

**超好熱アーキア *Thermococcus litoralis* DSM5473
のアスパラギン酸代謝関連酵素の機能と応用に関する研究**

著者	鷺尾 翼
発行年	2018-03-31
学位授与機関	関西大学
学位授与番号	34416甲第676号
URL	http://doi.org/10.32286/00000174

課程博士

2018年3月 関西大学審査学位論文

超好熱アーキア *Thermococcus litoralis* DSM 5473 の

アスパラギン酸代謝関連酵素の

機能と応用に関する研究

理工学研究科 総合理工学専攻

生命・医薬

14D6011 鷺尾 翼

《論題》

超好熱アーキア *Thermococcus litoralis* DSM 5473 のアスパラギン酸代謝関連酵素の
機能と応用に関する研究

《概要》

全ての生物は真核生物、真正細菌、アーキアの3つのドメインに大別される。80°C以上の高温環境で生育可能な微生物は超好熱菌と呼ばれ、一部のバクテリアを除くとその多くはアーキアに分類される。超好熱アーキアは、その生育する環境が始原の地球の環境に類似していることから、分子進化との関連性が着目されている。また、好熱菌由来の酵素は、一般に高い耐熱性に加えて、pH安定性、有機溶媒耐性など示すことが多く、保存性の高さや適応範囲の広さを活かした、バイオセンサーや酵素試薬としての産業利用が期待される。

本研究で対象とする *Thermococcus* 属のアーキアは偏性嫌気性の海洋性超好熱アーキアで、その生育温度が55°C~98°Cと全生物の中で比べても、生育可能な温度範囲が広いのが特徴である。これまで、*Thermococcus* 属由来の酵素の研究は、核酸代謝関連酵素や糖質代謝関連酵素について中心的に行われ、その酵素科学的な機能や応用利用について数多く報告されている。一方、アミノ酸代謝関連酵素に関する報告は、核酸代謝関連酵素や糖質代謝関連酵素に比べて少なく、特にD-アミノ酸代謝に関わる酵素についてはほとんど報告されていない。

そこで本研究では、*Thermococcus litoralis* DSM 5473の細胞内のアミノ酸分析を行い、D-,L-アミノ酸ともに細胞内の存在量が多かったアスパラギン酸代謝に着目し、アスパラギン酸代謝関連酵素の機能について解析することで、本菌のアスパラギン酸代謝経路について明らかにするとともに、これらの酵素の応用利用への有用性を明らかとすることを目的とした。本研究では、D-アスパラギン酸の生合成に関わるアスパラギン酸ラセマーゼとL-アスパラギン酸異化代謝の主要な酵素であるL-アスパラギン酸オキシダーゼの2酵素について、詳細な酵素科学的性質について明らかにした。また、これらの酵素がアスパラギン酸定量に用いる定量用酵素として有用であることを明らかとし、これらの酵素を用いた新規のD-及びL-アスパラギン酸定量法を開発した。

《各章の要旨》

第一章では *Thermococcus litoralis* DSM 5473 の細胞内に、アスパラギン酸、アラニン、セリン、バリンなどの D-アミノ酸が存在することを明らかにした。特に D-アスパラギン酸は他の D-アミノ酸に比べて著量に存在し、アスパラギン酸ラセマーゼによって生合成されていると考えられた。そこで、*T. litoralis* DSM 5473 ゲノム上のアスパラギン酸ラセマーゼ (AspR) のホモログ遺伝子をクローニングし、発現用宿主 *Escherichia coli* Rostta (DE3) の可溶性画分に発現させた結果、その遺伝子産物が AspR 活性を有することを見出した。アスパラギン酸ラセマーゼ遺伝子は 687 bp の塩基対で構成され 228 アミノ酸残基をコードしていた。精製酵素の比活性は 1,590 U/mg であった。本酵素は 56 kDa のサブユニット分子質量をもつホモダイマーで補酵素として PLP を必要としなかった。本酵素は 95°C の高温条件下でもアスパラギン酸ラセマーゼ活性を示し、その活性化エネルギーは 51.8 kJ/mol であった。本酵素は高い熱安定性を示し、90°C、11 h の熱処理後も約 50% の活性が残存していた。本酵素は pH 7.5 で最大活性を示し、pH 6.0-7.0 の間で安定であった。本酵素は D-および L-アスパラギン酸の他にも、L-システイン酸、L-システインスルフィン酸に対しても活性を示し、ヨード酢酸によって強く阻害された。部位特異的変異導入の結果から、Cys83 と Cys194 の二つのシステイン残基が触媒残基であることが明らかになった。

第二章では *Thermococcus litoralis* DSM 5473 の L-アスパラギン酸オキシダーゼ (LASPO) のホモログ遺伝子 (*Tl-laspo*) (accession no. : OCC_06611) を PCR で増幅し、pET21b ベクターにクローニング後、発現用宿主 *Escherichia coli* BL21 (DE3) に導入することで発現系を構築した。発現培養の結果、*Tl-laspo* を *E. coli* BL21 (DE3) の可溶性画分に発現させることに成功した。その遺伝子産物 (*Tl-LASPO*) は *in vitro* の FAD 存在下で L-アスパラギン酸オキシダーゼ活性を示し、本研究によって *Thermococcus* 属で初めてその詳細な性質について明らかとした。

Tl-LASPO と既報の *Pyrococcus horikoshii* OT3 の L-アスパラギン酸オキシダーゼの一次構造の類似性は約 65% であった。*Tl-LASPO* は 52 kDa のサブユニット分子質量をもつホモトリマーであった。本酵素は、75°C までの温度範囲で反応温度の上昇に伴い活性が上昇した。本酵素は、pH 4.5-10.5 の間で活性を示し pH 8.0 で最大活性を示した。本酵素は 80°C、1 時間の熱処理においても失活が見られなかった。反応速度論的な解析の結果、本酵素は 70°C において最も高い k_{cat}/K_m を示した。本酵素は L-アスパラギン酸に対し高い基質性を示し、それ以外の標準アミノ酸に対しては反応しなかった。嫌気条件下において本酵素は FAD に加えて、フマル酸、2,6-ジクロロインドフェノール (DCIP)、フェリシアン化カリウムを補因子とした。*Tl-LASPO* のホロ酵素の吸収スペクトルを測定したところ、補酵素 FAD に起因する、380 nm と 450 nm に極大吸収が見られた。FAD-*Tl-LASPO* 複合体における FAD の解離定数 (K_d) を算出したところ、 5.9×10^{-9} M であった。

第三章では、第一章、第二章の機能解析の結果、*Tl-AspR* と *Tl-LASPO* がいずれも高い安定性と基質特異性を有していたことから、これらの酵素は保存性の高いアスパラギン酸定量用酵素として用いるのに有用であると考え、これらの耐熱性酵素を用いて新規 D-,L-アスパラギン酸酵素定量法を開発した。試料中の L-アスパラギン酸濃度の測定は、*Tl-LASPO* と西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ(*HRP*)の共役反応を利用して定量した。また、総アスパラギン酸の定量は *Tl-AspR*、*Tl-LASPO*、*HRP* の三つの酵素をカップリングさせることで行った。標準 D-,L-アスパラギン酸溶液を用いて L-アスパラギン酸、総アスパラギン酸の検量線を作成した結果、いずれの検量線も 0 - 600 μM の範囲で直線性が得られた。本法を用いて、様々な D-アスパラギン酸含量(%)の D-,L-アスパラギン酸溶液の D-および L-アスパラギン酸を定量した結果、D-アスパラギン酸含量(%)の低い試料の定量法としても有効であった。本法は生体試料や食品サンプルのような L-アスパラギン酸を豊富に含むサンプルに対しても有効であると考えられたため、食品サンプルのモデルとして、日本酒試料と黒酢試料を用いて本酵素法と高速液体クロマトグラフィー法(*HPLC* 法)を比較した。日本酒、黒酢いずれのサンプルも酵素法を用いた定量値と *HPLC* 法を用いた定量値は同程度の値を示した。以上の結果から本酵素法は生体試料や食品試料中の D-,L-アスパラギン酸分析に有用なツールとなることが明らかとなった。

以上

目次

序論.....	1
第一章 <i>Thermococcus litoralis</i> DSM 5473 由来のアスパラギン酸ラセマーゼ の酵素科学的性質の解明	
1-1 緒言	5
1-2 実験材料および方法	8
1-2-1 実験材料	
1-2-2 <i>Thermococcus litoralis</i> DSM 5473 の培養とゲノム抽出	
1) <i>Thermococcus litoralis</i> DSM 5473 の培養	
2) ゲノム DNA 抽出	
1-2-3 <i>Thermococcus litoralis</i> DSM 5473 の細胞内アミノ酸含有量 の分析	
1-2-4 アスパラギン酸ラセマーゼホモログ遺伝子(<i>Tl-aspr</i>)の クローニングと発現系の構築	
1) <i>Tl-aspr</i> 全 DNA 配列の決定	
2) 発現系の構築	
1-2-5 クローン株の培養及び発現タンパク質(<i>Tl-AspR</i>)の精製	
1) クローン株の培養と粗酵素液の調製	
2) 発現タンパク質の精製	
3) タンパク質の定量と精製純度の確認	
1-2-6 標準活性測定法	
1-2-7 <i>Tl-AspR</i> 活性に及ぼす温度の影響	
1-2-8 <i>Tl-AspR</i> 活性に及ぼす pH の影響	
1) 最適 pH	

2) pH 安定性	
1-2-9 <i>Tl</i> -AspR の基質特異性	
1-2-10 <i>Tl</i> -AspR 活性に及ぼす SH 試薬及び金属イオンの影響	
1) SH 試薬の影響	
2) 金属イオンの影響	
1-2-11 <i>Tl</i> -AspR の部位特異的変異導入による触媒残基の同定	
1-2-12 <i>Tl</i> -AspR の反応速度論的解析	
1-2-13 <i>Tl</i> -AspR のサブユニット分子質量と会合状態の推定	
1-2-14 <i>Tl</i> -AspR の系統樹解析	
1-3 実験結果.....	21
1-3-1 <i>Thermococcus litoralis</i> DSM 5473 の細胞内アミノ酸含有量の分析	
1-3-2 <i>Tl</i> -AspR の発現と精製	
1-3-3 <i>Tl</i> -AspR 活性に及ぼす温度の影響と熱安定性	
1-3-4 <i>Tl</i> -AspR 活性に及ぼす pH の影響	
1-3-5 <i>Tl</i> -AspR の基質特異性	
1-3-6 <i>Tl</i> -AspR の触媒残基の決定	
1-3-7 <i>Tl</i> -AspR 活性に及ぼす SH 試薬及び金属イオンの影響	
1-3-8 <i>Tl</i> -AspR の反応速度論的解析	
1-3-9 <i>Tl</i> -AspR の系統樹解析	
1-4 考察.....	35

第二章 *Thermococcus litoralis* DSM 5473 由来の L-アスパラギン酸オキシダーゼの酵素科学的性質の解明

2-1 緒言	38
2-2 実験材料および方法	41
2-2-1 実験材料と使用菌株	
2-2-2 L-アスパラギン酸オキシダーゼホモログ遺伝子(<i>Tl-laspo</i>)の	

クローニングと発現系の構築

- 2-2-3 発現タンパク質(*Tl-LASPO*)の精製
- 2-2-4 標準活性測定法
- 2-2-5 *Tl-LASPO* 活性に及ぼす温度と pH の影響
- 2-2-6 *Tl-LASPO* の pH および熱に対する安定性
- 2-2-7 *Tl-LASPO* の基質特異性
- 2-2-8 *Tl-LASPO* の電子受容体の特異性
- 2-2-9 *Tl-LASPO* の反応速度論的解析
- 2-2-10 *Tl-LASPO* のサブユニット分子質量と会合状態の推定
- 2-2-11 *Tl-LASPO* のホロ酵素およびアポ酵素の吸収スペクトル解析
- 2-2-12 *Tl-LASPO* の FAD の解離定数の決定
- 2-2-13 *Tl-LASPO* の保存中に生じる未知タンパク質の
MALDI-TOF-MS 解析
- 2-2-14 *Tl-LASPO* の保存中の遊離チオール基の濃度変化の
ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)を用いた定量
- 2-2-15 *Tl-LASPO* ホモログ遺伝子の系統樹解析

2-3 結果..... 49

- 2-3-1 *Tl-laspo* 遺伝子のクローニングと系統樹解析
- 2-3-2 *Tl-laspo* 遺伝子の発現と精製
- 2-3-3 *Tl-LASPO* の酵素活性に及ぼす温度及び pH の影響
- 2-3-4 *Tl-LASPO* の基質特異性
- 2-3-5 *Tl-LASPO* の電子受容体の特異性
- 2-3-6 *Tl-LASPO* の反応速度論的解析
- 2-3-7 *Tl-LASPO* の吸収スペクトル解析と FAD の解離定数

2-4 考察..... 65

第三章 耐熱性酵素を用いた新規 D-および L-アスパラギン酸定量法の開発

3-1 緒言 70

3-2 実験材料および方法	73
3-2-1 実験材料	
3-2-2 <i>Tl-AspR</i> と <i>Tl-LASPO</i> を用いた D-及び L-アスパラギン酸 の定量	
3-2-3 高速液体クロマトグラフィー法を用いた D-及び L-アスパラギン酸の定量	
3-2-4 D-アスパラギン酸定量に及ぼす L-アスパラギン酸の影響	
3-2-5 反応系に用いるトリンダー試薬の検討	
3-2-6 食品試料中の D-及び L-アスパラギン酸の定量	
3-3 結果.....	77
3-3-1 <i>Tl-AspR</i> と <i>Tl-LASPO</i> を用いた D-及び L-アスパラギン酸の 定量	
3-3-2 D-アスパラギン酸定量に及ぼす L-アスパラギン酸の影響	
3-3-3 反応に用いるトリンダー試薬の影響	
3-3-4 食品試料中の D-及び L-アスパラギン酸の定量	
3-4 考察.....	83
総括と結論	84
参考文献	90
本論文に関する報告	100
謝辞.....	103

序論

全ての生物は真核生物、真正細菌、アーキアの 3 つのドメインに大別される。アーキアに分類される生物には高温、高圧、強酸性、強アルカリ性などの極限環境下で生育可能な極限環境微生物が多数見つかっている。中でも 80°C 以上の高温環境で生育可能な超好熱アーキアは、その生育する環境が始原の地球の環境に類似していることから、分子進化との関連性が着目されている。また、超好熱アーキアを含めた好熱菌由来の酵素は、一般に、耐熱性以外にも、pH 安定性、有機溶媒耐性など示すことが多く、総じて安定性が高いことから、バイオセンサーや酵素試薬といった応用面での利用が期待される。

本研究で対象とする *Thermococcus* 属のアーキアは偏性嫌気性の海洋性超好熱アーキアで、その生育温度が 55°C~98°C と全生物の中で比べても、生育可能な温度範囲が広いのが特徴である。*Thermococcus* 属由来の酵素として、古くから核酸代謝関連酵素や糖質代謝関連酵素がよく研究されており、一部の酵素は産業面での応用利用もなされている。例えば、*Thermococcus kodakaraensis* KOD1 由来の DNA ポリメラーゼ(EC 2.7.7.7)は、耐熱性かつ高正確性の PCR 用酵素として利用されている(Nishioka et al., 2001)。また、*T. kodakaraensis* 由来の 4- α -グルカノトランスフェラーゼはデンプン加工産業におけるデンプンの分子内の糖転移に利用される(Tachibana et al., 2000)など *Thermococcus* 属由来の酵素は様々な分野で産業利用されている。

Thermococcus 属のアミノ酸代謝関連酵素としては、これまでに、NADP⁺ 特異的なグルタミン酸脱水素酵素(EC 1.4.1.2) (Ma et al., 1994)や *T. litoralis* DSM 5473 の細胞内に見出された 2 つの芳香族アミノ酸アミノトランスフェラーゼ(EC 2.6.1.57)が L-体の芳香族アミノ酸の異化に関与していること (Andreotti et al., 1994)や、*Thermococcus* sp. CKU-1 由来のフォールドタイプ I の PLP 酵素として分類される新規の分岐鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ(EC 2.6.1.1)の酵素科学的性質(Uchida et al., 2014)や、L-アミノアシラーゼ(EC 3.5.1.14)の機能(Toogood et al., 2002)について報告されている。しかしながら、上記の核酸代謝関連酵素や糖質代謝関連酵素と比較するとアミノ

酸代謝関連酵素の報告例は少なく *Thermococcus* 属におけるアミノ酸代謝経路については十分に明らかとなっていないのが現状である。特に、D-アミノ酸代謝に関しては、真核生物やバクテリアの生体内での D-アミノ酸の生理的な機能について徐々に明らかとなりつつある一方で、アーキアにおける D-アミノ酸の生理的な機能や代謝経路についてはいまだ不分明な点が多く、*Thermococcus* 属由来の D-アミノ酸代謝関連酵素としては唯一、プロリンラセマーゼ/ヒドロキシプロリンエピメラーゼの機能について報告されている(Watanabe et al., 2015)。

そこで本研究では *T. litoralis* DSM 5473 の細胞内のアミノ酸分析を行い、D-,L-アミノ酸ともに細胞内の存在量が多かったアスパラギン酸代謝に着目し、第一章では D-アスパラギン酸の代謝に関わると考えられるアスパラギン酸ラセマーゼホモログ遺伝子のクローニングと、その遺伝子産物の機能解析によって、D-アスパラギン酸代謝に関わる酵素の存在を明らかにし、その詳細な酵素科学的性質について解明することを目的とした。

T. litoralis DSM 5473 のゲノム上にはアスパラギン酸代謝に関わる代謝経路として、アスパラギン酸ラセマーゼ(EC 5.1.1.13)の他にも、L-アスパラギン酸オキシダーゼ(EC 1.4.3.16)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(EC 2.6.1.1)、L-アスパラギナーゼ(EC 3.5.1.1)、アスパラギンシンターゼ(EC 6.3.5.4)、アデニロコハク酸シンセターゼ(EC 6.3.4.4)のホモログ遺伝子が存在していることが明らかとなっている(Fig. 1)。中でも L-アスパラギン酸オキシダーゼは *T. litoralis* DSM 5473 のアスパラギン酸の異化代謝における中心的な役割を担う酵素の一つであると予想された。また、耐熱性の L-アスパラギン酸オキシダーゼは保存性の高い酵素としてバイオセンサーや酵素定量法などの産業上の有用性が高いと考えられたため、第二章では *T. litoralis* DSM 5473 ゲノム上の L-アスパラギン酸オキシダーゼホモログ遺伝子をクローニングし、熱安定性、pH 安定性、基質特異性をはじめとした酵素科学的な性質について検討した。

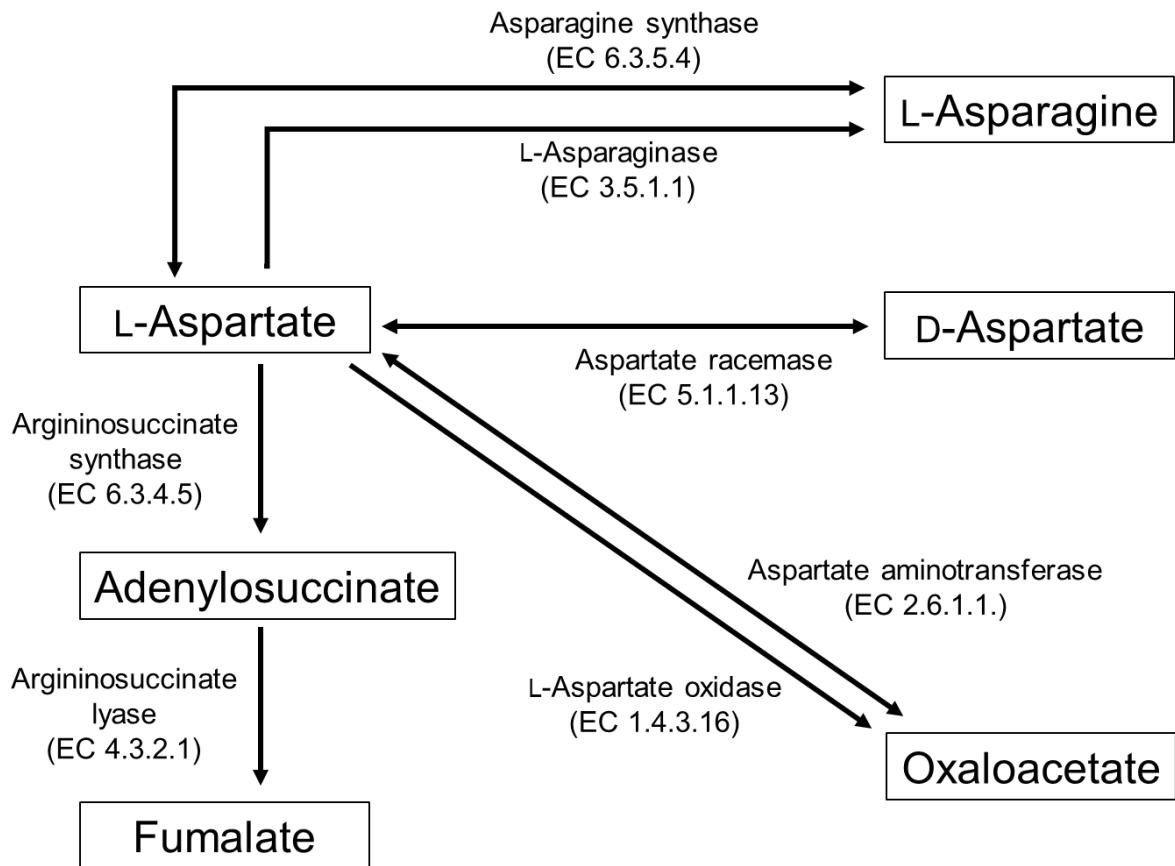


Fig. 1 *T. litoralis* DSM 5473 のゲノム上に保存されている
アスパラギン酸周辺の代謝経路

Thermococcus 属由来の酵素は一般に、その高い安定性や、反応温度の適応範囲が広いことから、応用面での有用性が期待される。第一章、第二章の機能解析の結果に基づき、これらの酵素はアスパラギン酸定量用の酵素として用いるのに有用であると考えられた。また、D-アスパラギン酸は肌の老化抑制効果を示すことが報告されている(芦田 他, 2011)他、当研究室ではこれまでに日本酒中の D-アスパラギン酸、D-アラニン、D-グルタミン酸が味質の向上に寄与していること明らかにしている(Okada et al., 2013)。このような食品中の D-アスパラギン酸の機能が注目されている今、高価な装置や専門的な分析技術を必要としない、簡便な D-アスパラギン酸定量法の開発への期待が高まっている。そこで第三章では、耐熱性アスパラギン

酸ラセマーゼ、L-アスパラギン酸オキシダーゼを用いた新規 D-及び L-アスパラギン酸定量法の開発を目指した。さらには、本酵素法の有用性を実証するため、食品サンプルのモデルとして、日本酒および黒酢を使用して試料中の D-及び L-アスパラギン酸の酵素法での定量結果と、従来法である高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法を用いた定量結果を比較した。

第一章

Thermococcus litoralis DSM 5473 由来の アスパラギン酸ラセマーゼの酵素科学的性質の解明

要約

本研究では、*Thermococcus litoralis* DSM 5473 の細胞内に、アスパラギン酸、アラニン、セリン、バリンなどの D-アミノ酸が存在することを明らかにした。また、アスパラギン酸ラセマーゼ(AspR)のホモログ遺伝子(*Tl-aspr*) (アクセッション No. : LC034559)を *Escherichia coli* Rostta (DE3)の可溶性画分に発現させることに成功し、その遺伝子産物がアスパラギン酸ラセマーゼ(AspR)活性を有することを見出した。アスパラギン酸ラセマーゼ遺伝子は 687 bp の塩基対で構成され 228 アミノ酸残基をコードしていた。精製酵素の比活性は 1,590 U/mg であった。本酵素は 56 kDa のサブユニット分子質量をもつホモダイマーで補酵素として PLP を必要としなかった。本酵素は 95°C の高温条件下でもアスパラギン酸ラセマーゼ活性を示し、その活性化エネルギーは 51.8 kJ/mol であった。本酵素は高い熱安定性を示し、90°C、11 h の熱処理後も約 50%の活性が残存していた。本酵素は pH 7.5 で最大活性を示し、pH 6.0-7.0 の間で安定であった。本酵素は D-および L-アスパラギン酸の他にも、L-システイン酸、L-システインスルフィン酸に対しても活性を示し、ヨード酢酸によって強く阻害された。部位特異的変異導入の結果から、Cys83 と Cys194 の二つのシステイン残基が活性に重要であることが明らかとなった。

1-1 緒言

生体内に存在するアミノ酸は全て L-体であると以前は考えられていたが、近年の分析技術の進歩に伴い、幅広い生物種において L-アミノ酸だけでなく D-アミノ酸が存在し、様々な生理機能をもつことが明らかとなってきた。例えば、真核生物においては、D-セリンが脳内の NMDA 型受容体のコアゴニストとして存在していることや、記憶や学習にも関与していることが報告されている(Fadda et al., 1988)。また D-アスパラギン酸も神経伝達物質と

しての機能やテストステロン、メラトニンなどのホルモンの生合成や分泌に関与していることが明らかとなっている(D’Aniello et al., 1996)。さらに、二枚貝などの一部の海洋性動物では D-アラニンがオスモライトとして機能し、細胞内の浸透圧調整に関与していることが報告されている(Yoshikawa and Yokoyama, 2015)。一方でバクテリアにおいては主として D-アラニン、D-グルタミン酸が細胞壁のペプチドグリカンの構成要素として存在することが広く知られている。一部のアーキアにはバクテリアと同様に細胞表層に細胞壁を持つものも存在しているが、その構成成分として D-アミノ酸は含まれておらず、細胞壁を有していない種も多く(Kandler and König, 1998)、アーキア全般における D-アミノ酸の生理機能についてはいまだ不分明のままである。超好熱アーキアの D-アミノ酸に関する報告として、これまでに *Desulfurococcus* sp. SY, *Pyrococcus* sp. O-II, *Thermococcus* sp. KS-1 の細胞内に遊離の D-アミノ酸が存在し、それらの細胞抽出液がそれぞれの D-アミノ酸に対応したアミノ酸ラセマーゼ活性を示すことが見出されている(Matsumoto et al., 1999)。

これらの生体内の D-アミノ酸の生合成経路としては一般に、アミノ酸ラセマーゼの機能によって L-アミノ酸から合成される経路が知られている。アミノ酸ラセマーゼは大別すると PLP を補酵素とする PLP 依存型と補酵素を必要としない PLP 非依存型に分類される。PLP 依存型アミノ酸ラセマーゼとしては、アラニンラセマーゼ(EC 5.1.1.1) (Oikawa et al., 2006)、セリンラセマーゼ(EC 5.1.1.18) (Gogami et al., 2009)、アルギニンラセマーゼ(EC 5.1.1.9) (Matsui et al., 2009)が報告されている。PLP 非依存型アミノ酸ラセマーゼとしてはグルタミン酸ラセマーゼ(EC 5.1.1.3) (Choi et al., 1992)、プロリンラセマーゼ(EC 5.1.1.4) (Rudnick and Abeles, 1975)が報告されている。一方、AspR(EC 5.1.1.13)の場合、PLP 依存型、PLP 非依存型の両方の酵素が存在し、PLP 依存型のアスパラギン酸ラセマーゼとしては、*Scapharca broughtonii* (Shibata et al., 2003)、*Thermoplasma acidophilum* (Long et al., 2001)由来の AspR が報告されており、PLP 非依存型のアスパラギン酸ラセマーゼとしては、*Lactobacillus sakei* NBRC 1589 (Fujii et al., 2015)、*Picrophilus torridus* (Aihara et al., 2016)、*Streptococcus thermophilus*(Okada et al., 1991)、*Bifidobacterium*

bifidum NBRC 14252 (Yamashita et al., 2004)について報告されている。興味深いことに、アーキアにはこれらの両タイプのアスパラギン酸ラセマーゼの存在が報告されているが、その詳細な酵素科学的性質についてはいまだに明らかとなっていない。そこで本研究では、*T. litoralis* DSM 5473 ゲノム上のアスパラギン酸ラセマーゼホモログ遺伝子(*Tl-aspr*)をクローニングし、大腸菌を用いた異種発現および酵素精製を行い、アーキア由来のアスパラギン酸ラセマーゼとしてその酵素科学的な性質について明らかにすることを目的とする。

1-2 実験材料および方法

1-2-1 実験材料

L-アスパラギン酸ナトリウム塩、D-アスパラギン酸、D,L-アスパラギン酸はいずれもナカライテスク株式会社から購入した。L-システイン酸及び L-システインスルフィン酸は和光純薬株式会社から購入した。*Escherichia coli* NovaBlue、*Escherichia coli* Rosetta (DE3)、pT7blue-T ベクター、pET11b ベクターは Novagen から購入した。Brend Taq DNA ポリメラーゼ、KOD plus ver.2 DNA ポリメラーゼは東洋紡から購入した。LA PCR in vitro cloning kit、DNA ligation kit、制限酵素(NdeI, XhoI)はタカラバイオ株式会社から購入した。Toyoparl DEAE-650M、Butyl-650M、SuperQ-650M は東ソー株式会社から購入した。その他の試薬は適切な純度の試薬を、和光純薬、関東化学、キシダ化学、ナカライテスク、渡辺化学、インビトロジェン、シグマアルドリッチ、Bio-Rad から購入した。

1-2-2 *Thermococcus litoralis* DSM 5473 の培養とゲノム抽出

1) *Thermococcus litoralis* DSM 5473 の培養

T. litoralis DSM 5473 の培養は *T. litoralis* 培養用培地(2.5 g/L Bacto Tryptone, 0.5 g/L Yeast extract, 3.6 g/L マルトースー水和物, 0.5 g/L L-システイン塩酸塩一水和物, 50 mL/L 10×Solution A, 50 mL/L 10×Solution B, 8 mL/L 125×Solution C, 10 mL/L 100×Trace mineral solution)を用いて、嫌気指示薬として 0.1% レザズリン水溶液を終濃度が 1 µg/mL になるように培地中に添加し、N₂ ガスを通気しながら嫌氣的に 84°C, 16 h 培養した。10×Solution A、10×Solution B、125×Solution C、100×Trace mineral solution の組成を以下に示す{(10×Solution A (/L) : NaCl 239 g, Na₂SO₄ 40 g, KCl 7 g, NaHCO₃ 2 g, KBr 1 g, H₃BO₃)、(10×Solution B (/L) : MgCl₂·6H₂O 108 g, CaCl₂·2H₂O 15 g, SrCl₂·6H₂O 15 g)、(125×Solution C : NH₄Cl 31.25 g, KH₂PO₄ 17.5 g, CH₃COONa 125 g, 100×Trace mineral solution : ニトリロ三酢酸 1.5 g, MnSO₄·H₂O 0.5 g, FeSO₄·7H₂O 1.4 g, NiCl₂·6H₂O 0.2 g, CoSO₄ 0.1 g, ZnSO₄·7H₂O 0.1 g, CuSO₄·5H₂O

0.01 g, Na₂WO₄·2H₂O 0.3 g, Na₂MoO₄·H₂O 0.01 g)}. 培養後の培養液 1 mL を 1.5 mL 容マイクロチューブに回収し、14,500×g、1 min 遠心分離し上清の培地を捨て、菌体を回収した。これを 5 回繰り返す、培養液 5 mL 分の菌体を回収した。

2) ゲノム DNA 抽出

得られた菌体に 60 μL の 1.0 mg/mL リゾチーム溶液と 400 μL の滅菌水を加えて懸濁し 37°C、30 min 処理した後、さらに 30 μL の 10% SDS と 30 μL のプロテイナーゼ K を加えて 65°C、18 h 処理した。処理後の混合液に、39 μL の 5 M NaCl を加えた後、700 μL の PCI 溶液(フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール=25:24:1)を添加しよく混合した。混合液を 5,900×g、5 min 遠心分離し、水層を新たな 1.5 mL 容マイクロチューブに回収し、そこへ 700 μL のクロロホルムを加えてよく混合した。混合液を再び 5,900×g、5 min 遠心分離し、水層を新たな 1.5 mL 容マイクロチューブに回収した。回収した水層の 0.6 倍量の 2-プロパノールを加えて生じた DNA の沈殿物を 1 mL の 70%エタノールでリンスした後、50 μL の 0.04 mg/mL RNase 溶液に再懸濁し、-20°C で保存した。

1-2-3 *Thermococcus litoralis* DSM 5473 細胞内の D-アミノ酸含有量の分析

T. litoralis DSM 5473 を前述の培地を用いて 82°C、23 h 培養後、200 mL の培養液を 3,000×g で 15 min 遠心分離し菌体を回収した。得られた菌体に 0.5 mL の 50 mM KPB, pH 7.0 に再懸濁し、超音波破碎した (Output 2, Duty cycle 30%, 1 min)。得られた細胞抽出液に等量の 10% (w/v)のトリクロロ酢酸を加えて 20 分間氷上で静置し除タンパク処理し、その後 5 M NaOH を加えて中和したものを分析サンプルとして *o*-フタルアルデヒド(OPA)と *N*-アセチル-L-システイン(NAC)を用いた HPLC 法(Gogami et al., 2011)で分析した。HPLC 分析には Develosil ODS UG-S カラム (φ6.0 × 250 mm, 野村化学) を使用し、移動相として 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液、メタノールを用いた。

1-2-4 アスパラギン酸ラセマーゼホモログ遺伝子(*Tl-aspr*)のクローニングと発現系の構築

1) *Tl-aspr* の全 DNA 配列の決定

本研究で用いたプライマーの配列及び宿主大腸菌の遺伝子型を Table 1-2-1 にまとめた。本研究を開始した当初、*T. litoralis* DSM 5473 の全ゲノム情報は解読中であったため、ゲノムウォーキング PCR 法を用いて、*Tl-aspr* の全長配列を決定した。まず初めに *Tl-aspr* 内部の部分配列の増幅のために、近縁のゲノム解読株 4 種(*Thermococcus kodakarensis* KOD1, *Thermococcus onnurineus* NA1, *Thermococcus sibiricus* MM739, *Thermococcus gammatolerans* EJ3)の *aspr* ホモログ遺伝子の遺伝子配列を比較し、保存性の高い領域で設計したプライマー(*aspr-N-1-int*, *aspr-N-2-int*, *aspr-C-1-int*, *aspr-C-2-int*)を用いて PCR を行い、250 bp と 370 bp の部分配列を得た(Fig. 1-2-1)。得られた部分配列の DNA シーケンスは、Thermo Sequenase primer cycle sequence kit (Amersham Bioscience)を用いてシーケンス反応させた解析用サンプルを SQ550E DNA sequencer (日立ハイテクノロジー)で分析を行った。DNA シーケンスの解析結果を基に、新たに4つのプライマー(*aspr-250-S1*, *aspr-250-S2*, *aspr-370-S1*, *aspr-370-S2*)を設計し、それぞれの部分配列の上流および下流の配列を LA PCR in vitro cloning kit を用いたゲノムウォーキング PCR によって決定した。

2) 発現系の構築

得られた配列情報を基に *Tl-aspr* 全長配列を増幅するためのプライマー *aspr-exp-N* と *aspr-exp-C* (Table 1-2-1)を新たに設計し PCR を行った。PCR 産物と pET11b プラスミドベクターは、それぞれ NdeI と XhoI で制限酵素処理し、得られたそれぞれの断片を、DNA ligation kit を用いてライゲーションした。ライゲーション産物を用いてクローニング用宿主 *Escherichia coli* NovaBlue を形質転換した。得られたコンストラクトの配列を DNA シーケンスによって確認した後、発現用宿主 *Escherichia coli* BL21 (DE3)に導入した。pET11b-*Tl-aspr* を導入した、*E. coli* BL21 (DE3)の形質転換体は 5 mL の LB 培地 (100 µg/mL amp を含む)で 37°C、16 h 培養後、培養液と 50%滅菌グリ

セロール溶液を 2 : 1 割合で混合しグリセロールストックを作成し、 -80°C で保存した。

Table 1-2-1 本研究に用いたプライマー及び宿主大腸菌

Primer	Sequence (5'→3')
<i>aspr</i> -N-1-int	AT(C/T)GG(A/C)AT(A/C)CT(A/C)GG(C/T)GG(A/C/G)ATGG
<i>aspr</i> -N-2-int	ACTT(C/T)ATAATAATGCC(A/C)TG(C/T)AA(C/T)AC(C/G)GCC
<i>aspr</i> -C-1-int	C(C/G)GT(A/G)TT(A/G)CA(G/T)GGCATTATTAT(A/G)AAGT
<i>aspr</i> -C-2-int	AC(A/G)CT(G/T)AC(C/T)TC(A/C)GT(A/G)CA(A/G)CC(A/G/T)GCTAT(C/T)A
<i>aspr</i> -250-S1	GCTGTCAATGAGTTCTGGAAGTGGATTTTC
<i>aspr</i> -250-S2	GAGAATATAAGCAGTTTCGATCGGGAATCTTG
<i>aspr</i> -370-S1	CTCAAAAAGAGAGGAATTGAAGCGCTCATTC
<i>aspr</i> -370-S2	CATGAAAGCTATCTATGAAGGAGTAAAGGCAGGTG
<i>aspr</i> -exp-N	TTACATATGGAGAAGGTCATAGGGA
<i>aspr</i> -exp-C	AGGATCCAAGGATGGTTATAAACCA
C83A-f	ATAATCATGCCCGCCAATACCGCTCATTACTTTGC
C83A-r	ATGAGCGGTATTGGCGGGCATGATTATAAAATCTGC
C194A-f	AATAGCCGGAGCCACGGAAGTAAGTGTAGCTTTAAAGC
C194A-r	TTACTTCCGTGGCTCCGGCTATTATAGCTTCAACTTC
Strain	Genotype
<i>Escherichia coli</i> NovaBlue	<i>endA1 hsdR17</i> ($r_{k12}^- m_{k12}^+$) <i>supE44 thi-1 recA1 gryA96 relA1 lac F</i> '[<i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Δ M15:: <i>Tn10</i>] (Tet ^R)
<i>Escherichia coli</i> Rosetta (DE3)	<i>F</i> ⁻ <i>ompT hsdS_b</i> ($r_b^- m_b^-$) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE (Cam ^R)

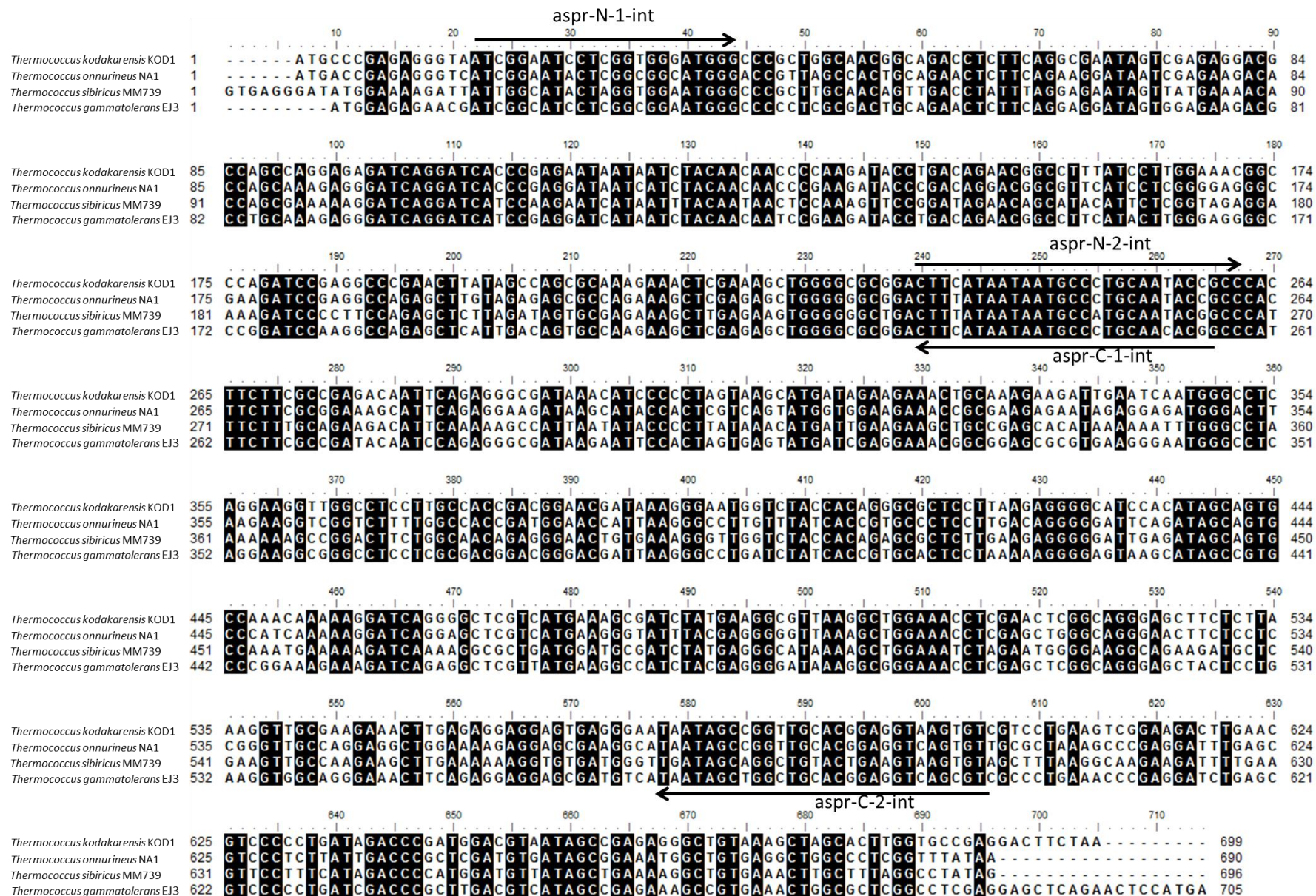


Fig. 1-2-1 プライマー設計に用いた *aspr* ホモログ遺伝子のアライメント

Thermococcus kodakaraensis KOD1 (accession No. : NC_006624)

Thermococcus onnurineus NA1 (accession No. : NC_011529)

Thermococcus sibiricus MM739 (accession No. : TSIB_0542)

Thermococcus gammatolerans EJ3 (accession No. : NC_012804)

1-2-5 クローン株の培養及び発現タンパク質(TI-AspR)の精製

1) クローン株の培養と粗酵素液の調製

発現用ベクターpET11b-*aspr*を導入した *Escherichia coli* Rosetta (DE3)を 5 mL の 100 µg/mL アンピシリンと 34 µg/mL クロラムフェニコールを含む LB 液体培地 (LB-amp/cm 培地) 中で 37°C、16 h 前培養した後、坂口フラスコ (4 本) 中の 250 mL の同培地に 1 mL ずつ植菌し 37°C で 16 h 培養した。培養液を 8,266×g、20 min 遠心することで発現菌体を集菌し、得られた菌体を 30 mL の 1 mM の 2-メルカプトエタノールを含む 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 (以後、緩衝液 A とする)に懸濁した。菌体懸濁液を、Output 6、Duty cycle 30 の条件で 5 min × 3 回超音波破碎した後、14,500×g、20 min 遠心、251,550×g、60 min 超遠心分離し上清を粗酵素液として回収した。

2) 発現タンパク質の精製

粗酵素液を 500 mL 容三角フラスコに移し 70°C、30 min 熱処理した。熱処理後の粗酵素液を 18,900×g、20 分間遠心分離し、回収した上清を 3 L の緩衝液 A に対して透析した (4°C, 16 h)。透析後の酵素液を、緩衝液 A で平衡化した、Toyopearl DEAE-650M カラム (φ25 × 150 mm) にアプライし、担体の 5 倍量の緩衝液 A で未吸着画分を洗い流した。吸着タンパク質の溶出は、緩衝液 A 中の NaCl 濃度を 0-400 mM の勾配で変化させて行い、1.5 mL ずつ分画した。分画した溶出液から AspR 活性を示す画分(No. 40~61)を回収し、脱塩と緩衝液交換のため 1 mM 2-メルカプトエタノールを含む 50 mM カリウムリン酸緩衝液(KPB), pH 8.0 に対して透析した。次いで、回収した画分を 2 M (NH₄)₂SO₄、1 mM 2-メルカプトエタノールを含む、50 mM KPB, pH 8.0 (以後緩衝液 B とする)に対して透析した。酵素液を緩衝液 B で平衡

化した Toyopearl Butyl-650M ($\phi 25 \times 150$ mm) にアプライし、緩衝液 B を担体の 5 倍量流すことで未吸着画分を洗い流した。吸着タンパク質は、緩衝液 B 中の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度を 2.0-0 M で直線的に減少させることで溶出し、1.8 mL ずつ分画した。分画した溶出液から AspR 活性を示す画分 (No. 65~96) を回収し、脱塩のため緩衝液 A に対して透析した。脱塩後の酵素溶液はさらに、緩衝液 A で平衡化した Toyopearl SuperQ-650M ($\phi 15 \times 150$ mm) にアプライし吸着させた。単体の 5 倍量の緩衝液 A を流すことで未吸着画分を洗い流し、緩衝液 A 中の NaCl 濃度を 0-400 mM の勾配で上昇させて吸着タンパク質を溶出した。溶出液は 1.8 mL ずつ分画し、AspR 活性を示す画分を回収した後、後述の方法で精製純度を確認した。得られた精製酵素は、1 mM 2-メルカプトエタノールを含む 50 mM KPB, pH 8.0 に対して透析した後、1.5 mL 容マイクロチューブに小分けし -80°C で保存した。

3) タンパク質の定量と精製純度の確認

各精製ステップでのタンパク質濃度は CBB protein アッセイ溶液 (ナカラ イテスク) を用いて CBB とタンパク質が反応することで生じる 595 nm の吸光度変化から測定した。タンパク質の標準液として、0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL になるように脱イオン水に溶解した牛血清アルブミン (和光純薬) を用いて検量線を作成した。各精製ステップにおけるタンパク質の純度は 13.5%T ポリアクリルアミドゲルを用いた Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) によって確認した。

1-2-6 標準活性測定法

アスパラギン酸ラセマーゼ活性は D-アスパラギン酸を基質として 90°C で反応を行い、生成する L-Asp 量から測定した。総量 200 μL の反応系中に 100 mM KPB (pH 8.0)、4 mM DTT、50 mM D-アスパラギン酸の濃度になるようにそれぞれの試薬を加えて 90°C 、5 min プレインキュベートし、そこに *Tl*-AspR を添加することで反応を開始した。 90°C で 0、2、4、6、8、10 分間反応させた後、60 μL の 1 M トリクロロ酢酸を加えることで反応停止し、さらに 140 μL 0.5 M Na_2CO_3 を加えて中和した。反応後のサンプルは、OPA

と NAC を用いたジアステレオマー蛍光誘導体化(OPA/NAC 法)、あるいはキラルカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法で分析した。ジアステレオマー蛍光誘導体化の分析は、島津製作所の LC システム(送液ユニット; LC-20AB, オートサンプラー; SIL-20AC, カラムオープン; CTO-20AC, 蛍光検出器; RF-10Ax1, ソフトウェア; LCsolution)の装置構成でカラムに Develosil ODS UG-S カラム ($\phi 6.0 \times 250$ mm, 野村化学)を用いて行った。キラルカラムを用いた分析には島津製作所の LC システム(送液ユニット; LC-10AD, オートサンプラー; SIL-10AD, カラムオープン; CTO-10A, UV 検出器; SPD-10A) の装置構成でカラムに SUMICHRAL OA-5000 カラム ($\phi 4.6 \times 150$ mm, 住化分析センター)を用いて行った。酵素活性 1 U は 90 °C で一分間に 1 μ mol の L-アスパラギン酸を生成する酵素量と定義した。

1-2-7 *Tl*-AspR 活性に及ぼす温度の影響

Tl-AspR の最適活性温度は、標準活性測定法の反応温度の条件を 25~95°C の間で 5°C おきに変化させて活性を測定することで調べた。*Tl*-AspR の活性化エネルギーは、最適活性温度の結果を基に以下に示す式(1-2-1)を用いてアレニウスプロットを作成することで算出した。*Tl*-AspR の熱安定性について調べるため 0.5 mg/mL の精製 *Tl*-AspR を 90°C で 0~16 時間、熱処理し一時間ごとの残存活性を測定した。

$$\ln k = (-E_a / R) / T + \ln A \quad (1-1)$$

k : 反応速度定数、 E_a : 活性化エネルギー(J/mol)、 R : 気体定数(8.314 J/K/mol)、 T : 反応温度(K)、 A : 頻度因子

1-2-8 *Tl*-AspR 活性に及ぼす pH の影響

1) 最適 pH

Tl-AspR の最適 pH は標準活性測定方法の 100 mM KPB (pH 8.0) の代わりに pH 6.0-8.5 間の 100 mM の各 pH の緩衝液を用いて、反応温度 50°C における活性を測定することで決定した。本実験に用いた各 pH の緩衝液を以下に示した；MES-NaOH, (pH 6.0-7.0)、HEPES-NaOH, (pH 7.0-8.0)、Tricine-NaOH, (pH 7.5-8.5)。

2) pH 安定性

Tl-AspR の pH 安定性は精製酵素と 0.5 M の各 pH の緩衝液を体積比で 2:3 となるように混合し、4°C、4 日間処理した後、酵素活性を測定することで決定した。本実験で使用した緩衝液を以下に示した；酢酸緩衝液, (pH 4.5-5.5)、MES-NaOH, (pH 5.5-7.0)、HEPES-NaOH, (pH 7.0-8.0)、TAPS-NaOH, (pH 8.0-9.0)、CHES-NaOH, (pH 9.0-10.0)。

1-2-9 *Tl*-AspR の基質特異性

本酵素の基質特異性を検討するため、L-アスパラギン酸、L-システイン酸、L-システインスルフィン酸、D-アスパラギン酸、D-アスパラギン、D-グルタミン酸、D-グルタミン、D-アラニン、D-ロイシン、D-バリン、D-プロリン、D-セリン、D-スレオニン、D-アルギニンを用いて、*Tl*-AspR の反応を行った。酵素反応の生成物のうち D-アスパラギン酸、L-システイン酸、L-システインスルフィン酸、L-アスパラギン、L-グルタミン酸の濃度は、前述の OPA/NAC 法を用いて測定した。また、L-アスパラギン酸、L-ロイシン、L-プロリン、L-バリンの濃度は SUMICHIRAL OA-5000 カラム ($\phi 4.6 \times 150$ mm, 住化分析センター)を用いて測定した。L-アスパラギン酸、L-ロイシンの分析には 2% (v/v) 2-プロパノールを含む 2 mM 硫酸銅水溶液を移動相として、プロリンとバリンの分析には 2 mM 硫酸銅水溶液を移動相として用いた。また、アラニン、セリン、スレオニン、グルタミン、アルギニンの分析には SUMICHIRAL OA-6100 ($\phi 4.6 \times 150$ mm, 住化分析センター)を用いた。アラニン、セリン、スレオニンの分析時には、1 mM 硫酸銅水溶液を移動相とし

て用い、グルタミン、アルギニンの分析時には、2% (v/v)アセトニトリルを含む 2 mM 硫酸銅水溶液を移動相として用いた。L-システイン酸、L-システインスルフィン酸以外のアミノ酸を基質とした酵素活性は、それぞれの基質に対応した L-,D-アミノ酸の生成量から標準活性測定法と同様の方法で求めた。L-システイン酸と L-システインスルフィン酸は対応する D-体の標品の入手が困難であったため、酵素反応による基質の減少量から活性を算出した。

1-2-10 *Tl-AspR* 活性に及ぼす SH 試薬および金属イオンの影響

1) SH 試薬の影響

ヨード酢酸、*N*-エチルマレイミド、ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)、*p*-クロロ水銀安息香酸をそれぞれ 1 mM になるように 50 mM KPB, pH 7.0 に溶解し各種 SH 試薬を調製した、調製したそれぞれの SH 試薬 4,980 μ L に対して 0.125 mg/mL の *Tl-AspR* を 20 μ L ずつ加えて混合し、4°C で 1 時間ヒートブロック (TAITEC; THERMO UNIT TAL1G) でインキュベートした。インキュベート後の酵素液は 1 mM 2-メルカプトエタノールを含む 50 mM KPB, pH 7.0 に対して透析(1 L \times 2 回)することで酵素液中に残存する SH 試薬を除去した。SH 試薬で処理した酵素液の残存活性は標準活性測定法で測定した。

2) 金属イオンの影響

Tl-AspR の活性に与える金属イオンの影響を調べるため、反応液中に終濃度が 1 mM になるように各種の 5 mM 金属イオン溶液(CaCl₂, MgSO₄, FeSO₄, MnSO₄, CuSO₄, NiSO₄, CoSO₄)および 5 mM EDTA をそれぞれ加え、標準活性測定法で活性を測定した。

1-2-11 *Tl-AspR* の部位特異的変異導入による触媒残基の同定

Tl-AspR の推定触媒残基である Cys83 および Cys194 のそれぞれ、あるいは両方をアラニン残基に置換した C83A、C194A、C83A/C194A の変異酵素をクイックチェンジ変異導入法(Fujii et al., 2016)によって作成した。

まず、pET11b-*Tl-aspr* をテンプレートとして、Table 1-2-1 に示した変異導

入プライマーの内、(C83A-f, C83A-r)あるいは(C194A-f, C194A-r)のプライマーの組み合わせで、KOD plus ver.2 polymerase を用いて PCR を行い、変異導入産物を増幅した。PCR は 25 μ L の反応系中に 1 \times buffer for KOD-plus-ver.2、0.2 mM dNTP、1.5 mM MgSO₄、15 pmol 各プライマー、KOD-plus-ver.2 (1 U) の濃度になるように各試薬を加えて、ポリメラーゼの活性化；94 $^{\circ}$ C、2 min、変性；98 $^{\circ}$ C、30 sec、アニーリング；55 $^{\circ}$ C、30 sec、伸長反応；68 $^{\circ}$ C、320 sec の条件で行った。反応後のサンプルに 10 U の DpnI を加えて 37 $^{\circ}$ C、1 h 処理することで、テンプレート DNA を除去した後、それぞれの変異を導入したコンストラクト (pET11b-*Tl-aspr* C83A, C194A) をエタノール沈殿させて精製し、それぞれのコンストラクトを用いて発現用宿主 *E. coli* Rosetta (DE3) を形質転換させた。pET11b-*Tl-aspr* C83A をテンプレートに用いて、C194A-f, C194A-r のプライマーの組み合わせで用いることで、上記と同様の操作を行い pET11b-*Tl-aspr* C83A/C194A のコンストラクトを得た。それぞれの変異酵素の形質転換体は前述の野生酵素の場合と同様の方法で、発現、精製した。

1-2-12 *Tl-AspR* の反応速度論的解析

異なる基質濃度の条件下で酵素活性を測定し、D-および L-アスパラギン酸それぞれの基質に対する、 K_m 、 V_{max} 、 k_{cat} をラインウィーバー・バークプロット (Lineweaver and Burk, 1934) から算出した。反応系中の基質濃度が D-アスパラギン酸、L-アスパラギン酸それぞれ 10、20、30、40、50 mM になるように基質を添加した条件で活性を測定した。

1-2-13 *Tl-AspR* のサブユニット分子質量と会合状態の推定

Tl-AspR のサブユニットの分子質量は前述の 13.5%T ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により決定した。*Tl-AspR* の会合状態については、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを用いて測定し、標準タンパク質を用いて作成した検量線から算出した。標準タンパク質としては、アポフェリチン (660 kDa)、 β -アミラーゼ (200 kDa)、アルコール脱水素酵素 (150 kDa)、アルブミン (66 kDa)、炭酸脱水酵素 (29 kDa)、を用いた。標準タンパク質溶液は各標準タンパク質の濃度が 1.0 mg/mL になるように 0.1 mL の 50 mM リ

ン酸ナトリウム緩衝液(NaPB), pH 7.0 に溶解して調製した。150 mM NaCl を含む 50 mM NaPB, pH 7.0 平衡化した Superdex 200 カラム($\phi 10 \times 300$ cm, GE-healthcare)に 300 μ L のサンプルをアプライし 0.5 mL/min の流速で同緩衝液を流すことで溶出した。先に標準タンパク質溶液を分析し、各標準タンパク質の移動度と分子質量の対数をプロットした検量線を作成し、0.5 mg/mL に調製した *Tl-AspR* の分析を同様の条件で行い、その移動度(K_{av})から分子質量を算出した。各標準タンパク質と *Tl-AspR* の移動度は次式(1-1)から算出した。

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0) \quad (1-1)$$

K_{av} : 移動度、 V_e : 各タンパク質のエリユーションボリューム (mL)、
 V_t : ベットボリューム(24 mL)、 V_0 : ボイドボリューム(8 mL)

1-2-14 *Tl-AspR* の系統樹解析

Tl-AspR ホモログの分布について明らかとするため、*AspR* としてデータバンクに登録されている 49 種の一次構造情報に基づきアライメントを作成し(Altschul SF et al., 1990)系統樹解析を行った。アスパラギン酸ラセマーゼの系統樹は MEGA4 プログラムの Clustal W マルチプルアライメント(Thompson et al., 2002)を用いて、近接結合法(Saitou and Nei 1987)によって作成した。

1-3 実験結果

1-3-1 *Thermococcus litoralis* DSM 5473 の細胞内アミノ酸含有量の分析

T. litoralis DSM 5473 の無細胞抽出液中のアミノ酸分析の結果を Table 1-3-1 にまとめた。*T. litoralis* DSM 5473 の細胞内の L-アミノ酸は、L-グルタミン酸が最も豊富に存在し、次いで L-アスパラギン酸が多く含まれていた。一方で D-アミノ酸は D-アスパラギン酸が最も多く存在し、他にも D-セリン、D-アラニン、D-バリンが存在していた。特に D-アスパラギン酸は DL 比 (D/(D+L)%) も高いことが明らかとなった。

Table 1-3-1 *T. litoralis* DSM 5473 の培養 23 h 後の細胞内アミノ酸含量

	Asp	Glu	Ser	Ala	Val
D-form (nmol/mg wet cell)	2.18±0.02	N.D.	0.28±0.16	0.61±0.03	0.16±0.08
L-form (nmol/mg wet cell)	2.11±0.33	12.8±0.61	N.D.	0.87±0.00	0.38±0.03
D/(D+L) %	50.8±8.50	-	-	41.2±1.36	30.0±13.3

n=2 N.D. : not detected

1-3-2 *Tl-AspR* の発現と精製

Tl-AspR の *E. coli* Rosetta (DE3) の可溶性画分への発現を SDS-PAGE を用いて確認したところ、約 60% のタンパク質が可溶性画分に発現していた。精製後の酵素の純度を SDS-PAGE で確認したところ、単一のバンドが確認された (Fig. 1-3-1)。精製過程のステップ表を Table 1-3-2 に示した。酵素精製は計 3 回行い、精製 *Tl-AspR* の比活性の平均は 1,900±350 U/mg であった。SDS-PAGE の移動度から算出した *Tl-AspR* のサブユニットの分子質量は 24 kDa で、Sephadex-200 10/300 GL カラムを用いたゲル濾過によって分析した

分子質量が 56 kDa であった(Fig. 1-3-2)ことから、本酵素はホモダイマーであることが明らかとなった。

Table 1-3-2 ステップ表

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)
Cell-free extract	273	422,000	1,550	100
Heat treatment	106	334,000	3,150	79.1
DEAE-Toyopearl	30.0	116,000	3,870	27.5
Butyl-Toyopearl	19.8	29,000	1,470	6.87
SuperQ-Toyopearl	18.3	29,100	1,590	6.89

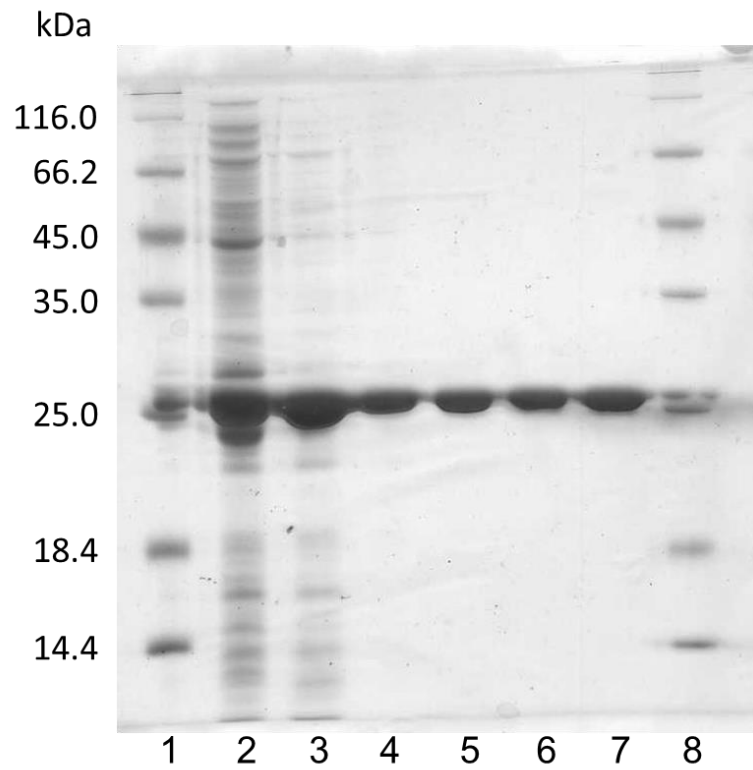


Fig. 1-3-1 各精製ステップにおける純度の確認

レーン 1,8 : 分子質量マーカー 4 μ L、

レーン 2 : 無細胞抽出液(可溶性画分) 5 μ g、

レーン 3 : 熱処理 5 μ g、レーン 4 : DEAE-Toyopearl 5 μ g、

レーン 5 : Butyl-Toyopearl 5 μ g、レーン 6,7 : SuperQ-Toyopearl 5 μ g

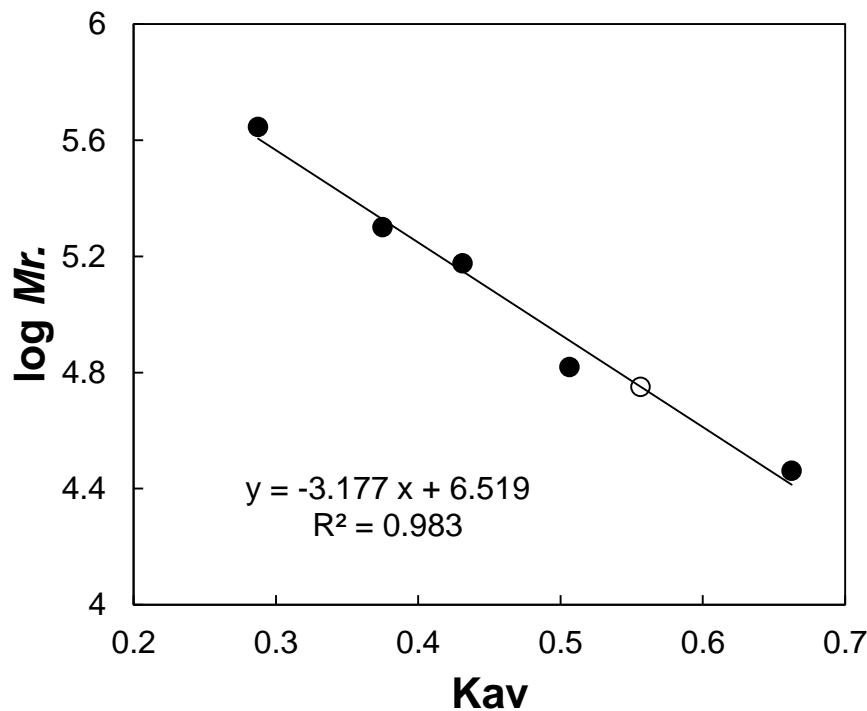


Fig. 1-3-2 *Tl*-AspR の会合状態の推定

- : 分子質量マーカー(29 kDa ; Carbonic anhydrase, 66 kDa ; Albumin, 150 kDa ; Alcohol dehydrogenase, 200 kDa ; β -Amylase, 443 kDa ; Apoferritin)
- : 精製 *Tl*-LASPO

1-3-3 *Tl*-AspR 活性に及ぼす温度の影響と熱安定性

Tl-AspR 活性は反応温度の上昇に伴い増加し、95°C で最大となり既報の *Picrophilus torridus* (60°C) (Aihara et al., 2016)、*B. bifidum* NBRC 14252 (45°C) (Yamashita et al., 2004)、*S. thermophilus* (37°C) (Okada et al., 1991)由来の AspR と比べると最も高い最適活性温度を示した (Fig. 1-3-3A)。アレニウスプロットから活性化エネルギーを算出したところ 51.8 kJ/mol であった (Fig. 1-3-3B)。0.5 mg/ml の精製酵素(1 mM 2-メルカプトエタノールを含む KPB pH 7.0 に溶解)は 90°C の 11 h の熱処理で約 50%の残存活性を示し、19 h の熱処理後も 25%の活性が残存していた(Fig. 1-3-4)。本酵素の熱安定性は既報の *S. thermophilus* の AspR の 50°C、1 h (Okada et al., 1991)、*B. bifidum* NBRC 14252 の AspR の 60°C、30 min (Yamashita et al., 2004)と比べると最も高い熱安定性を示すことが明らかとなった。

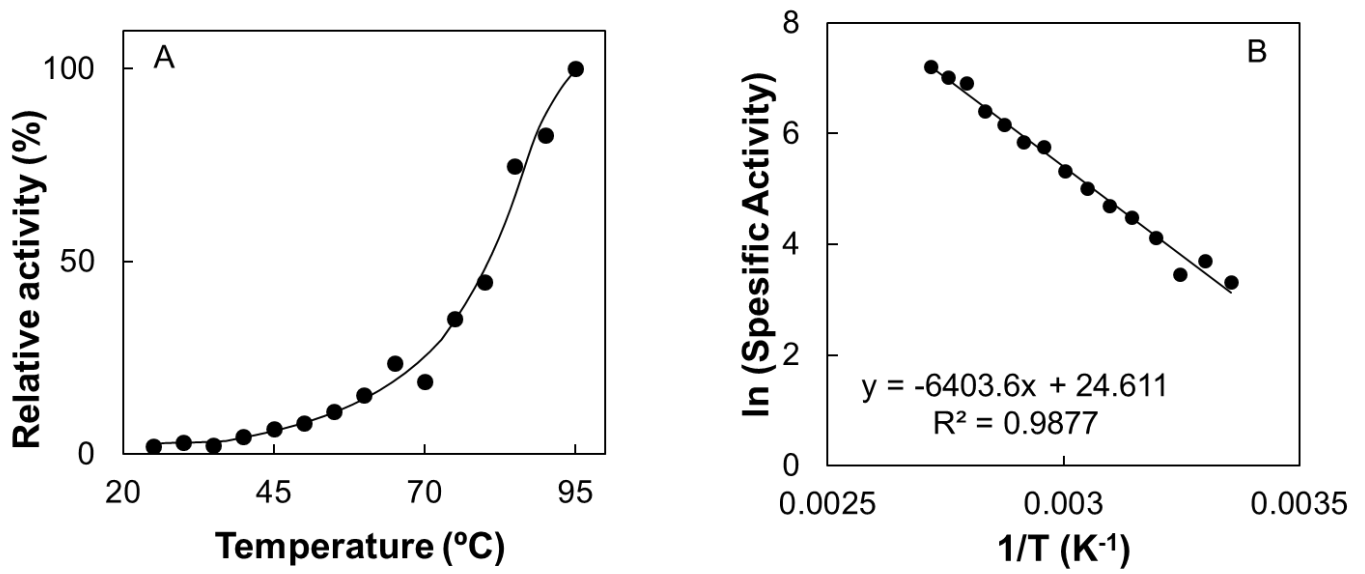


Fig. 1-3-3 TI-AspR の熱に対する影響
 A: 最適反応温度 B: アレニウスプロット

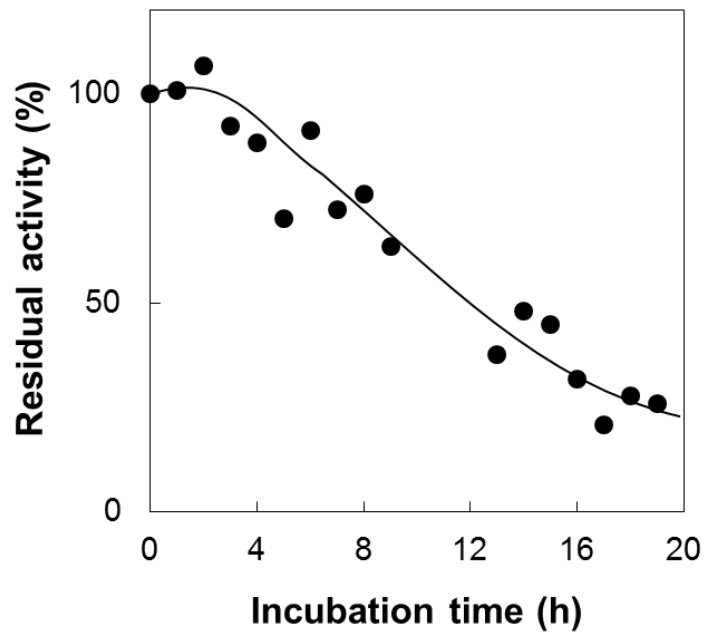


Fig. 1-3-4 TI-AspR の 90°C における熱安定性

1-3-4 *Tl*-AspR 活性に及ぼす pH の影響

Tl-AspR は 100 mM HEPES-NaOH, pH 7.5 を用いた時に最大活性を示した (Fig. 1-3-5A)。*Tl*-AspR は 0.5 M MES-NaOH を用いた pH 6.0 から 7.0 の間で最も安定であることが明らかとなった (Fig. 1-3-5B)。これらの pH に対する特性は、既報の AspR と同様の傾向を示した。*B. bifidum* NBRC 14252: 最適 pH 7.0-7.5、安定性 pH 5.5-7.5、*S. thermophilus*: 最適 pH 8.0、安定性 pH 6.0-7.0 (Yamashita et al., 2004; Okada et al., 1991)。

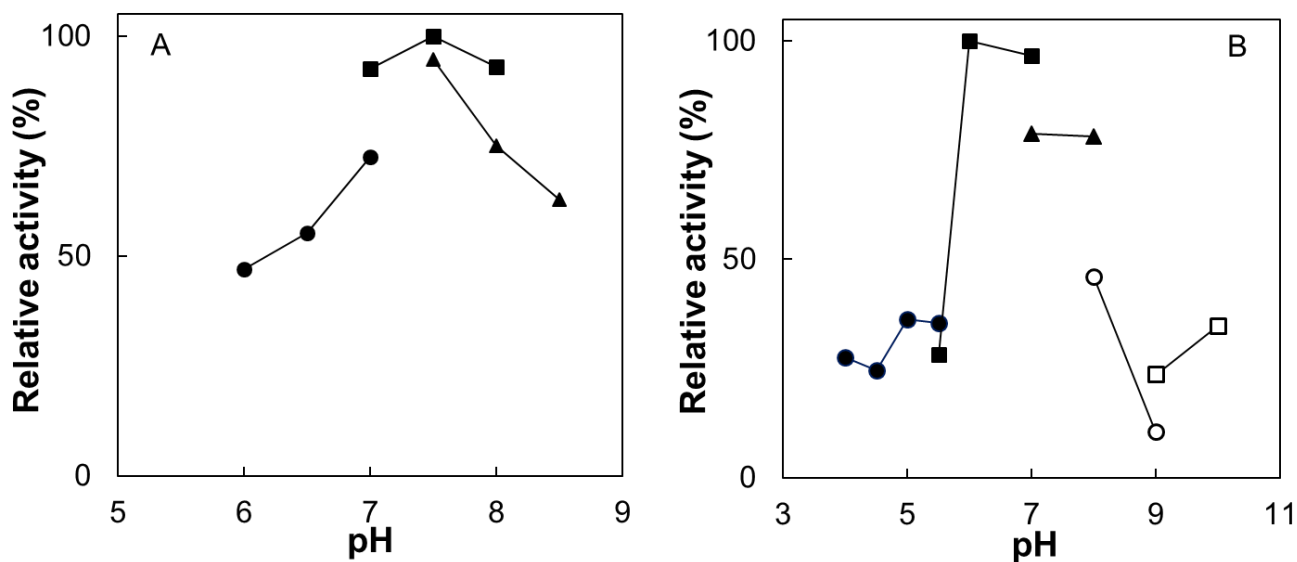


Fig. 1-3-5 *Tl*-AspR 活性に及ぼす pH の影響

A : 最適 pH (反応温度 : 50°C)

● : MES-NaOH, pH 6.0-7.0, ■ : HEPES-NaOH, pH 7.0-8.0,

▲ : Tricine-NaOH, pH 7.5-8.5

B : pH 安定性

● : 酢酸緩衝液, pH 4.5-5.5, ■ : MES-NaOH, pH 5.5-7.0,

▲ : HEPES-NaOH, pH 7.0-8.0, ○ : TAPS-NaOH, pH 8.0-9.0,

□ : CHES-NaOH, pH 9.0-10.0

1-3-5 *Tl*-AspR の基質特異性

Tl-AspR は L-システイン酸、L-システインスルフィン酸、L-および D-アスパラギン酸に対して活性を示し、その他に測定に用いたアミノ酸に対する活性は検出されなかった (Table 1-3-3)。

Table 1-3-3 *Tl*-AspR の基質特異性

Substrate	Relative activity (%)
D-Aspartic acid	100
L-Aspartic acid	56.4±1.9
L-Cysteinic acid	27.5±4.2
L-Cysteinesulfinic acid	12.3±3.0
D-Glutamic acid	0
D-Asparagine	0
D-Glutamine	0
D-Alanine	0
D-Leucine	0
D-Valine	0
D-Proline	0
D-Serine	0
D-Threonine	0
D-Arginine	0

n=2

1-3-6 *Tl*-AspR の触媒残基の決定

推定触媒残基である二つのシステイン残基(Cys83,Cys194)をアラニンに置換した変異型酵素 C83A-, C194A-, C83A/C194A-*Tl*-AspR を野生型酵素と同様に発現、精製し、SDS-PAGE 上で単一に精製されたことを確認した(Fig. 1-3-6)。いずれの変異酵素も標準活性測定法の条件下でアスパラギン酸ラセマーゼ活性を示さなかった。*Tl*-AspR の二つのシステイン残基の内、両方に変異を導入した C83A/C194A-*Tl*-AspR のみならず、片方のシステイン残基にのみ変異を導入した C83A-, C194A-*Tl*-AspR も AspR 活性が見られなくなったことから、Cys83 と Cys194 はそれぞれ *Tl*-AspR が活性を示すために必須な残基であることが明らかとなった。

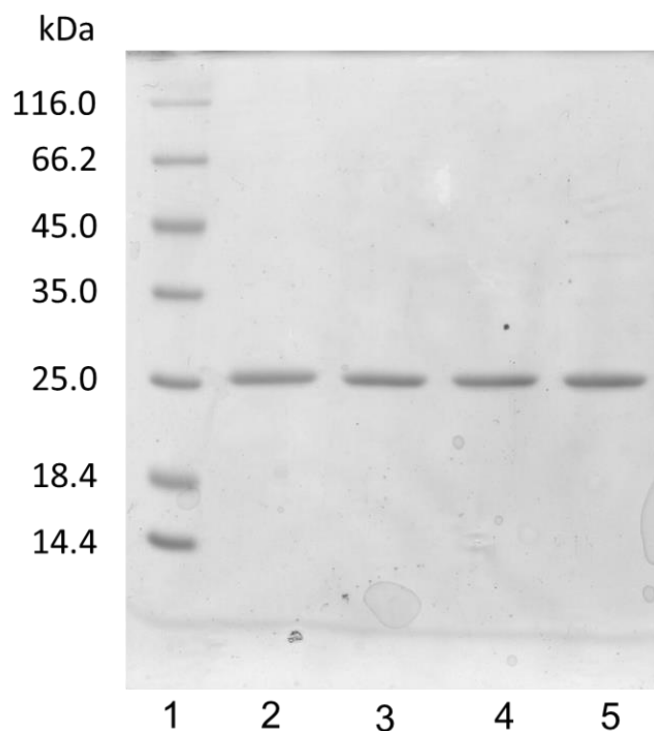


Fig. 1-3-6 野生型 *Tl*-AspR と各変異酵素の純度確認

レーン 1 : 分子質量マーカー (4 μ L)、レーン 2 : 野生型 *Tl*-AspR (2 μ g)、

レーン 3 : C83A-*Tl*-AspR (2 μ g)、レーン 4 : C194A-*Tl*-AspR (2 μ g)、

レーン 5 : C83A/C194A-*Tl*-AspR (2 μ g)

1-3-7 *Tl*-AspR の活性に及ぼす SH 試薬および金属イオンの影響

Tl-AspR は種々の SH 試薬によって活性を阻害された (Table 1-3-4)。一方で、いずれの金属イオンも酵素活性に大きく影響しなかった。また EDTA による酵素活性への影響もなかったことから、本酵素は金属イオンとの相互作用はしていないと考えられた。

Table 1-3-4 *Tl*-AspR の活性に及ぼす SH 基試薬と金属イオンの影響

Inhibitor	Relative activity (%)
None	100
<i>N</i> -Ethylmaleimide	38±4.5
5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)	65±5.2
<i>p</i> -Chloromercuribenzoic acid	64±3.0
Iodoacetic acid	0
EDTA	93±28
CaCl ₂	120±17
CuSO ₄	85±5.5
MnSO ₄	82±8.2
MgSO ₄	52±15
NiSO ₄	69±7.7
CoSO ₄	64±15
FeSO ₄	57±30

n=2

1-3-8 *Tl*-AspR の反応速度論的解析

Tl-AspR の L-および D-アスパラギン酸に対する K_m 、 V_{max} 、 k_{cat} 、 k_{cat}/K_m の各パラメーターはラインウィーバー・バークプロット(Fig. 1-3-7)から算出し Table 1-3-5 にまとめた。既報の *B. bifidum* NBRC 14252 や *S. thermophilus* 由来の AspR は L-アスパラギン酸に対する K_m が D-アスパラギン酸に対する K_m に比べて高い値を示すのに対し(Yamauchi et al., 2004; Okada et al., 1991)、*Tl*-AspR は D-アスパラギン酸に対する K_m が L-アスパラギン酸に対する K_m に比べ高い値を示した(D-Asp : 136 mM, L-Asp : 30.2 mM) (Table 1-3-5)。一方で *P. horikoshii* 由来の AspR は *Tl*-AspR と同様の傾向を示した。D-アスパラギン酸に対する k_{cat}/K_m と L-アスパラギン酸に対する k_{cat}/K_m の比として定義される K_{eq} の値が *Tl*-AspR において 1.15 と 1 に近い値を示したことから、本酵素がアスパラギン酸ラセマーゼとしての定義を満たしていることが明らかとなった。

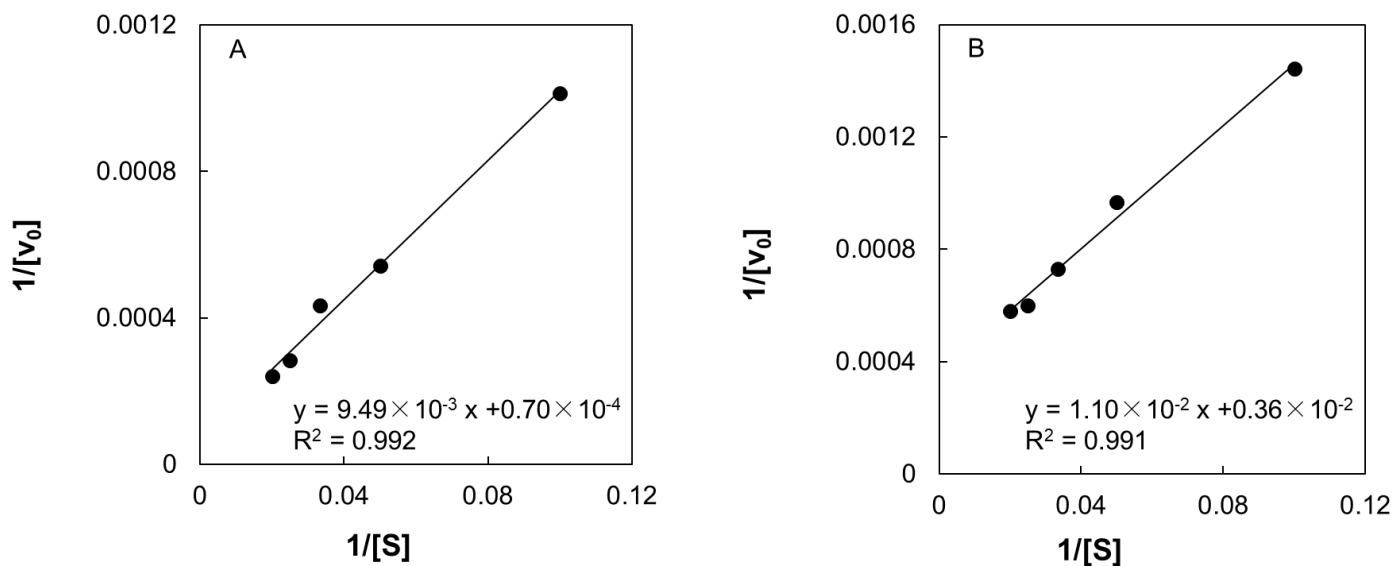


Fig. 1-3-7 Lineweaver-Burk plot

A : D-Asp 基質

B : L-Asp 基質

Table 1-3-5 反応速度論的パラメーター

Substrate	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$)	k_{cat} (sec^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{sec}^{-1}/\text{mM}$)	$K_{eq (D/L)}$
D-Asp	136 ± 48	$(1.41 \pm 0.50) \times 10^4$	$(6.10 \pm 2.15) \times 10^5$	$(4.51 \pm 2.26) \times 10^4$	1.15 ± 0.47
L-Asp	30.2 ± 3.1	$(0.28 \pm 0.02) \times 10^4$	$(1.18 \pm 0.73) \times 10^5$	$(3.92 \pm 0.47) \times 10^4$	

n=3

1-3-9 *Tl-AspR* の系統樹解析

Tl-AspR 系統樹解析の結果、*Tl-AspR* と高い配列類似性を示す *AspR* ホモログは主として *Thermococcaceae* 科のアーキアと一部のバクテリアに分布していた(Fig. 1-3-8)。*Desulfococcus* sp. SY を除くと、*Thermococcaceae* 科以外のアーキアには *Tl-AspR* と類似性を示す *AspR* ホモログが存在していなかった。

系統解析に用いた、*Tl-AspR* ホモログのアクセッション番号を以下に示した。(生物種 : Accession no.) *Atribacteria bacterium* JGI 0000014-F07 ; WP_090599668, *Bacillus onubensis* ; WP_099363952, *Bacillus panaciterrae* ; WP_028402222, *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. tengcongensis MB4 ; AAM24924, *Clostridioides difficile* ; WP_074429601, *Desulfurococcus* sp. SY ; BAA12209, *Mitsuokella jalaludinii* ; CUN68645, *Natronincola peptidivorans* ; SET27178, *Palaeococcus ferrophilus* ; WP_048148292, *Palaeococcus pacificus* ; WP_048165265, *Pyrococcus abyssi* GE5 ; CAB50281, *Pyrococcus furiosus* COM1 ; AFN03775, *Pyrococcus horikoshii* OT3 ; BAA29761, *Pyrococcus kulkarnii* ; AMM53874, *Pyrococcus* sp. NA2 ; AEC52198, *Pyrococcus* sp. ST04 ; AFK22666, *Pyrococcus yayanosii* CH1 ; AEH24360, *Thermococcales archaeon* 44_46 ; KUI98666, *Thermococcus barophilus* ; ALM74353, *Thermococcus celer* ; ASI98788, *Thermococcus celericrescens* ; KUH34700, *Thermococcus chitonophagus* ; ASJ16640, *Thermococcus cleftensis* ; AFL96228, *Thermococcus eurythermalis* ; AIU70513, *Thermococcus gammatolerans* EJ3 ; ACS33843, *Thermococcus gorgonarius* ; ASJ01064, *Thermococcus guaymasensis* DSM 11113 ; AJC72529, *Thermococcus kodakarensis* KOD1 ; BAD84693, *Thermococcus litoralis* DSM 5473 ; LC034559, *Thermococcus nautili* ; AHL22184, *Thermococcus onnurineus* NA1 ; ACJ16156, *Thermococcus pacificus* ; ASJ07222, *Thermococcus paralvinellae* ; AHF79793, *Thermococcus peptonophilus* ; AMQ17994, *Thermococcus piezophilus* ; ANF23362, *Thermococcus profundus* ; ASJ02930, *Thermococcus radiotolerans* ; ASJ14052, *Thermococcus sibiricus* MM 739 ; ACS89608, *Thermococcus siculi* ; ASJ09202, *Thermococcus* sp. 2319x1 ; ALV62187, *Thermococcus* sp. 4557 ; AEK72226,

Thermococcus sp. 5-4 ; ASA77493, *Thermococcus* sp. AM4 ; EEB73200,
Thermococcus sp. EP1 ; KPU62705, *Thermococcus* sp. EXT12c ; WP_099210848,
Thermococcus sp. P6 ; ASJ10697, *Thermococcus* sp. PK ; WP_042698886,
Thermococcus thio-reducens ; KQH83191, *Thermococcus zilligii* ; WP_010480338,

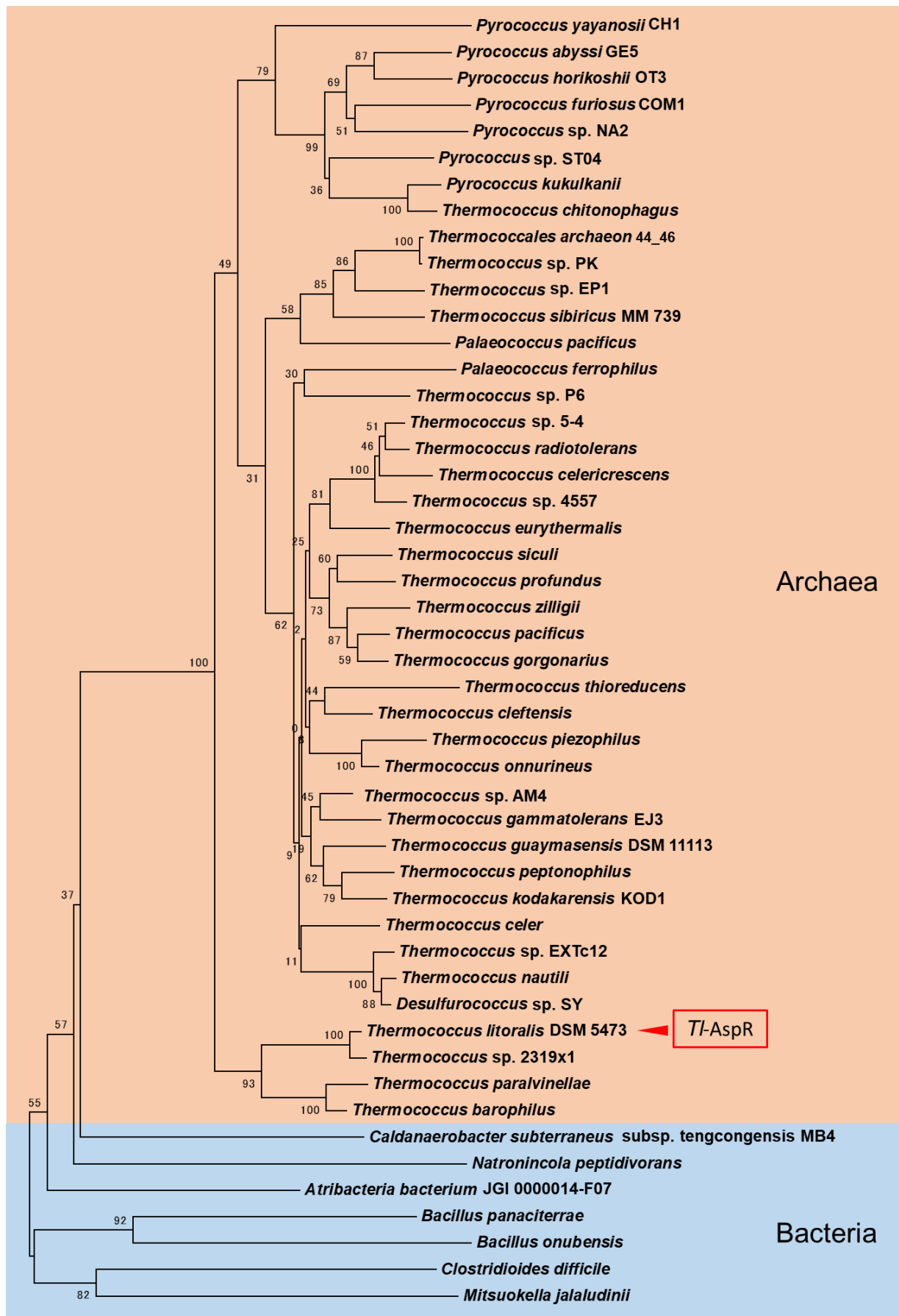


Fig. 1-3-8 TI-AspR の系統樹解析

1-4 考察

本研究において、*T. litoralis* DSM 5473 のアスパラギン酸ラセマーゼホモログ遺伝子の遺伝子産物(*Tl*-AspR)がアスパラギン酸ラセマーゼ活性を有していることを明らかにした。精製 *Tl*-AspR の機能解析の結果、本酵素は高い熱安定性を示し、既報の AspR の中では最も高い最適反応温度を示した。このような温度に対する特性は *T. litoralis* DSM 5473 の高い生育温度と関連していると考えられた。本酵素は精製過程において Toyopearl Butyl-650M カラムクロマトグラフィーの後に比活性が減少したことから、硫酸アンモニウム存在下での *Tl*-AspR と Toyopearl Butyl-650M の間の疎水的相互作用による失活がおこっているのではないかと考えられた。

AspR を含めた、グルタミン酸ラセマーゼ、プロリンラセマーゼといった PLP 非依存的なアミノ酸ラセマーゼには触媒残基として二つの Cys 残基が関与していることが報告されている(Ohtaki et al., 2008; Zhang et al., 2011)。これらの二つの Cys 残基は基質のアミノ酸の C α -H からの脱プロトン化と再プロトン化を触媒している(Fig. 1-4-1)。

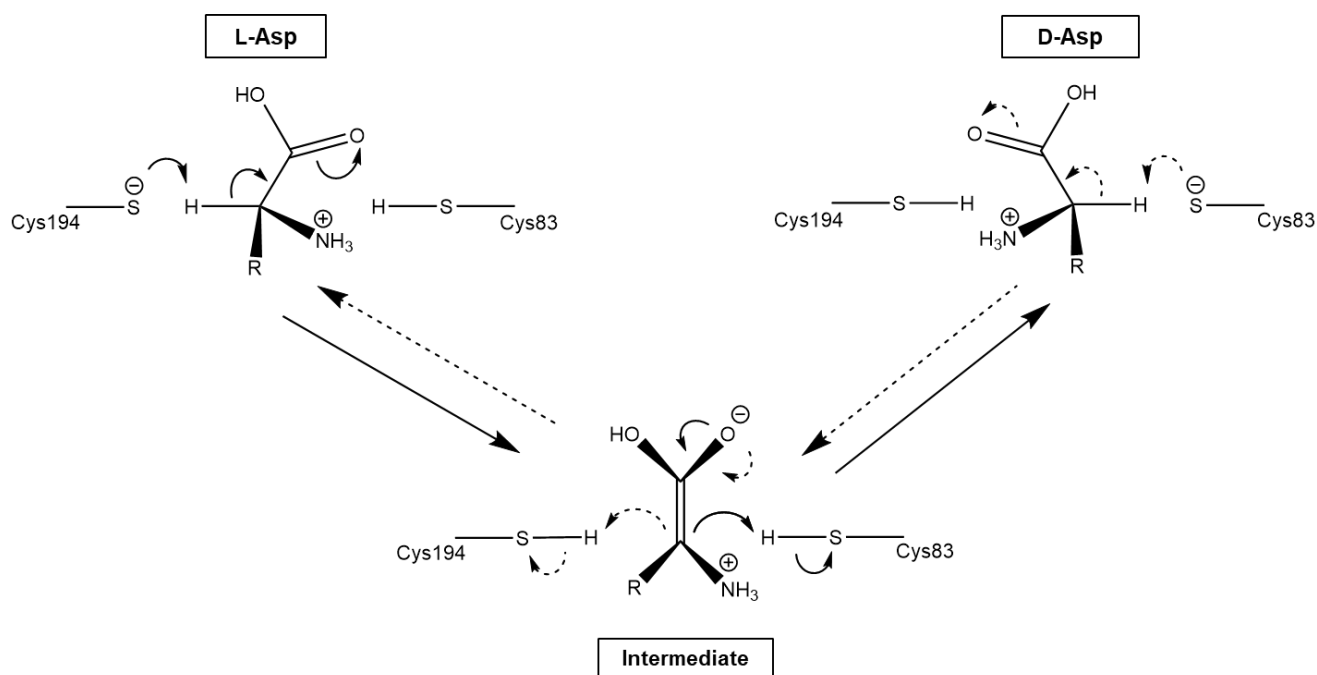


Fig. 1-4-1 *Tl*-AspR の推定反応機構 (R : アスパラギン酸側鎖)

Tl-AspR の一次構造中にはこれらの Cys 残基に対応する Cys83、Cys194 の二つの Cys 残基が存在している。この Cys83 と Cys194 をアラニンに置換した変異酵素(C83A, C194A, C83A/C194A)はいずれも AspR 活性を示さなかった。また *Tl-AspR* は種々の SH 試薬によって阻害されることや、*Tl-AspR* には PLP 依存型アミノ酸ラセマーゼに特有の Lys 残基の ϵ 位のアミノ基と PLP の間の結合によって形成されるシッフ塩基に起因する 420 nm 付近の吸収が見られなかったことから、*Tl-AspR* は PLP 非依存型のアスパラギン酸ラセマーゼであることが示され、Cys83 と Cys194 の二つのシステイン残基が酵素活性に必要な触媒残基であると考えられた。近縁の *Pyrococcus horikoshii* OT3 には 2 つの *aspr* ホモログ遺伝子(PH0670, PH1733)が存在し、これまでにこれらの遺伝子産物について X 線結晶構造解析が行われている(Liu et al., 2002, Kita et al., 2008)。しかしながらその酵素科学的な性質については未解明である。これらの遺伝子産物と *Tl-AspR* との間の一次構造の類似性はそれぞれ 68.0%、30.5%であった。この内、類似性の高い PH0670 の立体構造(PDB: 1JFL)をもとに MODELLER (Webb and Sali, 2014)を用いて *Tl-AspR* の推定三次構造モデルを構築した(Fig. 1-4-2)。*Tl-AspR* のモデル構造から、*Tl-AspR* の Cys83 と Cys194 が活性中心の触媒残基として配置されていることが推定された。

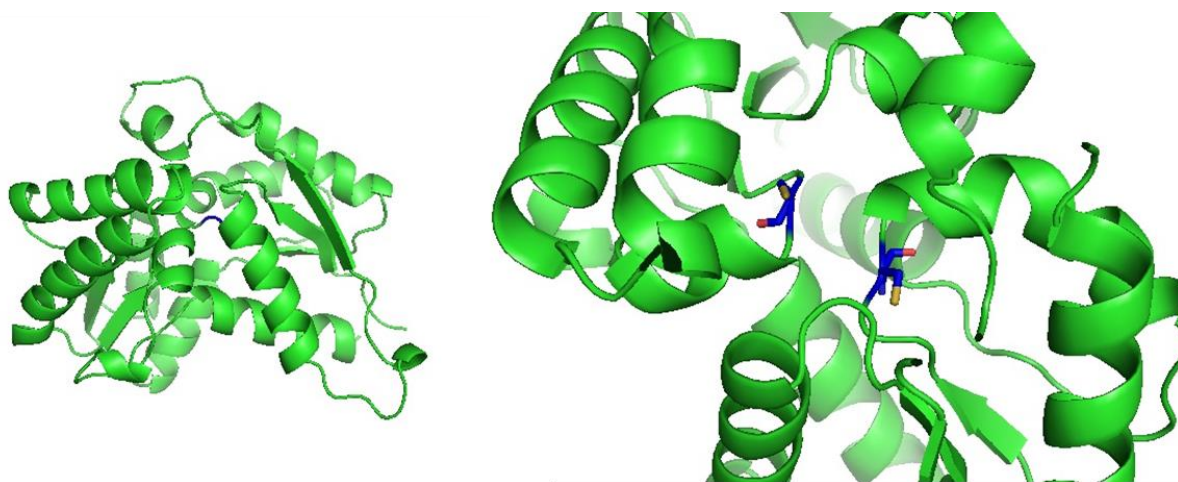


Fig. 1-4-2 *Tl-AspR* の推定三次構造モデル

左：*Tl-AspR* の推定三次構造(全体)

右：*Tl-AspR* の推定三次構造(青色表示：Cys83,Cys194)

また、*Pyrococcus horikoshii* OT3 の二つの *aspr* ホモログ遺伝子の内、PH1733 の一次構造中には、Cys 残基が一つしか存在していないことから、両ホモログ遺伝子のうち PH0670 にしかアスパラギン酸ラセマーゼ活性が見られないと考えられる。

T. litoralis DSM 5473 の細胞内のアミノ酸分析の結果、いくつかの D-アミノ酸が細胞内に存在していることが明らかとなった。興味深いことに *T. litoralis* DSM 5473 の細胞内には高濃度の D-アスパラギン酸が存在していることが明らかとなった。同様に *Desulflococcus* sp. SY、*Pyrococcus* sp. O-II、*Thermococcus* sp. KS-1 といった他の超高温アーキアの細胞内にも D-アスパラギン酸が存在することが明らかとなっているが、バクテリアにおいてはこのような報告はない。また、*Tl-AspR* の系統樹解析の結果から、*Tl-AspR* ホモログがアーキアにおいて主に *Desulflococcus* 属、*Pyrococcus* 属、*Thermococcus* 属に分布していることが明らかとなった。

Tl-AspR の D-Asp に対する K_m の値が L-Asp に対する K_m の 5 倍も高いことや、*T. litoralis* DSM 5473 細胞内に D-Asp が高濃度で存在していたことを合わせて考えると、*Tl-AspR* は *T. litoralis* DSM 5473 の生体内において、L-アスパラギン酸から D-アスパラギン酸を生合成するのに中心的な役割を担う酵素であると考えられる。また、*T. litoralis* DSM 5473 の細胞内には D-アスパラギン酸以外にも D-アラニンや D-セリン、D-バリンといった D-アミノ酸が存在していることが明らかとなった。しかしながら、*Tl-AspR* はアスパラギン酸、システイン酸、システインスルフィン酸にのみ作用し、これらの D-アミノ酸を基質としなかった。以上のことから、*Tl-AspR* はこれらの D-アミノ酸の生合成には寄与していないと考えられ、*T. litoralis* DSM 5473 には *Tl-AspR* の他にも、これらの D-アミノ酸の生合成に関わるアミノ酸ラセマーゼや D-アミノ酸アミノ基転移酵素のような酵素が存在すると考えられる。

第二章

Thermococcus litoralis DSM 5473 由来の L-アスパラギン酸オキシダーゼの酵素科学的性質の解明

要約

本研究では *Thermococcus litoralis* DSM 5473 の L-アスパラギン酸オキシダーゼ(LASPO)のホモログ遺伝子(*Tl-laspo*) (accession no. : OCC_06611)を PCR で増幅し、pET21b ベクターにクローニング後、発現用宿主 *Escherichia coli* BL21 (DE3)に導入することで発現系を構築した。発現培養の結果、*Tl-laspo* を *E. coli* BL21 (DE3)の可溶性画分に発現させることに成功した。その遺伝子産物(*Tl-LASPO*)は *in vitro* の FAD 存在下で L-アスパラギン酸オキシダーゼ活性を示し、本研究によって *Thermococcus* 属で初めてその詳細な性質について明らかとした。

Tl-LASPO と既報の *Pyrococcus horikoshii* OT3 の L-アスパラギン酸オキシダーゼの一次構造の類似性は約 65%であった。*Tl-LASPO* は 52 kDa のサブユニット分子質量をもつホモトリマーであった。本酵素は、75°C までの温度範囲で反応温度の上昇に伴い活性が上昇した。本酵素は、pH 4.5~10.5 の間で活性を示し pH 8.0 で最大活性を示した。本酵素は 80°C、1 時間の熱処理においても失活が見られなかった。反応速度論的な解析の結果、本酵素は 70°C において最も高い k_{cat}/K_m を示した。本酵素は L-アスパラギン酸に対し高い基質性を示し、それ以外の標準アミノ酸に対しては反応しなかった。嫌気条件下において本酵素は FAD に加えて、フマル酸、2,6-ジクロロインドフェノール(DCIP)、フェリシアン化カリウムを補因子とした。*Tl-LASPO* のホロ酵素の吸収スペクトルを測定したところ、補酵素 FAD に起因する、380 nm と 450 nm に極大吸収が見られた。FAD-*Tl-LASPO* 複合体における FAD の解離定数(K_d)を算出したところ、 5.9×10^{-9} M であった。

2-1 緒言

一般に超好熱アーキア由来の酵素は高い安定性と幅広い温度での活性を示すことから、幅広い分野において産業利用されている。

アミノ酸オキシダーゼは FAD を補酵素としてアミノ酸を酸化的に分解し 2-オキソ酸とアンモニアと過酸化水素を生じる反応を触媒する酵素で、幅広い生物種のアミノ酸代謝において重要な酵素である。加えて、アミノ酸オキシダーゼの触媒するアミノ酸の酸化還元反応はバイオセンサーや酵素定量法などに利用可能であることから、応用面での有用性も期待される。これまでに、基質特異性の違いに基づき、いくつかの種類のアミノ酸オキシダーゼについて報告されている。

D-アミノ酸オキシダーゼ(DAO、EC 1.2.3.3)は D-アミノ酸に作用しこれまでに *Rhodotorula gracilis* (Pilone et al., 1989), *Arthrobacter protophormia* (Geueke et al., 2007), *Rubrobacter xylanophilus* (Takahashi et al., 2014)をはじめとした様々な生物種の酵素について報告されている。D-アスパラギン酸オキシダーゼ(DDO, EC 1.4.3.1)は D-アスパラギン酸に特異的に作用し、ヒト、ウシ、タコ由来の酵素について報告されており、細胞内の D-アスパラギン酸濃度を調節する機能が明らかとなっている(Schell et al., 1997)。L-アミノ酸オキシダーゼ(LAAO, EC 1.4.3.2)は L-アラニン、L-アルギニン、L-リジン、L-ヒスチジン、L-ロイシンなど幅広い L-アミノ酸に対して作用する酵素として、*Crotalus adamanteus* (Wellner and Meister, 1960), *Rhizoctonia solani* (Hahn et al., 2017), *Pseudomonas* sp. AIU 813 (Isobe et al., 2012) 由来の酵素が報告されている。LAAO は蛇毒由来の酵素が最もよく研究されており (Mot et al., 2017, Stabeli et al., 2004; Braga et al., 2008; Vargas et al., 2013)、キングコブラ由来の LAAO は抗菌活性を示すことが明らかとなっている。L-グルタミン酸に作用する L-グルタミン酸オキシダーゼ(LGOX、EC 1.4.3.11)は、特に *Streptomyces endus* や *Streptomyces violascens* をはじめとした *Streptomyces* 属から単離されている(Bohmer et al., 1989)。LGOX は *Streptomyces* 属のグルタミン酸代謝に関わる主要な酵素であると考えられる。

本研究で対象とする L-アスパラギン酸オキシダーゼ(LASPO, EC 1.4.3.16) は主に L-アスパラギン酸に対して作用し、これまでに *Arabidopsis thaliana* (Kato et al., 2006)、*Escherichia coli* (Flachmann et al., 1988)、*Sulfolobus tokodaii* (Bifulco et al., 2013)などから報告されている。LASPO の生理的な機能としては、NAD⁺の生合成経路の最初の反応を触媒することが報告されている。し

かしながら、LASPO については他の DDO、DAO、LAAO、LGOX に比べると報告例が少ないのが現状である。

T. litoralis DSM 5473 ゲノム中には L-アスパラギン酸代謝に関わる酵素のホモログとして第一章で報告したアスパラギン酸ラセマーゼの他に L-アスパラギン酸オキシダーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、L-アスパラギナーゼ、アスパラギン合成酵素、アデノシルコハク酸合成酵素のホモログ遺伝子が保存されているが、*Thermococcus* 属におけるこれらの酵素の機能については、これまでに報告されていない。中でも、L-アスパラギン酸オキシダーゼのホモログ遺伝子(OCC_06611 : *Tl-laspo*)の遺伝子産物(*Tl-LASPO*)は、L-アスパラギン酸からオキサロ酢酸を生じる、L-アスパラギン酸代謝経路の主要な酵素の一つであると予想され、加えて耐熱性 LASPO として L-アスパラギン酸定量への有用性が期待される。そこで、本研究では *Tl-laspo* をクローニングし、大腸菌を用いた発現系を構築し、その遺伝子産物の詳細な酵素科学的な性質について明らかにすることを目的としている。

2-2 実験材料および方法

2-2-1 実験材料と使用菌株

特に記載しない限り、前章と同様の試薬会社から適当な純度の試薬を購入し実験に用いた。本実験で使用した宿主大腸菌の遺伝子型について Table 2-2-1 に示した。

Table 2-2-1 本研究で用いた大腸菌宿主の遺伝子型

Strain	Genotype
<i>Escherichia coli</i> NovaBlue	<i>endA1 hsdR17</i> ($r_{k12}^- m_{k12}^+$) <i>supE44 thi-1 recA1 gryA96</i> <i>relA1 lac F'</i> [<i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Δ M15:: <i>Tn10</i>] (<i>Tet</i> ^R)
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	<i>F</i> ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> ($r_B^- m_B^-$) <i>gal</i> (λ cl 857 <i>ind1 Sam7</i> <i>nin5 lacUV5-T7gene1</i>) <i>dcm</i> (DE3)

2-2-2 L-アスパラギン酸オキシダーゼホモログ遺伝子(*Tl-laspo*)のクローニングおよび発現系の構築

T. litoralis DSM 5473 の培養とゲノム DNA の抽出は前章に記載の方法で行った。PCR による LASPO のホモログ遺伝子(*Tl-laspo*)の増幅は、以下に示すプライマーペアを用いた(*Tl-laspo* N: TGTTCGGGTAGACATATGACA, *Tl-laspo* C: CTCGAGTAACATACACCTCCC)。PCR は 25 μ L の反応系中に 1 \times buffer for KOD-plus-ver.2、0.2 mM dNTP、1.5 mM MgSO₄、15 pmol 各プライマー、KOD-plus-ver.2 (1 U)の濃度になるように各試薬を加えて、ポリメラーゼの活性化；94 $^{\circ}$ C、2 min、変性；98 $^{\circ}$ C、30 sec、アニーリング；55 $^{\circ}$ C、30 sec、伸長反応；68 $^{\circ}$ C、90 sec の条件で行った。PCR 以降の実験操作は、前章と同様に行い、発現用コンストラクト pET21b-*Tl-laspo* を構築し、発現用宿主 *E. coli* BL21(DE3)を形質転換した。

2-2-3 発現タンパク質(*Tl-LASPO*)の精製

pET21b-*Tl-laspo* を導入した発現用宿主 *E. coli* BL21(DE3)の形質転換体を 500 mL 容坂口フラスコに調製した 250 mL の LB-amp 培地で 37°C、16 時間発現培養させた。培養液後の培地を 14,500×g, 15 min 遠心分離し菌体を回収した。培養液 1 L 分の菌体に 20 mM のイミダゾールと 300 mM の NaCl を含む 50 mM KPB, pH 7.0 (以下、緩衝液 A とする)を 30 mL 加えて再懸濁した。菌体懸濁液を 50 mL 容コニカルチューブに移し氷水中で超音波破碎機 (UD-201、トミー精工)を用いて超音波破碎した(output,6; duty cycle, 30%)。破碎後の液を遠沈管に移し 14,500×g, 4°C, 20 min 遠心分離した。上清を 500 mL 容三角フラスコに移し 80°C の温水中で穏やかに振盪した。15 min の熱処理後の液を遠沈管に移し、同様の条件で遠心分離し沈殿を除去し、上清を粗酵素液とした。得られた粗酵素液を緩衝液 A で平衡化した Ni-NTA アガロースカラム(φ 1.5×2.8 cm)にアプライした。50 mM のイミダゾール、300 mM NaCl を含む KPB, pH 7.0 をカラムに流し未吸着タンパク質を洗い流した後、15 mL の 250 mM イミダゾール、300 mM NaCl を含む 50 mM KPB, pH 7.0 を流し吸着タンパク質を溶出した。精製酵素は 50 mM KPB, pH 7.0 に対して透析(1 L×3 回)した後-80°C で保存した。

2-2-4 標準活性測定法

LASPO の活性測定は 70°C で行い、3 mL の反応液中に 50 mM KPB, pH 7.0、50 μM FAD、2 mM フェノール、0.4 mM 4-アミノアンチピリン(4-AA)、30 mM L-アスパラギン酸、9.6 U 西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ(HRP;和光純薬)、酵素溶液が含まれるように反応系を調製した。反応は酵素溶液を添加することで開始し、過酸化水素とフェノール、4-AA が HRP によって反応することで生じるキノンイミン色素の 500 nm における吸光度変化を分光光度計(日本分光)で測定した。事前に 70°C における HRP の安定性について検討し、70°C、30 分以内の熱処理では、HRP 活性への影響がないことを確認した。1 U の活性は 70°C で一分間に 1 μmol のキノンイミン色素を生成する酵素量とした。各 pH の緩衝液中でのキノンイミン色素のモル吸光係数(ϵ_{500} ; $M^{-1}cm^{-1}$)として H₂O₂ 標準液を用いて算出した値を Table 2-2-2 にまとめた。

Table 2-2-2 各 pH におけるキノニン色素のモル吸光係数

Buffer	pH	ϵ_{500} ($M^{-1}cm^{-1}$)
Bis-Tris	6.0	7,420
	6.5	7,440
KPB	6.5	7,520
	7.0	7,600
	7.5	7,260
	8.0	7,340
Tricine-NaOH	8.0	7,300
	8.5	8,000
	9.0	8,580

2-2-5 *Tl*-LASPO 活性に及ぼす温度と pH の影響

前述の標準活性測定法の反応温度および、緩衝液の pH をそれぞれ変えることで、*Tl*-LASPO 活性の温度と pH による影響を調べた。反応温度は 30、35、40、45、50、55、60、65、70°C で行った。pH の影響について調べるために、酢酸緩衝液(pH 4.5, 5.0, 5.5)、Bis-Tris (pH 5.5, 6.0, 6.5)、KPB (pH 6.5, 7.0, 7.5, 8.0)、Tricine-NaOH (pH 8.0, 8.5, 9.0)、ホウ酸緩衝液(pH 8.0, 8.5, 9.0)、グリシン緩衝液(pH 9.0, 10.0, 10.5)を使用した。

2-2-6 pH および熱に対する安定性

Tl-LASPO の pH 処理、熱処理後の残存活性を標準活性測定法で測定することで *Tl*-LASPO の安定性を調べた。pH 処理は、20 mM KPB (pH 7.0)に溶解した 0.6 mg/mL *Tl*-LASPO 100 μ L に対して、等量の 250 mM の各 pH 緩衝液を加えて 4°C で 72 h 静置して行った。各 pH の緩衝液には酢酸緩衝液(pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5)、Bis-Tris 緩衝液(pH 5.5, 6.0, 6.5)、KPB (pH 6.5, 7.0, 7.5, 8.0)、Tricine-NaOH (pH 8.0, 8.5, 9.0)、Glycine-NaOH (pH 9.0, 9.5, 10.5)を用いた。熱処理は、20 mM KPB (pH 7.0)に溶解した *Tl*-LASPO を 90°C、85°C、80°C、70°C のそれぞれの温度で 0、10、20、30、40、50、60 min 行い残存活性を測定した。

2-2-7 *Tl*-LASPO の基質特異性

本酵素の基質特異性について検討するため、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-システイン、L-システイン酸、L-システインスルフィン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、グリシン、D-アスパラギン、D-アスパラギン酸、L-グルタミン酸をL-アスパラギン酸の代わりに基質に用いて反応を行い活性を測定した。L-チロシンを除く各種アミノ酸は、スタンダードアッセイの反応系のL-アスパラギン酸の代わりに、終濃度が 30 mM になるように添加しその他の条件は標準活性測定法で活性を測定した(L-チロシンの終濃度：5 mM)。

2-2-8 *Tl*-LASPO の電子受容体の特異性

本酵素の電子受容体の特異性はフマル酸、DCIP、フェリシアン酸を電子受容体として用いることで確認した。酵素活性は 99.9%の純アルゴンガスを用いて嫌気雰囲気化した嫌気グローブボックス(As one) 内で嫌氣的に 70°C の条件下で反応を行い測定した。反応系(0.3 mL)の組成として、50 mM KPB, pH 7.0、50 μ M FAD、30 mM L-アスパラギン酸、*Tl*-LASPO (28 μ g)となるように試薬を混合し、そこに各電子受容体を加えることで反応を開始した。フマル酸、DCIP、フェリシアン化カリウムをそれぞれ電子受容体とした場合の反応条件および活性測定法を以下の a)、b)、c)に示した。

a) フマル酸を電子受容体としたアッセイは、反応系中のフマル酸濃度が 30 mM になるように添加し、0、4、6、8 min 反応させた後、50 μ L の 60%(w/w) 過塩素酸を反応系に添加することで反応を停止させた。活性は生成物であるアンモニアとネスラー試薬の反応によって生じる 412 nm の吸光度変化から測定した。アンモニア標準液として、0、1.5、3.0、4.5、6.0 mM の(NH₄)₂SO₄を用いて検量線を作成した。

b) DCIP を電子受容体とした酵素活性の測定は反応系中の DCIP 濃度が 42 μM になるように添加し、0、4、6、8 min 反応させた後、50 μL の 10%(w/v) SDS を反応系に添加することで反応を停止させた。酵素活性は DCIP の還元に伴う 600 nm の吸光度の減少から、モル吸光係数 $\epsilon_{600} = 17,970 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて算出した。

c) フェリシアン化カリウムを電子受容体としたアッセイは反応液中のフェリシアン化カリウム濃度が 1 mM になるように加えて 0、4、6、8 min 反応させた後、50 μL の 10% (w/v) SDS を反応系に添加することで反応を停止させた。酵素活性はフェリシアン化カリウムの還元に伴う 420 nm の吸光度の減少から、モル吸光係数 $\epsilon_{420} = 790 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて算出した。

2-2-9 *TI-LASPO* の反応速度論的解析

反応速度論的解析は、37°C、50°C、60°C、70°C の反応温度で、5、10、15、30、60 mM の基質濃度で *TI-LASPO* 活性を測定し行った。各反応温度における反応速度論的パラメーター(K_m , V_{max} , k_{cat})は、活性測定の結果を基にラインウィーバー・バークプロットから算出した。(Lineweaver and Burk, 1934)

2-2-10 *TI-LASPO* のサブユニット分子質量と会合状態の推定

TI-LASPO のサブユニットの分子質量は SDS-PAGE により決定した。分離ゲルには 12%T および 10%T アクリルアミドゲルを使用した。50 μL の精製酵素と等量の 2×サンプル緩衝液(125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% (w/v) SDS, 10% (w/v)スクロース, 0.01% ブロモフェノールブルー)を混合し 100°C、5 min 処理したものをサンプルとして用いた。

TI-LASPO の会合状態については、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを用いて測定し、標準タンパク質を用いて作成した検量線から算出した。標準タンパク質としては、アポフェリチン(660 kDa)、 β -アミラーゼ(200 kDa)、アルブミン(66 kDa)、炭酸脱水酵素(29 kDa)、チトクローム C (12.4 kDa)を用いた。標準タンパク質溶液は各標準タンパク質の濃度が 1.0 mg/mL になる

ように 0.1 mL の 50 mM KPB, pH 7.0 に溶解して調製した。300 mM NaCl を含む 50 mM KPB, pH 7.0 平衡化した Superdex 200 カラム($\phi 10 \times 300$ cm, GE-healthcare)に 100 μ L のサンプルをアプライし 0.5 mL/min の流速で同緩衝液を流すことで溶出した。先に標準タンパク質溶液を分析し、各標準タンパク質の移動度と分子質量の対数をプロットした検量線を作成し、2.0 mg/mL に濃縮した *TI-LASPO* の分析を同様の条件で行い、その移動度から分子質量を算出した。移動度の計算には第一章の式(1-1)を用いた。

2-2-11 *TI-LASPO* のホロ酵素およびアポ酵素の吸収スペクトル解析

アポ酵素は約 10 mg の *TI-LASPO* のホロ酵素を 3 M KBr と 0.05% 活性炭素を含む 50 mM KPB (pH 7.0), 500 mL に対して 4°C, 72 h 透析することで調製した。このとき透析外液は 24 h ごとに交換した。透析後の酵素液は 50 mM KPB (pH 7.0) で平衡化した PD-10 カラム(GE-healthcare)を用いて脱塩し、吸収スペクトルの測定に使用した。ホロ酵素とアポ酵素それぞれの酵素液は 50 mM KPB (pH 7.0) を用いて 1.4 mg/mL のタンパク質濃度になるように調製し、日本分光の分光光度計(JASCO V-550)を用いて吸収スペクトルを測定した。

2-2-12 *TI-LASPO* の FAD の解離定数の決定

TI-LASPO の FAD の解離定数(K_d)は、FAD とアポ酵素の結合によって生じる FAD の蛍光消光を測定し算出した。FAD 由来の蛍光は日立 F-2500 蛍光光度計(日立ハイテクノロジー)を用いて 25°C で 10 \times 10 \times 45 mm のセルを使用した、励起波長 450 nm (スリット幅: 10 nm)、蛍光波長 522.5 nm (スリット幅: 20 nm)の条件で測定した。測定に用いるサンプルは酵素濃度が 7.0 μ M になるように 50 mM KPB, pH 7.0 を用いてアポ酵素を希釈し、そこへ 0-24.5 μ M になるように 50 μ M FAD のストック水溶液を添加することで調製した。 K_d の値は、Arroyo らの方法に基づいて、以下に示す式(2-1)から算出した(Arroyo et al., 2007)。

$$1/(1 - a) = 1/K_d ([L_0]/a - [E_0]). \quad (2-1)$$

a : FAD 結合部位の飽和度、 K_d : 解離定数、 $[L_0]$: 総 FAD 濃度、 $[E_0]$: 総酵素濃度

2-2-13 *Tl*-LASPO の保存中に生じる未知タンパク質の MALDI-TOF-MS 解析

SDS-PAGE によって分離したポリアクリルアミドゲル上のタンパク質のバンドを約 1 mm×1 mm の小片として切り出し、1.5 mL 容マイクロチューブに回収した。回収したゲル片を In-Gel Digestion kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて処理することで、ゲル片からのタンパク質の回収、トリプシン消化を行った。トリプシン消化後のサンプルは Zip Tip C18 (Millipore) を用いて脱塩し、0.5 μ L の脱塩したサンプルと等量のマトリクス溶液と混合し MALDI ターゲットプレートにアプライした。マトリクス溶液は 1.0 mg/mL になるように 2,5-ジヒドロキシ安息香酸を 40% (v/v) アセトニトリル、0.06% (v/v) トリフルオロ酢酸を含む超純水で溶解することで調製した。プレート上の分析サンプルが乾いたら AXIMA-CFR-plus MALDI-TOF-MS (島津製作所) を用いて、リフレクションポジティブイオンモードで質量分析した。質量分析の結果得られたデータを MASCOT (Matrix science) で解析し、トリプシン消化によって生じたペプチド断片とデータベース上のタンパク質のペプチド断片を比較することでタンパク質サンプルの同定をした。

2-2-14 *Tl*-LASPO の保存中の遊離チオール基濃度変化のジチオビス(2-ニトロ安息香酸)を用いた定量

2 mL の 50 mM KPB, pH 7.0 に溶解した精製 *Tl*-LASPO を、各 pH の緩衝液 (50 mM Bis-Tris, pH 6.0, 50 mM KPB, pH 7.0, 8.0, Gly-NaOH, pH 9.0) で平衡化した PD-10 カラム (GE healthcare) を用いて置換し、緩衝液交換後の各 pH の酵素液を 4°C で保存した。168 h 後の酵素液の遊離のチオール基をジチオビス(2-ニトロ安息香酸) (DTNB) を用いて定量した (Patsoukis and Georgiou,

2004)。1.5 mL 容マイクロチューブに 30 μL の各 pH の酵素液サンプルと 60 μL の 500 mM NaPB (pH 8.0)、60 μL の 25 mM EDTA、24 μL の 10 mM DTNB を混合し、25°C、40 min 反応させた後、反応液の 412 nm における吸光度を測定した。チオール基の標準物質として還元型グルタチオンを 0、5、10、20、40 μM を調製し、同様の測定を行い、検量線を作成した。

2-2-15 *TI-LASPO* ホモログ遺伝子の系統樹解析

TI-LASPO ホモログの分布について明らかとするために、BLAST プログラムを用いて LASPO としてデータベースに登録されている 71 種の一次構造情報に基づき第一章の系統樹解析と同様の方法を用いてアライメントを作成、系統樹解析を行った。

2-3 結果

2-3-1 *Tl-laspo* 遺伝子のクローニングと系統樹解析

T. litoralis DSM 5473 のゲノムをテンプレートに *Tl-laspo* 遺伝子増幅用に設計した *Tl-laspo* N、*Tl-laspo* C プライマーを用いて PCR を行い、アガロース電気泳動で確認したところ、目的の 1,398 bp 付近に増幅産物のバンドが確認された(Fig. 2-3-1)。

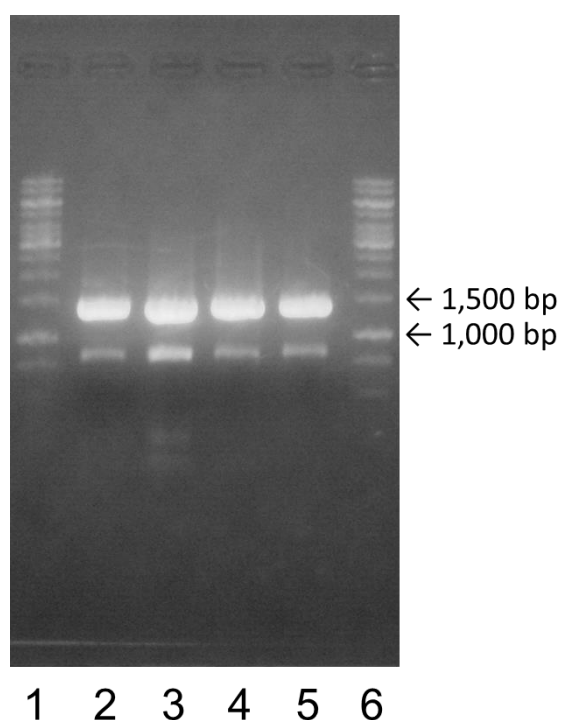


Fig. 2-3-1 PCR 産物のアガロース電気泳動

レーン 1,6 : マーカー

レーン 2, 3, 4, 5 : PCR 産物

得られた PCR 産物をアガロースゲルから切り出しゲル抽出した後、pT7Blue-T ベクターにライゲーションしサブクローニングした後、DNA シーケンスによって配列を確認した。DNA シーケンス解析の結果から、*Tl-laspo* 遺伝子が 1,398 bp から構成され、465 アミノ酸残基をコードしていることが示された。*T. litoralis* DSM 5473 ゲノム上の *Tl-laspo* 遺伝子の下流

にはキノリン酸合成酵素(EC 2.5.1.72)やニコチン酸ヌクレオチドピロホスホリラーゼ(EC 2.4.2.19)のホモログ遺伝子が保存されており、上流には機能未知の推定タンパク質がコードされていた。*Tl-LASPO* のアミノ酸配列は既報の *LASPO* との類似性を示し、各 *LASPO* との類似性は以下に示す通りであった(*Pyrococcus horikoshii* OT3; 65%, *Sulfolobus tokodaii* 7; 38%, *Bacillus subtilis* 168; 35%, *Escherichia coli* K-12; 34%)。 *Tl-LASPO* の一次構造中には FAD との結合に重要だと推定されるアミノ酸残基(Ala12, Gln43, Gly45, Glu331, Leu348)が高度に保存されていた(Fig. 2-3-2)。

Tl-LASPO の系統樹解析の結果、10 網に分類されるアーキアのうち *Thermococci*、*Thermoprotei*、*Halobacteria* の 3 網の特に、*Thermococcaceae*、*Sulfolobaceae*、*Halobacteriaceae* のそれぞれの科に所属する、*Thermococcus* 属、*Pyrococcus* 属、*Sulfolobus* 属、*Halobacteria* 属において *Tl-LASPO* のホモログ遺伝子が存在していることが示された(Fig. 2-3-3)。バクテリアにおいては、*Escherichia coli*、*Bacillus subtilis*、*Pseudomonas putida* 由来の *LASPO* について報告されているが、主として *Aquificaceae* 属において *Tl-LASPO* ホモログ遺伝子が存在している結果となった。

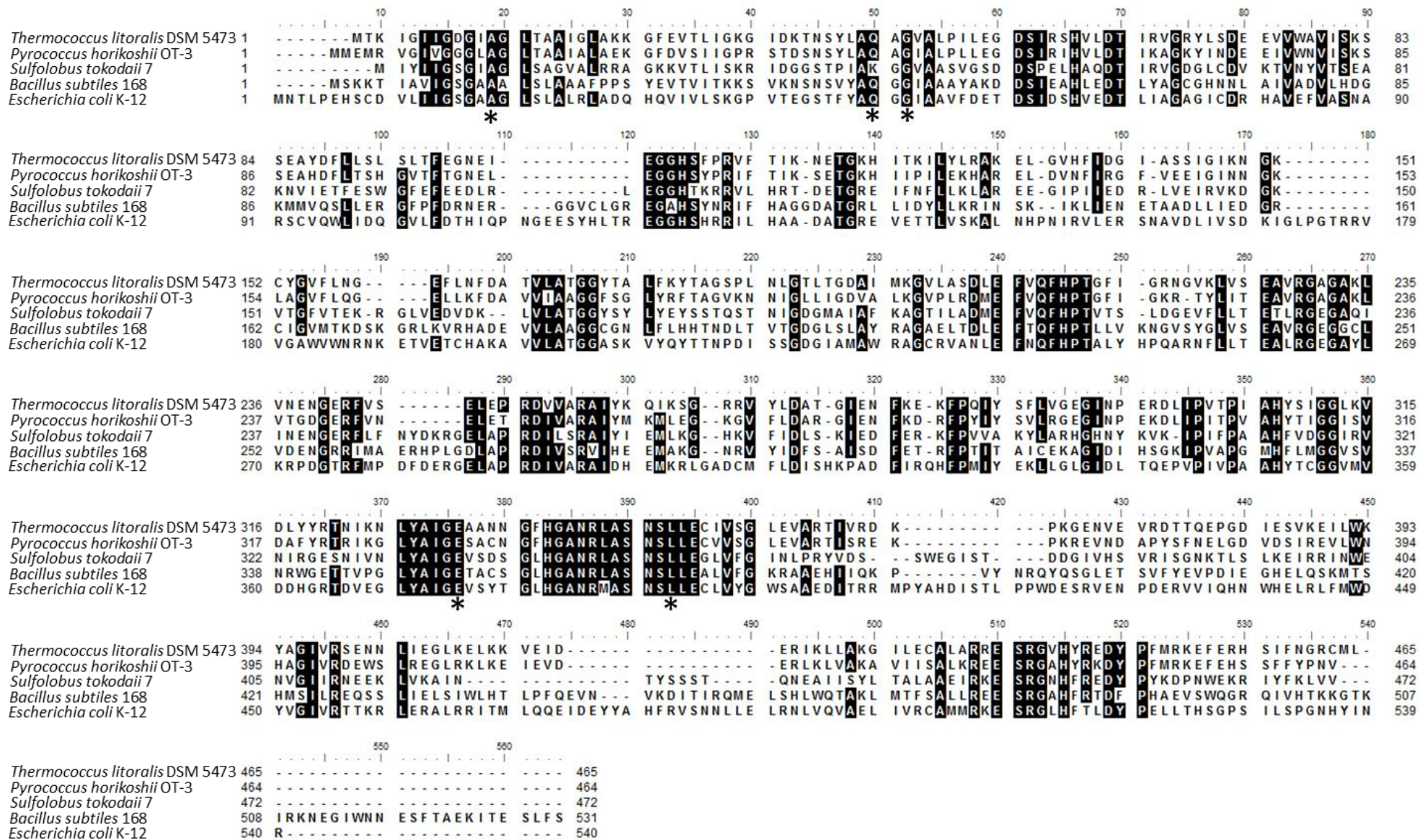


Fig. 2-3-2 *Tl*-LASPO と既報の LASPO とのアライメント解析

* FAD 結合部位と推定されるアミノ酸残基

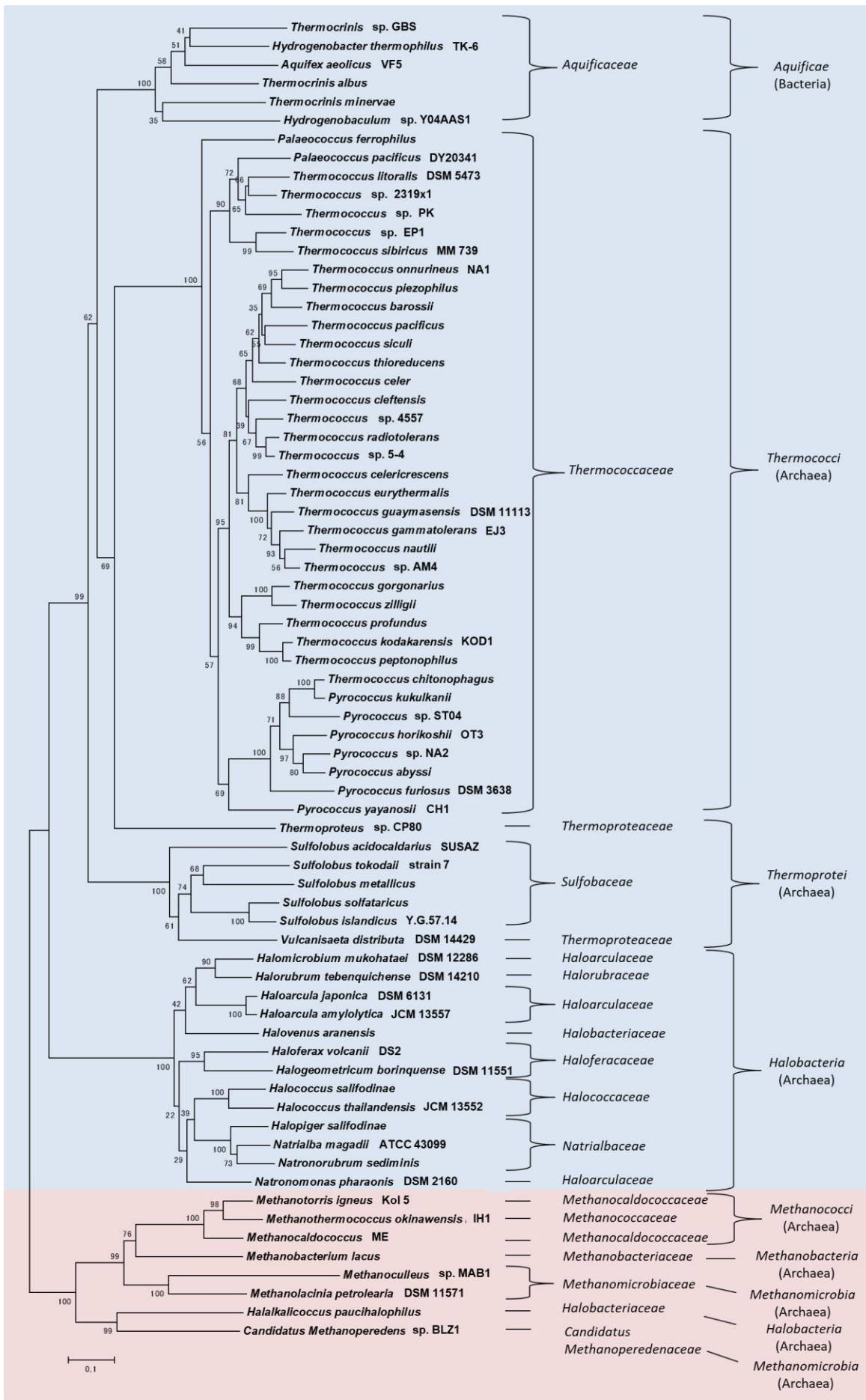


Fig. 2-3-3 T1-LASPO の系統解析

青色表示：LASPO ホモログ

赤色表示：フマル酸レダクターゼホモログ

系統解析に用いた各種のホモログ遺伝子の推定一次構造のアクセッション No.を以下にまとめる。(生物種名：Accession No.) *Aquifex aeolicus* VF5 : AAC06932、*Candidatus Methanoperedens* sp. BLZ1 : KPQ41658、*Halalkalicoccus paucihalophilus* : KYH26718、*Haloarcula amylolytica* JCM 13557 : EMA20236、*Haloarcula japonica* DSM 6131 : EMA28687、*Halococcus salifodinae* : EMA49854、*Halococcus thailandensis* JCM 13552 : EMA50543、*Haloferax volcanii* DS2 : ADE03658、*Halogeometricum borinquense* DSM 11551 : ADQ66598、*Halomicrobium mukohataei* DSM 12286 : ACV47611、*Halopiger salifodinae* : SEW21219、*Halorubrum tebenquichense* DSM 14210 : ELZ40236、*Halovenus aranensis* : SDJ44082、*Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 : BAI68789、*Hydrogenobaculum* sp. Y04AAS1 : ACG57280、*Methanobacterium lacus* : ADZ08296、*Methanocaldococcus infernus* ME : ADG13203、*Methanoculleus* sp. MAB1 : CVK31361、*Methanolacinia petrolearia* DSM 11571 : ADN37392、*Methanothermococcus okinawensis* IH1 : AEH06252、*Methanotorris igneus* Kol 5 : AEF95579、*Natronomonas pharaonis* DSM 2160 : CAI49299、*Natronorubrum sediminis* : SEH16664、*Palaeococcus ferrophilus* : WP_048149971、*Palaeococcus pacificus* DY20341 : AIF68566、*Pyrococcus abyssi* : WP_048147208、*Pyrococcus furiosus* DSM 3638 : AAL82100、*Pyrococcus horikoshii* OT3 : BAA29083、*Pyrococcus kukulkanii* : AMM54247、*Pyrococcus* sp. NA2 : AEC51452、*Pyrococcus* sp. ST04 : AFK21679、*Pyrococcus yayanosii* CH1 : AEH25409、*Sulfolobus acidocaldarius* SUSAZ : AHC50960、*Sulfolobus islandicus* Y.G.57.14 : ACP45480、*Sulfolobus met al.licus* : WP_054839231、*Sulfolobus solfataricus* 98/2 : AKA74220、*Sulfolobus tokodaii* 7 : BAK54476、*Thermococcus barossii* : ASJ03836、*Thermococcus celer* : ASI98302、*Thermococcus celericrescens* : KUH32063、*Thermococcus chitonophagus* : ASJ15662、*Thermococcus cleftensis* : AFL95005、*Thermococcus eurythermalis* : AIU68991、*Thermococcus gammatolerans* EJ3 : ACS33122、*Thermococcus gorgonarius* : ASJ01095、*Thermococcus guaymasensis*

DSM 11113 : AJC71951, *Thermococcus kodakarensis* KOD1 : BAD84486,
Thermococcus litoralis DSM 5473 : EHR78939, *Thermococcus nautili* : AHL22922,
Thermococcus onnurineus NA1 : ACJ17376, *Thermococcus pacificus* : ASJ06406,
Thermococcus peptonophilus : AMQ18168, *Thermococcus piezophilus* : ANF22655,
Thermococcus profundus : ASJ03423, *Thermococcus radiotolerans* : ASJ15399,
Thermococcus sibiricus MM 739 : ACS89124, *Thermococcus siculi* : ASJ08395,
Thermococcus sp. 2319x1 : ALV63936, *Thermococcus* sp. 4557 : AEK73068,
Thermococcus sp. 5-4 : ASA76763, *Thermococcus* sp. AM4 : EEB74599,
Thermococcus sp. EP1 : KPU63813, *Thermococcus* sp. PK : WP_083965087,
Thermococcus thio-reducens : ASJ11607, *Thermococcus zilligii* : WP_010478909,
Thermocrinis albus : WP_041434046, *Thermocrinis minervae* : SHK43562,
Thermocrinis sp. GBS : WP_029551840, *Thermoproteus* sp. CP80 : WP_081226661,
Vulcanisaeta distributa DSM 14429 : ADN49891.

2-3-2 *Tl-laspo* 遺伝子の発現と精製

本研究において、pET21b-*Tl-laspo* が導入された *E. coli* BL21 (DE3)の可溶性画分に *Tl-LASPO* を発現させることに成功した。SDS-PAGE で確認したところ約 60%のタンパク質が可溶性画分に発現していた。pET21b-*Tl-laspo* が導入された *E. coli* BL21 (DE3)から抽出した粗酵素液を、熱処理および Ni-NTA アフィニティカラムクロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーを用いて精製することで、単一に精製された酵素標品が得られた(Fig. 2-3-4A)。また、培養液 1 L 分の粗酵素液から約 20 mg の *Tl-LASPO* が得られた。精製酵素の比活性は、3.86 U/mg であった。ゲル濾過カラムクロマトグラフィーの結果、*Tl-LASPO* は約 140 kDa の位置に溶出した(Fig. 2-3-4C)。SDS-PAGE の結果から、*Tl-LASPO* のサブユニット分子質量は約 52 kDa であったことから、*Tl-LASPO* はホモトリマーであることが明らかとなった。

本研究の過程で、精製 *Tl-LASPO* を 4°C、96 h 以上保存すると SDS-PAGE において 52 kDa のバンドに加えて、100 kDa に相当する位置に新たにバンドが出現することを見出した(Fig. 2-3-4A)。しかしながら、保存している間の比活性の変化はほとんど確認されなかった。MALDI-TOF-MS を用いた解析によって 52 kDa のバンドと、100 kDa のバンドのタンパク質はそれぞれ *Tl-LASPO* の単鎖のポリペプチド鎖であることが同定された(Table 2-3-1)。*Tl-LASPO* の保存中の pH の影響について検討したところ、pH 6.0~pH 9.0 の範囲において pH が酸性になるにつれて、100 kDa に出現するバンドの強度が高くなることが明らかとなった(Fig. 2-3-4B)。加えて各 pH で保存した酵素の遊離のチオール基を定量した結果、pH の低下とともに遊離のチオール基の減少が見られた{pH, チオール基濃度(μM) : pH 6.0, 3.9 ± 1.1 , pH 7.0, 8.6 ± 2.0 , pH 8.0, 14.8 ± 3.1 , pH 9.0, 16.0 ± 0.9 }。以上の結果から、100 kDa のバンドとして検出されるタンパク質は、*Tl-LASPO* の 2 分子間でジスルフィド結合を介した会合体ではないかと考えられた。

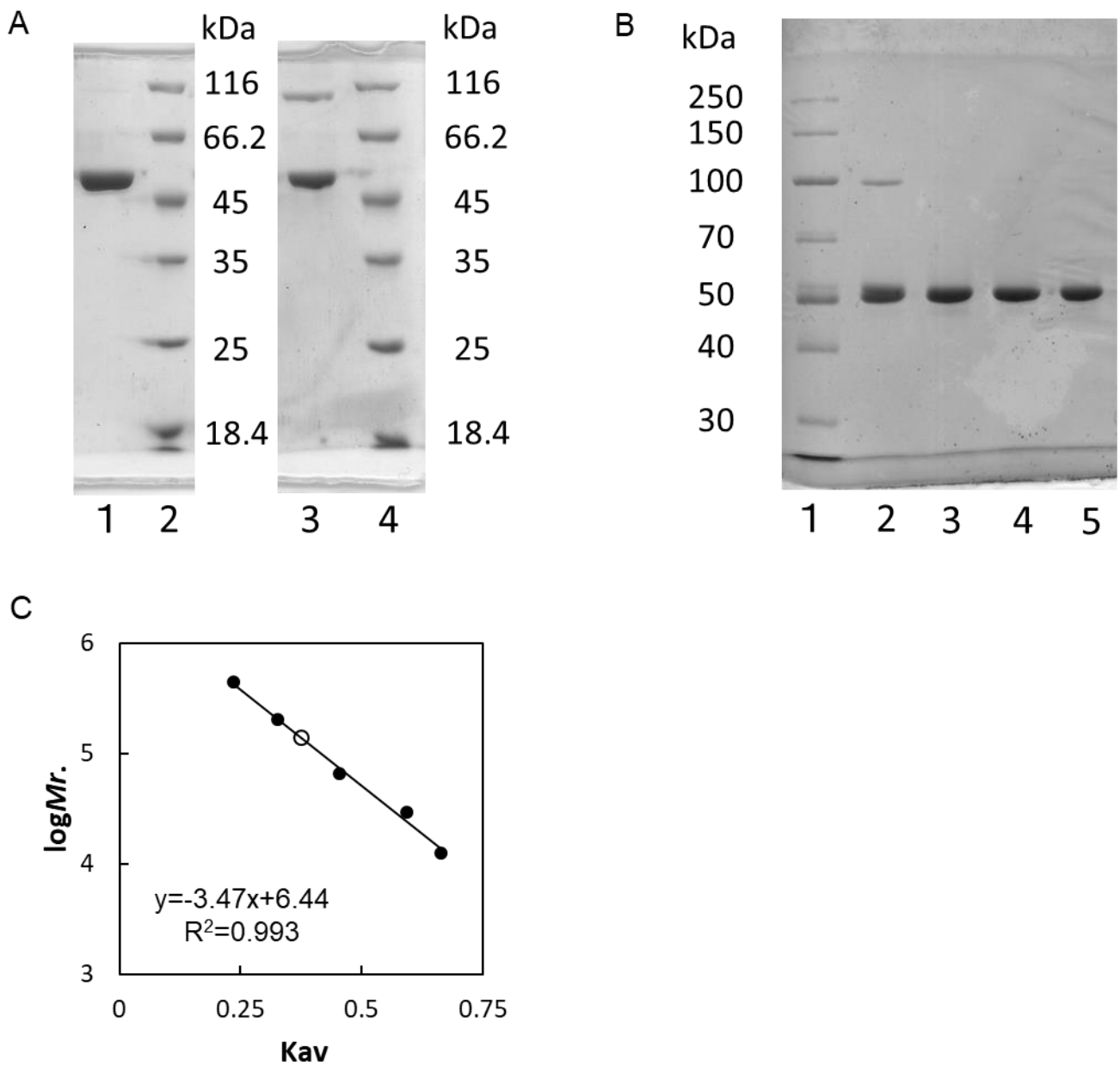


Fig. 2-3-4 SDS-PAGE 解析及び会合状態の推定

A : 精製 *Tl*-LASPO の保存による影響

レーン 1 保存 0 h 精製 *Tl*-LASPO 5 μ g、

レーン 3 保存 192 h 精製 *Tl*-LASPO 5 μ g、

レーン 2,4 分子質量マーカー(4 μ L)

B : *Tl*-LASPO の保存時の pH の影響

レーン 1 分子質量マーカー(4 μ L)

レーン 2~5 各 pH 緩衝液中で保存した精製 *Tl*-LASPO 5 μ g(レーン 2:pH 6.0、
レーン 3 : pH 7.0、レーン 4 : pH 8.0、レーン 5 : pH 9.0)

C : 会合状態の推定

● : 分子質量マーカー(12.4 kDa ; Cytochrome c, 29 kDa ; Carbonic anhydrase, 66 kDa ; Albumin, 200 kDa ; β -Amylase,443 kDa ; Apoferritin)

○ : 精製 *Tl*-LASPO

Table 2-3-1 MALDI-TOF-MS 解析による SDS-PAGE 上のバンドの同定結果

Mass value	Position	The band of 52 kDa (monomeric <i>Ti</i> -LASPO)		The band of 100 kDa		Sequence
		Observed mass value	M.C.	Observed mass value	M.C.	
		3103.30	83-110	3101.56	0	
3032.39	152-179	n.d.		n.d.		CYGVFLNGEFLNFDATVLTGGYTALFK
2190.45	199-218	n.d.		2189.50	0	GVLASDLEFVQFHPTGFIGR
2188.45	37-57	2188.63	0	2188.05	0	TNSYLAQAGVALPILEGDSIR
1966.18	281-297	1965.64	0	1965.12	0	FPQIYSFLVGEINPER
1923.19	180-198	1922.63	0	n.d.		YTAGSPLNLGTLTGDAIMK
1888.99	325-342	1888.56	0	1888.11	0	NLYAIGEANNGFHGANR
1874.18	343-360	n.d.		n.d.		LASNSLLECIVSGLEVAR
1794.10	298-314	1793.71	0	1793.30	0	DLIPVTPIAHYSIGGLK
1756.02	132-148	1755.69	0	1755.29	0	ELGVHFIDGIASSIGIK
1724.07	4-22	1723.77	0	1723.34	0	IGIIGDGIAGLTAAIGLAK
1637.82	69-82	1637.64	0	1637.26	0	YLSDEEVVWAVISK

1428.45	376-388	1418.59	0	1418.28	0	DTTQEPGDIESVK
1369.51	267-278	1369.63	0	n.d.		VYLDATGIENFK
1116.22	400-409	1116.60	0	1116.32	0	SENNLIEGLK
976.08	243-250	976.55	0	976.30	0	FVSELEPR
963.12	24-32	963.55	0	n.d.		GFEVTLIGK
957.06	444-450	957.47	0	957.21	0	EDYPFMR
945.15	426-434	945.56	0	n.d.		GILECALAR
940.07	58-65	940.57	0	940.33	0	SHVLDTIR
929.97	235-242	930.51	0	930.27	0	LVNENGER
829.91	456-462	830.48	0	830.26	0	HSIFNGR
827.93	315-320	828.48	0	828.27	0	VDLYYR
801.84	369-375	802.47	0	802.24	0	GENVEVR
772.90	223-229	773.51	0	773.30	0	LVSEAVR
759.81	414-419	760.46	0	n.d.		VEIDER
606.75	111-115	n.d.		608.18	0	VFTIK

n.d. : not detected MC: number of miss cleavages

2-3-3 酵素活性に及ぼす温度及び pH の影響

Tl-LASPO は 30-70°C の範囲で反応温度の上昇に伴い、活性が上昇した (Fig. 2-3-5A)。また、本酵素は pH 6.0-9.0 の範囲において 50 mM KPB, pH 8.0 を用いた時に最大活性を示した (Fig. 2-3-6A)。*Tl-LASPO* は 80°C 以下の温度において、一時間以内の熱処理による失活が見られず安定に活性を保持することが明らかとなった (Fig. 2-3-5B)。また、85°C、一時間の熱処理後も約 70% の活性が残存しており、90°C、85°C における活性半減期はそれぞれ約 46 min、170 min と算出された。このような *Tl-LASPO* の高い熱安定性は、既報の好熱菌由来の酵素とよく似た傾向を示した (*Sulfolobus tokodaii* ; 80°C 以下で安定、*Pyrococcus horikoshii* ; 80°C で高い安定性) (Sakuraba et al., 2008, Sakuraba et al., 2002)。また、*Tl-LASPO* は pH 5.5-10.5 の間で高い安定性を示した (Fig. 2-3-6B)。

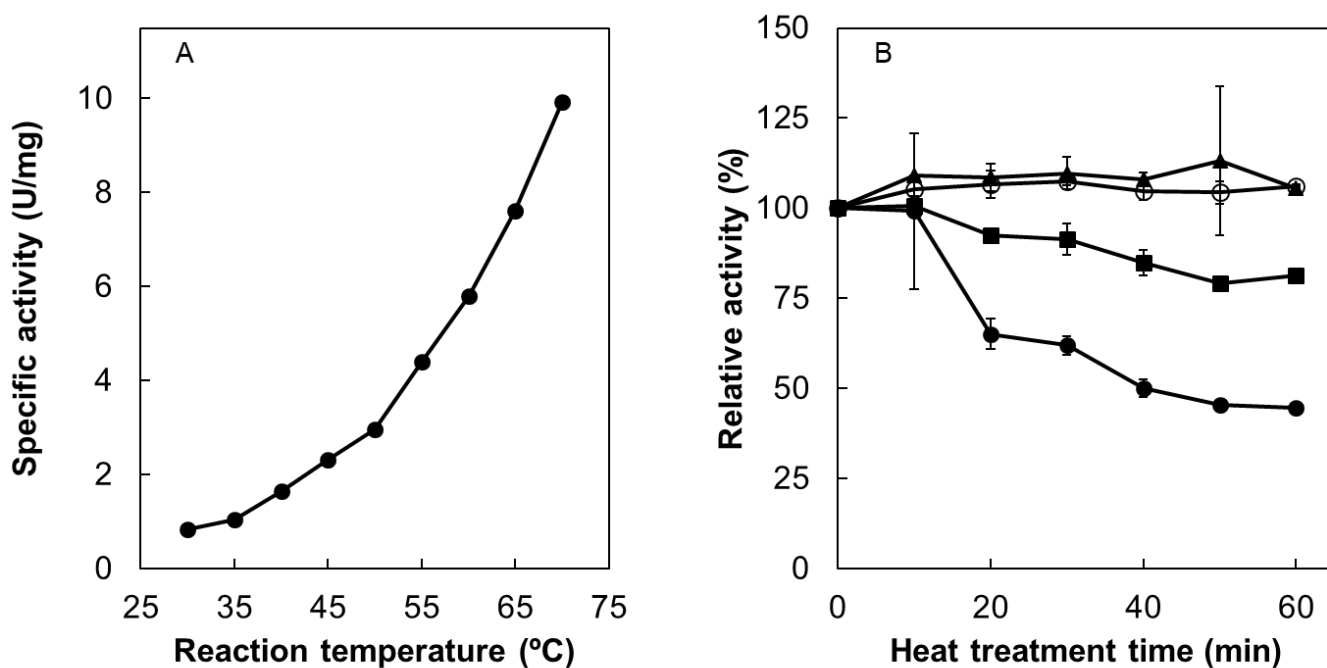


Fig. 2-3-5 *Tl-LASPO* 活性に及ぼす温度の影響

A : *Tl-LASPO* 活性に及ぼす反応温度の影響

B : 熱安定性 ● : 90°C ■ : 85°C ▲ : 80°C ○ : 75°C

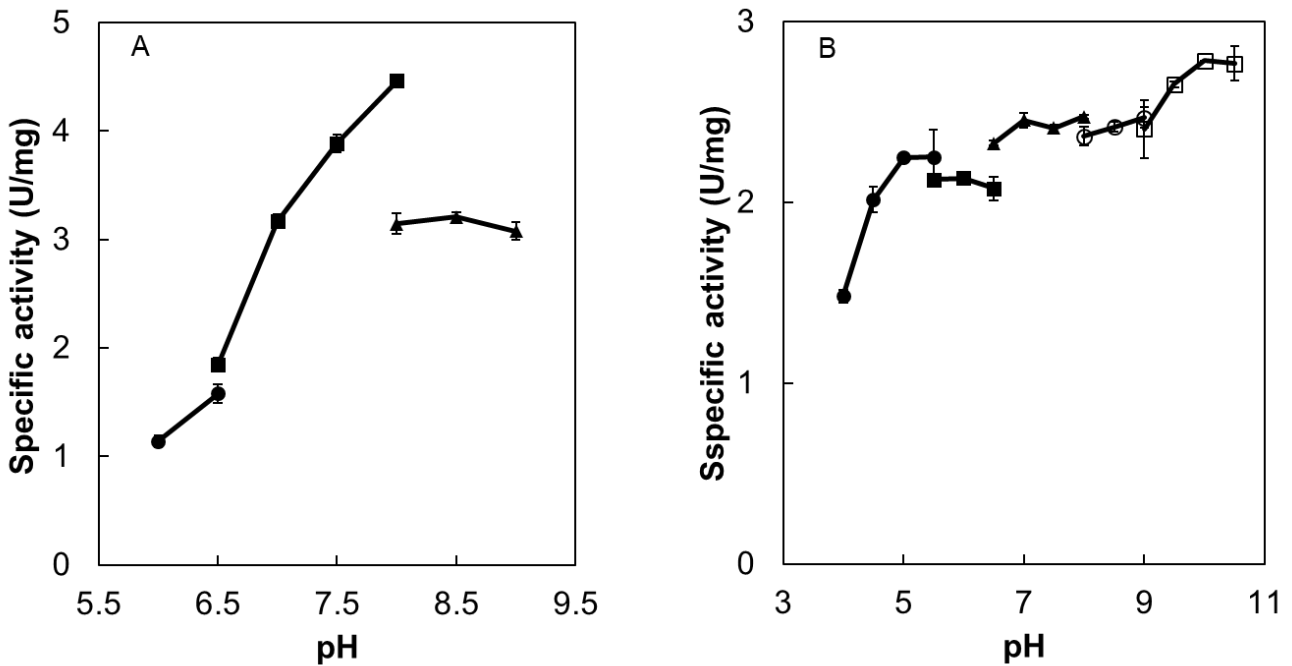


Fig. 2-3-6 *TI-LASPO* 活性に及ぼす pH の影響

A : 最適 pH

● : Bis-Tris (pH 6.0, 6.5) ■ : KPB (pH 6.5, 7.0, 7.5, 8.0)

▲ : Tricine-NaOH (pH 8.0, 8.5, 9.0)

B : pH 安定性

● : 酢酸-酢酸ナトリウム (pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5)

■ : Bis-Tris (pH 5.5, 6.0, 6.5) ▲ : KPB (pH 6.5, 7.0, 7.5, 8.0)

○ : Tris-HCl (pH 8.0, 8.5, 9.0) □ : ホウ酸-NaOH (pH 9.0, 9.5, 10.0, 10.5)

2-3-4 *TI-LASPO* の質特異性の検討

TI-LASPO はL-アスパラギン酸以外の標準アミノ酸に対する活性を示さず、一方で非標準アミノ酸である、L-システイン酸、L-システインスルフィン酸に対して弱い活性を示した(L-Aspに対する相対活性:L-システイン酸 4.02%、L-システインスルフィン酸 1.09%)。*TI-LASPO* と比較すると、既報の *LASPO* では *Sulfolobus tokodaii* 7 由来の酵素が L-アスパラギン酸の他に L-アスパラギンにも活性を示すこと(Bifulco et al., 2013)や、*Pseudomonas putida* ATCC

47054 の酵素が L-アスパラギン、L-グルタミンにも活性を示す(Leese et al., 2013)など基質特異性が低いことが示された(Table 2-3-2)。

Table 2-3-2 *Tl*-LASPO の基質特異性

Substrate	Specific activity (U/mg)	Substrate	Specific activity (U/mg)
L-Aspartic acid	3.69±0.19	L-Proline	0
D-Aspartic acid	0	L-Serine	0
L-Cysteinic acid	0.15±0.01	L-Threonine	0
L-Cysteinesulfinic acid	0.04±0.00	L-Methionine	0
L-Asparagine	0	L-Cysteine	0
D-Asparagine	0	L-Histidine	0
L-Glutamic acid	0	L-Arginine	0
D-Glutamic acid	0	L-Lysine	0
L-Glutamine	0	L-Phenylalanine	0
L-Alanine	0	L-Tryptophan	0
L-Valine	0	L-Tyrosine	0
L-Leucine	0	Glycine	0
L-Isoleucine	0		

n=3

2-3-5 *Tl*-LASPO の電子受容体の特異性

Tl-LASPO は嫌気条件において、フマル酸や DCIP、フェリシアン化カリウムを補因子とすることが明らかとなった。それぞれに対する比活性は、 0.96 ± 0.02 、 3.7 ± 0.6 、 15.7 ± 1.2 U/mg であった。

2-3-6 *Tl*-LASPO の反応速度論的解析

Tl-LASPO の反応速度論的パラメーターを Table 2-3-3 にまとめた。本酵素の L-アスパラギン酸に対する K_m の値は、反応温度の上昇に伴い減少し、一方で k_{cat} の値は増加することが明らかとなった。触媒効率を表す k_{cat}/K_m の値は、実験した温度範囲において 70°C で最大となった。*Tl*-LASPO の 37°C における K_m の値は既報の *S. tokodaii* 7 由来の酵素の K_m の値 (13.3 mM, 37°C , pH 8.0) (Bifulco et al., 2013) に比べて高い値を示していた。以上のことから、*S. tokodaii* 7 の LASPO と比べると *Tl*-LASPO は低温条件における L-アスパラギン酸との親和性が低いことが示された。

Table 2-3-3 *Tl*-LASPO の各反応温度における反応速度論的パラメーター

Temperature ($^\circ\text{C}$)	K_m for L-Asp (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	$k_{cat, \text{L-Asp}}$ (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
37	21.1 ± 5.0	0.82 ± 0.19	0.70 ± 0.16	0.03 ± 0.01
50	14.4 ± 1.7	1.89 ± 0.22	1.61 ± 0.18	0.11 ± 0.02
60	10.2 ± 3.1	2.97 ± 0.90	2.53 ± 0.77	0.25 ± 0.08
70	7.5 ± 1.4	5.00 ± 0.90	4.26 ± 0.77	0.57 ± 0.15

n=3

2-3-7 *TI*-LASPO の吸収スペクトル解析と FAD の解離定数

FAD とアポ型 *TI*-LASPO は強く結合していたため、3 M KBr のみで処理した場合は FAD の解離がみられなかった。そこで 3 M KBr に加えて、活性炭素を透析外液に添加することでアポ型の *TI*-LASPO の調製に成功した。ホロ型の *TI*-LASPO の吸収スペクトルでは、380 nm と 450 nm に極大吸収を示したのに対してアポ酵素ではこれらのピークが確認されなかった(Fig. 2-3-7)。アポ型 *TI*-LASPO と FAD の結合実験の結果 *TI*-LASPO は 1 サブユニット当たり 1 分子の FAD の添加を境に、蛍光強度の挙動に変化が見られた(Fig. 2-3-8)。上記の結果からホロ酵素の吸収スペクトルが FAD に由来する特徴を示し、*TI*-LASPO はサブユニット 1 分子あたり 1 分子の FAD が結合していることが明らかとなった。また、FAD-*TI*-LASPO 間の FAD の解離定数(K_d) は 5.6×10^{-9} M と算出された。

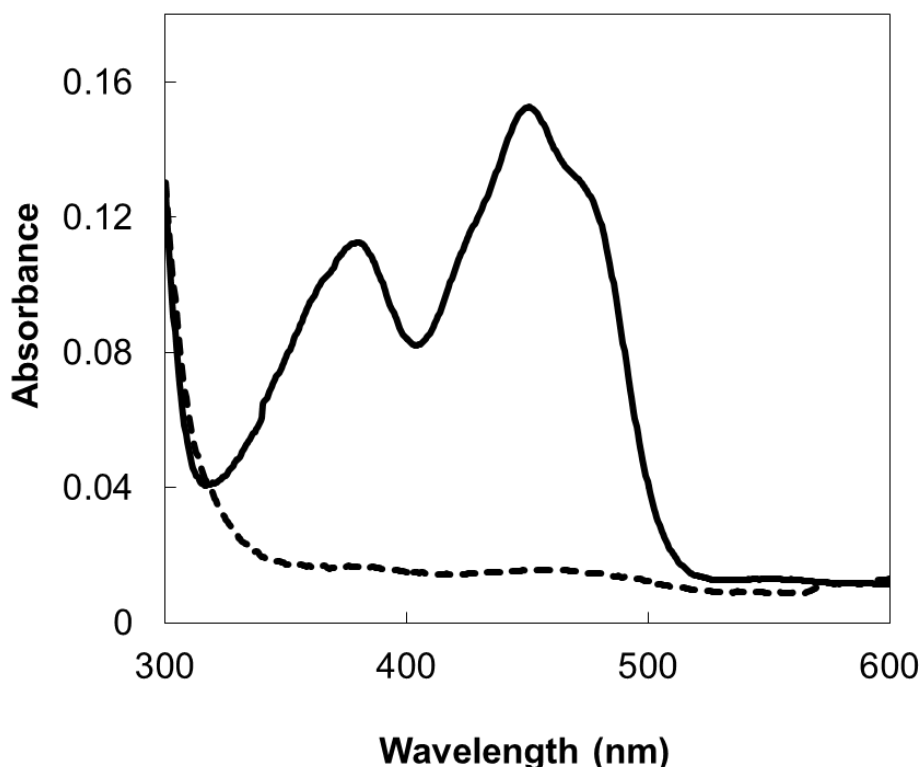


Fig. 2-3-7 *TI*-LASPO のアポ酵素とホロ酵素の吸収スペクトル解析

— ホロ酵素 (1.4 mg/mL, in KPb, pH 7.0)

---- アポ酵素 (1.4 mg/mL, in KPb, pH 7.0)

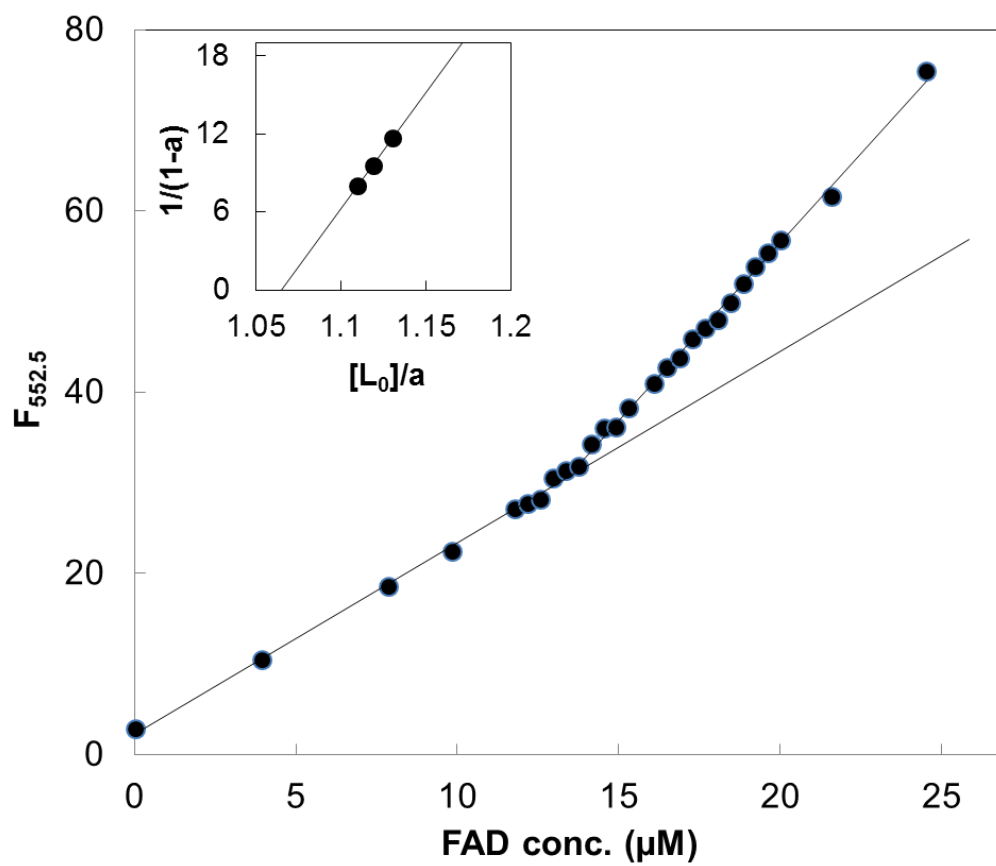


Fig. 2-3-8 FAD-*Tl*-LASPO の結合係数の決定

2-4 考察

本研究において、*T. litoralis* DSM 5473 ゲノム上の L-アスパラギン酸オキシダーゼホモログ遺伝子(OCC_06611: *Tl-laspo*)のクローニングと *E. coli* BL21(DE3)の可溶性画分に発現させることに成功し、また、その遺伝子産物が *in vitro* で L-アスパラギン酸オキシダーゼ活性を有することを示した。また、本研究は *Thermococcus* 属由来の L-アスパラギン酸オキシダーゼとして初の報告となった。

Tl-LASPO ホモログの系統解析の結果、*Tl-LASPO* と高い類似性を示す LASPO ホモログは、数種の限られたアーキアの綱と一部の好熱性の細菌に分布しており、他にも、一部のアーキア由来のフマル酸レダクターゼホモログとの類似性も見られた(Fig. 2-3-3)。このように、LASPO ホモログはフマル酸レダクターゼホモログにも類似性を示し、LASPO としての機能予測が難しいことが、他のアミノ酸オキシダーゼに比べて、細菌における LASPO の報告例が少ない理由のひとつではないかと考えられた。

Tl-LASPO は、52 kDa のサブユニットを構成単位とするホモトリマーであった。これまでに報告されている LASPO は *P. horikoshii* OT3 由来の酵素がホモトリマーである(Sakuraba et al., 2002)以外は、*S. tokodaii* 7 由来のものも含めて多くが単量体であると報告されている(Seifert et al., 1990, Marinoni et al., 2008, Bifulco et al., 2013)。このことから、*Thermococcales* 目由来の LASPO と *Sulfolobus* 目由来の LASPO では酵素の耐熱性に関わる機構が異なると考えられた。

精製 *Tl-LASPO* を 4°C で 96 h 以上保存した後、SDS-PAGE によって分析すると、アクリルアミドゲルの約 100 kDa に相当する位置に新たにバンドが出現した(Fig. 2-3-4B)。この 100 kDa の分子質量は *Tl-LASPO* のサブユニットの 52 kDa の約 2 倍であったため、この 100 kDa のタンパク質は、2 つの *Tl-LASPO* のポリペプチド鎖に起因している可能性が考えられた。この仮説は、精製 *Tl-LASPO* 保存時の pH に依存的して生じる SDS-PAGE で確認されるバンド強度の増加と、*Tl-LASPO* 遊離のチオール基の総量が減少していることから支持された。システイン残基のチオール基の pKa の値は一般的

には 6.16 であり、アルカリ側の pH でチオール基のプロトンが解離する。このため、酸性側の pH において *Tl-LASPO* の二つのポリペプチド鎖中の二つのシステイン残基間でジスルフィド結合が形成されやすかったのではないかと考えられる。この現象は、*Tl-LASPO* でのみ観察され、他の超好熱アーキア由来の酵素では報告されていない。*Tl-LASPO* の一次構造中には 4 つのシステイン残基 (Cys152, Cys351, Cys430, Cys463) が存在している。一方で *P. horikoshii* 由来の *LASPO* には 2 つのシステイン残基が、*S. tokodaii* 7 由来の *LASPO* には 1 つのシステイン残基しか存在しておらず、*Tl-LASPO* はいずれの超好熱アーキア由来の酵素よりもシステイン残基が多く存在している。このことは *Tl-LASPO* だけが保存中にポリペプチド鎖間でジスルフィド結合を形成する要因の一つである可能性が考えられた。

Tl-LASPO は L-アスパラギン酸に対して基質特異性が高いにもかかわらず、L-システイン酸、L-システインスルフィン酸に対しても活性を示した。このような基質特異性の特徴は第一章の *Tl-AspR* の基質特異性との合致がみられた。*T. litoralis* DSM 5473 のゲノム情報に基づく *Tl-AspR* によって D-アスパラギン酸から生じる L-アスパラギン酸は *Tl-LASPO* によってオキサロ酢酸へ変換されるのではないかと考えられる。オキサロ酢酸は L-アスパラギン酸がアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼによって変換される場合も生成するが、興味深いことに *T. litoralis* DSM 5473 のゲノム上にはアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼとアノテーションされている遺伝子が 5 つも存在している (OCC_05516, OCC_03517, OCC_11879, OCC_08839, OCC_10965)。しかしながら、これらのアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼについての報告はこれまでに一つもない。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼを除くと、*T. litoralis* DSM 5473 のゲノム上にはオキサロ酢酸代謝に関わる酵素と推定される遺伝子としてピルビン酸カルボキシラーゼサブユニット B (EC 6.4.4.1, OCC_09596) やオキサロ酢酸デカルボキシラーゼサブユニット β (EC 4.1.1.3, OCC_03162) が存在しているが、いずれも成熟型酵素の部分的なサブユニットしかコードされていないと考えられ、これらの遺伝子産物は生体内で機能していない可能性が考えられた (Fig. 2-4-1)。

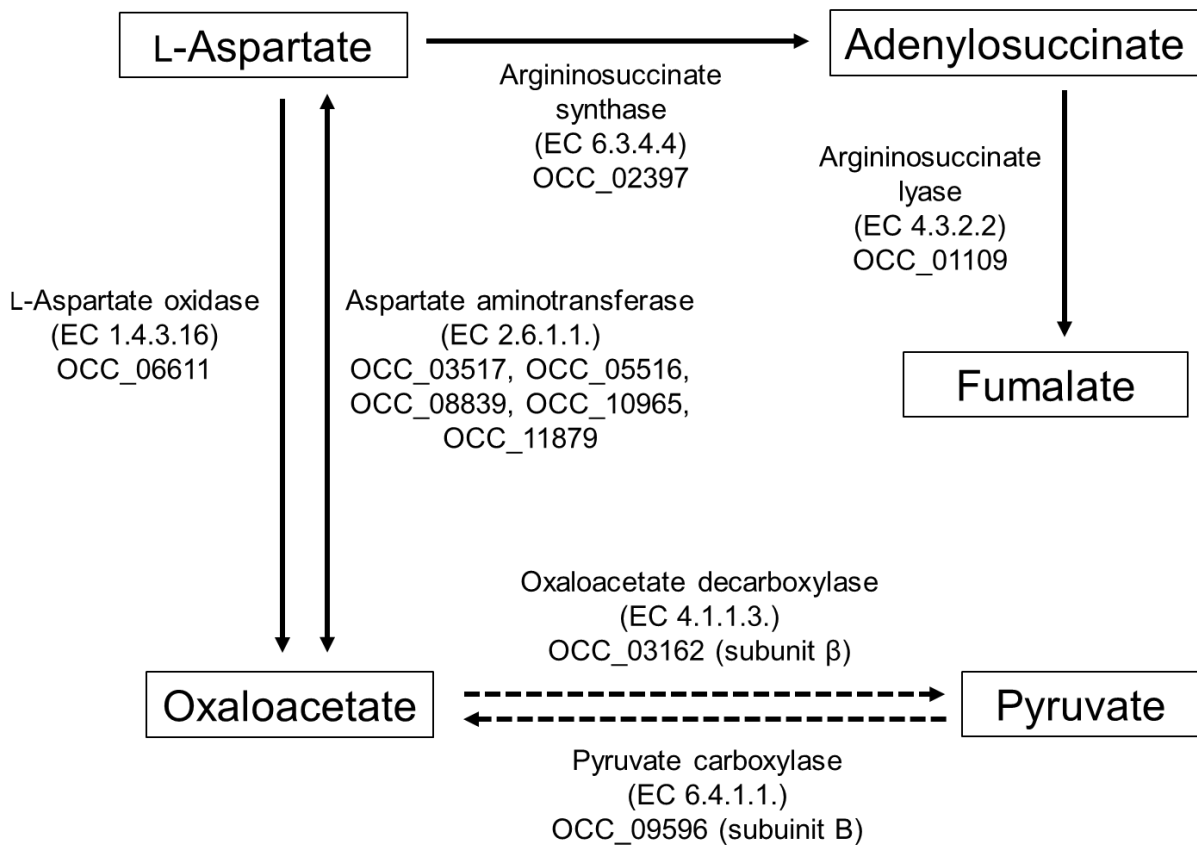


Fig. 2-4-1 *Thermococcus litoralis* DSM 5473 のアスパラギン酸周辺の代謝経路に存在するホモログ遺伝子

Tl-LASPO と *Tl-AspR* の基質特異性の類似性から判断すると、D-システイン酸、D-システインスルフィン酸についても生体内において D-アスパラギン酸と同様の代謝経路でスルホピルビン酸、 β -スルフィニルピルビン酸にそれぞれ変換されている可能性が考えられた。また、既報の *LASPO* が L-アスパラギンや L-グルタミン酸に対して活性を示したのに比べて、*Tl-LASPO* はこれらの標準アミノ酸に対する活性を示さなかった。このような高い基質特異性は、生体試料中の L-アスパラギン酸からオキサロ酢酸への特異的な変換や、L-アスパラギン酸の定量法といった応用面での利用に有用な性質であると考えられた。

Tl-LASPO は 3 M KBr と 0.05% 活性炭素を用いた処理によってアポ化されたことから、*Tl*-LASPO と FAD は非共有結合での結合をしていることが明らかとなった。既報の LASPO では、*B. subtilis* と *E. coli* 由来の LASPO と FAD の解離定数はそれぞれ、4.5 μ M、3.4 μ M と報告されている (Marinoni et al., 2008; Seifert et al., 1990)。バクテリア由来の LASPO が μ M オーダーの解離定数を示したのに対し、*Tl*-LASPO は nM オーダーの解離定数を示したことから、*Tl*-LASPO と FAD との結合はバクテリア由来の LASPO に比べて強いことが明らかとなった。また、*P. horikoshii* OT-3 や *S. tokodaii* 7 のアーキア由来の LASPO は FAD とアポ化が困難な程強く結合していることが報告されており (Sakuraba et al., 2002; Bifulco et al., 2013)、*Tl*-LASPO を含め超好熱アーキア由来の酵素は FAD とより強く結合していることが明らかとなった。

Tl-LASPO は嫌気条件で *in vitro* において *P. horikoshii* OT-3 と同様にフマル酸、DCIP、フェリシアン化カリウムを補因子として利用可能であった。これらの活性は *Tl*-LASPO の好気条件での酵素活性と同程度の値となった。*T. litoralis* DSM 5473 は偏性嫌気性であり嫌気条件下でしか生育できないことから、生体内において *Tl*-LASPO はフマル酸を補因子として用いていると考えられた。*T. litoralis* DSM 5473 のゲノム上には、アデニロコハク酸合成酵素 (EC 6.3.4.4; OCC_02397) とアデニロコハク酸リアーゼ (EC 4.3.2.2; OCC_01109) と推定される遺伝子がコードされており、生体内のフマル酸は L-アスパラギン酸からこれらの経路を経て生産されている可能性が考えられた (Fig. 2-4-1)。興味深いことに、*T. litoralis* DSM 5473 のゲノム上には、クエン酸回路上の遺伝子としてフマル酸ヒドラターゼのサブユニット α と推定される遺伝子 (OCC_11212) を除きほとんどの遺伝子が保存されていなかった。

既報の原核生物由来の LASPO の研究では NAD^+ の *de novo* 合成における初発の反応としての役割が注目されている。*T. litoralis* DSM 5473 のゲノム上にもこれらの代謝経路に関わるホモログ遺伝子が存在しており、*Tl*-LASPO もまた NAD^+ 生合成に関与している可能性が考えられたが、詳細は更なる研究が必要であると考えられる。

第三章

耐熱性酵素を用いた新規 D-および L-アスパラギン酸 定量法の開発

要約

これまでに第一章、第二章で機能解析を行った *Tl-AspR* と *Tl-LASPO* がいずれも高い安定性と基質特異性を有していることを見出した。これらの性質は、定量用酵素として用いるのに有用であると考えられたので、第三章ではこれらの耐熱性酵素を用いて新規 D-,L-アスパラギン酸酵素定量法を開発した。試料中の L-アスパラギン酸濃度の測定は、*Tl-LASPO* と西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ(HRP)の共役反応を利用して定量した。また、総アスパラギン酸の定量は *Tl-AspR*、*Tl-LASPO*、HRP の三つの酵素をカップリングさせることで行った。標準 D,L-アスパラギン酸溶液を用いて L-アスパラギン酸、総アスパラギン酸の検量線を作成した結果、いずれの検量線も 0 - 600 μM の範囲で直線性が得られた。本法を用いて、様々な D-アスパラギン酸含量(%)の D,L-アスパラギン酸溶液の D-および L-アスパラギン酸を定量した結果、D-アスパラギン酸含量(%)の低い試料の定量法としても有効であった。本法は生体試料や食品サンプルのような L-アスパラギン酸を豊富に含むサンプルに対しても有効であると考えられたため、食品サンプルのモデルとして、日本酒試料と黒酢試料を用いて本酵素法と高速液体クロマトグラフィー法(HPLC 法)を比較した。日本酒、黒酢いずれのサンプルも酵素法を用いた定量値と HPLC 法を用いた定量値は同程度の値を示した。以上の結果から本酵素法は生体試料や食品試料中の D-,L-アスパラギン酸分析に有用なツールとなることが明らかとなった。

3-1 緒言

L-アミノ酸は生体内に豊富に存在し、様々な生理機能を持ち、結合態としてはタンパク質の構成要素として主に機能しているが、前章までに述べたとおり、近年の研究によって、その鏡像異性体である D-アミノ酸も生体内に存在し、様々な生理的機能を持つことが明らかとなってきた。生体

内の D-アミノ酸は体内でアミノ酸ラセマーゼなどの酵素によって生合成される(Gogami et al., 2009, Matsui et al., 2009, Oikawa et al., 2006)ほか、食品中の D-アミノ酸を摂取することによって体外から取り込まれると考えられる(Morikawa et al., 2007, Nagata, et al., 1994)。当研究室では、これまでに様々な食品中、特に日本酒やワインなどの発酵食品中に豊富に D-アミノ酸が含まれていることを明らかにしている(Gogami et al., 2011, Kato et al., 2011)。また、当研究室では、日本酒中に含まれる D-アラニン、D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸が日本酒の味質の向上に寄与することを明らかにしており、他にも D-アスパラギン酸には、肌の老化抑制効果を示すことが明らかとなっているなど、食品中の D-アミノ酸の機能性が注目されている(Okada et al., 2013) (芦田 他, 2011)。

一般に D-及び L-アミノ酸の定量法としては、試料中のアミノ酸を蛍光ジアステレオマー誘導体化して高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて分析する HPLC 法と、試料中の測定対象とするアミノ酸に特異的に作用する酵素を用いて定量する酵素法が主に利用されている。HPLC 法では、最少検出感度が約 0.1 μM と低く高感度な分析が可能であるが、食品サンプルのような mM オーダーで多種類のアミノ酸を含むサンプル中の D-及び L-アミノ酸の分析には、数十～数百倍もの高い倍率で試料を希釈する必要がある、段階的な希釈操作による系統誤差が大きくなるという欠点がある。一方、酵素法では、最少検出感度は低いが試料中の数十 μM から数百 μM のアミノ酸を希釈することなく定量することができ、食品中の D-及び L-アミノ酸の分析には、この点で酵素法は HPLC 法より優れている。また、酵素法は、HPLC 法に比べて高額な分析装置が不要であり、操作が簡便なことも大きな利点である。これまでにいくつかのアミノ酸について酵素法を用いた定量法が報告されているが(Kusakabe et al., 1984, Sugawara et al., 2014) AspR と LASPO を用いた D-及び L-アスパラギン酸の酵素定量法については報告例がない。

第一章、第二章において、超好熱アーキア *Thermococcus litoralis* DSM 5473 の TI-AspR と TI-LASPO がいずれもアスパラギン酸に対する高い基質特異性と熱に対する高い安定性を有することを明らかにした。これらの耐熱性酵

素は、反応や保存中に熱による変性や失活の影響を受けにくく、また反応温度の適応範囲も広いことから、保存性の高い定量用酵素試薬として有用であると考えられた。そこで本研究では、これらの耐熱性 2 酵素(*Tl-AspR* 及び *Tl-LASPO*)を用いた D-及び L-アスパラギン酸の新規酵素定量法を開発することを目的とした(Fig. 3-1-1)。

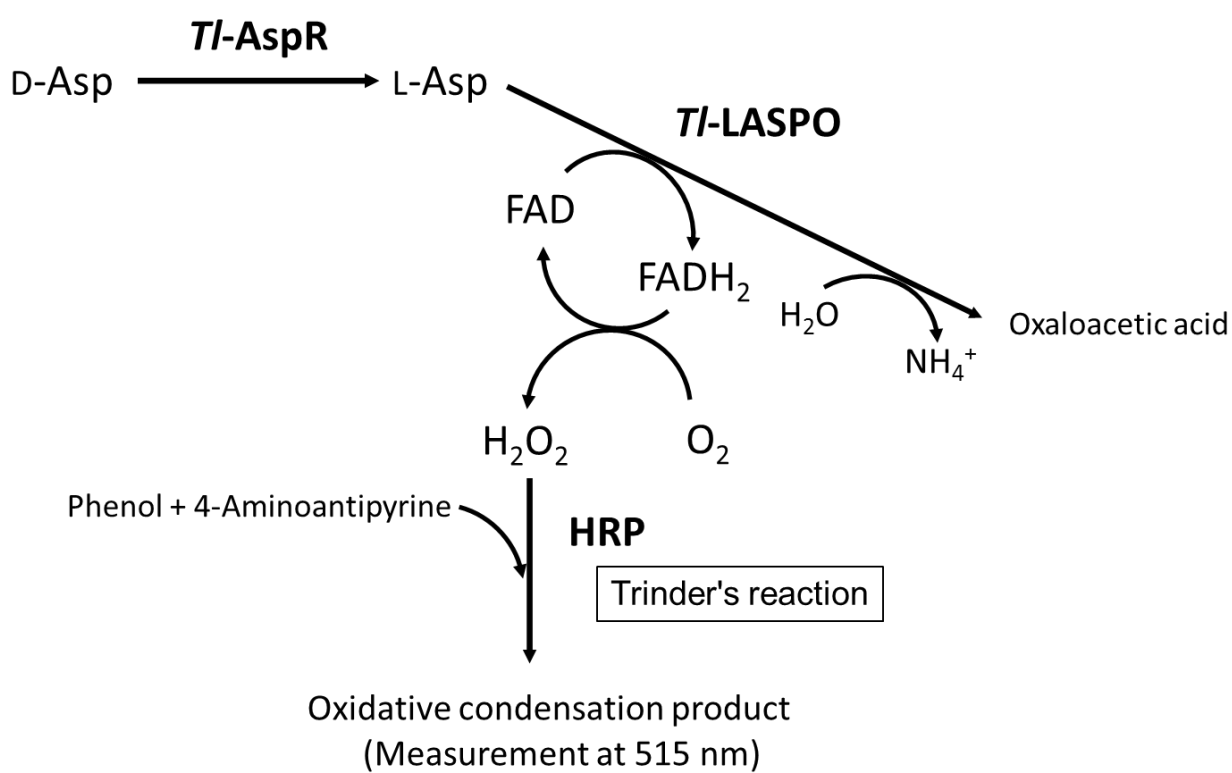


Fig. 3-1-1 D-及び L-アスパラギン酸定量の反応スキーム

3-2 実験材料および方法

3-2-1 実験材料

Tl-AspR と *Tl*-LASPO はそれぞれ第一章及び第二章で述べた方法に従い調製した。D-アスパラギン酸及び L-アスパラギン酸はナカライテスク株式会社から購入した。西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ(HRP、製品番号 169-10791、100 U/mg)、4-アミノアンチピリンは和光純薬工業株式会社から購入した。*N*-エチル-*N*-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン (TOOS)、*N*-エチル-*N*-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン(MAOS)は株式会社同仁化学研究所から購入した。その他の試薬は前章までの試薬と同様に適切な純度の試薬を各会社から購入した。

3-2-2 *Tl*-AspR と *Tl*-LASPO を用いた D-及び L-アスパラギン酸の定量

まず、反応に必要な試薬として、250 mM リン酸カリウム緩衝液 (KPB) pH 7.0、0.25 mM FAD、8.0 mM フェノール、1.0 mM 4-アミノアンチピリンを含む水溶液を調製し混合液 A とした。次に試料(50 μ L)をマイクロチューブ(Greiner Bio-One、製品番号 616201、1.5 mL 容)に入れ、混合液 A(50 μ L)、脱イオン水(130 μ L)を加えて十分攪拌した。マイクロチューブの蓋をしっかりと閉じ、ドライサーモユニット(タイテック株式会社・DTU-1B)を用いて 70°C で 5 min、プレインキュベートした。L-アスパラギン酸の測定の場合は、プレインキュベート後、50 mM KPB, pH 7.0 に溶解した 1.6 mg/mL (0.8 U) HRP (5 μ L)及び 10.2 mg/mL *Tl*-LASPO (0.6 U、15 μ L)をそれぞれ反応液に添加し、マイクロチューブの蓋をしっかりと閉じ、ドライサーモユニットを用いて 70°C でインキュベートすることで反応を開始した。30 min 後、マイクロチューブを氷上で冷却し、反応液の 515 nm における吸光度を、紫外可視分光光度計(日本分光, JASCO V-630)を用いて測定した($AbS_{[Sample(L-Asp)]}$)。ブランクは、試料の代わりに等量の脱イオン水を用いて反応液を調製したもの、*Tl*-LASPO の代わりに等量の 20 mM KPB pH 7.0 を用いて反応液を調製したもの及び HRP の代わりに等量の 20 mM KPB pH 7.0 を用いて反応液を調製したものをそれぞれ試料と同様に反応させた後、吸光度を測定し、

$Abs_{[-Sample(L-Asp)]}$ 、 $Abs_{[-Tl-LASPO(L-Asp)]}$ 、 $Abs_{[-HRP(L-Asp)]}$ とした。 $Abs_{[Sample(L-Asp)]}$ からブランクの中で、最も値の大きい $Abs_{[-Tl-LASPO(L-Asp)]}$ を差し引いた値 $\{ Abs_{[Sample(L-Asp)]} - Abs_{[-Tl-LASPO(L-Asp)]} \}$ を $Abs_{[L-Asp]}$ とした。試料中の L-アスパラギン酸濃度(L-Asp[o])は、試料として標準 L-アスパラギン酸水溶液(0, 100, 200, 400, 600 μ M)を用いて横軸に L-Asp[o] (μ M)、縦軸に $Abs_{[L-Asp]}$ をとり作成した検量線を用いて算出した。測定は少なくとも3回繰り返し行った。

試料中の D-アスパラギン酸濃度は、試料中の D-アスパラギン酸を *Tl-AspR* で等量の L-アスパラギン酸に変換後上記の方法で L-アスパラギン酸濃度(L-Asp[t])の測定を行い、L-Asp[t]から L-Asp[o]を差し引くことにより算出した。L-Asp[t]の測定は、上記 L-アスパラギン酸濃度の定量と同様に調製した混合液 A のプレインキュベート後、50 mM KPB pH 7.0 に溶解した 1.6 mg/mL (0.8 U) HRP (5 μ L)、10.2 mg/mL *Tl-LASPO* (0.6 U、15 μ L)をそれぞれ添加した後、さらに 50 mM KPB, pH 7.0 に溶解した 7.5 μ g/mL *Tl-AspR* (2.2 U、20 μ L)を加えてマイクロチューブの蓋をしっかりと閉じ、ドライサーモユニットを用いて 70°C でインキュベートし反応を開始した。30 min 後、マイクロチューブを氷上で冷却し反応を停止後、反応液の 515 nm における吸光度を測定した($Abs_{[Sample(D-Asp + L-Asp)]}$)。ブランクは、試料の代わりに等量の脱イオン水を用いて反応液を調製したもの、*Tl-LASPO* の代わりに等量の 20 mM KPB, pH 7.0 を用いて反応液を調製したもの及び HRP の代わりに等量の 20 mM KPB, pH 7.0 を用いて反応液を調製したものを試料と同様に反応させた後それぞれの吸光度を測定し、 $Abs_{[-Sample(D-Asp + L-Asp)]}$ 、 $Abs_{[-Tl-LASPO(D-Asp + L-Asp)]}$ 、 $Abs_{[-HRP(D-Asp + L-Asp)]}$ とした。 $Abs_{[Sample(D-Asp + L-Asp)]}$ からブランクの中で、最も値の大きい $Abs_{[-Tl-LASPO(D-Asp + L-Asp)]}$ を差し引いた値 $\{ Abs_{[Sample(D-Asp + L-Asp)]} - Abs_{[-Tl-LASPO(D-Asp + L-Asp)]} \}$ を $Abs_{[D-Asp + L-Asp]}$ とした。試料中の L-Asp[t]は、試料として標準 D-アスパラギン酸水溶液(0, 100, 200, 400, 600 μ M)を用いて測定を行い、横軸に L-Asp[t]、縦軸に $Abs_{[D-Asp + L-Asp]}$ をとり作成した検量線を用いて算出した。測定は少なくとも3回繰り返し行った。

3-2-3 高速液体クロマトグラフィー法を用いた D-及び L-アスパラギン酸の定量

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた試料中の D-及び L-アスパラギン酸の定量は、既報の方法に従って行った(Gogami et al., 2011)。試料として標準 DL-アスパラギン酸水溶液(1, 2, 5, 10, 15 μ M)を用いて横軸に標準 DL-アスパラギン酸濃度、縦軸にエリア面積をとり作成した検量線を用いて算出した。測定は少なくとも 3 回繰り返し行った。

3-2-4 D-アスパラギン酸定量に及ぼす L-アスパラギン酸の影響

一般に、生体試料や食品サンプル中の D-アスパラギン酸は L-アスパラギン酸に比べ含有量が著しく少なく、総アスパラギン酸含有量に対する D-アスパラギン酸含有量の DL 比($D/[D+L]\%$)は著しく低くなる。そこで、DL 比($D/[D+L]\%$)の低いサンプル中の D-アスパラギン酸が本酵素法で定量できることを確認するため、D-アスパラギン酸含量が 50%以下の 100 μ M D,L-アスパラギン酸溶液(DL 比($D/[D+L]\%$) = 5, 10, 25, 50)をそれぞれ調製し、上記 2 の酵素法を用いてこれらの溶液中の D-及び L-アスパラギン酸を定量した。

3-2-5 反応系に用いるトリンダー試薬の検討

本酵素定量法では、Fig. 3-1-1 に示す原理に基づき *Tl-AspR* と *Tl-LASPO* の共役反応により生成する過酸化水素を、HRP の存在下で 4-アミノアンチピリンとフェノールと反応させ、生成する酸化的縮合物の吸光度を測定することにより D-及び L-アスパラギン酸を定量する。この過酸化水素、4-アミノアンチピリン、フェノールと HRP との反応は、トリンダー(Trinder)によって開発され、トリンダー反応と呼ばれる(Trinder, 1969)。また、トリンダー反応におけるフェノールなどの水素供与体はトリンダー試薬と呼ばれる。一般に、トリンダー反応で生成する酸化的縮合物の検出波長や検出感度は、トリンダー試薬の種類を変えることにより変化することが知られている。そこで上記 2 の酵素法の反応系に用いるトリンダー試薬を検討するため、8.0 mM フェノールの代わりに 4.0 mM *N*-エチル-*N*-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン (TOOS)または 8.0 mM *N*-エチル-*N*-(2-

ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン(MAOS)を用いてそれぞれ 45°C および 70°C で反応を行い、それぞれ 550 nm または 630 nm における吸光度変化を経時的に測定した。検量線作成には、標準 L-アスパラギン酸(0, 15, 50, 125, 250 μ M)水溶液及び標準 D-アスパラギン酸(0, 15, 50, 125, 250 μ M)水溶液を用いてフェノール用いた場合と同様に反応を行い L-Asp[o] 及び L-Asp[t]の定量用の検量線を作成した。測定は少なくとも 3 回繰り返し行った。

3-2-6 食品試料中の D-及び L-アスパラギン酸の定量

Tl-AspR 及び *Tl-LASPO* を用いた D-及び L-アスパラギン酸の新規酵素定量法の有効性を確認するため、モデル食品分析試料として当研究室で保有している日本酒(試料番号:0204)1 試料と黒酢(試料番号:004)1 試料を用いて、前述の酵素法と HPLC 法を用いてそれぞれの試料中の D-及び L-アスパラギン酸の定量を行い、両測定法の分析結果を比較した。

3-3 結果

3-3-1 *Tl*-AspR と *Tl*-LASPO を用いた D-及び L-アスパラギン酸の定量

Tl-AspR 及び *Tl*-LASPO を用いた D-及び L-アスパラギン酸の新規酵素定量法の最適反応時間を検討するため、標準反応条件として設定した 70°C, pH 7.0 の条件で、D-及び L-アスパラギン酸それぞれを基質とした時の経時的な吸光度変化を測定した。その結果、D-アスパラギン酸、L-アスパラギン酸いずれを基質とした場合でも 20 分で A_{515} が一定となり、70°C で 20 分以上反応すれば反応が終了していた(Fig. 3-3-1)。そこで D-及び L-アスパラギン酸標準液を試料として本酵素法による L-アスパラギン酸と D-アスパラギン酸定量のための L-Asp[o]及び L-Asp[t]の検量線をそれぞれ作成したところ、いずれの検量線も 0-600 μM の範囲で直線性が得られた(Fig. 3-3-2A, Fig. 3-3-2B)。

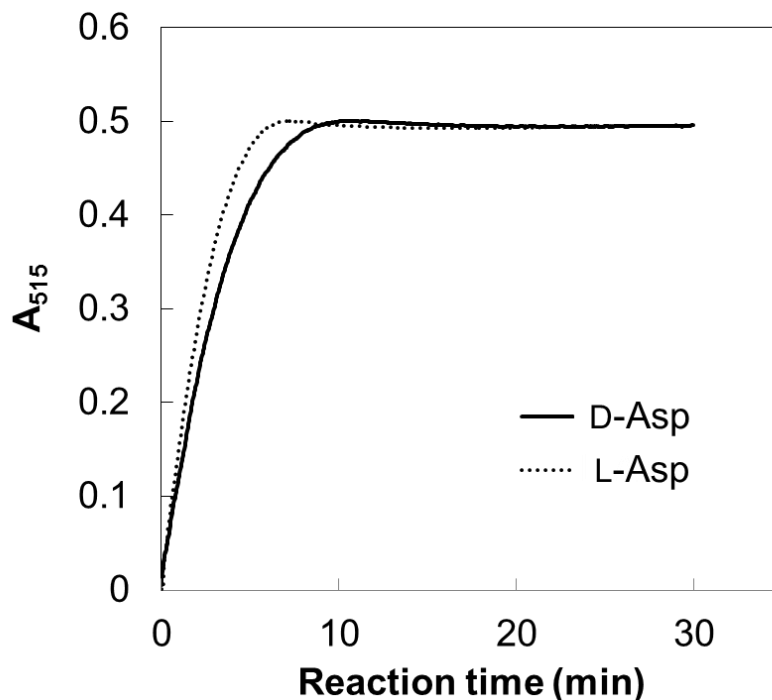


Fig. 3-3-1 D-,L-アスパラギン酸定量法の反応時間の影響

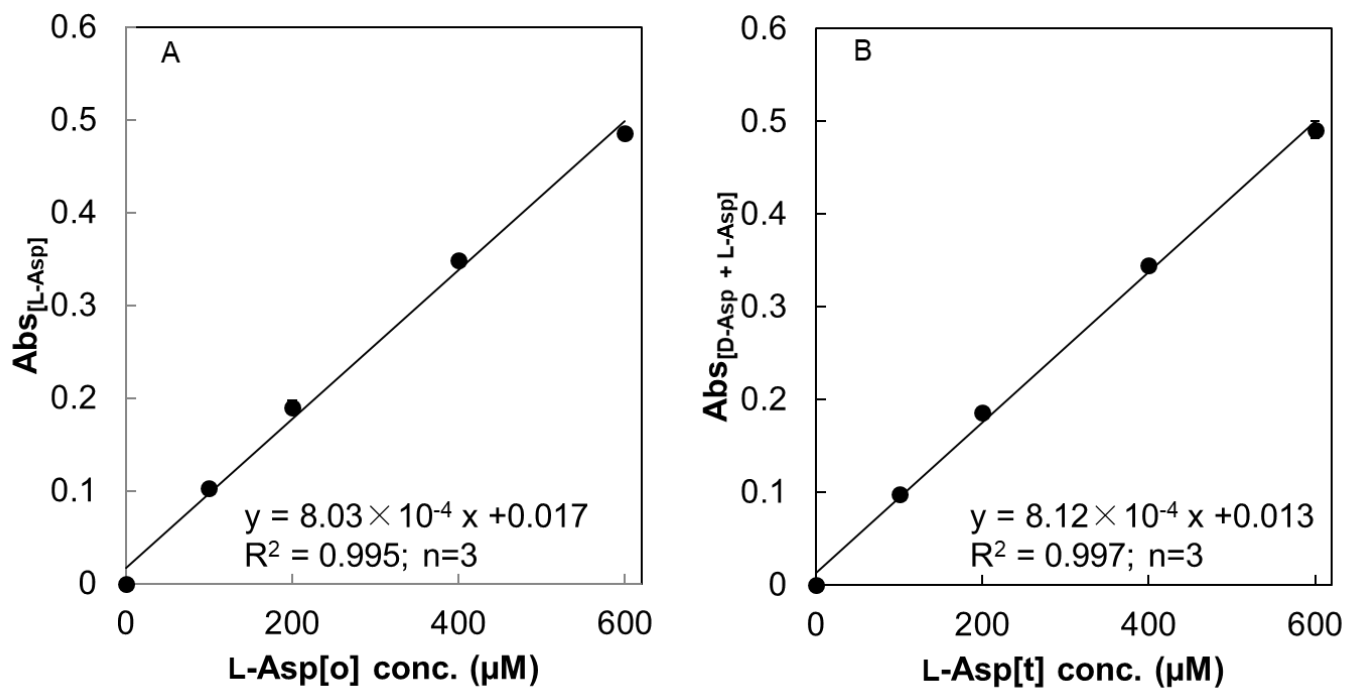


Fig. 3-3-2 酵素定量法に用いる L-Asp[o]、L-Asp[t]の検量線

A : L-Asp 検量線

(L-Asp 濃度 : 0, 100, 200, 400, 600 μM)

B : D-,L-Asp 検量線

(DL-Asp 濃度 : 0, 100, 200, 400, 600 μM)

3-3-2 D-アスパラギン酸定量に及ぼす L-アスパラギン酸の影響

D-,L-体の混合比が異なる 100 μM D-,L-アスパラギン酸溶液の酵素法を用いた D-及び L-アスパラギン酸定量の結果を Table 3-3-1 に示した。本酵素法は、5%までの D-アスパラギン酸含量のサンプル中の D-,L-アスパラギン酸の定量が可能であった。

Table 3-3-1 D-アスパラギン酸含量の違いによる定量値への影響

Theoretical values in standard solutions			Experimental values (μM)		
D-Asp (μM)	L-Asp (μM)	D/(D+L)%	L-Asp[t]	L-Asp[o]	D-Asp
5.0	95.0	5.0	98.5 \pm 1.3	95.3 \pm 1.0	3.2 \pm 1.7
10.0	90.0	10.0	94.9 \pm 0.6	86.8 \pm 6.3	8.1 \pm 6.3
25.0	75.0	25.0	96.7 \pm 0.8	75.0 \pm 1.8	21.7 \pm 1.9
50.0	50.0	50.0	95.4 \pm 0.8	50.0 \pm 1.5	45.4 \pm 1.7

n=3

3-3-3 反応に用いるトリンダー試薬の影響

本酵素法の反応系に用いるトリンダー試薬としてフェノールの代わりに TOOS と MAOS を用いて、L-アスパラギン酸と D-アスパラギン酸定量のための L-Asp[o]及び L-Asp[t]の検量線をそれぞれ作成したところ、70°C、pH 7.0 の条件下では TOOS、MAOS いずれの試薬を用いた場合もアスパラギン酸濃度に応じた吸光度変化がなく、直線性が得られなかった。これは、生成物の高温での安定性が低いことが原因であると考えられた。そこで、反応温度を 45°C に変更し TOOS を用いて同様に L-Asp[o]及び L-Asp[t]の検量線をそれぞれ作成したところ、いずれの検量線も 0 - 250 μM の範囲で直線性が得られた(Fig. 3-3-3A, Fig. 3-3-3B)。一方で MAOS を用いた場合、45°C、pH 7.0 の反応条件では、40 min 以上の反応時間でも完全に反応が進行しておらず検量線が作成できなかった。

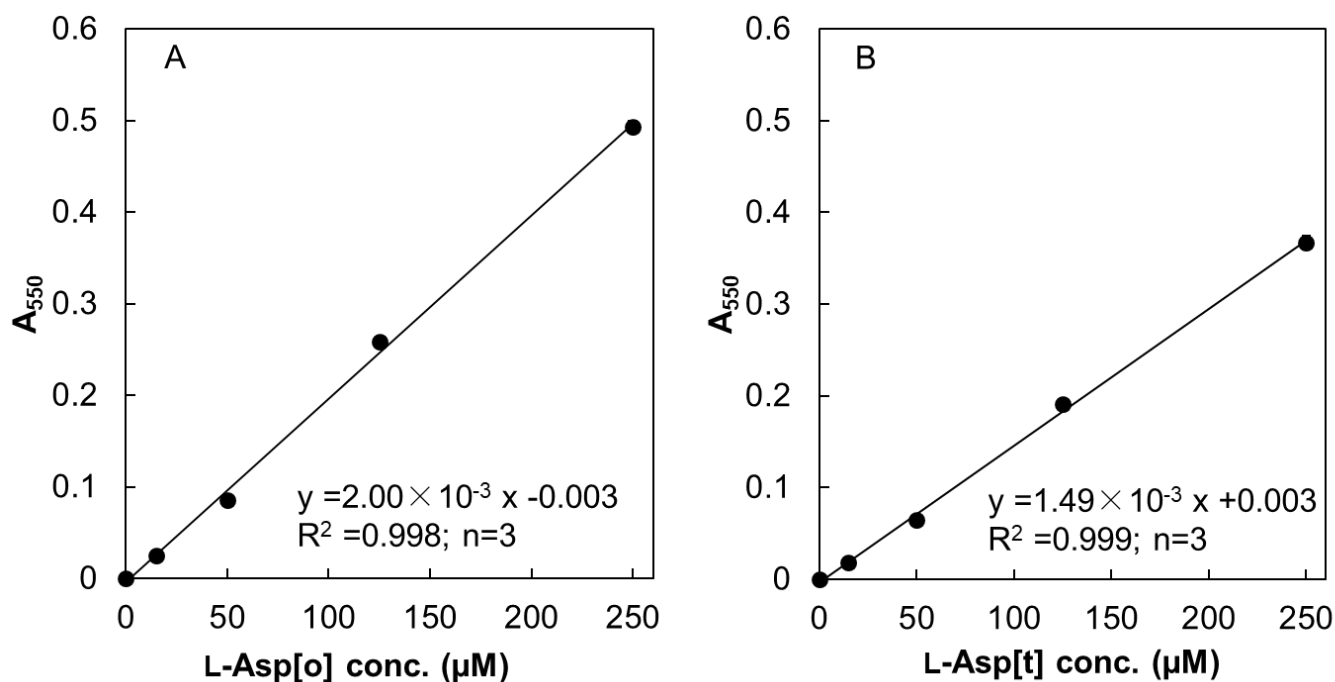


Fig. 3-3-3 TOOS を用いた L-Asp、D-,L-Asp 検量線

A : L-Asp 検量線 (L-Asp 濃度 : 0, 15, 50, 125, 250 μM)

B : D-,L-Asp 検量線 (D-,L-Asp 濃度 : 0, 15, 50, 125, 250 μM)

3-3-4 食品中の D-及び L-アスパラギン酸の定量

当研究室で保存している日本酒（試料番号；0204）と黒酢（試料番号；004）中の D-及び L-アスパラギン酸濃度を、本酵素法を用いて測定した。また、同一試料中の D-及び L-アスパラギン酸濃度を HPLC 法で測定し、検量線(Fig. 3-3-4)から D-及び L-アスパラギン酸濃度を算出した。その結果、いずれの試料中の D-及び L-アスパラギン酸濃度も酵素法と HPLC 法でよく一致した(Table 3-3-2)。したがって、本酵素法は、食品中の D-及び L-アスパラギン酸の定量法として適応可能であることが明らかとなった。

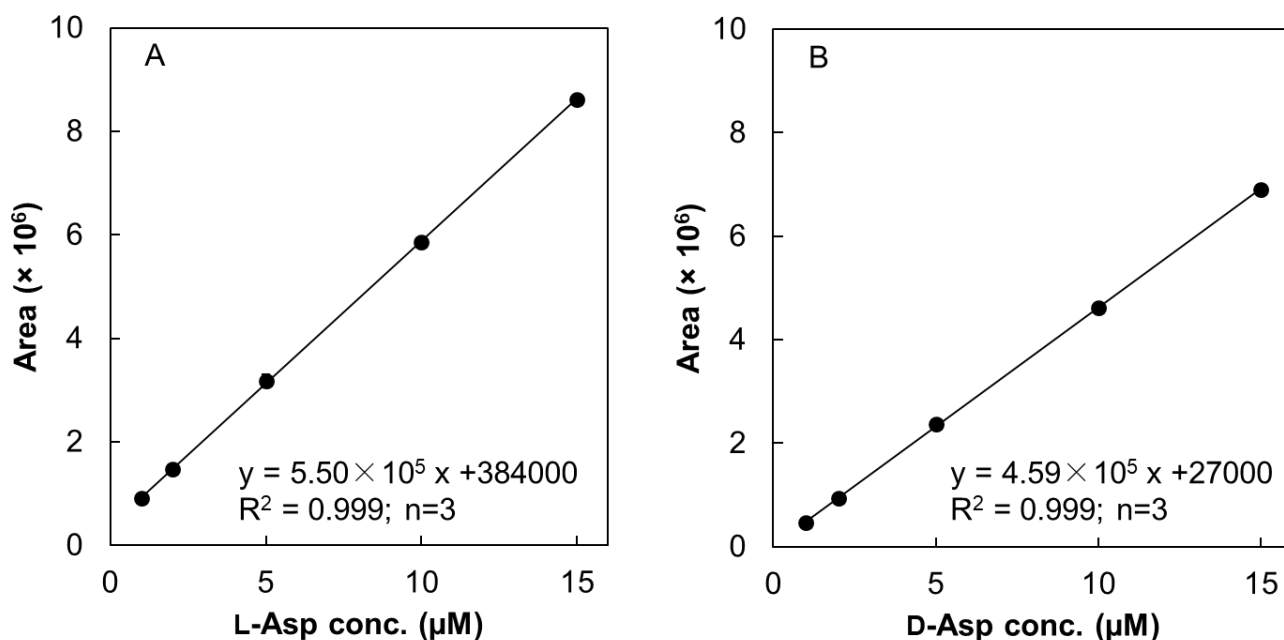


Fig. 3-3-4 HPLC 法を用いた L-Asp、D-Asp 定量検量線

A : L-Asp 検量線

(L-Asp 濃度 : 1, 2, 5, 10, 15 μM)、溶出時間: 10.20 min

B : D-Asp 検量線

(D-Asp 濃度 : 1, 2, 5, 10, 15 μM)、溶出時間: 11.13 min

Table 3-3-2 食品サンプル中の D-及び L-アスパラギン酸定量

Sample	Method	Concentration (μM)		
		D-Asp +L-Asp	L-Asp	D-Asp
Sake (No.0204)	Enzymatic	1,991 \pm 56	1,690 \pm 40	301 \pm 69
	HPLC	2,117 \pm 35	1,837 \pm 34	281 \pm 4.0
Black vinegar (No.004)	Enzymatic	1,172 \pm 41	925 \pm 48	247 \pm 64
	HPLC	1,138 \pm 3.2	878 \pm 3.1	261 \pm 4.4

n=3

3-4 考察

本研究では、耐熱性アスパラギン酸ラセマーゼ、L-アスパラギン酸オキシダーゼを用いた新規の D-及び L-アスパラギン酸定量法を開発した。反応条件を検討した結果、前述の方法を用いることにより、試料中の 0-600 μM L-アスパラギン酸、0-600 μM の D-アスパラギン酸を定量できることが明らかとなった。本酵素法は D-アスパラギン酸含量(%)の低いサンプルに対しても有効であったため、HPLC 法では測定が困難な DL 比(D/[D+L]%)の小さい試料中の D-アスパラギン酸も定量できることが明らかとなった。

反応液中のフェノールの代わりに TOOS をトリンダー試薬として用いた場合、フェノールを用いた場合よりも長い反応時間を必要とした。しかしながら、フェノールを用いた場合に比べて検出感度が高く、より長波長側での測定が可能となることから、試料中の D-及び L-アスパラギン酸濃度の低いサンプルや、試料中の物質が 500 nm 付近に吸収を持つ場合に有効であると考えられる。一方 MAOS をトリンダー試薬として用いた場合、70°C、pH 7.0 の条件下では生成する色素の安定性が低いことが明らかとなった。このため、MAOS を用いる場合には、より低温で反応させるなどの、生成物を安定に保持できる条件を検討する必要があると考えられる。

既報の D-アミノ酸の酵素定量法としては、酵母 *Rhodotorula gracilis* の D-アミノ酸オキシダーゼの T60A、Q144R、K152E、M213G 変異型酵素を用いたバイオセンサーによる試料中の総 D-アミノ酸の定量(Rosini et al., 2008)、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の D-セリンデヒドラターゼを用いた D-セリン定量(Ito et al., 2007)、*Ureibacillus thermophaericus* のメソ-ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼの変異型酵素、D-アミノ酸デヒドロゲナーゼを用いた D-イソロイシンの定量(Akita et al., 2014)などが報告されている。また、D-アスパラギン酸の酵素定量法として *Cryptococcus humicolus* の D-アスパラギン酸オキシダーゼと *Pseudomonas* sp. のオキサロ酢酸デカルボキシラーゼを用いた方法(Kato et al., 2012)について報告されているが、アスパラギン酸ラセマーゼと L-アスパラギン酸オキシダーゼの共役反応を利用した D-アスパラギン酸と L-アスパラギン酸の酵素定量法の報告例はなく、特に L-体、D-

体のアスパラギン酸両方を定量できる酵素定量法としては本報告が最初の例である。

第一章、第二章の機能解析の結果、*Tl-AspR* と *Tl-LASPO* はいずれもアスパラギン酸に対する基質特異性が高く、その他の標準アミノ酸に対する活性を示さないことが明らかとなっている。また、食品サンプル中のアスパラギン酸定量の結果、**HPLC** と酵素法の定量値がよく一致したことと合わせて考えると、本酵素法はサンプル中のアスパラギン酸を特異的に定量できる方法であると考えられた。本酵素法は、**HPLC** 法のように高価な実験装置や専門技術を必要とせず、簡便に **D-**及び **L-**アスパラギン酸を定量できる方法である。特に、本酵素法は **L-**アスパラギン酸含有量の高い試料中の **D-**アスパラギン酸の定量にも有効であり、今後、食品試料や生体試料のような豊富にアミノ酸を含む試料中の **D-**アスパラギン酸及び **L-**アスパラギン酸の定量への応用が期待される。

総括と結論

Thermococcus 属のアーキアは超好熱アーキアの中でも、その生育可能温度が 55°C~98°C と幅広く、*Thermococcus* 属由来の酵素は、高温環境から低温環境への適応機構を解明するモデルとして利用されたり、応用面では耐熱性かつ広範囲の適応範囲をもつ酵素として産業利用されたりしている。

これまでに *Thermococcus* 属由来の酵素として核酸代謝関連酵素、糖質代謝関連酵素について酵素科学的な性質から、応用面での利用まで詳細な研究が行われている。一方でアミノ酸代謝関連酵素についてはこれらの酵素に比べると報告例が少なく、特に D-アミノ酸代謝関連酵素についての報告は Watanabe らの報告したプロリンラセマーゼ/ヒドロキシプロリンエピメラーゼの一例のみであることから、*Thermococcus* 属のアミノ酸代謝経路について解明するには、より詳細な酵素科学的性質について明らかとする必要がある。

本研究の第一章では *T. litoralis* DSM 5473 の細胞内のアミノ酸分析の結果、細胞内にいくつかの遊離の D-アミノ酸が存在することを明らかとした。特に D-アスパラギン酸は他のアミノ酸と比較して *T. litoralis* DSM 5473 の細胞内に著量に存在していることを明らかとした。

これまでに、いくつかのアーキアの細胞内に遊離の D-アミノ酸が存在し、無細胞抽出液中にそれらの D-アミノ酸に対応するアミノ酸ラセマーゼ活性が見出されている(Matsumoto et al., 1999)。このことから *T. litoralis* DSM 5473 の細胞内の D-アミノ酸も主としてアミノ酸ラセマーゼによって生合成されていることが考えられた。そこで、*T. litoralis* DSM 5473 の D-アスパラギン酸の生合成経路について明らかとするために、*T. litoralis* DSM 5473 ゲノム上のアスパラギン酸ラセマーゼホモログ遺伝子をクローニングし *E. coli* Rosetta (DE3) を用いた発現系を構築したところ、その遺伝子産物 (*Tl-AspR*) が AspR 活性を示すことを見出した。

さらに、精製した *Tl-AspR* を用いて詳細な酵素科学的性質について機能解析を進めた結果、*Tl-AspR* は 95°C 以上の最適反応温度を示し 90°C での

熱安定性も非常に高いことが明らかとなり、これらの *Tl-AspR* の熱に対する特性は、*T. litoralis* DSM 5473 の生育環境と合致した。また、*Tl-AspR* の基質特異性は高く、D-アスパラギン酸、L-アスパラギン酸、L-システイン酸、L-システインスルフィン酸に対して活性を示した。一方で、*Tl-AspR* は細胞に存在していた D-アスパラギン酸以外の D-アミノ酸に対する活性は検出されなかった。このことから *T. litoralis* DSM 5473 には *Tl-AspR* 以外に、これらの D-アミノ酸の生合成に関わる酵素が存在していることが示唆された。

また、既報の *AspR* は大きく分けて、PLP を補酵素として要求する PLP 依存型の酵素と、PLP を必要としない PLP 非依存型の酵素に分類され、真核生物由来の *AspR* としては前者(Shibata et al., 2003)がバクテリア由来の *AspR* としては後者(Fujii et al., 2015, Okada et al., 1991, Yamashita et al., 2004)がこれまでに報告されている。一方でアーキアにおいては、両タイプの酵素の存在について報告されている(Long et al., 2001, Aihara et al., 2016)。*Tl-AspR* は PLP 依存型酵素に特有の 420 nm 付近の吸収を持たず、その一次構造中には PLP 非依存型酵素の触媒残基とされる二つのシステイン残基が保存されていた(Cys83、Cys194)。これらのシステイン残基をアラニンに置換した変異型酵素はいずれも *AspR* 活性を示さなかった。以上のことから *Tl-AspR* はこれらの Cys83 と Cys194 を触媒残基にもつ PLP 非依存型の酵素であることが明らかとなった。

反応速度論的解析の結果、*Tl-AspR* の K_m の値は L-Asp に対してよりも D-Asp に対しての方が高い値を示したことから、*T. litoralis* DSM 5473 の細胞内の D-アスパラギン酸は、L-アスパラギン酸が *Tl-AspR* によって変換されることで生合成されていることが明らかとなった。

T. litoralis DSM 5473 のゲノム上には、第一章で報告した、*Tl-AspR* による L-アスパラギン酸から D-アスパラギン酸を生合成する経路の他にも、L-アスパラギン酸代謝に関わる酵素として、アスパラギナーゼ、アスパラギン合成酵素、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、L-アスパラギン酸オキシダーゼのホモログ遺伝子が存在していた。中でも、L-アスパラギン酸オキシダーゼは、バイオセンサーやアスパラギン酸定量用酵素としての有用

性が期待されたため、第二章では L-アスパラギン酸オキシダーゼホモログのクローニングと大腸菌を用いた発現系を構築し、熱安定性をはじめとした詳細な酵素科学的性質について機能解析を行った。発現した *Tl-laspo* 遺伝子の遺伝子産物(*TI-LASPO*)は L-アスパラギン酸オキシダーゼ活性を有し、*TI-LASPO* の機能解析の結果、*TI-LASPO* は 80°C 以下の温度で高い熱安定性を示すことを明らかにした。

また、*TI-LASPO* は L-アスパラギン酸の他に、L-システイン酸、L-システインスルフィン酸に対しても活性を示し、その他の標準アミノ酸に対しては活性を示さなかった。この結果は、*TI-AspR* の基質特異性の結果とよく合致していたことから、*T. litoralis* DSM 5473 の生体内では D-アスパラギン酸と同様の代謝経路で D-システイン酸や D-システインスルフィン酸がスルホピルビン酸、 β -スルフィニルピルビン酸へ代謝されている可能性が考えられた。また、既報の *LASPO* の中には L-アスパラギンや L-グルタミンに対する活性を示したのに対し、*TI-LASPO* はこれらのアミノ酸に対して活性を示さなかったので、*TI-LASPO* は L-アスパラギン酸を特異的に定量する定量用酵素としての有用性が見出された。

TI-AspR と *TI-LASPO* の機能解析の結果、両酵素はいずれも高い熱安定性と L-アスパラギン酸への高い基質特異性を示すことが明らかとなった。これらの性質は、アスパラギン酸の酵素定量に用いる酵素として有用であると考えられた。第三章ではこれらの酵素を組み合わせた、新規の D-及び L-アスパラギン酸定量法の開発を試みた。これまでに、酵素法を用いたアミノ酸定量法としていくつかの手法が報告されているが、*AspR* と *LASPO* を用いる D-および L-アスパラギン酸の定量法としては本報告が初となる。

本酵素定量法は、D-アスパラギン酸含量の低い D,L-アスパラギン酸溶液中の D-アミノ酸に対しても有効であることが判明し、食品サンプルや生体試料のように D-アミノ酸に比べて豊富に L-アミノ酸を含むようなサンプルへの適応が可能であると考えられた。また、食品サンプルのモデルとして、当研究室で保有している日本酒および黒酢サンプル中の D,L-アスパラギン酸を本酵素法と従来法である HPLC 法を用いて定量したところ、両者の定

量値はよく一致していた。このことから本酵素法は、食品サンプルをはじめとした様々な生体試料中の D-及び L-アスパラギン酸定量法としての有用であると考えられた。

また、本酵素定量法は、検出に用いるトリンダー試薬の種類を変えることで、より高い検出感度での測定や、検出波長を変更することができる。本研究ではトリンダー試薬として TOOS (検出波長 = 550 nm)や MAOS (検出波長 = 630 nm)を用いた方法について検討したが、いずれのトリンダー試薬もフェノールと同一条件で反応すると、時間経過に伴う吸光度の減衰がみられ、生成物である色素の安定性が低いことが明らかとなった。TOOS を用いた反応では反応温度を 45°C に低下させることで生成物の分解を抑制することができたが、フェノールを用いた系に比べて基質が完全に反応するまでに時間がかかる結果となった。また、MAOS を用いた反応では依然として生成物が安定して保持される条件を本研究では定められず、今後のさらなる研究において、反応温度や pH、酵素添加量の条件を検討することで、より幅広いサンプルに適応可能な酵素定量法として利用できるようなると考えられる。

超好熱アーキア由来の酵素の酵素科学的な性質を明らかにすることは、高温環境から低温環境への適応機構の解明など、分子進化との関連性を解明するための足がかりになると考えられる。これまで *Thermococcus* 属由来の酵素の研究は核酸代謝関連酵素や糖質代謝関連酵素が中心でありアミノ酸代謝関連酵素については十分に解明されていなかった。第一章、第二章では *T. litoralis* DSM 5473 のアスパラギン酸代謝に関わる、アスパラギン酸ラセマーゼと L-アスパラギン酸オキシダーゼについてその酵素科学的性質について明らかにすることができた。*T. litoralis* DSM 5473 のゲノム上には、アスパラギナーゼやアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼといった、いくつかのアスパラギン酸代謝関連酵素のホモログ遺伝子が存在しており、今後のさらなる研究によってこれらの機能を明らかにすることで、*T. litoralis* DSM 5473 のアスパラギン酸代謝の全容が解明できると考えられる。

また、本研究では *T. litoralis* DSM 5473 の細胞内に D-アスパラギン酸をは

じめ、いくつかの D-アミノ酸が存在していることを明らかにした。特に、D-アスパラギン酸は、他の D-アミノ酸に比べてもその存在量が多いことから、今後 *T. litoralis* DSM 5473 の D-アミノ酸の生理機能を解明する上で D-アスパラギン酸が主要なターゲットとなるのではないかと考えられる。アーキアにおける D-アミノ酸の生理的な機能は未だ不分明なままであるが、本研究を足がかりにアスパラギン酸ラセマーゼの発現量解析や遺伝子破壊のようなさらなる解析が行われれば、アーキアにおける D-アスパラギン酸の生理的な機能に関する新たな知見が得られるのではないかと考えられる。

一般に、超好熱アーキア由来の酵素は高い安定性と引き換えに高温条件下でしか機能しないことが産業利用上の課題の一つとなる。*T. litoralis* DSM 5473 をはじめ *Thermococcus* 属のアーキアはその生育温度の範囲が広いことから、その酵素の適応温度の範囲も広いことが期待される。実際に *Tl-AspR* と *Tl-LASPO* を用いたアスパラギン酸定量においては、50~70°C でも両酵素の反応が進行していることが明らかとなった。しかしながら、より低温側になるにつれて、十分に反応が進行するのに必要な酵素量や反応時間が増えるのも事実である。今後のさらなる研究によって、これらの酵素の耐熱性機構が解明されることで、機能改変による反応条件の最適化が可能となると考えられる。

参考文献

- Aihara T, Ito T, Yamanaka Y, Noguchi K, Odaka M, Sekine M, Homma H, Yohda M. (2016) Structural and functional characterization of aspartate racemase from the acidothermophilic archaeon *Picrophilus torridus*. *Extremophiles*. 20(4):385-393.
- Akita H, Imaizumi Y, Suzuki H, Doi K, Ohshima T. (2014) Spectrophotometric assay of D-isoleucine using an artificially created D-amino acid dehydrogenase. *Biotechnol Lett*. 36(11):2245-2248.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410.
- Andreotti G, Cubellis MV, Nitti G, Sannia G, Mai X, Marino G, Adams MW. (1994) Characterization of aromatic aminotransferases from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *Eur J Biochem*.220(2):543-549.
- Arroyo M, Menendez M, Garcia J L, Campillo N, Hormigo D, de I, Castillon M P, Acebal C (2007) The role of cofactor binding in tryptophan accessibility and conformational stability of His-tagged D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*. *Biochim Biophys Acta* 1774:556-565.
- Bifulco D, Pollegioni L, Tessaro D, Servi S, Molla G (2013) A thermostable L-aspartate oxidase: a new tool for biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:7285-7295.
- Bohmer A, Muller A, Passarge M, Liebs P, Honeck H, Muller HG (1989) A novel L-glutamate oxidase from *Streptomyces endus*. Purification and properties. *Eur J Biochem* 182:327-332.

Braga M D, Martins A M, Amora D N, de M D B, Toyama M H, Toyama D O, Marangoni S, Alves C D, Barbosa P S, de S R, Fonteles M C, Monteiro H S (2008) Purification and biological effects of L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops insularis* venom. *Toxicon* 51:199-207.

Choi SY, Esaki N, Yoshimura T, Soda K. (1992) Reaction mechanism of glutamate racemase, a pyridoxal phosphate-independent amino acid racemase. *J Biochem* 112 (1):139-142.

D'Aniello A, Di Cosmo A, Di Cristo C, Annunziato L, Petrucelli L, Fisher G. (1996) Involvement of D-aspartic acid in the synthesis of testosterone in rat testes. *Life Sci* 59 (2):97-104.

Fadda E, Danysz W, Wroblewski JT, Costa E. (1988) Glycine and D-serine increase the affinity of *N*-methyl-D-aspartate sensitive glutamate binding sites in rat brain synaptic membranes. *Neuropharmacol* 27 (11):1183-1185.

Flachmann R, Kunz N, Seifert J, Gutlich M, Wientjes FJ, Laufer A, Gassen HG (1988) Molecular biology of pyridine nucleotide biosynthesis in *Escherichia coli*. Cloning and characterization of quinolinate synthesis genes *nadA* and *nadB*. *Eur J Biochem* 175:221-228.

Fujii T, Yamauchi T, Ishiyama M, Gogami Y, Oikawa T, Hata Y. (2015) Crystallographic studies of aspartate racemase from *Lactobacillus sakei* NBRC 15893. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 71(Pt 8):1012-1016.

Fujii T, Sato A, Okamoto Y, Yamauchi T, Kato S, Yoshida M, Oikawa T, Hata Y. (2016) The crystal structure of maleylacetate reductase from *Rhizobium* sp. strain MTP-10005 provides insights into the reaction mechanism of enzymes in its original family. *Proteins* 84:1029-1042.

Geueke B, Weckbecker A, Hummel W (2007) Overproduction and characterization of a recombinant D-amino acid oxidase from *Arthrobacter protophormiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:1240-1247.

Gogami Y, Ito K, Kamitani Y, Matsushima Y, Oikawa T. (2009) Occurrence of D-serine in rice and characterization of rice serine racemase, *Phytochemistry*, 70: 380-387.

Gogami Y, Okada K, Oikawa T. (2011) High-performance liquid chromatography analysis of naturally occurring D-amino acids in sake. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 879 (29):3259-3267.

Hahn K, Neumeister K, Mix A, Kottke T, Groger H, Fischer von Mollard G (2017) Recombinant expression and characterization of a L-amino acid oxidase from the fungus *Rhizoctonia solani*. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:2853-2864.

Isobe K, Sugawara A, Domon H, Fukuta Y, Asano Y (2012) Purification and characterization of an L-amino acid oxidase from *Pseudomonas* sp. AIU 813. *J Biosci Bioeng* 114:257-261.

Ito T, Takahashi K, Naka T, Hemmi H, Yoshimura T. (2007) Enzymatic assay of D-serine using D-serine dehydratase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Anal Biochem.* 371(2):167-172.

Kandler O and König H. (1998) Cell wall polymers in archaea (archaeobacteria). *Cell. Mol. Life Sci.* 54(4):305–308.

Kato S, Ikuta T, Hemmi H, Takahashi S, Kera Y, Yoshimura T. (2012) Enzymatic assay for D-aspartic acid using D-aspartate oxidase and oxaloacetate decarboxylase *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76 (11), 2150–2152.

Kato S, Ishihara T, Hemmi H, Kobayashi H, Yoshimura T. (2011) Alterations in D-amino acid concentrations and microbial community structures during the fermentation of red and white wines. *J Biosci Bioeng.* 111(1):104-108.

Katoh A, Uenohara K, Akita M, Hashimoto T (2006) Early steps in the biosynthesis of NAD in *Arabidopsis* start with aspartate and occur in the plastid. *Plant Physiol* 141:851-857.

Kita A1, Tasaki S, Yohda M, Miki K. (2009) Crystal structure of PH1733, an aspartate racemase homologue, from *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Proteins.* 74(1):240-244.

Kusakabe H, Midorikawa Y, Fujishima T. (1984). Methods for determining L-glutamate in soy sauce with L-glutamate oxidase. *Agricultural and Biological Chemistry* 48(1):181-184.

Leese C, Fotheringham I, Escalettes F, Speight R, Grogan G. (2013) Cloning, expression, characterisation and mutational analysis of L-aspartate oxidase from *Pseudomonas putida*. *J. Mol. Catal. B* 85-86, 17-22.

Lineweaver H, Burk D (1934) The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J Am Chem Soc* 56:658–666.

Liu L, Iwata K, Kita A, Kawarabayasi Y, Yohda M, Miki K. (2002) Crystal structure of aspartate racemase from *Pyrococcus horikoshii* OT3 and its implications for molecular mechanism of PLP-independent racemization. *J Mol Biol* 319 (2):479-489.

Long Z, Lee JA, Okamoto T, Sekine M, Nimura N, Imai K, Yohda M, Maruyama T, Sumi M, Kamo N, Yamagishi A, Oshima T, Homma H. (2001) Occurrence of D-Amino Acids and a pyridoxal 5'-phosphate-dependent aspartate racemase in the acidothermophilic archaeon, *Thermoplasma acidophilum*. *Biochem Biophys Res Commun* 281 (2):317-321.

Ma K, Robb FT, Adams MW. (1994) Purification and characterization of NADP-specific alcohol dehydrogenase and glutamate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *Appl Environ Microbiol* 60 (2):562-568.

Marinoni I, Nonnis S, Monteferrante C, Heathcote P, Härtig E, Böttger LH, Trautwein AX, Negri A, Albertini AM, Tedeschi G. (2008) Characterization of L-aspartate oxidase and quinolinate synthase from *Bacillus subtilis*. *FEBS J.* 275(20):5090-5107.

Matsui D, Oikawa T, Arakawa N, Osumi S, Lausberg F, Stähler N, Freudl R, Eggeling L (2009) A periplasmic, pyridoxal-5'-phosphate-dependent amino acid racemase in *pseudomonas taetrolens*. *Appl Microbiol Biotechnol* 83: 1045-1054.

Matsumoto M, Homma H, Long Z, Imai K, Iida T, Maruyama T, Aikawa Y, Endo I, Yohda M. (1999) Occurrence of Free D-Amino Acids and Aspartate Racemases in Hyperthermophilic Archaea. *J Bacteriol* 181 (20): 6560–6563.

Morikawa A1, Hamase K, Inoue T, Konno R, Zaitso K. (2007) Alterations in D-amino acid levels in the brains of mice and rats after the administration of D-amino acids. *Amino Acids.* 32(1):13-20.

Mot YY, Othman I, Sharifah SH (2017) Synergistic antibacterial effect of co-administering adipose-derived mesenchymal stromal cells and *Ophiophagus hannah* L-amino acid oxidase in a mouse model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-infected wounds. *Stem Cell Res Ther* 8:5.

Nagata Y, Konno R, Niwa A. (1994) Amino acid levels in D-alanine-administered mutant mice lacking D-amino acid oxidase. *Metabolism*. 43(9):1153-1157.

Nishioka M, Mizuguchi H, Fujiwara S, Komatsubara S, Kitabayashi M, Uemura H, Takagi M, Imanaka T (2001) Long and accurate PCR with a mixture of KOD DNA polymerase and its exonuclease deficient mutant enzyme. *J Biotechnol* 88:141-149.

Ohtaki A1, Nakano Y, Iizuka R, Arakawa T, Yamada K, Odaka M, Yohda M. (2008) Structure of aspartate racemase complexed with a dual substrate analogue, citric acid, and implications for the reaction mechanism. *Proteins*. 70(4):1167-1174.

Oikawa T, Tauch A, Schaffer S, Fujioka T. (2006) Expression of *alr* gene from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 in *Escherichia coli* and molecular characterization of the recombinant alanine racemase. *J Biotech* 125:503–512.

Okada H, Yohda M, Giga-Hama Y, Ueno Y, Ohdo S, Kumagai H. (1991) Distribution and purification of aspartate racemase in lactic acid bacteria. *Biochim Biophys Acta*. 1078(3):377-382.

Okada K, Gogami Y, Oikawa T. (2013) Principal component analysis of the relationship between the D-amino acid concentrations and the taste of the sake, *Amino Acids*,44, 489-498.

Patsoukis N, Georgiou CD (2004) Determination of the thiol redox state of organisms: new oxidative stress indicators. *Anal Bioanal Chem* 378:1783-1792.

Pilone S M, Pollegioni L, Casalin P, Curti B, Ronchi S (1989) Properties of D-amino-acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*. *Eur J Biochem* 180:199-204

Rosini E, Molla G, Rossetti C, Pilone MS, Pollegioni L, Sacchi S. (2008) A biosensor for all D-amino acids using evolved D-amino acid oxidase. *J Biotechnol.* 135(4):377-384.

Rudnick G, Abeles RH. (1975) Reaction mechanism and structure of the active site of proline racemase. *Biochem* 14 (20):4515-4522.

Sakuraba H, Satomura T, Kawakami R, Yamamoto S, Kawarabayasi Y, Kikuchi H, Ohshima T.(2002) L-Aspartate oxidase is present in the anaerobic hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT-3: characteristics and role in the de novo biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide proposed by genome sequencing. *Extremophiles* 6:275-281.

Sakuraba H, Yoneda K, Asai I, Tsuge H, Katunuma N, Ohshima T. (2008) Structure of L-aspartate oxidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii*. *Biochim. Biophys. Acta* 1784:563-571.

Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425.

Schell M J, Cooper O B, Snyder S H (1997) D-aspartate localizations imply neuronal and neuroendocrine roles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2013-2018.

Seifert J, Kunz N, Flachmann R, Laufer A, Jany KD, Gassen HG (1990) Expression of the *E. coli* nadB gene and characterization of the gene product L-aspartate oxidase. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 371:239-248.

Shibata K, Watanabe T, Yoshikawa H, Abe K, Takahashi S, Kera Y, Yamada RH. (2003) Purification and characterization of aspartate racemase from the bivalve mollusk *Scapharca broughtonii*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 134 (2):307-314.

Stabeli R G, Marcussi S, Carlos G B, Pietro R C, Selistre-de-Araujo H S, Giglio J R, Oliveira E B, Soares A M (2004) Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. *Bioorg Med Chem* 12:2881-2886.

Sugawara A, Matsui D, Yamada M, Asano Y, Isobe K. (2014). New enzymatic methods for selective assay of L-lysine using an L-lysine specific decarboxylase/oxidase from *Burkholderia* sp. *AIU* 395. *J Biosci Bioeng.* 119(3):369-374.

Tachibana Y, Takaha T, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T (2000) Acceptor specificity of 4- α -glucanotransferase from *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1, and synthesis of cycloamylose. *J Biosci Bioeng* 90:406-409.

Takahashi S, Furukawara M, Omae K, Tadokoro N, Saito Y, Abe K, Kera Y (2014) A Highly Stable D-Amino Acid Oxidase of the Thermophilic Bacterium *Rubrobacter xylanophilus*. *Appl Environ Microbiol* 80:7219-7229.

Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2002) Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 2:Unit 2.3

Toogood HS, Hollingsworth EJ, Brown RC, Taylor IN, Taylor SJ, McCague R, Littlechild JA. (2002) A thermostable L-aminoacylase from *Thermococcus litoralis*: cloning, overexpression, characterization, and applications in biotransformations. *Extrem* 6 (2):111-122.

Trinder P (1969) Determination of Glucose in Blood using Glucose Oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem.* 6:24-27.

Uchida Y, Hayashi H, Washio T, Yamasaki R, Kato S, Oikawa T (2014) Cloning and characterization of a novel fold-type I branched-chain amino acid aminotransferase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. CKU-1. *Extremophiles* 18(3):589–602.

Vargas L J, Quintana J C, Pereanez J A, Nunez V, Sanz L, Calvete J (2013) Cloning and characterization of an antibacterial L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cumanensis* venom. *Toxicon* 64:1-11.

Watanabe S, Tanimoto Y, Nishiwaki H, Watanabe Y. (2015) Identification and characterization of bifunctional proline racemase/hydroxyproline epimerase from archaea: discrimination of substrates and molecular evolution. *PLoS One* 10 (3):e0120349.

Webb B, Sali A. (2014) Comparative Protein Structure Modeling with MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics.* 47:5.6.1-32.

Wellner D, Meister A (1960) Crystalline L-amino acid oxidase of *Crotalus adamanteus*. *J Biol Chem* 235:2013-2018.

Yamashita T, Ashiuchi M, Ohnishi K, Kato S, Nagata S, Misono H. (2004) Molecular identification of monomeric aspartate racemase from *Bifidobacterium bifidum*. Eur J Biochem. 271:4798-4803.

Yoshikawa N, Yokoyama M (2015) Effects of high-salinity seawater acclimation on the levels of D-alanine in the muscle and hepatopancreas of kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. J Pharm Biomed Anal 116:53-58.

Zhang C, Guo Y, Xue Y. (2011) QM/MM study on catalytic mechanism of aspartate racemase from *Pyrococcus horikoshii* OT3. Theoretical Chemistry Accounts 129(6):781-791.

芦田 豊. 東條 洋介. 島田 正一郎. 岡村智恵子. 三田真史. 浜瀬健司. (2011) 皮膚における D-アミノ酸の存在とその生理活性. Bio industry,28(2):40-44.

本論文に関する報告

1. 研究論文

1) Tsubasa Washio, Shiro Kato, Tadao Oikawa.

Molecular cloning and enzymological characterization of pyridoxal 5'-phosphate independent aspartate racemase from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis* DSM 5473.

Extremophiles (5):711-721 (2016). 第一章

2) Tsubasa Washio, Tadao Oikawa.

Thermostable and highly specific L-aspartate oxidase from *Thermococcus litoralis* DSM 5473: cloning, overexpression, and enzymological properties.

Extremophiles DOI: 10.1007/s00792-017-0977-4 (2017). 第二章

3) 鷺尾 翼、老川 典夫

超好熱アーキア *Thermococcus litoralis* DSM 5473 の耐熱性アスパラギン酸ラセマーゼ及び耐熱性 L-アスパラギン酸オキシダーゼを用いた D-および L-アスパラギン酸の新規酵素定量法

Trace Nutrients Research 34 印刷中 (2017.9.28 受理) 第三章

2. 国内での発表

1) 鷺尾 翼、藤井 知実、畑 安雄、老川 典夫

超好熱アーキア、*Thermococcus litoralis* DSM 5473 のアスパラギン酸ラセマーゼホモログ遺伝子のクローニングとその遺伝子産物の酵素科学的性質

日本農芸化学会大会 仙台 (2013 年 3 月) 第一章

2) 鷺尾 翼、老川 典夫

超好熱アーキア *Thermococcus litoralis* DSM 5473 の L-アスパラギン酸オキシダーゼホモログ遺伝子のクローニングとその遺伝子産物の精製と酵素科学的性質の解明

日本生化学会大会 京都 (2014 年 10 月) 第二章

3) 鷺尾 翼、老川 典夫

超好熱アーキア *Thermococcus litoralis* DSM 5473 の L-アスパラギン酸オキシダーゼ：性質と酵素活性の反応速度論的解析

日本農芸化学会大会 岡山 (2015 年 3 月) 第二章

4) 鷺尾 翼、老川 典夫

Thermococcus litoralis DSM 5473 の耐熱性 L-アスパラギン酸オキシダーゼの分子特性の解析

日本ビタミン学会大会 奈良 (2015 年 6 月) 第二章

5) 鷺尾 翼、老川 典夫

Thermococcus litoralis DSM 5473 由来アスパラギン酸ラセマーゼと L-アスパラギン酸オキシダーゼを用いた D-および L-Asp の定量

D-アミノ酸学会学術講演会 高知 (2016 年 9 月) 第三章

6) 鷺尾 翼、老川 典夫

食品中の D-アスパラギン酸定量への応用を目的とした D-アスパラギン酸の
酵素定量法の開発

日本微量栄養素学会学術集会 大阪 (2017 年 6 月) 第三章

謝辞

本研究を行うにあたり、多大なる御教示と終始懇切なるご指導を賜りました老川 典夫教授に心から厚く御礼申し上げます。また、熱心なご助言承りました、山中 一也准教授に深く御礼申し上げます。本論文の作成に当たり、有益なご助言いただきました関西大学 化学生命工学部 生命・生物工学科の長谷川 喜衛 教授、松村 吉信 教授に深く感謝いたします。また、多大なご指導、ご助言を頂いた関西大学 化学生命工学部 生命・生物工学科の諸先生方に深くお礼申し上げます。

また、本実験を進めるにあたり、様々な面でご助言して頂きました、香川大学 国際希少糖研究機構の加藤 志郎 助教、サーモフィッシュャーサイエントフィック株式会社の内田 悠喜 氏ならびにその他の酵素工学研究室(旧生体分子工学研究室)の皆様に感謝申し上げます。