

## *Geobacillus kaustophilus* 由来推定 D-アミノ酸脱水素酵素遺伝子

### 組換えタンパク質の基質特異性の検討

牟田口祐太<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科

近年、D-アミノ酸は様々な疾患の診断マーカーとして利用できる可能性が報告されており、安価で簡便な新規 D-アミノ酸分析法が求められている。私たちは D-アミノ酸脱水素酵素を利用した新規 D-アミノ酸酵素分析法を開発することを目的とし、中等度好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* JCM 12893 由来の推定 D-アミノ酸脱水素酵素遺伝子 (Locus tag: GK1399) の発現タンパク質の酵素学的機能解析を行っている。本研究では、まず、大腸菌において発現させた GK1399 組換えタンパク質を、Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィーと熱処理によって高度に精製することに成功した。次に、この精製酵素を用いて、本酵素の D-アミノ酸脱水素酵素活性における基質特異性を検討した結果、D-プロリン、グリシン、D-2-アミノ酪酸、D-ロイシン、D-メチオニン、D-ノルロイシン、D-ノルバリン、D-トリプトファンに対して活性を示すことが明らかとなった。

**キーワード：**D-アミノ酸、脱水素酵素、好熱菌

D-アミノ酸脱水素酵素 (D-amino acid dehydrogenase: DADH; EC 1.4.99.1) は、酸化脱アミノ反応によって D-アミノ酸をケト酸とアンモニアに分解する反応を触媒する (He et al., 2011; Olsiewski et al. 1980; Wild et al., 1974; Tsukada 1966; Jones and Venables 1983)。これまでに報告されている DADH はいずれも人工の電子伝達体に電子を供与することから、DADH をセンサー素子とした分光光学的又は電気化学的 D-アミノ酸酵素分析法が検討されている。

生物が主に利用する L-アミノ酸の鏡像異性体である D-アミノ酸は、長年の間、生物において生理機能を持たないと考えられてきた。しかし、分析技術の向上により、様々な植物や動物（無脊椎動物からヒトを含む哺乳類等の高等動物）に遊離状態で存在すること、また、生命維持のための重要な機能を持つことが明らかとなっている。特にヒトにおいては、D-アミノ酸と様々な疾患との関連性について研究が進んでおり (Nishikawa, 2011; 上里, 2013; Katane &

Homma, 2011; D'Aniello et al., 2005)、D-アミノ酸は非常に有用な診断マーカーとして期待されている。

上述した DADH を利用した D-アミノ酸酵素分析法は、安価で簡便な新規 D-アミノ酸分析法に成り得るとして期待されているが、現在報告されている DADH の多くは安定性が低く、酵素分析法への応用に至っていない。また、安定性の高い DADH として、高度好熱菌や超好熱性アーキア由来のものが報告されているが (Satomura et al., 2002; Satomura et al., 2014)、常温での活性が非常に低いことが課題となっている。

私たちはこれまで、*Geobacillus kaustophilus* JCM 12893 のゲノム中にコードされている推定 DADH 遺伝子 (Locus tag: GK1399) の機能解析を目的とし、組換えタンパク質の発現系の構築に取り組んできた (菅澤, 2015)。*G. kaustophilus* JCM 12893 は生育温度範囲が 42~74°C、最適生育温度が 60°C の中等度好熱菌であり、高い安定性と酵素活性を有した DADH を見

出すことが期待できる。本研究では、*G. kaustophilus* 由来推定 DADH を遺伝子組換え大腸菌で発現させた後、高度に精製した組換えタンパク質の酵素活性について、基質特異性を検討したので、これを報告する。

## 材料と方法

### 使用菌株とベクター

GK1399 の組換えタンパク質の発現には大腸菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) (La Jolla, CA) を用いた。また、菅澤らが構築した pET21a\_GK1399 (菅澤, 2015) を発現用ベクターとして使用した。pET21a\_GK1399 は、発現される組換えタンパク質の C 末端に His-tag が付加されるようにデザインされている。

### 大腸菌での組換えタンパク質の発現と抽出

*E. coli* BL21 (DE3) を pET21a\_GK1399 を用いて形質転換した後、形質転換株を 1 L の LB 培地 (100 µg/ml アンピシリン含有) にて、37°C で振盪培養した。培養液の OD<sub>600</sub> 値が 0.5 に達した時点で、終濃度 1 mM の isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside を添加し、37°C で 3 時間の振盪培養を行った。その後、菌体を遠心分離 (6,500 × g, 10 分間, 4°C) にて集菌した。

得られた菌体 (湿重量 2.0 g) を 20 mL の Ni アフィニティーカラム用緩衝液 A (50 mM リン酸 Na 緩衝液 (pH 7.9), 0.5 M NaCl, 5 mM イミダゾール, 1 mM 2-メルカプトエタノール) に懸濁し、超音波破碎機を用いて溶菌した。菌体破碎液を遠心分離 (10,000 × g, 30 分間, 4°C) し、その上清を粗酵素液とした。

### 組換えタンパク質の精製

粗酵素液中の目的組換えタンパク質を、まず、Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィーによって精製した。粗酵素液を Ni-NTA agarose カラム (直径, 1.5 cm; 長さ, 5.75 cm) にアプライし、Ni アフィニティーカラム用緩衝液 B (50 mM リン酸 Na 緩衝液 (pH 7.9), 0.5 M NaCl, 60 mM イミダゾール, 1 mM 2-メルカプトエタノール) にてカラムを洗浄した。続いて、カラム内のイミダゾール濃度を 60 mM から 600 mM

に上昇させることで、His-tag が付加されている目的の組換えタンパク質を溶出した (グラジエント溶出)。SDS-PAGE にて目的タンパク質が含まれる画分を確認し、該当画分を一つにまとめ、透析用緩衝液 (10 mM リン酸 Na 緩衝液 (pH 7.2), 0.1 mM 2-メルカプトエタノール) を用いて透析を行った。

次に、熱処理によって目的組換えタンパク質の精製を行った。上記の透析後の酵素液を 60°C で 30 分間インキュベートし、冷却後、遠心分離 (10,000 × g, 10 分間, 4°C) した。遠心分離後の上清を回収し、精製酵素液として以後の実験に使用した。

### SDS-PAGE 及びタンパク質定量

SDS-PAGE (10% アクリルアミドスラブゲル, 厚さ 1 mm) は Laemmli の示した手法を用いて行った (Laemmli 1970)。電気泳動後のタンパク質の染色には Coomassie brilliant blue R-250 を用いた。タンパク質濃度の測定は Bradford 法にて行い、ウシ血清アルブミン換算でタンパク質濃度を算出した (Bradford 1976)。

### 酵素活性の検出

精製酵素の DADH 活性は、ディスクゲルを用いた Native-PAGE (菅澤, 2015) とディスクゲルの活性染色によって検出した。Native-PAGE 後のディスクゲルを表 1 に示す DADH 活性検出用の反応液に浸し、50°C で 30 分間の反応の後、DADH の活性を示す活性バンドの有無を確認した。

表 1 活性染色反応液組成 (5.00 mL / 1 本)

1 M リン酸 Na 緩衝液 (pH 8.0)	1.50 mL
100 mM 基質	0.50 mL
50 mM FAD	0.10 mL
0.4 mM mPMS	0.50 mL
1 mM INT	0.50 mL
H <sub>2</sub> O	1.90 mL

注 mPMS: 1-Methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate  
INT: Iodophenyl nitrophenyl phenyl tetrazolium chloride

## 結果

### 組換えタンパク質の精製

大腸菌を用いて GK1399 の組換えタンパク質を発

現させた後、抽出した粗酵素液をNiアフィニティークラムクロマトグラフィーと熱処理に供することによって、高度に精製された目的組換えタンパク質を得ることに成功した(図1A)。SDS-PAGEで確認されたタンパク質の分子量は約40 kDaであり、GK1399発現タンパク質の推定分子量39.97 kDaと一致した。また、精製酵素においてD-プロリン(D-Pro)を基質としたDADH活性を検出した(図1B)。結果として、遺伝子組換え大腸菌2.0 gから精製酵素8.5 mgを得ることができた。

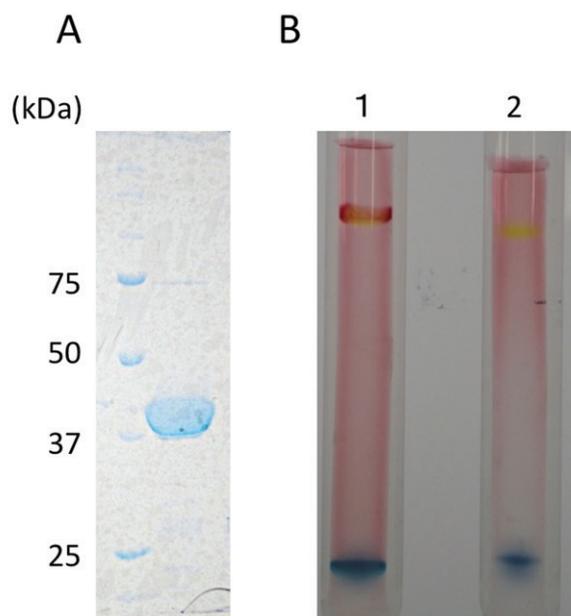


図1 A: 精製酵素のSDS-PAGE及びB: 酵素活性の検出  
A: アプライ精製酵素: 20  $\mu$ g. B: 1, D-Proを基質とした反応液で染色した場合; 2, 基質を含まない反応液で染色した場合

### 基質特異性

GK1399組換えタンパク質の脱水素酵素活性における基質特異性を、精製酵素(217  $\mu$ g)と21種のL-アミノ酸及び21種のD-アミノ酸、グリシン(Gly)を用いて調べた。その結果、D-Pro, Gly, D-2-アミノ酪酸(D-Abu), D-ロイシン(D-Leu), D-メチオニン(D-Met), D-ノルロイシン(D-Nle), D-ノルバリン(D-Nva), D-トリプトファン(D-Trp)の8つのアミノ酸を基質とした場合に活性バンドが確認された(図2)。

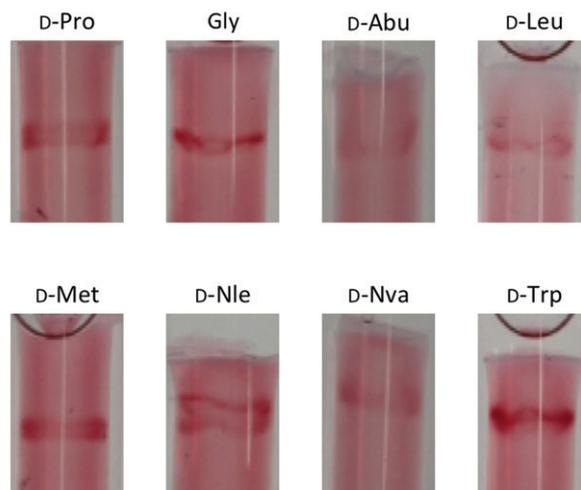


図2 GK1399組換えタンパク質の脱水素酵素活性における基質特異性

### 考察

菅澤らの報告(菅澤, 2015)では、GK1399の発現を誘導した組換え大腸菌の粗酵素抽出液を用いて、DADH活性を検出しており、本酵素はD-Proのみに活性を示し、D-Met, D-Nle, D-Trpには活性を示さないという結果が得られている。一方、本研究ではGK1399の発現タンパク質がD-Proを含めた7種類のD-アミノ酸と光学活性を持たないグリシンに対してDADH活性を持つことが示唆された。これは、本研究の場合、精製操作により濃縮された酵素試料を用いたことで、より高感度に活性を検出できたためと考えられる。今後、分光光学的手法を用いて本酵素活性を測定し、基質特異性に加えて、安定性や反応速度等の酵素学的機能を解析する予定である。

さらに、精製酵素を用いた活性染色では、活性バンドと同位置に黄色のバンドが観察された(図1B)。これは本酵素がFADといった補欠分子族を補因子とする可能性を示している。FADなどの補欠分子族に分類される補因子は、補酵素とは異なり酵素と強固に結合する。よって、大腸菌内でホロ酵素となった本酵素が、補欠分子族と結合したまま精製された結果、活性染色において活性バンドと同位置に黄色のバンドが観察されたものと考えられる。

一方、本研究で用いた活性染色によるDADH活性の検出方法では、D-アミノ酸酸化酵素(EC 1.4.3.3)

の活性も同様に検出される。しかしながら、菅澤らの報告（菅澤, 2015）では、本酵素は FAD を含まない反応液でも活性を示すことから、本酵素が mPMS を電子受容体とする可能性を指摘し、そのことから、本酵素は D-アミノ酸酸化酵素ではなく DADH であると考察している。しかし、上述したように、FAD と強く結合している本酵素は、FAD を含まない反応液でも活性を示すと考えられるため、今後、本酵素が D-アミノ酸酸化酵素である可能性も再度検討していく予定である。

## 文献

- Bradford, MM. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(2), 248-254.
- D’Aniello, G., Ronsini, S., Guida, F., Spinelli, P., D’Aniello, A. (2005). Occurrence of D-aspartic acid in human seminal plasma and spermatozoa: possible role in reproduction. *Fertility and sterility*, 84(5), 1444-1449.
- He, W., Li, C., Lu, CD. (2011). Regulation and characterization of the dadRAX locus for D-amino acid catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 193(9), 2107-2115.
- Jones, H. & Venables, WA. (1983). Effects of solubilisation on some properties of the membrane-bound respiratory enzyme D-amino acid dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Federation of European Biochemical Societies letters*, 151(2), 189-192.
- Katane, M. & Homma, H. (2011). D-Aspartate-An important bioactive substance in mammals: A review from an analytical and biological point of view. *Journal of Chromatography B*, 879 (29), 3108-3121.
- Laemmli, UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259). 680-685.
- Nishikawa, T. (2011). Analysis of free d-serine in mammals and its biological relevance. *Journal of Chromatography B*, 879 (29), 3169-3183.
- Olsiewski, JP., Kaczorowski, GJ., Walsh, C. (1980). Purification and properties of D-amino acid dehydrogenase, an inducible membrane-bound iron-sulfur flavoenzyme from *Escherichia coli* B. *The Journal of biological chemistry*, 255(10), 4487-4494.
- Satomura, T., Ishikura M., Koyanagi, T., Sakuraba, H., Ohshima T., Suye S. (2014). Dye-linked D-amino acid dehydrogenase from the thermophilic bacterium *Rhodothermus marinus* JCM9785: characteristics and role in trans-4-hydroxy-L-proline catabolism. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(10), 4265-4275.
- Satomura, T., Kawakami, R., Sakuraba, H., Ohshima, T. (2002). Dye-linked D-proline dehydrogenase from hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum islandicum* is a novel FAD-dependent amino acid dehydrogenase. *The Journal of biological chemistry*, 277(15), 12861-12867.
- 菅澤達希, 牟田口祐太 (2015). *Geobacillus kaustophilus* 「D-アミノ酸脱水素酵素遺伝子の機能解析」『秋田県立大学ウェブジャーナル B』 2, 62-66.
- Tsukada, K. (1966). D-Amino acid dehydrogenases of *Pseudomonas fluorescens*. *The Journal of biological chemistry*, 241(19), 4522-4528.
- 上里彰仁. (2013). 「グルタミン酸/D-セリン系と精神疾患」『D-アミノ酸研究会誌』1(1), 1-6.
- Wild, J., Walczak, W., Krajewska-Grynkiewicz, K., Klotowski, T. (1974). D-Amino acid dehydrogenase: the enzyme of the first step of D-histidine and D-methionine racemization in *Salmonella typhimurium*. *Molecular and general genetics*, 128(2). 131-146.

〔平成 28 年 7 月 20 日受付〕  
〔平成 28 年 7 月 31 日受理〕

## Substrate specificity of a putative D-amino acid dehydrogenase from *Geobacillus kaustophilus*

---

Yuta Mutaguchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Department of Biotechnology, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University*

D-Amino acids have recently been proposed as useful diagnostic markers because of the close relationships between D-amino acids and various diseases in humans. For a simple and rapid D-amino acid analysis using D-amino acid dehydrogenase, we have characterized the recombinant protein expressed from the putative D-amino acid dehydrogenase gene (Locus tag: GK1399) conserved in *Geobacillus kaustophilus* JCM 12893. In this study, first, the recombinant enzyme expressed in *Escherichia coli* was purified using Ni-affinity chromatography and heat-treatment. Next, the substrate specificity for the amino acid dehydrogenation activity of the recombinant protein was investigated. The substrates for this enzyme included D-proline, glycine, D-2-aminobutyric acid, D-leucine, D-methionine, D-norleucine, D-norvaline, and D-tryptophan.

**Keywords:** D-amino acid, dehydrogenase, thermophile