



蛋白質工学的手法による乳酸酸化酵素の耐熱化と乳酸センサーへの応用に関する研究

皆川, 宏貴

(Degree)

博士 (工学)

(Date of Degree)

2001-03-13

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2496

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002496>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【276】

氏 名・(本 籍) 皆川 宏貴 (愛知県)

博士の専攻分野の名称 博 士 (工 学)

学 位 記 番 号 博ろ第211号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の 日 付 平成13年3月13日

【学位論文題目】

蛋白質工学的手法による乳酸酸化酵素の耐熱化と

乳酸センサーへの応用に関する研究

審 査 委 員

主査 教授 福田 秀樹

教授 大川 秀朗 教授 加藤 滋雄

バイオセンサーとは生物素子のもつ優れた分子認識機能を利用した一種の化学センサーであり、種々の固定化された生物素子と信号変換器（トランスデューサー）を組み合わせた構造をしている。その中でも生物素子として酵素を用い、電極上に酵素を固定化した電気化学酵素センサーは最も広範に研究されており、多くのタイプのセンサーが実用化されている。しかし酵素センサーの問題点の一つとして、作製したセンサーの保存中にセンサー出力が低下するという現象がある。これはセンサーに使用する酵素の失活によってセンサー出力の低下が引き起こされていると考えられている。電極上に固定化された酵素が失活していく過程は、水溶液中の酵素が変性剤や加熱により変性していくのと同じ不可逆的変性過程であるという仮定をすると、酵素の耐熱性を向上させることにより変性に対する耐性が高まり、保存中のセンサー出力の低下が抑えられることが期待される。本研究では乳酸センサーに使用される乳酸酸化酵素

(Lactate Oxidase: 以下 LOD と略す) の耐熱性を高めることで、実際に乳酸センサーの保存寿命を向上させることが可能であることを示した。本研究は LOD 遺伝子のクローニング、LOD の耐熱化、耐熱化した LOD を用いた乳酸センサーの作製と評価、という流れで進めた。

LOD を産生する中温性のバクテリア *Aerococcus viridans* から LOD 遺伝子のクローニングを行ない、構造遺伝子とプロモーター及びターミネーター配列について明らかにした。その結果 LOD は 374 アミノ酸残基からなると推定された。クローニングした LOD 遺伝子を発現ベクターに組み込み、大腸菌での LOD の発現・精製を行なった。この組換え LOD の N 末端アミノ酸 7 残基は LOD 遺伝子から推定される N 末端残基と一致した。SDS-PAGE による推定分子量は約 43,000 であり、ゲルろ過から推定される分子量は約 160,000 であった。これらの値は *A. viridans* より精製された LOD と全く同じであり、組換え LOD も溶液中では同一サブユニットからなる 4 量体を形成していると考えられた。

進化分子工学的に LOD を耐熱化することを目的としてクローニングした LOD 遺伝子を好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* で発現させる系を構築して実際に好熱菌中で LOD を発現させた。好熱菌中での活性ある LOD の発現は培養温度に依存し、37℃培養では菌体中に LOD 活性が確認されたが、40℃以上の培養温度では LOD 活性を検出できなかった。一方同じベクターを用いて大腸菌中で LOD を発現させたところ 42℃の培養でも LOD 活性が検出された。この違いは好熱菌中では発現した LOD がプロテアーゼによって分解されることによると思われる。炭素源が乳酸のみである最少栄養培地（乳酸最少培地）では生育できないが、ピルビン酸最少培地では生育可能な乳酸資化能変異好熱菌を作製し、

この変異好熱菌中で LOD を発現させて乳酸資化能を回復させることを試みた。しかし乳酸最少培地での生育下限温度で活性のある LOD を発現させることができず、乳酸資化能を回復させることはできなかった。この系を進化分子工学に適用するためには宿主好熱菌のプロテアーゼを欠損させる必要があると考えられる。

そこで大腸菌の系を用いたランダム変異とスクリーニングによって耐熱性変異 LOD を探索した。error prone PCR 法と DNA shuffling 法を用いて LOD 遺伝子上にランダム変異を導入し、ベクターに挿入した後に大腸菌を形質転換させた。得られた形質転換体を加熱処理した後に LOD の残存活性を指標にして野生型に比べて耐熱化した変異 LOD のスクリーニングを行なった。その結果 160 位が Glu→Gly に変異した E160G、212 位が Asn→Asp に変異した N212D、160 位の Glu→Gly の変異に加えて 198 位が Val→Ile に変異した E160G/V198I の 3 種類の耐熱性 LOD が得られた。E160G の 65℃における活性の半減時間 ($t_{1/2}$) は野生型の約 10 倍、E160G/V198I の 70℃における $t_{1/2}$ は E160G の約 3 倍であった。N212D/E160G、V198I という変異 LOD を部位特異的変異によって作製して耐熱性を比較したが、N212D/E160G の耐熱性は E160G とほとんど変わらず、V198I の耐熱性は野生型とほとんど同じであった。これは耐熱性に関して N212D の変異は E160G の変異に加算的な影響を与えておらず、また V198I の変異は E160G の変異に協同的に作用していることを示している。したがってこれらの変異 LOD の耐熱性に関しては単純な変異の加算性は成立しないと考えられる。

次に LOD の立体構造を、グリコール酸酸化酵素をテンプレートとしたホモロジーモデリング法によって構築し、耐熱性 LOD の変異の効果を立体構造上から推測した。モデル構造から 160、212 位は α -ヘリックス上に、198 位はループ上にある残基であると推測された。いずれの部位も 4 量体の界面近傍ではなく、これらの部位の変異がサブユニット結合を強化しているのではなくサブユニット自身の構造を安定化していることが示唆された。N212D は野生型に比べ k_{cat} と K_m の両方が低下したのに対し、E160G では k_{cat} が大きく低下し K_m は増加していた。E160G の耐熱性は維持し、比活性を向上させるのを目的として部位特異的変異により 160 位を Gln、Arg、Lys、His に置換し、その効果を調べた。その結果 160 位のアミノ酸置換により E160G に比べ、比活性を回復した変異体は得られたが、耐熱性はいずれの変異体も E160G に比べて低下した。

E160G と N212D の 2 種類の耐熱性 LOD を用いて実際に乳酸センサーを作製し、野生型 LOD で作製した乳酸センサーと、センサー出力および保存寿命を比較した。同ユニット数の LOD を固定化した野生型、N212D、E160G センサーは

乳酸に対するセンサー応答に差が無く、出力は乳酸添加後 10～20 秒で定常状態に達した。しかし、乳酸の濃度を変えた時のセンサー出力（乳酸に対する calibration curve）は LOD の種類によって異なる傾向を示し、N212D センサーは各濃度の乳酸に対して野生型、E160G センサーに比べ大きな出力を示した。また野生型、N212D センサーが 400 μ M 以上の乳酸濃度で出力が飽和してくる（乳酸濃度に対するセンサー出力の直線性が悪くなる）のに対し、E160G センサーでは乳酸濃度が 800 μ M までセンサー出力の直線性を保っていた。これは野生型と E160G の乳酸に対する K_m 値の違いがセンサー出力に反映されていると考えられた。各センサーを空气中、40℃で保存して寿命の比較を行なった結果、すべてのセンサーが保存時間と共に出力が低下し、N212D と野生型のセンサーでは出力がほぼ同じ経過をたどって低下した。一方 E160G センサーの出力低下は野生型に比べて明らかに緩やかで、センサー出力が保存開始時の 50% まで低下した時間は、野生型、N212D が約 400 時間なのに対し、E160G では 2 倍の約 800 時間であった。したがって LOD の耐熱性を高めることによって乳酸センサーの保存寿命の向上が可能であることが実証された。

論文審査の結果の要旨

氏名	皆 川 宏 貴		
論文 題 目	蛋白質工学的手法による乳酸酸化酵素の耐熱化と 乳酸センサーへの応用に関する研究		
審 査 委 員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教 授	福 田 秀 樹
	副 査	教 授	大 川 秀 郎
	副 査	教 授	加 藤 滋 雄*
	副 査		印
	副 査		印
要 旨			
酵素の持つ優れた分子認識機能を利用したいわゆる酵素センサーは種々の化学物質を測定するためのセンサーが研究され、一部のものは実用化されている。酵素センサーの問題点の一つとして、固定化した酵素が失活することによるセンサー出力の低下があげられる。特に作製した酵素センサーが保存中に出力低下していく問題は酵素センサーの実用化を図る上で大きな障害となっている。 本研究では乳酸酸化酵素を用いた乳酸センサーの保存寿命の向上を目的とし、乳酸酸化酵素の耐熱性を高めることでこの問題の解決を試みている。本研究は乳酸酸化酵素遺伝子のクローニング、乳酸酸化酵素の好熱菌での発現系の構築、ランダム変異による乳酸酸化酵素の耐熱化、耐熱性乳酸酸化酵素を用いた乳酸センサーの作製とセンサー特性の評価、という流れで進められている。			

第1章では、乳酸酸化酵素 (LOD) を産生する中温性のバクテリア *Aerococcus viridans* から乳酸酸化酵素遺伝子のクローニングを行ない、乳酸酸化酵素としては初めて構造遺伝子とプロモーター及びターミネーター配列について明らかにしている。クローニングした遺伝子を大腸菌で発現させて精製を行ない、N末端アミノ酸の配列解析、SDS-PAGE、ゲルろ過を行なって結果、LOD は N 末端の Met を含む 374 残基からなり、サブユニット分子量は約 43,000 であることを明らかにしている。また、Recombinant LOD のサブユニット分子量と緩衝液中での分子量は *A. viridans* より精製された乳酸酸化酵素と同一であることを確認している。

第2章では、進化分子工学的に乳酸酸化酵素を耐熱化することを目的として好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* 中で乳酸酸化酵素を発現させる系を構築し、実際に好熱菌中での発現を確認している。そして好熱菌中での活性ある乳酸酸化酵素の発現は培養温度に依存し、この系を進化分子工学に適用するためには宿主好熱菌のさらなる改良が必要であると考察している。

第3章では、大腸菌の系を用いたランダム変異とスクリーニングによる耐熱性乳酸酸化酵素の探索において、ランダム変異を起こさせる方法として、error prone PCR 法と DNA shuffling 法を用いている。形質転換させた大腸菌を加熱処理し、乳酸酸化酵素の残存活性を指標にして野生型に比べて耐熱化した変異乳酸酸化酵素のスクリーニングを行なっている。その結果 3 種類の耐熱性乳酸酸化酵素 (N212D, E160G, N212D/E160G) を取得しており、これらの変異酵素の耐熱性や酵素化学的な性質について調べている。さらに DNA shuffling を行いアミノ酸変異を組み合わせた乳酸酸化酵素 (E160G/V198I) を作製した結果、著しい耐熱性の向上が見られた。また、耐熱性と変異の関係について考察した結果、乳酸酸化酵素の耐熱性に関しては単純な変異の加算性については成り立たないことを示している。

第4章では、乳酸酸化酵素の立体構造を、グリコール酸酸化酵素をテンプレートとしたホモロジーモデリング法によって構築し、耐熱性乳酸酸化酵素の変異の効果を立体構造上から推測している。この推測

から耐熱性乳酸酸化酵素の比活性を向上させることを目的とし、部位特異的変異によりアミノ酸置換の効果を調べ、推測の妥当性を検証している。

第5章では、2種類の耐熱性乳酸酸化酵素（N212D, E160G）を用いて乳酸センサー（プレーナ型アンペロメトリック型センサー）を作製し、野生型の乳酸酸化酵素で作製したセンサーとセンサー出力を比較している。乳酸に対するセンサー応答には野生型と耐熱性酵素において差がほとんど見られなかったが、乳酸濃度を変化した場合の出力特性は酵素によって異なっており、野生型と耐熱性酵素の乳酸に対する K_m 値の違いがセンサー出力に反映されていることによると考察している。次に、センサーを空气中、40℃で保存してセンサー寿命の比較を行ない、耐熱性乳酸酸化酵素を用いたセンサーでは、出力の低下に関してほぼ一次失活モデルで近似でき、保存開始時の50%まで低下する半減期は野生型の2倍以上であるという結果を示し、乳酸酸化酵素の耐熱性を高めることによって乳酸センサーの保存寿命の著しい向上が可能であることを実証している。

本研究は、酵素センサーの保存寿命向上を目的として、乳酸酸化酵素のクローニングと耐熱化を行ない、酵素の変異と耐熱性の関係および、実際に乳酸センサーを作製して耐熱性の効果について研究したものであり、酵素の耐熱性とセンサーの保存寿命との関係について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める

よって、学位申請者皆川宏貴は、博士（工学）の学位を得る資格があると認める。