

令和元年6月21日現在

機関番号：13102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07660

研究課題名(和文) 好熱性真菌における高安定性、高活性、広基質特異性D-アミノ酸化酵素の探索と解析

研究課題名(英文) Isolation and characterization of highly stable, highly catalytic and broad substrate specificity D-amino acid oxidase of thermophilic fungi

研究代表者

高橋 祥司 (Takahashi, Shouji)

長岡技術科学大学・工学研究科・教授

研究者番号：90324011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：D-アミノ酸化酵素(DAO)は、多様な機能を持つD-アミノ酸の検出・定量や医薬品原料の生産など、有用な酵素である。申請者らは、D-アミノ酸を生育に利用しかつ高温で生育する真菌*Rasamsonia emersonii* YA株を堆肥より単離し、DAO遺伝子(ReDAO)を見いだした。大腸菌で生産させたReDAOは、種々のD-アミノ酸だけでなく医薬品原料となるセファロスポリンCにも作用した。また、高い熱安定性と高い触媒活性を有していた。したがって、本研究により、高い安定性を有しかつ高活性で多様なD-アミノ酸に作用する工業的に有用な目的のDAOを取得することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

D-アミノ酸化酵素(DAO)は、D-アミノ酸の検出・定量、医薬品合成、病気の診断や治療など広範な産業分野での利用が期待されている。しかし、工業的には安定性の低いDAOが利用されており、高コストであることからDAOの応用的利用は制限されている。本研究の成果により、DAOを利用した物質生産プロセスや分析システムのコストを大幅に低減させることでDAOの多様な分野における応用的利用を可能にし、広範な産業分野の発展が期待される。さらに、今後の解析により、酵素の基質特異性や安定化メカニズムに新たな学術的な知見をもたらし、他の酵素の基質特異性改変技術や安定化技術の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：D-Amino acid oxidase (DAO), which is a D-amino acid-degrading enzyme, is a useful enzyme for detecting and quantifying D-amino acids involved in neuropsychiatric disorders and producing pharmaceutical raw materials. This study, therefore, aimed to obtain a unique DAO with high stability, high activity, and broad substrate specificity. We isolated a thermophilic fungus that can utilize D-amino acids for growth from compost and identified the fungus as a strain (named strain YA) of *Rasamsonia emersonii*. We then identified and isolated DAO gene (ReDAO) of the fungus. ReDAO produced in *E. coli* utilized not only various D-amino acids but also cephalosporin C, a pharmaceutical material, as a substrate. ReDAO also exhibited high thermal stability and activity. These results showed that we successfully obtained the desired DAO that has high stability and high activity with broad substrate specificity.

研究分野：応用微生物学

キーワード：D-アミノ酸オキシダーゼ *Rasamsonia emersonii* 好熱性真菌 耐熱性 クローニング 酵素学的緒特性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) は、D-アミノ酸の脱アミノ反応を触媒する FAD 酵素であり、TCA 回路で有名なクレブス博士が見いだして以降、フラビン酸化酵素-脱水素酵素のモデルとして詳細な生化学的解析がなされてきた。また、その反応特性から、D-アミノ酸の検出・定量、様々な疾患治療薬の合成やガンの治療など広範な産業分野において利用可能である。しかし、工業的には安定性の低い常温性真菌由来の DAO が利用されており、高コストであることから DAO の応用的利用は制限されている。したがって、より高い安定性を有する DAO が求められてきた。

このような状況のもと、申請者は世界で初めて好熱性細菌に DAO を見だし、最も高い安定性を有することを明らかにした。しかし、当好熱性細菌の DAO は工業的に利用されている常温性真菌由来の DAO の約 1/5 ~ 1/10 の活性しか示さず、また作用する基質も分岐鎖 D-アミノ酸に限られたことから多様な基質に作用できず、実用的利用における制限が示された。したがって、安定性が高くかつ高活性で多様な基質に作用する DAO が強く求められている。

DAO は様々な生物から単離されているが、なかでも真菌由来の DAO の反応性は非常に高い。加えて、真菌 DAO は基質特異性も広く、構造的に小さな D-アラニンから D-アミノ酸でない構造の非常に大きな半合成セファロsporin系抗生物質合成原料となるセファロsporin C にも作用する。したがって、好熱性真菌に今まで報告のなかった DAO が見だされれば、応用的に非常に価値の高い、安定性が高く、高活性で基質特異性の広い DAO を取得できると考えた。なかでも、好熱性真菌 *Chaetomium thermophilum* の生育最適温度は 55 °C であり (Fungal Biol, 116 : 489, 2012)、申請者が最も高い安定性を有する DAO を見出した好熱性細菌の生育最適温度 60 °C に匹敵する。また、好熱性真菌の酵素 (キシラーゼなど) はいずれも高い安定性 (50 °C で 1 週間活性減少無し, Appl Biochem Biotechnol, 162 : 1635, 2010) を示すことから、好熱性真菌に DAO を見出すことができれば、常温性真菌 DAO よりも高い安定性を示すと考えられた。

我々は、様々な好熱性真菌のゲノム情報を探索したところ、既知の DAO に有意な相同性を示すタンパク質遺伝子を見いだした。これらのアミノ酸配列中には、FAD 結合配列や DAO の触媒活性に必須のアミノ酸残基が全て保存されていた。さらに、好熱性真菌 *Thermomyces dupontii* の DAO ホモログ遺伝子を発現させた大腸菌粗抽出液は DAO 活性を示すことを確認している。したがって、好熱性真菌に高安定性、高活性かつ広基質特異性の DAO が存在する可能性は極めて高いと考えられた。

2. 研究の目的

D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) は、D-アミノ酸の検出・定量、様々な疾患治療薬の合成やガンの治療など広範な産業分野において利用可能である。しかし、工業的には安定性の低い常温性真菌由来の DAO が利用されており、高コストであることから、DAO の応用的利用は制限されている。したがって、より高い安定性を有する DAO が求められている。

DAO は様々な生物から単離されているが、多くの真菌由来の DAO の反応性は非常に高く、基質特異性も広いことが知られている。したがって、好熱性真菌に今まで報告のなかった DAO が見だされれば、応用的に非常に価値の高い、安定性が高く、高活性で基質特異性の広い DAO を取得できると考えた。

したがって、本研究は、高い安定性を有し、高活性で多様な基質に作用する工業的に有用な DAO を世界に先駆けて見だし、その応用的利用へ展開するための基盤を築くことを目的とした。

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。用いた試薬や詳細な実験方法・手順などは省略する。

(1) D-アミノ酸資化能を有する好熱性真菌の単離と同定

様々な種類の市販の発酵堆肥 (牛糞発酵堆肥、鶏糞発酵堆肥、パーク発酵堆肥、馬糞発酵堆肥) の懸濁液を、細菌の生育を抑制する抗生物質を含む PDA 培地に塗布し、50 °C で培養した。生育した糸状菌を新たな PDA 培地に塗布して分離培養した。単離した糸状菌を広基質特異性 DAO がよく作用する D-アスパラギン、D-アラニン、D-グルタミンもしくは D-ヒスチジン単一窒素源として含む最小寒天培地に塗布し、50 °C における生育を観察した。各 D-アミノ酸において良好に生育した糸状菌の ITS 領域の塩基配列をもとに、生物種を同定した。

(2) 好熱性真菌 DAO ホモログ遺伝子の同定と取得

既知の真菌 DAO のアミノ酸配列を query 配列として用いて *Rasamsonia emersonii* CBS 393.64 株のゲノム配列に対してホモロジー検索を行った。得られた DAO ホモログ遺伝子の塩基配列をもとに、単離した *R. emersonii* YA 株の DAO ホモログ遺伝子 (ReDAO 遺伝子) を PCR により単離し、塩基配列を解析した。単離した遺伝子の推定アミノ酸配列を既知の DAO のアミノ酸配列と比較解析することで、ReDAO における DAO 機能部位の保存性を確認した。大腸菌発現に適するようにコドン頻度を改変した ReDAO cDNA を外部委託により合成した。

(3) ReDAO 遺伝子の大腸菌発現と精製

ReDAO 遺伝子を大腸菌発現ベクター pET15b に連結し ReDAO 遺伝子発現ベクターを作成した。作成した発現ベクターを大腸菌 BL21 (DE3) pLysS 株に導入し, ReDAO を His タグ融合タンパク質として誘導発現させた。大腸菌を破砕して得られた粗抽出液を用いて D-システインを除く 18 種の D-アミノ酸および L-イソロイシン, L-バリン, L-メチオニンに対するオキシダーゼ活性を測定した。また, 大腸菌粗抽出液から ReDAO を金属キレートアフィニティーカラムを用いて電気泳動的に単一にまで精製した。

(4) ReDAO の酵素学的諸特性解析

精製した ReDAO の熱安定性, 至適温度, 至適 pH, 基質特異性, 阻害剤特性, 補因子 FAD, 四次構造や速度論パラメータなど種々の酵素学的諸特性を解析した。

4. 研究成果

(1) D-アミノ酸資化能を有する好熱性真菌の単離と同定

各種市販発酵堆肥の懸濁液をバクテリアの生育を抑制する抗生物質を含む PDA 培地に塗布し, 50 で 2 週間培養したところ, バーク発酵堆肥および牛糞発酵堆肥を塗布した PDA 培地において 3 株の好熱性真菌の生育が観察された。これら 3 株の好熱性真菌をそれぞれ YA 株, PB 株および PE 株と名付けた。

単離した 3 株が, 広基質特異性 DAO がよく作用する D-アラニン, D-アスパラギン, D-グルタミンおよび D-ヒスチジン各々を単一窒素源として含む最少培地で生育できるか解析したところ, いずれの株も生育した。特に, YA 株が良好に生育した。そこで, YA 株の生物種を同定するために, ITS 領域の塩基配列を解析したところ, 好熱性真菌 *Rasamsonia emersonii* の基準株である CBS 393.64 株と CBS 396.64 株の ITS 領域配列に対してそれぞれ 99.7% と 100% の塩基配列同一性を有していた。このことから, YA 株は *R. emersonii* に属することが分かった。

(2) 好熱性真菌 DAO ホモログ遺伝子の同定と取得

YA 株から DAO ホモログ遺伝子を単離するために, まずゲノム配列が明らかで, YA 株と同種である *R. emersonii* CBS 393.64 株における DAO ホモログ遺伝子の探索を行ったところ, DAO ホモログ遺伝子が 1 つ見いだされた。CBS 393.64 株に見いだされた DAO ホモログ遺伝子の塩基配列をもとに, YA 株の DAO ホモログ遺伝子 (ReDAO 遺伝子) を PCR により単離し, 塩基配列を解析したところ, 1 塩基を除いて CBS 393.64 株の DAO ホモログ遺伝子と同一の配列であった。

ゲノム DNA における ReDAO 遺伝子は 6 個のイントロンでコード領域が分断されており, ORF は 1,104 bp で 368 アミノ酸からなるタンパク質をコードしていた。アミノ酸配列は既知の真菌 DAO のアミノ酸配列と約 30 ~ 40% のアミノ酸配列同一性を示し, DAO で保存されている FAD 結合配列, 基質結合配列, ペルオキシソーム標的シグナルなどを全て有していたことから機能的な DAO であると考えられた。

(3) ReDAO 遺伝子の大腸菌発現と精製

ReDAO 遺伝子を His タグ融合体として発現させた大腸菌の粗抽出液を調製し, 種々の D-アミノ酸に対するオキシダーゼ活性を測定したところ, 様々の中性および塩基性 D-アミノ酸のみならず, D-アスパラギン酸オキシダーゼ (DDO) の基質である酸性 D-アミノ酸の D-グルタミン酸に対しても高い活性を示した。したがって, ReDAO 遺伝子産物は機能的な DAO であること, また ReDAO は多様な D-アミノ酸に作用する新奇な広基質特異性 DAO であると考えられた。

大腸菌で発現させた ReDAO 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 26% で約 25 倍に精製した。精製した ReDAO は D-イソロイシンに対して 37 で 70 U/mg, 50 で 112 U/mg の比活性を示した。この比活性値は, 他の高い触媒活性を有する真菌 DAO の比活性値と同等であり, ReDAO は高い触媒活性を有することが分かった。

(4) ReDAO の酵素学的諸特性解析

ReDAO の種々の酵素学的諸特性を解析した。ReDAO は D-アミノ酸のみに作用し, 多様な D-アミノ酸に作用した。特に, D-バリン, D-イソロイシン, D-フィニルアラニンなどの疎水性アミノ酸に対して高い活性を示した。面白いことに, 粗抽出液と同様に, ReDAO は DAO が本来基質としない DDO の基質である D-グルタミン酸に対しても D-バリンの約 50% の高い活性を示した。また, ReDAO は, DAO と DDO の競合阻害剤の両方により阻害されたことから, DAO と DDO の両方の基質特異性を有するユニークな新奇 DAO であることが分かった。さらに, 半合成セファム系抗生物質原料を合成するための出発原料であるセファロスポリン C に対しても活性を示した。これらの結果より, ReDAO は多様な D-アミノ酸に作用する広基質特異性 DAO であることが分かった。

ReDAO は四量体を形成しており, FAD を補酵素として含有していた。至適温度は 55 であり, 至適 pH は 8.0 であった。55 で 1 時間の保温まで安定であり, 活性が半減する温度 T_{50} は約 60 であった。これは, 好熱性細菌に見いだされた DAO の T_{50} 値 65 に匹敵した。また, 好熱性細菌由来の DAO はタンパク質濃度の減少に伴い熱安定性が低下したのに対して, ReDAO はタンパク質濃度が低下しても熱安定性の低下がほとんど観察されなかった。これらの結果から, ReDAO は高い熱安定性を有する DAO であることが明らかとなった。

以上、本研究により、目的の高い熱安定性、高い触媒活性、広基質特異性を有する新奇かつ工業的に有用な DAO を見いだすことに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Takahashi S, Osugi K, Shimekake Y, Shinbo A, Abe K, Kera Y. Characterization and improvement of substrate-binding affinity of D-aspartate oxidase of the thermophilic fungus *Thermomyces dupontii*. Applied microbiology and biotechnology. 査読有. Vol.103, 2019, pp. 4053-4064.

<https://doi.org/10.1038/srep43911>

〔学会発表〕(計8件)

七五三掛 湧也, 古市 剛大, 鈴木 秀之, 阿部 勝正, 後藤 勝, 解良 芳夫, 高橋 祥司. 好熱性真菌 *Rasamsonia emersonii* YA 株由来 D-アミノ酸オキシダーゼの広基質特異性に重要な構造因子の解明. 日本農芸化学会 2019 年度大会. 2019 年.

Shimekake Y, Furuichi T, Abe K, Kera Y, Takahashi S. Study on the substrate specificity of D-amino acid oxidase of thermophilic fungi. The 7th International GIGAKU Conference in Nagaoka. 2018 年.

古市 剛大, 七五三掛 湧也, 阿部 勝正, 解良 芳夫, 高橋 祥司. 好熱性真菌 D-アミノ酸オキシダーゼの耐熱性低下変異体スクリーニング法の開発と取得. 日本農芸化学会 2019 年度大会. 2019 年.

七五三掛 湧也, 高橋 祥司, 阿部 勝正, 解良 芳夫. 好熱性真菌 *Rasamsonia emersonii* YA 株由来 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 70 回大会. 2018 年.

七五三掛 湧也, 古市 剛大, 鈴木 秀之, 阿部 勝正, 後藤 勝, 解良 芳夫, 高橋 祥司. 好熱性真菌由来 D-アミノ酸オキシダーゼの基質特異性メカニズムの解析. 日本ビタミン学会第 71 回大会. 2019 年.

七五三掛 湧也, 阿部 勝正, 解良 芳夫, 高橋 祥司. 多様な応用的利用に有用な好熱性真菌 D-アミノ酸オキシダーゼの取得とその諸特性解析. 第 59 回新潟生化学懇話会. 2018 年.

七五三掛 湧也, 古市 剛大, 阿部 勝正, 解良 芳夫, 高橋 祥司. 好熱性真菌 *Rasamsonia emersonii* YA 株由来 D-アミノ酸オキシダーゼの広基質特異性メカニズム解析. 第 14 回 D-アミノ酸学会大会. 2018 年.

七五三掛 湧也, 阿部 勝正, 解良 芳夫, 高橋 祥司. 好熱性真菌 D-アミノ酸オキシダーゼの D-グルタミン酸への触媒作用を付与する構造因子の解明. 日本生化学会第 91 回大会. 2018 年.

〔その他〕

ホームページ等

<https://envbiochem.amebaownd.com/>

6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。