

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780074

研究課題名(和文)キノプロテイン・グリセロール脱水素酵素の触媒機能解析と高性能微生物触媒の創製

研究課題名(英文) Analysis of catalytic properties of quinoprotein glycerol dehydrogenase and its application

研究代表者

阿野 嘉孝 (ANO, Yoshitaka)

愛媛大学・農学部・准教授

研究者番号：00403642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：キノプロテイン・グリセロール脱水素酵素(GLDH)は、酢酸菌に特徴的な産業的に重要な細胞膜酵素である。本研究ではGLDHの特異な触媒機能を理解して機能を向上させることを目指した。

本研究より以下の成果を得た。(1)触媒機能の異なる2菌株のGLDHの一次構造を比較し、その原因がPQQ酵素の特徴的なプロペラ構造W1およびW2にあることを示した。(2)酢酸菌における異種発現系を構築し、GLDHの異種発現を実現した。(3)他のキノプロテインと一次構造を比較解析して、補酵素PQQの結合性を高めた変異体酵素を作製した。これらは5ケトグルコン酸生産等のGLDHが寄与する酸化発酵の向上に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Quinoprotein glycerol dehydrogenase (GLDH) is a membrane-bound enzyme, which is found in *Gluconobacter* having attractive industrial applications. In this study, the primary structure of GLDH was compared with other quinoproteins to understand its unique catalytic properties, and then mutant GLDH was prepared in heterologous expression in *Gluconobacter*.

This study provided the following finding. (i) The propeller structure of PQQ enzyme, especially W1 and W2, are important for GLDH activity. (ii) Heterologous expression system in acetic acid bacteria was constructed to prepare mutant GLDH (iii) GLDH mutants that improved PQQ-binding stability, were prepared by the point mutation based on comparative analysis among PQQ-enzymes. The data will lead to improvement in oxidative fermentation of 5-keto-D-gluconate and others.

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：キノプロテイン グリセロール脱水素酵素 ピロロキノリンキノン 酢酸菌 *Gluconobacter* 酸化発酵 エネルギー代謝 呼吸鎖

1. 研究開始当初の背景

キノプロテイン・グリセロール脱水素酵素 (GLDH) は、*Gluconobacter* 属酢酸菌の細胞膜にみられる特徴的な酵素で、その活性を利用してビタミン C 合成中間体やジヒドロキシアセトンの工業生産が実用化されている。本酵素はグリセロールなどの糖アルコールのみならず、グルコン酸を 5-ケトグルコン酸 (5KGA) に変換することができる柔軟な基質特異性をもつ酵素であることが明らかになっている。このことは、微生物工業における *Gluconobacter* 属酢酸菌の反応の大部分が GLDH によって触媒されているということを示し、新規な汎用性化合物製造技術開発の糸口となり、今後重要となるバイオマテリアル産業の創出に貢献できると期待している。

しかしながら、GLDH の性質に由来する思われるさまざまな要因が、発酵生産を不安定にして、新規汎用化合物の工業的生産の実現の障害となっている。

GLDH はピロロキノリンキノン (PQQ) のみを補欠分子族とするキノプロテインで、触媒サブユニット (SldA) と膜貫通サブユニット (SldB) から構成される。本酵素は広い基質特異性をもつほか、下記の 3 点のようなユニークな性質をもつことが明らかとなっている。(1) GLDH 反応の至適が酸性域とアルカリ域にみられ、それぞれで性質が異なる。(2) 補酵素 PQQ が酵素タンパク質から脱離しやすく、結合に必要な金属イオンの種類によっても性質を変える。(3) 上記の触媒特性は同属菌株間であっても異なる。GLDH の柔軟な基質特性を利用して新規汎用化合物製造技術を確立するためには、これらユニークな触媒機能を酵素化学的、分子生物学的に理解する必要があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、GLDH のユニークな触媒機能の詳細を酵素化学的および分子生物学的に解析して上記 (1)(2)(3) をもたらず要因を明らかにし、その成果を新規汎用化合物製造技術へと展開することである。GLDH 反応はすでにさまざまな物質の工業生産に利用されているものの、広い基質特異性や至適 pH、金属イオン要求性など触媒機能について多くの点が不明のままである。それは、GLDH の単離精製が困難を極め、十分に調査できていないことが大きな要因のひとつである。

本研究では、触媒機能の異なる 2 菌株の GLDH およびキノプロテイン間の PQQ 結合特性に着目し、これらの酵素の一次構造の比較解析から、ユニークな触媒機能をもたらず原因を探索した。

3. 研究の方法

本研究計画では、以下の 3 つの実験を計画し、GLDH のユニークな触媒機能をもたらず

原因を探索して、新規汎用性化合物製造技術における高性能微生物触媒の創製のための科学基盤を得ることを目指した。

(1) 触媒能の異なる 2 菌株の GLDH 構造遺伝子のクローニングと一次構造の比較

(2) 酢酸菌での異種遺伝子発現系の構築

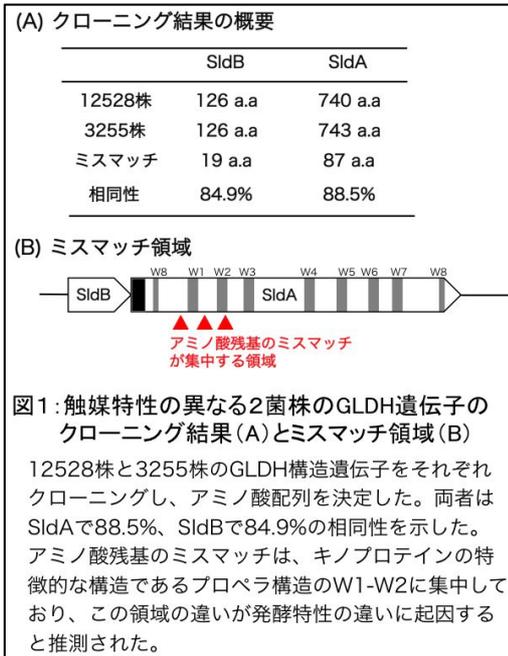
(3) 他のキノプロテインとの比較解析と変異体酵素の発現、酵素活性への影響

本研究課題では、一次構造の比較解析を中心に、ユニークな触媒機能に起因するアミノ酸残基の特定を目指して、部位特異的置換および異種発現系の構築、影響を調査した。

4. 研究成果

(1) 触媒能の異なる 2 菌株の GLDH 構造遺伝子のクローニングと一次構造の比較

ソルボース生産菌として研究の進められている 3255 株はソルビトールからソルボースへの酸化能力が優れているが、5KGA の生産能力はそれほど強いものではない。一方、5KGA 生産菌としてスクリーニングされた 12528 株はグルコン酸を酸化して 5KGA をよく生産するが、ソルボース発酵は特筆するほどの能力はないことが明らかとなった。本研究ではこの触媒機能の違いを元に、両菌株から GLDH 構造遺伝子 *sldBA* をクローニングして一次構造を決定し、比較解析を行った。両者は同属菌株でありながら、SldA で 88.5%、SldB で 84.9% という比較的低い相同性を示した。両者のアライメント解析から、アミノ酸レベルでのミスマッチは、N 末端側に集中しており、C 領域の差異はわずかであった。類似した構造をもつ大腸菌由来 PQQ-GDH のアミノ酸から構造を予測すると、キノプロテインに特徴的なプロペラ構造の W1 および W2 にミスマッチが集中しており、この領域が、ソルボース発酵および 5KGA 発酵の特性に大きく影響していることが推測された。(図 1)



## (2) 酢酸菌での異種遺伝子発現系の構築

上記のアミノ酸残基の差異が、実際に触媒機能に影響するかどうかを確認するために、当該アミノ酸残基を変異させた変異体 GLDH の発現系を試みた。しかしながら、大腸菌等を用いた既存の異種遺伝子発現系では宿主細胞に補欠分子族 PQQ の生合成能がないことが問題となる。そこで、本研究ではまず *Gluconobacter* 属酢酸菌 3255 株を宿主とする異種遺伝子発現系の構築を行った。今回は変異体 GLDH の活性への影響を調査することが目的であるので、本来宿主細胞がもつ内在性 GLDH 構造遺伝子の挿入破壊を行った。本宿主細胞には、*sldBA* に相同性を示すパラログ遺伝子 *sldBA2* の存在が確認されたが、幸い種々の検討結果より本パラログ遺伝子は GLDH 活性を示さないことが確認できた。(図2) 一方、発現ベクターに関しては、細胞膜酵素の過剰発現の実績のある酢酸菌由来のプロモーター、Pgox1068、Pgox0264、Pgox0452 制御下で機能する発現ベクターを構築した。

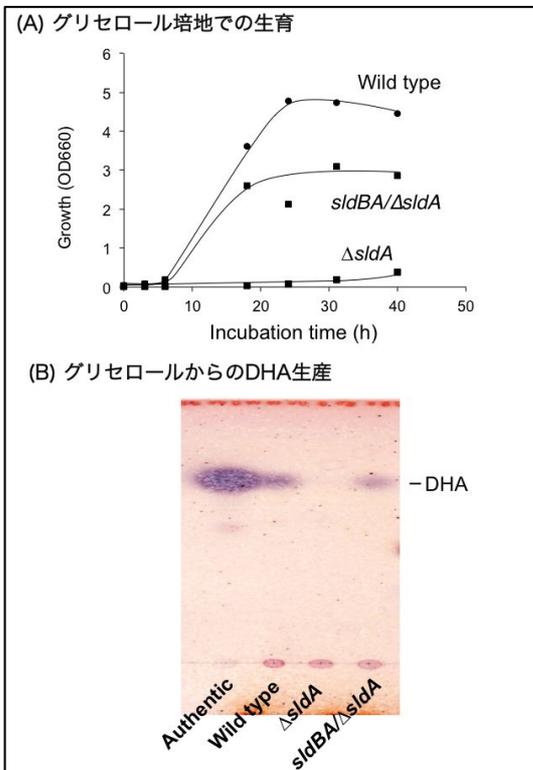


図2: *sldA*破壊株のグリセロール培地での生育(A)と変異株の物質生産能(B)

3255株を宿主とする発現系を構築するために、内在性 *sldA* の挿入破壊を行った。本菌株には *sldBA* のパラログ遺伝子の存在が確認されたが、*sldA* を破壊することで、グリセロールでの生育およびグリセロールからのジヒドロキシセトン (DHA) 生産能が完全に消失した。これらのことから、パラログ遺伝子は GLDH の活性を有しないと結論づけた。

## (3) 他のキノプロテインとの比較解析と変異体酵素の発現、酵素活性への影響

GLDH の触媒機能を高めるために、PQQ の結合性を高めた変異体酵素の作製を試み

た。キノプロテインが補酵素 PQQ と結合する際に、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  といった金属イオンを要求することが知られている。そのため、EDTA のようにキレート作用がある物質の存在下では PQQ の脱離が生じ、大幅な活性の低下が生じることが知られている。GLDH はこれまでの研究によりキレート作用の効果を極めて受けやすく、グルコン酸等の基質によっても PQQ が脱離し、活性を失ってしまうことが確認されている。本研究では、キレート剤に感受性を示す大腸菌由来 GDH (EcGDH) と、高い相同性を示しながら EDTA に耐性を示す酢酸菌由来 GDH (GoGDH) の一次構造を GLDH と比較解析することによって、PQQ の結合安定性に関わるアミノ酸残基を推定した。(図3) EcGDH とマッチし GoGDH とはミスマッチするアミノ酸残基を PQQ 結合に寄与するアミノ酸残基と推定し、10 箇所程度のアミノ酸残基を抽出した。当該アミノ酸を部位特異的置換により、任意のアミノ酸残基へと置換して変異体酵素発現プラスミドを構築した。現在、(2) で構築した宿主系に導入し、変異体酵素タンパク質を作製し、活性を調査しているところである。

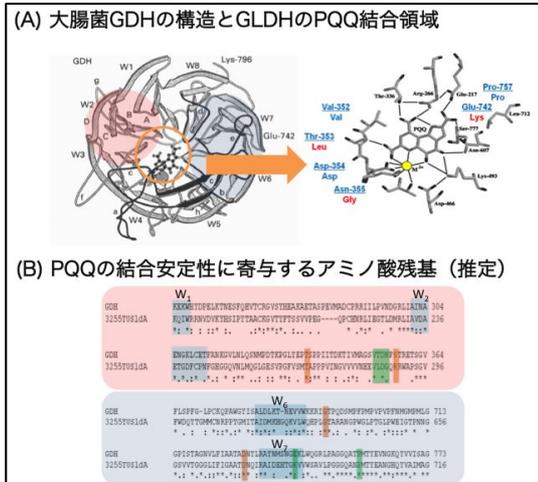


図3: 大腸菌GDHの構造から推測されるGLDHのPQQ結合領域構造(A)とPQQの結合に寄与すると推定されるアミノ酸残基

EDTA存在下での安定性が異なるキノプロテインと GLDH の一次構造を比較解析して、PQQ 結合安定性に寄与するアミノ酸残基を推定した。当該アミノ酸残基について部位特異的置換を行い、変異体酵素を作製、酢酸菌での異種発現系を試みた。

これまでの研究により、触媒特性に重要なアミノ酸残基の推定と実証試験のための基盤が構築できた。今後、変異体酵素の触媒機能への影響を調査することで、GLDH のユニークな性質の要因を特定でき、GLDH を高性能触媒へと向上させることができると期待している。

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 2 件)

Adachi O., Hours RA., Akakabe Y., Shinagawa E., Ano Y., Yakushi T., Matsushita K., Pentose oxidation by acetic acid bacteria led to a finding of membrane-bound purine nucleosidase. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 査読有, 77(5), 1131-1133 (2013)

Miura H., Mogi T., Ano Y., Migita CT., Matsutani M., Yakushi T., Kita K., Matsushita K., Cyanide-insensitive quinol oxidase (CIO) from *Gluconobacter suboxydans* is a unique terminal oxidase superfamily of cytochrome *bd*. *J. Biochem.*, 査読有, 153(6), 535-545 (2013)

〔学会発表〕(計 13 件)

玉井秀樹, 丸山雅史, 阿野嘉孝, 酢酸菌のウロン酸酸化に寄与するPQQ酵素, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 28 日, 明治大学, 神奈川

阿野嘉孝, 大久保慎二, 丸山雅史, 三井亮司, メチロトローフ酢酸菌 *Acidomonas methanolica* におけるジヒドロキシアセトン生産, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 28 日, 明治大学, 神奈川

足立収生, Hours RA, 赤壁善彦, 阿野嘉孝, 品川恵美子, 片岡尚也, 薬師寿治, 松下一信, 分子内ケトンを持つ酸化糖の酸化発酵を触媒する膜酵素, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 28 日, 明治大学, 神奈川

玉井秀樹, 丸山雅史, 阿野嘉孝, *Gluconobacter* 属酢酸菌のウロン酸酸化に寄与する細胞膜酵素, 酢酸菌研究会第 5 回研究集会, 2013 年 10 月 19 日, 沖縄県産業支援センター, 沖縄

阿野嘉孝, 内藤朋子, 丸山雅史, 薬師寿治, 松下一信, *Gluconobacter* 属酢酸菌の酸化発酵過程での呼吸鎖の変換, 第 65 回日本生物工学会大会, 2013 年 9 月 18 日, 広島国際会議場, 広島

玉井秀樹, 丸山雅史, 阿野嘉孝, 酢酸菌のガラクトロン酸酸化活性の探索, 日本農芸化学会中四国支部会第 36 回講演会, 2013 年 6 月 8 日, 島根大学, 島根

阿野嘉孝, 数井彩加, 種場理絵, 山本拓諒, 松谷峰之介, 丸山雅史, 薬師寿治, 松下一信, *Gluconobacter thailandicus* NBRC

3255 に見出された *sldBA* パラログ遺伝子のジヒドロキシアセトン生産への寄与, 日本農芸化学会中四国支部会第 36 回講演会, 2013 年 6 月 8 日, 島根大学, 島根

幡田准也, 丸山雅史, 阿野嘉孝, メチロトローフ酢酸菌 *Acidomonas methanolica* における炭素源に応答した呼吸鎖電子伝達系の変換, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013 年 3 月 26 日, 東北大学, 宮城

足立収生, Hours RA, 阿野嘉孝, 赤壁善彦, 品川恵美子, 薬師寿治, 松下一信, 4-ケトアルドペントースの酸化発酵生産には新規 PQQ 酵素が機能する, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013 年 3 月 25 日, 東北大学, 宮城

玉井秀樹, 丸山雅史, 阿野嘉孝, 酢酸菌におけるウロン酸酸化活性の探索, 酢酸菌研究会第 4 回研究集会, 2012 年 11 月 10 日, 山口大学, 山口

数井彩加, 丸山雅史, 阿野嘉孝, 特性の異なるキノプロテイン・グリセロール脱水素酵素の特徴と一次構造の比較, 酢酸菌研究会第 4 回研究集会, 2012 年 11 月 10 日, 山口大学, 山口

内藤朋子, 丸山雅史, 阿野嘉孝, *Gluconobacter* における酸化発酵過程での呼吸活性の挙動, 酢酸菌研究会第 4 回研究集会, 2012 年 11 月 10 日, 山口大学, 山口

内藤朋子, 種場理絵, 丸山雅史, 薬師寿治, 松下一信, 阿野嘉孝, 酢酸菌グルコン酸酸化呼吸鎖におけるシアン耐性キノール酸化酵素の機能, 日本農芸化学会中四国支部第 33 回講演会, 2012 年 6 月 2 日, 愛媛大学, 愛媛

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.agr.ehime-u.ac.jp/~microbiol/1index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿野 嘉孝 (ANO, Yoshitaka)

愛媛大学・農学部・准教授

研究者番号: 00403632