

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 17 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23560946

研究課題名(和文) 超好熱菌の新規色素依存性デヒドロゲナーゼの探索と機能性電極素子への利用

研究課題名(英文) The discovery of novel dye-linked dehydrogenases in hyperthermophiles and their application for biosensor elements

研究代表者

櫻庭 春彦 (Haruhiko, Sakuraba)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：90205823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：色素依存性デヒドロゲナーゼ(dye-DH)は、バイオセンサーの素子としての利用が期待できる。しかし常温菌由来の酵素は総じて不安定であり、応用開発は遅れている。一方、超好熱菌には安定性の高いdye-DHが存在する。本研究では、超好熱菌のゲノム情報に基づきdye-DHの探索を行った。その結果、新規D-フェニルアラニンデヒドロゲナーゼ、3タイプのD-乳酸デヒドロゲナーゼ、L-プロリンデヒドロゲナーゼ(LPDH)を見出し、これらの酵素化学的性質を明らかにした。さらに、LPDHについては結晶構造解析に成功した。また、数種の酵素を用いて電極に固定化し、センサー素子としての有用性を確認した。

研究成果の概要(英文)：Many types of dye-linked dehydrogenases(dye-DHs) have been identified in mesophilic microorganisms, and it has been suggested that they have the potential for use as specific elements in biosensors. However, their instability has limited the practical application of mesophilic dye-DHs. On the other hand, hyperthermophiles are known to produce highly stable dye-DHs. Their high stability make them more amenable to practical application. In this study, on the basis of genome information, we observed novel D-phenylalanine dehydrogenase, three types of D-lactate dehydrogenase, and L-proline dehydrogenase (LPDH) in hyperthermophiles. We revealed enzymological properties of these enzymes. Moreover, we succeeded in the crystal structure analysis of LPDH. Finally, we constructed enzyme-immobilized electrodes with hyperthermophilic dye-DHs and confirmed that these electrodes are available for stable biosensors.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：生物機能・バイオプロセス

キーワード：超好熱菌 デヒドロゲナーゼ バイオセンサー フェニルアラニン 乳酸 プロリン 結晶構造解析 耐熱性酵素

1. 研究開始当初の背景

色素依存性デヒドロゲナーゼ(Dye-DH)は、糖・有機酸・アミノ酸など各種生体成分から電子を取り出し、人工の酸化還元色素に渡すことができる。この反応を利用すれば、人工色素をメディエーターとして、酵素反応と電極を結びつけることが可能となるため、バイオセンサーやバイオ電池素子としての利用が期待できる。しかしながら常温生物由来の酵素は、総じて不安定であり、応用開発は遅れている。

我々はこれまでに、超好熱菌培養菌体の活性スクリーニングにより、*Thermococcus profundus* に色素依存性L-プロリンデヒドロゲナーゼ(LPDH)を見出し、本酵素が4種類のサブユニットから構成される複合体構造を持つことを明らかにした。また、類縁の*Pyrococcus horikoshii* に、2種サブユニット型LPDHを見出し、そのX線結晶構造解析に成功している。4種サブユニット型LPDHについては、DCIPと共に炭素電極へ固定化することに成功し、L-プロリン濃度に依存して良好な電流応答を示すことを確認した。これは、超好熱菌由来のDye-DHがセンサー素子として有効利用できることを示す最初の例として高い評価を受けた[第5回酵素応用シンポジウム研究奨励賞受賞]。さらに、*Pyrobaculum islandicum* には、膜結合型のD-プロリンデヒドロゲナーゼ(DPDH)を見出している。膜結合型酵素は、活性を保持したまま電極へ固定化することが困難であるが、我々はDPDHを用いて、高分子ポリマーを利用した、高温条件下での効果的な固定化法の開発に成功した。作成したD-アミノ酸センサーは、80日以上 of 長期間、高い精度を保持した。これらの結果は、超好熱菌のDye-DHが応用面で優れた潜在性を持つことを示している。

2. 研究の目的

上記背景を踏まえ、臨床分析などに有用性の高い、多様なDye-DHを見出すことを目的として、活性スクリーニングを行ったところ、研究開始時点で新規D-乳酸デヒドロゲナーゼ(DLDH)および新規ホモダイマー型LPDHを見出した。しかしながら、新しいDye-DHの探索には、培養菌体を用いた活性スクリーニングだけでは限界がある。超好熱菌のゲノム情報を見ると、いまだに機能が知られていない多くのDye-DHホモログが存在している。本研究ではDLDH、LPDHの構造解析を進めるとともに、これら未知のDye-DHの活性スクリーニング、触媒する反応の同定、さらに、その機能・構造解析を通して機能性電極素子としての有用性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 超好熱菌のDye-DHホモログ遺伝子のクローニング、発現系の構築および産物の機

能解析

存在が推定されたDye-DHをコードする遺伝子をPCRで増幅後、大腸菌における発現系を構築した。可溶性画分に産物の発現が認められたサンプルについて、熱処理を行い、大腸菌由来のタンパク質を変性させた。その後、活性染色により触媒活性の同定を行った。活性が検出できた酵素を精製し、基質特異性、電子受容体特異性、カイネティクス、熱安定性、反応の温度依存性などを詳細に解析した。

(2) 新規Dye-DHのX線結晶構造解析

酵素の結晶化条件を検討した。シッティングドロップ、ハンギングドロップを基本にして、各種沈殿剤でスクリーニングを行い、得られた結晶を用いてインハウスX線回折装置により、回折データを収集した。分子置換法による位相の決定を試み、これが適用できない場合は、重原子誘導体のスクリーニングを行った。また大腸菌における発現系において、セレノメチオニンを含んだ培地を用いてセレノメチオニル化酵素を生産し、重原子誘導体の結晶を得た。高エネルギー加速器研究機構のビームラインを利用して高精度のデータを収集し、SIRAS、MAD法等により位相決定を行った。

(3) 酵素固定化電極の作成

基本システムとして、取得した酵素をDCIP修飾カーボンペースト電極上へ固定化した機能性電極を作成し、基質の添加に伴う電流応答を、ボルタンメトリーもしくはアンペロメトリー法で検出した。また、オスミウム錯体、キノン類、フェロセン類など多様なメディエーターとの電子授受反応を検討した。固定化法としては、高温条件下で溶液状にしたAgar GelまたはCarbon Nanotube-Ionic Liquid Gelを用いたスピンコーティング法を用い、各酵素における最適条件を検討した。

4. 研究成果

(1) *Rhodothermus marinus* ゲノムより色素依存性D-アミノ酸脱水素酵素(DADH)を見出した。本酵素を大腸菌で生産させ、性質を解析したところ、D-フェニルアラニンをもっとも良好な基質とするDADHであることが明らかとなった。既知のDADHは、D-アラニンまたはD-プロリンをもっとも良好な基質とするため、本酵素は新規DADHであることが判明した。興味深いことに、ゲノム上で本酵素遺伝子は、今までに報告されているD-アミノ酸脱水素酵素遺伝子を含むオペロン構造とは大きく異なる新規クラスターを形成しており、未知のD-アミノ酸代謝経路の存在が示唆された。(学会発表)

(2) *Aeropyrum pernix* 由来の新規ホモダイマー型LPDHの結晶構造解析に成功した。本酵素の基質結合部位にはL-プロリンが結合していた。またC-末端アミノ酸のLeuは、

基質結合ポケットを溶媒から完全に遮断していた。L-プロリンは、その基質結合ポケットに強固にトラップされていた。C-末端 Leu の役割を検証するため、その欠損ミュータントの構造解析を行った。ミュータントの活性中心にはL-プロリンは認められなかった。また、基質結合ポケットは溶媒に対して解放されていた。すなわち本酵素では、L-プロリンの活性中心への保持にC-末端のLeuが重要な役割を担っているという新たな知見を得た。本成果は、国際的に著名な生化学雑誌である *J. Biol. Chem.* に掲載された。(雑誌論文、学会発表)

(3) *Aeropyrum pernix* 由来の DLDH については、結晶作成に成功した。また、X線解析用の初期データを得た。これまで本酵素の構造解析例は大腸菌由来の酵素しか無く、超好熱菌由来酵素の特徴解明が期待できる。また、*Thermoproteus tenax* にも DLDH を見出した。(雑誌論文、学会発表)

(4) 新規ホモダイマー型 LPDH については、非固定化状態で、フェロセンをメディエーターとして L-プロリンに対する電極応答が確認され、0-0.7 mM の範囲で L-プロリンを電気化学的に定量できた。本酵素は従来の LPDH にくらべて、シンプルなサブユニット構造、L-プロリンに対する高い特異性と親和性を持っており固定化電極素子としてより有用性が高いと考えられる。(未発表)

(5) 各種超好熱菌由来の LPDH の酵素化学的性質を詳細に調べ、比較検討した。(雑誌論文、学会発表)

(6) 構造解析に成功したマルチ銅オキシダーゼ (McoP) をカーボン電極表面に滴下し、McoP を物理吸着させた電極を作成した。この電極を用いて、酸素飽和下で酸素の還元波の検出に成功した。また、McoP と polyethyleneimine と交互に積層した電極を作成したところ、作成7日間で約70%の電流密度を維持することができた。このことから、McoP は電極に固定化しても高い安定性を維持できる、バイオ電池のカソード用素子として有用性の高い酵素であることが判明した(雑誌論文、学会発表)

(7) 色素依存性アルドースデヒドロゲナーゼの固定化電極作成に成功した。カーボンナノファイバー、ベンゾキノンおよび本酵素をアガロースゲルと混合し、90 の高温条件下でカーボンペースト電極にスピンコーティングし、電極を作成した。固定化電極はグルコースに対して30日以上安定したレスポンスを示し、センサーとしての有用性が確認できた。超好熱菌酵素の耐熱性を利用した固定化法として注目されている。(雑誌論文)

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 21 件)

Yoneda, K., Sakuraba, H., Araki, T., Shibata, T., Nikki, T. & Ohshima, T. (2013) Crystallization and preliminary X-ray analysis of L-serine 3-dehydrogenase complexed with NADP⁺ from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum calidifontis*, *Acta Cryst.* F69, 134-136. (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23385753>

櫻庭春彦, 大島敏久 (2013) 超好熱菌の極限酵素の耐熱化機構と応用. *バイオインダストリー*, 8, 3-11 (査読無)

http://www.cmcbooks.co.jp/products/detail.php?product_id=4471

Yamada, Y., Hayashi, T., Sakuraba, H., Yabutani, T. & Takayanagi, T. (2013). Fabrication and characterization of a thermostable quinoprotein aldose sugar dehydrogenase immobilized electrode. *Anal. Sci.*, 29, 79-83. (査読有)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23303089>

Kawakami, R., Noguchi, C., Higashi, M., Sakuraba, H. & Ohshima, T. (2013). Comparative analysis of the catalytic components in the archaeal dye-linked L-proline dehydrogenase complexes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97, 3419-3427. (査読有)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22752365>

Sakuraba, H., Kawai, T., Yoneda, K. & Ohshima, T. (2012). Structure of a UDP-glucose dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum islandicum*. *Acta Cryst.*, F68, 1003-1007. (査読有)

<http://dx.doi.org/10.1107/S1744309112030667>

Sakuraba, H., Satomura, T., Kawakami, R., Kim, K., Hara, Y., Yoneda, K. & Ohshima, T. (2012). Crystal structure of novel dye-linked L-proline dehydrogenase from hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*. *J. Biol. Chem.*, 287, 20070-20080. (査読有)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22511758>

Satomura, T., Hara, Y., Suye, S., Sakuraba, H. & Ohshima, T. (2012). Gene expression and characterization of a third type of dye-linked L-proline dehydrogenase from the aerobic hyperthermophilic archaeon, *Aeropyrum pernix*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76, 589-593. (査読有)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22451406>

Yoneda, K., Sakuraba, H., Araki, T. & Ohshima, T. (2012). Crystal structure of binary and ternary complexes of archaeal UDP-galactose 4-epimerase-like L-threonine dehydrogenase from *Thermoplasma volcanium*. *J. Biol. Chem.*, 287, 12966-12974. (査読有)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22374996>

川上竜巳, 里村武範, 櫻庭春彦, 大島敏久

(2012) フラビン含有色素依存性脱水素酵素の機能・構造解析とその応用. **バイオサイエンスとインダストリー**, 70, 340-345 (査読無)

http://www.jba.or.jp/pc/archive/2012/vol70_no5.html

Shibahara, T., Satomura, T., Kawakami, R., Ohshima, T. & Sakuraba, H. (2011). Crystallization and preliminary X-ray analysis of a dye-linked D-lactate dehydrogenase from the aerobic hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*. *Acta Cryst.* F67, 1425-1427. (査読有)

<http://dx.doi.org/10.1107/S1744309111036098>

Satomura, T., Kusumi, K., Ohshima, T. & Sakuraba, H. (2011). Identification and characterization of UDP-glucose dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum islandicum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 2049-2051. (査読有)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&listuids=21979093>

Sakuraba, H., Koga, K., Yoneda, K., Kashima, Y. & Ohshima, T. (2011). Structure of a multicopper oxidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Acta Cryst.*, F67, 753-757. (査読有)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&listuids=21795787>

Sakuraba, H., Kawai, T., Yoneda, K. & Ohshima, T. (2011). Crystal structure of UDP-galactose 4-epimerase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum calidifontis*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 512, 126-134. (査読有)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&listuids=21645492>

[学会発表](計 39 件)

廣田湧也; 石倉 優; 里村武範; 櫻庭春彦; 大島敏久; 末 信一郎 (2014) 好熱性細菌 *Rhodothermus marinus* 由来色素依存性 D-フェニルアラニン脱水素酵素の性質の解明と基質特異性の解析, 日本農芸化学会 2014 年度大会

末 信一郎; 内井俊貴; 坂元博昭; 里村武範; 櫻庭春彦; 大島敏久 (2014) バイオ電池構築のための超好熱性古細菌 *Pyrobaculum aerophilum* 由来 multicopper oxidase を用いたバイオカソード, 日本農芸化学会 2014 年度大会

櫻庭春彦 (2013) 超好熱アーキアの新規 FAD 依存性 L-プロリン脱水素酵素の構造解析, ビタミン B 研究委員会 第 434 回研究協議会

里村武範; 石倉 優; 小柳峰史; 廣田湧也; 櫻庭春彦; 大島敏久; 末 信一郎 (2013) *Rhodothermus marinus* 由来色素依存性 D-

フェニルアラニン脱水素酵素の特性と生理機能の解析, 第 65 回日本生物工学会

川上竜巳; 櫻庭春彦; 大島敏久 (2013) L-プロリン脱水素酵素からのオキシダーゼ活性除去の検討, 第 65 回日本生物工学会

石倉 優; 里村 武範; 櫻庭春彦; 大島 敏久; 末 信一郎 (2013) 耐熱性色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素の探索と機能解析, 日本農芸化学会 2013 年度大会

里村 武範; 金子 祥; 大井 愛実; 布浦 拓郎; 高木 善弘; 高見 英人; 高井 研; 櫻庭春彦; 大島 敏久; 末 信一郎 (2013) 超好熱アーキアに存在する色素依存性 D-乳酸脱水素酵素の機能解析, 日本農芸化学会 2013 年度大会

内井 俊貴; 山口 かよ; 坂元 博昭; 里村 武範; 櫻庭春彦; 大島 敏久; 末 信一郎 (2013) 超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来 multicopper oxidase を用いたバイオカソード電極の構築, 日本農芸化学会 2013 年度大会

石倉 優; 里村武範; 櫻庭春彦; 大島敏久; 末 信一郎 (2012) ゲノム情報を元にした耐熱性色素依存性脱水素酵素の探索と機能解析, 第 64 回日本生物工学会大会

大井愛実; 里村武範; 櫻庭春彦; 大島敏久; 末 信一郎 (2012) 超好熱菌アーキア *Thermoproteus tenax* 由来 D-乳酸脱水素酵素の機能解析, 第 64 回日本生物工学会大会

内井俊貴; 山口かよ; 坂元博昭; 里村武範; 櫻庭春彦; 大島敏久; 末 信一郎 (2012) 超好熱性古細菌由来 *Pyrobaculum aerophilum* multicopper oxidase を用いたバイオカソード電極の特性と評価, 第 64 回日本生物工学会大会

Takenori Satomura; Ryushi Kawakami; Shin-ichiro Suye; Haruhiko Sakuraba; Ohshima Toshihisa (2012) Functional and structural characterization of Dye-linked L-proline dehydrogenase from hyperthermophiles, The 12th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering

里村 武範; 川上 竜巳; 末 信一郎; 櫻庭春彦; 大島 敏久 (2012) 好気性超好熱アーキア *Aeropyrum pernix* 由来色素依存性 L-プロリン脱水素酵素の構造解析, 日本農芸化学会 2012 年度大会

里村武範; 川上竜巳; 末信一郎; 櫻庭春彦; 大島敏久 (2012) クレンアーキオータに存在する新規ホモダイマー型色素依存性 L-プロリン脱水素酵素の機能解析, 第 12 回極限環境微生物学会年会

古賀孝太郎; 米田一成; 鹿島康浩; 大島敏久; 櫻庭春彦 (2011) 超好熱アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来 Multicopper oxidase の構造解析, 平成 23 年度日本農芸化学会西日本支部、中四国支部合同大会

櫻庭春彦; 里村武範; 川上竜巳; 大島敏久

(2011) 超好熱アーキアの L-プロリン脱水素酵素, 第 84 回日本生化学会大会 (シンポジウム)

Toshihisa Ohshima; Tomoki Yabutani; Takenori Satomura; Haruhiko Sakuraba (2011) Characteristics of membrane bound FAD-linked D-proline dehydrogenase and its application to Eelectrochemical biosensor, The Third International Conference on Cofactors 03 (ICC-03)

Toshio Watanebe; Yohei Yamada; Junko Motonaka; Tomoki Yabutani; Haruhiko Sakuraba; Mikito Yasuzawa (2011) Preparation of an electrode modified with a thermostable enzyme Bacillus Subtilis CotA by electrodeposition and its application to biofuel cell cathode, Sixth International Conference on Advanced Materials Development and Performance

〔図書〕(計 1 件)

Sakuraba, H. & Ohshima, T. (2013) Thermophiles in Industrial Biotechnology, Chapter 34: Heterogeneous Production of Thermostable Proteins and Enzymes, Thermophiles in Environmental and Industrial Biotechnology, Springer, pp. 395-412.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 1 件)

名称 : 新規なピルベートオルトホスフェートジキナーゼ、及びその製造方法
発明者 : 櫻庭春彦; 林 順司; 酒瀬川 信一
権利者 : 企業等
種類 : 特許
番号 : 5352788
取得年月日 : 2013 年 9 月 6 日
国内外の別 : 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ag.kagawa-u.ac.jp/sakuraba/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻庭 春彦 (SAKURABA Haruhiko)
香川大学・農学部・応用生物科学科・教授
研究者番号 : 90205823

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

藪谷 智規 (YABUTANI Tomoki)
徳島大学大学院・ソシオテクノサイエンス
研究部・准教授
研究者番号 : 80335786

大島 敏久 (OHSHIMA Toshihisa)
大阪工業大学・工学部・生命工学科・教授
研究者番号 : 10093345