

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：32663

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21780082

研究課題名（和文）

グラム陰性細菌由来新規コレステロール酸化酵素の高度安定化機構の解明

研究課題名（英文）

Analysis of a highly stable cholesterol oxidase from a gram-negative bacterium

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

研究成果の概要（和文）：コレステロールオキシダーゼは、血中の総コレステロールの定量に広く使用されている。これまで報告された全ての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）の高度な安定性の機構について調べた結果、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。

研究成果の概要（英文）：Cholesterol oxidase is a valuable enzyme which is used for determination of cholesterol 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 this study, the mechanism of the high stability of the enzyme was studied. As the result, it was found that a coenzyme FAD is involved in the stability of the enzyme.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：コレステロール・コレステロールオキシダーゼ・臨床検査・*Chromobacterium*・グラム陰性細菌

## 1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の国民健康・栄養調査によると、血液中の中性脂肪やコレステロールの値が高い人は、潜在的患者も入れると、2,200 万人もいるといわれている。このような疾患は、「脂質異常症」と呼ばれる。アメリカや西欧を含めると「脂質異常症」の可能性のある人

は約 3 億人に達する。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。微生物由来のコレステロールオキシダーゼ（以下、COX と略す）は、このような高コレステロール血症などの臨床検査のため、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。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、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、いわゆる「善玉」）に含まれるコレステロールをそれぞれ別々に分離して測定する技術も開発されているが、この場合には酵素変性作用の強い界面活性剤が使用されている。厚労省の「脂質異常症」の診断基準として用いられる日本動脈硬化学会の「動脈硬化性疾患予防ガイドライン」では、2007年からLDLとHDL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、今後は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るものと予想される。このような技術開発には、様々な界面活性剤存在下で安定性の高いCOXが必要となる。この他にも、COXは、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応用する研究が報告されており、医薬品原料の生産として注目されている。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。現在、臨床検査やその他の研究に使用されている酵素のほとんどが、グラム陽性細菌である *Streptomyces* 属や *Nocardia* 属など放線菌由来のCOXである。これらの酵素は、グラム陰性細菌由来のCOXに比べて、界面活性剤や有機溶媒存在下で不安定であり、熱安定性も低い。

## 2. 研究の目的

我々は、これまで報告された全てのCOX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（グラム陰性細菌 *Chromobacterium* sp. DS-1 株由来）について報告していた (Doukyu et al., Appl Microbiol Biotechnol 80:59-70 (2008))。本酵素は、臨床検査分野やその他の産業分野へのCOXの応用性を拡大するものとして期待している。そこで、本研究では *Chromobacterium* sp. DS-1 株由来のCOX（以下、DS-1 COXと略す）の高度安定化の機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

COXは補欠分子族としてフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) を必要とし、FADがタンパク質に共有結合したタイプと非共有結合のタイプの2種類がある。DS-1 COXはFADが共有結合しており、放線菌由来のCOXは非共

有結合型である。これまでの報告等から、FAD共有結合型COXの方がFAD非共有結合型COXよりも安定性が高いことが推察される。つまり、FADと酵素の結合の違いが酵素の安定性に関与しているものと考えられた。DS-1 COXはX線結晶解析の結果などから、ヒスチジン残基 (His63) にFADが共有結合していることが分かっている。そこで、このヒスチジン残基を他のアミノ酸に置換した変異体 (FAD非共有結合型COX) を作製し、変異体の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。この結果、FADと酵素の結合の酵素安定性への関与について明らかにすることにした。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

シグナルペプチドを除いて、成熟型COXを発現するように構築されたプラスミド pETCOX を鋳型として用いた。タカラバイオのPCR変異導入キットを用いて、FADが共有結合しているヒスチジン基 (H63) をアラニンに置換した。構築したプラスミドを pETCOX (H63A) とした。

### (2) COX変異体の精製

pETCOX (H63A) を大腸菌に導入し、LB培地を用いて30°C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によりCOXを精製した。

### (3) COX活性の測定 (Allain法)

Allain法は、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。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 ml に酵素液 50  $\mu$ l を加え30°Cで反応させ、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  $\mu$ mol のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を生成する酵素量を1 Uとした。

## 4. 研究成果

### (1) COX変異体の作製と精製

既に、本酵素をコードする遺伝子のクローニングに成功していたため、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) の高発現化を検討した。この結果、pET システムを用いることにより、元の DS-1 株に生産させた場合よりも 148 倍高い (同じ培養液量当たり) 酵素生産が可能になった。また、精製条件なども検討した結果、培養液 100 ml から 4 mg 程度の精製酵素を得ることが可能となった。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。また、発現された組換え COX は、元の DS-1 株が生産する野生型 COX と同様の性質 (至適温度、至適 pH、温度安定性、pH 安定性、基質特異性、Km 値、Vmax 値など) を示すことが分かっていた。そこで、pETCOX を鋳型として用いて、FAD が結合しているヒスチジン残基 (His63) を他のアミノ酸に置換するようにプライマーを設計して PCR を行うことにより、COX 遺伝子に変異を導入し、FAD 非共有結合型 COX を作製し、精製した。変異体 COX の精製について表 1 にまとめた。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 1)。

表 1 COX 変異体の精製

	総活性 (U)	総タンパク量 (mg)	比活性 (U/mg)	精製度	収率 (%)
超音波破碎後	6.9	115	0.060	1	100
DEAE精製後	6.3	10.3	0.61	10	92

200 ml 培養した結果を示した

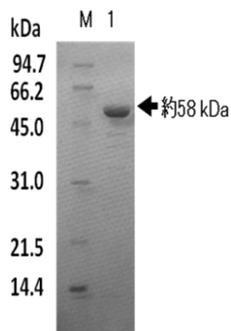


図 1 精製した COX 変異体  
M: マーカー  
1: 精製した COX 変異体

(2) COX 変異体の温度安定性および至適温度さらに、精製した変異導入体の温度安定性について検討した結果、変異導入体の熱安定性が著しく低下していることが示された (図 2)。また、至適温度を調べた結果、野生型酵素と FAD 非共有結合型 COX のいずれの場合も至適温度は 60°C から 65°C であったが、30°C から 50°C の範囲において FAD 非共有結合型 COX の活性が顕著に低下していた。

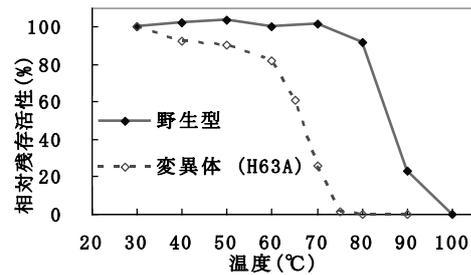


図 2 野生型 COX と H63A の温度安定性

(3) COX 変異体の pH 安定性および至適 pH pH 安定性についても検討した。野生型酵素と FAD 非共有結合型 COX を用いて、pH 2 から pH 12 までの範囲の各 pH において 30°C で 30 分間保温した後の残存活性を調べた結果、pH 2 から pH 3 の範囲において FAD 非共有結合型 COX の方の安定性が低下していた。至適 pH を調べた結果、FAD 非共有結合型 COX の pH 3 から pH 6 までの範囲における活性が、野生型酵素に比べて低下していた (図 3)。

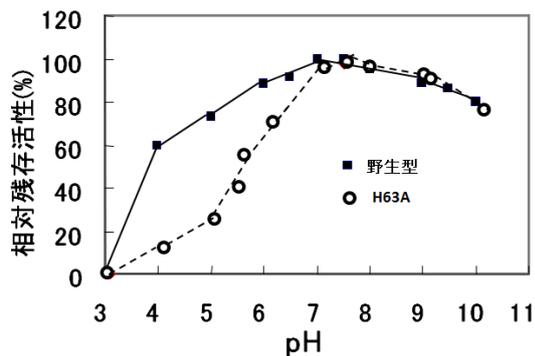


図 3 野生型 COX と H63A の至適 pH

(4) COX 変異体の安定性に対する有機溶媒および界面活性剤の影響  
有機溶媒や界面活性剤に対する安定性につ

いて調べた結果、FAD 非共有結合型 COX は、SDS などの界面活性剤や酢酸エチルやブタノールなどの有機溶媒に対する安定性が野生型酵素よりも著しく低下していた。

#### (5) CD スペクトルによる COX の二次構造の変化

CD スペクトルにより、様々な温度における FAD 非共有結合型 COX の二次構造の変化を調べた結果、FAD 非共有結合型 COX は 70°C 以上で二次構造の変化が認められ、野生型酵素よりも安定性が低下していることが確認された (図 4)。以上の結果から、FAD が酵素に共有結合しているか否かが酵素の安定性に深く関与することが示唆された。

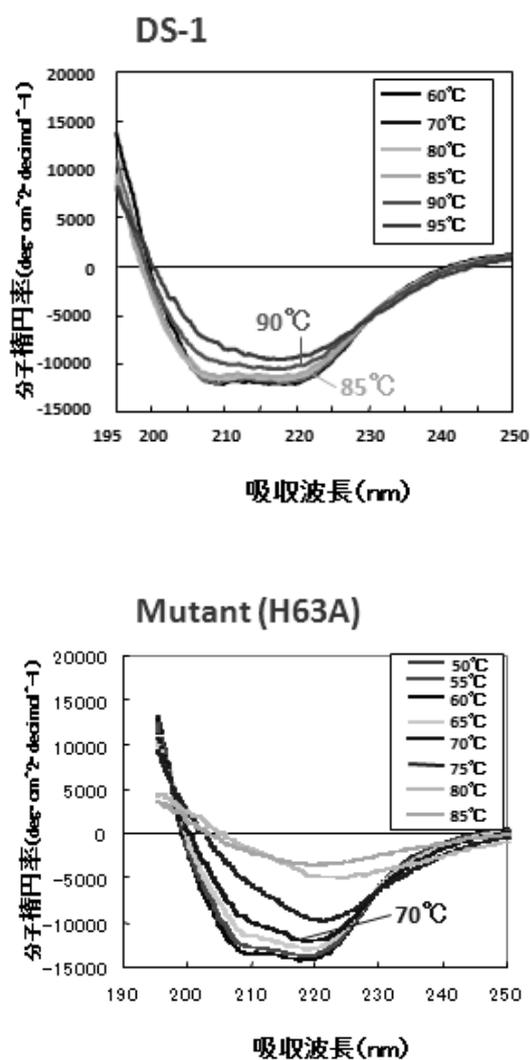


図 4 野生型 COX と H63A の温度を変化させた場合の CD スペクトル

#### (6) DS-1 COX の立体構造

DS-1 COX の X 線結晶構造解析を行った。本酵素の立体構造は、アミノ酸レベルで 42% の相同性を示し、既に立体構造が決定されていた

*Brevibacterium sterolicum* 由来のコレステロールオキシダーゼと全体的な構造は非常に似ていたが、いくつかのループ構造などに違いが認められた。これら 2 つの酵素の耐熱性は大きく異なり、*Brevibacterium sterolicum* 由来の COX は 1 時間の熱処理で 50°C まで安定であるが、DS-1 株由来の COX は 1 時間の熱処理で 85°C まで安定である。また、*Brevibacterium sterolicum* 由来の COX はコレステロールを酸化してコレスト-4-エン-3-オンを生成するのに対し、DS-1 株由来のコレステロールオキシダーゼによるコレステロール酸化反応では 6 $\beta$ -ヒドロペルオキシコレスト-4-エン-3-オンが生成することが分かっている。また、本酵素の内部には、酸素分子が流入するトンネルや、基質結合部位、補酵素である FAD の結合領域が認められた (図 5)。また、補酵素の FAD は酵素分子と 63 番目のヒスチジン残基の部分で共有結合していることが確認された (図 6)。また、分子内部には、酸素分子の流入をコントロールするゲートの役割をする考えられるグルタミン酸残基とアルギニン残基が存在することが分かった。

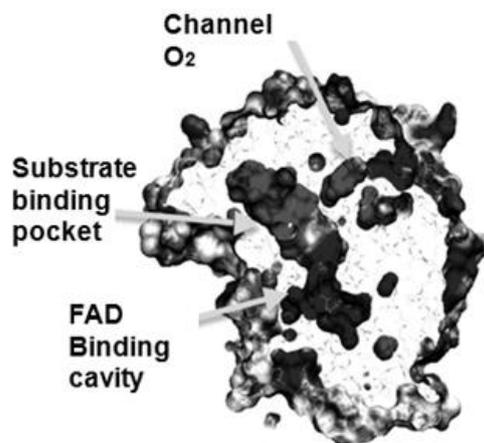


図 5 DS-1 COX の分子内部の立体構造

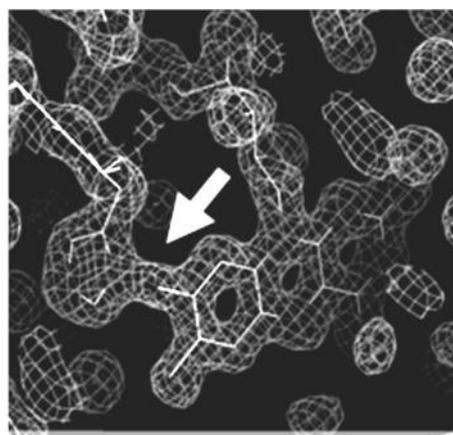


図 6 補酵素 FAD と His63 の結合

また、DS-1 株由来の COX と *Brevibacterium sterolicum* 由来の COX では、酵素の表層の極性が大きく異なっており、DS-1 株由来の COX は正に荷電したアミノ酸残基が多く塩基性であり、また、*Brevibacterium sterolicum* 由来の COX では、負に荷電したアミノ酸残基が多く酸性となっている。

これら 2 つの酵素のアミノ酸組成を調べた結果、ロイシンやアラニンの割合が、DS-1 株由来のコレステロールオキシダーゼでは多く、これらのアミノ酸は、酵素の表層の  $\alpha$ -ヘリックスに存在することが示された。アラニンがタンパク質の二次構造である  $\alpha$ -ヘリックスに高頻度で存在すると、タンパク分子が安定化することが知られており、DS-1 株由来の COX の高い安定性の 1 つの要因として、アラニンが  $\alpha$ -ヘリックスに高頻度で存在することが考えられる。

#### 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 4 件)

- ① N. Doukyu, Novel cholesterol oxidases which were found in the studies of applications of organic solvent-tolerant bacteria. J. Jpn. Soc. Extremophiles 10, 13-16 (2011) 査読なし
  - ② M. Sagermann, A. Ohtaki, K. Newton, N. Doukyu, Structural characterization of the organic solvent-stable cholesterol oxidase from *Chromobacterium* sp. DS-1. J. Struct. Biol. 170, 32-40 (2010) 査読有り
  - ③ N. Doukyu and H. Ogino, Organic solvent-tolerant enzymes. Biochem. Eng. J. 48, 270-282 (2010) 査読有り
  - ④ N. Doukyu, Characteristics and biotechnological applications of microbial cholesterol oxidases. Appl. Microbiol. Biotechnol. 83, 825-837 (2009) 査読有り
- [学会発表] (計 14 件)
- ① N. Doukyu, Novel microbial cholesterol oxidases - useful enzymes for multiple applications, 9<sup>th</sup> International Symposium on Bioscience and Nanotechnology (2011 年 12 月 10 日), Kawagoe, Japan
  - ② S. Nihei, N. Ono, N. Doukyu, M. Sagermann, Characterization of cholesterol oxidases

from gram negative bacteria, 9<sup>th</sup> International Symposium on Bioscience and Nanotechnology, (2011 年 12 月 10 日), Kawagoe, Japan.

- ③ 二瓶翔、道久則之「組換え大腸菌による *Pseudomonas aeruginosa* 由来コレステロールオキシダーゼの生産」極限環境微生物学会 2011 年度年会 (2011 年 11 月 27 日-28 日) 長崎大学
- ④ 小野奈津美、道久則之「*Chromobacterium* sp. DS-1 株由来コレステロールオキシダーゼの触媒部位の解析」極限環境微生物学会 2011 年度年会 (2011 年 11 月 27 日-28 日) 長崎大学
- ⑤ N. Doukyu, Novel cholesterol oxidases from bacteria -Useful enzymes for multiple applications. BNERC - IIT Delhi Seminar, International Seminar for the 125<sup>th</sup> Anniversary of Toyo University, (2011 年 8 月 2 日) India, Delhi.
- ⑥ N. Ono, S. Nihei, N. Doukyu, M. Sagermann. Analysis of highly stable cholesterol oxidases from gram negative bacteria. 8<sup>th</sup> International Symposium on Bioscience and Nanotechnology, (2010 年 12 月 10 日) Tokyo.
- ⑦ 道久則之 「臨床検査に役立つ酵素～細菌のコレステロールオキシダーゼの研究～」東洋大学 生命科学部シンポジウム、(2010 年 11 月 26 日) 東洋大学 板倉校舎
- ⑧ 道久則之 「有機溶媒耐性菌の応用研究から見出された新規なコレステロール酸化酵素に関する研究」極限環境微生物学会 2010 年度年会、極限環境生物学会・研究奨励賞講演、(2010 年 11 月 16 日) 京都大学宇治キャンパス
- ⑨ 道久則之 「コレステロール値を測定するための安定なコレステロールオキシダーゼ」大学連携新技術説明会、(2010 年 10 月 29 日) JST ホール 東京
- ⑩ N. Doukyu, Cholesterol oxidases from organic solvent-tolerant bacteria. The 8th International Congress on Extremophiles. (2010 年 9 月 12-16 日) Ponta Delgada. Portugal.
- ⑪ 道久則之 「熱、有機溶媒、界面活性剤耐性のコレステロールオキシダーゼの解析」CPhI Japan, TLO/大学知的財産本部セミナー、(2010 年 4 月 23 日) 東京ビッグサイト

⑫ 道久則之、柴田貫平「*Chromobacterium* 属細菌由来コレステロールオキシダーゼ遺伝子のクローニングと発現」、日本農芸化学会（2010年3月29日）東京大学

⑬ N. Doukyu, K. Shibata, M. Sagermann. Cloning, sequence analysis and expression of a gene encoding *Chromobacterium* sp. DS-1 cholesterol oxidase. 7<sup>th</sup> *International Symposium on Bioscience and Nanotechnology*, (2009年11月20日) Toyo University.

⑭ 道久則之、「*Chromobacterium* 属細菌由来コレステロールオキシダーゼ遺伝子のクローニング」、極限環境微生物学会 第10回年会（2009年10月29日）明治大学

〔その他〕

ホームページ等

東洋大学 研究者情報データベース

[http://ris.toyo.ac.jp/details/index.php?user\\_id=791](http://ris.toyo.ac.jp/details/index.php?user_id=791)

## 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

### (2) 研究分担者 (0)

### (3) 連携研究者 (0)