9 μ l を回収した.

(3)ライゲーション反応を以下の溶液を作成し, 行った.

Instant Sticky-end Ligase Master Mix 5 μ l

H₂O 1 μ l

DNA 4 μ l

Total 10 μ l

4 °C で 30 分静置した .

4. コンピテントセルの形質転換

(1) 大腸菌 DH5 α を氷中で溶かし, 3.(3)のライゲーション溶液を 3 μ l をクリーンベンチ内で大腸菌 DH5 α に加え, 氷中で 30 分静置した.

(2) 42°Cの水に, 30 秒間浸し, その後氷中で 10 分静置した.

(3) クリーンベンチ内で LB/Free 液体培地を 500 μ l を加えて, 37°C で一時間振盪培養した.

(4) LB/Kanamycin 寒天培地に培養液をスプレッダーによりぬり広げた.

(5) 37 °C で 18 時間培養した.

5. SDS アルカリ法によるプラスミドの精製

ZYMO RESEARCH 社の Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit を用いて行った.

(1) LB/Kanamycin 液体培地 2 ml に目的プラスミドを含むコンピテントセルを 37°Cで 16 時間振盪培養した.

(2) 培養した大腸菌を 1.5 ml チューブに移し, 1 分間遠心して集菌した.

(3) 滅菌蒸留水を 600 μ l 加えて, 懸濁した.

(4) 7x Lysis Buffer を 100 μ l 加えて, チューブを 4~5 回よく混和した.

(5) Neutralization Buffer を 350 μ l 加え, よく混和した.

(6) 13,400 rpm で 3 分間遠心し, 上澄みを 700 μ l 取り Zymo-Spin™ IIN Columns に入れた.

(7) Collection Tubes の中にカラムを置き, 13,400 rpm で 30 秒間遠心した.

(8) Collection Tubes にある素通り画分を捨てた.

(9)カラムに Endo-Wash Buffer を 200 μ l 加え, 13,400 rpm で 30 秒間遠心した.

(10) カラムに Zyppy™ Wash Buffer を 400 μ l 加え, 13,400 rpm で 60 秒間遠心した.

(11) 1.5 ml チューブの蓋を切り落とし, チューブにカラムを入れ Zyppy™ Elution Buffer をカラムに直接 30 μ l 加えて, 13,400 rpm で 30 秒間遠心した.

(12) 溶出した溶液を 0.5 ml チューブに回収した.

6. 塩基配列の決定 (ABI PRISM 3130-Avant Genetic Analyzer を使用)

(1) Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem, CA, USA)

を用いてサイクルシーケンス反応を行った.

(2) 以下の反応溶液で行った.

Big Dye	1 μ l
Primer (1pmols/ μ l)	3 μ l
5 \times Sequence Buffer	3.75 μ l
目的 DNA	3 μ l
H ₂ O	9.25 μ l
<hr/>	
Total	20 μ l

<Cycle Sequencing>

96°C		1 min	} 25 Cycles
Denaturation	96°C	20 sec	
Annealing	50°C	10 sec	
Extension	60°C	3 min	
	4°C	∞	

(3) Cycle Sequencing 反応後, 反応溶液に 125 mM EDTA を 5 μ l 加えた. またこの時 0.5 ml チューブに移し替えた.

(4) 60 μ l の 100%エタノールを入れ, よく混和した.

(5) 室温で 15 分静置し, 13,400 rpm で 15 分間遠心し, 上清を取り除いた.

(6) 70%エタノールを 180 μ l 加え, 13,400 rpm で 5 分間遠心した.

(7) 完全に上澄みを取り除いた後, 65°C で 3 分間加熱して, 乾燥させた.

(8) ホルムアミド 15 μ l 加えてシーケンスサンプルとした.

(9) シーケンスサンプルを高知大学遺伝子実験施設に送った.

(10) 遺伝子実験施設の ABI PRISM 3130-Avant Genetic Analyzer により塩基配列の解析を依頼し, 解析後のデータを受け取り, 塩基配列を確認した.

7. オーバーラップエクステンション PCR 法による PK 遺伝子全合成

(1) オーバーラップエクステンション PCR 用各プライマーを混合し，滅菌蒸留水で希釈し，各プライマー濃度が 625 nM になるよう調製した．これを Template として使用し，PCR に使用した．

(2) First PCR を以下の条件で行った．

<Reaction mixture>

KOD ⁺ Neo	0.5 μ l
10 \times KOD ⁺ Neo buffer	2.5 μ l
2 mM dNTPs Mixture	2.5 μ l
DMSO	1.25 μ l
25 mM MgSO ₄	1 μ l
Template	1 μ l
滅菌蒸留水	16.25 μ l
<hr/>	
Total	25 μ l

<Cycle>

	96 $^{\circ}$ C	3 min	} 20 Cycles
Denaturation	95 $^{\circ}$ C	30 sec	
Annealing	65 $^{\circ}$ C \rightarrow 55 $^{\circ}$ C	30 sec	
Extension	68 $^{\circ}$ C	2 min	
	68 $^{\circ}$ C	5 min	
	4 $^{\circ}$ C	∞	

Annealing の温度は 1 サイクルごとに 0.5 $^{\circ}$ C ずつ下がるように設定した．

(3) Second PCR

First PCR の産物を Template として使用し，PCR を行った．

<Reaction mixture>

KOD ⁺ Neo	0.5 μ l
10 \times KOD ⁺ Neo buffer	2.5 μ l
2 mM dNTPs Mixture	2.5 μ l
DMSO	1.25 μ l
25 mM MgSO ₄	1 μ l
PK 遺伝子の N 末端側 primer	1 μ l
PK 遺伝子の C 末端側 primer	1 μ l
Template	1 μ l

滅菌蒸留水	14.25 μ l
Total	25 μ l

<Cycle>

	94°C	2 min	} 35 Cycle
Denaturation	95°C	30 sec	
Annealing	60°C	30 sec	
Extension	68°C	1.5 min	
	68°C	5 min	
	4°C	∞	

(4) アガロースゲル電気泳動を行い、目的産物を切り出し、1.5 ml チューブに入れた。

(5) ガラスビーズ法によって精製した。

8. Normal *Taq* による DNA 末端側アデニン付加と TA クローニング

(1) 以下の反応溶液を作った。

Normal *Taq* 0.5 μ l

DNA 5 μ l

10×Buffer 1 μ l

dNTP 1 μ l

滅菌蒸留水 3 μ l

Total 10.5 μ l

72°Cで30分間反応させた。

(2) 0.5 μ l の pGEM-T Easy に、アデニンを付加した DNA 溶液を 1.5 μ l 加えた。

さらに、H₂O 3 μ l とライゲーションバッファーを 5 μ l 加えて、4 °C で 30 分静置した。

(3) 大腸菌 DH5 α をトランスフォームした。ブルーホワイトセレクションを行うために、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド(X-gal)を寒天培地に 20 μ l 添加した。

(4) プラスミド回収と塩基配列を確認した。

9. pGEM-T Easy ベクターから pET30b (Novagen, Merck KGaA GER)ベクターへの載せ替え

(1)制限酵素処理を以下の溶液で行った。

a. 合成した PK 遺伝子がクローニングされた pGEM-T Easy

NEBuffer 4	2 μ l
DNA 溶液	3 μ l
滅菌蒸留水	14.5 μ l
<i>Nde</i> I	0.5 μ l
<hr/>	
Total	20 μ l

b. pET30-b

NEBuffer 4	2 μ l
DNA 溶液	5 μ l
滅菌蒸留水	12.5 μ l
<i>Nde</i> I	0.5 μ l
<hr/>	
Total	20 μ l

37°C, 5 時間反応させた.

(2)反応後, a 及び b の溶液に *EcoR* I を 1 μ l 加え二時間反応させた.

ただし, b には一時間半後に Bacterial Alkaline Phosphatase を 1 μ l 加えた.

(3)アガロースゲル電気泳動を行い, 目的産物を切り出した.

(4)ガラスビーズ法で DNA を精製した.

(5)精製した a を 1 μ l, b を 3 μ l それぞれ混和し, さらに, H₂O 1 μ l とライゲーションバッファーを 5 μ l 加えて, 4 °C で 30 分静置した .

(6) 大腸菌 DH5 α をトランスフォームした.

(7) プラスミド回収と塩基配列を確認した.

10.大腸菌によるリコンビナント酵素の発現確認

(1)発現させる遺伝子を導入した pET ベクターで大腸菌 BL21 を形質転換した.

(2) 2 ml の LB/Kanamycin 液体培地 BL21 をトランスフォームした大腸菌をつつき 50 ml チューブに入れた.

(3) 大腸菌を 37°C, 18 時間 170 rpm で振盪培養した.

(4) 培養液を 1 ml をそれぞれ二つの 10 ml LB/Kanamycin 液体培地に加えた.

(5) 37°C, 三時間, 110 rpm で振盪培養した.

(6) 一方の培養液に 100 mM イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド(IPTG) を 55.2 μ l を加え, 最終濃度を 0.5 mM にした. IPTG を加えていないものはネガティブコントロールとした.

(7) 16°C, 48 時間 110 rpm で培養した.

(8) 培養した大腸菌を 1.5 ml チューブに満杯になるまで入れ, 2 分間遠心し集菌し, 上清を取り除いた. これを 3 回繰り返した.

- (9) 大腸菌の重量を量りその 5 倍量の Bug Buster Protein Extraction reagent (Novagen 社製)を 1.5 ml チューブに加え, 20 分静置した.
- (10)3 分間遠心し, 上清を 50 μ l 取り, 0.5 ml チューブに移した.
- (11)上清を完全に取り除き, His-tag 用 Buffer A を 400 μ l 加え, 混濁し, 新しい 0.5 ml チューブに 50 μ l 入れた.

His-tag 用 Buffer A

50 mM NaH₂PO₃

300 mM NaCl

NaOH で pH8.0 に調節

- (12) (10)及び(11)で回収したサンプルに 50 μ l の SDS sample buffer を 50 μ l 加え, 98°Cで 5 分間加熱した.

11. SDS-PAGE によるリコンビナント PK の発現と可溶化の確認

- (1)ゲル板を 100%エタノールでよく拭いた.
- (2)ゲル板にチューブをセットし, 二つのクリップでとめた.
- (3)コームを差し込んで 1 cm 下に印を付けた.
- (4) 分離ゲルの作成

50 ml チューブに以下の溶液を入れてよく混ぜた.

30%アクリルアミド	3000 μ l
滅菌蒸留水	2700 μ l
2 M Tris-HCl (pH8.9)	1400 μ l
10 % SDS	150 μ l
0.5 M EDTA	15 μ l
10% 過硫酸アンモニウム AMPS	240 μ l
テトラメチルエチレンジアミン(TEMED)	7 μ l

- (5)印の所まで分離ゲルを流し込んだあと, 30 分静置しゲルを固めた.
- (6)濃縮ゲルを作製した.

以下の溶液を 50 ml チューブに入れ, よく混ぜた.

滅菌蒸留水	1550 μ l
2 M Tris-HCl (pH6.9)	750 μ l
30 % アクリルアミド	400 μ l
10 % SDS	60 μ l
0.5 M EDTA	6 μ l
10% AMPS	70 μ l
TEMED	3 μ l

- (7)分離ゲルの上に濃縮ゲルを流し込んだ後コーンをゲルに差し込んで、30分静置した。
- (9) ゲル板からクリップとチューブを外し、1×SDS-Running Buffer を泳動槽に浸した。その中にゲル板を差し込み固定した。(ゲル板一枚で流す場合は反対側に代わりの板をセットした。)
- (10) 内側に Running Buffer を流し込み、ゲルからコーンを外した。
- (11) 分子量マーカーを 4 μ l , サンプルを 10 μ l ずつ入れた。
- (12) 200 V 23 mA で流し始め、サンプルが分離ゲルに到達後、26 mA に変えて最後まで流した。
- (13) サンプルが流れ終わったら、ゲル板からゲルを切り出し、染色液に 30 分間浸した。
- (14) 染色液を除き、脱色液に 2 時間浸した。脱色液は 1 時間おきに入れ替えた。
- (15) 脱色液を除き、2 時間かけて乾燥させた。

12.リコンビナント PK の大量発現

- (1) 2 ml の LB/Kanamycin 液体培地 BL21 にトランスフォームした大腸菌をつつき 50 ml チューブに入れた。
- (2) 大腸菌を 37°C, 18 時間, 170 rpm で振盪培養した。
- (3) 培養液を 2 ml を 100 ml LB/Kanamycin 液体培地に加えた。37°C, 三時間, 110 rpm で振盪培養した。
- (4) 100 mM イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド(IPTG) を、最終濃度を約 0.5 mM とするよう添加し、16°C, 48 時間 110 rpm で培養した。
- (5) 培養した大腸菌を 3,000 rpm, 4°C, 30 分間遠心し、集菌した。
- (6) 大腸菌の重量を量り、その 5 倍量の Bug Buster Protein Extraction reagent (Novagen 社製)を加え、20 分静置した。
- (7) 13,000 rpm, 4°C, 20 分間遠心し、上清を回収した。

13.His-tag を利用したアフィニティークロマトグラフィーによるリコンビナントタンパク質の精製

- (1)10 ml カラム(ムロマチテクノス(株)東京)に 400 μ l の樹脂(Ni-NTA Super flow)を充填し、His-tag 用 Buffer A で洗浄した。
- (2) Elution Buffer, 20 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, (His-tag 用 Buffer A + Elution Buffer で作成)の Elution Buffer を 20 mM を 4 ml, 50 mM を 2 ml, 100 mM と 150 mM を各 1 ml ずつ加え溶出させた。

Elution Buffer

50 mM NaH₂PO₃

300 mM NaCl

1 M Imidazole

NaOH で pH8.0 に調節

(3)各溶出サンプルを 50 μ l ずつ取り出し, SDS sample buffer を 50 μ l 加えた. 98°C で 5 分間加熱した. このサンプルを用いて SDS-PAGE による発現と精製の確認を行った.

14. Strep-tag を利用したアフィニティークロマトグラフィーによるリコンビナントタンパク質の精製

(1) Strep-tag が付加されたリコンビナント PK は Strep-Tactin® Super flow, IBA 社を使用して精製した.

(1) 1 mL の樹脂が充填されたカラムに 4 mL の Buffer W を流した.

(2)上清を全てカラムに流した.

(3) 5 mL の Buffer W を流した.

(4) 1 mL のずつ Buffre E で PK を溶出し, これを 3 回繰り返して, PK を精製した.

(6)各溶出サンプルを 50 μ l ずつ取り出し, SDS sample buffer を 50 μ l 加えた. 98°C で 5 分間加熱した. このサンプルを用いて SDS-PAGE による発現と精製の確認を行った.

(7) カラムの再生のため Buffer R を 6 ml 加え樹脂を再生した.

(8)Buffer W を 2 ml 加え溶出させ, 下のキャップをしめ, Buffer W を 2 ml 加え, 4°Cで保存した.

15.酵素活性の測定

(1) PK が溶出したと考えられる画分は 280 nm の吸光度を測定し, 酵素の存在と濃度を測定した.

(2)活性測定用溶液の作製を行った.

< Mixture > (10 本分)

100 mM Tris-HCl (pH8.0)	6500 μ l
750 mM KCl	500 μ l
250 mM Magnesium Acetate	500 μ l
100 mM ATP (100 mM Imidazole-HCl pH 7.0 溶液を用いて作製)	500 μ l
25 mM Phosphoenolpyruvic	500 μ l
5mM NADH (100 mM Tris-HCl pH 8.0 溶液を用いて作製)	500 μ l
PK/LDH Mixture	500 μ l
Total	9.5ml

また、1.5 ml チューブに以下の組成で PK/LDH Mixture を作製した。

< PK/LDH Mixture >(20 本分)

100 mM Imidazole-HCl(pH7.0)	1000 μ l
Pyruvate kinase	21 μ l
Lactatedehydrogenase	15 μ l
<hr/>	
Total	1036 μ l

(3) 活性測定用溶液を 950 μ l ずつ 1.5 ml チューブに分注した。

(4) 分注したチューブにで精製した PK を 50 μ l を加えた。

(5) (4)のチューブを 25°Cの恒温槽で 3 分間加温し、基質であるグアニジド化合物溶液を 50 μ l 加えた。

(6)の溶液をすぐにセルに移し、340 nm の吸光度を測定した。

(7) 反応速度パラメーターはまず本研究室の宇田が作製した Excel テンプレート (Uda et al. 2007)を使用して求めた後、Sigma Plot 12 と Enzyme kinetic software (Dr. R. Viola 1994) を用いて酵素パラメーターとグラフを作成した。

付録 2

遺伝子合成時に使用したプライマー

Table 1 *Anophryoides haemophila*-AK オーバーラップ用プライマー

Anophryoides haemophila-AK primer 1	AACATATGGGTTGTGGTAAATCTAGCGATAAAGCGGGTGAAC
Anophryoides haemophila-AK primer 2	GTCCAGGATTTTAGAAACACGCGCCTGGTCAGAGGACGCCGGTTCACCCGCTTTATCGCT
Anophryoides haemophila-AK primer 3	GCGTGTCTTCTAAAATCCTGGACATCAAAAAACGCAGCCGCAGAATTGCATGGCGCAGGC
Anophryoides haemophila-AK primer 4	TTGCAGTTCGCGGGTTCAGGGAGTCGTAAAATTCTTTAGTGAAGGCCTGCGCCATGCAATT
Anophryoides haemophila-AK primer 5	TGACCCCGGAAGTCAAGCGCGTCTCCTGAAATGCTGTATCAGCGGTATTGAAAACCCCTG
Anophryoides haemophila-AK primer 6	TAGTCATCCGGTTGATTGCGGTAGCAGCCATAATAGAGTCAGGGTTTTCAATACCGCTG
Anophryoides haemophila-AK primer 7	GCGAATCAACCGGATGACTATGATAAACTGGGTACGTTCTTCAATCGTGCGCTGGAACAA
Anophryoides haemophila-AK primer 8	GTTATTGATATGTTTGGTTTTGGTGAGGTCAACCTTATGATATTGTTCCAGCGCACGATT
Anophryoides haemophila-AK primer 9	TCACCAAACCAAACATATCAATAACTGGTCTCTGGAAGGTGTTGAAGGTATCCCGGAAG
Anophryoides haemophila-AK primer 10	GAGCTGGGAGGCCGAGTTTTTCCAGGTCCAGTTGGCCGTCTTCCGGGATACCTTCAACAC
Anophryoides haemophila-AK primer 11	CTCGGCCTCCAGCTCTGTCTATGCGCGTTCGCACCGGCCGTAACCTGAACAAATACCCT
Anophryoides haemophila-AK primer 12	ATATTGACACGGTCCGCTGGGTTCATCGCCGCAGGGAGAGGGTATTTGTTACGGTTACGG
Anophryoides haemophila-AK primer 13	AGGCGGACCGTGTCAATATGGAGAAGGACCTGAAAGCGGTGTTGACTCTCTGGCGGCGA
Anophryoides haemophila-AK primer 14	ATGACCCGGGGTAATAGAAACGTAATACCACCGAAGTCCGGATTCGCCGCCAGAGAGTC
Anophryoides haemophila-AK primer 15	GTTTCTATTACCCCGGGTTCATGAGAATTCATTAACGAAGCAGAATACCAGGAATACGTG
Anophryoides haemophila-AK primer 16	GAGTCTTTGCTCATGTCTTTGAACATAATGTGTTTGTCCACGTATTCCTGGTATTCTGCT
Anophryoides haemophila-AK primer 17	TTCAAAGACATGAGCAAAGACTCTTTCCTCCTGACCGCGGGTATCGCCCAAGATTGGCCG
Anophryoides haemophila-AK primer 18	ATGATGAAACCCGCGTCTTCAGACACGTAACAACCACGACCATGCGGCCAATCTTGGGCG
Anophryoides haemophila-AK primer 19	AAGACGCGGGTTTCATCATCTGGGTTGGCGAGGAGGATCACCTGCGTATCATGGCGATGC
Anophryoides haemophila-AK primer 20	TTTTGAGACGGTCGAAAACCTTGTGAGCAGAGTGCCTTCTGCATCGCCATGATACGCA
Anophryoides haemophila-AK primer 21	AAAGTTTTCGACCGTCTCAAAGCGCAATCAACGTCGTCGAAGACCTCATCCCAGGTGGC
Anophryoides haemophila-AK primer 22	TTGGGCAAGAGGTAACCACACCGATGGTTTCAGATTCGCGCAGCCACCTGGGATGAGGT
Anophryoides haemophila-AK primer 23	GTGGTTACCTCTTGCCCAACCAACGCGGGCACTGGTATGCGTGCGAGCGTTCACATTCT
Anophryoides haemophila-AK primer 24	TTTCGCTTTCGCGTCGGTACCATCCTTGGTCAGGTTTGGCAGAGGAATGTGAACGCTCGC
Anophryoides haemophila-AK primer 25	CCGACGCGAAAGCGAAAGAAGTGTGCCGTCCGCTGGGTCTGTCTGTACGTGGTCTGGGTG
Anophryoides haemophila-AK primer 26	GATGTCTACCGTACCGTCAGCACCGATCGCGGTGTGCTCACCACCCAGACCACGTACAGA
Anophryoides haemophila-AK primer 27	CTGACGGTACGGTAGACATCTCTCCGTCTGCCGTTTTTGCATCTCTGAGGCGGAGATCA
Anophryoides haemophila-AK primer 28	TTCTTCTTCAGCAGTTGCAGACCTTTGTACAGAGCAACGATGATCTCCGCTCAGAGAT
Anophryoides haemophila-AK primer 29	TGCAACTGCTGAAGGAAGAAGAGGATAAGGCTGGTGCGGAACAGTGGTCTCATCCGCAAT
Anophryoides haemophila-AK primer 30	TTAAGCTTTTATTTTTCGAATTGCGGATGAGACCACTG

下線はプライマー1では*Nde* I , 最後のプライマーでは*Hind* IIIの制限酵素サイトを示す

Table 2 *Monosiga brevicollis*-AK オーバーラップ用 プライマー

Monosiga brevicollis-AK primer 1	AACATATGGGTGGCTGCGTTCGGTCTAAGACCGCCCAAG
Monosiga brevicollis-AK primer 2	GGAGCGGCGCAGAAGACTGTTTAACAGCGGCTGCGGTACCCGCTTGGGCGGTCTTAGACG
Monosiga brevicollis-AK primer 3	TCTTCTGCGCCGCTCCCAGATGACCCGACCGTTCGTA AAAATCCTCGAAGTTCGTGAATCT
Monosiga brevicollis-AK primer 4	ATCAACATCGAAGTGT TTTGCCATACGATTACCTGGGTGAGATTCACGA ACTTCGAGGAT
Monosiga brevicollis-AK primer 5	GGCAA AACTTCGATGTTGATTACTATCTGAGCCTGTCTGATGACGACAAGAAAGCGCT
Monosiga brevicollis-AK primer 6	CAGAGTCACCATTGTCAATACCGCTCTGGCAGCATTTGATCAGCGCTTCTTGTCTCAT
Monosiga brevicollis-AK primer 7	GGTATTGACAATGGTGACTCTGGTATGGGTTGTTATGCGATGCAACCGGCTGACTACGAC
Monosiga brevicollis-AK primer 8	GTGGTAGTCCGCCAGA ACTTTAGAGAAAAAAGGTTTGAAGCGGTTCGTAGTCAGCCGGTTG
Monosiga brevicollis-AK primer 9	AGTTCTGGCGGACTACCACAAAGTTGGCGAAGATGCTAAACACACCAACA ACTGGGACCT
Monosiga brevicollis-AK primer 10	GGTCCAGACGGCCATCTGCAGGCAGACCTTCAACACCAGAGAGGTCCAGTTGTTGGTGT
Monosiga brevicollis-AK primer 11	AGATGGCCGTCTGGACCTGGCTGCACTGGGTCTCCCAGCCCTGTCCATGCGTGTTCGTGT
Monosiga brevicollis-AK primer 12	GTCATCGCACCCGGCAGCGGGAAGTCTGCGAGATTGCGACCGACACGAACACGCATGGAC
Monosiga brevicollis-AK primer 13	TGCCGGGTGCGATGACCAAAGACGACCGTGTTAACCTGGAAAAGAAAATGTGCGAAGCGT
Monosiga brevicollis-AK primer 14	AACCACCACCGTACTCCGGCATCGCTTTGAGTTTGTGCAACGCTTCGCACATTTCTTTT
Monosiga brevicollis-AK primer 15	CGGAGTACGGTGGTGGTTACA ACTCCCTCACCCCTGACCACCCGGATCACATTTCTGAGG
Monosiga brevicollis-AK primer 16	TTGAACATGATGTGGTCTTTAACGAGCTGGCGGTACGCTTCTCAGAAATGTGATCCGGG
Monosiga brevicollis-AK primer 17	CGTTAAAGACCACATCATGTTCAAAGACATGGCAGGATCCTTATCTGGCGTCTGCTGG
Monosiga brevicollis-AK primer 18	AAACATAGCAACCACGACCATA CGGCCAGTCCGCTGCAATACCAGCAGACGCCAGATAAG
Monosiga brevicollis-AK primer 19	ATGGTCGTGGTTGCTATGTTTCTGAAGACCGTGGTTTTATCATTGGGTTCGGTGAAGAAG
Monosiga brevicollis-AK primer 20	GAACGGTACCTTTGCGCATGCACATGATACGCAGGTGATCTTCTTACCGACCCAAATGA
Monosiga brevicollis-AK primer 21	TGCGCAAAGGTACCGTTCTGAACGAAGTTTTCGACCGTCTCAAACGGCCCTGGACGTTG
Monosiga brevicollis-AK primer 22	GTAGTCTGGAGACATAGCGAAAGACGGACCCTCGATACCGTTAACACGTCAGGGCCGT
Monosiga brevicollis-AK primer 23	TTCGCTATGTCTCCAGACTACGGTGTCTTACCTCTTGCCCGACCAACCTCGGTACGGGT
Monosiga brevicollis-AK primer 24	CAGCGGTCAGGTTTGGGAGGCCGATGTGAACAGACGCACGCATACCCGTACCGAGGTTGG
Monosiga brevicollis-AK primer 25	CCCAAACCTGACCGCTGACGGTACTGACGCGAAAGCGAAGGAAGTTTGCCGTCCACTCGG
Monosiga brevicollis-AK primer 26	ACCAATAGGAGTGTGCTCACCGCCGATACCACGTACAGAGAGACCGAGTGGACGGCAAAC
Monosiga brevicollis-AK primer 27	GTGAGCACACTCCTATTGGTGAAGGTGGCGTGTGCGACATCTCTCCGAGCGCGCTTTT
Monosiga brevicollis-AK primer 28	GATGCCCGTATAGAGCGCCGTGATGATCTGCGCTTCGGTGTGCAAAAACGCGCGCTCGG
Monosiga brevicollis-AK primer 29	GCGCTCTATACGGGCATCAA ACTGCTGAAAGAAGAGGAAGATAAAGCAGGTAGCGCGTGG
Monosiga brevicollis-AK primer 30	TTAAGCTTTTATTTTTCGAACTGCGGATGAGACCACGCGCTACCTGCT

下線はプライマー1では*Nde* I , 最後のプライマーでは*Hind* IIIの制限酵素サイトを示す

Table 3 Pseudocohnilembus persalinushe-AK オーバーラップ用 プライマー

Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 1	<u>AACATATGGGTTGCGGTA</u> ACTCCACCGATAAAGCGGG
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 2	AGGATCTTTTTAACCTTAACTTCGTCAGACTGACCCGGTTGACCCGCTTTATCGGTGGAG
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 3	ACGAAGTTAAGGTTAAAAAGATCCTGGACATCAAGAAGAAATATCCGGGTAACATCATGG
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 4	GACAGAGAGTCGTAATATTCTTGGTGAAAGACTGCGCCATGATGTTACCCGGATATTTTC
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 5	CAAGGAATATTACGACTCTCTGTCTCCGGAAGTGC AAAAGCGCCTGCTCAAATGCTGTCA
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 6	CGTAACAGCCCATCTGAGAGTCAGGGTTGTCAATACCGCTCTGACAGCATTTGAGCAGGC
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 7	CTCTCAGATGGGCTGTTACGCGTGCCAGCCGCTGACTACGATGACCTGAAAACGTTCTT
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 8	TTCAGATCAACTTTGTGGTATTTTTTCGAGTGCAGACTGGAAGAACGTTTTTCAGGTCATCG
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 9	AAAAATACCACAAAGTTGATCTGAACGAGAAAAAACACGTTAACAACCTGGGACTTCTCTG
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 10	CAGGTCCAGTACACCGCTTTCCGGCAGACCTTCCACACCAGAGAAGTCCCAGTTGTAAAC
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 11	AGCGGTGTA CTGGACCTGGCCGAAGTGGCCTCCCAGAAGTGTCCATGCGTGTTCGCACC
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 12	TAGACATAGACGCTGGCAGTGGGTA CTCTTCAGGTTACGACCGGTGCGAACACGCATGG
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 13	ACTGCCAGCGTCTATGTCTAAGGATGACCGTATCAATCTGGAGAAAGACATGAAAGGTGC
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 14	TTACCACCGAATTCGGGTTAGAGATCAGATTTTCGAACGCACCTTTTCATGTCTTTCTCC
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 15	ACCCGGAATTCGGTGGTAAATACGTTTCTATCACCCCTGGCCACGAAAACCTTCATCGACG
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 16	AACATGATATGGTCATCTACCAGTTTCTGATATTCTTTTCGCGTTCGATGAAGTTTTCGTGG
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 17	ACTGGTAGATGACCATATCATGTTCAAGGATATGAGCAAAGACTCTTACCTGCTGACCGC
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 18	ATGTAGCAACCACGACCGTGC GGCCAGTCAGCGCCGATACCCGCGGTCAGCAGGTAAGAG
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 19	CGGTGCTGGTTGCTACATCTCCGAAGACCGTGGTTTCATCATCTGGGTTGGCGAAGAGGA
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 20	G TTCAGAATGGTACCTTTCTGCATCGCCATAATACGCAGGTGATCCTCTTCGCCAACCCA
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 21	GCAGAAAGGTACCATTCTGAACAAAGTATTCGATCGTCTGAAAGCAGCGATCAAAGTCGT
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 22	AGTCCGCAGACATCGCACAGCCGCTGGAACGAGGTCTCTACGACTTTGATCGCTGCTT
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 23	TGCGATGTCTGCGGACTACGGTGTCTGTTACCTCTTGCCCCGACTAACTGCGGTACGGGTAT
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 24	TTTGGTCAGGTTCCGGCAGCGGGATGTGAACAGAGGCACGCATACCCGTACCGCAGTTAGT
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 25	CTGCCGAACCTGACCAAAGATGGTACTGACAAAAAAGCAAAGAAATCTGCAAACCACTG
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 26	GGGTGTGTTACCAACCGGTACCACGAACAGACAGACCCAGTGGTTGCAGATTTCTTTTG
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 27	CGGTGGTGAACACACCCCAATCGGTAAGGACGGCACCGTTGATATCTCCCCGTCTGCCCG
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 28	CCTTTGTACAGCGCGACGATGATTTCCGCTTCAGAAATGCAAACGGGCAGACGGGGAG
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 29	CGTCGCGCTGTACAAAGGCCTGAAACTCCTGAAAGAGGAAGAGACCAAGGCATCTAACTG
Pseudocohnilembus persalinushe-AK primer 30	TTAAGCTTTTATTTCTCGAATTGCGGGTGAGACCAGTTAGATGCCTTGGTCTCT

下線はプライマー1では*Nde* I , 最後のプライマーでは*Hind* IIIの制限酵素サイトを示す

Table 4 Chromera velia-AK オーバーラップ用 プライマー

Chromera velia-AK primer 1	AACATATGGGTAAGTCTTCTAACAACCATGGAAGCGGCAAAGCGGGTGGTATGCCGGA
Chromera velia-AK primer 2	CGTTCGGAACCGCAGCAGCGGCCTGGGCAGCGAGGGCAGATGGGTCCGGCATAACCACCCG
Chromera velia-AK primer 3	GCTGCGGTTCCGAACGTCCCGTCTATCGACGTTAAGGCGATGGCGGAGCTCGCTAAGGCT
Chromera velia-AK primer 4	TGAGATGCTTCGCAGCCTCGATTTTTGCCAGGATAGATGGTGCAGCCTTAGCGAGCTCCG
Chromera velia-AK primer 5	AGGCTGCGAAGCATCTCAACCCTGACAACCTCATGGCGAAATATTGGGACCTGGGCTACT
Chromera velia-AK primer 6	TGCAGCAGACCCAGCTGTTTGAGTTGGTTCTGAGAAGTGAAGTAGCCCAGGTCCCAATAT
Chromera velia-AK primer 7	CAGCTGGGTCTGCTGCAGATCGTTCGTTCTGGTGCAGGAGAACCCGGACTCTGGCATGGGT
Chromera velia-AK primer 8	ATTTCTTGAAGTCATCGTAGTCGGTCCGGCTGCATCGGTACATACCCATGCCAGAGTCCG
Chromera velia-AK primer 9	CGACTACGATGACTTCAAGAAATACTTTGACGAATGCATCAAGGCCTACCACAAAATCTC
Chromera velia-AK primer 10	TCCTTCAGCTCCCAAGAAGAAACGTGTTAACTTACCAGAGATTTTGTGGTAGGCCTTG
Chromera velia-AK primer 11	TCTTCTGGGAGCTGAAGGACGCCGAGGATGCGGAGGGCATTCTGCCGATGGCAAAGT
Chromera velia-AK primer 12	AGACAGCGGCTGGTTCGTCGGGAATACCGATGTTACGAACATCCAGTTTGCCATCGGCAGG
Chromera velia-AK primer 13	CGACCAGCCGCTGTCTATGCGTGTTCGTGTGGTTCGTAACCTGTCTACCTTCCCACTCCC
Chromera velia-AK primer 14	TCTGTTCCATTTAACACGGTCATCTTGGGTTCATCGCGCCTGGGAGTGGGAAGGTAGACA
Chromera velia-AK primer 15	GACCGTGTAAATGGAACAGAAAATGATCGGTGTATTTCGAAGAACTCATCAAAGACCAC
Chromera velia-AK primer 16	TTACCCGGGGTCAGAGAGTGGTAAGTACCACCGTAGTTGTGGTCTTTGATGAGTCTTTCG
Chromera velia-AK primer 17	CTCTCTGACCCCGGGTAACAAATACTCCATCGACGACAATAAGTACAACGAACTCGTTAA
Chromera velia-AK primer 18	GGTCCGCAGACATATCTTTGAACATGATGTGCGCTTTAACGAGTTCGTTGTACTTATTGT
Chromera velia-AK primer 19	TCAAAGATATGTCTGCGGACCACTACCTGATGTCCGCGGGTATCGCGAAACACTGGCCAC
Chromera velia-AK primer 20	ACGATGAAACCTTTGTCTTCGGCAACGTAGCAACCACGACCATGTGGCCAGTGTTCGCG
Chromera velia-AK primer 21	CGAAGACAAAGGTTTCATCGTTTGGGTGGCGAGGAAGATCACCTGCGTATCATGTGCAT
Chromera velia-AK primer 22	GCAGGCGGTGCAAACGTCGTTGAGGATGAAAGAGGTTTTCATGCACATGATACGCAGGT
Chromera velia-AK primer 23	CGTTTTCGACCGCCTGCGTGCAGCACTGGATCGTGTTGAAAAGCTGCTGGTTGAATCTAA
Chromera velia-AK primer 24	ATAACCGTAAGATGGAGAACGCGCAATTCACCAACTTTAGATTCAACCAGCAGCTTTTC
Chromera velia-AK primer 25	GCGTTCTCCATCTTACGGTTATGTTACCTCTTGCCCGACGAACCTGGGTACGGGCATGCG
Chromera velia-AK primer 26	TACCATCCGCGGTGAGTTTCGGCAGCTTGACGTGAACGCTCGCGCGCATGCCCGTACCCA
Chromera velia-AK primer 27	AACTCACCGCGGATGGTACCGACAAAAAAGCGAAAGCGGTCGCGAAGCCGCTCGGCCTCT
Chromera velia-AK primer 28	CGTCTTCGCCGATTGGGGTGTGTTACCACCCAGACCGCGAACGGAGAGGCCGAGCGGCT
Chromera velia-AK primer 29	CCCAATCGGCGAAGACGGTACTGTTGACATCTCTCCTTCTGCGCGCCTCATGATTAAGGA
Chromera velia-AK primer 30	GGAGTTGCAGACCTTTATAGAGTTTGCAGATGATGGTGCCTCCTTAATCATGAGGCGCG
Chromera velia-AK primer 31	ACTCTATAAAGGTCTGCAACTCCTCCGTGAAGAAGAGGGCGAAAGTTGAAGAATGGTCTCA
Chromera velia-AK primer 32	TTAAGCTTTTATTCTCGAATTGCGGGTGAAGACCATTCTTCAACTTTTCG

下線はプライマー1では*Nde* I , 最後のプライマーでは*Hind* IIIの制限酵素サイトを示す

Table 5 *Vitrella brassicaformis*-AK オーバーラップ用 プライマー

<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 1	<u>AACATATGGGTAACATCCCTTCTGACCTGATCATCAAATACATC</u>
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 2	AGTTTACGCATTTTTTACCGTACTTTTCATGGTGCATGTATTTGATGATCAGGTCAGAA
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 3	ACGGTGAAAAAATGCGTAAACTGCTCGCGGCAAAAGAAGTGTACCGTGATAACCGTATGG
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 4	CGTCGAGAGATTTCGAAGTACTGCAGGTCAAAGTGTTTAGCCATACGGTTATCACGGTACA
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 5	AGTACTTCGAATCTCTCGACGAGGACATGCAGCGTGGTCTGCTGCACCTCTGCAACTCTG
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 6	CATCGCGTAGCAACCCATAGAAGAGTCCGGGTTTTTCGATACCAGAGTTGCAGAGGTGCAG
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 7	TATGGGTTGCTACGCGATGCAGCCTGCCGATTACGACCGTTACAAACCGTTCTTCTCTAA
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 8	CGCGCTCGCGTCAACTTTGTGGTAGTCGCAGATAACTTTAGAGAAGAACGGTTTGTAACG
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 9	GTTGACGCGAGCGGACTCAGACCAACGAATGGTCTCTGGAAGGTGTTGAGGGTATCCCG
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 10	GCCGGCAGACCCAGCAGAGACAGGTCGAGTTTACCACCATCCGGGATACCCTCAACACCT
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 11	GCTGGGTCTGCCGGCTCTGTCTATGCGCGTTCGTGTAGGTCGCAACCTCGCGGACTTCCC
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 12	TTCCATGTTACGGCGATCTTCCTTGGTCATCGCACCCGGCAGCGGGAAGTCCGCGAGGTT
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 13	GAAGATCGCCTGAACATGGAAACCAAAATGTGCGAAGCCTTCGCCAAACTGATCGGTATG
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 14	GACCCGGCGTGAGAGAGTTGTAGCGACCACCGTATTCCGGCATAACCGATCAGTTTGCGGA
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 15	CTCTCTCACGCCGGGTCACAAAGACAATATCACCGACGAAGAATACAAACAGCTGGTTGC
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 16	TACGGGTCGTTCCGCATATCCTTAAACATGATGTGATCCGCAACCAGCTGTTTGTATTCT
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 17	ATGGCGAACGACCCGTACCTGGCTTCTGCGGGTATCGCCTCTGACTGGCCTTTCGGTCGT
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 18	CAACCCAGATGATGAAACCACGGTCTTCAGAAACGTAACCACCACGACCGAAAGGCCAGT
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 19	GTGGTTTCATCATCTGGGTTGGTGAGGAGGACCACCTGCGTATCATGTGCATGAAGAAGG
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 20	CGCTTTCAGACGGTCGAAGACTTCGTTACAGGACGGTACCCTTCTTCATGCACATGATACG
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 21	CTTCGACCGTCTGAAAGCGGCTCTCGATGTTGTTGAATCTATCGAAGGTCTGCAGTTCGC
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 22	TTGGTCGGGCAAGACGTAACATAGCCGTAGTCCGGAGATTTTGCGAACTGCAGACCTTCG
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 23	ACGTCTTGCCCGACCAACCTGGGTACTGGTATGCGTGCCTGTTTACATCCAGATCCCG
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 24	CAGATTTGGCTTTCGCTTCGGTGCCATCACGGGTCAGGTTCCGGGATCTGGATGTGAACAG
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 25	CGAAGCGAAAGCCAAATCTGTTTGCAAGCCGCTCGGTCTGTCTGTCCGTGGTATGGGTGG
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 26	GAGATGTCAACAGTGCCGTCCGCACCGATCGCGGTGTGTTACCACCCATAACCACGGACA
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 27	ACGGCACTGTTGACATCTCTCCGTCTGGCCGTTTCCACATCAAAGAAGCGGAAATCATCG
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 28	CTTCTCTTTCAGCAGCTTGATACCTTTGTACAGCGCAACGATGATTTCCGCTTCTTTGA
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 29	TCAAGCTGCTGAAAGAGGAAGAGGACAAGGCGGGCAAAGAATCTTGGTCTCACCTCAGT
<i>Vitrella brassicaformis</i> -AK primer 30	TTAAGCTTTATTTTTCGAACTGAGGGTGAGACCAAGATT

下線はプライマー1では*Nde* I , 最後のプライマーでは*Hind* IIIの制限酵素サイトを示す

Table 6 *Aphanomyces invadans*-PK オーバーラップ用 プライマー

<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 1	<u>AACATATG</u> TTTCGCTAAAGCGATTCGTAACA
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 2	CCAGCGTGAACGCACCAACGCCCGCAACAACGTGCGCGTTGTTACGAATCGCTTTAGCGA
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 3	GGTGCCTTACGCTGGGTATCGCGGGTGGCCTCAACCGTCCGGCGTCTGAATCTGCGTCT
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 4	AGCACGCAGACGGAGCGCAATCTCGTTGAGAGCGCTATGGGTAGACGCAGATTCAGACGC
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 5	GCTCCGTCTGCGTGCTATCGAGCAAGATCTCGGTCTGAAGTCTCCAGAGGACGGTAAACC
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 6	TTTGTGCTTCGGGGTCAGAACAGGGTAGTTGTTGTATTTTCGGTTTACCGTCTCTGGAGA
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 7	CTGACCCCGAAGCACAAATCTCTGATGGCTAAACACATCACCCCTGAAATCTACGCCAAA
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 8	GGTCGAGGGTGTAGCCGTAAGAGGTCTGGCGACCCGCCAGTTTGGCGTAGATTTACAGGGG
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 9	CGGCTACACCCTCGACCAAGCCATCCAGACCGGTATCGACACCCTCACCTCGGTGTGGG
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 10	TTCTTTGAAGGTAACGAAAGAGTCTTCGTCACCTGCAACGATGCCCACACCGAGGTGAGG
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 11	GACTCTTTCGTTACCTTCAAAGAAGTATGATGGACCCGATTATCGAAGGTTGGCACGGTTAC
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 12	TTGGTGTAGTCCAGATCAGAGTGGTGTGTTGCTTCCGGTTTGTAACCGTGCCAACCTTCG
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 13	ACTCTGATCTGGACTACACCAAAATCAAAAACGGTAACATCCCTTCTTCTTACGTTGAAT
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 14	AGGCCACGGACGCTACGACCTGCACGGATACGGGTAGATTCAACGTAAGAAGAAGGGATG
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 15	GTAGCGTCCGTGGCCTGGCGCTGCCTCCGGGCACCTCTCGTGGTGAGCGCCGTGAAGTTG
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 16	AGGTCACCCGTGAGGTTACCGAGCGCCTTAGACAGAACACGTTCAACTTCACGGCGCTCA
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 17	GTAACCTCACGGGTGACCTCCGTGGTAAATACTACCCGCTGGCGAAAATGACCAAACAAG
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 18	TCTGAAACAGGAAGTGGTTCATCGATCAGCTGCTGCTCTTCTTGTGTTGGTCATTTTCGCCA
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 19	ATGACCACTTCTGTTTCAGAAACCTGGCGGTGGCACCCCTGCTGACTAACGCTGGTGCCG
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 20	GCGTCGTTGTGGAAAATACCACGACCATCCGGCCAGTCACGAGCGGCACCAGCGTTAGTC
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 21	GGTATTTTCCACAACGACGCGAAATCTTTTCTCGTTTGGGTTAACGAAGAAGATCACATG
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 22	TCTGAACGTTACCGGTGTTTTCCATAGAGATAACACGCATGTGATCTTCTTCGTTAACCC
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 23	AAAACACCGGTAACGTTACAGAACGTTTTTCGAACGCTTCGTTTCGCGGCGTTAATGATGTAG
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 24	TCGTACATATACTCACGACCTTCCGCTTTAACAACTTTTTCTACATCATTAAACGCCGCGA
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 25	GAAGGTCGTGAGTATATGTACGACGATCACCTGGGCTTCTCTGTACCTGCCCGTCCAAT
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 26	CGGGAATTTGATCATAACAGACGCGCGCAGGCCCGTACCCAGATTGGACGGGCAGGTACA
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 27	CGTCTGTTATGATCAAATTTCCGAAACTCTCTGAAAACCTCCGACCAGTTTTACGCGCTCT
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 28	TTACCTTTAGAACCACGCGCTTGCAGGCCGAGAACGTCGCAGAGCGCGTAAAACTGGTC
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 29	GCGTGGTTCCTAAAGGTGAACACTCTCCGCCTGGTCTGGTGGCGTTTTACGACGTTTCTA
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 30	TGTACGAGTTCTACTTTCGCTGAAACCGATGCGCGCCTTGTTAGAAACGTCGTAAACGCCA
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 31	CAGCGAAGTAGAACTCGTACAGACGATGATCGACGGCGTTTGGAAACTGATTGAACCTGGA
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 32	TTTGTCCGCGATGCTCAGACCTTTTTTCAGGTCTTCTCCAGTTCAATCAGTTTCCAAC
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 33	CTGAGCATCGCGGACAAAGTTGCGAAACTGGGCGTGAAAGCGGGTGCTAAATCTTCTGGT
<i>Aphanomyces invadans</i> -PK primer 34	TTAAGCTTTTTATTTTTCAAACCTGCGGGTGAGACCAGTGACCAGAAGATTTAGCACCCG

下線はプライマー1では*Nde* I, 最後のプライマーでは*Hind* IIIの制限酵素サイトを示す

Table 7 *Albugo candida*-TK オーバーラップ用プライマー

Albugo candida-TK primer 1	AACATATGTTCCGGTAAATTCCTGCGTCAGAATGCGACCAATATCGC
Albugo candida-TK primer 2	AGAGCAAGACACCAGACCAACAGAGATCGCGCATGCACCCGCGATATTGGTCGCATTCTG
Albugo candida-TK primer 3	TGGTCTGGTGTCTTGCTCTCACGTTGTTTCTACGACGCGCCCACTCATGGCAGGAATCTCA
Albugo candida-TK primer 4	AGCGCAGACGAGTCGCGATTTACCGTAATGGTCTTTGGACTGAGATTCCGCCATGAGTG
Albugo candida-TK primer 5	GCGACTCGTCTGCGCTCTATTGAAACCCACCTGCGTGCTTCTAACGCGAAACAAAACCTCT
Albugo candida-TK primer 6	ACGATGTTTCGGGGTTCAGAACAGGGTAGTTGTTATATTGAGAGGTTTTGTTTCGCGTTAGA
Albugo candida-TK primer 7	TCTGACCCCGAAACATCGTTCTCTGATGGCTAAGCACCTCACCCCGGAAATGTACGAACG
Albugo candida-TK primer 8	GGTCCAGAGAGTAACCAGAAGAGGTACGACGGTTTTTCAGACGTTTCGTACATTTCCGGGG
Albugo candida-TK primer 9	CTTCTGGTTACTCTCTGGACCAGGCGATCCAGACCGGTATCGACACCCCGCACCTGGGTG
Albugo candida-TK primer 10	CTTTGAAGGTTTGGTAAGATTCTTCGTCACCGGCAACAACACCAACACCCAGGTGCGGGG
Albugo candida-TK primer 11	GAAGAATCTTACCAAACCTTCAAAGAAGTGTGGACCTGGTAATCGAATCTTGGCACGGT
Albugo candida-TK primer 12	GGGAGTCGATGTCAGTGCGGTGAGAGTCGGTTCGGTTTGTAACCGTGCCAAGATTCGATTA
Albugo candida-TK primer 13	GCACTGACATCGACTCCCGTAAAATCCAGGATGGTATCCTGCCGTCTCAGTACGTTATTT
Albugo candida-TK primer 14	ACAGACCACGAACAGAACGACCCGCACGATACGGGTAGAAATAACGTACTGAGACGGCA
Albugo candida-TK primer 15	CGTTCGTGTTTCGTGGTCTGTCTCTGCCACCGGGTACGAGCCGCGGTGAACGTCGCGAAGTT
Albugo candida-TK primer 16	GTCACCACGCAGATTACCCAGCGCTTTAGACAGTACACGTTCAACTTCGCGACGTTACC
Albugo candida-TK primer 17	GGGTAATCTGCGTGGTGACCTCAAGGGCAAATACTACCCGCTCTCTAAGATGACCAAATC
Albugo candida-TK primer 18	GGAACAGGAAGTGGTCTTCGATCAGCTGCTCTTCTTCAGATTTGGTCATCTTAGAGAGCG
Albugo candida-TK primer 19	CGAAGACCACTTCTGTTCCAGAAACCGGGTGGTGGTACCCTGCTGACCAATGCTGGCGC
Albugo candida-TK primer 20	GTCGTTGTGGTAAATACCACGACCATCCGGCCAGTCACGCGCAGCGCCAGCATTGGTCAG
Albugo candida-TK primer 21	CGTGGTATTTACCACAACGACGAAAAGACCTTCTGGTTTGGATCAACGAAGAGGACCAC
Albugo candida-TK primer 22	CTTTAACATCACCACCGTCTTGCATGGCGATAACACGCATGTGGTCTCTTCGTTGATCC
Albugo candida-TK primer 23	CAAGACGGTGGTGATGTTAAAGCGGTTTTTCGACCGTTTCTCTCGCGGTGTGTCCCAAGTC
Albugo candida-TK primer 24	CATCATACATATATTCAGAACCTTCGTCTTGAACAACAGACTCGACTTGGGACACACCGC
Albugo candida-TK primer 25	CGAAGGTTCTGAATATATGTATGATGAACACCTCGGCTTCGTTTGCCTTAGCCTAGCAA
Albugo candida-TK primer 26	GCAGTTTGATCATAACGGACGCGCGCAGGCCCGTACCGAGATTGCTAGGGCAAGTGCAAA
Albugo candida-TK primer 27	CGTCCGTTATGATCAAACGCGTGCCTCGCGGAACACAGCAAACGTTTACGAACTGT
Albugo candida-TK primer 28	ACTTTAGAACCACGCGCCTGGAGTTTGAATTTGTCGCACAGTTCGTAAAACAGTTTGCT
Albugo candida-TK primer 29	GCGCGTGGTTCTAAAGGTGAACACTCTCCGCCAGGCCCTGGTGGCGTTTACGACATCTCC
Albugo candida-TK primer 30	TGAACGAGCTCTACTTCAGAGTAGCCGATACGCGCTTGTGGAGATGTCGTAAACGCCA
Albugo candida-TK primer 31	CTCTGAAGTAGAGCTCGTTCAGACCATGATTAACGGTATCTGGAACTGATTGAACTGGA
Albugo candida-TK primer 32	TTTTAGAGCCAATCGGACGGTTGTGTTTCAGGTCTTCCAGTTCAATCAGTTTCCAGA
Albugo candida-TK primer 33	CCGTCCGATTGGCTCTAAAATCTTCTCTGGGTCTGTGGTCTCACCCGCAATTCGAGAA
Albugo candida-TK primer 34	TTAAGCTTTTATTTCTCGAATTGCGGGTGAG

下線はプライマー1では*Nde* I, 最後のプライマーでは*Hind* IIIの制限酵素サイトを示す

Table 8 Ectocarpus siliculosus-TK オーバーラップ用 プライマー

Ectocarpus siliculosus-TK primer 1	<u>AACATATG</u> CTGGAAACCATCCTGAACAGCGTGAAGAACATTGAAG
Ectocarpus siliculosus-TK primer 2	ACCAGCCGCTTTAGATTTAGAAAGACGTCATCAGGTCGCCTTCAATGTTCTTCACGCTGTT
Ectocarpus siliculosus-TK primer 3	TCTAAATCTAAAGCGGCTGGTGGTGGTTACGTTGACCCGGTTAGCAACTTCCCGACCCTG
Ectocarpus siliculosus-TK primer 4	GTTGAGGAGAACAGACGCCGCCAGAGAGTTGTGTTTCGGGGTCAGGGTCGGGAAGTTGCT
Ectocarpus siliculosus-TK primer 5	GGCGTCTGTTCTCCTCAACCGTCTGACCTGTACACCAAATACTGCAACTCTGTGACCTC
Ectocarpus siliculosus-TK primer 6	ATACCCGCTTGGATCGCATTATCAAAGGTGAAACCGCTAGAGGTCACAGAGTTGCAGTAT
Ectocarpus siliculosus-TK primer 7	TGCGATCCAAGCGGGTATTGATGCGCCGCACCTGGGTGTTGGTGCCGTTGCGGGCGACGA
Ectocarpus siliculosus-TK primer 8	TCGATAACAACGTCCATAAAGTCTTTGAACGTTTCGTAAGACTCCTCGTCGCCCGCAACG
Ectocarpus siliculosus-TK primer 9	GACTTTATGGACGTTGTTATCGAAGGTTGGCACGGCTACAAACCGGACGACAAGCACAAG
Ectocarpus siliculosus-TK primer 10	CTGTTCCGCGGTCAGTTTGATGTTGTTTCGCATCGATATCAATCTTGTGCTTGTCTCCGG
Ectocarpus siliculosus-TK primer 11	AAACTGACCGCGGAACAGGCGAAAAAGTTCGACCAGTACGTTATTTCTACCCGTATCCGT
Ectocarpus siliculosus-TK primer 12	CCTGGTGGCAGTGGCAGACCACGAATAGAACGACCCGCACGGATACGGGTAGAAATAACG
Ectocarpus siliculosus-TK primer 13	TGCCACTGCCACCAGGCACGAACCGTGCGCAGCGTCGTAAGGTAGAGAAACTCCTGCGTA
Ectocarpus siliculosus-TK primer 14	ATTTACCCGCCATCGCACCCGGTCATACGAGTCAGACCTTTACGCAGGAGTTTCTCTACCT
Ectocarpus siliculosus-TK primer 15	GTGCGATGGCGGGTAAATACTATCCGCTGGGTGGTATGACTGACGCAGAAGAGCAGGAAC
Ectocarpus siliculosus-TK primer 16	ACGCGGAGACGGTTTCTGAAAGAGGAAGTGGTCGTCGATGAGTTCCTGCTCTTCTGCGTC
Ectocarpus siliculosus-TK primer 17	AGAAACCGTCTCCGCGTAACGTTCTGGCGAACTGTGGCGCAGCACGTGACTGGCCGGATG
Ectocarpus siliculosus-TK primer 18	CAAACCAGGAAGTCCTTCTTGGCGTTGTGGAAGATACCACGACCATCCGGCCAGTCACGT
Ectocarpus siliculosus-TK primer 19	CAAGAAGGACTTCCTGGTTTGGGTTAACGAAGAGGATCACATGCGTGTTATCTCTATGGA
Ectocarpus siliculosus-TK primer 20	ACCAACGCGCGAAAACATTCTTAATGTTACCGCCTTGTTCCATAGAGATAACACGCATGT
Ectocarpus siliculosus-TK primer 21	TGTTTTCGCGCGTTGGTCCGCGGCTGTTGGCGAAGTTGAAAAGCGCTGAAAGCGGAAGG
Ectocarpus siliculosus-TK primer 22	GGTGCAGACGTTACCGAGGTGTTTCGTTGTACATATATTCAAACCTTCCGCTTTCAGCGC
Ectocarpus siliculosus-TK primer 23	CTCGGTAACGTCTGCACCTGCCCGTCTAACCTGGGCACGGGCTCCGCGCTTCTGTTATG
Ectocarpus siliculosus-TK primer 24	TTGTGAACACCCCAAGATTTGTACAGTTTCGGCAGTTTCAGCATAACAGAAGCGCGGAGG
Ectocarpus siliculosus-TK primer 25	CAAATCTTGGGGTGTTACAAACTGGAGGAATATTGCGACTCTCTCGGTGTCCAGGCTCG
Ectocarpus siliculosus-TK primer 26	CTCACCAGACGGACCTGGCGGAGAGTGTTTCGCCTTTCGCACCACGAGCCTGGACACCGAG
Ectocarpus siliculosus-TK primer 27	CCAGGTCCGTCTGGTGAGTTTGACATCTCTAACAAAGCGCGTATCGGCTACTCTGAAGTG
Ectocarpus siliculosus-TK primer 28	CAGACGGTCAACACCGTCGATCATCTGCTGCACCAGCTCCACTTCAGAGTAGCCGATACG
Ectocarpus siliculosus-TK primer 29	GACGGTGTGACCGTCTGATCAAGCTGGAAGAATCTCTGTGGTCTCATCCTCAGTTCGAA
Ectocarpus siliculosus-TK primer 30	TTAAGCTTTTATTTTTCGAACTGAGGATGAGACCA

下線はプライマー1では*Nde* I , 最後のプライマーでは*Hind* IIIの制限酵素サイトを示す

Table 9 *Guillardia theta*-TK オーバーラップ用 プライマー

<i>Guillardia theta</i> -TK primer 1	<u>AACATAT</u> GTCTGCGGAAGAAAAAGCG
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 2	TTACGCTGTTCTTCCAGCCATTTTTCAAATTTTGC GACTTCCGCTTTTTCTTCCGCAGAC
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 3	GGCTGGAAGAACAGCGTAAAACTCTAAACCGGACCCGAAAGACACCGAAGACTTCAAGT
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 4	GACCAGAGTGAAACGGCGGCAGTTCGGTGAAGGTGATAAACTTGAAGTCTTCCGGTGTCTT
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 5	CGCCGTTTCACTCTGGTCATCGTTCTCTGATGAGCAAAGTGCTCACCGCGGACCTCTTTG
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 6	CTGAAAGAGTAACCTTTAGAAGAGGTAATGTCTTTGTATTTGCAAAGAGGTCCGCGGTG
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 7	CCTCTTCTAAAGGTTACTCTTTT CAGCAATGCGATCCAGTGCGGTGTACTGAAGCCGCACC
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 8	GGTCGAAGCATTCTTCGTCACCCGCCGTGAAACCAACACCCAGGTGCGGCTT CAGTACAC
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 9	TGACGAAGAATGCTTCGACCTGTTCAAAGAAATTATCTATCCGATCGTAAAAGGCTGGCA
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 10	TCAGGTCGCTACGATGAGATTGAGTTTCCGGATCGAACTTATGCCAGCCTTTTACGATCG
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 11	ATCTCATCGTAGCGACCTGAACCCTCTGCACCTGAATTTTTCTCGTGAACAGCAACTGAA
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 12	GCTGCGCGAACACGGGTAGACTCAACGTATTGATCGAATTT CAGTTGCTGTT CACGAGAA
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 13	CCGTGTTTCGCGCAGCGCGCAATATCTCTGGTTTCTCTCTGCCGTGTGGCGCTACCCCTAA
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 14	CCGAACGCCTGTTTGAGCACGTTCTCGACGCCTT CACGCTCCTTAGGGGTAGCGCCACAC
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 15	GCTCAAACAGGCGTTCCGGTATGTTCCAAGGTGAACTGCGTGGTAAATACTACCCGCTCGG
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 16	GTTAGACTGCAGCATCTCCTCTTCTGCGCGGT CAGGTTACCGAGCGGGTAGTATTTACC
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 17	GAGGAGATGCTGCAGTCTAACGGTTTTCTGTTCCAGAAACCTGGTCCAGCCCAGCTGCTC
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 18	ATACCGCGATTGTCTGGCCACTGACGAGCTGCACCCGCGACTGCGAGCAGCTGGGCTGGA
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 19	GCCAGACAATCGCGGTATTTTCCACAACAACGAAAAACCGCGCTCGCATGGTGTAACGA
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 20	TCGCCACCCTTTTGCATAGAGATGATACGGCAGTGATCCTCCTCGTTACCCATGCGAGC
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 21	CTATGCAAAAGGGTGGCGACGTTTGGTCTGTTTTCGCGCGTTTTTGTAAAGATCTCTGACA
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 22	AGTTTTGCACCGTTTTTCTGCGCCGCTTCCGCGATGGTGT CAGAGATCTTACAAAACGC
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 23	GCAGAAAAACGGTGCAAACTCATGTATAGCGACAAGCTGGGTTTTCTGGGTACGTGCC
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 24	ACGGATCATAACAGACGCACGCAGACCCGTACCGAGGTTGCTCGGGCACGTACCCAGGAA
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 25	GTGCGTCTGTTATGATCCGTATCCCGCAGCTGAATAAAGACCCAAAGGCACTCGAAAAAG
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 26	CCAGAAGAACCACGCGGCTGCAGGTCAAACGCGTCACAACTTTTTCGAGTGCCTTTGGG
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 27	CCGCGTGGTTCTTCTGGTGAACACTCTGAAGCGGTTGGTGGTAAGTGGGACATTTCCAAT
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 28	TGAACCAGTTCAACCTCAGAAAAGCCGATACGCTGCTTATTGGAAATGTCCC ACTTACCA
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 29	TTCTGAGGTTGAACTGGTTCAGAAGATGATCGACGGTGT TACCAAGATCATCGCAATCGA
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 30	TGCATTGGAGTCATGCCTGGGTTAGCAACCAGCATTTCTTCGATTGCGATGATCTTGGTA
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 31	CAGGCATGACTCCAATGCAAGCTCTGGAGAAAGTCAAATGGAGCCATCCTCAGTTTGAGA
<i>Guillardia theta</i> -TK primer 32	TTAAGCTTTTTATTTCTCAA ACTGAGGATGGCTC

下線はプライマー1では*Nde* I ,最後のプライマーでは*Hind* IIIの制限酵素サイトを示す

Table 10 *Ophelina* sp.-TK1 オーバーラップ用primer

Ophelina sp.-TK1 primer 1	<u>ACATATGGCGGACACCTACCTGAACTACCCATCCAAGGACA</u> ACTTCCCGGACTTCTCT
Ophelina sp.-TK1 primer 2	GTTCCGGGGTCAGGTGTTTACGCAGCATAACAGTTGAAACCAGAGAAGTCCGGGAAGTTGT
Ophelina sp.-TK1 primer 3	ACACCTGACCCCGGAACTCTATGACAAGCTGTATAAGCGTAAAACCCCGAACGGTGTAC
Ophelina sp.-TK1 primer 4	CCGGTGTGTGCGCACGCCGGCTGGATAACTTTGTCCAGGGTAACACCGTTCGGGGTTTTA
Ophelina sp.-TK1 primer 5	CGTGCGACAACACCGGTTCGCATCATGGGTCTCATCGCGGGTGACGAGGAGTCTTACGAAA
Ophelina sp.-TK1 primer 6	GTTTATCATCGATAATCGCGTCGAAAATTTCTTGAAGGTTTCGTAAGACTCCTCGTAC
Ophelina sp.-TK1 primer 7	CGACGCGATTATCGATGATAAACATCAGGGTTTTGGTCCATCTGAGAAACACCCTGCACC
Ophelina sp.-TK1 primer 8	GGTCAGAGATGTCACCTTTGAGCTTAGACGCATCCAGGTCTGGTGCAGGGTGTTCCTCAG
Ophelina sp.-TK1 primer 9	TCAAAGGTGACATCTCTGACCCGAAATACATCAAATCTTGCCGTATCCGCACGGGCCGTT
Ophelina sp.-TK1 primer 10	CGTTCGGCACGGCAGATCGCAGGTGGGAAGCAAATACCCTTGAGAGAACGGCCCGTGC
Ophelina sp.-TK1 primer 11	TCTGCCGTGCCGAACGTCGCCTGGTTGAAGCGACTATGGTTGACGCGCTGAAGGGTCTGT
Ophelina sp.-TK1 primer 12	GACATACCTTTCAGCGGGTAGTACTTACCAGCCAGGTTCGCCAGACAGACCCTTCAGCGCG
Ophelina sp.-TK1 primer 13	CTACCCGCTGAAAGGTATGTCTGACAAAGACTACAACCAGCTGATTGACGACCACTTCT
Ophelina sp.-TK1 primer 14	GCAAGAGTTAACCATGAGGTGACCGGTAGGTTTTCTGGAACAGGAAGTGGTTCGTCATCAG
Ophelina sp.-TK1 primer 15	CACCTCATGGTTAACTCTTGCGCGTGCCGTGACTGGCCGGACGGTCGTGGTATCTTCCAC
Ophelina sp.-TK1 primer 16	TCTTCTTCGTTGATCCAAACCAGGAACGTTTTGTCGTTGTTGTGGAAGATAACCACGACCG
Ophelina sp.-TK1 primer 17	TGGTTTGGATCAACGAAGAAGACCACTACCGTATCATCTCTATGCAGAAAGTTCTGACG
Ophelina sp.-TK1 primer 18	GGTCAGACCGCGGCAGAAACGCTCGAAGGTTCGCTTTAACGTCAGAACCTTTCTGCATAGA
Ophelina sp.-TK1 primer 19	TGCCGCGGTCTGACCGAAATTGAAAACCTGATGAAGAAAAAAGGTCACCAGTTCATGCAC
Ophelina sp.-TK1 primer 20	ATGTTAGAAGGGCACGCACACAGGTAGCCGAAACGGTCATGGTGCATGAACTGGTGACCT
Ophelina sp.-TK1 primer 21	GTGCGTGCCCTTCTAACATTGGTACGGGTCTGCGTGCCTGTTTCATCCAACCTGCACA
Ophelina sp.-TK1 primer 22	GCAGGCATCATCGGTTCGAATTTGGATGCTTACAGAGTTTGTGCAGTTGGATGTGAACA
Ophelina sp.-TK1 primer 23	CGAACCGATGATGCCTGCTATGGGCCTCCAGGCAGCTGGTACCGGTGGCGAACATACCGC
Ophelina sp.-TK1 primer 24	CAGGCGGGCACGGTTAGAGATATCGTAAACGTCATCAACGGCAGCGGTATGTTCCGCCACC
Ophelina sp.-TK1 primer 25	AACCGTGCCCGCCTGAAAAAGACTGAACGTGAGTTCGCGCAACAGCTCATTGACGGCGTG
Ophelina sp.-TK1 primer 26	TTTACCTTCTTCCAGACGTTTTTTCCATAGCGATCAGTTTATTACGCCGTCAATGAGCTG
Ophelina sp.-TK1 primer 27	GAAAAACGTCTGGAAGAAGGTAAGAGATCGACGACCTCCTCCAGCAGGTATCCATCAT
Ophelina sp.-TK1 primer 28	TTTAGTGATGGTGGTGGTGGATGATGGATACCTGCTGGGA

下線は*Nde* I の制限酵素サイトを示す

Table 11 *Ophelina* sp.-PK2 オーバーラップ用primer

Ophelina sp.-PK2 primer 1	<u>ACATATGC</u> AGGCGTGCGACTCTTACCTGCGTTATCCTTCTAAAGACAACCTTCCCGGACTT
Ophelina sp.-PK2 primer 2	GGGGTCAGGTGCTTCTTGAGCATGCATTTAAAGCCCTCAAAGTCCGGGAAGTTGTCTTTA
Ophelina sp.-PK2 primer 3	CAAGAAGCACCTGACCCCGGAACTGTACGAAAAAATGTATAAACGTAAGACCCCGAACGG
Ophelina sp.-PK2 primer 4	GTGTTGTCACACGCCGGTTGGATAACTTTGTCCAGAGAAACACCGTTCGGGGTCTTACGT
Ophelina sp.-PK2 primer 5	CCGGCGTGTGACAACACCGGTCGCATCATGGGTCTGATCGCGGGTGACGAGGAGTCTTAT
Ophelina sp.-PK2 primer 6	TGTCGTCGATAATCGCGTCGAAAATCTCTTTGAAGGTTTCATAAGACTCCTCGTCACCCG
Ophelina sp.-PK2 primer 7	GACGCGATTATCGACGACAAACACCAGGGTTTTGGTCTGCGGAAAAACACCCAGCCCCG
Ophelina sp.-PK2 primer 8	TCGGGTGAGAGATGTCACCCTGGAGTTTATTCGCGTCCAGGTCCGGGGGTGGGTGTTTTT
Ophelina sp.-PK2 primer 9	GGTGACATCTCTGACCCGAAATACATCAAATCTTGCCGTATTCGTACGGGTGCTCTCTC
Ophelina sp.-PK2 primer 10	ACGTTCCGCACGGCACATCGCAGGCGGGAAGCAGATACCCTTGAGAGAGCGACCCGTACG
Ophelina sp.-PK2 primer 11	TGCCGTGCGGAACGTCGCTCTGGTTGAAAAACTATGGCGGACGCGCTGCAGGGCCTGTCT
Ophelina sp.-PK2 primer 12	TCAGACATACTTTTCAGCGGGTAATACTTGCCAGCGAGATCACCAGACAGGCCCTGCAGC
Ophelina sp.-PK2 primer 13	CCGCTGAAAGGTATGTCTGACAAAGACTACAACCAGCTCATTGACGATCACTTCCTGTTT
Ophelina sp.-PK2 primer 14	GCGTTAGAGTTCATCATGAGGTGGCCGGTCGGTTTTCTGAAACAGGAAGTGATCGTCAATG
Ophelina sp.-PK2 primer 15	ACCTCATGATGAACTCTAACGCGGCTCGCGACTGGCCGGACGGTCGCGGTATTTCCACA
Ophelina sp.-PK2 primer 16	GTCTTCTTCGTTGATCCAAACGAGGAAGGTCTTGTCGTTGTTGTGGAAAATACCGCGACC
Ophelina sp.-PK2 primer 17	CGTTTGGATCAACGAAGAAGACCACTACCGTATCATCTCTATGCAGAAAGTTCTGACGT
Ophelina sp.-PK2 primer 18	TCGGTCAGACCACGGCAGAAACGCTCGAAAGTCGCTTTAACGTCAGAACCTTTCTGCATA
Ophelina sp.-PK2 primer 19	GCCGTGGTCTGACCGAGATCGAAAACCTGATGAAGAAAAAGGGTCACCAATTCATGCATC
Ophelina sp.-PK2 primer 20	ATGTTAGACGGACAAGCGCACAGGTAACCGAAACGTTTCGTGATGCATGAATTGGTGACCC
Ophelina sp.-PK2 primer 21	GCGCTTGTCCGTCTAACATCGGTACTGGCCTGCGTGCCTGTGTACACATCCAGCTCCATA
Ophelina sp.-PK2 primer 22	CCGGCATCATCGGTTTCGAATTTGGGTGCTTACACAGTTTATGGAGCTGGATGTGTACAG
Ophelina sp.-PK2 primer 23	CGAACCGATGATGCCGGCGATGGGCCTGCAAGCGCGTGGTACCGGTGGCGAACACACCGC
Ophelina sp.-PK2 primer 24	TGAGACGCGCACGGTTAGAGATATCATAAACATCGTCCACCGCTGCGGTGTGTTGCCAC
Ophelina sp.-PK2 primer 25	TAACCGTGCGCGTCTCAAAAAGACCGAACGTGAATTTGCGCAGCAGCTGATTGACGGTGT
Ophelina sp.-PK2 primer 26	TTACCTTCTTCCAGACGCTTTTCCATCGCAATCAGTTTGTTCACACCGTCAATCAGCTGC
Ophelina sp.-PK2 primer 27	AAAGCGTCTGGAAGAAGGTAAAGAAATCGATGACCTGCTCCCTGCTGGCATCCATCACCA
Ophelina sp.-PK2 primer 28	TTAATGATGATGGTGGTGATGGATGCCAGCA

下線は*Nde* I の制限酵素サイトを示す

Table 12 *Ophelina* sp.-CK オーバーラップ用primer

Ophelina sp.-CK primer 1	<u>ACATATGCCGGGTAACGAAAACCAGAAAACTTTAAGGCGGAAGAAGA</u>
Ophelina sp.-CK primer 2	CGCCATCCAGTTGTTGTGTTGGTCAGATCCGGAAAATCTTCTTCCGCCTTAAAGTTTTT
Ophelina sp.-CK primer 3	ACACAACAACCTGGATGGCGAATGTTCTGACCCCGGAAATCTACGCGAAATACCGTGACGT
Ophelina sp.-CK primer 4	GTCTGGATGCACTGATCGAAGCTCACACCGTTCGGGGTGGTAACGTCACGGTATTTCGCG
Ophelina sp.-CK primer 5	TTCGATCAGTGCATCCAGACTGGCGTTGACAACCCTGGCCATCCGTTTCATCTACACCGTA
Ophelina sp.-CK primer 6	GAAAACCTCGTAAGATTCTTCGTCACCTGCAACGCAACCTACGGTGTAGATGAACGGATG
Ophelina sp.-CK primer 7	ACGAAGAATCTTACGAGGTTTTCAAGGACTTCTTTGATCCGGTTATCGACAAGCGCCACG
Ophelina sp.-CK primer 8	AGTCCAGGTTCGGTTTTATGTTTAGCGTCAGGGCCATAACCACCGTGGCGCTTGTCGATAA
Ophelina sp.-CK primer 9	AACATAAAACCGACCTGGACTTCAACAACCTGAAAGGTGGTCAGCTGGACGAGAAATACG
Ophelina sp.-CK primer 10	CCTTTGATGGAGCGACCAGTACGGACACGAGAAGACAGAACGTATTTCTCGTCCAGCTGA
Ophelina sp.-CK primer 11	CTGGTCGCTCCATCAAAGGTCTGTCTCTGCCGCCACATTGTTGCCGTGCTGAACGTCGCG
Ophelina sp.-CK primer 12	ACCAGACAGAGAGTCGAGCGCGGTGGTCGCGATGCGTTCAACAGCGCGACGTTTCAGCACG
Ophelina sp.-CK primer 13	GCTCGACTCTCTGTCTGGTGAGTTCTCTGGTAAATACTACCCGCTGTCTAAAATGACGGA
Ophelina sp.-CK primer 14	AAACAGGAAGTGGTCGTTGATGAGCTGGTCCTGTTCTTCCGTCATTTTAGACAGCGG
Ophelina sp.-CK primer 15	ATCAACGACCACTTCCTGTTGATAAACCGGTCTCTCCGCTGCTGACTTGCGCAGGCATG
Ophelina sp.-CK primer 16	CGTCGTTGTGCCAGATACCACGAGCGTCCGGCCAGTCACGCGCCATGCCTGCGCAAGTCA
Ophelina sp.-CK primer 17	GGTATCTGGCACAACGACGCCAAAACCTTCCTGGTTTGGGTAAACGAGGAAGATCACCTC
Ophelina sp.-CK primer 18	TGACCAATGTTGCCACCCTTCTGCATAGAGATAACACGGAGGTGATCTTCTCCTCGTTTACC
Ophelina sp.-CK primer 19	GGGTGGCAACATTGGTCAAGTATTCCAGCGTTTTTTGCGAAGGCCTGACGAAAGTTGAAGA
Ophelina sp.-CK primer 20	TTCGTTCCACATGTAAGTACTGCGCACCTTGTTTTTTCATCGCTTCTTCAACTTTCGTCAGGCC
Ophelina sp.-CK primer 21	CGCAGTACATGTGGAACGAACACCTGGGTTACGTCCTGACCTGCCCGTCTAACCTGGGCA
Ophelina sp.-CK primer 22	GCCAGGTTCCGGCAGTTTAAACGTGAACACCAGCGCGCAGACCAGTGCCCAGGTTAGACGGG
Ophelina sp.-CK primer 23	AAACTGCCGAACCTGGCGAAAGATGAGAAGCAGCTCGACGGTATCCTGGAGAAACTGCGT
Ophelina sp.-CK primer 24	TAGACGCGGTGTCTACGCCACCGGTACCACGTTTCTGGAGACGCAGTTTCTCCAGGATAC
Ophelina sp.-CK primer 25	GCGTAGACACCGCGTCTACCGATGGTACCTACGACATCTCTAACGCGGATCGTATTGGTT
Ophelina sp.-CK primer 26	CGCCATCTACTACGAACTGCAGCAGTTCCTACTCAGAGAAACCAATACGATCCGCGTTAG
Ophelina sp.-CK primer 27	GCAGTTCGTAGTAGATGGCGTTAACCTGCTGGTGGAAATGGAAAAGAAGCTGGAGGCGGG
Ophelina sp.-CK primer 28	TTTAGTGATGATGGTGGTGTGCGGATTAGACGCTTACCCGCTCCAGCTTCTT

下線は*Nde* I の制限酵素サイトを示す

Table 13 *Ophelina* sp.-MiCK オーバーラップ用primer

Ophelina sp.-MiCK primer 1	<u>ACATATG</u> CGTAACTGGACCAGCA
Ophelina sp.-MiCK primer 2	GGTCCGGATAGTTGCAAGACGCCGGGTATTTACAGGTGCGCGTTGCTGGTCCAGTTACGCA
Ophelina sp.-MiCK primer 3	GTCTTGCAACTATCCGGACCTGTCTCAGCACAACTACTATGGCGGACTGCCTGACCCC
Ophelina sp.-MiCK primer 4	AACCGTTTGGGGTAACTTTGTACAGCAGATTACCGTAAATCTTCGGGGTCAGGCAGTCCG
Ophelina sp.-MiCK primer 5	ACAAAGTTACCCCAAACGGTTTCACCCTGGACATGTGCATCCAAACCGGCGTTGACAACC
Ophelina sp.-MiCK primer 6	TCACCCGCGACGATACCGCAGGTGCTGATAAACGGGTGGCCAGGGTTGTCAACGCCGGTT
Ophelina sp.-MiCK primer 7	GGTATCGTCGCGGGTGACGAAGAATCTTACGAAGTTTTTCGCTGAGCTGTTTGACCCGATC
Ophelina sp.-MiCK primer 8	GTTTATCGTTCGGACCGTAACCACCGTGTTTCGCCGCGATGATCGGGTCAAACAGCTCAG
Ophelina sp.-MiCK primer 9	GTTACGGTCCGAACGATAAACATCCGACTGACCTGGATGCGTCTAAACTGCGCGGTGGTC
Ophelina sp.-MiCK primer 10	CGGTACGAACACGAGAAGACAGAACGTATTTAGGGTCGAAGTGACCACCGCGCAGTTTAG
Ophelina sp.-MiCK primer 11	GTCTTCTCGTGTTTCGTACCGGCCGTTCTATCCGTGGTCTGACCCTGCCACCAGCTTGCTC
Ophelina sp.-MiCK primer 12	AGCCTCAGATAACAACACGCTCAACTTCACGACGTTCCGCGCGAGAGCAAGCTGGTGGCAG
Ophelina sp.-MiCK primer 13	GCGTGTTGTATCTGAGGCTCTGGCGGAGCTCGACGGTGAATTTAACGGTAAATACTACCC
Ophelina sp.-MiCK primer 14	GTTTGTCTGTTCCGCCTCGGTCATTTTGGCCAGCGGGTAGTATTTACCGTTAAATTCAC
Ophelina sp.-MiCK primer 15	GAGGCGGAACAGGACAAACTGATTGAAGATCATTTCTCTTCGACAAGCCGGTCTCCCCG
Ophelina sp.-MiCK primer 16	CGTGCGTCCGGCCAGTCACGCGCCATAACCAGAAGCCAGCAGCAGCGGGGAGACCGGCTTG
Ophelina sp.-MiCK primer 17	TGGCCGGACGCACGTGGCATCTTCCACAATGACAAGAAGAACTTCTGGTTTGGGTAAAC
Ophelina sp.-MiCK primer 18	CCCTTCTCCATAGAGATAACACGGGTATGGTCTCTCGTTAACCCAAACCAGGAAGTTC
Ophelina sp.-MiCK primer 19	CGTGTTATCTCTATGGAGAAGGGTGGTAACATGAAAGCCGTATTCGAGCGTTTTTGCGCG
Ophelina sp.-MiCK primer 20	CCCAGCCTTTTTGTTTGATTTTGCCTTCCACTTTGTTTCAGACCCGCGCAAAAACGCTCGA
Ophelina sp.-MiCK primer 21	CAAAATCAAACAAAAGGCTGGGAATTTATGTGGAATAGCCACCTGGGTTATGTTCTCAC
Ophelina sp.-MiCK primer 22	ACGCCCGCACGGAGGCCAGTGCCCAGGTTGGTTCGGGCAGGTGAGAACATAACCCAGGTGG
Ophelina sp.-MiCK primer 23	CTCCGTGCGGGCGTTCACGTTAAGCTGCCGAAACTGGGTCAACACCCGAAATTTGAAAAA
Ophelina sp.-MiCK primer 24	CGGTACCACGTTTCTGCAGTTTCATTTCTTTCAGGATTTTTTCAAATTTTCGGGTGTTGAC
Ophelina sp.-MiCK primer 25	CTGCAGAAACGTGGTACCGGTGGTGTGGACACGGCAGCGGTAGGTGGTATCTTCGATATC
Ophelina sp.-MiCK primer 26	GCTGGACTTCGGATTTACCCAGGCGTTCTGCGTTGGAGATATCGAAGATACCACCTACCG
Ophelina sp.-MiCK primer 27	GGGTAAATCCGAAGTCCAGCTCGTGCAACTCGTTGTTGACGGTATCAATCGTCTGGTTGA
Ophelina sp.-MiCK primer 28	TCGTGATTTTTCTGACCTTTCTCCAGACGTTTTTCCATGTCAACCAGACGATTGATACCG
Ophelina sp.-MiCK primer 29	AGAAAGGTCAGAAAATCGACGATCTCCTGCCGCGTGGTTGCAAACATCATCACCACCATC
Ophelina sp.-MiCK primer 30	TTTAGTGATGGTGGTGATGATGTTTGC

下線は*Nde* I の制限酵素サイトを示す

付録 3

参考論文及び発表論文のリストとコピー

参考論文

- (1). Characterization of four arginine kinases in the ciliate *Paramecium tetraurelia*: Investigation on the substrate inhibition mechanism. Yano, D., Suzuki, T., Hirokawa, S., Fuke, K., Suzuki, T. *International Journal of Biological Macromolecules*. 101, 653-659, 2017.
- (2). Arginine kinase from *Myzostoma cirriferum*, a basal member of annelids. Yano, D., Mimura, S., Uda, K., Suzuki, T. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B. Biochemistry and Molecular Biology*, 198, 73-78, 2016.

発表論文

- (1). Arginine Kinases from the Precious Corals *Corallium rubrum* and *Paracorallium japonicum*: Presence of Two Distinct Arginine Kinase Gene Lineages in Cnidarians. Matsuo, T., Yano, D., Uda, K., Iwasaki, N., Suzuki, T. *The Protein Journal*. 36, 502-512. 2017.
- (2). Arginine kinases from the marine feather star *Tropiometra afra macrodiscus*: the first finding of a prenylation signal sequence in metazoan phosphagen kinases. Chouno, K., Yano, D., Uda, K., Fujita, T., Iwasaki, I., Suzuki, T. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B. Biochemistry and Molecular Biology*, 187, 55-61, 2015.
- (3). Cooperativity and evolution of *Tetrahymena* two-domain arginine kinase. Okazaki, N., Motomura, S., Okazoe, N., Yano, D., Suzuki, T. *International Journal of Biological Macromolecules*. 79, 696-703, 2015.