

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580127

研究課題名(和文) 高度な安定性を有するコレステロール酸化酵素の触媒機構の解明と高活性化

研究課題名(英文) Analysis of catalytic mechanism and activation of a highly stable cholesterol oxidase

研究代表者

道久 則之 (Doukyu, Noriyuki)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：60302957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：高いコレステロール値は動脈硬化を促進するため、心血管疾患に関与する。コレステロールオキシダーゼ(COX)は、血中のコレステロール値の定量に広く使用されている。我々は、これまで報告されたコレステロールオキシダーゼの中で、最も高い熱安定性、界面活性耐性、有機溶媒耐性を示すコレステロールオキシダーゼ(グラム陰性細菌 *Chromobacterium* sp. DS-1株由来)を見出している。また、補欠分子族であるフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)がDS-1株由来の酵素の安定性に関与することを明らかにした。本研究では、さらに安定性が向上したDS-1株由来の変異体酵素を構築した。

研究成果の概要(英文)：High cholesterol levels are strongly associated with cardiovascular disease because these promote atheroma development in arteries. Cholesterol oxidase is useful for enzymatic determination of cholesterol levels in human blood. We previously discovered a thermal, organic solvent and detergent-tolerant cholesterol oxidase from a gram-negative bacterium *Chromobacterium* sp. DS-1. In addition, it was found that several amino acid residues near the FAD cofactor probably play an important role in the reactivity and the stability of the enzyme. Therefore, we constructed mutant enzymes which had mutated amino acid residues near the FAD cofactor by site directed mutagenesis, to identify amino acid residues that play an important role in activity and stability. In this study, we constructed a mutant enzyme which is relatively stable at high temperature and in the presence of detergents.

研究分野：応用微生物学

キーワード：コレステロール コレステロールオキシダーゼ 臨床検査

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の循環器疾患基礎調査によると、2,200 万人の日本人が「高コレステロール血症」などを含む「脂質異常症」と疑われている。欧米を含めると約3億人の患者がいるといわれている。コレステロール値が高いと動脈硬化が起き、心筋梗塞や脳卒中のリスクが高まることが知られている。微生物由来の COX は、このような疾患の臨床検査のため、血中の総コレステロールの定量に広く使用されている。メタボリック症候群検診が 2008 年 4 月から医療保険者全員にその実施が義務化されたことから、その検査項目の 1 つであるコレステロール値の検査数も急激に増加している(2008 年の国内検査数は約 30 億件)。COX の基質となるコレステロールは非水溶性であるため、臨床検査の測定液にはコレステロールを溶解するために界面活性剤が添加される。近年、「脂質異常症」の診断基準において、LDL (低比重リポタンパク質、いわゆる「悪玉」と HDL (高比重リポタンパク質、「善玉」)に含まれるコレステロールの値を別々に評価する点が重要視されており、LDL-と HDL-コレステロールの効率的な分離測定技術の必要性が高まっている。このような技術には、酵素変性作用の強い界面活性剤が使用されるため、界面活性剤耐性の COX が必要とされている。この他にも、コレステロール以外のステロイド化合物の変換反応やコレステロールに類似した構造のアルコールの光学分割に COX を応用する研究が報告されており、医薬品原料等の生産への応用が注目されている。このような反応には、基質を溶解するため反応液に有機溶媒が添加されており、有機溶媒耐性の COX が望まれている。

2. 研究の目的

これまでに、既知の微生物由来のコレステロールオキシダーゼ(以下、COX と略す)の中で、最も高い熱安定性、界面活性耐性、有機溶媒耐性を示す COX の探索に成功し、酵素化学的諸性質の解析、遺伝子解析、X 線結晶解析による立体構造の解析を行ってきた。本研究では、本 COX の触媒活性に関与する部位を同定して触媒機構を解明し、その知見を用いて、高安定性を有する本 COX を高活性化して、高安定かつ高活性な COX を創製することを目的とした。また、新規な高安定かつ高活性な COX を見出しその解析を行った。

3. 研究の方法

本研究計画では、1)高安定性を有する COX の立体構造の情報に基づいた部位特異的変異導入等を用いて、酵素の触媒活性に関与するアミノ酸残基を同定して、触媒機構を解明する。2)酵素の高活性化に寄与するアミノ酸置換を見出し、これら変異を蓄積した多重変異酵素を作製することにより、高安定かつ高活性な COX を創製する。3)新規な高安定かつ高活性な COX を見出しその解析を行う。以上の研究内容を主に遂行することとした。また、作製した変異体酵素などについて温度安定性や界面活性剤耐性、

有機溶媒耐性、Km 値、kcat 値などの反応速度論的パラメータ、二次構造(円二色性スペクトル解析)等を調べた。以下に、主な実験方法について記述した。

(1) COX 変異体の構築

KOD-Plus-Mutagenesis Kit (東洋紡社製)または TAKARA PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit(タカラバイオ社製)を用いた部位特異的導入法により変異体酵素を作製した。変異導入のためのプライマーを設計し、野生型酵素発現用プラスミド pETCOX を鋳型として用いて PCR により W22, W65, P128, P130, H144 をアラニンに置換した変異体酵素発現用プラスミドを作製した。また、分子シミュレーション解析(アクセリス社製)により P130 をロイシンとヒスチジン、アスパラギンに、H144 をチロシンとフェニルアラニンに置換すると安定性が向上する可能性が示唆されたため、これら変異体酵素発現用プラスミドも作製した。

(2) COX 変異体の精製

構築した変異体 COX プラスミドを大腸菌に導入し、LB 培地を用いて 30℃ で 24 時間培養した。培養時間 5 時間後に IPTG を終濃度 0.5 mM になるように添加した。24 時間後、遠心分離により菌体を回収した。回収した菌体に 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)を添加して菌体を懸濁した。この菌体懸濁液を用いて超音波破碎により菌体を破碎した。菌体破碎液を遠心分離後、上清を回収した。この上清を用いて、DEAE-セルロースを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにより、COX を精製した。

(3) COX 活性の測定

コレステロールを酸化する際に生じる過酸化水素を定量する方法である Allain 法を用いて COX 活性を測定した。反応液(87 mM Na-リン酸緩衝液(pH 7.0), 64 mM コール酸ナトリウム, 0.34% Triton X-100, 1.4 mM 4-アミノアンチピリン, 21 mM フェノール, 0.89 mM コレステロール, 4.5 U/ml ペルオキシダーゼ)1.0 ml に酵素液 50 μ l を加え 30℃、5 分間反応させ、分光光度計で 500 nm における吸光度を測定した。この方法において 1 分間に 1 μ mol の H₂O₂ を生成する酵素量を 1 U とした。

(4) 反応速度論的解析

様々なコレステロール濃度の反応液 1.0 ml を 30℃、5 分間保温し、これに 50 μ l の酵素溶液 (1.2 U/ml)を加え、反応の初期速度を測定した。Lineweaver - Burk plot を用いて、近似曲線から切片 1/V_{max} と傾き Km/V_{max} を求めた。

(5) COX 変異体の安定性に及ぼす温度の影響

50 μ l の酵素溶液 (1.2 U/ml, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)中)を 30~90℃ の各温度において保温した。1 時間保温した後、Allain 法の方法により酵素活性を測定した。

(6) COX 変異体の安定性に対する界面活性剤の影響

酵素溶液 (1.2 U/ml) に界面活性剤 (最終濃度 0.1% (wt/vol)) を加え、30 °C で 1 時間静置後、Allain らの方法を用いて酵素活性を測定した。界面活性剤を加えてない場合を 100% とした相対値を算出した。また、界面活性剤として SDS および LBS を用いた。

4. 研究成果

(1) COX 変異体の作製と精製

既に、当研究室において、*Chromobacterium* sp. DS-1 株由来の COX が取得されていた。また、本酵素をコードする遺伝子のクローニングや X 線結晶解析による立体構造も解明された。本酵素はこれまで知られているコレステロールオキシダーゼの中で最も高い耐熱性を示し、界面活性剤や有機溶媒に対しても、市販の酵素より高い安定性を示す。DS-1 株由来 COX の FAD から 3.5 Å 以内のアミノ酸として、W22, H63, W65, P128, P130, H144 がある (図 1)。このうち、H63 は FAD と共有結合しているアミノ酸である。本研究では、これらのアミノ酸酵素活性が安定性への影響を調べるためにそれぞれアラニンに置換した変異体を作製した。また、アクセリス社製の分子シミュレーションソフト (Discovery studio) による変異体タンパク質の耐熱性解析から P130 をロイシン、ヒスチジン、アスパラギンや H144 をチロシン、フェニルアラニンに置換すると安定性が向上することが予想されたので、これらに置換した変異体酵素 (P130L, P130N, P130H, H144F, H144Y) なども作製することにした。

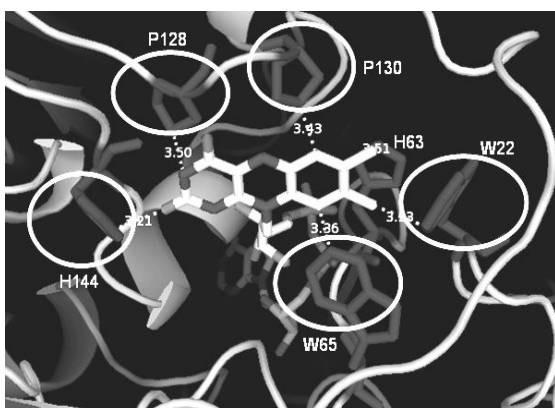


図 1 *Chromobacterium* sp. DS-1 株由来の COX の FAD と近傍のアミノ酸の構造

本研究では本遺伝子を導入した大腸菌によるタンパク質高発現システムである pET システム (Novagen 社製) を用いた本コレステロールオキシダーゼ (COX) の高発現化を試みた。この pET システムに使用した COX 発現用のプラスミド (pETCOX) は、シグナルペプチドを除去した成熟型 COX を発現するように設計された COX 遺伝子が挿入されている。培養条件や精製条件などを検討した結果、培養液 200 ml から 6-12 mg

程度の精製酵素を得ることが可能となった。変異体 COX の精製について表 1 にまとめた。精製した酵素は、それぞれ超音波破碎後の上清から 4~10 倍にまで精製され、収率は 50~90% 程度であった。比活性は 0.1~6.9 U/mg となった。また、SDS-PAGE 後、CBB 染色により、58 kDa のバンドが得られることを確認した (図 2)。

表 1 COX 変異体の精製

| 変異体 | 精製法 | 総活性 (U) | 総タンパク量 (mg) | 比活性 (U/mg) | 精製度 | 収率 (%) |
|-------|------|---------|-------------|------------|------|--------|
| W22A | 超音波 | 59.3 | 104 | 0.57 | 1.00 | 100 |
| | DEAE | 35.8 | 6.26 | 5.72 | 10.0 | 60.4 |
| W65A | 超音波 | 104 | 106 | 0.98 | 1.00 | 100 |
| | DEAE | 51.8 | 7.46 | 6.94 | 7.08 | 49.9 |
| P128A | 超音波 | 40.1 | 34.5 | 1.16 | 1.00 | 100 |
| | DEAE | 35.1 | 7.30 | 4.81 | 4.14 | 87.5 |
| P130A | 超音波 | 32.0 | 76.0 | 0.42 | 1.00 | 100 |
| | DEAE | 22.3 | 12.5 | 1.78 | 4.25 | 69.9 |
| P130L | 超音波 | 61.1 | 61.0 | 1.00 | 1.00 | 100 |
| | DEAE | 36.6 | 9.83 | 3.72 | 3.72 | 59.9 |
| P130I | 超音波 | 3.56 | 48.7 | 0.07 | 1.00 | 100 |
| | DEAE | 2.94 | 3.55 | 0.82 | 11.3 | 82.6 |
| P130H | 超音波 | 37.1 | 40.4 | 0.91 | 1.00 | 100 |
| | DEAE | 30.1 | 13.4 | 2.30 | 2.50 | 81.1 |
| P130N | 超音波 | 27.4 | 82.0 | 0.33 | 1.00 | 100 |
| | DEAE | 13.8 | 10.1 | 1.37 | 4.09 | 50.4 |
| H144Y | 超音波 | 1.03 | 43.3 | 0.02 | 1.00 | 100 |
| | DEAE | 0.99 | 8.24 | 0.12 | 5.05 | 96.1 |

200 ml 培養した結果を示した

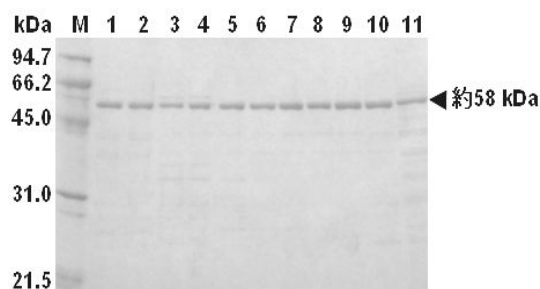


図 2 SDS-PAGE 解析結果

M: 分子量マーカー、1: W22A、2: W65A、3: P128A、4: P130A、5: P130I、6: P130L、7: P130N、8: P130H、9: H144A、10: H144Y、11: H144F

(2) DS-1 株由来 COX 変異体の反応速度的パラメーターの解析

各基質濃度における反応速度を解析し、 K_m 値および V_{max} 値を Lineweaver - Burk plot を用いて算出した(表 2)。いずれの変異体においても最大反応速度である V_{max} 値と触媒効率を示す V_{max}/K_m 値は、低下していた。また、基質と酵素の親和性を示す K_m 値は増加した。FAD 近傍のアミノ酸には示したようにコレステロールの脱水素反応や還元型 FAD の再酸化などに関与することが考えられる。したがって、これらのアミノ酸を置換すると、コレステロールの脱水素反応や還元型 FAD の再酸化に影響し、この結果、 K_m 値が増加し、 V_{max} 値や触媒効率が低下したものと考えられる。

表 2 変異体 COX の K_m 値、 V_{max} 値および触媒効率

| | V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) | K_m (mM) | V_{max}/K_m ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) |
|-------|---|---------------|---|
| WT | 16.7 | 0.0269 | 617 |
| W22A | 5.77 | 0.0280 | 206 |
| W65A | 6.75 | 0.0477 | 141 |
| P128A | 4.51 | 0.0950 | 47.5 |
| P130A | 2.14 | 0.0294 | 73.9 |
| P130L | 3.95 | 0.0238 | 165 |
| P130I | 1.25 | 0.0740 | 16.9 |
| P130H | 2.47 | 0.145 | 17.0 |
| P130N | 1.61 | 0.261 | 6.18 |
| H144Y | 0.0239 | 0.674 | 0.0355 |

(3) COX 変異体の安定性に対する温度の影響
野生型 COX と変異体酵素の熱安定性を調べた結果、P130L を除く全ての変異体は、野生型 COX と比べて安定性が低下した。P130L は、野生型 COX に比べて熱安定性が向上していた。野生型 COX と P130L の 80 と 85 における熱安定性を経時的に調べた(図 3)。その結果、80 において 5 時間後には、野生型 COX の活性は 53%まで低下したが、P130L の活性は 83%程度の活性が残存していた。また、85 では、1 時間後には野生型 COX の活性は 8%と顕著に低下したのに対し P130L の残存活性は 65%であり、野生型 COX の活性よりも高かった。これらの結果から P130L は野生型 COX に比べて安定であることがわかった。

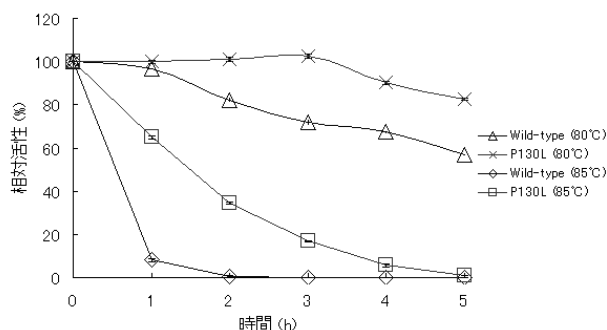


図 3 P130L 変異体の 80 および 85 における熱安定性の経時変化

(4) P130L 変異体の CD スペクトル解析による熱安定性

Wild-type と P130L 変異体酵素の CD スペクトル解析による熱安定性を調べた(図 4)。この結果、60 ~ 80 までにはどちらも大きな変化はなかったが野生型酵素は 85 で変性したことがわかった。しかし、P130L 変異体酵素は 85 でも変性しなかった。これらの結果から、P130L 変異体酵素は野生型酵素よりも熱安定性が向上したことがわかった。

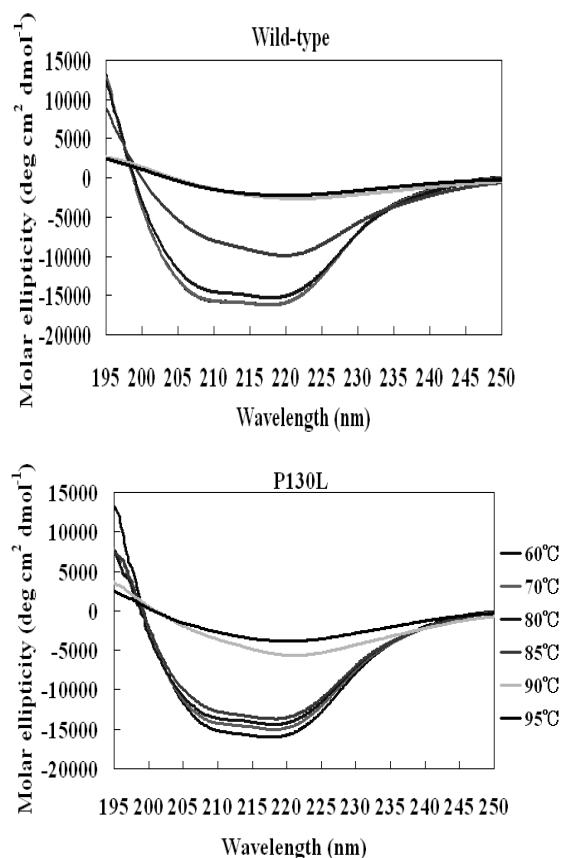


図 4 野生型酵素と P130L 変異体酵素の CD スペクトル解析

(5) COX 変異体の安定性に対する界面活性剤の影響

野性型 COX と各変異体 COX の界面活性剤 (SDS と LBS) に対する安定性を調べた。この結果、野生型 COX と W22A, P130A, P130I は、界面活性剤無添加のときと比べて相対残存活性が 20% まで低下したが W65A は、約 40% の相対残存活性を示し、P130L は、99% の相対残存活性を示した。また、H144Y も 60% の相対残存活性を示した。この結果から、W65A, P130L, H144Y の界面活性剤存在下における安定性が野生型よりも向上することがわかった。この結果から、DS-1 株由来の COX よりも高い安定性を示す COX 変異体を作製することができたことが示された。

(6) *Pseudomonas* 属細菌由来の COX

上記の DS-1 株由来の COX の遺伝子配列などを基に *Pseudomonas* 属細菌由来の COX をクローニングして解析した。この結果、本酵素は、DS-1 株由来の COX よりも最大反応速度 V_{max} 値が高く、比較的高い触媒効率を示すことが分かった。

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)

N. Doukyu, S. Nihei. Cholesterol oxidase with high catalytic activity from *Pseudomonas aeruginosa*: Screening, molecular genetic analysis, expression and characterization. J. Biosci. Bioeng. in press (2015) 査読あり
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.12.003.

[学会発表] (計 4 件)

石川誠、道久則之「*Rhodococcus erythropolis* 由来コレステロールオキシダーゼのコレステロール酸化物の解析」極限環境微生物学会 2014 年度年会 (2014 年 11 月 1 日-3 日) 今帰仁村コミュニティセンター (沖縄県国頭郡)

N. Doukyu, Organic solvent-tolerant bacteria and enzymes, International Conference on Frontiers in Energy, Environment, Health and Materials Research (EEMR2013), Bhubaneswar, India (2013 年 8 月 12 日-13 日)

石川誠、道久則之「*Rhodococcus erythropolis* 由来コレステロールオキシダーゼの大腸菌による発現」極限環境微生物学会 2013 年度年会 (2013 年 10 月 26 日-27 日) 明治大学生田キャンパス (神奈川県川崎市)

道久則之、二瓶翔「*Pseudomonas aeruginosa* 由来コレステロールオキシダーゼの解析」極限環境微生物学会 2012 年度年会 (2012 年 12

月 1 日-2 日) 日本大学文理学部 (東京都世田谷区)

[図書] (計 3 件)

伊藤政博、道久則之 他 7 名『極限環境生命 生命の起源を考え、その多様性に学ぶ』, 9 章 有機溶媒耐性微生物』コロナ社, p.131-145 (2014)

今中忠行監修、道久則之 (分担)『極限環境生物の産業展開 第 7 章 有機溶媒生物圏 3. 疎水性有機溶媒耐性微生物の耐性機構と応用』シーエムシー出版 p.131-139 (2012)

植田充美監修、道久則之 (分担)『合成生物工学の隆起 有用物質の新たな生産法構築をめざして 第 7 章 有機溶媒耐性大腸菌の溶媒耐性機構と応用』シーエムシー出版 p.236-244 (2012)

[その他]

ホームページ等

<http://www2.toyo.ac.jp/dokyu/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

道久 則之 (DOUKYU NORIYUKI)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号: 60302957