

新規 FMN 依存性グルタミン酸脱水素酵素の反応機構の解析とエレクトロケミカルデバイスへの応用

※1

研究代表者： 里村 武範（工学系部門・准教授）

共同研究者： 末 信一郎（福井大学・理事）、早出 広司（ノースカロライナ大学・教授）、

概 要	FMN 依存性 L-グルタミン酸脱水素酵素はフェリシアン化カリウムのような人工の電子受容体存在下で L-グルタミン酸の酸化反応を触媒する酵素である。本酵素は人工電子受容体を介して基質の電子を電極へ伝達することが可能であることから L-グルタミン測定用バイオセンサ用素子として応用可能である。しかしながら、これまで FMN 依存性 L-グルタミン酸脱水素酵素活性を示す酵素の存在は報告されていない。そこで、好熱菌を対象に FMN 依存性 L-グルタミン酸脱水素酵素のスクリーニングを行った結果、好熱菌 <i>Geobacillus kaustophilus</i> 菌体内より本酵素活性を見出すことに成功した。本研究では、 <i>G. kaustophilus</i> より見出した FMN 依存性 L-グルタミン酸脱水素酵素の大腸菌によるタンパク質発現系の構築を行い、詳細な酵素化学的性質の解析、バイオセンサ応用への評価を行った。
関連キーワード	L-グルタミン酸、バイオセンサ、酸化還元酵素

研究の背景および目的

L-グルタミン酸は食品中のうまみ成分として機能しており食品の品質管理の指標として重要な成分である。また、我々の生体内においては興奮性の神経伝達物質として働き、記憶・学習などの脳高次機能に重要な役割を果たしていることが知られている。さらに、L-グルタミン酸は過剰に摂取すると急性神経毒性を示すことが報告されており、その体内における生理活性は、グルタミン酸摂取量と密接な関係があることが明らかとなっている。これらのことから、L-グルタミン酸は、これらに起因する神経系疾患のバイオマーカーとして期待されている。ゆえに食品、医療などの分野において、L-グルタミン酸を数値化するバイオセンサへの応用が期待されている。

これまでにグルタミン酸を定量可能なバイオセンサ用素子としてはグルタミン酸オキシダーゼ、NAD(P)依存性グルタミン酸脱水素酵素が報告されており、グルタミン酸定量用試薬として市販されている。しかしながら、これらの酵素を用いたグルタミン酸の測定は、高価な NAD⁺を必要としたり、NAD⁺と酵素の共役反応系を用いることによる測定誤差の問題や、測定誤差を生じやすい酸素を必要とするといった課題があった。

これらの課題から、より高い感度で簡便に測定可能な L-グルタミン酸の測定法の開発が望まれている。これらの課題を解決する手段として色素依存性脱水素酵素を素子としたバイオセンサが挙げられる。色素依存性脱水素酵素とは、FAD や FMN

を補酵素として有しており、オキシダーゼや NAD(P)依存性脱水素酵素とは異なり、フェナジンメトサルフェートのような人工の酸化還元色素を電子受容体とし基質の酸化反応を行う酵素である。本酵素は人工酸化色素をメディエーターとすることで基質の電子を電極へ伝達することが可能であることから、高感度、簡便に基質の濃度を測定可能なバイオセンサ用素子として注目されている。しかしながら、これまでに、L-グルタミン酸を基質とできる色素依存性脱水素酵素の報告例は無くバイオセンサへの応用例は無い。

そこで、我々は様々な生物種から色素依存性 L-グルタミン酸脱水素酵素 (Dye-GDH) の探索を行った。その結果、好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* から調製した粗酵素液から Dye-GDH 活性を検出することに成功した。上述のように、これまでに Dye-GDH はどの生物種からも報告例がなく、新規な酵素であると考えられる。そこで、本研究では *G. kaustophilus* 由来 Dye-GDH の詳細な性質の解析を行い、バイオセンサ用素子としての評価を行うことを目的とした。

研究の内容および成果

G. kaustophilus 由来 Dye-GDH の詳細な酵素化学的性質を明らかにするために、本酵素をコードする遺伝子の大腸菌による発現系の構築を行った。pET15b に Dye-GDH をコードする遺伝子が挿入された大腸菌発現用ベクター pET15b-Dye-GDH を *E. coli* BL21 CodonPlus (DE3) RIPL に導入し 1 L の LB 培地で培養後、組換えタンパク質発現を行った。その後、超音波破碎により細胞を破碎し、粗酵素液を調製した。粗酵素液に対し、陰イオン交換クロマトグラフィーを行ったところ、精製酵素を得ることに成功した。この精製酵素を用いて詳細な酵素化学的性質を解析した。

大腸菌によって発現した組換え Dye-GDH を Native-gradient PAGE のに供し、分子量を測定し、SDS-PAGE によってサブユニットの分子量を測定した結果、本酵素は単量体構造を取っていることが明らかとなった。本酵素の補酵素を HPLC で解析した結果、補酵素として FMN を有していることが判明した。また、本酵素の安定性について検討した結果、40 °C、10 分の処理においては失活せず、60 °C においては約 24% の残存活性を示した。

さらに、基質特異性について検討した結果、L-グルタミン酸に高い特異性を示した (図 1)。また、電子受容体特異性を調べたところ、ジクロロインドフェノール、フェナジンメトサルフェート、フェリシアニドを利用することができ、NADP⁺、NAD⁺、酸素には、まったく反応性を示さなかった (図 2)。このことから、本酵素は、これまで見出されているグルタミン酸オキシダーゼ、NAD(P) 依存性グルタミン酸脱水素酵素とは異なる新規な反応を触媒する酵素であることが確認できた。以上の結果より、本酵素は、これまで報告されているグルタミン酸オキシダーゼ、NAD(P) 依存性 L-グルタミン酸脱水素酵素に代わる L-グルタミン酸定量用バイオセンサ用素子として有用性が高いことが明らかとなった。現在、本酵素を素子としたバイオセンサの構築を進めている。

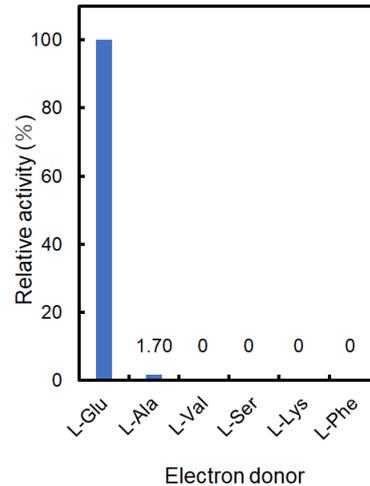


図 1. 基質特異性

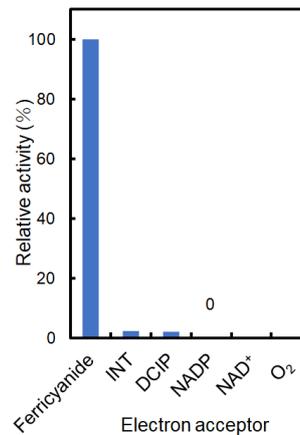


図 2. Dye-GDH 活性における電子受容体特異性

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」

令和 2 年度日本農芸化学会に発表予定である。

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

本申請を元に令和 2 年度科学研究費 (基盤研究 C) に申請した。