

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870271

研究課題名(和文)新規色素依存性D-アミノ酸脱水素酵素の応用利用に向けた機能開発

研究課題名(英文)Characterization and application of a novel dye-linked D-amino acid dehydrogenase

研究代表者

里村 武範 (Satomura, Takenori)

福井大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50412317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに報告されているD-アミノ酸を基質とする色素依存性脱水素酵素とは一次構造が大きく異なる新規の色素依存性D-アミノ酸脱水素酵素を高度好熱菌*Rhodothermus marinus*から見出すことに成功した。本酵素の大腸菌によるタンパク質の発現系を構築し、組み換えタンパク質の精製にも成功した。本酵素の酵素化学的性質を解析したところ、これまで見出されている色素依存性D-アミノ酸脱水素酵素とは性質の大きく異なる新規酵素であることが判明した。また、本酵素は熱だけでなく幅広いpH領域に対しても高い安定性を示した。このことから、D-アミノ酸定量用素子として有用性が高いことも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The novel dye-linked D-amino acid dehydrogenase was found in thermophilic bacterium, *Rhodothermus marinus*. The primary structure of the enzyme was largely different from that of mesophilic dye-linked D-amino acid dehydrogenases so far reported. The dye-linked D-amino acid dehydrogenase was overexpressed in *Escherichia coli*, and its product was purified and characterized. When enzyme-catalyzed dehydrogenation of several D-amino acids was carried out using 2,6-dichloroindophenol as the electron acceptor, D-phenylalanine was the most preferable substrate among the D-amino acids tested. In addition, the enzyme was stable over a wide range of pH and did not also lose its activity by incubating 70 degrees C for 10 min. Thus, the highly thermostable dye-linked D-amino acid dehydrogenase exhibits a high potential usefulness for application to the D-amino acid bio-sensor.

研究分野：酵素化学

キーワード：D-アミノ酸 色素依存性脱水素酵素 好熱菌

1. 研究開始当初の背景

色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素は、人工の酸化還元色素存在下で様々な種類の D-アミノ酸の酸化反応を触媒する一群の酵素である。この人工色素を介した酸化反応を利用すれば、酵素反応と電極を結びつけることが可能となるため、D-アミノ酸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用素子として利用できる。しかしながら、従来から研究されてきた常温生物由来の酵素は総じて不安定であり、D-アミノ酸検出用素子としての応用例は無い。申請者らは、超好熱性アーキア *Pyrobaculum islandicum* に D-プロリン (D-Pro) を最も良好な基質とする色素依存性 D-プロリン脱水素酵素 (D-ProDH) を見出し、これが非常に高い安定性を持つことやセンサ用素子として有用性が高いことを明らかにした。D-アミノ酸を基質とする色素依存性脱水素酵素の中で、センサ用素子として利用可能な酵素は申請者が見出した本酵素以外報告例がなくバイオセンサ応用への律速となっている。

D-アミノ酸は、植物、下等動物、哺乳類などの様々な生物の生体内に存在し重要な生理機能を果たしていることが明らかとなっている。その中でも遊離の D-セリン (D-Ser) と D-アスパラギン酸 (D-Asp) は、高等動物生体内において高濃度で確認されている。D-Ser は N-メチル-D-Asp 受容体のコ・アゴニストとして神経伝達に関与しており D-Ser 濃度と統合失調症病態との関連性が注目されている。また、D-Asp は精巣内のテストステロン生産亢進に関与しており D-Asp 濃度と無精子症との関連性に注目が集まっている。このように D-アミノ酸は非常に有用な診断用マーカーとして期待されている。高度に安定な D-アミノ酸脱水素酵素 (DADH) を素子とする酵素機能電極が構築できれば、これまでセンサ用素子としての不安定性から実現できなかった安価で簡便に定量可能な D-アミノ酸定量用デバイスの開発が可能になる。以上のことから、安定性の高い DADH の発見が期待されている。

2. 研究の目的

本申請では、これまでに申請者が報告している超好熱菌由来 D-ProDH に加え、申請者らは新たに 3 つの DADH ホモログを高度好熱菌、超好熱菌から見出した (遺伝子 ID: TTX1315、TTX1450、Rmar0499)。本研究では、これら DADH ホモログの機能解析を行い、D-アミノ酸定量用バイオセンサへの応用面の開発につなげるため詳細な酵素の機能解析を行いセンサ用素子としての機能評価を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素ホモログの機能解析
大腸菌用タンパク質発現ベクター pET-11a に

3 種類の DADH ホモログをそれぞれ連結したプラスミドベクター pET11a- TTX1315、pET11a- TTX1450、pET11a- Rmar0499 を作成し大腸菌に導入した。これら形質転換体を用いて組み換えタンパク質の発現を行った。大腸菌によって発現した組み換えタンパク質を SDS-PAGE によって確認し組み換え酵素の精製を行った。電気泳動的に単一に精製した酵素を用いて酵素化学的性質の解析を行った。

(2) *R. marinus* 由来色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素の生理機能の解析

R. marinus 由来 DADH をコードしている遺伝子周辺には、L-ヒドロキシプロリンを代謝する酵素が存在しておりクラスターを形成していた。このことから、*R. marinus* 由来 DADH は L-ヒドロキシプロリンの異化代謝に関与していることが示唆された。そこで、*R. marinus* を L-ヒドロキシプロリン存在下で培養し DADH をコードする遺伝子の転写誘導が起こるかをリアルタイム PCR 法によって解析を行った。

4. 研究成果

(1) 色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素ホモログの機能解析

3 種類の DADH ホモログ遺伝子をコードするタンパク質を大腸菌細胞内で発現させた結果、TTX1315、TTX1450 遺伝子の発現産物は封入体を形成していた。一方、Rmar0499 遺伝子発現産物は可溶性画分にタンパク質発現が確認できた。そこで、Rmar0499 遺伝子発現産物の精製を行った後、さらに詳細な酵素化学的性質の解析を行ったところ、本酵素は 50、10 分間の処理では pH4 から 11 の広範囲の pH 領域で全く失活しなかった。さらに 70、10 分間の熱処理を行っても変性しなかった。大腸菌由来の DADH は 37、10 分間の処理で失活してしまうことが知られている。これらの結果から、本酵素は、これまで知られている DADH のなかで、すでに我々が見出している超好熱菌 *P. islandicum* 由来 DADH に次いで 2 例目の高い安定性を有する DADH であることが明らかとなった。この酵素の安定性の結果から、本酵素はバイオセンサ用素子として高い有用性を有していることが明らかとなった。次に、基質特異性の解析を行った結果、本酵素は様々な種類の D-アミノ酸に対して色素依存性脱水素酵素活性を示したが、D-フェニルアラニンに最も高い活性を示した。すでに我々が見出している *P. islandicum* 由来 DADH も、本酵素と同様に D-アミノ酸に対して広い基質特異性を有しているが、この酵素は D-プロリンに最も高い活性を示すことから *R. marinus* 由来 DADH とは基質特異性の面では性質が異なっていた。我々は、すでに *P. islandicum* 由来 DADH のバイオセンサへの応用には成功しているが、異なった基質特異性を有する本酵素を用いたバイオセン

サを構築することによって、*P. islandicum* 由来 DADH を素子としたバイオセンサでは測定できなかった D-アミノ酸を定量できる可能性を見出した。

(2) *R. marinus* 由来色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素の生理機能の解析

R. marinus 由来 DADH の生理機能の同定を行うために、DADH 遺伝子のオペロン構造の解析を行った。DADH 遺伝子周辺に存在する遺伝子をもとにプライマーを作成し逆転写 PCR によって DADH 遺伝子の転写単位の同定を行った。その結果、DADH 遺伝子は、自身の遺伝子を含む 6 つの遺伝子を一つの転写単位とする巨大なオペロンを形成していることが明らかとなった (DADH オペロン (図 1))。

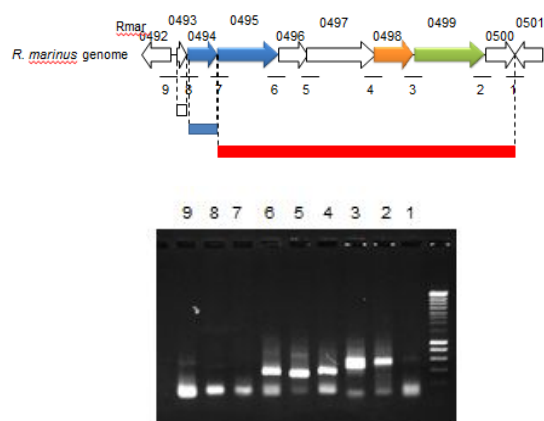


図 1. *R. marinus* 由来 DADH の転写単位の同定; (上図) *R. marinus* DADH の周辺遺伝子 (転写単位は遺伝子の下にある線で示す) と (下図) 逆転写 PCR によって増幅した遺伝子領域

次に、同定できた DADH オペロンの転写誘導条件の検討を行った。合成培地中に L-フェニルアラニン (L-Phe)、L-アラニン (L-Ala)、L-プロリン (L-Pro)、L-ヒドロキシプロリン (L-Hyp) をそれぞれ添加した培養液で培養した *R. marinus* の mRNA を抽出し DADH 遺伝子内部配列をもとに作成したプライマーを用いてリアルタイム PCR (RT-PCR) を行った。その結果、L-Hyp を添加した培地で培養した菌株で DADH オペロンの転写量の大幅な増大が認められた (図 2)。

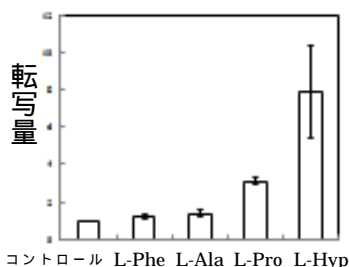


図 2. RT-PCR による DADH オペロンの転写量の解析

これらの結果より、DADH は L-ヒドロキシプロリンの異化代謝に関与していることが明らかとなった。これまで大腸菌由来 DADH は、L-アラニンの異化代謝に関与していることが分かっているが、*R. marinus* 由来 DADH は、L-アラニンを添加した合成培地では誘導されないことから、従来の DADH とは異なる新規な生理機能を有していることが判明した。

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)

T. Satomura, H. Sakuraba, S. Suye, T. Ohshima

Dye-linked D-amino acid dehydrogenases: biochemical characteristics and applications in biotechnology.

Appl. Microbiol. Biotechnol. **99**, 9337-9947, (2015), 査読あり

T. Satomura, M. Ishikura, T. Koyanagi, H. Sakuraba, T. Ohshima, S. Suye

Dye-linked D-amino acid dehydrogenase from the thermophilic bacterium

Rhodothermus marinus JCM9785:

characteristics and role in

trans-4-hydroxy-L-proline catabolism.

Appl. Microbiol. Biotechnol. **99**, 4265-4675, (2015), 査読あり

〔学会発表〕(計 6 件)

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

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 回日本生物工学会大会、2013 年 9 月 18 日、広島国際会議場、広島

石倉優、廣田湧也、里村武範、櫻庭春彦、大島敏久、末信一郎

好熱菌由来色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素の発見と基質特異性の解析

2013 北陸合同バイオシンポジウム、2013 年 11 月 8 日、国民宿舎 能登小牧台、石川

石倉優、里村武範、櫻庭春彦、大島敏久、末信一郎

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

2013 日本農芸化学学会大会、2013 年 3 月 25 日、東北大学川内北キャンパス、宮城

小柳峰史、里村武範、櫻庭春彦、大島敏久、末信一郎

好熱性細菌 *Rhodothermus marinus* 由来プロリンラセマーゼホモログの機能解析

2013 日本農芸化学学会大会、2013 年 3 月 25 日、東北大学川内北キャンパス、宮城

里村武範、石倉優、小柳峰史、櫻庭春彦、

大島敏久、末信一郎
好熱菌由来色素依存性D-アミノ酸脱水素
酵素はL-ヒドロキシプロリン代謝に關与
する

第 66 回日本生物工学会大会、2014 年 9
月 10 日、札幌コンベンションセンター、
北海道

廣田湧也、石倉優、里村武範、櫻庭春彦、
大島敏久、末信一郎

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

2014 日本農芸化学大会、2014 年 3 月 29
日、明治大学生田キャンパス、神奈川

〔図書〕(計 1 件)

里村武範, 大島敏久, 技術情報協会、「バ
イオセンサの先端科学技術と新製品への
応用開発」第 3 章 2 節 安定性の高い超
好熱菌由来色素依存性脱水素酵素を用い
たバイオセンサの開発、2014

6. 研究組織

(1) 研究代表者

里村武範 (SATOMURA TAKENORI)
福井大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：50412317

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究協力者

櫻庭春彦 (SAKURABA HARUHIKO)
香川大学・農学部・教授
研究者番号：90205823

大島敏久 (OHSHIMA TOSHIHISA)
大阪工業大学・工学部・教授
研究者番号：10093345

末信一郎 (SUYE SHIN-ICHIRO)
福井大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：90206376