

超好熱菌酵素を素子とするバイオセンサーの開発: ポリアミン関連酵素の機能解析
とD-プロリン脱水素酵素機能電極センサーの開発

郷田秀一郎¹ 藪谷智規² 櫻庭春彦¹ 本仲純子² 大島敏久^{1*}

Development of Biosensors Using Hyperthermophilic Enzymes as an Element:
Functional Analysis of Polyamine Metabolizing Enzymes and Development for Enzyme
Electrode Sensor Using D-Proline Dehydrogenases

by

Shuichiro GODA, Tomoki YABUTANI, Haruhiko SAKURABA, Junko MOTONAKA, and
Toshihisa OHSHIMA*

An amperometric enzyme sensor give us higher sensitivity and specificity for the substrate determination. In spite of advantages of enzyme sensor, many enzymes so far found have been too labile to use as biosensor elements in artificial circumstances for a longer period. Hyperthermophiles, which can grow above 90 °C, have been known to produce much more stable enzymes under various artificial conditions. In this work, we carried out screening, biochemical characterization and improvement of production for hyperthermostable enzymes which are more useful as the elements in the biosensors. We focused on the polyamines as one of the substrates of biosensors. Polyamines have been known to play many important roles in cell proliferation, differentiation and transformation. The concentration of the polyamines together with their acetyl conjugates remarkably increases in the biological fluids and the affected tissues of cancer patients. Therefore, their polyamines are listed as tumor markers. Gas and ion chromatographies have been so far used for polyamine determination, but have some problems from the aspects of high sensitivity and easy operation. Thus, we here developed biosensors using hyperthermostable enzymes for polyamine determination. Such enzyme sensors are more useful for the simple and rapid determination of polyamines and application for clinical analysis and food analysis. In addition, we tried the construction of biosensor using the hyperthermophilic enzyme, D-Proline dehydrogenase. As the results, we found the thermostable agmatinase and spermidine dehydrogenase in hyperthermophiles, *Pyrococcus horikoshii* and *Sulfolobus tokodaii*, respectively. We succeeded the construction of novel amperometric sensor for D-proline determination using D-Proline dehydrogenase derived from *Pyrobaculum islandicum*.

Keywords: enzyme sensor, hyperthermophile, dehydrogenase, polyamine

¹徳島大学工学部生物工学科

Department of Biological Science and technology,
Faculty of Engineering, The University of Tokushima

²徳島大学工学部化学応用工学科

Department of Chemical Science and technology,
Faculty of Engineering, The University of Tokushima

*連絡先: 〒770-8506 徳島市南常三島町2-1

徳島大学工学部生物工学科

1. 緒言

有機化合物や生体関連物質などの計測は、病気の診断、食品や化学工業プロセスの制御、環境保全などのために、広範囲に利用され、極めて重要な手段となっている。これらの化合物を迅速かつ簡便に測定するセンサーの開発が要望されている。近年、生体分子のもつ物質の高い認識性を利用した各種計測デバイスの研究開発が注目されている。酵素は高い触媒能を備えていると同時に、特定の基質と反応する基質特異性を有しているため測定対象物質の選択性に優れている。しかし、酵素は一般に生産性が低く、安定性に欠けるため、酵素を素子として使い捨てる方式で、長期間にわたり安定に用いることは容易でない。そこで無機あるいは有機担体に固定化することにより、より安定に、繰返し利用を達成する必要がある。固定化した酸化還元酵素と信号変換機(トランジェンサー)を組み合わせることにより、電気化学的に生体関連物質の濃度を選択的かつ迅速に測定する酵素センサーが開発できる。

近年、温泉、高塩濃度の塩水湖、砂漠、海底など極限環境下でも生育する微生物が存在することが明らかとなり、それらの中には、超好熱菌と呼ばれる 100 以上の温度で生育可能な菌も単離されている。超好熱菌の生育限界温度は現在の生命の限界温度であり、その生体構成分子の耐熱、好熱化機構は極めて興味深い。超好熱菌は高度耐熱性のタンパク質を生産しており、新規ポリアミン及び産業上有用性の高い安定酵素の分離源と

して期待できる。

本研究ではポリアミンの酵素分析法の開発を進めた。ポリアミンは低分子の窒素を含む塩基性物質であり、真核細胞・原核細胞を問わず、細胞内ではMg²⁺やATPとともに低分子物質として最も多く含まれている(10~20 mg)。分子の中心にアミンを多く含むため、ポリアミンと名付けられている。ポリアミンは 2 分子のアミンを含む Putrescine、3 分子のアミンを含む Spermidine、4 分子のアミンを含む Spermine などの総称である。通常、原核細胞は Putrescine と Spermidine を多く含み、真核細胞は Spermidine と Spermine を多く含んでいる。ポリアミンはその身軽さと塩基性を持つことから細胞内に存在する多くの酸性高分子物質(核酸・酸性蛋白質・リン脂質など)と非常に弱く結合し、細胞増殖・細胞分化などに関与することが知られている。⁽¹⁾⁽²⁾ そのために、ポリアミンは、病気や食品の鮮度などの診断にマーカーとなる。ポリアミン合成経路の中間物質の一つに Agmatine が存在する。Agmatine は魚介類が腐敗したときに生じる腐敗アミンの一つであり、その定量によって魚介類の鮮度を客観的に評価することができる。Agmatinase はポリアミン合成に関与する酵素の一つであり、Agmatine を Putrescine と Urea に加水分解する(図1)。それ故、同酵素を利用した魚介類鮮度センサーの作製が可能である。

一方、近年、がん患者の尿中にポリアミンが増加すると報告され、増殖の早いがんを持つ患者ほど、尿中に多量のポリアミンを排出することが判明している。⁽³⁾⁻⁽⁵⁾ さらに、転移性の悪性がんに罹患した場合、非転移性のがんの場合よりもポリアミン合成が著しく亢進する。それ故、ポリアミンの定量はがんの早期発見につながるものと期待されている。現在の最も信頼性が高く汎用されているポリアミンの定量法は、ポリアミンを細胞より強酸で抽出し、直接高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析する方法である。陽イオン交換力

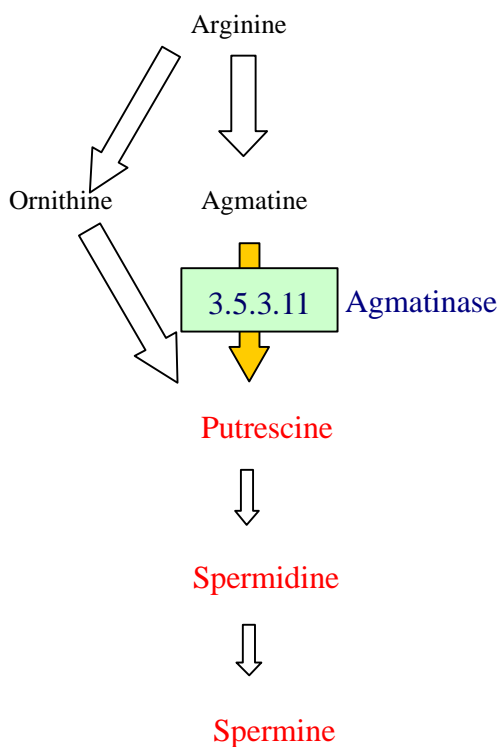


図1 ポリアミン代謝経路

ラムを用い、最初にアミノ酸を溶出し、ついで Putrescine, Spermidine, Spermine の順で溶出する。その後、o-フタルアルデヒドとポリアミン中のアミノ基を反応させ、蛍光性ポリアミン誘導体を定量する。蛍光法のため測定感度は優れているが、1回の定量に約40分を要し、1日せいぜい36本が限界で、多くのサンプルの検査を行うためには数日を必要とする。さらに、尿中ポリアミン量は個人差が大きいために、基準となる正常時における各個人のポリアミン濃度を予め知っておく必要がある。そのため、家庭や屋外などにおいて簡便かつ安価にポリアミンを測定する手法と装置の開発が期待されている。本研究では、ポリアミン測定用センサー素子として有用な酵素を開発するために、超好熱菌由来の新規ポリアミン代謝酵素のゲノム情報探索を行いポリアミン合成酵素の一つである Agmatinase を見出した。その機能解析、遺伝子クローニングによる生産性の改良を行った。

我々は超好熱菌由来酸化還元酵素の機能解析

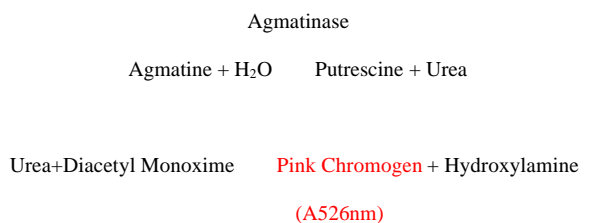
から、*Pyrobaculum islandicum* 由来 D-Proline dehydrogenase (以後 D-ProDH) を既に見出している。本酵素は色素依存性の膜結合性脱水素酵素としては、例外的に高い安定性を有している。そこで、同酵素の高い安定性を活かし、D-アミノ酸測定用電極型バイオセンサーの作製を行った。

この酵素電極型センサーは、電気化学的に簡便に生体物質の測定ができることと、装置のチップ化が期待できるために、将来的にナノセンサーの開発モデルになることが期待できる。これは、ポリアミン測定用バイオセンサーチップの開発のために、先導的技術になる。

2. 実験方法

超好熱菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来 Agmatinase の単離・精製・機能解析⁽⁶⁾

全ゲノム配列が決定されている *P. horikoshii* のゲノム情報から、相同性検索によって Agmatinase をコードすると予想される ORF (PH0083) を見いだし、大腸菌を宿主に用いた発現系の構築を行った。大腸菌 BL21(DE3) codon plus-RIL で生産された PH0083 産物は菌体内で不溶性顆粒として得られたため、変性剤(GuHCl)を用いて可溶化し、巻き戻しを行った。酵素活性は反応の際に生じる Urea を定量することによって測定した。反応式を以下に示す。



好気性超好熱菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来 Spermidine dehydrogenase (SpeDH) の単離

S. tokodaii のゲノム情報に基づき、SpeDH をコードすると予想される ORF(ST1293) を相同性検索より見いだし、大腸菌を宿主に用いた発現系を構築した。大腸菌 BL21(DE3)pLysS で生産された

SpeDH は菌体内で不溶性顆粒として得られたため、変性剤(GuHCl)を用いて可溶化し、巻き戻しを行った。

電気化学的測定

各種電気化学測定および解析には電気化学測定装置 BAS-50W (ピーエーエス)を用いた。電極は、作用電極にはグラッシーカーボン電極(GCE, 電極径 3mm)および酵素固定修飾金電極 (D-ProDH immobilized OT-Au electrode) を使用した。対極には白金線、参照極には Ag|AgCl(sat.KCl)電極を用いる三電極方式を採用した。電極はサンドペーパー、ダイヤモンド、アルミナの順に研磨し、純水、アセトンで洗浄後、測定に使用した。酵素固定化電極の作製は以下の手順で行った。⁽⁷⁾硫酸研磨を施した Au 電極を、2 mol dm⁻³ KOH 中で 1 時間洗浄(80)し、さらに、0.5 mol dm⁻³ HNO₃ で 30 分間超音波洗浄した。この電極を 10 mmol dm⁻³ オクタンチオール (OT) のエタノール溶液中で Au 電極を室温下で 6 時間浸漬した後、D-ProDH を含む溶液に 4 下で Au 電極を一晩浸漬した。

D-ProDH はすでにその機能解析の結果を報告している。⁽⁸⁾ D-Proline, Potassium chloride は関東化学製を用いた。メディエータとしてベンゾキノン(キシダ化学)、2,6 - ジクロロインドフェノール(DCIP, 関東化学)、ヒドロキノン(石津製薬)、フェリシアン化カリウム (K₃Fe(CN)₆, 和光純薬), [Os(bpy)₃]Cl₂, フェロセンカルボン酸(東京化成)を使用した。

測定溶液は特に指定がない場合は、100 mmol dm⁻³ KCl(15分間窒素バブリング)を含む pH 7.0 リン酸緩衝液(PBS)で行った。電気化学測定にはサイクリックボルタンメトリー(CV)、を用いた。

実験結果及び考察

P. horikoshii 由来の Agmatinase の機能解析

P. horikoshii の全ゲノム配列から Agmatinase に相同性を示す ORF を見出した(図 2) その結

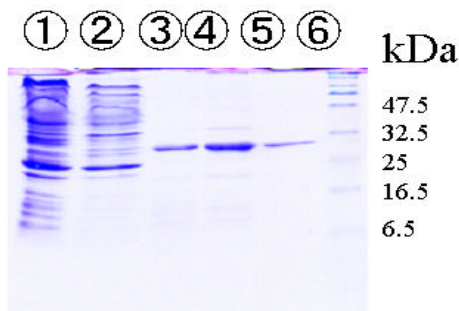
果、ORF ID:PH0083 のアミノ酸配列がヒト、及び大腸菌等の Agmatinase の配列と約 30%の相同性を示したので、この ORF が Agmatinase をコードしていると推定した。大腸菌 Agmatinase の活性発現に重要な役割を果す 153 番目の残基のアスパラギン酸残基は、他の生物種の本酵素と同様、PH0083 の ORF にも保存されている(図 2)。



図 2 Agmatinase 遺伝子の相同性検索

宿主に大腸菌を用い、遺伝子 PH0083 の発現の確認を行った。組換え体大腸菌細胞の細胞抽出液を遠心分離した上清の可溶性画分に本酵素は認められず、遠心分離後の沈殿の不溶性顆粒である封入体から本酵素を見出した(図 3)。

次に、変性剤の GuHCl で本酵素の封入体を可溶化し、巻き戻しを行った(図 4)。その操作は、まず 酵素の 50 倍量(モル)β-メルカプトエタノール(β-ME)によって、変性剤で可溶化させた酵素のジスルフィド結合を切断し還元変性状態にさせた後、その溶液を図 4 に示すような巻き戻し溶液に滴下する。その後希釈によって塩酸グアニジン濃度を低下させ、巻き戻しを完了する。巻き戻し溶液を濃縮・透析し、その後、ゲル濾過を行い、精製酵素とした。精製の結果、培溶液 1L 当たり 225 mg の Agmatinase を高効率で得ることができた。本酵素の分子質量はゲル濾過法によって 145kDa、SDS-PAGE 法により 34 kDa であったことから、本酵素はホモ 4量体構造をとることが明らかとなった。大



- ①菌体超音波破碎後上清(pET15bのみ)
- ②菌体超音波破碎後上清(pET15b/PH0083)
- ③菌体超音波破碎後沈殿
- ④菌体超音波破碎後沈殿
- ⑤封入体巻き戻し後
- ⑥分子量マーカー

図3 大腸菌での発現の SDS-PAGE を用いた確認

腸菌の本酵素は分子量 80kDa の 2 量体構造をとることが報告されており P. horikoshii の本酵素は異なるサブユニット構造をとることがわかった。

本酵素活性に対する 2 価の金属カチオンの要求性を調べたところ、ヒトや大腸菌の本酵素では、 Mn^{2+} が活性に最も有効であるのに対し、本酵素では、 Mn^{2+} よりも Co^{2+} や Ca^{2+} で高い活性が認められた。酵素活性の最適 pH は 11 付近であった。この pH は大腸菌やマウスの酵素の最適 pH 8 よりもかなり高い。本酵素の酵素活性及び安定性に対する熱の影響を調べた結果、酵素活性は 50 以上の温度では、温度の上昇と共に 100 まで直線的に上昇するので最大活性は 100 以上の高温にあると

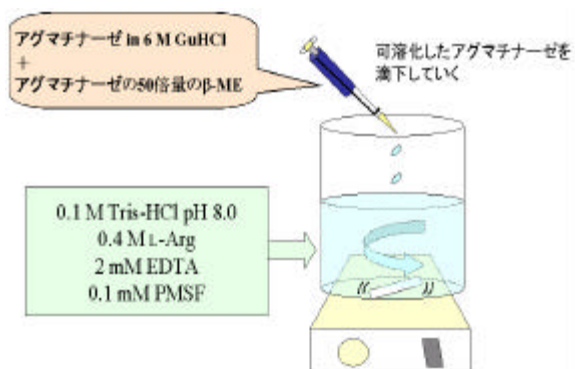


図4 変性 Agmatinase の希釈による巻き戻し法

予想される。酵素の熱安定性を測定するために、酵素液を 50 以上の色々な温度で 10 分間処理した後に、残存活性を測定した。80 まで酵素活性の低下は見られず、それ以上高温では失活が始まり、90 では約 50% の残存活性が見られた。本酵素は非常に高い耐熱性を示すことが分かった。Agmatinase 活性は典型的なミカエリスメンテンタイプの反応を示し、Lineweaver-Burk plot より、Agmatine に対する K_m は 0.53 mM であった。本酵素は 80 の高温でも失活しない既知の本酵素の中で最も耐熱性の高く、センサー用酵素として優れた性質を有することが判明した。

S. tokodaii 由来 SpeDH の単離

ゲノム情報から超好熱菌 *S. tokodaii* より、SpeDH 活性を持つ酵素をコードすると推定される遺伝子を見いだした。その遺伝子を Agmatinase と同様に発現系を構築し、産物を不溶性顆粒として得た。得られた不溶性顆粒はアグマチナーゼと同様に希釈法で巻き戻し、SpeDH 活性の確認を行った。その結果、産物より SpeDH 活性を見出した。現在、精製と機能解析を進めている。

D-proDH を用いたバイオセンサーの作製

D-proDH に対する最適メディエーターの検討

D-ProDH に対する最適電子メディエーターの検討を行った。測定溶液は 1 mmol dm^{-3} 電子メディエーター、支持電解質 100 mmol dm^{-3} KCl および $25 \mu\text{l}$ D-ProDH を含む pH 7.07 リン酸緩衝液 (PBS) に、基質として 20 mmol dm^{-3} D-Proline 添加した溶液を CV (サイクリックボルタロメトリ) 法で測定した。電子メディエーターは、一般的に酵素電極に用いられるベンゾキノン (BQ)、2,6 - ジクロロインドフェノール (DCIP)、ヒドロキノン (HQ)、フェリシアン化カリウム (K_3FeCN_6)、 $[Os(bpy)_3]Cl_2$ 、フェロセンカルボン酸 (FCA) について検討した。

その結果、BQ および DCIP に関しては触媒酸

化波が確認されたが、それ以外のメディエータでは確認されなかった。BQ および DCIP を用いた場合のサイクリックボルタモグラムを図5に示す。これらのメディエーション効果の原因としては、比較的分子サイズが小さく、2電子2プロトン電子移動が可能なBQおよびDCIPが良好なメディエーション効果を発現している。分子サイズの大きな電子メディエータであるオスmium錯体、 K_3FeCN_6 は、比較的分子量のD-ProDHの

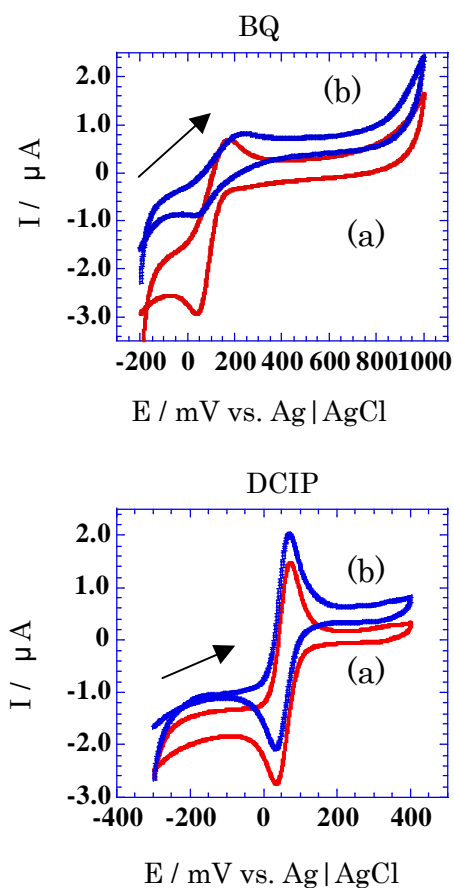


図5 電気触媒酸化のサイクリックボルタモグラム。基質にはD-Prolineを用い、GC電極にBQとDCIPを含む。試料：pH 7.07 PBS中に1 mmol dm^{-3} BQ もしくはDCIP、100 mmol dm^{-3} KCl, 20 mmol dm^{-3} D(+)-proline (50)。 (a)25 μl D-Pro DHなし(b)25 μl D-Pro DHあり。走査速度は10 $mV s^{-1}$

活性部位に接近できなかったと考えられる。フェロセンカルボン酸、ヒドロキノンについては還元体であるために、酵素（酸化/還元）-メディエータ-（還元/酸化）-電極間での電子伝達のスキームが起こらなかったと考えられる。

温度の影響

酵素の反応速度は、一般にある温度に最大値を持つことが知られており、この温度は最適温度と呼ばれている。これは酵素反応の速度自身が、一般の化学反応の場合と同じく温度の上昇とともに Arrhenius の式に従って増大するという事実と、一方、酵素タンパク質が熱変性を起こして失活するという現象が、ある温度以上で急激に顕著になるといわれている。そこで、D-ProDH 固定化電極を用いて温度依存性の検討を行った。作用電極には D-ProDH 固定化電極を使用した。測定溶液には支持電解質 100 mmol dm^{-3} KCl および 1 mmol dm^{-3} BQ を含む pH 7.07 の PBS を用いた。温度 20 ~ 69 の範囲において、20 mmol dm^{-3} D-プロリンを添加したときの触媒酸化電流値を測定した(図6)。温度の上昇とともに、酸化電流値の直線的増加が 70 まで確認でき、酵素活性の温度依存性が電流値から測定でき、70 の高温で酵素電極が機能することが分かった。なお、遊離状態の本酵素の場合、活性の温度依存性も同様な直線的依存性を示し、最大活性は 70 であることから、⁽⁸⁾固定化酵素電極においても同様な酵素反応が起こり、それが良好に電気化学的に検出できることを示している。

D-ProDH 固定化電極を用いるアンペロメトリック D-Pro 定量と D-Pro の K_m の算出

D-ProDH 固定化電極を用いるアンペロメトリックな測定法による酵素活性の D-Pro 濃度依存性を決定した(図7)。電流値(酵素活性)と D-Pro の間には典型的なミカエリス-メンテンタイプの関係が認められた。これからも、D-ProDH 固定化電極反応が良好に行われてい

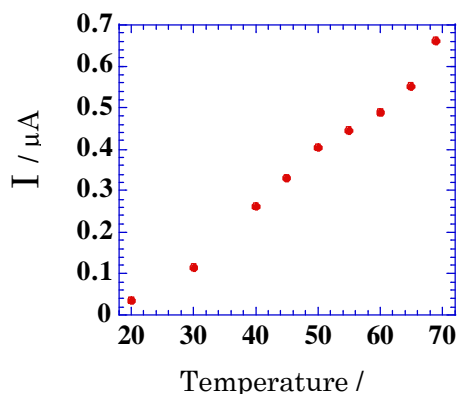


図6 D-proline センサーの電気触媒酸化電流値の温度による影響。D-ProDH は OT-Au 電極に固定化した。

試料：pH 7.07 PBS 中に 100 mmol dm⁻³ KCl, 1 mmol dm⁻³ BQ, 20 mmol dm⁻³ D-proline を含む。

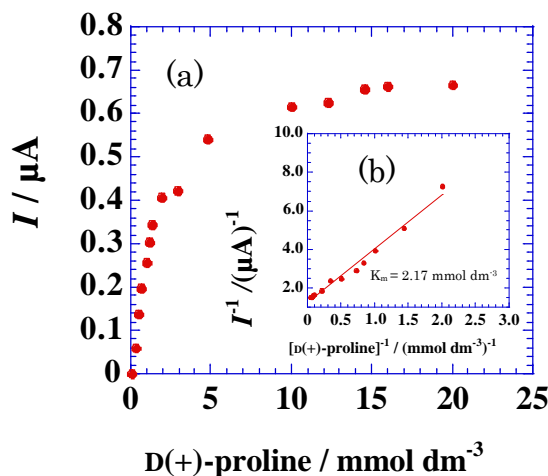


図7 D-proline のアンペロメトリック測定。D-ProDH : OT-Au 固定化電極 (a)、Lineweaver-Burk plot (b)

試料：pH 8.0 PBS 中に 100 mmol dm⁻³ KCl と 1 mmol dm⁻³ BQ を含む (50)。

ることが分かる。また、図7の挿入図の Lineweaver-Burk プロットにより算出された D-Pro に対する K_m 値は 2.17 mmol dm⁻³ (2.17mM) であった。遊離酵素の D-Pro に対する K_m は 4.2mM であるので、固定化酵素の D-Pro に対する K_m がより小さいことになり、基質に対する親和性が少し高いことが判明した。D-Pro 濃度と電流値の直線関係から本酵素電極センサーで測定できる D-pro は 0.20-5.00 mM であった。

結言

本研究により、未だ不分明である超好熱アーキアのポリアミン関連酵素のうち、*P. horikoshii* 由来 Agmatinase と *S. tokodaii* 由来 SpeDH を見いだした。Agmatinase は酵素学的諸性質を解明し、今後、魚介類の鮮度を測定する応用面での展開が期待できる。SpeDH は、今後酵素学的諸性質の解明を行い、バイオセンサーの構築を行う予定である。超好熱菌由来酵素のバイオセンサー作製例として、耐熱性膜酵素である D-ProDH のセンサー構築に成功した。この結果は超好熱菌由来酵素の高

い安定性を活かすことによって、室温から 70 の高温まで利用可能な酵素電極バイオセンサーが開発できた。このような膜酵素をセンサー素子として利用する酵素機能電極型バイオセンサーの開発は、これが最初であり、今後の実用化に向けての展開が期待できる。

本研究は平成15年度徳島大学工学部研究プロジェクトの補助を得て行った。記して感謝の意を表す。

参考文献

- 1) A. E. Pegg and P. P. McCann, *Am. J. Physiol.*, **243**, C212. (1982).
- 2) A. E. Pegg, *Biochem. J.*, **234**, 759. (1986).
- 3) D. H. Russel, *Nat. New Biol.*, **233**, 144. (1971).
- 4) J. W. Suh, S. H. Lee, B. C. Chung, J. and Park, *J. Chromatogr. B*, **688**, 179. (1997).
- 5) M. Bandyopadhyay, and A. K. Ganguley, *Med. Sci. Res.*, **27**, 645. (1999).
- 6) S. Goda, H. Sakuraba, and T. Ohshima, *Biochim. Biophys. Acta*, in press (2005).

- 7) M. Darder, E. Casero, F. Parient, and E. Lorenzo,
Anal. Chem., **72**, 3784-3792. (2000).
- 8) T. Satomura, R. Kawakami, H. Sakuraba, and T.
Ohshima, *J. Biol. Chem.*, **277**, 12861-12867.
(2002).