

好冷好圧性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 由来 D-アミノ酸脱水素酵素の結晶化のための精製  
Purification of D-Amino Acid Dehydrogenase from the Psychrophilic and Piezophilic Bacterium  
*Shewanella violacea* DSS12 for Crystallization

○磯部 葵<sup>1</sup>, 徳久 真弓<sup>2</sup>, 小池 美弥<sup>3</sup>, 谷川 実<sup>3</sup>, 西村 克史<sup>3,4</sup>

\*Aoi Isobe<sup>1</sup>, Mayumi Tokuhisa<sup>2</sup>, Miya Koike<sup>3</sup>, Minoru Tanigawa<sup>3</sup>, Katsushi Nishimura<sup>3,4</sup>

Abstract: D-Amino acid dehydrogenase (DAD) have been reported to be involved in the electron transport system. *Shewanella violacea* DSS 12 (*S. violacea*) is a psychrophilic and facultatively piezophilic bacterium, and has DAD (SvDAD). In this study, we examined expression conditions and purification procedure of SvDAD using recombinant *E. coli* harboring SvDAD gene for the purpose of clarifying the conformation of DAD by X-ray crystal structure analysis. Refolding of SvDAD in inclusion bodies using Tween 20 was not suitable. SvDAD activity is highest at 10°C. By culturing at 25°C and in a short time, formation of inclusion bodies was suppressed and DAD increased in the supernatant.

## 1. 緒言

D-アミノ酸脱水素酵素 (DAD) は *Helicobacter pylori* や *Pyrobaculum islandicum* の生体内に存在し、いずれも電子伝達系に関与することが報告されている。一方、深度 5,110 m の琉球海溝底泥から単離された好冷好圧性細菌 *Shewanella violacea* DSS12 (*S. violacea*) の最適生育温度は 8°C であり、最適生育圧力は 300 気圧であり、その生体内には圧力耐性を示す DAD (SvDAD) が存在している (1)。しかし、*S. violacea* における SvDAD の生理的役割や圧力耐性に関する構造活性相関は明らかにされていない。

本研究では、X 線結晶構造解析により SvDAD の立体構造を明らかにすることを目的とし、SvDAD 遺伝子を導入した組換え大腸菌を用いて大量かつ高純度の SvDAD を獲得するための発現条件と精製方法を検討した。

## 2. 方法

### 2.1 SvDAD のタンパク質発現と酵素活性

組換えプラスミド pET41b-*dadA* を導入した組換え大腸菌 BL21 (DE3) を 30 µg/mL kanamycin (Km) を含む LB 液体培地で振盪培養 (37°C, over night) し (前培養)、得られた培養液を新しい培地に植菌した。37°C で OD<sub>660</sub> が 0.4–0.5 になるまで振盪培養し、培養液に isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, 終濃度 0.1 mM) を添加した後、37°C で 5 h 培養した。その後、遠心分離 (8,000 g, 4°C, 10 min) によって菌体を集めた。集めた菌体を 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride を含む 50 mM Na-Pi buffer (pH 7.0) に懸濁し、超音波破碎 (40 W, 15 min, on ice) を行った。遠心分離 (10,000 g, 4°C, 15 min) により上清と沈澱を得た。沈澱画分を SDS-PAGE と活性

測定に供した。

### 2.2 封入体中の SvDAD の可溶化

2.1 で得られた沈澱画分を 7 M 尿素、10 mM dithiothreitol, 1 µM flavin adenine dinucleotide (FAD) を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) に懸濁し、可溶化 (4°C, 30 min) を行った。遠心分離 (10,000 g, 4°C, 20 min) の後、上清を回収した。

### 2.3 封入体中の SvDAD のリフォールディングの検討

2.2 で得られた可溶化後の上清を、尿素の濃度を 6–0 M に段階的に下げ、かつ Tween 20 の濃度を終濃度が 1% になるように段階的に上げた 1 µM FAD を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) に対して 6 回透析し、SvDAD タンパク質のリフォールディングを試みた。遠心分離 (10,000 g, 4°C, 20 min) により得られた上清画分を SDS-PAGE に供し、また、DAD 活性を測定した。

### 2.4 活性測定

2,6-dichlorophenolindophenol ( $A_{610\text{nm}} = 0.8$ ), 1 µM FAD, 2 µM phenazine methosulfate, 50 mM Na-Pi buffer (pH 7.0) に、酵素サンプル (10 µg) と 50 mM 基質 (D-Pro または D-Ser) を加えて全量 250 µL の反応溶液を調製し、3, 10, 15, 20, 30, 40, 50°C で 30 分間反応させた後、610 nm における吸光度変化をプレートリーダーで測定し DAD 活性を算出した。

### 2.5 培養の温度と時間の検討

組換え大腸菌を 2.1 と同様に前培養し、得られた培養液を 30 µg/mL Km を含む LB 液体培地に植菌した。37°C で OD<sub>660</sub> が 0.4–0.5 になるまで振盪培養し、培養液に IPTG (終濃度 0.1 mM) を添加した後、25°C または 37°C で 3 h 培養した。遠心分離 (8,000 g, 4°C, 10 min) によって菌体を集めた。2.1 と同様に集めた菌体の懸濁、超音波破碎、遠心分離を行った。得られた上清と沈澱

1:日大理工・学部・応化 2:日大理工・研究員・応化 3:日大理工・教員・応化 4:日大短大・教員・応化

を SDS-PAGE と DAD の活性測定に供した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 SvDAD のタンパク質発現と酵素活性

破碎後沈澱を SDS-PAGE に供したところ、SvDAD に相当するタンパク質バンドが確認された。組換え大腸菌において SvDAD タンパク質は大量に発現しているにも関わらず、活性測定の結果、酵素活性はどちらの基質 (D-Ser, D-Pro) に対しても非常に低かった。このことから、大腸菌内で大量発現した DAD は封入体となり活性を失っていると考えられたため、リフォールディングを試みた。

#### 3.2 封入体中の SvDAD のリフォールディングの検討

破碎後沈澱の可溶化およびリフォールディングを行った後、遠心分離によって得られた上清を SDS-PAGE に供したところ、DAD に相当するバンドが確認された。また、活性測定の結果、破碎後沈澱と比較してリフォールディング後の上清の比活性はどちらの基質に対してもほとんど変化がなかった (Table 1)。このことから、封入体となっている SvDAD に適したリフォールディング条件の更なる検討が必要であると考えられた。

Table 1. DAD の活性測定

|              | 全タンパク質 (mg) | 比活性 (nmol/min/mg) |       | 全活性 (nmol/min) |       |
|--------------|-------------|-------------------|-------|----------------|-------|
|              |             | D-Pro             | D-Ser | D-Pro          | D-Ser |
| 破碎後沈澱        | 3.26        | 3.24              | 3.51  | 10.6           | 11.4  |
| リフォールディング後上清 | 1.64        | 3.63              | 3.81  | 5.95           | 6.25  |

#### 3.3 活性測定の反応温度の検討

破碎後沈澱を用いて活性測定の温度を検討したところ、10°C で最も DAD の比活性が高くなることが示唆された (Fig. 1)。しかし、15°C 以下での測定中には結露が生じ正確な測定は困難であるため、今後の活性測定は 20°C で行うこととした。

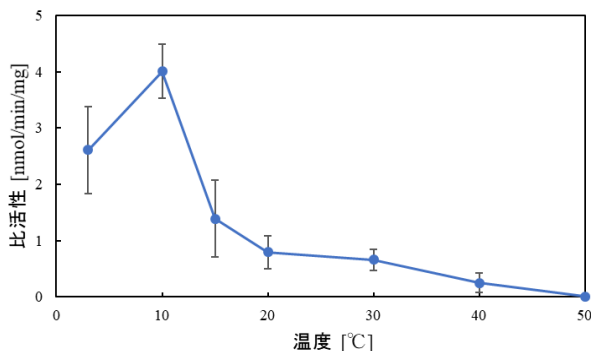


Fig. 1. 活性測定温度の検討 (D-Pro)

#### 3.4 培養の温度と時間の検討

25°C または 37°C で培養した時の破碎後上清と沈澱を SDS-PAGE に供したところ、全てに SvDAD のタンパク質バンドが確認された (Fig. 2)。また、活性測定の結果、25°C で培養した時の破碎後上清と沈澱が D-Pro に対して高い活性を示した (Table 2)。3.2 のリフォールディングの検討結果より、DAD の精製には破碎後沈澱より破碎後上清の方が適していると考えられた。また、培養時間を 3 h に減じた方が破碎後上清の DAD 活性が高いことが分かった。今後、25°C で 3 h 培養した組換え大腸菌の破碎後上清を用いて SvDAD の精製方法を検討する。

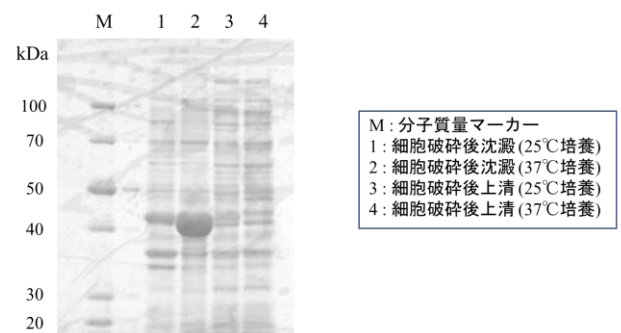


Fig. 2. SDS-PAGE

Table 2. DAD の活性測定

|              | 全タンパク質 (mg) | 比活性 (nmol/min/mg) |       | 全活性 (nmol/min) |       |
|--------------|-------------|-------------------|-------|----------------|-------|
|              |             | D-Pro             | D-Ser | D-Pro          | D-Ser |
| 破碎後沈澱 (25°C) | 4.91        | 18.1              | 0     | 88.9           | 0     |
| 破碎後沈澱 (37°C) | 27.1        | 1.00              | 0     | 27.1           | 0     |
| 破碎後上清 (25°C) | 108         | 17.0              | 0.850 | 1836           | 91.9  |
| 破碎後上清 (37°C) | 130         | 3.28              | 0     | 426            | 0     |

## 4. 文献

- (1) 渡邊翔太, 2013 年度修士論文