

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07395

研究課題名(和文) 高度好塩菌由来2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼの機能・構造解析と応用

研究課題名(英文) Function, structure, and application of extremely halophilic 2-deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase

研究代表者

櫻庭 春彦 (Sakuraba, Haruhiko)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：90205823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ(DERA)は、多様なアルデヒド分子間の縮合反応を触媒するため、抗高脂血症剤などの合成への利用が期待される。しかし通常微生物由来の酵素は、基質のアルデヒドで失活するなど、その不安定性から実用化は達成されていない。高度好塩菌の酵素はアセトアルデヒド等の有機溶媒様物質の存在下でも安定で高活性を示すことが期待できる。本研究では、高度好塩菌に新たに見出したDERAについて研究を進め、その精製法を確立し、大腸菌DERAに比べ極めて高い安定性を示すこと、超好熱菌由来DERAに比べると25℃における活性は非常に高いなど高度好塩菌DERAの有用性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：2-Deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase (DERA) catalyzes the aldol reaction between two aldehydes and is useful for the production of a variety of stereo-specific materials. However, practical application of the enzyme from a mesophilic organism such as *Escherichia coli* is still limited by its poor resistance to high aldehyde concentrations. The enzymes from extreme halophilic archaea generally retain considerable activity in organic solvents and this may overcome the problem of DERA utilization. Therefore, we overexpressed the gene encoding DERA from extreme halophilic archaeon in *Escherichia coli*. The enzyme was highly resistant to a high concentration of acetaldehyde under which *E. coli* DERA is completely inactivated. The enzyme exhibited much higher activity at ordinary temperature than hyperthermophilic DERAs. Our results suggest that the extremely halophilic DERA has high potential to serve as a biocatalyst in organic syntheses.

研究分野：応用生物化学

キーワード：高度好塩菌 アルドラーゼ 2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ アーキア 抗高脂血症剤

1. 研究開始当初の背景

2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ (DERA) は、HIV 感染の治療に用いられるアジドチミジンなど、様々な抗ウイルス剤や抗がん剤、抗高脂血症剤のビルディングブロックとなる光学活性化合物合成への利用が期待されている。スクリプス研究所の C. H. Wong らにより大腸菌 DERA を用いた各種化合物の合成が研究されているが、これまで検討されてきた常温微生物由来の酵素は、有機溶媒様物質である基質のアルデヒドで失活してしまい、十分な収率で産物を得られないため実用化は達成されていない。

我々はこれまでに、90 付近の高温環境に成育する超好熱菌に初めて DERA を見出し、その X 線結晶構造解析に成功し、高い安定性 (100、10 分の熱処理を行っても全く失活しない) に寄与する構造上の特徴を明らかにした [1]。さらに超好熱菌 DERA が、アセトアルデヒド 3 分子の縮合反応による 2,4,6-トリデオキシ-D-エリスロヘキサピラノシド (TEHP: 高コレステロール血症治療薬であるスタチンの合成前駆体として有用、**図 1** 参照) の合成においては、大腸菌由来の酵素よりはるかに生産性が優れていることを見出している (国際特開 WO2005/098012) [2]。

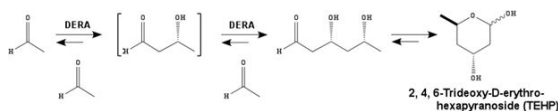


図 1 DERA によるアセトアルデヒド 3 分子の縮合反応

高濃度 (300 mM) のアセトアルデヒド存在下では、大腸菌 DERA が急速に失活するのに対し、超好熱菌 DERA が最大活性の約 50% の活性を保持できることがその要因と考えられる。しかし超好熱菌の酵素は、高温環境下では高い活性を示すが、工業利用に用いられる 25 のような常温下では大腸菌酵素の約 1/60 ~ 1/300 の活性しか持たない。実用化レベルで要求される活性を実現するには、有機溶媒耐性で、なおかつ常温でも高い活性を示す酵素の探索が急務となっていた。

2. 研究の目的

常温下、2.5 M 以上の高塩濃度環境に成育する高度好塩菌は、細胞内に 2~4 M 程度の塩を蓄積しており、その酵素は、高濃度の塩存在下のような水分活性の低い環境でのみ立体構造を維持することが可能である。そのため、異種生物において酵素遺伝子を発現させることが極めて難しい。本研究開始時、我々は、高度好塩菌 *Haloarcula japonica* 由来の DERA ホモログ遺伝子を大腸菌で発現させ、高濃度塩処理により「活性型リコンビナント酵素」を取得することに成功した。従って *H. japonica* DERA は、機能・構造解析の研究対象として非常に貴重な存在と言える。さ

らに高度好塩菌の酵素は、タンパク質分子の表層に多数の水分子を保持できるため、アセトアルデヒド等の有機溶媒様物質存在下でも安定で、常温で高活性を示すことが期待できる。これらの結果・考察を踏まえ、*H. japonica* DERA およびそのホモログの機能・構造を解析し、アルドラーゼ開発の新たな展開につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 高度好塩菌の DERA ホモログ遺伝子のクローニング、発現系の構築および産物の精製、機能解析

H. japonica DERA を Ni-キレートクロマトグラフィーおよびゲルろ過で精製した。精製酵素の基質特異性、カイネティクス、熱安定性、有機溶媒耐性等を詳細に解析した。これ以外にも高度好塩菌 *Halomicrobium mukohataei*, *Halorhabdus utahensis*, *Halorubrum lacusprofundi*, *Haloterrigena turkmenica* に存在が推定された DERA をコードする遺伝子を PCR で増幅後、大腸菌における発現系を構築した。可溶性画分に産物の発現が認められたサンプルについて、触媒活性の同定を行った。

(2) X 線結晶構造解析

酵素の結晶化条件を検討した。シッティングドロップ、ハンギングドロップを基本にして、各種沈殿剤でスクリーニングを行い、得られた結晶を用いてインハウス X 線回折装置により、回折データを収集した。

4. 研究成果

(1) 高度好塩菌 DERA を発現させた大腸菌を 2~2.5 M の NaCl 存在下で破碎し、塩存在下で精製した場合、不活性型酵素が大量に生じることが判明した。そこで、NaCl 非存在下で大腸菌を破碎、精製を行った。その後 2 M NaCl に対して透析すると、不活性型の生成が抑制された。さらに、塩存在下でゲル濾過を行い、高回収率の精製方法を開発した。高度好塩菌の酵素はイオン交換クロマトグラフィーが使用できないので、精製が困難なものが多い。本研究により高度好塩菌 DERA の高回収率の精製法を確立した。

(2) *H. japonica* DERA の酵素化学的性質を明らかにした。本酵素は 70、10 分間の熱処理後も 90% 以上の活性を保持しており、高い耐熱性を示した。また、50、30 分間の処理において pH 6.3~12.3 まで失活せず pH に対する安定性も高かった。さらにメタノール、エタノール、アセトニトリル、DMSO の有機溶媒に対しても高い安定性を持つことが判明した。

(3) 産業利用を想定して 25、300 mM アセトアルデヒド存在下での安定性評価した。その結果、5 時間の処理でも 35% の活性を保持することが明らかとなった。この条件では、大腸菌の DERA は完全に活性を失う。また超好熱菌由来 DERA に比べると、25 における活性は非常に高いことが判明した。以上の成

果は、国際誌 Protein Expression and Purification に掲載された。*H. japonica* DERA について 25、300 mM アセトアルデヒド存在下の条件で実際に TEHP 合成を評価すると、大腸菌 DERA と比較して非常に高い合成活性を示した(図2参照)。本研究は、高度好塩菌 DERA を解析した初めての例であり、高度好塩菌 DERA の有用性を始めて示すことができた。本酵素については、活性型リコンビナント酵素を取得した時点で特許出願を行っており(特願 2016-049393「アルドラーゼおよびその用途」)出願時期が 2016/3/14 となるため、下記出願状況には加えていない。

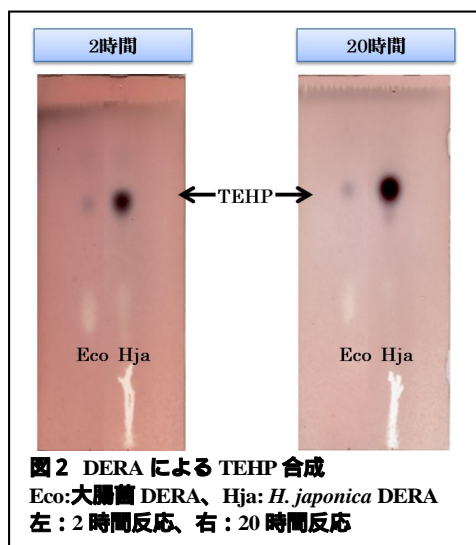


図2 DERA による TEHP 合成
Eco:大腸菌 DERA、Hja: *H. japonica* DERA
左: 2 時間反応、右: 20 時間反応

(4) *H. japonica* DERA については各種結晶化条件を検討したが、結晶が得られなかった。各種高度好塩菌の DERA について大腸菌で遺伝子発現させた中で *H. turkmenica* DERA が特に発現と酵素活性が良好であったため *H. japonica* DERA と同様の手法で精製を行い、酵素の大量取得に成功した。) 酵素溶液に含まれる NaCl を NDSB-195 (非界面活性型スルホベタイン) に置換し、結晶化スクリーニングを行い結晶化に成功した。得られた結晶を高エネルギー加速器研究機構のビームラインを用いて X 線回折実験を行った。しかし、分解能が 6 Å の反射データであったことから、構造解析には至っていない。現在、これを種結晶として結晶化条件の精密化を行い、構造解析に適した結晶の作製を進めている。

< 引用文献 >

- [1] Sakuraba, H. et al., *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 10799-10806.
- [2] Sakuraba, H. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, 73, 7427-7434.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

Yoneda, K., Sakuraba, H., Araki, T., Ohshima, T. (2018) Crystal structure of the

NADP⁺ and tartrate-bound complex of L-serine 3-dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum calidifontis*. *Extremophiles* 22, 395-405. (査読有)

DOI: 10.1007/s00792-018-1004-0

Hayashi, J., Mutaguch, Y., Minemura, Y., Nakagawa, N., Yoneda, K., Ohmori, T., Ohshima, T., Sakuraba, H. (2017) Crystal structure of the novel amino-acid racemase isoleucine 2-epimerase from *Lactobacillus buchneri*, *Acta Crystallographica section D*, 73, 428-437 (査読有)

DOI: 10.1107/S2059798317005332

Hayashi, J., Seto, T., Akita, H., Watanabe, M., Hoshino, T., Yoneda, K., Ohshima, T., Sakuraba, H. (2017) Structure-based engineering of an artificially generated NADP-dependent D-amino acid dehydrogenase, *Applied and Environmental Microbiology*, 83, e00491-17 (査読有)

DOI: 10.1128/AEM.00491-17

Kawakami, R., Sakuraba, H., Ohmori, T., Ohshima, T. (2017) First characterization of an archaeal amino acid racemase with broad substrate specificity from the hyperthermophile *Pyrococcus horikoshii* OT-3, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 73, 428-437 (査読有)

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2017.02.004

Wakamatsu, T., Sakuraba, H., Kitamura, M., Hakumai, Y., Fukui, K., Ohnishi, K., Ashiuchi, M., Ohshima, T. (2017) Structural insights into L-tryptophan dehydrogenase from a photoautotrophic cyanobacterium *Nostoc punctiforme*, *Applied and Environmental Microbiology*, 83, e02710-16 (査読有)

DOI: 10.1128/AEM.02710-16

Hayashi, J., Yamamoto, K., Yoneda, K., Ohshima, T., Sakuraba, H. (2016) Unique coenzyme binding mode of hyperthermophilic archaeal sn-glycerol-1-phosphate dehydrogenase from *Pyrobaculum calidifontis*, *Proteins*, 84, 1786-1796 (査読有)

DOI: 10.1002/prot.25161

Fukuda, Y., Sakuraba, H., Araki, T., Ohshima, T., Yoneda, K. (2016) Catalytic properties and crystal structure of thermostable NAD(P)H-dependent carbonyl reductase from the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1, *Enzyme and Microbial Technology*, 91, 17-25 (査読有)

DOI: 10.1016/j.enzmictec.2016.05.008

Ohshida, T., Hayashi, J., Satomura, T., Kawakami, R., Ohshima, T., Sakuraba, H. (2016) First characterization of extremely halophilic 2-deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase, *Protein Expression and*

Purification, 126, 62-68 (査読有)
DOI: 10.1016/j.pep.2016.05.009

大阪工業大学・工学部・生命工学科・教授
研究者番号： 10093345

〔学会発表〕(計 2 件)

大志田 達也; 林 順司; 里村武範; 川上
竜巳; 大島敏久; 櫻庭春彦(2017)高度好
塩菌 *Haloarcula japonica* 由来 2-デオキシ
リボース 5-リン酸アルドラーゼに関する
研究, 日本農芸化学会 2017 年度大会
大志田達也; 林 順司; 里村武範; 川上竜
巳; 大島敏久; 櫻庭春彦(2016)高度好塩
菌 *Haloarcula japonica* 由来 2-デオキ
シリボース -5-リン酸アルドラーゼに
関する研究, 日本農芸化学会 2016 年度
中四国支部大会

(4)研究協力者

()

〔図書〕(計 1 件)

大島敏久; 櫻庭春彦(2017)アーキア生
物学、pp 144-147

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ag.kagawa-u.ac.jp/sakuraba/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

櫻庭 春彦 (SAKURABA Haruhiko)
香川大学・農学部・応用生物科学科・教授
研究者番号：90205823

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

大島 敏久 (OHSHIMA Toshihisa)