

D-アミノ酸アッセイ系構築を目指したセンサー用素子の機能開発

研究代表者： 里村 武範（工学研究科・講師）

共同研究者： 末 信一郎（工学研究科・教授）

概 要	本申請では、生体内に存在する D-アミノ酸を簡便、高感度に定量できるバイオセンサー用素子の開発を目的として研究を行った。D-アミノ酸は近年、ヒトにおいて様々な病気の診断用マーカーとして期待されている。そこで、安価で高感度に物質の濃度を測定可能な酵素を素子としたバイオセンサーに注目が集まっている。しかしながら現在までに見出されている D-アミノ酸定量用のバイオセンサー用素子は安定性が非常に低いため、センサーへの実用化はおろか素子の詳細な機能解析も進んでいない。そこで、バイオセンサー用素子の現在における課題となっている短寿命という要素を克服するため、安定性が高い超好熱菌由来酵素からセンサー用素子を探索し機能解析を行い、新規バイオセンサー用素子として利用可能であるかの評価を行った。本申請では特にバイオセンサー用素子とし有用性が高いことが既実証されている色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素の機能解析によるバイオセンサーへの評価と新規バイオセンサー用素子として近年注目されているアミノ酸ラセマーゼの機能評価について研究を行った。
関連キーワード	D-アミノ酸、色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素、D-アミノ酸ラセマーゼ、超好熱菌

研究の背景および目的

近年、遊離型 D-アミノ酸はヒトの生体内の様々な組織に局在し多くの生理機能を果たしていることが明らかとなっており、その例を挙げれば枚挙にいとまはないが代表的なものは下記のとおりである。

①D-アスパラギン酸は脳ホルモンの分泌制御に働いている。②精巢内のテストステロンの合成促進にも働いている。③D-セリンは記憶や学習など脳の高次機能制御に関与する N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体のコアゴニストとして機能している。以上のように様々な D-アミノ酸が生体内の生理機能に関与しており、新たな D-アミノ酸の生理機能も続々と発見されている。

それに伴い、D-アミノ酸と人の疾病の関連性にも大きな関心が寄せられており、①無精子症患者において精液、精漿中の D-アスパラギン酸濃度が有意に低下する、②統合失調症やアルツハイマー患者では血中や脊髄液中の D-セリン濃度が低下することが報告されている。その他にもさまざまな種類の D-アミノ酸がヒトやマウスなど哺乳動物で見出されはじめ、様々な病気と D-アミノ酸の関連について注目され始めている。そこで、手軽に迅速かつ低コストに D-アミノ酸を測定できる方法が求められている。

現在、D-アミノ酸の定量分析には主に高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた定量法が行われている。この方法は微量のアミノ酸の同時

分析が可能であるが高コストで分析時間を要し、分析条件の設定などに熟練の技術を要するなど迅速な D-アミノ酸分析が困難である。一方、HPLC を用いる定量法以外では D-アミノ酸を基質とする酵素を素子としたバイオセンサーによる定量方法が存在する。このバイオセンサーを用いた定量方法は、HPLC を用いた方法に比べて、簡便、迅速に測定できることから HPLC に代わる D-アミノ酸定量方法として期待されている。しかし、現在、バイオセンサーによる定量法で用いられている酵素素子は安定性に欠けること、基質特異性が低いこと、利用できる pH 域、温度が限られるなどセンサー用素子として充分機能を果たせない点と、汎用性に適したデバイスの開発が進んでいないため、バイオセンサーを利用した方法は有効な D-アミノ酸の検出、定量方法とはなっていない。そこで、本申請では、これらの課題を克服できうる唯一の酵素素子である超好熱菌由来酵素に着目し研究を進めた。特に、基質を電気化学的信号に容易に変換することによって物質の濃度を簡便に測定できる酸化還元酵素の一種である色素依存性脱水素酵素と、近年、基質の光学異性体を高度に認識できる識別用素子として注目されているラセマーゼに焦点を当て、色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素と D-アミノ酸ラセマーゼの機能解析を進めることを目的として研究を進めた。

研究の内容および成果

D-アミノ酸測定バイオセンサー用素子として既に有用性が証明されている超好熱菌 *Pyrobaculum islandicum* 由来色素依存性 D-プロリン脱水素酵素を用いて D-アミノ酸測定用素子としてさらなる高機能化へつなげるため、本酵素の立体構造解析を進めた。本酵素は大腸菌によるタンパク質の大量発現系は構築できているので、本酵素の結晶化条件の検討を進めた。288種の結晶化条件を検討したが、本酵素の結晶は得ることができなかった。本酵素は膜結合性酵素であるためタンパク質の結晶化に必要な高濃度タンパク質条件下では凝集してしまうことから良質な結晶が得られなかったと考えられた。そこで、様々な界面活性剤を添加し結晶化条件の検討を進めた。しかしながら現在のところ良質な結晶を得ることはできていない。現在、本酵素の膜結合部位であるN末端アミノ酸部位を除去した酵素を作成し結晶化条件の検討を進めている。さらに、本酵素と相同性の高いタンパク質を近年ゲノム解析が終了した超好熱菌から2種類見出すことに成功した。現在、本酵素だけではなく新たに見出した本酵素ホモログの大腸菌によるタンパク質発現系を構築し結晶化条件の検討を進めている。

一方、D-アミノ酸測定バイオセンサー用素子として利用を検討しているラセマーゼについては、超好熱菌ゲノム情報より検索した結果、超好熱菌 *Pyrobaculum calidifontis*, *Aeropyrum pernix* の2種類の菌からラセマーゼホモログ (Pcal_1660, Ape_1498.1) を抽出することに成功した。これらのラセマーゼ候補遺伝子を用いて大腸菌によるタンパク質大量発現系の構築を行った。その結果、これらホモログタンパク質の大腸菌によるタンパク質発現系の構築に成功した。しかしながら、これら大腸菌による発現タンパク質は封入体を形成しており、酵素活性を有した状態で得ることはできなかった。そこで、これら封入体タンパク質のリフォールディングを行った。その結果、*P. calidifontis*由来 Pcal_1660のリフォールディングに成功した。*A. pernix*由来 Ape_1498.1についてはリフォールディングには成功していないが現在、リフォールディング条件の最適化を検討している。リフォールディングに成功した Pcal_1660 発現タンパク質について、様々なアミノ酸を用いて本タ

ンパク質の機能の同定を進めたところ、セリンラセマーゼ活性を有していることが明らかとなった (図1)。D-セリンはヒトにおいて記憶や学習などの脳の高次機能制御に関与する N-メチル-D-アスパラギン酸受容体のコアゴニストとして機能していることが報告されている。また、統合失調症やアルツハイマー患者では血中や脊椎液中の D-セリン濃度が低下することも指摘されている。このように D-セリンの濃度を簡便、安価に測定することは、これら病気の予防、検出に有用であると考えられる。そこで、本申請で明らかにできた *P. calidifontis*由来 Pcal_1660のバイオセンサー用素子としての評価を行うために本タンパク質の詳細な機能解析を行った。その結果、本酵素は70°Cでも活性を失わず、非常に高い安定性を有していることが明らかとなった。また、本酵素はラセマーゼ活性だけでなく、L-セリンデヒドラターゼ活性を有していることが明らかとなった。これらの結果から、本申請で明らかにできたセリンラセマーゼはバイオセンサー用素子として有用であることが明らかとなった。今後、本酵素の更なる機能解析を進め、光導波路と組み合わせた新規センサー用素子として利用する研究を進めていく予定である。

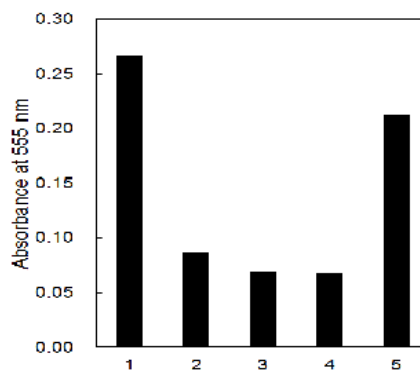


図1. *P. calidifontis*由来セリンラセマーゼ (Pcal_1660) 活性

- 1: 酵素添加 (Pcal_1660), 2: 酵素非添加,
3: 基質 (セリン) 非添加, 4: 酵素, 基質非添加
5: ポジティブコントロール

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

平成24年度日本生物工学会発表予定

平成24年度日本農芸化学会発表予定

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

平成23年度 A-Step フィージビリティスタディステージ 探索タイプ・1年間・バイオマーカーの迅速検出を実現するアッセイシステムの開発・代表・否・1,500,000円

平成23年度野口遵研究助成金・1年間・酵素機能電極用素子の網羅的探索と応用開発・代表・否・2,200,000円

平成24年度 A-Step フィージビリティスタディステージ 探索タイプ・1年間・D-アミノ酸の迅速検出を可能とするアッセイシステムの開発・代表・申請予定・1,500,000円