

色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素の機能と構造解析及び応用開発

研究代表者： 里村 武範（工学研究科・准教授）

共同研究者： 末 信一郎（工学研究科・教授）

概 要	
	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センサー用素子の探索と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。その結果、好熱性細菌 <i>Rhodothermus marinas</i> のゲノム配列より色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素をコードする遺伝子を見出すことに成功し、機能解析にも成功した。
関連キーワード	D-アミノ酸、色素依存性脱水素酵素、超好熱菌、バイオセンサー

研究の背景および目的

色素依存性脱水素酵素は、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、これを人工の酸化還元色素に渡す。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、酵素反応と電極を直接結びつけることが可能となるため、物質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ー用素子や生体物質を起電力とするバイオ電池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、機能性素子としての応用例はほとんど無い。我々の研究グループでは、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-アミノ酸脱水素酵素 (DProDH) を見出し、これが非常に高い安定性を持つことやセンサー用素子として高い有用性を持つことを明らかにしている。D-アミノ酸を基質とする色素依存性脱水素酵素の中で、センサー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い。

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。そのなかでも遊離の D-Ser と 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-アスパラギン酸受容体のコ-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。高度に安定な色素依存性 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、これまでセンサー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。本研究では、現在までに見出している耐熱性 DProDH とは異なる新規な耐熱性 D-アミノ酸脱水素酵素を検索と機能解析を行うことにより新規な D-アミノ酸定量用素子の開発につなげることを目的とした。

研究の内容および成果

申請者は、以前から多くの超好熱菌、高度好熱

菌を培養し安定性の高い色素依存性 D-アミノ酸

脱水素酵素活性を探索してきた。しかしながら、現在までに上述の*P. islandicum*由来DProDH以外に高安定性DADHの発見には至っていない。そこで、培養菌体から酵素活性を探索するだけでなく好熱菌ゲノム情報からD-アミノ酸代謝オペロン構造の類似性やDADHと一次構造の相同性を探索したところ、高度好熱菌*Rhodothermus marinus*ゲノムよりDADHホモログ遺伝子を見出すことに成功した。本遺伝子は既存のDADHとは一次構造上15%程度しか相同性を示さないが、*R. marinus*ゲノム上でプロリンラセマーゼとクラスターを形成している。プロリンラセマーゼはプロリンの異性化を触媒する酵素でありD-アミノ酸の代謝に関連する酵素である。このことから、プロリンラセマーゼ遺伝子とクラスターを形成する本遺伝子はD-アミノ酸を代謝する新規色素依存性D-アミノ酸脱水素酵素である可能性が高いことが明らかになった。そこで、*R. marinus*由来DADHホモログ遺伝子について大腸菌によるタンパク質発現系を構築し、発現した組換えタンパク質の機能同定を行った。その結果、D-Pheを最も良好な基質とする既知のDADHには無い基質特異性を有する新規酵素であることが判明した。しかも、本酵素は申請者が既に見出した*P. islandicum*由来DProDHとは14%しか相同性を示さず同じバクテリアである*E. coli*由来DADHとも16%と低い相同性しか認められない。本酵素は、今までに報告されているDADHとは異なる新規酵素である可能性が示唆された。そこで、本酵素の精製を行い詳細な機能解析を進めた。本酵素は、非イオン性界面活性剤であるTritonX-100存在下で、Q-セファロース教員イオン交換クロマトグラフィー、

ゲル濾過クロマトグラフィーの2段階の精製法によって精製することに成功した。精製酵素について酵素化学的な性質を解析したところ、本酵素はD-Pheを最も良好な基質としたが、それ以外にもD-Pro、D-Leu、D-Valなどにも反応性を示し、基質特異性が広いことが明らかとなった。さらに、D-アミノ酸定量用バイオセンサーへの応用利用に向けた課題である酵素の安定性について検討したところ、70℃、10分間の熱処理においても失活せず、非常に高い安定性を有していることが判明した。このことから*R. marinus*由来色素依存性D-Phe脱水素酵素はバイオセンサー用素子として優れた性質を有する酵素であることが明らかとなった。現在までに、D-アミノ酸定量用素子として利用可能な酵素は、我々の研究グループで見出した*P. islandicum*由来DProDH以外見出されておらず、本酵素は2例目となる。現在、*P. islandicum*、*R. marinus*由来のDADHを素子としたD-アミノ酸定量用バイオセンサーを構築している。しかしながら、これら酵素は広い基質特異性を有するため特定のD-アミノ酸を定量できないという課題が残されている。本課題を解決するため、これら酵素をコードする遺伝子にランダムに変異を与えることによって高基質特異性DADH変異株の作成を進めている。さらに、現在、マレーシアマラヤ大学との共同研究によるバイオインフォマティクス解析により、本酵素の基質結合アミノ酸残基の特定を進めており、基質との結合に関与するアミノ酸が同定でき次第、ピンポイントに変異を与えることによって高基質特異性DADH変異株の探索を進めていく予定である。

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」

「好熱菌由来色素依存性 D-アミノ酸脱水素酵素の機能解析とその応用」 里村武範
生研センタープロジェクト「D-アミノ酸に着目した食品機能開発」公開シンポジウム 招待講演
九州大学箱崎キャンパス 平成25年3月1日
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
石倉優、里村武範、櫻庭春彦、大島敏久、末信一朗
平成24年度日本生物工学会大会 神戸国際会議場

「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」

石倉優、里村武範、櫻庭春彦、大島敏久、末信一朗

日本農芸化学会2013年度大会 東北大学
平成25年度3月25日

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

日本学術振興会・科学研究費補助事業・若手研究
(B)・3年間・代表・申請中