

## 部位特異的変異によるピラノース酸化酵素の 色素依存性脱水素酵素活性の向上

荒木 俊雄<sup>a)</sup>・中柄 朋子<sup>a)</sup>・田村 隆・稲垣 賢二  
(農芸化学コース)

### Improvement of dye-mediated dehydrogenase activity of pyranose oxidase by site-directed mutagenesis

Toshio Araki<sup>a)</sup>, Tomoko Nakatsuka<sup>a)</sup>, Takashi Tamura and Kenji Inagaki

(Course of Agrochemical Bioscience)

Pyranose oxidase (EC 1.1.3.10 ; PROD) catalyzes the oxidation of aldopyranoses at the position C-2 to yield the corresponding 2-keto-aldoses and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, using oxygen as an electron acceptor. The enzyme shows broad substrate specificity as well as reactivity for 1,5-anhydro-D-glucitol (1,5-AG), which is known as a clinical glycemic marker. It is considered that the reactivity of PROD for 1,5-AG is useful in the development of an amperometric-type biosensor, which is a convenient diagnostic device for self-monitoring blood glucose (SMBG). However, the levels of dissolved oxygen in blood affect biosensor systems that are equipped with an artificial electron mediator. In the present study, we attempted to develop an O<sub>2</sub>-insensitive oxidase that would improve the dye-mediated dehydrogenase activity. We performed site-directed mutagenesis on PROD isolated from basidiomycetous fungus No. 52, which generated 11 mutants. The amino acid substitution Q421A exhibited a significant decrease (8.8% of wild type) in its oxidase activity, whereas it maintained its dehydrogenase activity (67% of wild type). In this study, we characterized PROD mutants from basidiomycetous fungus No. 52, which showed improved dye-mediated dehydrogenase activity.

**Key words** : pyranose oxidase, 1,5-anhydro-D-glucitol, biosensor, site-directed mutagenesis, SMBG

### 緒 言

ピラノース酸化酵素 (EC 1.1.3.10) は、グルコースなどの6員環を形成する糖類の2位の水酸基を酸化し、過酸化水素を生成する反応を触媒する酵素として知られている<sup>1,2)</sup>。本酵素はその特性から、抗生物質の生成やフルクトースの工業生産、その他にもバイオセンサやバイオ燃料電池への応用など、様々な用途への提案がなされている酵素である<sup>3,4,5,6)</sup>。

また、本酵素は糖尿病の診断マーカである1,5-アンヒドログルシトール (1,5-anhydro-D-glucitol : 1,5-AG) を基質とするため、糖尿病の診断薬としても使用されている<sup>7)</sup>。1,5-AG 診断用途に本酵素を用いる場合、現状の液状試薬としての形態で用いる他に、上記に記載した酵素センサとして用いる形態も考えられる。例えば酵素センサとしては、糖尿病患者が自らの血中グルコース濃度を測定する血糖自己測定 (SMBG : self-monitoring of blood glucose) 機器が広く普及しており、1,5-AG を SMBG 用機器のように酵素センサに応用することができれば、より簡便に1,5-AG を測定することが可能と考えられる。そのような人工の電子伝達体を用いる電流計

測型の酵素センサに酵素を用いる場合、酸化酵素ではなく、血中の溶存酸素の影響を受けない脱水素酵素が適している。これまでに本用途を目的とした1,5-AG 脱水素酵素の開発について報告がなされている<sup>8)</sup>。

一方で、酸化酵素に部位特異的変異を導入することで、酸化酵素活性を低減し、人工電子受容体を介した酵素活性 (色素依存性脱水素酵素活性 : 以下、脱水素酵素活性と称する) を向上させた報告がなされている<sup>9)</sup>。これらの報告では、酸素への電子移動に関わる残基へ変異を導入することで、酸素への電子伝達能が低下し、人工電子受容体への電子伝達能が向上した改良がなされている。

本研究では basidiomycetous fungus No. 52 由来ピラノース酸化酵素 (PROD)<sup>10)</sup> の活性部位近傍に位置すると推測されるアミノ酸残基に変異を導入し、脱水素酵素活性が向上した改変体について報告する。

Received October 1, 2014

a) 池田食研株式会社 (Ikeda Food Research Co., Ltd.)

## 材料と方法

### 1) 使用菌株およびプラスミド

宿主には *Escherichia coli* BL21 (DE3) を使用し、目的タンパク質の発現ベクターには pET 21a-PROD を使用した。

### 2) 変異導入方法

変異導入用にデザインしたプライマーのリン酸化を行い、沢野らの方法<sup>11)</sup>に基づいて変異が導入されたプラスミドの複製 (Quick change 法) を行った。反応溶液に対して制限酵素消化 (*Dpn*I) を行い、*Escherichia coli* BL21 (DE3) を形質転換した後、変異が導入されたプラスミドを取得した。

### 3) 酵素活性測定方法

酸化酵素活性の測定方法は、リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 1  $\mu$ mol, ベルオキシダーゼ 10 U, 4-アミノアンチピリン 2.48  $\mu$ mol, フェノール 42  $\mu$ mol, グルコース 100  $\mu$ mol を含む反応溶液に酵素液を添加し、反応を開始させ、500 nm の吸光度変化を測定した。脱水素酵素活性の測定では、リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 0.1 mmol, 2,6-ジクロロフェノールインドフェノール (DCIP) 0.42  $\mu$ mol, 1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムメチルスルフェート (1-methoxy PMS) 0.6  $\mu$ mol, グルコース 1 mmol を含む反応溶液に酵素液を添加し、反応を開始させ、600 nm の吸光度変化を測定した。なお、1 分間に 1  $\mu$ mol の基質を消費する酵素量を 1 U と定義した。

## 結果および考察

### 1) 変異導入部位のデザイン

PROD のアミノ酸配列を検索配列とし、プロテインデータバンク (RCSB Protein databank : <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) をデータベースとした

ブラスト検索を行った。その結果、*Peniophora* sp. 由来 PROD (PDB ID : 2F5V) が最もアミノ酸配列の同一性 (41%) が高かった。次に分子グラフィックスツール Pymol を用いて *Peniophora* sp. 由来 PROD (PePROD) の立体構造から、補酵素である FAD のイソアロキサジン環と基質アナログである 2-ケト- $\beta$ -D-グルコースの周辺に立体構造上位置するアミノ酸残基を抽出した。これらのアミノ酸と、アミノ酸配列のアライメントで一致する basidiomycetous fungus No.52 由来 PROD (BfPROD) のアミノ酸をアラニンに置換した改変体 11 種 (P147A, K212A, L214A, P215A, L216A, N409A, P411A, Q421A, N565A, T143A, H419A) を作製した。

### 2) 改変体の評価

作製した改変体を培養し、菌体破碎後に得られた無細胞抽出液の酸化酵素活性と脱水素酵素活性をプレートリーダーで評価した結果を Fig. 1 に示す。未変異の野生型酵素は、酸化酵素活性と同程度の脱水素酵素活性を示した。評価した改変体は 11 種の改変体中、H419A を除いた 10 種において酸化酵素活性が低下していた。H419A は酸化酵素活性および脱水素酵素活性とも野生型とほぼ同程度の酵素活性を示したことから、419 番目のヒスチジン残基は酵素活性に関与しない残基であると推察された。また、T143A は酸化酵素活性および脱水素酵素活性の両方ともほとんど活性を示さず、失活していた。この結果から 143 番目のスレオニンは酵素活性に関わる重要な残基の 1 つであると考えられた。

11 種類の改変体の中で、酸化酵素活性と比べて脱水素酵素活性が高い 4 種類の改変体 (P147A, L214A, L216A, Q421A) について、無細胞抽出液の比活性を評価した。(Fig. 2) 野生型酵素の酸化酵素活性は 3.4 U/mg, 脱水素酵素活性は 2.1 U/mg であり、脱水素酵素活性の比活性は酸化酵素活性の約 62% であった。Q421A は、

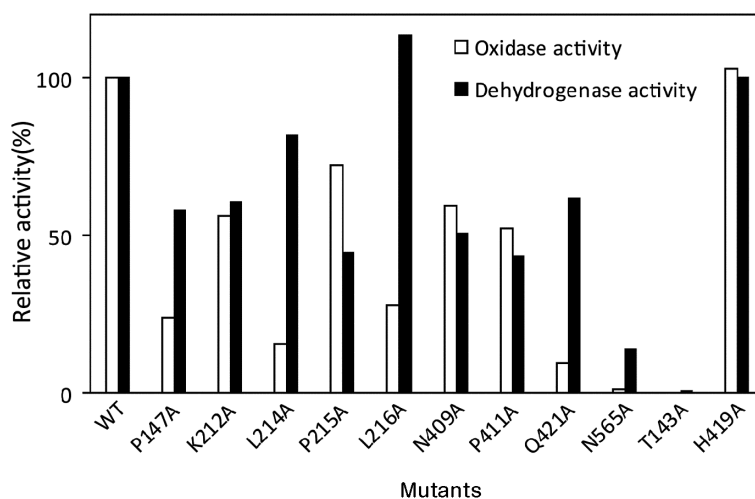


Fig. 1 Relative activities of oxidase and dehydrogenase in pyranose oxidase mutants.

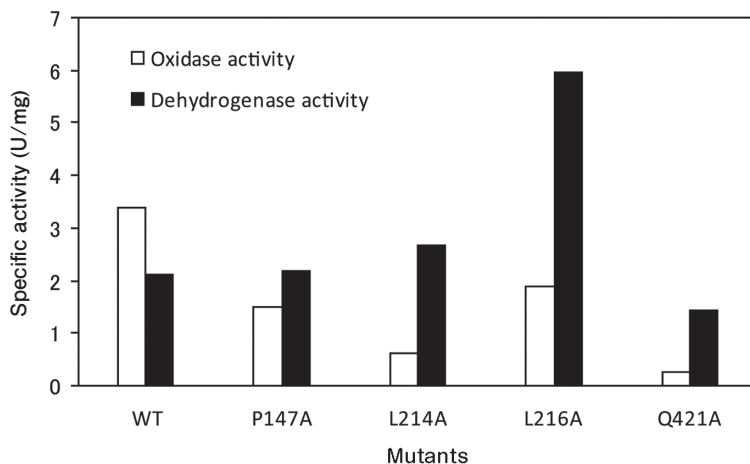


Fig. 2 Specific activities of oxidase and dehydrogenase in pyranose oxidase mutants.

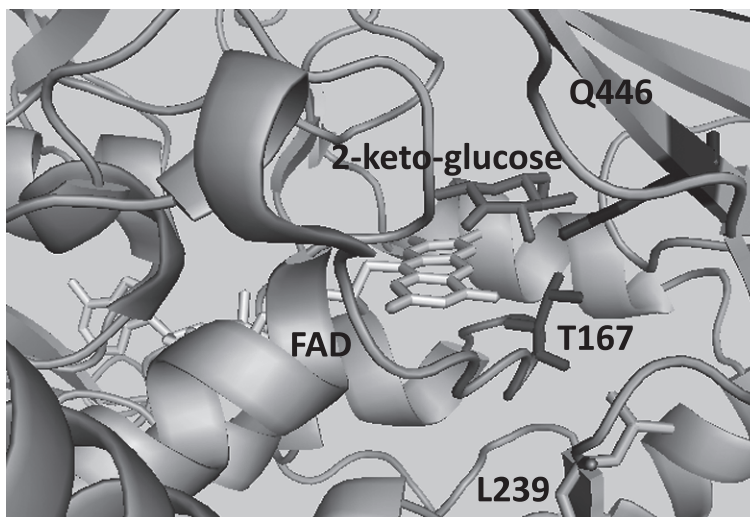


Fig. 3 3D structure of pyranose oxidase from *Peniophora* sp. (PDB ID : 2F5V).

野生型酵素の脱水素酵素活性と比べ、脱水素酵素活性が約33%低下 (1.4 U/mg) していたが、酸化酵素活性は野生型酵素の約8.8%であり、評価した4種類の中で最も酸化酵素が低下していた。一方で、L216Aは、酸化酵素活性が野生型酵素の約44% (1.9 U/mg) であったが、脱水素酵素活性は野生型酵素に比べて約2.8倍向上 (5.9 U/mg) していた。

Fig. 3にPePRODの立体構造上における、PRODの改変部位の相対配置を示す。PePRODとPRODのアミノ酸配列のアライメント結果から、PRODの各残基の位置に相当するPePRODの残基を抽出した。Alaへの変異により酸化酵素活性および脱水素酵素活性共に活性が低下したPRODの143番目のThr (灰色分子、Fig. 3のPePRODでは167番目のThr)は、FADのイソアロキサジン環と2-keto-D-グルコースそれぞれと比較的近接(約

4Å内)しており、触媒反応または基質認識に関与している可能性が考えられた。一方で、PRODのQ421(青分子、Fig. 3のPePRODでは446番目のGln)は、T143と比べて上記の2分子から更に離れた位置に存在しており、酸素分子への電子の受け渡しに関わる電子伝達(プロトンリレーシステム)に関与している可能性が考えられた。

## 要 約

Basidiomycetous fungus No.52由来PRODの活性中心近傍に位置すると考えられたアミノ酸11種をAlaへ置換することにより、酸化酵素活性が低下し、且つ脱水素酵素活性を保持した4種類の改変体を取得した。Q421Aは酸化酵素活性が野生型の約8.8%まで低下し、改変体L216Aは脱水素酵素活性が野生型の約2.8倍向上した。

今後、本実験で色素依存型脱水素酵素活性が向上した変異箇所を Ala 以外の他の残基へ置換することや、または導入した変異を組み合わせることによって、更に酸化酵素活性が低下し、且つ色素依存型脱水素酵素活性を有する改変体を取得できると考えられた。

#### 文 献

- 1) Ruelius, H. W., R. M. Kerwin and F. W. Janssen : Carbohydrate oxidase, a novel enzyme from *Polyporus obtusus* : I. Isolation and purification. *Biochim. Biophys. Acta.*, **167**, 493-500 (1968)
- 2) Machida, Y. and T. Nakanishi : Purification and properties of pyranose oxidase from *Coriolus versicolor*. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2463-2470 (1984)
- 3) Koths, K., R. Halenbeck and M. Moreland : Synthesis of the antibiotic cortalcerone from D-glucose using pyranose 2-oxidase and a novel fungal enzyme, aldose-2-ulose dehydratase. *Carbohydr. Res.*, **232**, 59-75 (1992)
- 4) Shaked, Z. and S. Wolfe : Stabilization of pyranose 2-oxidase and catalase by chemical modification. *Methods Enzymol.*, **137**, 599-615 (1988)
- 5) Taguchi, T., K. Ohwaki and J. Okuda : Glucose 2-oxidase (*Coriolus Versicolor*) and its application to D-glucose colorimetry. *J. Appl Biochem.*, **7**, 289-295 (1985)
- 6) Spadiut, O., I. Pisanelli, T. Maischberger, C. Peterbauer, L. Gorton, P. Chaiyen and D. Haltrich : Engineering of pyranose 2-oxidase : Improvement for biofuel cell and food applications through semi-rational protein design. *J. Biotechnol.*, **139**, 250-257 (2009)
- 7) Yabuuchi, M., M. Masuda, K. Katoh, T. Nakamura and H. Akanuma : Simple enzymatic method for determining 1,5-anhydro-D-glucitol in plasma for diagnosis of diabetes mellitus. *Clin. Chem.*, **35**, 2039-2043 (1989)
- 8) Tsugawa, W., S. Horiuchi, M. Tanaka, H. Wake and K. Sode : Purification of a marine bacterial glucose dehydrogenase from *Cytophaga marinoflava* and its application for measurement of 1,5-anhydro-D-glucitol. *Appl. Biochem. Biotech.*, **56**, 301-310 (1996)
- 9) Kojima, K., T. Kobayashi, W. Tsugawa, S. Ferri and K. Sode : Mutational analysis of the oxygen-binding site of cholesterol oxidase and its impact on dye-mediated dehydrogenase activity. *J. Mol. Catal., B Enzym.*, **88**, 41-46 (2013)
- 10) Izumi, Y., Y. Furuya and H. Yamada : Purification and properties of pyranose oxidase from Basidiomycetous fungus No.52. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1393-1399 (1990)
- 11) Sawano, A. and A. Miyawaki : Directed evolution of green fluorescent protein by a new versatile PCR strategy for site-directed and semi-random mutagenesis. *Nucleic Acids Res.*, **28**, e78 (2000)