

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18380060

研究課題名（和文） 超好熱菌の色素依存性脱水素酵素複合体の機能、構造解析と応用

研究課題名（英文） Functional and structural analyses, and application of dye-linked dehydrogenase complexes from hyperthermophiles

研究代表者

大島 敏久 (Ohshima Toshihisa)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：10093345

研究成果の概要：

超好熱菌由来のアミノ酸や有機酸などの種々の還元物質を電子供与体（基質）とし、ジクロロフェノールインドフェノールなどの人工色素を電子受容体とする色素依存性脱水素酵素複合体の生化学、分子生物学的機能解析と X 線結晶構造解析と、そのバイオセンサーや酵素燃料電池への応用開発を行った。その結果、これまで不明であった色素依存性アミノ酸脱水素酵素機能と構造の解明に大きな成果を見出した。また、超好熱菌由来の安定性の高い色素依存性脱水素酵素を素子とする電気化学的検出が可能な新規アミノ酸センサーの開発に成功した。さらに、色素依存性 L-プロリン脱水素酵素を素子とする新規なプロリン酵素電池の開発に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2007 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2008 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：超好熱菌、色素依存性脱水素酵素、フラビン酵素、酵素電池

1. 研究開始当初の背景

色素依存性脱水素酵素は、アミノ酸、有機酸、糖、アミンなどの種々の還元物質を電子供与体（基質）とし、それらの電子を電子伝達体へ取り込み、最終的に酸素やイオウに渡し、水や硫化水素と ATP を生成する酵素複

合体において、最初の電子を伝達系に取り込む働きをする一群の酵素である。活性測定時に人工の電子受容体である色素ジクロロフェノールインドフェノール(DCIP) などを使用するので、特に色素依存性脱水素酵素と言う(図1)。

アミノ酸、乳酸、アルコールなど（電子供与体）+DCIPなど（電子受容体）= オキソ酸（酸化型生成物）+還元型DCIPなど

図 1. 色素依存性脱水素酵素反応式

一群のフラビン含有色素依存性脱水素酵素は膜結合性で複雑な複合体を形成するために、常温菌や中等度好熱菌由来の酵素では総じて安定性が低く、精製や機能開発が遅れていた。一方、本酵素を用いると基質濃度を電気化学的に検出できるので、酵素電極素子として、医療、食品、環境分析用バイオセンサーなどへの新しい応用が期待されてきた。本研究の開始する数年前より、本研究代表者らは種々の条件下で、より高い安定性が期待できる超好熱菌や高度好熱菌の生産する色素依存性脱水素酵素を対象に、ゲノム情報と活性測定法を用いて、スクリーニングを行い、新しい2種のL-プロリン脱水素酵素とD-プロリン脱水素酵素を発見した。またそれらの生化学的機能の解析、X線結晶解析による高次構造の解明を行い、基本的な酵素化学的特徴の解明と1種類のL-プロリン脱水素酵素の立体構造解析に成功し、超好熱菌由来の安定性の高い酵素を対象とすることによって、それまで不明であった色素依存性脱水素酵素の機能と構造解析が可能であることを明らかにした。このような我々の先導的な研究により、本研究の開始当初、この酵素ファミリーの機能と構造、応用開発への大きな展開が可能である状況になっていた。

2. 研究の目的

色素依存性脱水素酵素（複合体）は、酵素反応を利用して電気化学的に基質の電子を陰極へ取り込めるので、酵素電極素子として優れた特長をもち、医療、食品、環境用バイ

オセンサーマイクロマシンや酵素燃料電池への新たな応用が期待できる。しかし、多くのこのグループの脱水素酵素では、活性は検出されているものの、膜結合性や複雑な複合体構造をとるために、常温菌や中等度好熱菌由来の酵素は極端に不安定で、詳細な機能と構造解析の研究は困難で、応用面の開発は未開拓のまま残されている。近年、100℃付近で生育可能な超好熱菌が熱水環境などから100種類以上分離され、それらの生産する酵素は、耐熱性が高いだけでなく、長期間の保存性、有機溶媒や界面活性剤などの化学物質、酸やアルカリなどに対して高い耐性を示すことが分かってきた。それ故、超好熱菌由来の色素依存性脱水素酵素は高い安定性から、その基礎及び応用研究の進展が期待できる。また、10数種の超好熱菌のゲノム全塩基配列が既に決定され、豊富なゲノム情報が酵素の機能解析に有効に利用できる。本研究では、既に見出した2種のL-プロリン脱水素酵素と1種類のD-プロリン脱水素酵素の機能と構造のより詳細な解析を進める。さらに、超好熱菌のゲノム情報と活性測定法を用いて、新規な色素依存性脱水素酵素を超好熱菌や高度好熱菌から見出し、それらの機能と構造の解明を進める。その結果を踏まえ、それらを反応素子とする酵素機能電極型バイオセンサーや酵素燃料電池の開発を進めることを主な目的とする。

3. 研究の方法

(1) 酵素活性の検出と定量

近年、海底火山、地獄、温泉、堆肥などの高温自然環境から、様々な超好熱菌や高度好熱菌が多数分離され、高度耐熱性遺伝子資源としての利用が可能になっている。また全ゲノムの塩基配列の解読（ゲノム解析）も進み、その遺伝子情報の活用ができる。しかし、色

素依存性脱水素酵素の研究は他の多くの NAD(P) 依存性脱水素酵素 (Ohshima, T., Soda, K.: In *Stereoselective Biocatalysis*, Marcel Dekker Inc, 877, 2000)とは異なり、研究が遅れているために、我々がこれまでに遺伝子をクローニングし、塩基配列を明らかにした 3 種のプロリン脱水素酵素以外にはほとんど遺伝子配列情報がない。そのために、新しい超好熱菌や高度好熱菌の色素依存性脱水素酵素の発見には、まずそれらの好熱菌を培養し、得られた菌体細胞の破碎を行い、細胞抽出液を調製し、各種クロマトグラフィーでの精製後、精製酵素の N 末端アミノ酸配列情報、遺伝子クローニングと遺伝子の塩基配列情報、大腸菌での大量生産系の確立、精製酵素の酵素化学的性質の解析などを行う必要がある。細胞抽出液中の色素依存性脱水素酵素活性は、2つの方法で検出した。第一の方法はディスクポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) で分離後、ディスクゲルを取り出し、試験管に予め調製した活性染色液 {緩衝液、基質、フェナジメトスルフェート、ヨードニトロテトラゾリウム塩 (INT) からなる} に浸漬して、50°C で 30-60 分間放置して、INT が還元されることによるホルマゼン生成による赤色のバンドの出現で検出した。この場合、ブランクとして、基質を入れない活性染色液を用いて、同様にディスクゲルの染色を行い、バンドが出現しないことを確認した。第 2 の方法は、分光光度計を用いる分光学的な測定法である。この場合、電子供与体 (基質) であるアミノ酸、有機酸、糖などから青色の人工色素電子受容体である DCIP への電子伝達を DCIP の 600 nm における吸光度 (モル吸光係数 = $20.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) の減少速度から、反応速度を測定した。第一の方法は、細胞抽出液中の脱水素酵素の存在を簡便に検出する方法として有効である。一方、第二の

分光光度法は、酵素活性の存在を検出するとともに、活性の定量に有用である。

(2) 色素依存性脱水素酵素の精製と遺伝子の大腸菌でのクローニング、遺伝子組換えによる酵素の大量生産、酵素の酵素科学的性質の解析

タンパク質を構成する 20 種のアミノ酸のうち、Cys、Gln、Asn を除く Gly と 16 類の L-アミノ酸と同数の D-アミノ酸、L 及び D-乳酸、DL-リンゴ酸、DL-酒石酸、メゾ酒石酸、グリセロール、D-グルコース、D-フルクトース、スクロースなどを基質として利用し、それらを電子供与体とする色素依存性脱水素酵素を検索した。超好熱菌と高度好熱菌としては、ドイツ連邦共和国の微生物保存機関である DSMZ (ブラウンシュバイグ市) と我が国の機関である JCM (理化学研究所、和光市) から入手したものと、大分県や鹿児島県などから採集した高温土壌試料から分離した菌株を用いた。次に、活性が認められたものに関しては、酵素を各種クロマトグラフィーによって高度精製を行い、精製酵素を用いて、温度安定性、分子量、サブユニット構造、電子供与体と受容体の特異性とミカエリス定数 (K_m 値)、補酵素、N 末端アミノ酸配列などの分析を行った。

次に、決定した N 末端アミノ酸配列から、ゲノム解析が完了している好熱菌の酵素では、ゲノム情報を利用して相同性の認められる遺伝子を見出した。遺伝子が同定できれば、その遺伝子を手に入れ、大腸菌で発現させ、発現産物が予想した活性を持つかどうか、大腸菌細胞の抽出液をディスク PAGE で分離し、該当する基質を加えた活性染色法にて活性バンドの確認を行う。また、分光学的な活性測定法により、活性の存在を確認するとともに、総活性値と比活性を算出した。活性が認

められたら、遺伝子のクローニングを行い、大腸菌高発現系にて、酵素の生産性を向上させ、酵素の大量発現系を構築した。ついで、その大腸菌組換え体細胞を培養し、その細胞抽出液から高度好熱菌由来の目的酵素を熱処理などの分離操作により簡便に生成する方法を確立した。

一方、酵素活性が見出された好熱菌のゲノムの塩基配列情報が無い場合は、決定したN末端アミノ酸配列から、DNAプローブを作成し、培養細胞から目的遺伝子を吊り上げPCR法にて増幅し、塩基配列を決定する。その遺伝子を大腸菌の高発現系に導入し、目的酵素の発現を行う。その後は、上記の場合と同様に組換え大腸菌の細胞抽出液から、酵素を精製し、機能を解析する。

(3) 酵素の結晶構造解析

高度に精製した酵素を濃縮（約 10 mg/ml 以上の濃度）にしたあと、硫酸アンモニウムやポリエチレングリコールなどの沈殿剤を用いて、ハンギングドロップ法で結晶を作成する。結晶が得られたら、結晶の回折強度データの収集をDIP 2030 (Brucker) 及びつくば市にある高エネルギー物理学研究所放射光施設 NW12 を利用して行った。

(4) 酵素を用いた電極型バイオセンサーの作成法

超好熱菌や高度好熱菌由来の酵素を素子とする酵素電極型バイオセンサーについては以下の研究成果の項に詳細を記した。

4. 研究成果

(1) 超好熱アーキア *Thermococcus profundus* の色素依存性 L-プロリン脱水素酵素 (PDH) の発見と機能解析

安定性の優れた色素依存性脱水素酵素を

見出すために、まず超好熱菌における検索を行った。超好熱菌は 80°C 以上の高温で良好に増殖するために、通常の装置を用いて培養することは困難であり、また危険でもある。既に開発した簡便、安価に超好熱菌を培養できる装置を用いて多数の超好熱アーキアの培養を行った。それらの集菌した超好熱菌細胞を超音波破碎して得た抽出液中を酵素液として、アミノ酸や有機酸などを電子供与体とし、DCIP を電子受容体とする色素依存性脱水素酵素を検索した。その結果、L-プロリンの脱水素反応を行う L-プロリン脱水素酵素を数種の *Thermococcales* 目に属する超好熱アーキアに見出すことに成功した。そのなかで細胞抽出液の比活性が最も高かった *T. profundus* を選び、酵素の精製を数種の異なるクロマトグラフィーによって行い、ほぼ電気泳動的に均一に精製することに成功した。この酵素は、膜結合性ではなく細胞抽出液中の可溶性画分に存在した。分子質量はゲルろ過法で約 120 kDa、SDS 電気泳動法により 4 種類の異なるバンドが検出され、それぞれの 4 種のサブユニットの分子質量は α : 54, β : 43, γ : 19, δ : 11 kDa であり、この酵素は $\alpha\beta\gamma\delta$ 複合体構造をとることを明らかにした。

本酵素は 70°C の熱処理や pH 4-10 (50°C の処理条件) の広い pH 領域で失活せず、この種の酵素としては非常に高い安定性を示した。本酵素は L-プロリン特異的に電子供与体とし、それを Δ^1 pyrroline-5-carboxylate (P5C) に変換した。D-プロリン、L-ヒドロキシプロリンをはじめ多くのアミノ酸は電子供与体とならず、本酵素の基質特異性は非常に高い。また、過塩素酸処理により酵素から抽出したフラビンを HPLC で分析すると、FAD のみが検出できた。次に本酵素遺伝子のクローニングを行い、全長 3,399 bp の ORF の塩基配列の決定に成功した。 $\alpha\beta\gamma\delta$ の各サブユニット遺伝

子 (*pdhA*, *pdhB*, *pdhF*, *pdhX*) は *pdhA*-*pdhF*-*pdhX*-*pdhB* の配列で並び、それぞれ

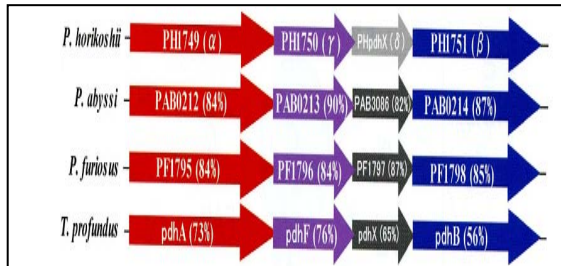


図 2. *T. profundus* の PDH の遺伝子クラスターと他の *Thermococcales* 目の超好熱アーキアの類似の遺伝子クラスター

れの遺伝子の 5'末端の一部と次の遺伝子の 3'末端の一部を重複しながらクラスターを形成していることが分かった(図 2)。また、これと類似した遺伝子クラスターがデータベースのゲノム解析情報を検索した結果、*Thermococcus* や *Pyrococcus* 属菌のような *Thermococcales* 目のアーキアに特異的に存在することが明らかになった。それゆえ本酵素は *Thermococcales* 目の超好熱アーキアに特異的に存在する機能と何らかの関連が予想される。

次に 4 種の $\alpha\beta\gamma\delta$ サブユニットの遺伝子 *pdhA*, *pdhF*, *pdhX*, *pdhB* のそれぞれを PCR 法で増幅後、p ET15 ベクターに挿入し、大腸菌でそれぞれの酵素サブユニット成分を単独発現させ、大腸菌から各サブユニット成分を高度に精製し、それらの機能解析を行った。まず、どのサブユニットに dye-L-PDH 活性が検出できるかを分析した結果、酵素活性は全てのサブユニットが揃った native の $\alpha\beta\gamma\delta$ 複合体酵素の値 (14.0 units/mg) に比較すると低い、 β サブユニットにのみ活性 (3.9 units/mg) を検出できたので、 β サブユニットが PDH 成分である。 β サブユニット (アミノ酸残基数: 385、分子量: 42,682) 溶液の可視紫

外部吸収スペクトルはフラビン補酵素特有の吸収極大を示した。その一次構造中に、アデニン結合部位 (FAD のアデニン結合部位と予想される) に特有のモチーフ ($G^{11}XGXXG/////E^{35}$) が N 末端付近に認められた。一方、 α サブユニットは、他の生物のゲノム情報から、*Pyrococcus abyssi*, *P. horikoshii*, *P. furiosus* のザルコシンオキシダーゼ、D-ノパリン脱水素酵素に高いアミノ酸配列の相同性 (75、73%) を認めたので、そのような酵素活性を測定したがいずれも検出できなかった。一方、この α サブユニットが *P. furiosus* の色素依存性 NADH 脱水素酵素 (NADHDH) と推定されるタンパク質のアミノ酸配列と 36% の相同性を示したので、その酵素活性を測定したところ、複合体で 0.68 unit/mg、サブユニット単独で 0.18 unit/mg の活性を検出できた。 β , γ , δ のサブユニット単独では、いずれも NADHDH 活性は検出できなかった。一方、この α サブユニットが NADHDH 成分であることが明らかになった。また、基質である NADH のピリジン環の 4 位の炭素には、Pro-R と Pro-S の 2 つの水素が存在し、一般に脱水素酵素反応ではどちらか一方の水素が立体特異的に受容体へ転移される。NADHDH 反応の水素転移の立体特異性を立体特異的に重水素化した $[4R-^2H]$ NADH を用いて 1H -NMR で分析した結果、Pro-S 水素が特異的に転移されることが明らかになった。 α サブユニット (483 アミノ酸残基、分子量: 51,921) のアミノ酸配列の特徴を見ると $[2Fe-2S]$ の鉄イオウクラスターのモチーフ ($^{62}C\sim^{83}C$) と、2 つの ADP 結合モチーフ ($^{118}K\sim^{149}E$, $^{280}R\sim^{310}E$) が認められた。後者の 2 つの ADP 結合モチーフは電子供与体の NADH と電子受容体の FAD の結合部位であると推定できる。これまでに、L-プロリン代謝系酵素で大腸菌の PutA (プロリンオキシダ

ーゼ) が、本酵素と同様に L-プロリンから P5C への FAD 依存性の酸化活性と P5C から L-グルタミン酸への NAD 依存性の脱水素酵素活性を併せ持つことが知られている (Maroy, S. R.: In Cellular and molecular biology, vol. 1, American Society for Microbiology, 1513, 1987)。しかし、本酵素のように、L-プロリンと NADH の 2 種の脱水素酵素反応を併せもつ複合体酵素はこれまで全く報告はなく、本酵素が最初の例である。また γ サブユニットの配列は上記の 3 種の *Pyrococcus* 属菌のフェレドキシンと推定されるタンパク質と 60~74% の高い相同性を示すことと、2 つの [4Fe-4S] の鉄イオウクラスターに特有のモチーフ (CxxCxxCxxxCP, 39~53 と 73~84) が存在することから、このサブユニットは電子伝達タンパクであるフェレドキシン様タンパク質であると推定される。第 4 の成分である δ サブユニット (98 アミノ酸残基) にも、また上述した 3 種の *Pyrococcus* 属菌と *A. fulgidus* に相同性の高い機能未知タンパク質が存在するが、機能はまだ不明のままである。以上のことから、*Tp*-PDH は L-PDH、NADHDH、フェレドキシン、機能未知タンパク質から構成される新規ヘテロ複合体酵素であることが明らかになった (図 3)。この酵素複合体の生理的機能は NAD から NADH への還元反応を伴う L-プロリンから P5C への酸化反応であるのか、逆に NADH から NAD への酸化反応を伴う L-プロリンへの還元反応 (合成反応) であるかについて明らかにするには、 γ と δ サブユニットの機能の解明や基質による酵素の誘導実験など、今後の解析が必要である。

(2) 嫌気性超好熱菌 *P. horikoshii* の 2 種の異なる色素依存性 L-プロリン脱水素酵素複合体

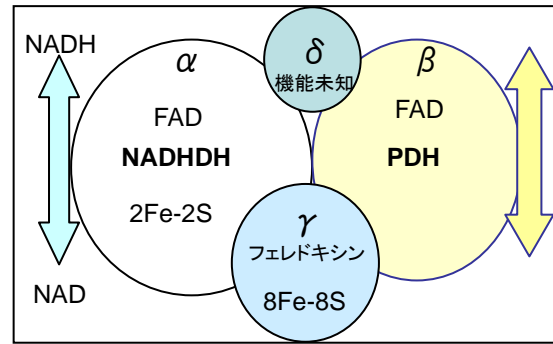


図 3. *T. profundus* L-プロリン脱水素酵素 (PDH) 複合体の構造。NADHDH

超好熱菌における PDH のスクリーニングの過程において、*P. horikoshii* と *T. peptonophilus* の細胞抽出液の Native 電気泳動 (PAGE) 後、L-プロリンを電子供与体として PMS-INT 系で活性染色を行うと、移動度が大きく異なる 2 本の活性バンドが検出できた。また、*P. horikoshii* の細胞抽出液を疎水性クロマトグラフィーにかけると、溶出パターンに明確に異なる 2 つの活性ピークが認められた。さらに、既に、図 2 に示したように *Tp*-PDH と同様の 4 種のサブユニットをコードする遺伝子のクラスターが *P. horikoshii* にもゲノム情報から認められることから、我々は *P. horikoshii* には *Tp*-PDH と同タイプの PDH に加えて、新規な PDH が別に存在すると予想した。これを確認するために、これら 2 種類の PDH (電気泳動で移動度が小さい *Ph*-PDH1 と大きい *Ph*-PDH2) をそれぞれ細胞粗抽出液から高度に精製し、両酵素の酵素化学的特徴を解析した。その結果、移動度の大きい *Ph*-PDH2 が *Tp*-PDH と同様の 4 種類 (SDS-PAGE で求めた分子質量: $\alpha=52, \beta=46, \gamma=20, \delta=8$ k Da) のサブユニットからなる複合体酵素 (分子質量: 120 k Da) であり、決定した各サブユニットの N-末端アミノ酸配列とゲノム情報から得られた配列から $\alpha \beta \gamma \delta$ の遺伝子は、それぞれ PH1749, PH1751, PH1750, PH $pdhX$ である

と同定できた。これらの遺伝子からの得られる各サブユニットのアミノ酸配列は先に述べた *Tp*-PDH の α β γ δ サブユニットの配列とそれぞれが高い相同性を示したので、*Ph*-PDH2 は *Tp*-PDH と同様な機能と構造をもつ PDH 複合体酵素であることが明らかになった。

一方、電気泳動の移動度が小さい *Ph*-PDH1 を精製後、SDS-PAGE を行うと 56 (α) と 43 kDa (β) の分子質量を持つ 2 種類のサブユニットが検出できた。ゲルろ過法によって算出された酵素の分子質量は約 440 kDa であったので、本酵素は $\alpha_4\beta_4$ のヘテロサブユニット複合体構造をとり、 α β γ δ 構造をとる *Ph*-PDH2 とは 4 次構造が全く異なるアイソザイムであることが分かった。*Ph*-PDH1 の α と β サブユニットの N-末端アミノ酸配列を決定し、ゲノム情報から得られる配列の比較から、それぞれをコードする遺伝子として PH1363、PH1364 を見出した。この両遺伝子もクラスターを形成し、*Pyrococcus* や *Thermococcus* 属菌の Thermococcales 目のアーキアに共通に認

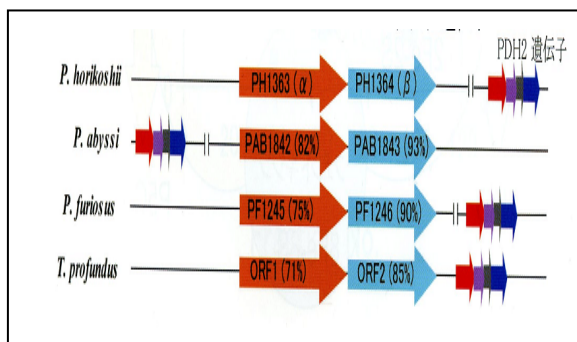


図 4. *P. horikoshii* の PDH 1 (α 、 β 型) の遺伝子クラスターと類似の遺伝子クラスター

められた(図 4)。既に述べたように、*T. profundus* では、細胞抽出液の電気泳動では活性バンドは 4 種類のサブユニットからなる複合体酵素 (*Ph*-PDH2 と同様な複合体酵素) のみが認められ、*Ph*-PDH1 に相当する活性バン

ドは認められなかった。しかし *Ph*-PDH1 の α と β に高い相同性を示す遺伝子が *T. profundus* にも存在することは、*T. profundus* にも同様な酵素の存在が示唆されるが、PAGE の活性染色では、活性バンドが認められなかったことは、生理的な条件の違いによる遺伝子の発現制御が菌種によって異なることと予想される。

次に *Ph*-PDH1 の 2 つの遺伝子を大腸菌で発現させ、発現した酵素を精製後、酵素化学的特徴を解析した結果、本酵素は *Tp*-PDH よりも高い熱安定性を示し、90°C で 120 分間の熱処理によっても全く失活しなかった。本酵素反応の L-プロリンからの生成物を薄層クロマトグラフィーで同定した結果、*Tp*-PDH と同様 P5C であった。また、 α と β サブユニットの大腸菌における単独発現系を調製し、それぞれの発現産物を精製した後、PDH 活性を測定したところ、 β サブユニットには活性が存在したが、 α には全く検出できなかった。さらに、*Tp*-PDH の α サブユニットが示した NADHDH 活性も *Ph*-PDH1 には認められなかった。一方、*Ph*-PDH1 の α と β の各サブユニットの過塩素酸抽出液中の補酵素を HPLC で分析したところ、*Tp*-PDH は α と β サブユニットそれぞれに 1 分子ずつ FAD を含み、酵素複合体として 2 分子の FAD を含んでいた。また、HPLC では FAD に加え、FMN と ATP のピークが確認できた。トリメチルアミン脱水素酵素では ADP の結合が報告されているが Lim, M. W., et al: *J. Biol. Chem.*, **263**, 3075, 1988)、ATP が結合している脱水素酵素の例はなく、本酵素の大きな特徴の 1 つである。さらにこれらの 3 種類の補欠分子が α 、 β のどちらのサブユニットに結合しているかについて、大腸菌で単独発現させたサブユニットについて分析した結果、FAD が β サブユニットに、ATP が α サブユニットに、それぞれ含まれて

いることが判明した。しかし FMN は、予想外にも単独で発現させ、精製した α と β のどちらのサブユニットからも HPLC では検出できなかった。我々は、この原因として、FMN は α と β サブユニットの境界に、両サブユニットに挟まれて結合し、結合が弱いと予想した。以上の解析から *Ph*-PDH 1 はサブユニット構造、補酵素の種類などが大きく、*Tp*-PDH 複合体とは異なるアイソザイムであることが明らかになった。

(3) *Ph*-PDH1 の X 線結晶構造解析と新規な電子伝達系の存在

Tp-PDH と *Ph*-PDH1 の詳細な構造と機能に関する知見を得るため、両酵素の X 線結晶構造解析を行った。*Tp*-PDH に関しては X 線解析に必要な良好な結晶が得られなかったが、*Ph*-PDH1 については結晶化に成功し、最大分解能 2.8 Å でその構造解析に成功した¹⁰⁾。*Ph*-PDH1 は $\alpha\beta$ ヘテロダイマーが基本となる ($\alpha\beta$)₄ の 8 量体構造をとり、その 2 対の α サブユニットの Cys381 α 間にジスルフィド結合の架橋が形成され、架橋された($\alpha\beta$)₂ のテトラマー構造を基本構成としている。(図 4)

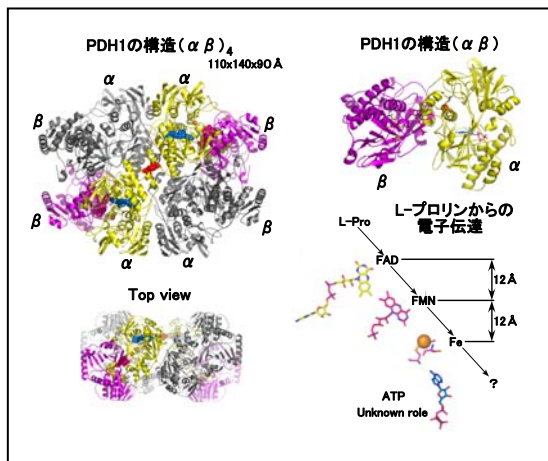


図 4. PDH 1 ($\alpha\beta$ 4 型) の立体構造と補欠分子の位置

その($\alpha\beta$)₂ テトラマーの 2 分子が重なり合

う形で全体の($\alpha\beta$)₄ オクタマー構造をとることが明らかになった。この立体構造解析によって、色素依存性プロリン脱水素酵素複合体の構造と機能に関する新規知見が明らかになった。上述のように補欠分子族の HPLC 分析から、FAD が β サブユニットに、ATP が α サブユニットに存在することが分かったが、FMN はどこに結合しているかは不明であった。立体構造解析から β サブユニットは、主に基質結合ドメイン、FAD 結合ドメイン、 α サブユニットとの接触ドメインから構成され、FMN は β サブユニットの接触ドメインの α サブユニット側、すなわち α と β サブユニットの境界に挟まれて存在することが明確になった。それは FMN の平面構造をとるイソアロキサジン環が 2 つの疎水性アミノ酸残基である β サブユニットの W304 β と α サブユニットの M444 α によって挟まれて存在していることから明らかである(図 7)。また、基質の L-Pro の結合部位は、類似の既に構造が解明され一次構造上相同性が高いモノマー型サルコシン酸化酵素 (Trickey, P. et al. *Structure* 7, 331, 1999) の基質 L-Pro の結合部位の構造類似性から PDH の β サブユニットの基質結合ドメインにおいて、L-プロリンは、そのピロリジン環が FAD のイソアロキサジン環と約 3 Å の距離で向かい合う形で存在することが分かった。一方、 α サブユニットは、ATP 結合ドメイン、セントラルドメイン、及び N-末端ドメインの 4 個のシステイン残基 (Cys413, 415, 447, 452) からなるシステイン-クラスタードメインから構成されていることがわかった。さらに結晶化を行うために用いられた緩衝液成分の CAPS (N-cyclohexyl-3-amino-propanesulfonic acid) が結合している 4 個のトリプトファン残基から形成されている疎水性に富むトリプトファン-クラスタードメインが含まれている。

システインクラスターは、そのドメインのアミノ酸配列から[2Fe-2S]の鉄イオウクラスターと予想できたが、X線結晶解析からは明確な鉄の電子密度は確認できなかった。しかし、生化学的分析や EPR スペクトル分析から鉄が存在する結果が得られたので、本来存在する鉄が結晶化の過程で酵素から遊離し、失われたために検出できなかったものと推定される。また、疎水性に富むトリプトファン-クラスタードメインに、緩衝液成分である CAPS が結合した構造が得られたことから、この部位は生理的には CAPS に代わるキノンなどの疎水性に富む電子伝達体が結合すると推定できる。CAPS に変わる生理的な電子伝達体の同定が今後必要とされる。なお、FAD、FMN、鉄原子間の距離はいずれも同じように約 12 Å である。

以上の *Ph*-PDH1 に関する生化学的解析と X 線結晶構造解析から、次のような新しい電子伝達系が存在すると考えられる。まず、電子供与体の L-プロリンから電子がβサブユニットの FAD に取り込まれ、FADH₂ が形成される。次に電子は約 12 Å 離れたβとαサブユニットの接触面に位置する FMN へと伝達され、その FMN から約 12 Å の距離にある α サブユニットのシステインクラスタードメインの鉄へと伝達される。最終的に電子は α サブユニット中の疎水性に富むトリプトファンクラスタードメインに結合する未同定の電子受容体へと流れる。なお、α サブユニットに存在する ATP の役割については現在のところ不明であるが、電子伝達には直接関与せず、高次構造の保持や電子伝達の調節因子として機能していることが予想できる。構造情報に基づくプロリン脱水素酵素複合体の電子伝達機構に関しては、不明な点が多い。今後タンパク質工学的的手法などによる電子伝達と ATP の調節機能の詳細な解析などが

必要であり、それらにより、酵素の生理的機能についても解明が進むことが期待できる。

(4) 膜結合型色素依存性 D-プロリン脱水素酵素

色素依存性脱水素酵素のスクリーニングにより、100°C に最適生育温度を示す内陸性超好熱アーキアの *Pyrobaculum islandicum* JCM 9189 に DCIP 依存性 D-プロリン脱水素酵素 (D-PDH) を発見した。この酵素は、DCIP を電子受容体として D-プロリンや D-バリンなどの D-アミノ酸を広く電子供与体とすること、及び生成物が P5C ではなく P2C (Δ^1 pyroline-2-carboxylate) であった。この点で、上述の 2 種の PDH とは全く異なる反応を触媒する色素依存性脱水素酵素である。また、本酵素は、PDH とは異なり細胞抽出液中の膜成分に存在することから、我々は D-PDH を界面活性剤で可溶化後、精製を行い、ほぼ均一まで精製することに成功した。この酵素の分子質量はゲルろ過法で 145 kDa、SDS-PAGE で約 42 kDa と算出されたので、本酵素はホモテトラマー構造をとることが分かった。サブユニットの N 末端アミノ酸の配列 (28 残基) を決定後、本酵素遺伝子のクローニングを行い塩基配列 (ORF: 1,089bp) を決定した。その塩基配列から本酵素の一次構造 (363 アミノ酸、分子量: 40,341) を明らかにした。本酵素の補酵素としては、HPLC 分析から FAD が同定された。この FAD 結合部位は N 末端領域に存在するアデニン結合モチーフ (G⁷XGXXG---E³³) の部分にあると予想されが、この N 末端領域は疎水性に富んでおり、恐らく本酵素の膜結合性ドメインでもあると考えられる。これまで、色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素としては、大腸菌やサルモネラ菌由来の酵素が知られているが (Olsiewski, P.J. et al., : *J. Biol. Chem.*, **255**, 4487, 1980)、いずれも D-アラニンに最も高い

活性が認められ、D-プロリンに対しては相対的に低い活性しか認められていない。また、これらの常温菌由来の D-アラニン脱水素酵素は可溶化後、極端に不安定になり、機能解析はほとんど行われていない。

(5) *Sulfolobus tokodaii* の色素依存性 D-乳酸脱水素酵素(D-LDH)の機能開発

色素依存性脱水素酵素の超好熱菌におけるスクリーニングにおいて、我々は、DCIP を電子受容体とする D-乳酸脱水素酵素活性を好気・好酸性超好熱菌 *S.tokodaii* train 7 見出した。これまで、超好熱菌において同様な D-乳酸脱水素酵素は、嫌気性イオウ要求性菌 *Archeoglobus fulgidus* にのみ見出され、精製され基本的な性質が明らかにされている (Reed, D. W., Hartzell, P. L. *J. Bacteriol.* **181**, 7580, 1999)。この酵素は4℃の低温で好気条件下保存されると、急速に失活する亜鉛含有フラボタンパク質である。しかし、*S.tokodaii* の本酵素は、低温から高温まで非常に安定であり、亜鉛イオンの添加が酵素活性に影響しないことが本酵素の基本的な性質の決定から明らかになり、*A. fulgidus* の酵素とは異なるタイプの色素依存性 D-乳酸脱水素酵素であると考えられた。そこで、*S.tokodaii* を培養して得られた菌体の破碎液から本酵素の精製を開始し、酵素化学的特徴の解析、遺伝子の同定、クローニング、大量生産系の構築などを行った。

S.tokodaii の培養して得た菌体を破碎、遠心分離 (10000gX20 分間)して上清に得られた粗酵素液を、DEAE-TOYOPEARL、Butyl- TOYOPEARL、Q-Sepharose、調製用 PAGE の分離操作により約 18 倍精製し、電気泳動的に均一酵素標品を得ることに成功した。この酵素の分子量はゲル濃度勾配 PAGE 法で約 93kDa、SDS-PAGE 法で約 48kDa と算出され、本酵素が 2 量体構造をとることが明らかになった。本酵素の安定性は 10 分間の熱処理では 80℃まで失活せず、85℃では残存活性は 40%となった。本酵素は、現在、最も耐熱性が高い色素依存性 D-乳

酸脱水素酵素である。また、50℃で 30 分間異なる pH で処理後の残存活性を測定したところ、pH 6.5 ~10 の広範囲にわたり、失活が認められず、高い安定性を示すことが判明した。酵素活性に対する pH の影響を調べたところ、L-乳酸酸化反応は pH 8.5 で最大であった。酵素活性は 1 mM SrCl₂、CaCl₂、MgCl₂、NiCl₂、ZnCl₂ の添加では影響されないが、*p*-メルクリ安息香酸、MnCl₂、CoCl₂、HgCl₂、MnCl₂、CuCl₂では強い阻害が認められた。電子供与体としては、D-乳酸のほかに D-2-ヒドロキシ酪酸が D-乳酸の 97%の相対活性を示した。L-乳酸、グリコール酸、L-酒石酸、クエン酸、グリオキシル酸、2-ヒドロキシイソ酪酸、D-グリセリン酸、D-2-ホスホグリセリン酸は電子供与体にはならなかった。また、電子受容体としてはフェリシアン化カリウムが最も良好であり、フェナジンメトサルフェートとヨードニトロテトラゾリウム系、DCIP、MTT もそれぞれ 17,59,29%の相対反応速度を示した。ベンジルピオローゲン、メチレンブルーは電子受容体としての活性を持たなかった。気相エドマン法で決定した酵素の N-末端アミノ酸配列は、MLEGIEYSQGEEREDFVGFKIKPKIであった。この配列情報を *S.tokodaii* のゲノム情報から検索してみると、この配列はグリコール酸酸化酵素サブユニットと推定されている ST0649 遺伝子の N 末端アミノ酸配列と一致した。この ST0649 遺伝子の ORF から得られるアミノ酸配列を NCBI データベースで Blast を用いて相同性検索を行ったところ、*S.acidocaldarius* の D-乳酸脱水素酵素を含む推定タンパク質 (相同性:75%)、*Metallosphaera sedula* DSM 5348 の D-乳酸脱水素酵素 (65%)、*Caldivirga maquilgensis* IC-167 の同酵素 (50%)、*Archeoglobus fulgidus* (39%)、*Oceanobacillus iheyensis* (37%)、*Bacillus halodurans* (37%)、*B. subtilis*(35%)の推定グリコール酸酸化酵素サブユニット、及び *Aeropyrum pernix* の D-乳酸脱水素酵素(35%)に相同性が認められた。興味あることに、ST0649 遺伝子のコードする酵素のアミノ酸配列は、唯一色素依存性 D-乳酸脱水素酵素であることが報告されている *A. fulgidus* の酵素の

配列との相同性が 32%であり、同じ菌の推定グリコール酸酸化酵素サブユニットとの相同性(39%)よりも低い。これは、*S.tokodaii* の D-乳酸脱水素酵素が新規な酵素であることを示している。

次に、*S.tokodaii* の D-乳酸脱水素酵素遺伝子の発現ベクター-pDLDH で形質転換された大腸菌 BL21(DE3)codon plus RIL を調製した。その大腸菌組換え体の粗抽出液には、高い80℃で10分間熱処理しても失活しない D-乳酸脱水素酵素活性が認められた。その後 Nickel-charged chelating Sepharose カラムクロマトグラフィーにて精製すると均一な酵素が簡便に得られた。この組換え体酵素は、FAD 含有緩衝液で透析すると約 6 倍活性化され、*S.tokodaii* の細胞から得られた酵素の比活性とほぼ同じ値に上昇した。なお、1% 過塩素酸処理した酵素抽出液の HPLC により FAD が補酵素として検出され、FMN は認められなかった。遺伝子組換え体から得られた His タグ付の酵素の基質特異性、耐熱性などの性質は、*S.tokodaii* の細胞から得られた酵素とほぼ同じであったが、pH 安定性だけが少し低下し、pH6-7 で安定であり pH 6.5 及び 9.0 で処理すると 50% 失活することがわかった。本酵素の D-乳酸に対する Km 値は DCIP を電子受容体とすると 91 μM、MTT を電子受容体とすると 247 μM と算出できた。

本研究以前には、好熱菌の FAD 含有色素依存性 D-乳酸脱水素酵素としては *A. fulgidus* の酵素(遺伝子 AF0394)のみが知られていたが(*S.tokodaii* の D-乳酸脱水素酵素は、その酵素とは 32%のアミノ酸配列上の相同性をもち、その活性を持たないグリコール酸酸化酵素サブユニット(AF0807p)に、より高い相同性(39%)を認められたので、*A.fulgidus* の色素依存性 D-乳酸脱水素酵素とは大きく異なる新規な耐熱性の D-乳酸脱水素酵素であると考えられる。また、*S.tokodaii* の D-乳酸脱水素酵素(遺伝子 ST0649)と相同性が高い *A.fulgidus* の酵素

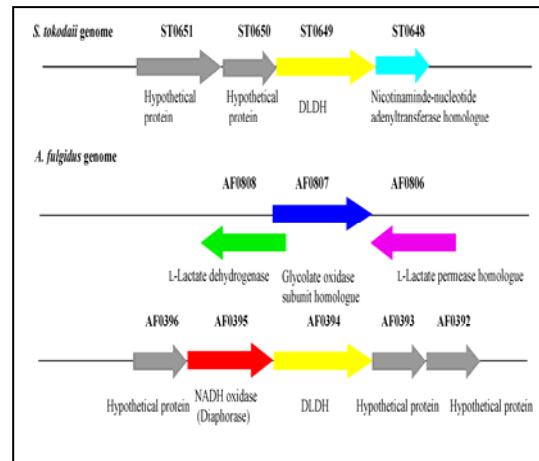
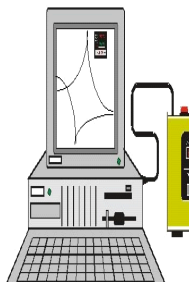


図5. *S. tokodaii* の D-乳酸脱水素酵素(DLDH)の遺伝子(ST0649)とその遺伝子クラスター、及び *A.fulgidus* の DLDH の遺伝子(AF0394)とその遺伝子クラスター。ST0649 産物は AF0394 と AF0807 の産物とそれぞれ 32、39%の相同性がある。

(遺伝子 AF0394)との間の遺伝子クラスターの比較を行うと、AF0394 はエネルギー生産系に機能する NADH 酸化酵素遺伝子(AF0395)を含む 5 遺伝子が同じユニットを組んでいるが、*S.tokodaii* ST0649 は 4 遺伝子が同じユニットを組んでおり、NADH 酸化酵素遺伝子は見当たらない(図5)。クラスターを構成する遺伝子の全ての機能が明確ではないので、明確ではないが、現時点では好気性菌の *S.tokodaii* の D-乳酸脱水素酵素遺伝子クラスターは、嫌気性 *A.fulgidus* の酵素(遺伝子 AF0394)のそれと大きく異なると言えるので、生理的な機能においても、異なると言える。

一方、三次元立体構造が、近年大腸菌の色素依存性 D-乳酸脱水素酵素で決定されている(Dym, O. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 94, 1999)。しかし、この呼吸系の電子伝達系に機能する膜結合性酵素との *S.tokodaii* の D-乳酸脱水素酵素とのアミノ酸の相同性は非常に低いので、立体構造に関しても類似性は低いと予想される。それゆえ、今後、*S.tokodaii* の D-乳酸脱水素酵素の立体構造解明が必要とされる。



(6) 色素依存性の脱水素酵素のバイオセンサーへの応用

この種の FAD 含有脱水素酵素は電気化学的バイオセンサー素子としての利用が期待できる。そこで、我々は高い安定性が高い PDH、及び D-PDH を素子として利用する L-プロリン、及び D-アミノ酸測定用の酵素機能電極型バイオセンサーの開発を進めた。まず、PDH と DCIP を同時固定化した炭素電極からなる機能性電極型 L-プロリン定量用バイオセンサーを設計、構築し、FAD 要求性脱水素酵素を利用する新しいバイオセンサーを開発した (図 6)。

また、肺炎を起こすデジオネラ菌の毒素タンパク質遺伝子を PCR で増幅後、PDH の電極型バイオセンサーを応用して電気化学的に遺伝子量を測定し、循環型温泉水などに含まれる病原菌量を迅速に検出する新規方法を開発した。この方法は、医療、食品、環境分析用センサーへの展開が期待できる。さらに、高度耐熱性 D-ProDH を 70℃ の高温溶液中では

図 6. PDH の固定化電極を用いた L-プロリン測定用電極型バイオセンサーの構成図。円内は LDH と DCIP をグルタルアルデヒド法で固定化した酵素電極を示している。

図 6. PDH の固定化電極を用いた L-プロリン測定用電極型バイオセンサーの構成図。円内は PDH と DCIP をグルタルアルデヒド法で固定化した酵素電極を示している。

溶液状態の熱可逆性ポリマーである寒天溶液を用いスピコーティング法によって酵素を固定化した電極を作成し、それを用いる

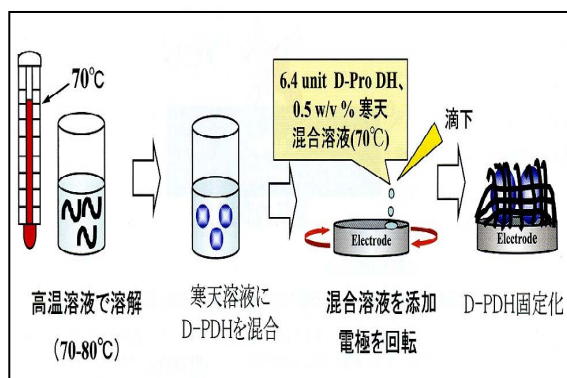


図 7. スピコーティング法による D-プロリン脱水素酵素 (D-PDH) 固定化電極の調製法

D-アミノ酸の電気化学的センサーの開発にも成功した(図 7)。このセンサーの特徴の 1 つは、80℃ の高温状態で 1.5% 寒天液と酵素液を攪拌して調製した液を、回転している電極にたらしながら層状に固定化する方法で酵素電極を調製していることである。つまり寒天液が固まらない 80℃ の温度では、超好熱菌由来の D-プロリン脱水素酵素が熱変性せず、容易に均一に混合できることを生かした方法である。この電極を用い 5-20 mM の D-プロリンが電気量から測定できる。固定化における寒天濃度は 1.5% が最適で、10 mM D-プロリン (DCIP 濃度: 0.5 mM) の応答電流値は 50℃ で 0.15 μ A で、その相対標準偏差は 7.6% であった。応答電流値は 70℃ まで測定温度の上昇とともに増大し、センサーの応答は pH 8 が最適であった。この D-PDH 寒天固定化センサーは 80 日後においても応答電流値の低下は認められず、長期間にわたり安定であった。本センサーは酵素の基質特異性を反映して D-プロリンの他に D-イソロイシン (D-プロリンに対する相対応答電流: 46%)、D-ヒスチジン (29%)、D-ロイシン (19%)、D-バリン (18%) などの数種の D-アミノ酸に応答があったが、D-セリン、D-グルタミン酸、及び L-プロリンには全く応答がなかった。以上、超好熱菌由来の耐熱性 D-ProDH を 1.5% 寒天を用いてスピコーティング法で固定化し酵素電極を作製し、D-プロリンなどの D-アミノ酸の電気化学的測定が可能なバイオセンサーの開発に成功した。このセンサーは、素子であ

る酵素の安定性を反映して、70℃のような高温での使用が可能であるだけでなく、少なくとも 80 日間という長期間安定的に利用できる新しい D-アミノ酸測定用の酵素電極型センサーであり、今後生物試料や食品中の D-プロリンなどの迅速センシングに応用展開が期待できる。

(7) 酵素電池

色素依存性 L-プロリン脱水素酵素を陰極用素子とし、白金電極を陽極とする L-プロリン電池を作成することに成功した。詳細については、まだ研究の進行中であるので、今後さらに詳細を検討を重ね、成果を発表する予定である。

6. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① T. Satomura, R. Kawakami, H. Sakuraba, T. Ohshima, A novel flavin adenine dinucleotide (FAD) containing D-lactate dehydrogenase from the thermoacidophilic crenarcheota *Sulfolobus tokodaii* strain 7: Purification and expression in *Escherichia coli* (2008) *J. Bioci. Bioeng.* 106, 16-21. (査読有)
- ② 大島敏久、櫻庭春彦、川上竜巳、里村武範、津下英明、超好熱性アーキアのフラビン含有アミノ酸脱水素酵素の機能と構造、及び応用 (2008) 日本応用酵素協会 43, 33-44.
- ③ Y. Tani Y, K. Tanaka, T. Yabutani, Y. Mishima, H. Sakuraba, T. Ohshima, J. Motonaka (2008) Development of a D-amino acids electrochemical sensor based on immobilization of thermostable D-proline dehydrogenase within agar gel membrane, *Anal Chim Acta.* **619**, 215-220. (査読有)

- ④ H. Zheng, Y. Hirose, T. Kimura, S. Suye, T. Hori, H. Katayama, J. Arai, R. Kawakami, T. Ohshima (2006) L-Proline sensor based on layer-by-layer immobilization of thermostable dye-linked L-proline dehydrogenase and polymerized mediator, *Sc. Technol. Adv. Materials* **7**, 243-248. (査読有)
- ⑤ 大島敏久 (2006) 超好熱アーキアのフラビン含有色素依存性脱水素酵素の機能と構造解析、及び応用、*ビタミン 80*, 261-271. (査読有)
- ⑥ 津下英明, 川上竜巳、櫻庭春彦、安芸謙嗣、勝沼信彦、大島敏久 (2006) 新規時フラビン脱水素酵素ファミリー: FAD, FMN, ATP結合L-プロリン脱水素酵素複合体の構造と機能、*生化学* **78**, 41-45. (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

- ① 張小冬、原佑介、里村武範、土居克実、櫻庭春彦、大島敏久 (2009.3.28) 内陸性超好熱菌アーキア *Pyrobaculum caldifontis* 由来色素依存性 L-プロリン脱水素酵素 (ProDH) の機能解析、日本農芸化学会 2009 年度大会 (福岡)。
- ② 里村武範、飯塚舜介、櫻庭春彦、大島敏久 (2009.3.28) NMR を用いた超好熱菌アーキア由来色素依存性 D-乳酸脱水素酵素の構造解析、日本農芸化学会 2009 年度大会、福岡市
- ③ 川上竜巳、櫻庭春彦、大島敏久 (2009. 3. 28) 超好熱菌アーキア由来色素依存性 L-プロリン脱水素酵素複合体の構造解析、日本農芸化学会 2009 年度大会、福岡市
- ④ T. Ohshima (2008. 9. 28) The functional and structural characteristics of FAD, FMN, and ATP-containing dye linked

L-prolone dehydrogenase complexes from *Pyrococcus horikoshii*, The 2nd International Interdisciplinary Conference on Vitamins, Coenzymes and Biofactors, University of Georgia, Athens, Georgia, USA.

- ⑤ 大島敏久、谷祐児、田中勝人、藪谷智規、本仲純子、櫻庭春彦 (2008. 9. 20) 高度耐熱性の D-プロリン脱水素酵素の寒天固定化電極による D-アミノ酸の電気化学的センシング、第4回 D-アミノ酸研究会学術講演会、名古屋大学野依記念学術交流館、名古屋市
- ⑤ 大島敏久 (2007. 12. 14) 耐熱性フラビン含有アミノ酸脱水素酵素：機能、構造解析と酵素センサーへの応用、第30回日本分子生物学会・第80生化学合同大会、パシフィコ横浜、横浜市
- ⑥ T. Ohshima、R. Kawakami、H. Sakuraba、H. Tsuge (2006. 11. 16) Dye linked L-prolone dehydrogenase complexes from hyperthermophilic archaea: structure, function and appkication, Japan-Italy Research Cooperative Program: Japan-Italy Symposium of New Trends in Enzyme Science and Technology, Nagoya University, Nagoya, Japan
- ⑧ 大島敏久、里村武範、櫻庭春彦、谷祐児、藪谷智規、本仲純子 (2006. 9) 超好熱菌の膜結合性 D-プロリン脱水素酵素の機能開発、酵素・補酵素研究会、大分県由布院市
- ⑨ 大島敏久、里村武範、櫻庭春彦、谷祐児、藪谷智規、本仲純子 (2006. 9. 9) 超好熱アーキア *Pyrobaculum islandicum* の色素依存性 D-プロリン脱水素酵素の機能解析と応用、第2回 D-アミノ酸研究

会学術講演会、京都大学芝蘭会館稲盛ホール、京都市

[図書] (計1件)

- ① 大島敏久、櫻庭春彦、津下英明(2007)バイオセンサー素子としてのアミノ酸脱水素酵の構造と機能、「構造生物学」、倉光、杉山編、共立出版、pp.184-191.

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 敏久 (OHSHIMA TOSHIISA)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：10093345

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

① 櫻庭 春彦 (SAKURABA HARUHIKO)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：90205823

② 藪谷 智規 (YABUTANI TOMOKI)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス

研究部・准教授

研究者番号：80335786