

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：13102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580106

研究課題名(和文) 耐熱性を有する新奇な D - アミノ酸オキシダーゼの探索と機能解析

研究課題名(英文) Isolation and characterization of thermostable D-amino acid oxidase

研究代表者

高橋 祥司 (Takahashi, Shouji)

長岡技術科学大学・工学部・准教授

研究者番号：90324011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000 円、(間接経費) 1,320,000 円

研究成果の概要(和文)：D-アミノ酸オキシダーゼ(DAO)は、D-アミノ酸の光学分割や医薬品中間体の合成など様々な応用的利用が可能なることから、安定性の高いDAOが強く求められている。

申請者は、好熱菌 *Rubrobacter xylanophilus* に DAO ホモログ遺伝子 (RxDAO) を見出し、大腸菌における発現産物の解析から、RxDAO が既存の DAO よりも非常に高い安定性を有することを明らかにした。さらに、他の好熱菌や好熱性真菌にも DAO ホモログ遺伝子を見出し、新たな高い安定性を有する DAO が存在する可能性を示した。本研究により得られた成果により、DAO の産業的利用を推進するための基盤を築くことができた。

研究成果の概要(英文)：D-Amino acid oxidase (DAO) is a biotechnologically important enzyme that can be used for various applications, such as the determination of D-amino acids and the production of pharmaceutical intermediates. Therefore, a highly stable DAO has been desired.

In this study, we identified a DAO homologous gene (RxDAO) in the thermophilic bacterium *Rubrobacter xylanophilus*, and showed that the gene product produced in *E. coli* has a much higher stability than known DAOs. In addition, we identified DAO homologous genes in another thermophilic bacterium and also in a thermophilic fungus, showing the possibility of the additional existence of other highly stable DAOs. In conclusion, we successfully identified a novel, highly stable DAO useful for practical applications in various industrial fields.

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：D-アミノ酸オキシダーゼ 耐熱性酵素 好熱菌 *Rubrobacter xylanophilus* D-アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

D-アミノ酸オキシダーゼ (DAO) は、D-アミノ酸の酸化脱アミノ反応を触媒する補酵素としてフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) を有する酵素である。DAO は、D-アミノ酸の検出・定量、アミノ酸ラセミ体混合物の光学分割や光学純度測定、ケト酸や7-アミノセファロsporin酸などの医薬品中間体の合成に利用可能である。さらに、ガンなどの疾病の治療への応用も研究されている。このように、DAO は多様な応用的利用が可能な非常に有用な酵素であるが、その低い安定性から産業上における利用が困難な状況にある。したがって、高い安定性を有する DAO が現在求められている。

近年まで、DAO は真核生物においてのみ見いだされており、原核生物には見いだされてこなかった。このことから、原核生物に DAO は存在しないと長年考えられてきた。しかし近年、細菌 *Arthrobacter protophormiae* に DAO が初めて見いだされ、原核生物にも DAO が存在することが示された。原核生物には、好熱菌や超好熱菌などの高温環境を生育場所とするものが多数存在しており、これら好熱菌由来の酵素は非常に高い安定性を示すことが知られている。したがって、好熱菌に DAO を見出すことができれば、工業的に有用な高い安定性を有する DAO が獲得できると期待された。

2. 研究の目的

本研究は、応用的に有用な DAO の産業利用を拡大させるため、今まで DAO が見出されていなかった好熱菌において DAO を探索し、世界で初めて好熱菌由来の DAO を見出すとともに、高い安定性を有する新奇な DAO を世界に提供することを目的とする。また、好熱菌 DAO の種々の酵素学的諸特性を明らかにし、様々な応用的利用へ展開するための基盤を築くことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、主に以下の項目について研究を行った。用いた試薬や具体的な実験方法・手順等は省略する。

(1) 好熱菌における DAO ホモログ遺伝子の探索

酵母や動物由来の既知 DAO のアミノ酸配列を用いて、ゲノムデータベースを BLAST 検索した。有意な相同性を示す遺伝子 (DAO ホモログ遺伝子、DAO 遺伝子) のうち、好熱菌や好熱性真菌に存在する DAO 遺伝子を探し出した。好熱菌や好熱性真菌にみられた DAO 遺伝子がコードする推定アミノ酸配列を既知の DAO のアミノ酸配列と ClustalW を用いてアライメントし、DAO の機能に重要なアミノ酸残基の保存性を確認した。

(2) 好熱菌および好熱性真菌の DAO 遺伝子

の単離

上記で見出された好熱菌や好熱性真菌、また中温菌と系統学的に近縁関係にある好熱菌を NBRC や IFO から入手した。入手した菌を培養し、ゲノム DNA を調製した。調製したゲノム DNA を鋳型とした PCR により DAO 遺伝子の単離を検討した。好熱性真菌の一部の DAO 遺伝子は、イントロンの存在が推定されたため、大腸菌発現に適するように改変した遺伝子を外部委託により合成した。

(3) 好熱菌 DAO 遺伝子の好熱菌における発現と精製

単離した DAO 遺伝子を好熱菌発現ベクターに融合して His タグ融合 DAO 発現ベクターを作成し、好熱菌に導入した。各種発現条件 (培養温度や時間、発現誘導剤濃度) の検討を行い、発現の最適化を行ったのち、ジャーファーマーターを用いて大量培養した。得られた好熱菌体から、金属キレートアフィニティークラムを用いて種々の精製条件を検討して最適化したのちに、電気泳動的に単一にまで精製し、精製酵素標品を得た。

(4) 好熱菌 DAO の酵素学的諸特性解析

精製した酵素の熱安定性、最適温度、最適 pH、基質特異性、阻害剤特性、補因子や四次構造などの種々の酵素学的諸特性を解析した。

4. 研究成果

(1) 好熱菌における DAO 遺伝子の探索

既知の酵母やブタ由来の DAO のアミノ酸配列を用いて、原核生物ゲノムデータベースを対象に BLAST 検索を行ったところ、有意な相同性を示す遺伝子が多くの細菌 (特にアクチノバクテリア) に確認された。この中から好熱菌を探索したところ、好熱菌 *Rubrobacter xylophilus* DSM9941 に高いアミノ酸同一性を有するタンパク質をコードする遺伝子 (RxDAO) が存在した。

RxDAO 遺伝子がコードするタンパク質の推定アミノ酸配列は、ヒト、ブタ及び *A. protophormiae* 由来の DAO のアミノ酸配列と高い同一性を示した。また、推定アミノ酸配列中に、既知の DAO において基質結合や FAD 結合に関わるアミノ酸残基が全て保存されており、RxDAO が DAO である可能性が示唆された。

(2) RxDAO 遺伝子の単離

ゲノムデータベース上の、RxDAO 遺伝子の塩基配列から設計したプライマーを用いて、ゲノム DNA を鋳型とした PCR により RxDAO 遺伝子全長の取得を試みたが、取得できなかった。そこで、RxDAO 遺伝子内部や外部にアニールする種々のプライマーを用いて PCR を行ったところ、RxDAO 遺伝子を単離することができた。しかし、その塩基配列はデータベースの配列と少し異なっ

ていた。

申請者が決定した RxDAO 遺伝子は 972 bp であり、324 アミノ酸残基数からなる推定分子質量 35.1 kDa のタンパク質をコードしていた。新たに決定した RxDAO のアミノ酸配列は既知の DAO に高い同一性 (30-46%) を示し、機能アミノ酸残基も保存されていた。

(3) RxDAO 遺伝子の^{大腸菌}における発現
RxDAO 遺伝子を^{大腸菌}において His タグ融合タンパク質として発現させたところ、粗抽出液は DAO 活性を示した。このことから、RxDAO 遺伝子が DAO をコードしていることが示され、好熱菌に DAO が存在することが初めて見出された。

^{大腸菌}で発現した RxDAO のほとんどは不溶性画分に存在したことから、発現温度や発現誘導剤濃度などの発現条件を解析した。発現温度を 37 から 15 へ低下させたところ、可溶性画分における RxDAO のタンパク質量が増加したが、反対に活性が著しく減少した。このことから、不溶性画分は増加するものの、活性体を得るためには高い温度による発現が有効であることが分かった。一方、IPTG 濃度変化による発現への影響は観察されなかった。

(4) ^{大腸菌}で発現させた RxDAO の精製

^{大腸菌}粗抽出液から RxDAO を金属キレートアフィニティーカラムを用いて回収率約 8% で 340 倍に精製した。多くの DAO と異なり、RxDAO は単量体であった。また、非共有結合的に強固に結合した FAD を補酵素として有していた。RxDAO の酸素電極法による D-バリンに対する比活性は、60 において 21.1 U/mg であった。この比活性値は、真核微生物の DAO の比活性値よりも低かった。

(5) RxDAO の酵素学的諸特性解

RxDAO の種々の酵素学的諸特性を解析した。RxDAO は、D-アミノ酸に対してのみ作用し、D-バリン、D-ロイシンや D-イソロイシンなど分岐鎖 D-アミノ酸に対して高い活性を示した。また、DAO 阻害剤として知られる安息香酸により強く阻害された。このことから、RxDAO が DAO であることが示された。

RxDAO の至適温度は 65 であり、至適 pH は 7.5-10 と塩基性側で高い活性を示した。また、1 時間の保温で 60 まで安定であり、活性が半減する温度 T_{50} は 64 であった。これは、既知の DAO の中で最も熱安定性が高い DAO よりも 10 以上高い温度であった。このことから、RxDAO が既知の DAO の中で最も高い熱安定性を有することが分かった。さらに、RxDAO は 30 保温において活性減少が約 1 週間観察されず、50 保温において 8 日間保温後も約 25% の残存活性が観察

された。RxDAO の安定性はタンパク質濃度依存的であり、タンパク質濃度の低下により安定性は低下した。しかし、FAD を酵素液に添加すると安定性は回復した。このことから、RxDAO の安定性には FAD との結合が寄与していると考えられた。

(6) 他の好熱菌および好熱性真菌 DAO の解析

データベース検索から DAO 遺伝子が見出された中温菌に進化的に近い好熱菌の複数種からゲノムを調製し、中温菌 DAO 遺伝子の配列から設計したプライマーを用いて PCR を行ったところ、ある一種から既知の DAO に高い相同性を示すタンパク質をコードする DNA 断片を取得することができた。

また、データベース検索から、ある種の好熱性真菌が DAO 遺伝子を 2 つ有することが示された。真菌由来の DAO は細菌由来の DAO よりも高活性であることから、高い安定性を有する高活性な DAO の存在が期待された。これら DAO 遺伝子を^{大腸菌}で発現させたところ、一方の遺伝子の発現産物は D-メチオニンや D-チロシンに高い活性を示し、他方の遺伝子の発現産物は D-グルタミン酸に特異的に作用する新規な DAO であることが分かった。

5. 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 1 件)

Yayoi Saito, Shouji Takahashi, Mieko Kobayashi, Katsumasa Abe and Yoshio Kera: D-Amino acid oxidase of *Streptomyces coelicolor* and the effect of D-amino acids on the bacterium. Annals of Microbiology, 印刷中, 2014. 査読有り DOI : 10.1007/s13213-013-0756-0

[学会発表](計 11 件)

古川原 諒・高橋 祥司・田所 南海帆・齋藤 弥生・小林 見江子・大前圭史・阿部 勝正・解良 芳夫: 好熱菌 *Rubrobacter xylanophilus* D-アミノ酸オキシダーゼの諸特性. 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 29 日, 明治大学・生田キャンパス(川崎市)

高橋 祥司・大前 圭史・田所 南海帆・齋藤 弥生・小林 美江子・阿部 勝正・解良 芳夫: 好熱菌 D-アミノ酸オキシダーゼの諸特性解析. 日本ビタミン学会第 65 回大会, 2013 年 5 月 17 日, 一橋大学・一橋講堂(東京都)

高橋 祥司: 微生物 D-アミノ酸酸化酵素の働きと構造. 生研センタープロジェクト

「D-アミノ酸に注目した食品機能開発」公開シンポジウム, 2013年3月1日, 九州大学・箱崎キャンパス(福岡市)

Shouji Takahashi, Katsumasa Abe, Yoshio Kera: Isolation and characterization of a novel thermostable D-amino acid oxidase. The 2nd joint symposium CU-NUT, 2012年10月11日, Chulalongorn university (Bangkok, Thailand)

大前 圭史・田所 南海帆・斎藤 弥生・小林 美江子・阿部 勝正・高橋 祥司・解良 芳夫: 好熱菌 D-アミノ酸オキシダーゼの探索と解析. 第64回生物工学会大会, 2012年10月25日, 神戸国際会議場(神戸市)

大前 圭史・斎藤 弥生・田所 南海帆・小林 美江子・阿部 勝正・高橋 祥司・解良 芳夫: 好熱菌 *Rubrobacter xylanophilus* の D-アミノ酸オキシダーゼの諸特性解析. 第85回日本生化学会大会, 2012年12月15日, 福岡国際会議場(福岡市)

大前 圭史・田所 南海帆・斎藤 弥生・小林 見江子・高橋 祥司・阿部 勝正・解良 芳夫: 好熱菌 D-アミノ酸オキシダーゼの探索と解析. 日本農芸化学会 2012年度関東支部大会, 2012年10月27日, 新潟薬科大学(新潟市)

高橋 祥司・斎藤 弥生・田所 南海帆・小林 美江子・阿部 勝正・解良 芳夫: *Streptomyces coelicolor* A3(2) の D-アミノ酸オキシダーゼの機能解析. 日本農芸化学会 2012年度大会, 2012年3月23日, 京都女子大学(京都市)

Yayoi Saito, Namiho Tadokoro, Mieko Kobayashi, Katsumasa Abe, Shouji Takahashi and Yoshio Kera Analysis of D-amino acid oxidase of and effect of D-amino acids on *Streptomyces coelicolor* A3(2). The 1st International GIGAKU Conference in Nagaoka, 2012年2月3日, 長岡技術科学大学(長岡市)

斎藤 弥生・田所 南海帆・小林 美江子・高橋 祥司・阿部 勝正・解良 芳夫: 放線菌 *Streptomyces coelicolor* の推定 D-アミノ酸オキシダーゼの機能解析. 第7回 D-アミノ酸学術研究会, 2011年9月10日, 東京医科歯科大学(東京都)

斎藤 弥生・田所 南海帆・小林 美江子・高橋 祥司・解良 芳夫・阿部 勝正: 耐熱性を有する D-アミノ酸オキシダーゼの探索と解析. 日本ビタミン学会第63回大会, 2011年6月4日, 安田女子大学(広島市)

〔その他〕

<http://envbiochem.web.fc2.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 祥司 (TAKAHASHI, Shouji)

長岡技術科学大学・工学部・准教授

研究者番号: 90324011