

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20560730

研究課題名(和文) 好熱菌由来アルドラーゼの探索と糖類関連化合物合成への利用

研究課題名(英文) Screening of thermophilic aldolases and application for the synthesis of sugar related materials

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

研究成果の概要(和文)：高温環境から直接取り出した DNA から、超好熱菌の 2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ(DERA) 遺伝子を PCR により増幅した。得られた断片を、既存の超好熱菌 DERA の発現ベクターの相当配列とスワップし、キメラ酵素の発現系を作成した。大腸菌で発現させた結果、野生型の約 2 倍の高い比活性を持つキメラ酵素の創製に成功した。さらに、超好熱菌由来の 2-ケト-3-デオキシ-D-グルコン酸アルドラーゼの X 線結晶構造解析に成功し、全体構造を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The hyperthermophilic 2-deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase (DERA) gene was amplified from environmental DNA by PCR. These fragments were swapped with corresponding sequence of the known hyperthermophilic DERA gene and the expression vector for the chimera enzyme was constructed. The specific activity of the recombinant chimera DERA produced in *Escherichia coli* was two times higher than that of the wild type enzyme. In addition, we succeeded in determination of the crystal structure of hyperthermophilic 2-keto-3-deoxygluconate aldolases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：構造生物化学, 応用生物化学, 酵素工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：結晶構造解析, 超好熱菌, アーキア

## 1. 研究開始当初の背景

(1) アルドラーゼは可逆的にアルドール縮合反応を触媒する酵素であり、光学活性化合物の合成に利用できる。中でも 2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ(DERA)は、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糖類関連化合物合成への利用が期待されている。アメリカのスクリプス研究所の Wong らにより DERA による各種化合物の合成が研究されているが(*J. Am. Chem. Soc.* 1992, Vol. 114, pp. 741; 1994, Vol. 116, pp8422; 1995, Vol. 117,

pp. 3333)、これまで検討されてきた常温生物由来の酵素は、有機溶媒である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(Jennewein et al., *Biotech. J.*, 2006, Vol. 1, pp. 537)。DERA 以外にも有用性が期待できるアルドラーゼは多数存在するが、産業利用には至っていない。

(2) 一方、高温環境に好んで成育する好熱菌の酵素は、一般に耐熱性が高いだけでなく、有機溶媒や種々の薬品処理などに対しても高い安定性を示す。このため、好熱菌に安定なアルドラーゼが存在すれば、その応用開発の進展が期待できる。我々はこれまでに、*Aeropyrum pernix* に、超好熱菌で初めて DERA を見出した(好熱菌の中でも 100°C 付近で生育可能なものを超好熱菌と呼ぶ)。本酵素はそれまで報告されている中で最も安定性の高い(100°C、10 分の熱処理でも全く失活しない)DERA であった。また X 線結晶構造解析の結果、ユニークなオリゴマー構造がその高い熱安定性に寄与していることを明らかにした(Sakuraba et al., *J. Biol. Chem.*, 2003, Vol. 278, pp. 10799)。

更に、超好熱菌 *Pyrobaculum aerophilum* および *Thermotoga maritima* 由来の DERA についても構造および機能解析を行い、これらが 25°C のような低温であってもアセトアルデヒド 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) の合成においては大腸菌由来の酵素より格段に生産性が優れていることを見出している(国際特開 W02005/098012)。この TEHP は高コレステロール血症治療薬であるスタチンの合成中間体として有効利用できる。構造比較および機能解析の結果から、超好熱菌由来の DERA はアセトアルデヒドに対する高い安定性を持つことが示唆された

(Sakuraba et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, Vol. 73, pp. 7427)。

## 2. 研究の目的

(1) これまでの研究により、超好熱菌由来 DERA は高い安定性と有用性を持つことが明らかとなったが、ゲノム情報を見ると数種類の超好熱菌でしか DERA 遺伝子は確認されておらず、様々な好熱菌由来 DERA の探索と有用性の評価には限界がある。一方、現在まで研究対象とされてきた分離・培養可能な微生物は、環境中微生物全体の 1% 未満に過ぎないと言われており、大量の遺伝子資源が未利用のまま残されている。そこで、環境から直接取り出した DNA (eDNA) を利用することで、これらの遺伝子資源を獲得する試みが進められている。本研究では、様々な高温環境より取得した eDNA からの新規 DERA 遺伝子の獲得とその産物の機能評価を目的とした。

(2) DERA 以外のアルドラーゼに関しては、好気性好酸性好熱菌 *Sulfolobus tokodaii* に高度に安定な 2-ケト-3-デオキシ-D-グルコン酸アルドラーゼ (KDGA) を見出し、これがアラビノース、キシロース、ガラクトースなどの多種類の糖とピルビン酸との間の縮合反応を触媒することを明らかにしている。アラビノースとピルビン酸の縮合産物は 2-ケト-3-デオキシ-D-オクトネート (KDO) であり、グラム陰性菌の細胞壁外層構成成分のリポ多糖 (LPS) にのみ存在する特殊な糖であるため、KDO アナログは LPS の生合成を阻害し、グラム陰性菌に特異的に作用する抗菌剤として利用できる。KDGA は、この KDO アナログなど新規な糖誘導体合成への応用が期待できる。これらの成果をさらに発展させるために、本研究では KDGA の酵素化学的特徴を更に詳細に解明すると共に、結晶構造を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 各種バクテリアやアーキアのゲノム情報から DERA 遺伝子増幅用縮重プライマーを設計する。このプライマーを用いて、各地の熱水土壤から抽出した eDNA サンプルをテンプレートとして PCR を行う。PCR 産物のクローニングを行い、塩基配列を決定する。得られた部分配列と既知の DERA 遺伝子の相当する配列をスワップし、キメラ酵素発現ベクターを作成する。活性発現に成功した酵素を精製し、基質特異性、反応のカイネティクス、安定性などの機能解析を行う。また、有用物質の合成反応を評価する。

(2) *S. tokodaii* 由来の KDGA については ST2235 と ST2479 の 2 種類を見出しており、既にそれぞれの発現系を構築している。大腸菌で発現させた両酵素の酵素化学的性質を詳細に調べる。両酵素のうち、ST2479 については結晶化および位相決定に成功しているので、構造精密化をさらに進め、全体構造を明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) ①鹿児島県桜島周辺海域海底の若尊カルデラ「たぎり」(水深約 200 m) 由来の熱水土壤から抽出した eDNA サンプル 10 種をテンプレートとして PCR を行った。その結果、1 サンプルにおいて遺伝子断片の増幅を確認した。PCR 産物のクローニングを行い、塩基配列を決定した結果、3 種類の異なる配列 (#33、#34、#40) が確認された。予想されるアミノ酸配列は、*Clostridium perfringens* (常温菌)、*Oceanobacillus iheyensis* (好冷菌)、*Thermococcus kodakarensis* (超好熱菌) の DERA と 50~70%の同一性を示した。

大分県玖珠郡九重町小松地獄において採取された 4 種の土壤より eDNA の抽出を行った結果、1 サンプルより抽出が認められた。この eDNA を鋳型とし、PCR を行ったところ、

目的の長さの断片の増幅が確認できた。断片をクローニングし、塩基配列を解析した結果、2 種類の異なる配列が得られ (#2kom3、#3kom3)、予想されるアミノ酸配列は、超好熱細菌 *Thermotoga*、超好熱アーキア *Staphylothermus* および *Thermococcus* の DERA と 56~97%の同一性を示した。

②たぎり由来の土壤より獲得した 3 種の DERA 断片のうち、超好熱菌由来と考えられる 1 断片 (#40) について、*Thermotoga maritima* および *Pyronbaculum aerophilum* 由来 DERA 発現ベクターとスワップし、キメラ酵素を作成したが、活性の有る産物を得られなかった。#40 は、*Tc. kodakaraensis* 由来の酵素と高い相同性を示すため、*Tc. kodakaraensis* DERA の発現ベクターを用いたキメラ酵素 (chimera#40) の作成を行なったところ、DERA 活性を示す産物が得られた。また、小松地獄由来の土壤より獲得した、#2kom3、#3kom3 についても同様にキメラ酵素を作成し (chimera#2kom3、chimera#3kom3)、活性のある産物を得た。これらの酵素を精製し、性質を野生型酵素 (Wild DERA) と比較した。③3 種類のキメラ酵素の熱安定性を比較したところ、いずれにおいても Wild DERA に比べ安定性の低下が認められた (図 1)。

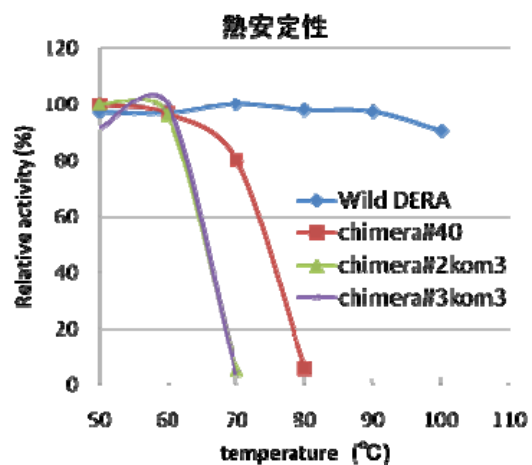


図 1 熱安定性の比較

このうち chimera#40 の熱安定性は、野生型 (90°Cまで安定) に比べ劣っていたが、キメラ酵素の中では、最も耐熱性に優れていた (70°Cまで安定)。

アセトアルデヒドに対する安定性を調べたところ、25°C、300 mM、1 時間の処理条件で Wild DERA 47%の残存活性があるのに対し、chimera#40 は 3%まで活性が低下し、耐性が低いことがわかった。chimera#2kom3 および chimera#3kom3 では約 30%の残存活性があり、耐性が認められた。アセトアルデヒドの 3 分子縮合による THEP の合成反応について調べた結果、Wild DERA は THEP を生産したが、キメラ酵素ではその生産を確認することができなかった (表 1)。Deoxyribose 合成反応については chimera#40 のみに Wild DERA と同様の生産が認められた。

一方、キメラ酵素の比活性を比較すると chimera#2kom3、chimera#3kom3 は Wild DERA の約 1/2 であるのに対し、chimera#40 は野生型の 2 倍の高い活性を示すことが明らかとなった (表 1)。

表 1 キメラ酵素の性質の比較

測定50°C Tris/HCl (pH8.0)	Wild DERA	chimera#40	chimera#2kom3	chimera#3kom3
比活性	0.411 U/mg (70°C熱処理)	0.932 U/mg (70°C熱処理)	0.23 U/mg (60°C熱処理)	0.19 U/mg (60°C熱処理)
熱安定性	100°C 90%	70°C 80%	60°C 96% 70°C 5%	60°C 100% 70°C 4%
acetaldehyde 耐性	1.0h 47%	0.5h 12% 1.0h 3%	0.5h 33% 1.0h 29%	0.5h 27% 1.0h 30%
acetaldehyde 縮合反応	○	×	×	×
Deoxyribose 合成反応	○	○	×	×

本研究により、設計した DERA 増幅用縮重プライマーによる PCR を用いて、eDNA から効率的に DERA 遺伝子を取得することに成功した。また PCR スワッピング法を用いてキメラ酵素を作製することにより新規配列の評価系を確立した。得られたキメラ酵素は、すべて DERA 活性を示したが、熱安定性は野生型に比べて劣っていた。しかしながら、作成したキメラ酵素のなかで最も高い安定性を示

した chimera#40 は、野生型の約 2 倍の高い比活性を持っており、eDNA を利用することにより、高活性酵素の創製に成功した。

(2) ① *S. tokodaii* 由来の 2 種類の KDGA (ST2235、ST2479) を大腸菌で発現させ、精製した酵素の酵素化学的性質を比較した。ST2479 は 95°C、3 時間の処理でも全く失活せず、100°C、3 時間の処理でも 90%の残存活性を示した (図 2)。また、pH 4 - 12 の広範囲にわたって安定であり、高い有用性を示した (図 3)。ST2235 もほぼ同様の安定性を示し、95°C、3 時間の処理で 90%の残存活性があり、pH 4 - 12 の間で安定であった。

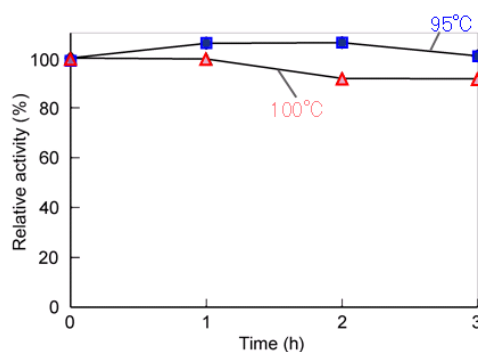


図 2 ST2479 の熱安定性

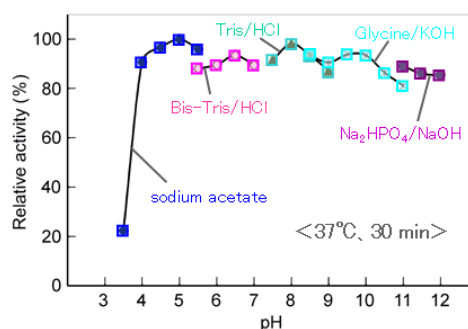


図 3 ST2479 の pH 安定性

両酵素の基質特異性の詳細を表 2 に示す。両酵素共に類似した性質を示したが、グラム陰性菌に特異的に作用する抗菌剤として利用できる KDO の分解に対する反応性は ST2235 が ST2479 の約 2 倍の値を示した。一方、KDO の合成 (pyruvate + arabinose) については

ST2479 が ST2235 の約 1.7 倍の値を示し、生産性に優れていた。

表 2 キメラ酵素の基質特異性の比較

Substrate	Relative activity (%)	
	ST2235	ST2479
Cleavage reaction (10 mM)		
2-keto-3-deoxy-D-gluconate (KDG)	100	100
2-keto-3-deoxy-D-octonate (KDO)	60	34
<i>N</i> -acetylneuraminic acid	0	0
Condensation reaction (20 mM)		
D,L-glyceraldehyde	100	100
glycolaldehyde	550	396
D,L-glycolaldehyde-3-phosphate	(122)	(122)
D-xylose	0.6	0.6
D-arabinose	0.3	0.5
L-arabinose	0	0.6
D-glucose	0.4	++
D-galactose	0.2	0.2
D-mannose	0.1	++

②ST2479 について 3.05 Å の分解能で結晶構造解析に成功した。結晶の空間群は P2<sub>1</sub> で格子定数は a = 55.3 Å, b = 130.8 Å, c = 80.8 Å, α = 90°, β = 106.2°, γ = 90°であった。本酵素は結晶中で 4 量体を形成しており、全体としてリング状の 4 次構造を持っていた。また、モノマーは典型的な αβバレル構造をとっており、既知のアルドラーゼと類似したフォールドを持つことが明らかとなった。

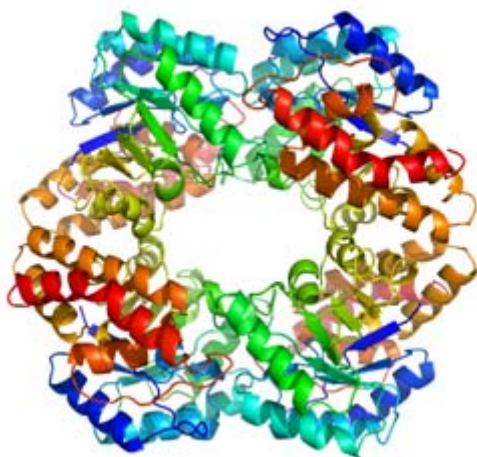


図 4 ST2479 の全体構造



図 5 ST2479 のモノマー構造

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① T. Satomura, X. Zhang, Y. Hara, K. Doi, H. Sakuraba, T. Ohshima, Characterization of a novel dye-linked L-proline dehydrogenase from anaerobic hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum calidifontis*, Appl. Microbiol. Biotech., 査読有, Vol. 89, 2010, 1075-1082
- ② K. Yoneda, H. Sakuraba, I. Muraoka, T. Oikawa, T. Ohshima, Crystal structure of UDP-galactose 4-epimerase-like L-threonine dehydrogenase belonging to the intermediate short-chain dehydrogenase-reductase superfamily, FEBS J., 査読有, Vol. 277, 2010, 5124-5132
- ③ T. Satomura, H. Sakuraba, Y. Hara, T. Ohshima, Crystallization and preliminary X-ray analysis of a novel dye-linked L-proline dehydrogenase from the aerobic hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*, Acta. Cryst. F, 査読有, Vol. 66, 2010, 1508-1510
- ④ H. Sakuraba, K. Yokono, K. Yoneda, A. Watanabe, Y. Asada, T. Satomura, T. Yabutani, J. Motonaka, T. Ohshima, Catalytic properties and crystal structure of quinoprotein aldose sugar dehydrogenase from hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*, Arch. Biochem. Biophys., 査読有, Vol. 502, 2010, 81-88
- ⑤ K. Yoneda, J. Fukuda, H. Sakuraba, T. Ohshima, The first crystal structure of L-lysine 6-dehydrogenase as an NAD-dependent amine dehydrogenase, J. Biol. Chem., 査読有, Vol. 285, 2010, 8444-8453
- ⑥ H. Sakuraba, K. Yoneda, T. Satomura, R.

- Kawakami, T. Ohshima, Structure of a D-tagatose 3-epimerase-related protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, Acta. Cryst. F, 査読有, Vol. 65, 2009, 199-203
- ⑦ R. Kawakami, H. Sakuraba, S. Goda, H. Tsuge, T. Ohshima, Refolding, characterization and crystal structure of (S)-malate-dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*, Biochim. Biophys. Acta, 査読有, Vol. 1794, 2009, 1496-1504
- ⑧ 櫻庭春彦、大島敏久、超好熱菌アルドラーゼが触媒するアルドール縮合反応、日本生物工学会誌、査読有, Vol. 86, 2008, 165-167
- ⑨ H. Sakuraba, K. Yoneda, I. Asai, H. Tsuge, N. Katunuma, T. Ohshima, Structure of L-aspartate oxidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii*, Biochim. Biophys. Acta, 査読有, Vol. 1784, 2008, 563-571

〔学会発表〕(計 2 件)

- ① 櫻庭春彦、超好熱菌酵素の機能・構造解析と応用、日本農芸化学会中部支部第158回例会(シンポジウム)、2010年6月26日、石川県女性センター
- ② 佐藤杏子、櫻庭春彦、大島敏久、環境試料由来新規アルドラーゼ遺伝子の探索、日本農芸化学会中四国支部2008年度支部大会、2008年9月13日、鳥取大学・農学部

〔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・教授

研究者番号：90205823

### (2) 連携研究者

大島 敏久 (TOSHIHISA OHSHIMA)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：10093345