

令和 2 年 5 月 7 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07748

研究課題名(和文)好熱性アーキア由来新規色素依存性L-乳酸脱水素酵素複合体の機能解析と応用

研究課題名(英文)Characterization and application of a novel dye-linked L-lactate dehydrogenase from thimophilic archaea

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・准教授

研究者番号：50412317

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)：色素依存性L-乳酸脱水素酵素(Dye-LDH)は、L-乳酸を定量可能なバイオセンサやL-乳酸を燃料とするバイオ電池用素子として期待されている。しかしながら、これまで見出されているDye-LDHは酵素の安定性が低いために応用開発が限られている。申請者は、超好熱菌から高い安定性が期待できるDye-LDHを探索した。その結果、超好熱性アーキアから新規なDye-LDHを見出した。本申請では、この新規酵素の性質と機能の解明に成功した。さらに、このDye-LDHを素子としたバイオセンサ、バイオ電池用素子としての機能評価に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請で見出した色素依存性L-乳酸脱水素酵素(Dye-LDH)は、L-乳酸をリアルタイムで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すことが明らかとなった。L-乳酸は、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-乳酸をリアルタイムで測定可能なバイオセンサは、酵素の安定性の問題で開発が困難であった。本申請で見出したDye-LDHを用いてバイオセンサを構築できれば、これまで見出されているDye-LDHでは実現不可能であった長期間連続使用できるウェアラブルデバイスなど全く新しい用途で利用できる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)：Dye-linked L-lactate dehydrogenase (Dye-LDH) has high potential usefulness as a specific element for L-lactate biosensor and bio fuel cell. However, the practical application to Dye-LDH reported so far has been limited because of its low stability. We were screening for Dye-LDH with high stability from hyperthermophile. As a result, we found a novel Dye-LDH, and characterized the detail enzyme properties. In addition, investigation as a specific element for electrochemical devise was successful. These results indicate that the novel Dye-LDH derived from hyperthermophilic archaea has high potential utility for application to a specific element for electrochemical devices.

研究分野：タンパク質化学

キーワード：L-乳酸 酸化還元酵素 バイオセンサ バイオ電池

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) とは、有機酸、糖、アミノ酸などの生体物質を酸化し、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メディエータとすることで酵素反応を電極と結びつけることが可能になる。このことから Dye-DH は物質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や生体物質を起電力とするバイオ電池に利用できる酵素機能電極用素子としての応用が期待されている。

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超好熱菌に着目して、Dye-DH の機能開発を進めてきた。その結果、超好熱アーキア *Sulfurisphaera tokodaii* より L-乳酸を基質とする色素依存性 L-乳酸脱水素酵素 (Dye-LDH) を見出すことに成功した。L-乳酸は、糖尿病、肝不全、腎不全などの合併症で致死率が非常に高い乳酸アシドーシスの重要な指標であり医療診断用のバイオマーカーとして注目を集めている。また、L-乳酸はヒト汗中にも多く存在しており発汗により発電可能な酵素燃料電池用燃料としても注目されている。研究代表者が見出した超好熱菌由来 Dye-LDH は、これまで見出されている超好熱菌由来酵素と同様に高い安定性を有していると考えられ、本酵素を素子とする酵素機能電極が構築できれば、これまでに例の無い長期モニタリング可能な医療用新規バイオセンサや長期間作動可能なウェアラブル機器に搭載可能な新規バイオ電池の開発が可能になる。本研究では、この新たに見出された超好熱菌由来 Dye-LDH の酵素機能の評価を行い新規バイオセンサ、酵素燃料電池への応用面の開発につなげることを目的として研究を進めた。

2. 研究の目的

L-乳酸は、糖尿病、肝不全、腎不全などの合併症で致死率が非常に高い乳酸アシドーシスの重要な指標である。また、L-乳酸はヒト汗中にも多く存在していることが知られている。これらのことから、L-乳酸をリアルタイムで測定可能なバイオセンサや L-乳酸を燃料として長期間作動可能なバイオ電池などの電気化学デバイスの開発が期待されている。Dye-LDH は基質である L-乳酸の電子を人工の酸化還元色素を介して電極へ伝達することができるため、これら電気化学デバイス用素子としての応用利用が期待されている。しかしながら、これまでに見出されている酵母や常温細菌から見出されている Dye-LDH は、酵素の安定性に問題があり長期間モニタリング可能な L-乳酸定量用バイオセンサや長期間作動可能な酵素燃料電池の開発は進んでいない。

研究代表者が見出した超好熱菌由来 Dye-LDH は高い安定性が期待されるため、これまで見出されている酵母や常温性細菌では困難であった長期間モニタリング可能な L-乳酸定量用バイオセンサや長期間作動可能な酵素燃料電池の開発が期待される。

しかしながら、本酵素は超好熱菌で初めて見出された Dye-LDH であるため、酵素の分子構造や分子内の電子伝達経路などの酵素化学的、立体構造学的知見がほとんどない。バイオセンサやバイオ電池用素子など応用開発を行うに当たって、酵素の特性の改良や、高出力な電極を作製するための電極上での酵素の配向性を持たせた固定化法の開発には、分子内の電子伝達経路の解析を含む詳細な酵素化学的性質の解析やタンパク質の立体構造情報は必須である。本研究では、超好熱アーキアから見出した新規 Dye-LDH の機能と構造を明らかにすることによって、本酵素の応用利用に向けた機能開発を進めることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) *Sulfurisphaera tokodaii* 由来 Dye-LDH の酵素化学的性質の解析

超好熱アーキア *Sulfurisphaera tokodaii* のゲノム情報より Dye-LDH をコードしていると考えられる遺伝子情報を抽出した。この Dye-LDH 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。また、*Sulfurisphaera tokodaii* と同じアーキアである *Sulfolobus acidocaldarius* を宿主とするタンパク質発現系も構築した。

構築した大腸菌あるいは *Sulfolobus* を宿主とした Dye-LDH の発現系を用いて、それぞれの宿主で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。

発現が確認できた組換えタンパク質の精製を行い、精製酵素を用いて酵素の性質の解析を行った。

(2) DyeLDH の電気化学的性質の解析

Dye-LDH をグラッシーカーボン (GC) 電極上にカーボンナノチューブ (CNT) とともに修飾した Dye-LDH/CNT/GC 電極を作成し Dye-LDH の電極上での触媒能を評価した。

4. 研究成果

(1) *Sulfurisphaera tokodaii* 由来 Dye-LDH の発現

Sulfurisphaera tokodaii 由来 Dye-LDH (Sf-LDH) の機能評価を行うために組換えタンパク質発現系を行った。本酵素をコードする遺伝子 *stk_16550* は *Sf. tokodaii* ゲノム上で *stk_16540*, *16560*,

16570 と遺伝子クラスターを形成していたため、これら遺伝子がコードするタンパク質も Dye-LDH 活性に関与しているサブユニットの可能性が考えられた。そこで、*stk_16550* と他の遺伝子との共発現系を構築する必要性があった。そこで、大腸菌を宿主とする組換えタンパク質発現系を構築する際には、それぞれの遺伝子の upstream に T7 プロモーターを配置し T7 プロモーター制御下での組換えタンパク質発現系 pET15b-*stk16540/16550/16560/16570* の構築を行った。構築した組換えタンパク質発現系を用いて大腸菌によるタンパク質発現を行った。その結果、発現タンパク質は封入体を形成してしまい Dye-LDH 活性も確認できなかった。そこで、次に *Sulfolobus acidocaldarius* を宿主としたタンパク質発現系の構築を行った。*Sulfolobus* 細胞内で複製可能なプラスミドを用いて *stk16540/16550/16560/16570* 遺伝子クラスターの発現系を構築した。構築した発現系を用いて *S. acidocaldarius* 細胞内で本遺伝子クラスターの発現を行った。その結果、宿主内での Dye-LDH 活性を確認することができた。さらに *S. acidocaldarius* 細胞内での組換えタンパク質発現を確認するためにウエスタンブロット解析を行った。構築した組換えタンパク質発現系は STK16540 の N 末端側にヒスチジンタグ (His-tag) が付加するように設計してあるので His-tag 抗体で組換えタンパク質の検出を行った。その結果、His-tag タンパク質を確認できた。これらの結果から、*S. acidocaldarius* を宿主とした組換えタンパク質発現系で Dye-LDH を発現することに成功した。

(2) Sf-LDH の機能解析

Sf-LDH のサブユニット構造の解析

Sf-LDH をニッケルキレートリングカラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトクロマトグラフィーの 2 段階の精製を行った。この精製酵素をネイティブグラジエント PAGE で確認したところ 250 kDa 付近にタンパク質が確認でき、電気泳動的に均一に精製できていることが明らかとなった。この精製酵素を SDS-PAGE にかけて、サブユニット構造を解析した結果、本酵素は 42 kDa と 33 kDa の二つのサブユニットから構成されていることが明らかとなった。これらのタンパク質は分子量から STK16540 (33 kDa) と STK16550 (42 kDa) であることが分かった。STK16540 は一次構造から鉄硫黄クラスターを含む電子伝達タンパク質であることが分かった。これらの結果から本酵素は、サブユニットからなる 3 3 構造を取っていることが判明した。

Sf-LDH の酵素化学的性質の解析

Sf-LDH のセンサ用素子の評価を行うために酵素の諸性質の解析を行った。本酵素の基質特異性を調べた結果、電子受容体では人工酸化還元色素である 2,6-ジクロロインドフェノールに対して最も高い活性を示した。また、電子供与体では L-乳酸の他に 2-ヒドロキシヘキサノ酸、2-ヒドロキシ酪酸などの α -ヒドロキシ酸に反応性を示した。また、本酵素の補酵素はこれまで見出されている常温菌由来 Dye-LDH 同様 FMN を補因子として有していた。Sf-LDH の安定性について解析したところ、本酵素は 80°C、10 分の熱処理においても 80% 以上の残存活性を示し、50°C、30 分の処理においては、pH 6.5 から pH 8.0 までの広範囲な pH 領域に対して安定性を示した。これまでに見出されている常温菌由来 Dye-LDH は 50°C 以上で失活するものがほとんどであることから、本研究で見出した Dye-LDH は、これまでの酵素と比較して高い安定性を有することが明らかとなり、バイオセンサ用素子として高い有用性が示された。

(3) Sf-LDH 修飾電極の解析

Sf-LDH をグラッシーカーボン電極 (GCE) 上に多層カーボンナノチューブ (MWCNT) とともに修飾した SfLDH/MWCNT/GCE を作成し、phenazine ethosulfate (PES) をメディエータとして用いた Mediator electron transfer (MET) 反応における電気化学的評価を行った。SfLDH/MWCNT/GCE 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-乳酸存在下での電流密度の上昇が認められた。また、クロノアンペロメトリー (CA) 測定において各乳酸濃度での電流値の増大が確認できた。CA の結果をもとに基質濃度と上昇した電流値をプロットした結果、0.01 - 0.06 mM の間で直線性を示した。このことから、酵素に PES をメディエーターとした電極を用いることにより、この濃度の L-乳酸を測定することが可能であることが明らかとなった。

また、本酵素は鉄硫黄含有タンパク質である STK16540 と Dye-LDH 活性コンポーネントである STK16550 の二種類のタンパク質から構成されていることが明らかとなっている。鉄硫黄タンパク質を含む酵素の多くは、酵素-電極間の電子伝達をメディエータ非存在下でも行うことができる直接電子移動 (DET) 反応を行うことができることが知られている。本酵素も鉄硫黄タンパク質を有していることから DET 反応を行う可能性が考えられたため、本酵素による DET 反応の評価を行った。その結果、CV 測定ではメディエータを用いなくても基質存在下においても電流密度の増大が確認できた。DET 反応は、電極反応にメディエータを必要としないため、電極あるいは酵素にメディエータを修飾する必要が無くバエレクトロケミカルデバイス用素子として非常に有用である。これまでに DET 反応を行うことができる Dye-LDH の報告は無く、本酵素が初めてである。

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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 里村武範、宇野紘平、角間真人、黒沢則夫、櫻庭春彦、大島敏久、末信一郎
2. 発表標題 好熱性アーキアに存在する新規色素依存性L-乳酸脱水素酵素複合体の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇野 紘平、里村 武範、黒沢 則夫、櫻庭 春彦、末 信一郎
2. 発表標題 Sulfolobus tokodii 由来色素依存性 L-乳酸脱水素酵素の大腸菌を宿主とした発現系の構築
3. 学会等名 第71回日本生物工学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 里村武範、宇野紘平、櫻庭春彦、末信一郎
2. 発表標題 長寿命バイオ電極用超好熱性色素依存性脱水素酵素の特性評価
3. 学会等名 第29回日本MRS年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 里村 武範、宇野 紘平、角間 真人、櫻庭 春彦、大島 敏久、末 信一郎
2. 発表標題 好熱性アーキアに存在する色素依存性L-乳酸脱水素酵素複合体の機能解析
3. 学会等名 第69回日本生物工学会
4. 発表年 2017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
研究協力者	大島 敏久 (Ohshima Toshihisa) (10093345)	大阪工業大学・工学部・教授 (34406)	
研究協力者	櫻庭 春彦 (Sakuraba Haruhiko) (90205823)	香川大学・農学部・教授 (16201)	
研究協力者	坂元 博昭 (Sakamoto Hiroaki) (70552454)	福井大学・学術研究院・准教授 (13401)	
研究協力者	末 信一郎 (Suye Shinichio) (90206376)	福井大学・理事・副学長 (13401)	