

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15432

研究課題名（和文）難発現性モリブデン酵素の汎用的異種発現系の確立と機能解析

研究課題名（英文）Establishment of a general heterologous expression system for difficult-to-express molybdenum enzymes and their functional analysis.

研究代表者

竹内 道樹 (Takeuchi, Michiki)

京都大学・農学研究科・特定助教

研究者番号：40766193

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）：モリブデン酵素は、様々な反応を触媒するユニークな酸化還元酵素であり、その反応の多様性から、幅広い分野に応用可能な酵素である。Rhodococcus erythropolisを異種発現として用いることで、ウラシル/チミンデヒドロゲナーゼ、キサンチンオキシダーゼ、ポリフェノールデヒドロキシラーゼの異種発現（一部同種）に成功した。活性型での異種発現条件を検討した結果、モリブデン酸の添加やコドン頻度の最適化が活性型での異種発現において重要であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モリブデン酵素は、様々な反応を触媒するユニークな酸化還元酵素であり、その反応の多様性から、幅広い分野に応用可能な酵素である。例えば、ギ酸脱水素酵素による二酸化炭素が還元や、腸内細菌のポリフェノール脱水素酵素による腸内代謝など、環境分野や健康分野といった様々な分野に關与する重要な酵素である。モリブデン酵素の活性型での異種発現に関する知見は、モリブデン酵素の学術的知見を深めるうえで必要不可欠であり、その応用は幅広い分野に役立ち、社会的意義が高いものである。

研究成果の概要（英文）：Molybdenum enzymes are unique redox enzymes that catalyze a variety of reactions. By using Rhodococcus erythropolis as a heterologous expression, I succeeded in heterologous (partially homologous) expression of uracil/thymine dehydrogenase, xanthine oxidase, and polyphenol dehydroxylase. After examining the conditions for heterologous expression in the active form, I found that the addition of molybdic acid and optimization of codon frequency were important for heterologous expression in the active form.

研究分野：応用微生物学

キーワード：モリブデン酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

モリブデン酵素は、モリブデンコファクター (MoCo) を含有する酸化還元酵素であり、様々な酸化還元反応を触媒することから、幅広い分野に応用可能なユニークな酵素である。含有する MoCo の種類により、キサンチンオキシダーゼファミリー、亜硫酸酸化酵素ファミリー、DMSO 還元酵素ファミリーの3つに分類される。モリブデン酵素は、組換えホストの MoCo の供給能力不足や、発現時に封入体を形成するといった相性の悪さから、組換え微生物での発現が難しい。特に、DMSO 還元酵素ファミリーに属するモリブデン酵素は、酸素により不活性化する場合が多く、酵素精製が困難である場合が多い。そのため、汎用的に使える遺伝子工学的基盤の構築が求められていた。

2. 研究の目的

難発現性モリブデン酵素の発現における *Rhodococcus* 発現系の汎用性の確認・拡張することで、「難発現性モリブデン酵素を活性型で異種発現できる汎用的なシステムの構築」を行う。さらに、構築した発現系を用いて、特に、酸素感受性のモリブデン酵素 (DMSO 還元酵素ファミリー) の異種発現を行い、酵素の機能解析することで、モリブデン酵素の学術的知見を広げる。

3. 研究の方法

異種発現の報告例がない下記の種々のモリブデン酵素・タングステン酵素について、主に *Rhodococcus erythropolis* L88 をホストとし、異種発現を試みた。活性型での異種発現および組み換え酵素の精製に成功した場合は、酵素の諸性質解明を行った。

4. 研究成果

(1) ウラシル/チミンデヒドロゲナーゼ (UTDH)

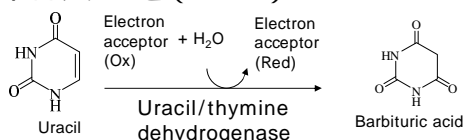


図1 UTDH が触媒する反応

同種発現になるが、*Rhodococcus erythropolis* 由来の UTDH (図1) を *R. erythropolis* L88 で発現させた。SDS-PAGE により発現は確認できたが、活性を確認できなかったため、培養時の金属の添加効果を検討したところ、モリブデン酸ナトリウム (Na_2MoO_4) の添加により、活性を確認することができた (図2)。L サブユニットの C 末端に His-tag を付与すると活性を失うことも明らかにした。His-tag を付与していない組み換え UTDH を、イオン交換クロマトグラフィーに供したところ、サブユニットが分離してしまい、精製は困難であった。元株から UTDH を精製する際と挙動が異なっており、組み換え酵素と元の酵素に何らかの違いがあることが予想された。

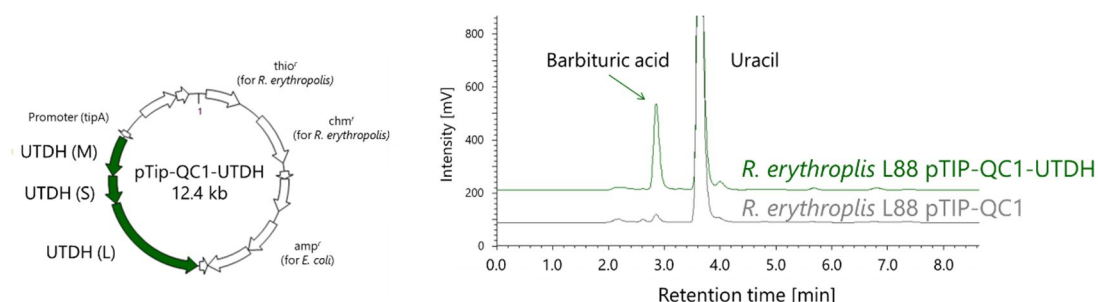


図1 *Rhodococcus erythropolis* における UTDH の発現と活性の確認

(2) キサンチンオキシダーゼ

モリブデン酵素である *Cellulosimicrobium funkei* 由来キサンチンオキシダーゼについて、*Escherichia coli* Rosetta2 (DE3) を用いた異種発現を検討したところ、活性を確認することはできなかった。ホストを *R. erythropolis* L88 に変更し、異種発現を検討したところ、活性発現に成功した。モリブデンバインディングサブユニットの C 末端に His-tag を付与したところ、活性を保持しており、アフィニティークロマトグラフィーにより精製が可能であった。本酵素の諸性質解明について学術雑誌に報告した[1]。

(3) ギ酸デヒドロゲナーゼ

Methylobacterium 由来ギ酸デヒドロゲナーゼは、タングステノプテリンを有し、ギ酸を基質と

してメチルピオロゲンを還元することができるユニークな酵素である。*Methylobacterium* 由来ギ酸デヒドロゲナーゼについて、増幅した遺伝子を *R. erythropolis* 用プラスミドベクターに組み込み、*R. erythropolis* での異種発現を行ったが、活性は確認できなかった。さらに、本酵素遺伝子のコドン頻度の最適化を行い、再度異種発現を検討したところ、SDS-PAGE により発現を確認することができたが、活性を確認することはできなかった。また、低温発現、タングステン酸トランスポーター (tupABC) の共発現、Fe-S クラスター合成に必要な化合物の添加など、活性発現条件検討も実施したが、いずれも活性は確認できなかった。*Methylobacterium* 由来ギ酸デヒドロゲナーゼは、異種発現が困難であると考え、*Methylobacterium* での発現系を構築した。*R. erythropolis* における異種発現が難しい場合の代替ホストとして、今後の検討に用いる予定である。

(4) アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ

申請者が藍染め染色液より独自に取得したインジゴ還元菌が、アセトアルデヒドを電子供与体としてメチルピオロゲン(インジゴと酸化還元電位が同等)を還元することを明らかにし[2]、本反応に関与するアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼはモリブデン酵素と予想される。このことから、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼがインジゴ還元酵素と推定し、本酵素の異種発現に取り組んだ。まずは本菌からモリブデン酵素のアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子を増幅し、*R. erythropolis* 用プラスミドベクターに組み込み、*R. erythropolis* での異種発現を行ったが、活性は確認できなかった。そのためコドン頻度の最適化を実施し、異種発現の検討を行った。SDS-PAGE では発現を確認できなかったが、活性評価に供した。活性評価方法としては、電気化学測定のカイクリックボルタンメトリーを使用した。アセトアルデヒド添加時のメチルメチルピオロゲンをメディエータとする酸化触媒電流、還元触媒電流の有無で活性評価した。一度は触媒電流が観察されたものの、再現性が取れず *R. erythropolis* での異種発現に成功したとは言い難い結果となった。菌体における発現量や活性発現が安定しないのがその要因と考えられ、培養条件の検討や、菌体濃度を上げる工夫などが解決策としてあげられる。

また、モリブデン酵素の応用について検討すべく、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼが関与する、藍染め染色液を用いて微生物燃料電池の構築を検討し、成功した[3]。本成果については、論文を投稿・報告した。また、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼが関与する、藍染め染色液を用いて、基質であるインジゴを検出するセンサの構築を検討し、成功した。本成果については、論文を投稿・報告した[4]。

(5) ポリフェノールデヒドロキシラーゼ

2種類のポリフェノールデヒドロキシラーゼ(と)について、*R. erythropolis* L88 における異種発現を検討した。ポリフェノールデヒドロキシラーゼ遺伝子 は、*R. erythropolis* L88 における異種発現を検討したところ、Native の遺伝子配列で活性を確認することができた。続いてポリフェノールデヒドロキシラーゼ遺伝子 について、*R. erythropolis* L88 における異種発現を検討したところ、Native の遺伝子配列では活性を確認できなかった。また、元菌のシャペロンの共発現も試みたが、シャペロンの共発現株は生育が著しく悪く、活性を確認できなかった。と でコドン頻度が異なっていたため、ポリフェノールデヒドロキシラーゼ遺伝子 について、コドン頻度を最適化したところ、菌体濃度を上げ、反応時間を長くすることにより、活性を確認することができた。このことから、*R. erythropolis* におけるモリブデン酵素の異種発現では、コドン頻度の最適化が重要な因子の一つであることがわかった。また、培養時にモリブデン酸を添加したところ、予想に反して活性は減少したことから、モリブデン酸の添加は必須ではなく、評価するモリブデン酵素によって、添加の影響を調べる必要があることがわかった。

[1] Kozono, I., **M. Takeuchi**, S. Kozono, A. Satomura, W. Aoki, M. Hibi, J. Ogawa. "Characterization of xanthine oxidase from *Cellulosimicrobium funkei* possessing hypoxanthine metabolizing activity." *J. Appl. Microbiol.*, 130(6), 2132-2140 (2021).

[2] Nakagawa, K., **M. Takeuchi**, M. Kikuchi, S. Kiyofuji, M. Kugo, T. Sakamoto, K. Kano, J. Ogawa, E. Sakuradani. "Mechanistic Insights into Indigo Reduction in Indigo Fermentation: A Voltammetric Study." *Electrochemistry*, 89(1), 25-30 (2021).

[3] Kikuchi, M., K. Sowa, K. Nakagawa, M. Matsunaga, A. Ando, K. Kano, **M. Takeuchi***, E. Sakuradani. "Indigo-mediated semi-microbial biofuel cell using an indigo-dye fermenting suspension." *Catalysts*, 11(9), 1080 (2021). *Corresponding author

[4] Kikuchi, M., K. Sowa, **M. Takeuchi***, K. Nakagawa, M. Matsunaga, A. Ando, K. Kano, J. Ogawa, E. Sakuradani. "Quantification of leuco-indigo in indigo-dye-fermenting suspension by normal pulse voltammetry." *J Biosci Bioeng*, 134(1), 84-88 (2022). *First author

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Kikuchi, M., K. Sowa, M. Takeuchi, K. Nakagawa, M. Matsunaga, A. Ando, K. Kano, J. Ogawa, E. Sakuradani.	4. 巻 134
2. 論文標題 Quantification of leuco-indigo in indigo-dye-fermenting suspension by normal pulse voltammetry	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Biosci Bioeng	6. 最初と最後の頁 84-88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2022.04.009	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 M. Kikuchi, K. Sowa, K. Nakagawa, M. Matsunaga, A. Ando, K. Kano, M. Takeuchi, E. Sakuradani	4. 巻 11
2. 論文標題 Indigo-mediated semi-microbial biofuel cell using an indigo-dye fermenting suspension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Catalysts	6. 最初と最後の頁 1080
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/catal11091080	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 -
1. 著者名 K. Nakagawa, M. Takeuchi, M. Tada, M. Matsunaga, M. Kugo, S. Kiyofuji, M. Kikuchi, K. Yomota, T. Sakamoto, K. Kano, J. Ogawa, E. Sakuradani	4. 巻 86
2. 論文標題 Isolation and characterization of indigo-reducing bacteria and analysis of microbiota from indigo fermentation suspensions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem	6. 最初と最後の頁 273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab209	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 Kozono, I., M. Takeuchi, S. Kozono, A. Satomura, W. Aoki, M. Hibi, J. Ogawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Characterization of xanthine oxidase from Cellulosimicrobium funkei possessing hypoxanthine metabolizing activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jam.14891	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 Nakagawa, K., M. Takeuchi, M. Kikuchi, S. Kiyofuji, M. Kugo, T. Sakamoto, K. Kano, J. Ogawa, E. Sakuradani	4. 巻 89
2. 論文標題 Mechanistic Insights into Indigo Reduction in Indigo Fermentation: A Voltammetric Study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Electrochemistry	6. 最初と最後の頁 25-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5796/electrochemistry.20-00123	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 Nakagawa, K., M. Takeuchi, M. Kikuchi, M. Tada, T. Sakamoto, K. Kano, J. Ogawa, E. Sakuradani	4. 巻 -
2. 論文標題 Voltammetric in-situ monitoring of leuco-indigo in indigo-fermenting suspensions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Biosci Bioeng	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2021.01.005	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 竹内道樹, 中川香澄, 菊地真由, 宋和慶盛, 松永桃花, 阪本鷹行, 安藤晃規, 小川 順, 加納健司, 櫻谷英治
2. 発表標題 藍染め染色液の電気化学的解析と微生物燃料電池への応用
3. 学会等名 電気化学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------