

---

総合論文

---

超好熱アーキアの FAD 依存性脱水素酵素複合体及び  
PLP 依存性アミノ酸ラセマーゼの研究\*

徳島大学大学院社会産業理工学研究部生物資源産業学域

川上 竜巳\*\*

Vitamins (Japan), **93** (12), 531-541 (2019)

**FAD-dependent dehydrogenase complexes and PLP-dependent  
amino acid racemases from hyperthermophilic archaea**

Ryushi Kawakami

Division of Bioscience and Bioindustry, Graduate school of Technology, Industrial and Social Sciences,  
Tokushima University, 2-1, Minamijosanjima-cho, Tokushima, Japan

We have paid much attention to screen and characterize enzymes from hyperthermophiles for analysis of their metabolic pathways of amino acids and utilization of the enzymes as the functional element for biosensor. In this review, we introduce two kinds of enzymes, FAD-dependent L-proline dehydrogenase complex and PLP-dependent amino acid racemase, from hyperthermophilic archaea. Two different FAD-dependent L-proline dehydrogenase activities were detected in the screening process of stable dye-linked dehydrogenase as specific element for electrochemical biosensor. The first enzyme found in *Thermococcus profundus* formed  $\alpha\beta\gamma\delta$  structure with not only proline dehydrogenase activity but also NADH dehydrogenase activity. We have succeeded in the construction of DNA sensing system using this enzyme. The second one from *Pyrococcus horikoshii* formed  $\alpha4\beta4$  structure and had FAD, FMN, ATP and Fe as cofactors. On the other hand, PLP-dependent amino acid racemase with broad substrate specificity was found in the process of investigation into D-amino acid utilization in the growth of *P. horikoshii*. Furthermore, we found another amino acid racemase specific for Ala and Ser by functional analysis of the homologs of the amino acid racemase. Because the genes of both dehydrogenases and racemases are widely conserved in the genomes of *Pyrococcus* and *Thermococcus* species, these enzymes may play important roles in the amino acid metabolisms.

**Key words:** Hyperthermophilic archaea, L-proline dehydrogenase complex, amino acid racemase, flavin cofactor, Pyridoxal-5'-phosphate

(Received August 27, 2019)

---

\*本論文は日本ビタミン学会第71回大会(2019.6.7~8, 鳥取市)における奨励賞受賞講演を総合論文としてまとめたものである。

\*\*〒770-8513 徳島県徳島市南常三島町2-1 徳島大学生物資源産業学域 E-mail: kawakami@tokushima-u.ac.jp

## 1. はじめに

現在広く受け入れられている生命の系統学的分類法は、1990年に Carl Woese によって提唱された、生命を真核生物、真正細菌及びアーキア(古細菌)の3つのドメインに分類する3ドメイン説である<sup>1)</sup>。アーキアは真正細菌と同じ原核生物であるが、細胞膜がsn-グリセロール-1-リン酸のイソプレノイドエーテルにより構成されている点で根本的に異なっており(真正細菌や真核生物はsn-グリセロール-3-リン酸の脂肪酸エステル構造)、16S rRNA 配列による分子生物学的な系統解析においても、真正細菌や真核生物とは大きく異なる生命であることが明らかになっている<sup>2)</sup>。このような特徴からアーキアには他の生物にはない特殊な代謝系や酵素の存在が期待されており、実際に糖代謝などにおいてアーキア特有の酵素も発見されている<sup>3)</sup>。他方、高温、高塩濃度、酸性・アルカリ性などの極限環境から発見される一群の微生物が存在する。海底の熱水噴出孔や温泉の源泉などから発見される、80℃以上で良好に生育できる微生物は超好熱菌と呼ばれ、生産する酵素は熱やpH、有機溶媒などに対して高い耐性を示すことから、応用展開可能な酵素を検索するための微生物資源にもなっている。これまで見つかった超好熱菌のほとんどはアーキアであり、応用展開可能な新奇酵素を有していることが期待できる。

著者はこれまで、超好熱アーキアのアミノ酸代謝に関する酵素を中心に研究を進め、多くの新規知見を明らかにしてきた<sup>4)-12)</sup>。その中で、バイオセンサー用素子として利用可能な色素依存性脱水素酵素のスクリーニング過程で見いだした2種類のFAD依存性L-プロリン脱水素酵素複合体と、超好熱アーキアの増殖におけるD-アミノ酸酸化性を解析する過程で発見したPLP依存性アミノ酸ラセマーゼに関する研究成果に対して、2019年度日本ビタミン学会奨励賞を受賞した。本稿では、これらの酵素の発見の経緯、機能や構造の解析、応用展開などについて紹介する。

## 2. FAD 依存性脱水素酵素複合体に関する研究

酸化還元酵素はアミノ酸、有機酸、糖、アルコール、アミンなどの電子供与体と電子受容体間の可逆的な電子授受を伴う酸化還元反応を触媒し、NAD(P)、FAD、FMN、PQQなどの補酵素を電子受容体とする脱水素酵素や還元酵素、酸素を電子受容体とする酸化酵素(オキシダーゼ)や酸素添加酵素(オキシゲナーゼ)などに分類される。これらの中で、NAD(P)を補酵素とする脱水素酵素は多くの種類が知られていて、グルコース脱水素酵

素やL-グルタミン酸脱水素酵素のように、酵素化学的な基礎研究に加えて、バイオセンサー用素子として利用するための応用研究が進んでいるものもある<sup>13)14)</sup>。しかし、NAD(P)依存性脱水素酵素のバイオセンサー用素子としての利用には、補酵素の固定化やNAD(P)を再生する必要があるなどの問題があった。一方で、NADH脱水素酵素、コハク酸脱水素酵素などのように、酵素分子内に結合するFADやFMNなどのフラビンを電子受容体とする一群の脱水素酵素が存在する<sup>15)16)</sup>。これらのFAD依存性脱水素酵素は人工の酸化還元色素である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などを用いて活性測定するため、色素依存性脱水素酵素(Dye-DH)とも呼ばれる。電気化学的な測定を基盤とするセンサーではこれらの酸化還元色素をメディエータとして利用できるので、Dye-DHを機能性素子とするバイオセンサーを構築することができる<sup>17)</sup>。しかし、既知のDye-DHは膜結合性酵素であることが多く、膜から可溶化すると不安定化するために機能性素子としての応用開発だけでなく、酵素化学的な機能や構造の解析も進んでいなかった。先述したように、超好熱菌の酵素であれば膜結合性でも温度、pH、有機溶媒などに対して高い耐性を備えている場合が多く<sup>18)</sup>、常温菌では不安定な色素依存性脱水素酵素も超好熱アーキアの酵素なら安定であることが期待できる。そこで、*Pyrococcus*属や*Thermococcus*属が属するThermococcales目の超好熱アーキアを中心にDye-DHのスクリーニングを試みた。

### 2-1. 2種類のFAD依存性L-プロリン脱水素酵素の発見

Thermococcales目を中心に、数種類の超好熱アーキアの培養菌体から粗酵素液を抽出し、活性染色法によりDye-DH活性をスクリーニングした。アミノ酸や有機酸などを基質として検索した結果、いくつかの菌からL-プロリンを基質とするDye-DH活性を検出できた(図1)。一般に膜酵素はポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動では濃縮ゲルと分離ゲルとの境界で発色するが、今回の解析ではいずれも分離ゲルの中で発色しており、可溶性のDye-DHであると考えられた。また、*P. horikoshii*や*T. peptonophilus*においては活性バンドが2種類検出できた。著者らはまず、粗酵素液中の比活性が最も高く、1種類の活性バンドしか示さなかった*T. profundus*の酵素(TpProDH)について、精製を試みた<sup>4)</sup>。精製の結果、TpProDHは4種類のサブユニット( $\alpha$ : 54,  $\beta$ : 43,  $\gamma$ : 19,  $\delta$ : 11 kDa)からなることが分かり、その分子質量は約120 kDaであることから、 $\alpha\beta\gamma\delta$ 構造の複合体酵素であることが分かった。TpProDHは70℃10分間の熱処理でも失活することなく、

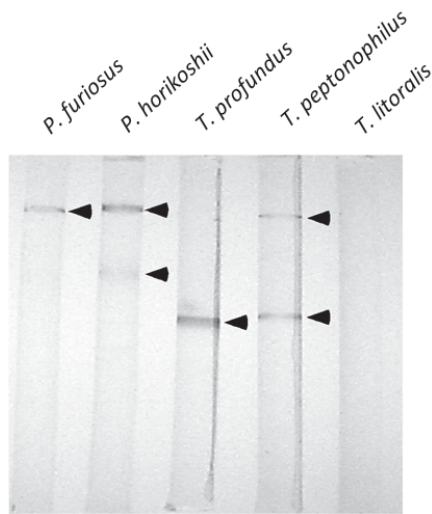


図1 活性染色法による ProDH 活性の検出

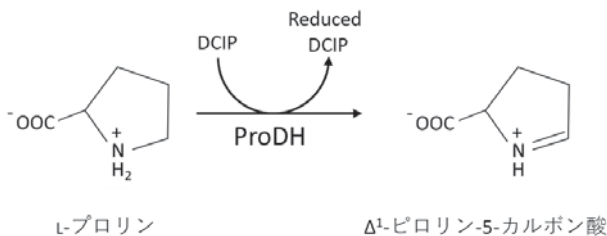


図2 ProDH の反応式

pH 4 ~ 10 の広い範囲で安定であった。本酵素は L-プロリンを特異的な基質として  $\Delta^1$ -ピロリン-5-カルボン酸を生成した(図2)。他の L-アミノ酸をはじめ、L-ヒドロキシプロリン、D-プロリンなどの類似体へは反応性を全く示さなかった。

## 2-2. $\alpha\beta\gamma\delta$ 型 L-プロリン脱水素酵素複合体の機能と構造

*T. profundus* のゲノム DNA から遺伝子クローニングを行い、各サブユニット遺伝子のすべてが含まれている、約 5.8 kbp のゲノム DNA 断片を得ることに成功した<sup>5)</sup>。シーケンス解析の結果、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  の各サブユニット遺伝子 (*pdhA*, *pdhB*, *pdhF*, *pdhX*) は *pdhA*-*pdhF*-*pdhX*-*pdhB* の順でクラスターを形成しており、現在ゲノム情報が公開されている 36 種類の Thermococcales 目超好熱アーキアのすべての種に、類似の遺伝子クラスターが保存されていた。このことは、本酵素が Thermococcales 目において重要な生理的役割を担っていることを示唆している。

次に 4 種のサブユニットの単独発現系を構築して、各サブユニットの機能解析を行った。まず、どのサブユニットに ProDH 活性があるかを解析した。一次構造解析の結果、 $\alpha$  サブユニットに 2 つ、 $\beta$  サブユニット

に 1 つの Rossmann-fold 型 FAD 結合ドメインが認められることから、それぞれの ProDH 活性について検討したところ、 $\beta$  サブユニットから検出できた。このことは、酵素は複合体として存在するものの、ProDH 活性自体はサブユニット単体で触媒できることを示している。単独で発現させた  $\alpha$  サブユニットにも FAD が結合しており、2 つあるドメインのうちの 1 つと結合していることが予想できた。Rossmann-fold 型 FAD 結合ドメインは NAD との結合にも関与していることから、NADH や NADPH に対する酵素活性を測定した結果、 $\alpha$  サブユニットから色素依存性 NADH 脱水素酵素 (NADHDH) 活性が検出できた。この活性は複合体酵素からも検出されることから、1 種類の複合体酵素が 2 種類の酵素活性 (ProDH 及び NADHDH) を示すことを明らかにした。これまでに 1 つの酵素が 2 種類の連続した酵素反応を触媒できるものは見いだされている。例えば、PutA (プロリンオキシダーゼ) は、本酵素と同様に L-プロリンから  $\Delta^1$ -ピロリン-5-カルボン酸への FAD 依存性の酸化活性と  $\Delta^1$ -ピロリン-5-カルボン酸から L-グルタミン酸への NAD 依存性の脱水素酵素活性を併せ持っている<sup>19)</sup>。しかし、本酵素のように L-プロリンと NADH の 2 種類の基質の脱水素酵素活性を持つ複合体酵素は本酵素が最初の例である。 $\gamma$  サブユニットには 2 つの [4Fe-4S] 型鉄イオウクラスターが含まれており、フェレドキシン様電子伝達タンパク質であることが分かった。 $\delta$  サブユニットの機能についてはまだよくわかっていないが、その一次構造は後述する *P. horikoshii* の  $\alpha 4\beta 4$  型 ProDH 複合体の  $\alpha$  サブユニットの C 末端アミノ酸配列と類似しており、この部分は [Fe-4Cys] 型の Cys クラスターを含む電子伝達ドメインであることが構造解析から分かっている。以上の結果から、TpProDH は L-プロリン脱水素酵素、NADH 脱水素酵素および 2 種類の鉄硫黄クラスター含有電子伝達タンパク質で構成される新規複合体酵素であることが判明した(図3)。この酵素複合体が菌体

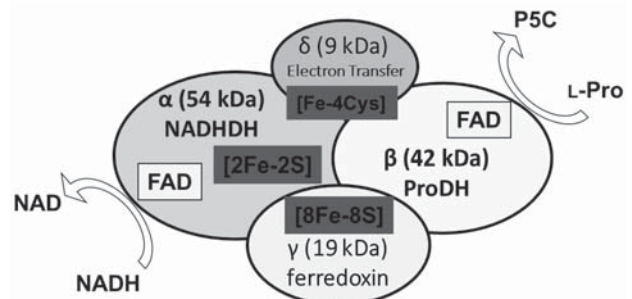


図3 TpProDH の構造模式図

内でどのような生理的役割を担っているかについてはまだよくわかっておらず、今後の解明が待たれる。

### 2-3. $\alpha 4\beta 4$ 型 L-プロリン脱水素酵素複合体の同定とサブユニット機能

上述したように、*P. horikoshii* や *T. peptonophilus* からは 2 種類の ProDH 活性バンドが検出された。*P. horikoshii* のゲノムには、*T. profundus* から見いだした ProDH 複合体遺伝子が認められるため、*P. horikoshii* には  $\alpha\beta\gamma\delta$  構造の ProDH 複合体と、これとは異なる構造の ProDH の存在が示唆された。著者らはそれぞれの酵素を高度に精製し、SDS-PAGE と N 末端アミノ酸配列解析により、PhProDH2 (下の活性バンド) が 52, 46, 20, 8 kDa の 4 種類のサブユニットからなり、それぞれが PH1749, PH1751, PH1750, PH1750.1 の各遺伝子にコードされていることを突き止めた (図 4)<sup>7)</sup>。これらの遺伝子は TpProDH の各サブユニット遺伝子に相同な遺伝子であることから、この酵素が  $\alpha\beta\gamma\delta$  構造の ProDH 複合体であることを明らかにした。一方で、PhProDH1 (上の活性バンド) からは  $\alpha$  (56 kDa) 及び  $\beta$  (43 kDa) の 2 種類のバンドが検出され、ゲルろ過法による分子質量は 440 kDa であったことから、 $\alpha 4\beta 4$  型の新規 ProDH 複合体であることが分かった。各バンドの N 末端アミノ酸配列解析の結果、 $\alpha$  サブユニットは PH1363、 $\beta$  サブユニットは PH1364 によってコードされており、この遺伝子クラスターも *T. profundus* を含む Thermococcales 目超好熱アーキアに広く保存されて

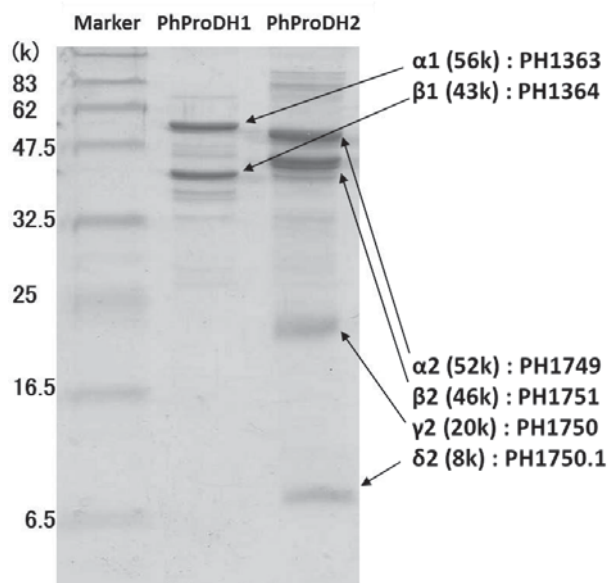


図 4 PhProDH1 と PhProDH2 の SDS-PAGE と遺伝子の同定

いた。各菌には両複合体の遺伝子クラスターがコードされているにもかかわらず、各酵素の発現状況に違いがあるのは、各菌に固有の遺伝子発現調節機構が存在するからかもしれない。

PhProDH1 についても、各サブユニットと複合体での発現系を構築して大腸菌で発現させた。PhProDH1 の  $\beta$  サブユニットの一次構造は、 $\alpha\beta\gamma\delta$  型の  $\beta$  サブユニットと 50% 以上の相同性を示しており、ProDH 活性は  $\beta$  サブユニットから検出された。一方で  $\alpha$  サブユニットからは、NADHDH 活性も含めて、酵素活性を検出することはできなかった。また、複合体酵素に含まれる補欠分子を同定した結果、 $\alpha\beta\gamma\delta$  型からは FAD しか検出されなかったのに対して、 $\alpha 4\beta 4$  型複合体酵素からは FAD だけでなく、FMN と ATP が検出された。サブユニットごとに分析すると、FAD は  $\beta$  サブユニットに結合しており、ATP は  $\alpha$  サブユニットから検出されたが、FMN はどちらからも検出されなかった (詳細は後述する)。このように、 $\alpha\beta\gamma\delta$  型と  $\alpha 4\beta 4$  型はともに ProDH 活性を示すが、補酵素の種類やサブユニット構造などの他の成分の機能に大きな違いがあり、生理的な機能も大きく異なると考えられる。

### 2-4. $\alpha 4\beta 4$ 型 L-プロリン脱水素酵素複合体の X 線結晶構造解析

2 種類のフラビン含有 ProDH 複合体は本研究で初めて見いだされた酵素であり、電子伝達タンパク質も含むことからその電子伝達システムにも興味を持たれる。著者らはこれまでに両酵素の立体構造解析を行うため結晶化に取り組み、PhProDH1 の結晶化と分解能 2.8 Å での立体構造解析に成功した (図 5A)<sup>6)</sup>。PhProDH1 の基本構造は  $\alpha\beta$  ヘテロダイマーであり (図 5B)、 $\alpha$  サブユニットの 381 番目の Cys 残基間でジスルフィド結合が形成されることにより ( $\alpha\beta$ ) 2 のテトラマー構造が構成され、2 分子のテトラマーが重なり合うようにして全体の ( $\alpha\beta$ ) 4 オクタマー構造が形成されていた。

補欠分子の解析で述べたように、 $\beta$  サブユニットには FAD が  $\alpha$  サブユニットには ATP が結合していることを構造解析からも確認できた。一方で、FMN は  $\alpha$  と  $\beta$  サブユニットの境界で挟まれるように結合していることが明らかになった。このことは、FMN が複合体からは検出されるが、サブユニット単独では検出できなかったこととも一致する。さらに特徴的なことに、 $\alpha$  サブユニットには、4 個の Cys 残基 (Cys413, Cys415, Cys447, Cys452) からなる Cys クラスタードメインがあることが明らかになった。X 線結晶構造解析からは Cys クラスター内に明

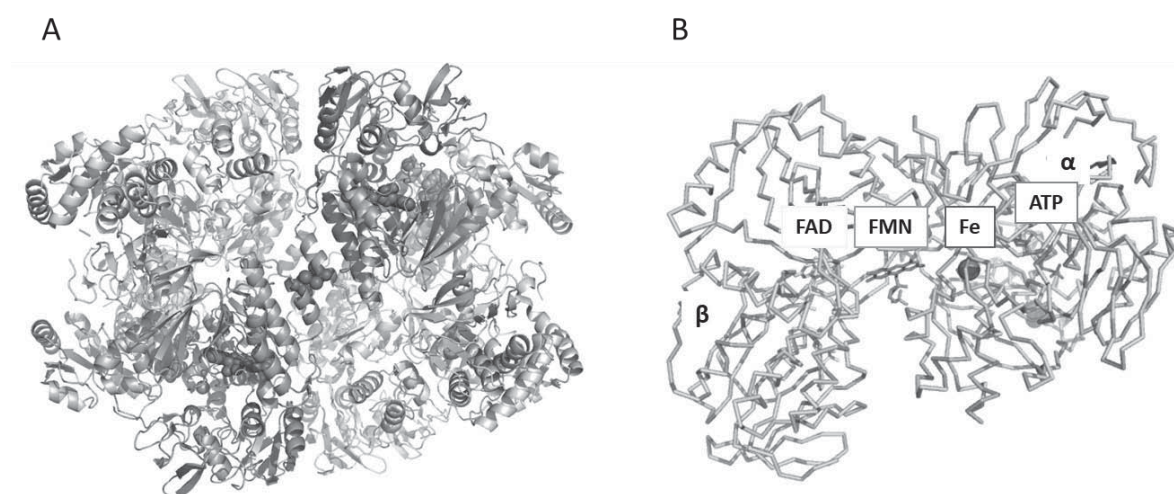


図5 PhProDH1の全体構造(A)と $\alpha\beta$ 構造(B)

確な鉄の電子密度は確認できなかったが、生化学的分析やEPRスペクトル分析は鉄が検出できることから、このクラスターに鉄が結合していると考えられる。解析の結果、FAD、FMN、鉄原子間の距離はいずれもおおよそ12 Å離れており、次のような電子伝達システムが存在すると考えている(図5B)。1)  $\beta$ サブユニット内でL-プロリンが酸化され、FADが還元される。2) 還元型FADの電子はFMNを経由してCysクラスターの鉄へと伝達される。3) 最終的に電子は菌体内に存在する未同定電子受容体へと流れる。なお、 $\alpha$ サブユニットに存在するATPの役割については明らかではないが、高次構造の保持や電子伝達の調節因子として機能していることが予想される。しかし、本酵素の電子伝達機構に関しては、まだまだ不明な点が多い。タンパク質工学的手法を用いた電子伝達経路の解明やATPの役割の解析などを行うことで、本酵素の菌体内での生理機能も明らかになると期待できる。

## 2-5. DNA センシングへの応用

これまで、超好熱アーキア由来の2種類のProDHについて機能や構造を中心に紹介してきたが、元々は、バイオセンサー用機能性素子として利用できる安定なDye-DHを取得することを目的に見いだされた酵素である。見いだされた酵素は扱いやすい可溶性酵素であり、高い安定性を示すなど、バイオセンサー用素子として好都合な性質を持ち合わせていた。実際に、TpProDHを素子とするL-プロリン定量用の電極型センサーの開発を進め、L-プロリン濃度依存的な電流応答を示すProDH固定化電極の作製に成功している<sup>8)9)</sup>。このことは、超好熱菌由来の高い安定性を有する酵素

であれば、Dye-DHを反応素子とするバイオセンサーの開発が可能であることを示している。本稿では、この安定性に優れたProDHをDNAセンシングへ応用した例を紹介する。

レジオネラ菌は常在菌として様々な場所に存在している。健康者であれば感染症などのリスクはほとんどないが、高齢者などの抵抗力が低い場合は感染により重篤な肺炎を起こすことがあり、日本では特に、温泉施設の循環式浴槽などでの集団感染により、死亡例も報告されている。そのため、浴槽水中のレジオネラ菌数は100 mLあたり10コロニー未満という基準が設けられている(循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル)。計測には選択培地を用いる増殖法が用いられるが、検出までに一週間程度かかるため、迅速な方法が望まれていた。著者らは福井大学の末教授らと共同して、TpProDHを利用したレジオネラ菌検出用DNAセンシングシステムを開発した(図6)。1) 採集・濃縮した浴槽水から抽出した環境ゲノムDNAをテンプレートとして、レジオネラ菌固有の毒素タンパク質のmip領域をPCR増幅させる。2) PCR産物、ビオチンを結合させた捕獲プローブ、TpProDHを融合させた標識プローブを混合して加熱・冷却することにより、3者のハイブリッドを形成させる。3) ハイブリッド中のビオチンと電極上に配置したアビジンが特異的に結合することにより、ProDHが電極表面に近接する。4) L-プロリン添加によって起こる酵素反応を電極上で検出する。この方法は、加熱・冷却によるハイブリッド形成過程を経ても失活しない、熱に安定なTpProDHを用いることにより初めて可能となり、浴槽中のレジオネラ菌を約2時間で定量的に計測することができた。

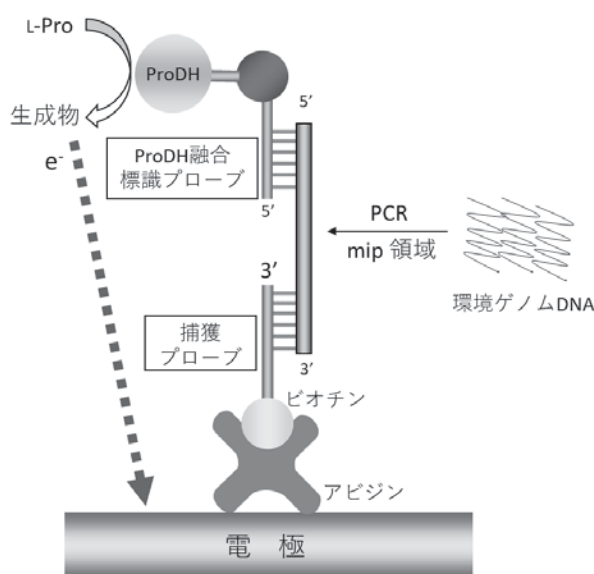


図6 レジオネラ菌のDNAセンシングシステム

また、この方法は専門知識が不要で、現場での測定もできる画期的なものである。さらに、PCRプライマーを変更することで、レジオネラ菌だけでなく様々な病原菌などを検出することが可能であり、実際にサルモネラ菌の検出にも成功している。センサーのマイクロ化やチップ化などを促進するとともに、色々なタンパク質のセンシングを可能にする同様な酵素電極型センサーの開発を進めることにより、医療、食品、環境分析などに有効利用できる多用途型酵素センサーの実用化が可能になると期待している。

### 3. PLP依存性アミノ酸ラセマーゼに関する研究

アミノ酸にはL体とD体が存在し、互いに鏡像異性体の関係にある。これまで、生命が利用するアミノ酸のほとんどはL-アミノ酸であり、D-アミノ酸は細菌細胞壁のペプチドグリカン成分としてD-GlnやD-Alaが含まれるくらいで、生体への利用は限定的と考えられてきた。しかし、近年のアミノ酸分析技術の発展はこれまでの常識を覆し、微生物をはじめ、植物、哺乳動物などに幅広くD-アミノ酸が存在し、多彩な生理機能を担っていることを明らかにしている。例えば、哺乳動物において、D-Serが記憶や学習などの高次機能に関わる脳内のNMDA型グルタミン酸受容体のコアゴニストとして機能することやホルモンの分泌制御にD-Aspが関与することなどが報告されている<sup>20)21)</sup>。また、乳酸菌などの発酵微生物もD-アミノ酸を生産することが知られており、日本酒や醸造酢などの発酵食品にもD-アミノ酸が高い濃度で存在していることが分析の結果

明らかになっている<sup>22)23)</sup>。これらの生体中に存在するD-アミノ酸は主にアミノ酸ラセマーゼによって生産される。アミノ酸ラセマーゼはアミノ酸のラセミ化を触媒する酵素であり、PLPを補酵素として要求するものと要求しないものに大別される。これまでに、アーキアにおけるD-アミノ酸の分布やその代謝酵素の存在がいくつか報告されており、*Pyrococcus* 属、*Thermococcus* 属、*Desulfurococcus* 属および*Thermoplasma* 属の超好熱アーキアには総遊離Aspの40%以上に達する多量のD-Aspが存在し、その生成酵素としてPLP非依存性Aspラセマーゼ(AspR)が報告され、機能と構造の相関解析などが行われた<sup>24)25)</sup>。これらの超好熱アーキアの菌体からはAsp以外にAlaやLeuなどの遊離D-アミノ酸も検出されているので、これらの生成酵素の存在が示唆される。超好熱アーキア*P. horikoshii*にもAspRが存在することは知られているが、それ以外にD-アミノ酸代謝酵素が存在するか否かは調べられていない。そこで、著者らは*P. horikoshii*のD-アミノ酸資化能を調べることで、D-アミノ酸代謝酵素のスクリーニングを開始した。

#### 3-1. *P. horikoshii*のアミノ酸要求性とD-アミノ酸資化性

*Pyrococcus* 属超好熱アーキアは炭素源としてトリプトンやペプトンなどを含む天然培地、アミノ酸混合物を含む合成培地でよく増殖する。ところが、*P. horikoshii*はカザミノ酸を炭素源とする天然培地では増殖できないことが報告されている<sup>26)</sup>。カザミノ酸はカゼインの加水分解物であり、その製造過程でTrp, Asn, Glnが分解されている。カザミノ酸にTrpを添加することで増殖が回復することから、Trp要求性を示すことが指摘されたが、それ以外のアミノ酸要求性は調べられていなかった。著者らはカザミノ酸を用いた培養実験でTrp要求性を再確認するとともに、20種類のアミノ酸と各種ビタミンを栄養源とする合成培地による培養条件を確立し、アミノ酸を1種類ずつ条件から除くことでアミノ酸要求性を検討した(表1)<sup>10)</sup>。その結果、*P. horikoshii*はThr, Leu, Val, Phe, Tyr, Trp, His, Argの8種類のアミノ酸に対して要求性を示し、IleとMetを除いた条件では増殖の遅延が認められた。残りの10アミノ酸を除いた条件では生育への影響は認められなかった。このようなアミノ酸要求性は*Pyrococcus* sp. GB-Dや*T. celer*でも認められている(表1)<sup>27)</sup>。

これらのアミノ酸要求性は*P. horikoshii*自身のゲノムにコードされたアミノ酸生合成酵素遺伝子の有無と密接に関係している。*P. horikoshii*は既にゲノム情報が

表1 *P. horikoshii* のアミノ酸要求性と D-アミノ酸資化性

アミノ酸	アミノ酸要求性			D-アミノ酸資化性
	<i>Pyrococcus</i> sp.	<i>T. celer</i>	<i>P. horikoshii</i>	
Gly	○	○	○	—
Ala	○	○	○	—
Ser	○	○	○	—
Thr	×	×	×	×
Cys	○	○	○	—
Asn	○	○	○	—
Gln	○	○	○	—
Leu	×	×	×	○
Ile	×	×	△	○
Val	×	×	×	△
Met	×	×	△	○
Phe	×	×	×	○
Tyr	×	×	×	○
Trp	×	×	×	○
Pro	○	○	○	—
Asp	○	○	○	—
Glu	○	○	○	—
His	×	○	×	×
Lys	×	×	○	—
Arg	×	×	×	○

明らかにされており、KEGG データベース上で酵素遺伝子の存在を参照できる。例えば、Trp, Phe, Tyr の各芳香族アミノ酸は、D-Erythrose-4-phosphate と Phosphoenolpyruvate の縮合反応から始まるシキミ酸経路を経て合成されるが、*P. horikoshii* にはシキミ酸経路に関わる遺伝子やそれに続く各アミノ酸生合成遺伝子を持っていないために、これらのアミノ酸に対して要求性を示すと考えられる。His や Arg の生合成経路の全部もしくは一部も欠損しており、培養実験の結果と一致している。一方で、Asp から生合成される Thr や Met において、生合成酵素遺伝子を有しているにも関わらず増殖に影響が出ることや、生合成できないと推定される Ile を除いた条件でも速度は遅いが増殖することなど、ゲノム情報と培養実験の結果には多少の矛盾も認められた。

*P. horikoshii* が L-Trp を加えたカザミノ酸培地で増殖できるようになることは先ほど述べた。著者らは、この L-Trp を D-Trp に代えた条件でも *P. horikoshii* が増殖できることを発見した<sup>10)</sup>。<sup>14</sup>C ラベルされた D-Trp を使った培養実験で、<sup>14</sup>C がタンパク質中に取り込まれていることから、*P. horikoshii* が D-Trp を培地から取り

込み、L-Trp に変換して利用していることが明らかになった。増殖の遅延や要求性を示す残り 9 種類のアミノ酸についても同様に D-アミノ酸に置換して培養した結果を表 1 に示す。D-*allo*-Thr と D-His は資化できないものの、残りの 8 種類のアミノ酸置換培地では L-アミノ酸培地と同様の増殖を示した。このような幅広い D-アミノ酸資化能の発見が、その後の D-アミノ酸代謝酵素の研究の出発点になっている。

### 3-2. 低基質特異性アミノ酸ラセマーゼの発見と特徴

D-アミノ酸資化性の結果は、*P. horikoshii* にこれらの D-アミノ酸を L-アミノ酸に変換する酵素活性があることを示唆している。アミノ酸ラセマーゼがこの変換に関与していると予想して、*P. horikoshii* 菌体抽出液中のアミノ酸ラセマーゼ活性を測定した結果、Met, Phe, Leu などに対する活性を検出することに成功した<sup>10)</sup>。これまでに *P. horikoshii* からは PLP 非依存性の AspR しが発見されていなかったため、新規アミノ酸ラセマーゼであることが強く示唆された。*P. horikoshii* には AspR をコードする PH0670 遺伝子と 30% 程度の相同性を示すラセマーゼホモログ遺伝子 (PH1054, PH1733)

が存在したので、組換え酵素を調製して酵素活性を測定したが、Met などに対するラセマーゼ活性は検出できなかった。そこで、Met に対する活性を指標として、*P. horikoshii* 粗酵素液からの酵素精製による遺伝子同定を試みた。部分精製酵素の MALDI-TOF/MS 解析の結果、候補遺伝子として PH0138 遺伝子を同定し、大腸菌発現させた酵素の活性を測定した結果、Met, Phe, Leu などに対して高いラセマーゼ活性を示すとともに、各基質に対する相対活性が *P. horikoshii* 粗酵素液と大体一致することから、PH0138 産物が目的酵素であると同定した。本酵素は様々なアミノ酸のラセミ化を触媒できるため、低基質特異性アミノ酸ラセマーゼ (Broad substrate specificity Amino acid Racemase, BAR) とした。

BAR は 4-aminobutyrate aminotransferase (GABA-AT) と推定された、fold-type I の Aminotransferase class III に分類される PLP 酵素である。PLP を補酵素とする酵素はラセミ化やアミノ基転移などの多様な反応に関与し、二次構造や立体構造から少なくとも 5 つの fold-type に分類される。これまでに知られているアミノ酸ラセマーゼは fold-type I, II, III のいずれかに分類され

ており、fold-type I に属するアミノ酸ラセマーゼとして、カビ由来の Ala ラセマーゼ (AlaR) や *Lactobacillus* 由来の Ile エピメラーゼ (ILEP) が知られている。ILEP は Ile のほかにも、分岐鎖アミノ酸などのラセミ化を触媒し、BAR と同じ class III に分類されている。

精製した BAR の分子質量はゲルろ過法で約 91 kDa であり、サブユニット分子量が約 52 kDa であるため、二量体構造と推定された<sup>11)</sup>。これは、ILEP が四量体構造をとることとは異なっていた。酵素は非常に安定で、80℃でインキュベートした場合、pH 7 で 24 時間、pH 10 で 2 時間処理しても活性を完全に保持した。基質特異性は幅広く、Leu, Phe, Met, Tyr, Trp, Ile, Val, Ala, Thr, Ser に反応性を示した (表 2)。これまでに、ILEP を含めて、基質特異性の低いアミノ酸ラセマーゼがいくつか報告されているが、Tyr や Trp といった芳香族アミノ酸に反応性を示すのは、本酵素だけである。

表 1 と表 2 から、*P. horikoshii* が資化できる D-アミノ酸と BAR の基質特異性はほぼ一致することが分かる。これは、この酵素の存在が D-アミノ酸資化を可能

表 2 各アミノ酸ラセマーゼの基質に対する反応性

	BAR	ASR	ILEP	<i>P. putida</i>
Ala	5	100	3	6
Val	13	2	48	-
Ile	48	-	100	-
Leu	86	-	30	10
Met	64	-	21	66
Phe	100	-	24	-
Tyr	64	-	-	-
Trp	27	-	-	-
Thr	42	9	-	3
Ser	10	83	6	10
Lys	-	-	-	100
Arg	-	-	-	79
Gln	-	-	-	54
Asn	-	-	-	12
Cys	-	-	-	-
His	-	-	-	6
Glu	-	-	-	-
Asp	-	-	-	-
Pro	-	-	-	-





異性の異なる PLP 依存性アミノ酸ラセマーゼを見いだすことができた。残り 2 種類のホモログ酵素のうち、PH1501 からは、非常にわずかであったが、Ala, Leu, Phe, Tyr, Met などに対する活性が検出されている。一方で、PH1423 からはアミノ酸ラセマーゼ活性は検出されなかった。現在、これらの酵素に関して解析を進めている。

#### 4. 終わりに

以上のように、超好熱アーキアに新奇な 2 種類のフラビン含有色素依存性脱水素酵素複合体の存在を明らかにするとともに、その安定性を利用したバイオセンサーを構築することができた。その後、第 3 のタイプとして、ホモダイマー型 ProDH も他の超好熱アーキアから発見され、機能構造の解析だけでなく応用展開も進められている。これらの発見は、超好熱アーキアから未知の色素依存性脱水素酵素が発見される可能性が残されていることを示唆しており、その酵素の機能や構造の解析とともに新たな応用展開なども期待できる。また、超好熱アーキアにおける D-アミノ酸資化能の解析から、PLP 依存性の新奇なアミノ酸ラセマーゼを 2 種類見いだすことに成功した。D-*allo*-Ile を添加した培養条件で BAR の発現が誘導されることが明らかになっており、BAR が *P. horikoshii* の D-アミノ酸資化に重要な役割を担っていることが考えられる。D-アミノ酸培養による ASR の発現量の変化は認められていないが、ASR ホモログは Thermococcales 目超好熱アーキアに広く保存されていることから、この酵素も D-アミノ酸に関連する何らかの機能を担っていることが推察される。今回の一連の発見は他の超好熱アーキアにも D-アミノ酸代謝経路が存在することを示唆しており、新たなビタミン含有酵素の発見にもつながることが期待できる。

#### 謝 辞

本研究を進めるにあたり多大なるご指導を賜りました大阪工業大学工学部教授 大島敏久先生、香川大学農学部教授 櫻庭春彦先生に心より感謝いたします。これらの研究に温かいご助言を賜りました京都産業大学 津下英明先生、福井大学 末信一郎先生、里村武範先生、長崎大学 郷田秀一郎先生に御礼申し上げます。また、本研究を共に進めてきた大学院生、学部生の皆様に感謝いたします。

(2019.8.27 受付)

#### 文 献

- 1) Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 4576-4579
- 2) 西原正照, 古賀洋介 (1990) 古細菌のエーテル型脂質. *化学と生物* **28**, 288-294
- 3) 大島敏久, 櫻庭春彦 (2009) 超好熱性アーキアのユニークな糖代謝系. *蛋白質核酸酵素* **54**, 134-140
- 4) Sakuraba H, Takamatsu Y, Satomura T, Kawakami R, Ohshima T (2004) Purification, characterization, and application of a novel dye-linked L-proline dehydrogenase from a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus profundus*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1470-1475
- 5) Kawakami R, Sakuraba H, Ohshima T (2001) Gene and primary structures of dye-linked L-proline dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus profundus* show the presence of a novel heterotetrameric amino acid dehydrogenase complex. *Extremophiles* **8**, 99-108
- 6) Tsuge H, Kawakami R, Sakuraba H, Ago H, Miyano M, Aki K, Katunuma N, Ohshima T (2005) Crystal structure of a novel FAD-, FMN-, and ATP-containing L-proline dehydrogenase complex from *Pyrococcus horikoshii*. *J Biol Chem* **280**, 31045-31049
- 7) Kawakami R, Sakuraba H, Tsuge H, Goda S, Katunuma N, Ohshima T (2005) A second novel dye-linked L-proline dehydrogenase complex is present in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT-3. *FEBS J* **272**, 4044-4054
- 8) Zheng, H, Hirose Y, Kimura T, Suye S, Hori T, Katayama H, Arai J, Kawakami R, Ohshima T (2006) L-Proline sensor based on layer-by-layer immobilization of thermostable dye-linked L-proline dehydrogenase and polymerized mediator. *Sci Technol Adv Mater* **7**, 243-248
- 9) Zheng H, Lin L, Okezaki Y, Kawakami R, Sakuraba H, Ohshima T, Takagi K, Suye S (2010) Electrochemical behavior of dye-linked L-proline dehydrogenase on glassy carbon electrodes modified by multi-walled carbon nanotubes. *Beilstein J Nanotechnol* **1**, 135-141
- 10) Kawakami R, Ohmori T, Sakuraba H, Ohshima T (2015) Identification of a novel amino acid racemase from a hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT-3 induced by D-amino acids. *Amino acids* **47**, 1579-1587
- 11) Kawakami R, Sakuraba H, Ohmori T, Ohshima T (2017) First characterization of an archaeal amino acid racemase with broad substrate specificity from the hyperthermophile *Pyrococcus horikoshii* OT-3. *J Biosci Bioeng* **124**, 23-27
- 12) Kawakami R, Ohshida T, Sakuraba H, Ohshima T. A novel PLP-dependent Alanine/Serine racemase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT-3. (2018) *Front Microbiol* DOI: 10.3389/fmicb.2018.01481
- 13) Kula MR, Lragl U (2000) Dehydrogenases in the synthesis of chiral compounds, In *Stereoselective Biocatalysis*, Marcel Dekker Inc, 839-866

- 14) Ohshima T, Soda K (2000) Amino acid dehydrogenase, In *Stereoselective Biocatalysis*, Marcel Dekker Inc, 877-902
- 15) Dancy GF, Levine AE, Shapiro BM (1976) The NADH dehydrogenase of the respiratory chain of *Escherichia coli*. I. Properties of the membrane-bound enzyme, its solubilization, and purification to near homogeneity. *J Biol Chem* **251**, 5911-5920
- 16) Hederstedt L, Holmgren E, Rutberg L (1979) Characterization of a succinate dehydrogenase complex solubilized from the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis* with the nonionic detergent Triton X-100. *J Bacteriol* **138**, 370-376
- 17) Frew JE, Hill HA (1987) Electrochemical biosensors. *Anal Chem* **59**, 933A-944A
- 18) Ohshima T, Nishida N (1993) Purification and properties of extremely thermostable glutamate dehydrogenase from two hyperthermophilic archaeobacterial *Pyrococcus woesei* and *Pyrococcus furiosus*. *Biosci Biotech Biochem* **57**, 945-951
- 19) Menzel R, Roth J (1981) Purification of the putA gene product. A bifunctional membrane-bound protein from *Salmonella typhimurium* responsible for the two-step oxidation of proline to glutamate. *J Biol Chem* **256**, 9755-9761
- 20) Errico F, Mothet JP, Usiello A (2015) D-Aspartate: An endogenous NMDA receptor agonist enriched in the developing brain with potential involvement in schizophrenia. *J Pharm Biomed Anal* **116**, 7-17
- 21) Genchi G (2017) An overview on D-amino acids. *Amino Acids* **49**, 1521-1533
- 22) Mutaguchi Y, Ohmori T, Wakamatsu T, Doi K, Ohshima T (2013) Identification, purification, and characterization of a novel amino acid racemase, isoleucine 2-epimerase, from *Lactobacillus* species. *J Bacteriol* **195**, 5207-5015
- 23) Mutaguchi Y, Ohmori T, Akano H, Doi K, Ohshima T (2013) Distribution of D-amino acids in vinegars and involvement of lactic acid bacteria in the production of D-amino acids. *Springerplus* **2**, 691, doi: 10.1186/2193-1801-2-691
- 24) 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**, 6560-6563
- 25) Long Z, Lee JA, Okamoto T, Sekine M, Nimura N, Imai K, Yohda M, Maruyama T, Sumi M, Kamo N, Yamagishi A, Ohshima 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**, 317-321
- 26) González JM, Masuchi Y, Robb FT, Ammerman JW, Maeder DL, Yanagibayashi M, Tamaoka J, Kato C (1998) *Pyrococcus horikoshii* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a hydrothermal vent at the Okinawa Trough. *Extremophiles* **2**, 123-130
- 27) Hoaki T, Nishijima M, Kato M, Adachi K, Mizobuchi S, Hanzawa N, Maruyama T (1994) Growth requirements of hyperthermophilic sulfur-dependent heterotrophic archaea isolated from a shallow submarine geothermal system with reference to their essential amino acids. *Appl Environ Microbiol* **60**, 2898-2904