

令和元年6月18日現在

機関番号：21401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18684

研究課題名(和文)新規D-アミノ酸分析法のためのD-アミノ酸化還元酵素のメタエンザイムの探索

研究課題名(英文) Meta-enzymatic search for D-amino acid oxidoreductases for a novel D-amino acid analysis method.

研究代表者

牟田口 祐太 (Mutaguchi, Yuta)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：30724314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では高い基質特異性と安定性を備えた新規D-アミノ酸化還元酵素を見出すことを目的とした。まず、秋田県内外の温泉土壌から、栄養源・pHを変えて好熱菌の培養を試み、10種の菌叢と84株の好熱菌株を得た。これらを対象に活性染色法による目的酵素活性の検出を試みたが、活性は検出されなかった。加えて、*Geobacillus kaustophilus*のゲノムデータベース上に見出した推定D-アミノ酸脱水素酵素遺伝子の機能解析を行った。本遺伝子の組換えタンパク質はD-プロリンを始めとする7種のD-アミノ酸に酸化還元酵素活性を示すことを見出したが、その活性は非常に低く、目的酵素の獲得には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では秋田県及びその周辺の4つ温泉の12カ所の土壌から、様々な栄養源・pHで生育する10種の菌叢と84株の好熱菌株を得ることに成功した。これまで秋田県の温泉に生息する好熱菌を生物資源として活用した研究例は殆ど無かった。よって、本研究において秋田県の温泉から様々な培養条件で生育する好熱菌を見出したことは、秋田の温泉の生物資源としての有用性を示す成果である。今後、有用酵素や生理活性物質の探索に秋田県及びその周辺の温泉から得られた好熱菌が活用されることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this work was to find a novel D-amino acid oxidoreductase with the high substrate specificity and stability. We tried to cultivate several thermophile that grow under different nutrient source and pH conditions from different hot spring soils collected in Akita and around. As a result, 10 types of thermophilic flora and 84 thermophilic strains were obtained. Using the activity staining method, we screened D-amino acid oxidoreductase activities from these thermophilic flora and strains. However, no activity detected. In addition, characterization of putative D-amino acid dehydrogenase gene (Locus tag: GK1399) found in genome database of *Geobacillus kaustophilus* was conducted. The recombinant protein expressed from this gene showed D-amino acid oxidoreductase activities for 7 types of D-amino acid. But, their activities were much lower than other D-amino acid oxidoreductase ready known. Therefore, this enzyme was not a novel D-amino acid oxidoreductase that we aimed at.

研究分野：農学

キーワード：D-アミノ酸 好熱菌 酵素分析 酸化還元酵素 脱水素酵素 酸化酵素 有用酵素 メタエンザイム

1. 研究開始当初の背景

近年の分析技術の向上により、様々な植物や動物（無脊椎動物からヒトを含む哺乳類等の高等動物）に遊離状態の D-アミノ酸が存在し、生命維持のための重要な機能を持つことが分かってきている。これを受け、D-アミノ酸を主題とした国際学会や、国際学術誌において D-アミノ酸特集が行われており、新たな研究分野として D-アミノ酸の生理機能が注目されている。

現在、D-アミノ酸の定量分析は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いた定量法が主流となっているが、この方法は高額な装置（五百～一千万円）が必要であり、D-アミノ酸分析のための環境整備が D-アミノ酸研究の普及・発展の大きな障害となっている。この問題を解決するため、D-アミノ酸を基質とする酵素を利用した定量法（酵素分析法）が検討されている。酵素分析法では、HPLC に比べ安価な分光光度計（数十～百万円）での分析が可能となる。

これまでに報告されている D-アミノ酸酵素分析法はいずれも、D-アミノ酸を一つ目の酵素でオキソ酸又は L-アミノ酸に変換した後、その生成物を基質とする酸化還元酵素（脱水素酵素や酸化酵素）の活性を測定することで間接的に D-アミノ酸を測定する方法である。このような複数の酵素を利用した方法では、検出感度と操作の煩雑さに問題点が残っている。一方、特定の D-アミノ酸に高い基質特異性を示す酸化還元酵素が利用できれば、単一の酵素による簡便かつ好感度な D-アミノ酸分析が可能となる。しかしながら、現在報告されている D-アミノ酸酸化還元酵素は多種の D-アミノ酸に対して幅広く活性を示すため、特定の D-アミノ酸分析に応用できない。また、安定性が低く、利用できる pH 域、温度が限られるため、主に医療分野での応用が困難である。このように、D-アミノ酸酸化還元酵素を用いた酵素分析の確立には、基質特異性及び安定性の高い酵素を新たに見出すことが課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では pH や熱に対する安定性が高く、特定の D-アミノ酸のみに活性を示す基質特異性の高い新規 D-アミノ酸酸化還元酵素を見出す事を目的とした。一般的に好熱菌由来の酵素は pH、熱、有機溶媒等に対する安定性が高いことが知られている。そこで本研究では、秋田県及びその周辺の温泉から好熱菌を培養し、その好熱菌から新規 D-アミノ酸酸化還元酵素を見出すことを目指した。特に哺乳類での重要な生理機能が明らかとなっている D-アスパラギン酸（D-Asp）や D-セリン（D-Ser）に対して特異的な活性を示す酵素を見出すことを目指した。さらに、環境や菌叢から菌を単離せずに、酵素活性のみを指標としてスクリーニングを行うメタエンザイム法の手法を取り入れることで、既知酵素のアミノ酸配列情報に依存せず、新規の有用酵素を見出すことを目指した。

3. 研究の方法

後生掛温泉、蒸ノ湯温泉からの好熱菌の培養

秋田県鹿角市の後生掛温泉の 3 カ所（後生掛温泉 ～ ） 同市の蒸ノ湯温泉の 3 カ所（蒸ノ湯温泉 ～ ）の計 6 カ所で、温泉土壌を採取した。採取時の土壌の温度はいずれも 43～70°C で、pH は 2.6～3.9 であった。

続いて、これらの温泉土壌を脱脂綿でろ過して砂泥を除き、培地に添加した。そして、50°C で振盪培養を行い、12 時間毎に OD660 を測定することで菌の増殖を観察した。温泉土壌から多様な好熱菌を得るため、培地の炭素源・窒素源（CN 源）濃度と pH 条件を検討した。細菌・真菌の培養に用いられる TSB 培地を基に、培地を構成する要素を、CN 源、リン酸水溶液、無機塩類の 3 つに分けて各構成要素を調節することで、3 つの CN 源濃度（1×、1/10×、1/100×

濃度)と3つのpH(pH 2.0、4.5、7.0)を組み合わせた計9つの培地条件を検討した。加えて、培地の炭素源・窒素源をD-AspまたはD-Serとし、pH(pH 2.0、4.5、7.0)条件を変えた6つの培地条件も検討した。

小安峡温泉、鬼首温泉からの好熱菌の培養

秋田県湯沢市小安峡温泉の3カ所(小安峡温泉 ~)、宮城県大崎市鬼首温泉の3カ所(鬼首温泉 ~)の計6カ所で、温泉土壌を採取した。採取時の土壌の温度は58~87°Cで、pHは7.8~8.3であった。

続いて、これらの温泉土壌を脱脂綿でろ過して砂泥を除き、ろ液を2%寒天培地に塗布した後、55°Cで培養を行った。この寒天培地での培養では、主な窒素源及び炭素源をD-アミノ酸に限定した寒天培地(D-Asp寒天培地またはD-Ser寒天培地)を用いることで、酸化還元酵素を含むD-アミノ酸代謝関連酵素を有する好熱菌の選択的な培養を試みた。3日間の培養後、D-Asp寒天培地から558株、D-Ser寒天培地から69株の好熱菌を得た。これらの株を、それぞれ窒素源を各D-アミノ酸、炭素源をグルコースとした液体培地にて培養(55°C・3日間)し、培養液中のD-アミノ酸の減少を調べることで、D-アミノ酸酸化還元酵素を有している可能性が高い株の選抜を行った。

活性染色法によるD-アミノ酸酸化還元酵素活性のスクリーニング

後生掛温泉、蒸ノ湯温泉から培養した各菌叢については1Lの培養液にて定常期まで培養後、得られた菌体をマルチビーズショッカーにて破碎し、粗酵素液を得た。小安峡温泉、鬼首温泉から得られた各菌株は200mLの培養液で3日間培養後、得られた菌体をマルチビーズショッカーにて破碎し、粗酵素液を得た。

各粗酵素液10µL分をディスクゲルによるNative-polyacrylamide gel electrophoresis(Native-PAGE)に供した後、ディスクゲルを酵素反応液に浸した。50°Cで1時間反応を行い、酸化還元酵素活性によって生じるホルマザン発色(活性バンド)を観察した(図1)。酵素反応液の組成のうち基質については、基質無し、L-アミノ酸(L-AspまたはL-Ser)、D-アミノ酸(D-AspまたはD-Ser)の3条件を検討し、D-アミノ酸を基質とした場合にのみ活性バンドが検出される粗酵素液を探索した。

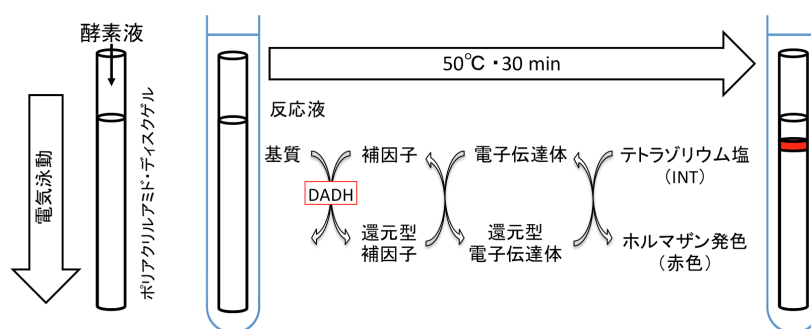


図1. 活性染色による目的酵素活性の検出

好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* 由来推定 D-アミノ酸脱水素酵素遺伝子の機能解析

本研究ではデータベースの情報に基づいた好熱菌由来 D-アミノ酸酸化還元酵素遺伝子の探索及び機能解析も行った。特に、KEGG データベースにゲノム情報が登録されている好熱菌

Geobacillus kaustophilus JCM 12893に見出された推定 D-アミノ酸脱水素酵素 (DADH) 遺伝子 (Locus tag: GK1399) の機能解析を行った。*G. kaustophilus* JCM 12893 は生育温度範囲が 42~74°C、最適生育温度が 60°C の中等度好熱菌であり、高い安定性と酵素活性を有した DADH を見出すことができると考えた。

G. kaustophilus の染色体 DNA からクローニングした目的遺伝子を大腸菌用発現プラスミド pET21a にクローニングし、pET21a_GK1399 を構築した。pET21a を発現宿主 *E. coli* BL21(DE3) に導入後、IPTG による組換えタンパク質の発現誘導処理を行った。発現誘導処理を行った大腸菌体の破碎液から、Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィーと熱処理によって目的タンパク質を高度に精製した。

この精製タンパク質を用いて DADH 活性を測定した。活性測定は、反応によって生じた還元型補因子の電子を、電子伝達体 (mPMS) を介してテトラゾリウム塩に渡し、発生するホルマザン発色を分光光度計で測定する事で行った。基質には既知の DADH の多くが活性を示す D-プロリン (D-Pro) を使用し、補因子には、本酵素のアミノ酸一次配列中に結合ドメインが保存されていた FAD, NAD, NADP の混合液を使用した。

加えて、高感度に酵素活性を検出できる活性染色法を用いて、本酵素が活性を示すアミノ酸のスクリーニングを行った。ディスクゲル電気泳動によって精製酵素を濃縮した後、ゲルをそれぞれに異なるアミノ酸を含む反応液に浸漬した。基質にはタンパク質構成アミノ酸の D 体 19 種類を含む 22 種類の D-アミノ酸とグリシンを使用し、DADH 活性によって生じるホルマザン発色の有無を確認した。

4. 研究成果

後生掛温泉、蒸ノ湯温泉からの好熱菌の培養

後生掛温泉 のサンプルからは 1/10×CN 源濃度・pH 4.5 の培地で菌の増殖を確認した。また、蒸ノ湯温泉 のサンプルからは 1×CN 源濃度・pH 4.5 の培地と 1/10×CN 源・pH 4.5 及び pH 2.0 の培地の計 3 つの培地条件で菌の増殖を確認した。蒸ノ湯温泉 と のサンプルからは、1×CN 源濃度・pH 4.5 及び pH 7.0 の培地と 1/10×CN 源濃度・pH 4.5 の培地の計 3 つの培地条件で菌の増殖を確認した。一方、培地の炭素源・窒素源を D-Asp または D-Ser とし、pH 条件 (pH 2.0、4.5、7.0) を変えた 6 つの培地条件では菌の増加は観察されなかった。以上をまとめると、後生掛温泉及び蒸ノ湯温泉の温泉土壌から、10 種の菌叢を得た。

小安峡温泉、鬼首温泉からの好熱菌の培養

小安峡温泉及び鬼首温泉の土壌からは、窒素源を D-アミノ酸 (D-Asp または D-Ser)、炭素源をグルコースとした液体培地で増殖し、且つ培養液中の D-Asp 濃度を 5% 以上減少させる株を 71 株、D-Ser 濃度を 5% 以上減少させる株を 13 株見出した。

活性染色法による D-アミノ酸酸化還元酵素活性のスクリーニング

後生掛温泉、蒸ノ湯温泉から得た 10 種の菌叢及び小安峡温泉、鬼首温泉から得た 84 株の菌株について、活性染色法による D-Asp または D-Ser を基質とした酸化還元酵素活性の検出を試みた。その結果、D-アミノ酸を基質とした場合に特異的な活性バンドを示す菌叢または菌株は無く、全ての菌叢・菌株において D-アミノ酸酸化還元酵素活性を見出すことができなかった。

小安峡温泉及び鬼首温泉の土壌からは、生育過程で培養液中の D-Asp または D-Ser 濃度を減少させる菌株が見出されていた為、D-アミノ酸酸化還元酵素の存在が期待されていた。しかし、

それらの粗酵素液の多くが、L-アミノ酸を基質とした場合と D-アミノ酸を基質とした場合の両方で同じ位置に活性バンドを示し、D-アミノ酸を基質とした場合に特異的に現れる活性バンドは観察されなかった。このことから、小安峡温泉及び鬼首温泉から得られた菌株の多くは、D-アミノ酸をラセマーゼ等の異性化酵素で L-アミノ酸とした後に、L-アミノ酸酸化還元酵素にて L-アミノ酸をケト酸とアンモニアに分解して栄養源とする代謝系を有していたと考えられる。

本研究では、秋田県及びその周辺の温泉から温泉土壌を採取し、そこから培養された好熱菌を対象として、新規 D-アミノ酸酸化還元酵素のスクリーニングを試みた。しかしながら、目的の D-アミノ酸酸化還元酵素活性を見出すことはできなかった。研究当初はタンパク質の分解物やグルコースを栄養源とした培地を用いて好熱菌を培養していたが、目的の酵素活性を得られなかった為、窒素源・炭素源を D-アミノ酸に限定した培地を検討することで、D-アミノ酸代謝関連酵素を有する好熱菌の選択培養の効率化を図った。しかし、活性染色に必要な菌体量を得るための培養と、菌体の破碎、電気泳動、活性染色の行程に時間を要し、多くの検体をスクリーニングできなかったことが、目的の酵素活性を見出すことができなかった原因と考えられる。今後は、D-アミノ酸寒天培地に形成されたコロニーに、反応液を浸透させたる紙を被せる等の処理を行い、コロニーを直接活性染色する系を構築することで、スクリーニングの更なる効率化が期待できると考えている。

好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* 由来推定 D-アミノ酸脱水素酵素遺伝子の機能解析

G. kaustophilus JCM 12893 のゲノム DNA に見出された推定 DADH 遺伝子 (Locus tag: GK1399) を大腸菌で発現させた後、高度に精製した組換えタンパク質を調製した。この精製酵素の D-Pro に対する DADH 活性を測定した結果、その比活性は $0.0053 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ であった。これは既知の DADH の D-Pro に対する活性と比較して、非常に低いものであった (約 1/25000~1/300)。

そこで、他の D-アミノ酸に対する活性を活性染色法にて調べたところ、D-Pro に加え、D-トリプトファン (D-Trp)、D-メチオニン (D-Met)、D-ロイシン (D-Leu)、D-ノルロイシン (D-Nle)、D-アミノ酪酸 (D-Abu)、D-ノルパリン (D-Nva)、グリシン (Gly) の 8 種類のアミノ酸に対して酸化還元酵素の活性を見出した (図 2)。しかし、これら 8 種類のアミノ酸に対する活性は D-Pro を上回るものではなく、非常に低いものであった。

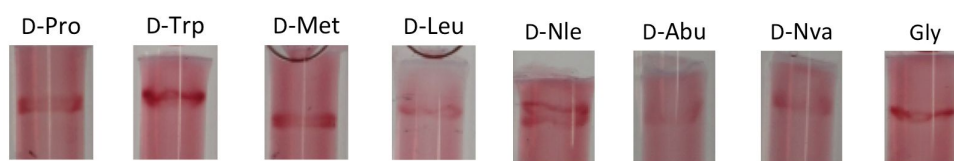


図 2. GK1399 組換えタンパク質が DADH 活性を示した基質とその活性バンド

本研究では KEGG データベース上で DADH と推定された遺伝子を対象として、その遺伝子産物の DADH 酵素活性を検討した。本酵素は D-Pro を始めとする 7 種の D-アミノ酸に活性を示すことを見出したが、その活性が非常に低かったため、本酵素が *G. kaustophilus* 内で触媒を担う化学反応の全容は不明である。原核生物における D-アミノ酸酸化還元酵素の報告例は少なく、そのアミノ酸配列の情報も乏しいため、アミノ酸配列の相同性に頼った新規 D-アミノ酸酸化還元酵素のスクリーニングは困難であることが改めて示された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- 1) 牟田口祐太、*Geobacillus kaustophilus* 由来推定 D-アミノ酸脱水素酵素遺伝子組換えタンパク質の基質特異性の検討、秋田県立大学ウェブジャーナル B、2:189-193 (2016)
- 2) Yuta Mutaguchi and Toshihisa Ohshima, Purification of a protein exhibiting isoleucine 2-epimerase activity from *Lactobacillus otakiensis* JCM 15040, Bio-protocol, 5: e1632 (2015)
- 3) 菅澤達希、牟田口祐太、*Geobacillus kaustophilus* D-アミノ酸脱水素酵素遺伝子の機能解析、秋田県立大学ウェブジャーナル B、2: 62-66 (2015)

〔学会発表〕(計3件)

- 1) 牟田口祐太、大森勇門、大島敏久、春日和、小嶋郁夫、発酵食品における乳酸菌の D-アミノ酸生産への関与と乳酸菌の D-分岐鎖アミノ酸生産、秋田応用生命科学研究会第 30 回講演会 (2017.11.24.)
- 2) Yuta Mutaguchi, “D-Amino acid productions and a novel amino acid racemase in lactic acid bacteria”, The Eighth International Conference on Materials Engineering for Resources 2017, Invited Lectures, Akita, Japan (2017.10.26.)
- 3) 牟田口祐太、春日和、小嶋郁夫、Isoleucine 2-epimerase ホモログ遺伝子をもつ乳酸菌の D-アミノ酸生産、日本農芸化学会 2016 年度大会 (2016.3.30.)

〔図書〕(計2件)

- 1) 牟田口祐太、D-アミノ酸の生産微生物と食品機能、「食と微生物の事典」朝倉書店、p148-149 (2017)
- 2) Yuta Mutaguchi, Junpei Kobayashi, Tadao Oikawa and Toshihisa Ohshima, D-Amino Acids in Fermentative Foods, *D-Amino Acids*, Springer, p 341-355 (2016)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

Researchmap: https://researchmap.jp/yuta_mutaguchi

6 . 研究組織

(1)研究分担者

無し

(2)研究協力者

無し

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。