

令和 3 年 8 月 24 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K05936

研究課題名（和文）人工マルチドメイン酵素固定化シートを用いた低コストなアゾ染料分解法の研究

研究課題名（英文）Low-cost degradation of azo dyes using the artificial multi-domain enzymes immobilized on the sheet.

研究代表者

堀内 正隆（HORIUCHI, Masataka）

北海道医療大学・薬学部・准教授

研究者番号：90322825

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）：アゾレダクターゼは、アゾ色素中のアゾ基を開裂させるNADPH依存型酵素である。補酵素NADPHは高価であることから、NADPH再生酵素であるグルコキナーゼおよびグルコース-6-リン酸脱水素酵素をアゾレダクターゼと接続したハイブリッドアゾレダクターゼを開発した。ハイブリッド酵素中の酵素ドメインの接続に、フレキシブルリンカーを導入したところ、アゾ色素の連続分解効率が向上した。分解効率向上の要因を解明するために、リアルタイムNMR法を導入し、酵素反応を原子レベルで追跡することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

代表的な合成染料であるアゾ色素は、生産コストが低いことから、さまざまな繊維の染色において大量利用されている。アゾ色素はその高い化学的安定性により、廃棄にあたっては、凝集沈殿や加温処理などの高いエネルギーコストを必要とする。

本研究では、NADPH再生酵素群をアゾレダクターゼと組み合わせ、より少量の補酵素でアゾ色素を連続分解できるハイブリッド酵素を開発した。このハイブリッド酵素をカードランシートに低コストで固定化することで、工業的な大規模利用への端緒を開いた。また、ハイブリッド酵素による複雑な補酵素再生およびアゾ色素の分解カスケードを、NMR法により精密かつ効率的に観測することにも成功した。

研究成果の概要（英文）：Azoreductase is NADPH-dependent enzyme that cleaves azo bond in azo dyes. Since NADPH is a high-cost compound, we have sequentially connected an NADPH regeneration system with glucokinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase domains to obtain a hybrid azoreductase. The degradation efficiency of azo dyes with the hybrid azoreductase was higher when the domains were connected via flexible linkers. In order to understand the mechanisms of how the linkers contribute to increasing degradation rate of azo dyes, we will track the enzymatic reaction of each domain in the hybrid enzymes using the real-time NMR method.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：アゾレダクターゼ アゾ色素 タンパク質工学 アフィニティークロマトグラフィー 固定化酵素 カードラン

1. 研究開発当初の背景

工業的に化学合成された物質の多くは自然環境中での安定性が高く、分解や廃棄のために大量のエネルギーを必要とする。代表的な合成染料であるアゾ化合物も廃棄にあたって凝集沈殿や加温処理が必要であり、処理物を埋め立て地まで輸送するコストも高くなる。もし、アゾ化合物を低エネルギーで再利用可能な物質レベルまで分解できれば、ゼロエミッションへと近づくことが可能となる。これまでに低エネルギーでアゾ染料を分解する方法として、アゾレダクターゼによる酵素的分解法が報告されている (Suzuki *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2001)。この酵素反応では、反応液に酵素とその基質以外の夾雑物がほとんど含まれず、酵素によって選択的に-N=N-結合を切断された生成物は、簡単な精製ステップでアゾ色素の合成原料として再利用できる。ただし、アゾレダクターゼによる酵素分解には高価な補酵素であるNADHあるいはNADPHのいずれかを必要とするため、高エネルギーを要する既存の廃棄法に取って代わるためには、この補酵素の再生サイクルを低コストで実現することが必須となっている。

2. 研究の目的

これまで研究代表者の堀内は、アゾレダクターゼによるアゾ化合物の酵素的分解法の開発を、アゾレダクターゼの発見者である北海道大学の鈴木定彦教授と共同で進めてきた。当初、遺伝子組換え酵素の固定化には、市販のアフィニティービーズを用いていたが、アフィニティービーズが高価なため、スケールアップはコスト的に難しかった。そこで自ら開発した低コストなタンパク質固定化システム“GRPシステム”の研究成果を進展させて、固定化アゾレダクターゼを安価に大量生産するという着想を得た (Horiuchi *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.*, 2012)。GRPシステムは、堀内らがカイコの自然免疫関連タンパク質である β -1,3-glucan recognition protein (8GRP) の構造生物学的研究 (Takahashi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009) の過程で見出したもので、8GRPのグルカン結合ドメイン (GRP-tag) を融合した組換え酵素を、固形の β -1,3-グルカン (カードラン) と特異的に結合させて固定化酵素を作製するシステムである。カードランは食品添加物 (増粘多糖類) として安価に入手できることから、従来のタンパク質固定化システムよりコスト面で大幅に勝っていることが特徴である。アルカリで溶解したカードランは、再び中和によって固化する過程で、形状を自由に調節できるという特徴をもつ。堀内はこの特徴を熟知しており、紙や布などの繊維をカードラン溶液に浸漬後に中和することで、丈夫なカードランシートを作製できることに着目した。マルチドメイン構造をもつシグナル伝達タンパク質に関する研究経験に基づき、本研究では、安価なカードランシートにアゾ化合物分解ドメインと補酵素再生ドメインをもつ人工マルチドメイン酵素を固定化し、アゾ化合物の効率的な連続分解を行うことを目的としている。

3. 研究の方法

(1) NADPH 再生系を内包するハイブリッド型アゾレダクターゼの作製 (担当: 堀内)

基質特異性の異なる文献既知の 4 種類のアゾレダクターゼ (Sugiura *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2006) および未公表の 1 種類のアゾレダクターゼの cDNA を、大腸菌用発現プラスミドにクローニングした。これらのアゾレダクターゼ (AZR) を個々に大腸菌体内で発現させ、NADPH 存在下におけるアゾ基切断活性を確認した。NADPH 再生を担う酵素ドメインには、大腸菌の解糖系酵素群を利用した。大腸菌からクローニングしたグルコキナーゼ (GLK) およびグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (ZWF) を発現させ、それぞれの活性を確認した。さらに、GLK、ZWF および AZR を、ATP、グルコースおよび NADP⁺とともにメチルレッドと反応させ、NADPH 再生系が機能し、AZR が連続的に活性化されるかどうか確認した。

NADPH 再生系を内包するハイブリッド型アゾレダクターゼ (図 1) の作製は以下のとおり行なった。まず、ハイブリッド型アゾレダクターゼ用の各酵素ユニットを大腸菌において発現させ、アフィニティークロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。次に中央ドメイン (ZWF) と C 末ドメイン (GLK) を SrtA_{Strep} で結合したのち、N 末ドメイン (AZR) を SrtA_{Staph} で結合した。プロテインライゲーション反応は、限外ろ過膜による濃縮法を用いた (Freiburger *et al.* 2015)。また、3ドメイン全てを最初から含むコンストラクトを、GRP-tag 融合タンパク質として生産した。

(2) リアルタイムNMR法によるアゾ色素の分解およびNADPH再生過程の観察 (担当: 永田)

NADPH再生酵素とアゾレダクターゼによるアゾ色素分解カスケードにおける各基質の分解を、網羅的かつリアルタイムに観察するために、その基盤情報となる、基質ごとのNMRスペクトルの経時変化を観察した。NMRによる酵素反応液中

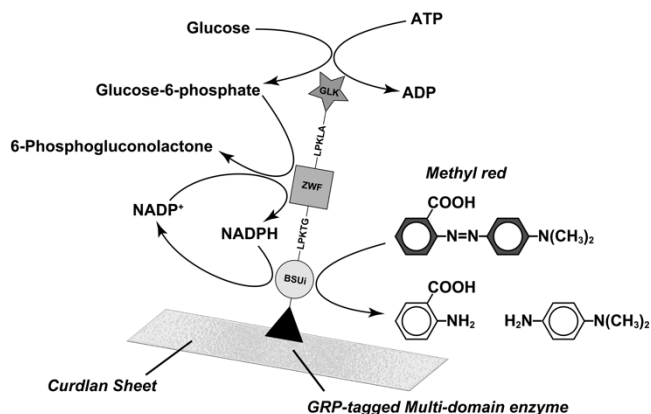


図 1 NADPH 再生系を内包するハイブリッド型アゾレダクターゼの概念図

の各基質のスペクトル強度の測定は以下のとおり行なった。まず、GLK, ZWFおよびAZRを、各酵素の基質であるATP、グルコース、NADPHおよびメチルレッドの混合液中に添加し、37 °C で反応を行い、0、15、30、45、60 min ごとに反応液を分取し、酵素反応を停止するために、ただちに90 °C、5 min 加熱した。これらの反応液に重水を添加した後、DRX600またはAvance III 分光器 (Bruker Biospin) NMRによって、各基質の¹H-¹³C HSQCスペクトルを取得した。

4. 研究成果

(1) NADPH 再生系を内包するハイブリッド型アゾレダクターゼの作製

酵素カスケードの反応効率を上げることを目指し、プロテインライゲーション法によるAZR-ZWF-GLK ハイブリッド酵素の作製を試みた。SrtA_{Strep} およ SrtA_{Staph} を用いたシークエンシャルな反応により、133 kD の分子量をもつ AZR-ZWF-GLK の生成を確認できた (図 2)。また、ドメイン間に 10 アミノ酸残基からなるフレキシブルリンカー (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂ を導入したところ、メチルレッドの分解活性が 20% 向上した。このことから、ドメイン間の距離または配向が、分解活性に影響することが示唆された。

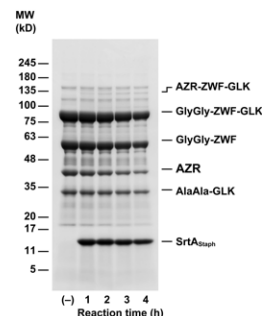


図 2 AZR と ZWF-GLK のプロテインライゲーションの経時変化

(2) NADPH 再生系をともなったアゾ色素分解過程の NMR による観測

0, 15, 30, 45, 60 min の反応液の ¹H-¹³C HSQC スペクトルから、ATP, グルコース, 6-ホスホグルコン酸, NADP⁺, アントラニル酸, および N,N-ジメチル-1,4-フェニレンジアミンそれぞれについて、反応時間に対するシグナル強度の変化を解析した (図 3)。ATP のシグナル (ATP-1) とグルコースのシグナル (Glucose-3) は GLK の反応により減衰し、ZWF の反応により 6-ホスホグルコン酸のシグナル (6-Phosphogluconic acid-1) が増大した。また、メチルレッドは AZR によって分解され、アントラニル酸のシグナル (2-aminobenzoic acid-5E) と N,N-ジメチル-1,4-フェニレンジアミンのシグナル (N,N-dimethyl-1,4-phenylenediamine-4F) が増大した。以上の結果から、NADPH 再生からメチルレッド分解へ至る反応カスケードは、NMR を用いることで一斉に測定できることが確かめられた。今後は、酵素および基質の混合比の最適化のために、本測定法を用いていく予定である。

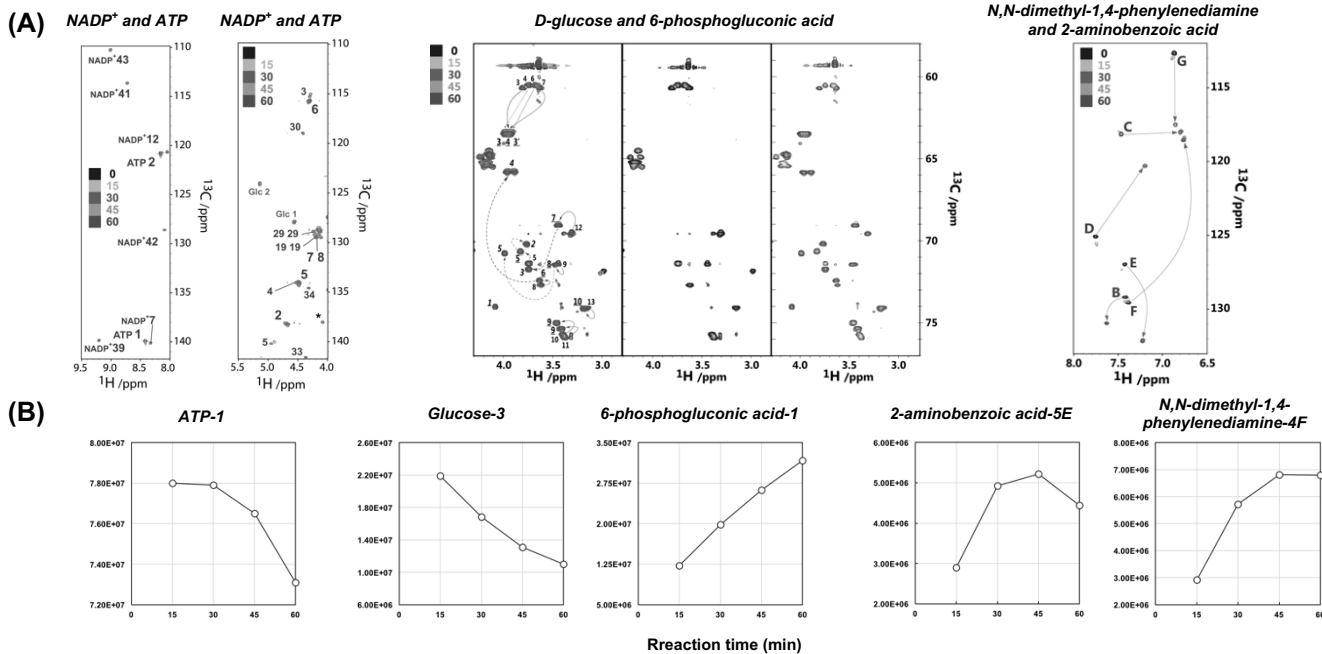


図 3 (A) ATP および NADPH, グルコースおよび 6-ホスホグルコン酸, アントラニル酸および N,N-ジメチル 1,4-フェニレンジアミンの ¹H-¹³C HSQC スペクトル. (B) 各基質および生成物のシグナル強度の経時変化。

<引用文献>

1. Horiuchi M., Nagata T., Katahira M., Kobashigawa Y., Suzuki Y., Ochiai M. “Continuous degradation of azo dyes using a hybrid azoreductase including NADPH regeneration system.” *The 10th International Symposium of Advanced Energy Science*. September 5th, 2019, Kyoto (poster)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahasi Kiyohiro, Onomoto Koji, Horiuchi Masataka, Kato Hiroki, Fujita Takashi, Yoneyama Mitsutoshi	4. 巻 517
2. 論文標題 Identification of a new autoinhibitory domain of interferon-beta promoter stimulator-1 (IPS-1) for the tight regulation of oligomerization-driven signal activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 662 ~ 669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.07.099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Amano Ryo, Namekata Masato, Horiuchi Masataka, Saso Minami, Yanagisawa Takuya, Tanaka Yoichiro, Ghani Farhana Ishrat, Yamamoto Masakuni, Sakamoto Taiichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Specific inhibition of FGF5-induced cell proliferation by RNA aptamers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2976 ~ 2976
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-82350-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件／うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Horiuchi, M., Kuninaga, S., Saito, I., Katahira, M., Nagata, T.
2. 発表標題 Development of the crystalline cellulose degradation system consisting of the psychrophilic fungus-type hybrid enzymes.
3. 学会等名 The 11th International Symposium of Advanced Energy Science (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kumagai, K., Suzuki, T., Sekikawa, Y., Kamba, K, Wan, L., Nagata, K., Takaori-Kondo, A., Katahira, M., Nagata, T., Sakamoto, T.
2. 発表標題 NMR analysis for the development of artificial RNAs to control biomolecular function.
3. 学会等名 The 11th International Symposium of Advanced Energy Science (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀内正隆, 国永史朗, 齋藤泉, 片平正人, 永田崇
2. 発表標題 好冷菌 <i>Sclerotinia borealis</i> 由来 -グルコシダーゼのクローニングおよびキャラクタリゼーション
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笹生 みなみ、天野 亮、行方 昌人、堀内 正隆、柳澤 拓也、西本 翔、田中 陽一郎、Farhana Ishrat Ghani、山本 昌邦、坂本 泰一
2. 発表標題 線維芽細胞増殖因子5 (FGF5) に対するAptamerの解析
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 胡 艶萍、佐藤 卓史、福田 夏希、小橋川 敬博、堀内 正隆、増田 豪、大槻 純男、森岡 弘志
2. 発表標題 血液試料を用いたバイオマーカー探索のための新規アフィニティー精製システムの開発
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masataka Horiuchi, Takashi Nagata, Masato Katahira, Yoshihiro Kobashigawa, Yasuhiko Suzuki, Masanori Ochiai
2. 発表標題 Continuous degradation of azo dyes using a hybrid azoreductase including NADPH regeneration system
3. 学会等名 The 10th International Symposium of Advanced Energy Science ~Beyond the Decade of Zero Emission Energy~ (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀内正隆, 永田崇, 片平正人, 小橋川敬博, 鈴木定彦, 落合正則
2. 発表標題 NADPH再生系を内包するハイブリッド型アゾレダクターゼの開発
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大久保広稀, 天野亮, 堀内正隆, 坂本泰一
2. 発表標題 SELEX実験におけるGRPタグの利用
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹生みなみ, 天野亮, 行方昌人, 堀内正隆, 柳澤拓也, 西本翔, 田中陽一郎
2. 発表標題 線維芽細胞増殖因子 (FGF) 5に対するアプタマーの取得と解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Minami Saso, Ryo Amano, Masato Namekata, Masataka Horiuchi, Takuya Yanagisawa, Kakeru Nishimoto, Yoichiro Tanaka, Farhana Ishrat Ghani, Masakuni Yamamoto, Taiichi Sakamoto
2. 発表標題 Selection and characterization of aptamers against fibroblast growth factor (FGF) 5
3. 学会等名 The 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀内 正隆, 永田 崇, 片平 正人, 小橋川 敬博, 鈴木 定彦, 落合 正則
2. 発表標題 NADPH再生系を伴ったアゾレダクターゼによるアゾ染料分解反応のNMR解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Horiuchi, M., Nagata, T., Katahira, M., Kobashigawa, Y., Suzuki, Y., Ochiai, M.
2. 発表標題 Real-time NMR analysis of the continuous degradation process of azo dyes using azoreductase in cooperation with the NADPH regeneration system.
3. 学会等名 The 9th International Symposium of Advanced Energy Science (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Horiuchi, M., Nagata, T., Katahira, M., Kobashigawa, Y., Suzuki, Y., Ochiai, M.
2. 発表標題 Development of the artificial multi-domain enzymes immobilized on the curdlan sheet at low cost.
3. 学会等名 The 8th International Symposium of Advanced Energy Science (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道医療大学講座・教員案内 薬学部人間基礎科学<化学> 堀内正隆 <研究について>
<http://www3.hoku-iryo-u.ac.jp/courses/1/032/index.html>
 北海道医療大学講座・教員案内/人間基礎科学<化学> (堀内正隆)/教員トップ/概要/<研究について>
<http://www3.hoku-iryo-u.ac.jp/courses/1/032/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	永田 崇 (NAGATA Takashi) (10415250)	京都大学・エネルギー理工学研究所・准教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関