

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05834

研究課題名(和文)新規反応を触媒する色素依存性L-グルタミン脱水素酵素の機能開発と応用

研究課題名(英文)Characterization and application of novel dye-linked L-glutamate dehydrogenase

研究代表者

里村 武範 (Satomura, Takenori)

福井大学・学術研究院工学系部門・教授

研究者番号：50412317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：色素依存性L-グルタミン酸脱水素酵素(Dye-GluDH)は人工電子受容体存在下でL-グルタミン酸の酸化反応を触媒する酵素である。本酵素は人工電子受容体を介して基質の電子を電極へ伝達することが可能であることからL-グルタミン測定用バイオセンサ用素子として応用可能である。そこで、様々な種類の微生物を対象にDye-GluDHのスクリーニングを行った結果、好熱菌Geobacillus kaustophilus菌体内よりDye-GluDH活性を見出すことに成功した。さらに、本申請ではDye-GluDHの大腸菌によるタンパク質発現系の構築、バイオセンサ用素子としての機能評価にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請で見出したDye-GluDHは、L-グルタミン酸を電気化学的に測定可能なバイオセンサを開発するうえで非常に高い有用性を示した。L-グルタミン酸は、食品の品質管理に有用なインジケータ、また、様々な病気に対する重要なバイオマーカーになることが知られている。これまでに、L-グルタミン酸を測定可能な最適なバイオセンサ用素子は、見出されていなかった。本申請で見出したDye-GluDHを用いてバイオセンサを構築できれば、これまでには無い簡便で高感度にL-グルタミン酸測定用のバイオデバイスの開発が可能となる。

研究成果の概要(英文)：The dye-linked L-glutamate dehydrogenase (Dye-GluDH) is an enzyme that catalyzes the oxidation of L-glutamate in the presence of artificial electron acceptors. This enzyme can transfer electrons from the substrate to an electrode via an artificial electron acceptor, making it possible to use as an element for an L-glutamate biosensor. However, the existence of an enzyme showing Dye-GluDH activity has not been reported so far. Therefore, we have screened Dye-GluDH in various microorganisms. As a result, we successfully detected Dye-GluDH activity in the thermophilic bacterium Geobacillus kaustophilus. We also succeeded in the construction of a recombinant protein expression system for G. kaustophilus Dye-GluDH in Escherichia coli, analysis of the detailed enzymatic properties, and evaluation of the Dye-GluDH as an element for L-glutamate biosensor.

研究分野：応用生物化学

キーワード：酸化還元酵素 L-グルタミン酸 バイオセンサ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

色素依存性脱水素酵素 (Dye-DH) は、糖、アミノ酸などの生体成分物を酸化し、抽出された基質の電子を人工の酸化還元色素に伝達することができる。この反応を利用して、人工酸化還元色素を電子伝達メディエータとすることで酵素反応と電極と結びつけることが可能になる。このことから Dye-DH は生体成分の濃度を電気化学的信号として簡便に検出するバイオセンサ用素子としての応用が期待される。

しかし、現在までに報告されている Dye-DH のほとんどは、酵素の安定性に問題があり、バイオセンサやバイオ電池用素子としての応用利用例は、同じ酸化還元酵素である NAD(P) 依存性脱水素酵素に比べて大幅に遅れている。そこで、研究代表者は安定性の高い酵素が数多く報告されている好熱菌に着目して、Dye-DH の機能開発を進めてきた。その結果、好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* に L-グルタミン酸を基質とする色素依存性 L-グルタミン酸脱水素酵素 (Dye-GluDH) 活性を見出すことに成功した。これまで L-グルタミン酸を基質とできる Dye-DH の存在は報告されておらず、本酵素の酵素化学的性質を明らかにすることができれば新規なバイオセンサ用素子として応用が可能となる。本研究では、新たに *G. kaustophilus* より見出した Dye-GluDH の大腸菌によるタンパク質発現系の構築を行い、詳細な酵素化学的性質の解析、バイオセンサ応用への応用面の開発につながることを目的として研究を進めた。

### 2. 研究の目的

L-グルタミン酸は食品中のうまみ成分として機能しており食品の品質管理の指標として重要な成分である。また、生体内においては興奮性の神経伝達物質として働き、記憶・学習などの脳高次機能に重要な役割を果たしていることが知られている。さらに、L-グルタミン酸は過剰に摂取すると急性神経毒性を示すことが報告されており、その体内における生理活性は、グルタミン酸摂取量と密接な関係があることが明らかとなっている。これらのことから、L-グルタミン酸は、これらに起因する神経系疾患のバイオマーカーとして期待されている。ゆえに食品、医療などの分野において、L-グルタミン酸を数値化するバイオセンサへの応用が期待されている。

これまでにグルタミン酸を定量可能なバイオセンサ用素子としてはグルタミン酸オキシダーゼ (GOX)、NAD(P) 依存性グルタミン酸脱水素酵素 (NAD(P)-GluDH) が報告されており、グルタミン酸定量用試薬として市販されている。しかしながら、これらの酵素を用いた L-グルタミン酸の測定は、高価な NAD を必要としたり、NAD と酵素の共役反応系を用いることによる測定誤差の問題や、生体内の溶存酸素量により測定誤差を生じやすい酸素を電子受容体として利用しなければならぬといった課題があった。

これらの課題から、高い感度で簡便に測定可能な GOx や NAD(P)-GluDH に代わる新たな L-グルタミン酸の測定用バイオセンサ用素子の開発が望まれている。これらの課題を解決する手段として色素依存性脱水素酵素 (Dye-DH) を素子としたバイオセンサが挙げられる。Dye-DH とは、FAD や FMN を補酵素として有しており、オキシダーゼや NAD(P) 依存性脱水素酵素とは異なり、2,6-ジクロロインドフェノールのような人工の酸化還元色素を電子受容体とし基質の酸化反応を行う酵素である。Dye-DH はこの人工酸化色素を電子伝達メディエータとすることで基質の電子を電極へ伝達することが可能である。このことから、高感度、簡便に基質の濃度を電気化学的に測定可能なバイオセンサ用素子として注目されている。しかしながら、これまでに、L-グルタミン酸を基質とできる Dye-DH の報告例は無くバイオセンサへの応用例は無い。

そこで、我々は様々な生物種から Dye-GluDH の探索を行った。その結果、好熱菌 *G. kaustophilus* から調製した粗酵素液から Dye-GluDH 活性を検出することに成功した。上述のように、これまでに Dye-GluDH はどの生物種からも報告例がなく、新規な酵素であると考えられる。そこで、本研究では *G. kaustophilus* 由来 Dye-GluDH の詳細な性質の解析を行い、バイオセンサ用素子としての評価を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) *G. kaustophilus* 由来 Dye-GluDH をコードする遺伝子の同定と組換えタンパク質の発現

好熱菌 *G. kaustophilus* 菌体内に存在する Dye-GluDH 活性を有する酵素をコードする遺伝子を見出すために、*G. kaustophilus* の菌体を培養し、菌体内より Dye-GluDH の部分精製を行い、N 末端アミノ酸配列の同定を行った。

同定できた Dye-GluDH と考えられるタンパク質の N 末端アミノ酸配列より Dye-GluDH をコードしている遺伝子情報を *G. kaustophilus* ゲノム情報より抽出した。この Dye-GluDH 遺伝子情報を用いて大腸菌によるタンパク質発現系を構築した。

構築した大腸菌を宿主とした Dye-GluDH の発現系を用いて組換えタンパク質の発現を行った。発現した組換えタンパク質をウエスタンブロット解析で確認した。

(2) *G. kaustophilus* 由来組換え Dye-GluDH の精製と酵素化学的性質の解析

発現が確認できた組換えタンパク質をニッケルアフィニティクロマトグラフィーによって単一に精製し、精製酵素を用いて基質特異性、電子受容体特異性、 $K_m$  値の測定などの酵素化学的性質の解析を行った。

(3) Dye-GluDH の電気化学的性質の解析

精製した Dye-GluDH をグラッシーカーボン (GC) 電極上に修飾した Dye-GluDH/GC 電極を作成し Dye-GluDH の電極上での触媒能を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) *G. kaustophilus* 由来 Dye-GluDH 活性を有するタンパク質の同定と大腸菌を宿主とする組換えタンパク質の発現

*G. kaustophilus* 由来 Dye-GluDH 活性を有する酵素の同定を行うために *G. kaustophilus* を培養し、菌体内より粗タンパク液を抽出し Dye-GluDH の部分精製を行った。部分精製酵素について SDS-PAGE を行い、N 末端アミノ酸配列の解析を行った。その結果、Dye-GluDH 活性を有すると考えられる数種類のタンパク質の N 末端アミノ酸配列を同定することができた。これら同定できた N 末端アミノ酸配列情報を基に *G. kaustophilus* ゲノムデータベースより遺伝子の同定を行ったところグルタミン酸合成酵素 (GltS) のサブユニットの一部と一致した。そこで、GltS をコードする遺伝子を大腸菌組換えタンパク質発現用ベクターである pET15b に挿入した組換えタンパク質発現系 (GltS-pET15b) を構築した。本発現ベクターを *E. coli* BL21 CodonPlus (DE3) RIPL に導入し LB 培地で培養後、組換えタンパク質発現を行った。その後、超音波破碎により細胞を破碎し、粗酵素液を調製し SDS-PAGE を行い組換えタンパク質の発現確認を行った。その結果、明確な組換えタンパク質の発現が確認できた。さらに、この粗酵素液に対し、ニッケルアフィニティクロマトグラフィーを行ったところ、精製酵素を得ることに成功した。この精製タンパク質について Dye-GluDH 活性を測定したところ酵素活性も確認することができた。このことから *G. kaustophilus* が有する Dye-GluDH 活性は GltS であることが明らかになった。

(2) Dye-GluDH の酵素化学的性質の解析

精製した組換えタンパク質を用いて詳細な酵素化学的性質を解析した。大腸菌によって発現した組換え Dye-GluDH を Native-gradient PAGE に供し、分子量を測定し、SDS-PAGE によってサブユニットの分子量を測定した結果、本酵素は単量体構造を取っていることが明らかとなった。本酵素の補酵素を HPLC で解析した結果、補酵素として FMN を有していることが判明した。また、本酵素の安定性について検討した結果、40、10 分の処理においては失活せず、60 においては約 24% の残存活性を示した。さらに、基質特異性について検討した結果、L-グルタミン酸に高い特異性を示した。また、電子受容体特異性を調べたところ、人工の酸化還元色素を利用することができたが、NADP、NAD、酸素には、まったく反応性を示さなかった。このことから、本酵素は、これまで見出されている GOX、NAD(P)-GluDH とは異なる新規な反応を触媒する酵素であることが確認できた。以上の結果より、本酵素は、これまで報告されている GOX、NAD(P)-GluDH に代わる L-グルタミン酸定量用バイオセンサ用素子として有用性が高いことが明らかとなった。

(3) Dye-GluDH のバイオセンサ用素子としての解析

Dye-GluDH を GC 電極上に物理吸着によって修飾した Dye-GluDH/GC 電極を作成し、酵素化学的性質の解析を行った際に使用した様々な電子受容体メディエータを電子受容体として用いて電気化学的評価を行った。Dye-GluDH/GC 電極を用いてサイクリックボルタメトリー (CV) 測定を行った結果、基質である L-グルタミン酸存在下での電子伝達メディエータの酸化還元波の上昇が認められた。このことから、Dye-GluDH を素子とした電極を用いることによって L-グルタミン酸を電気化学的に測定することが可能であることが明らかとなった。現在、この酵素を用いたエレクトロケミカルデバイスの構築を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>岩田 峻弥、伊藤 佑衣、櫻庭 春彦、大島 敏久、里村 武範、末 信一朗 |
| 2. 発表標題<br>好熱菌由来色素依存性L-グルタミン酸脱水素酵素の性質の解析       |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2022年度大会                     |
| 4. 発表年<br>2022年                                |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>伊藤佑衣, 里村武範, 岩田峻弥, 櫻庭春彦, 大島敏久, 末信一朗 |
| 2. 発表標題<br>好熱菌由来色素依存性L-グルタミン酸脱水素酵素の酵素化学的性質の解析 |
| 3. 学会等名<br>極限環境生物学会2020年度（第21回） 年会            |
| 4. 発表年<br>2020年                               |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|