

酢酸菌グリセロール脱水素酵素の機能安定化の 物質生産および呼吸鎖への影響

Effect of functional stabilization of
glycerol dehydrogenase from *Gluconobacter*
on biotransformation and respiratory chain

- 金田梨沙, 阿野嘉孝 (愛媛大・農)
- Risa Kaneda, Yoshitaka Ano (Fac. of Agr., Ehime univ.)

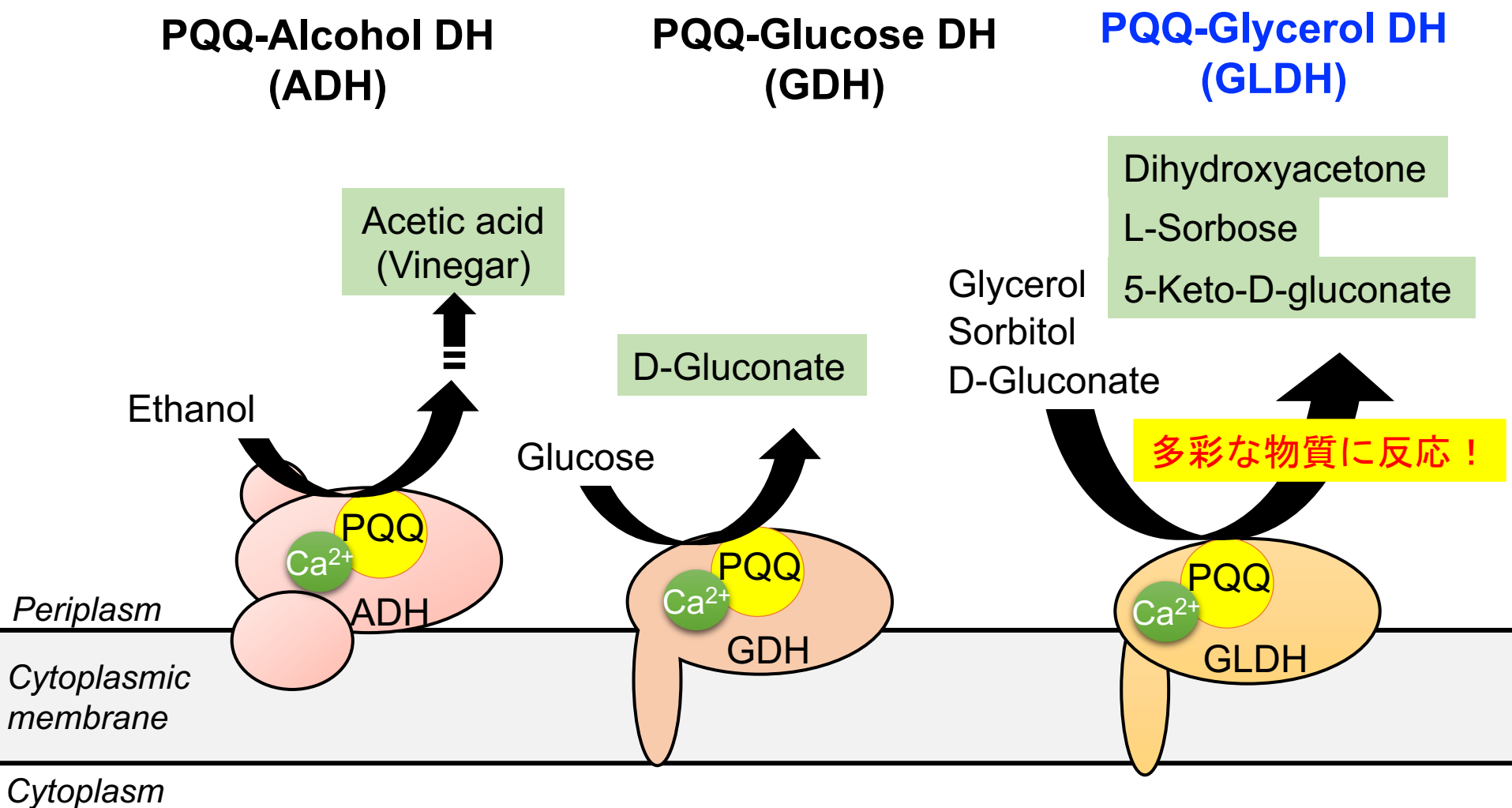
学会創立100周年記念

日本農芸化学会2023年度中四国・西日本支部合同大会
(2023年9月21日, 高知県立大学)

優秀発表賞受賞: 金田梨沙

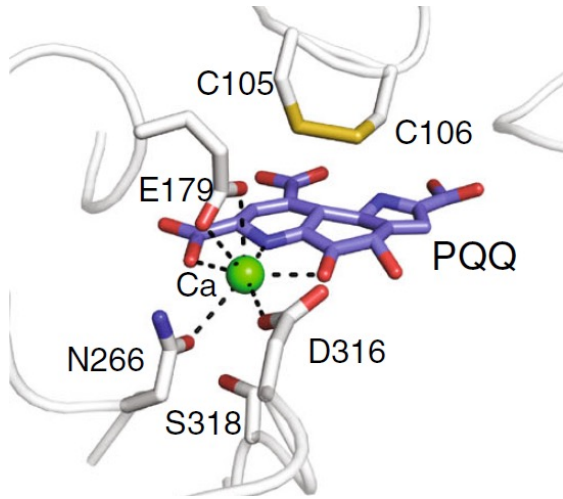
(農学部 応用生命化学コース 発酵化学教育分野)

酢酸菌グリセロール脱水素酵素 (GLDH)

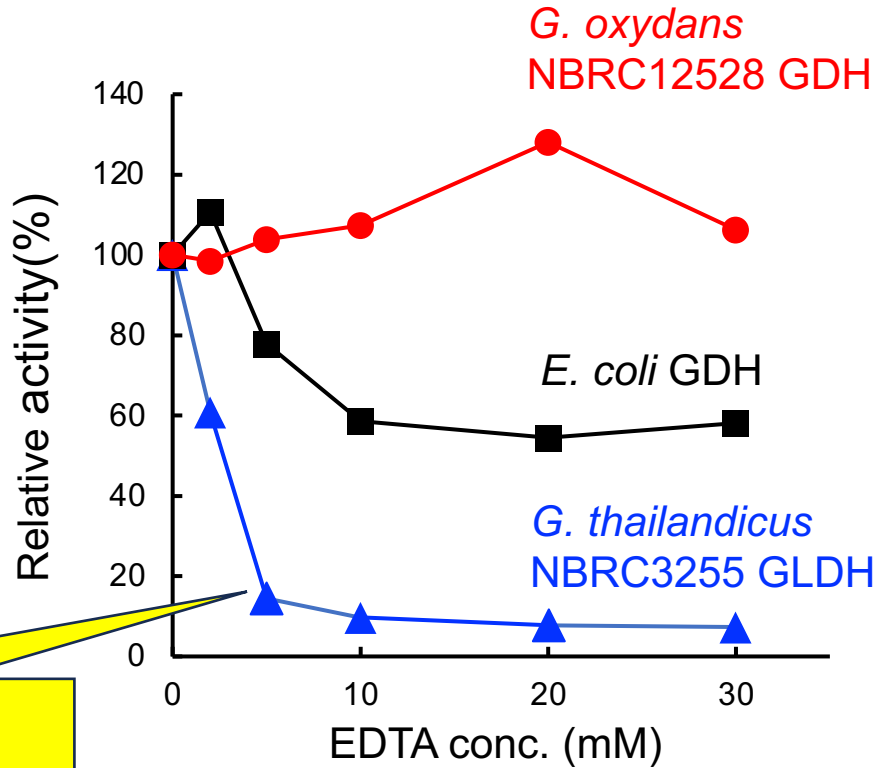


GLDHは、さまざまな物質を多彩な有用化合物に変換できる
産業的に魅力的な多機能酵素である

補酵素ピロロキノリンキノン (PQQ) とその結合



cf. Soluble methanol dehydrogenase
Keltjens et al., *AMBI* 98, 6163(2014)

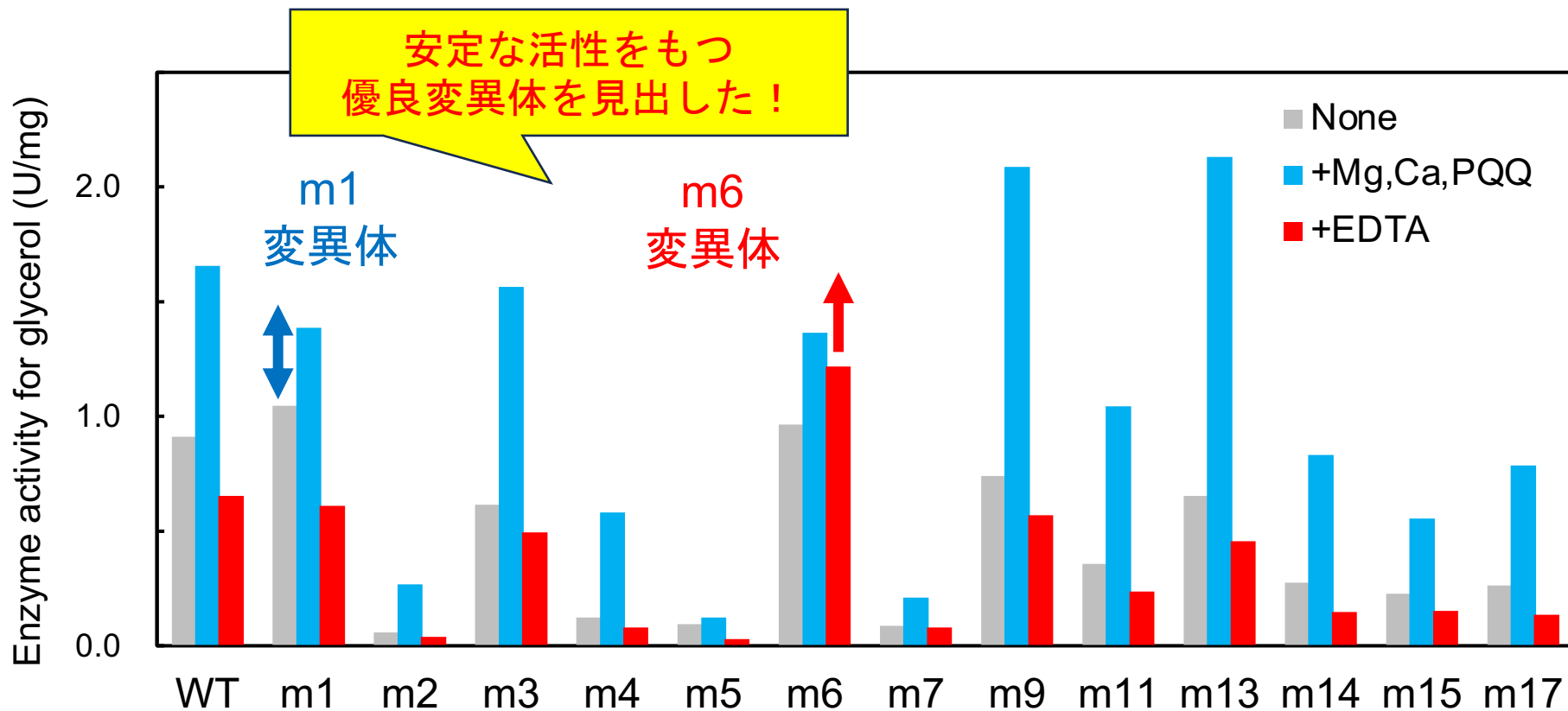


GLDHは夾雑物などのキレート作用で活性を失う！

12528 GDH	351	N	S	A	I	T	D	N	G	S	V	K	Q	A	S	G	A	T	Q	A
<i>E. coli</i> GDH	347	A	G	S	V	T	D	N	F	S	T	R	A	P	S	G	V	I	R	G
3255 sldA	281	N	H	E	V	L	D	G	Q	R	R	W	E	T	S	G	V	I	R	G
					I												A	T	Q	A

新しい反応のために補酵素PQQの結合強化が必要。
安定な類似酵素のアミノ酸配列を元に、変異型GLDHを作製

変異体GLDHと活性の安定性

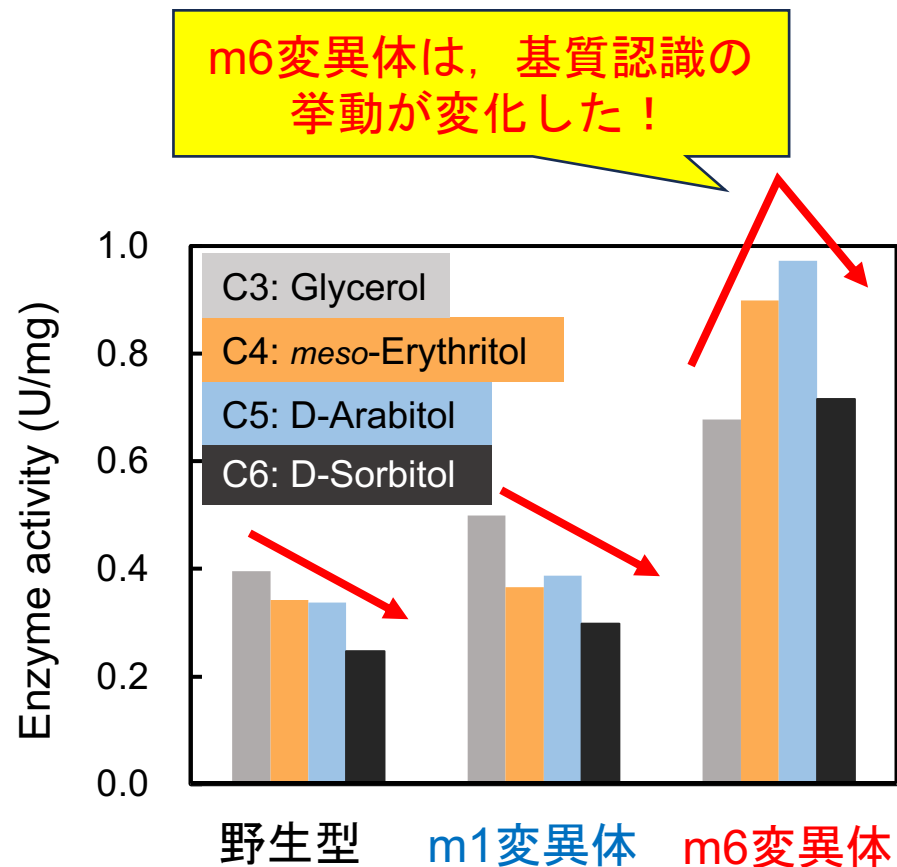
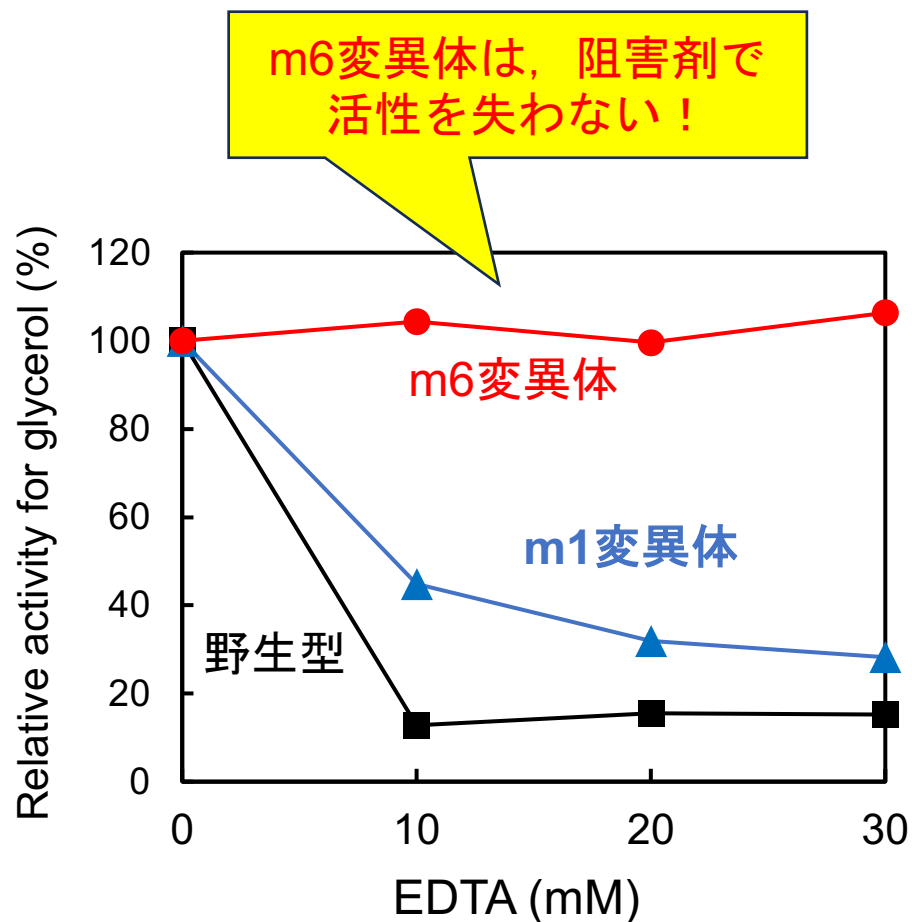


変異体m1：未処理でも最大活性に近い活性を示す変異体

変異体m6：阻害作用のあるEDTAを添加しても安定な変異体

得られた優良変異体は、どのような活性を示すのか？
有用物質の生産にどのように影響するのか？

変異体酵素の活性の特徴



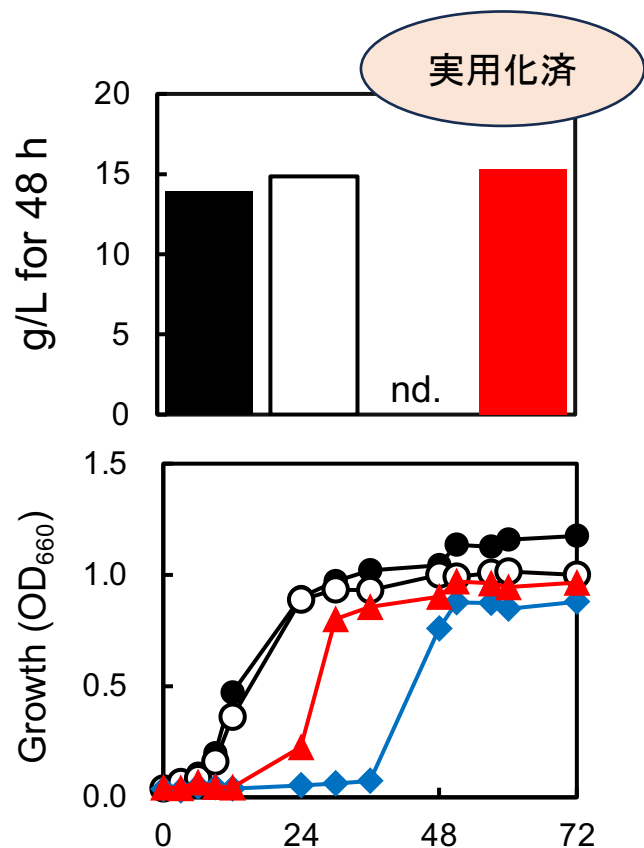
m1変異体：阻害剤EDTAに対して、ゆるやかな耐性を示した

m6変異体：阻害剤EDTAに対して、安定な酵素活性を示した

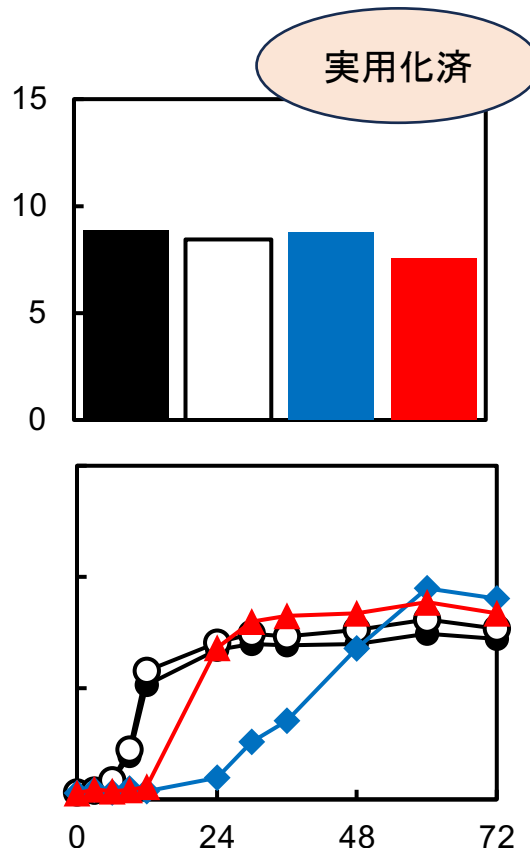
基質認識が変化した、基質特異性が変化した

変異体酵素の物質生産

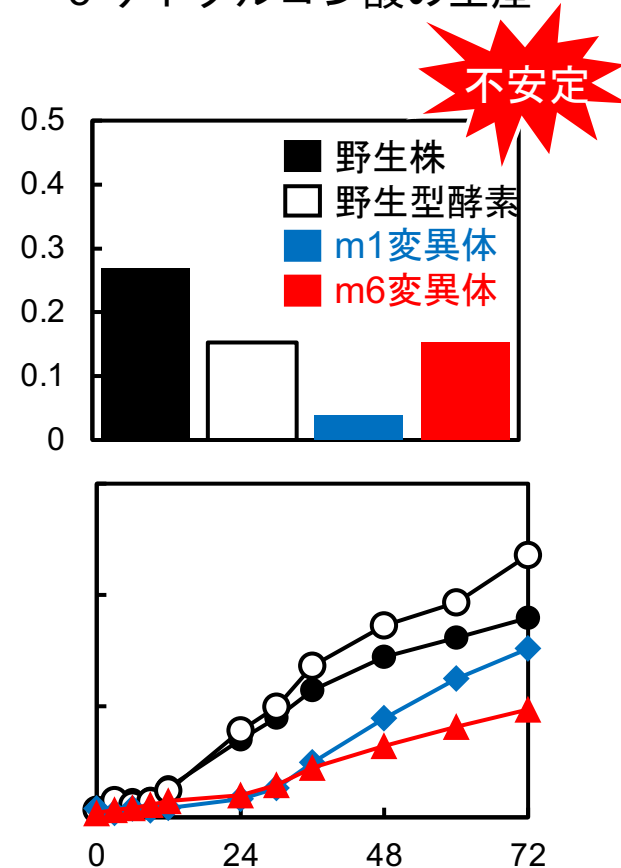
化粧品原料となる
ジヒドロキシアセトンの生産



ビタミンCの原料となる
L-ソルボースの生産



生分解性ポリマー等の原料となる
5-ケトグルコン酸の生産

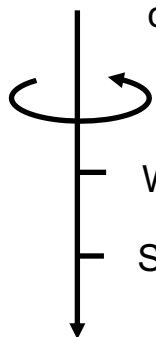


期待に反して、変異体酵素の物質生産性は向上していない
発酵生産に伴う微生物増殖が遅くなったため？

細胞反応による物質生産

Gluconobacter

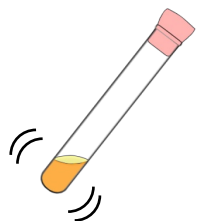
cultured on P' medium.
(30°C, 200 rpm, 24 h)



Washed with dH₂O twice

Suspended with 10 mM KPB (pH6.5)

Resting cells suspension

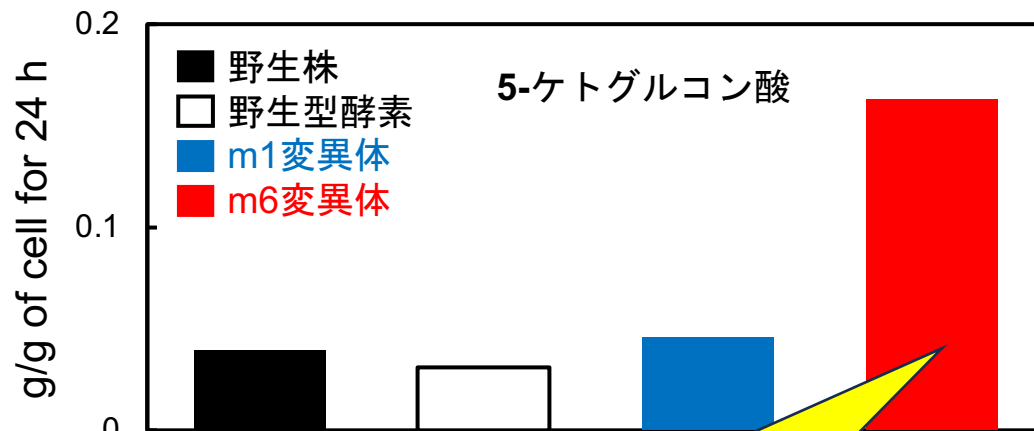
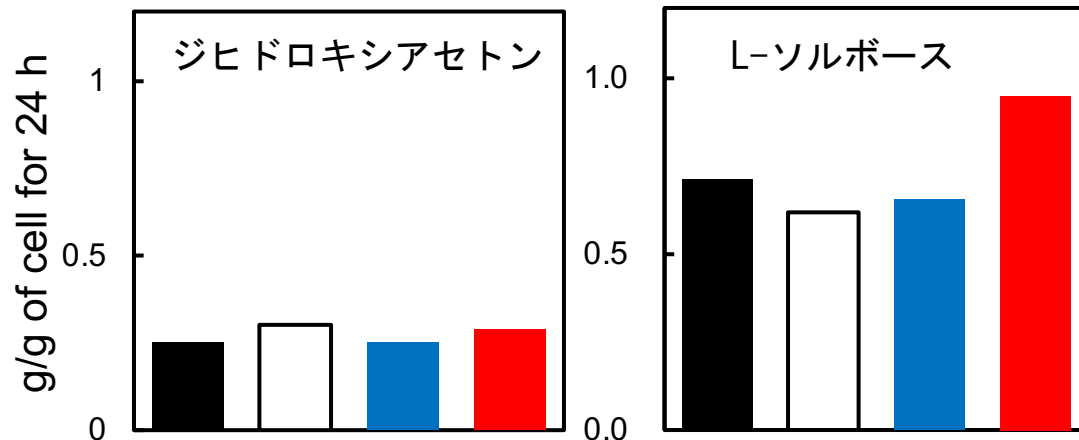


Reaction mixture

Resting cells
100 mM substrate
50 mM KPB (pH 6.5)

Vigorous shaking at 30°C for 24 h

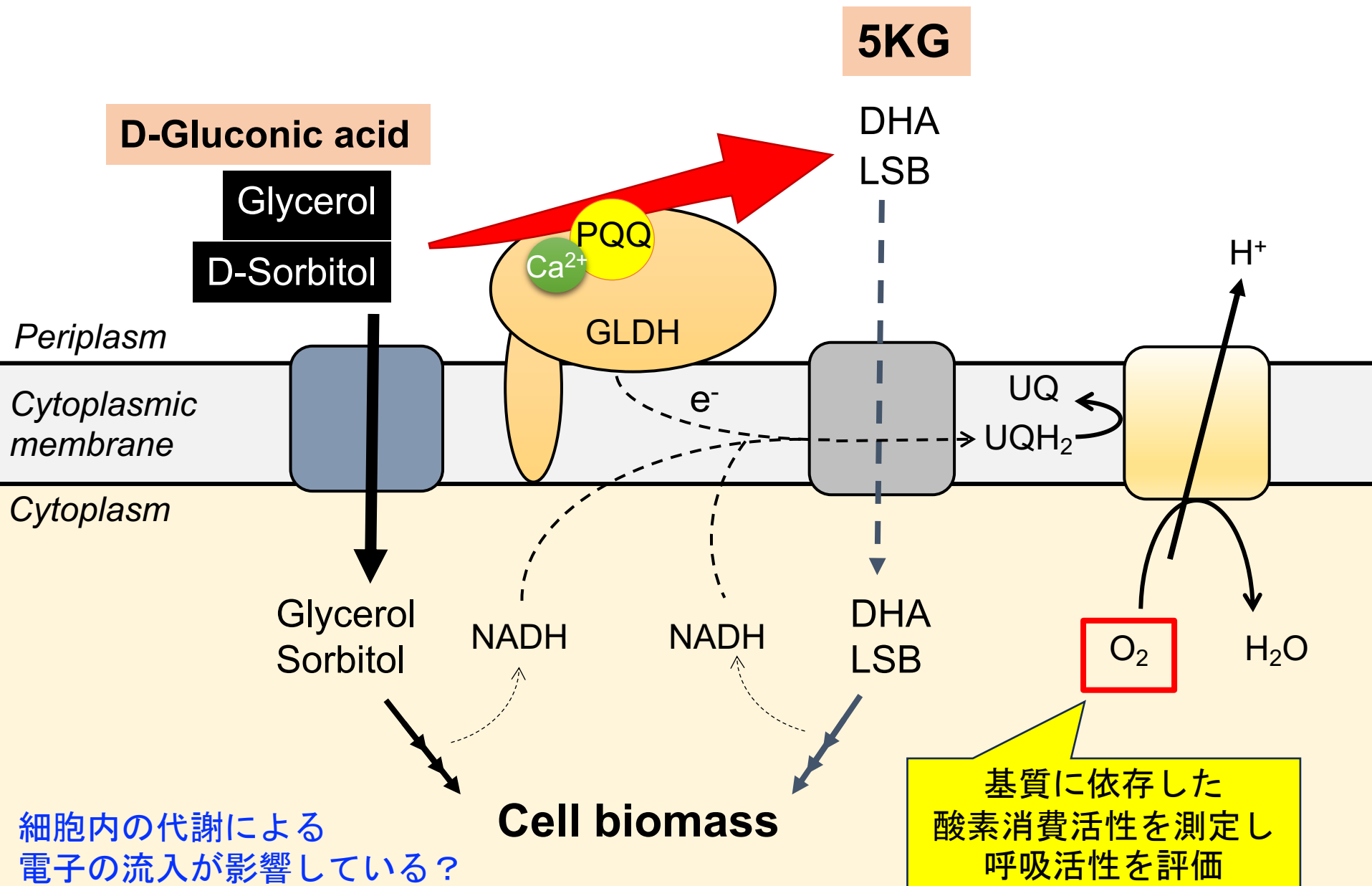
変異体細胞と物質を
混ぜて反応させる



阻害を受けやすい
5-ケトグルコン酸生産で
特に大幅に向上した！

増殖を伴わない反応では、変異体酵素の物質生産性向上した

酢酸菌の細胞膜に存在する呼吸鎖



変異体酵素の呼吸鎖への影響

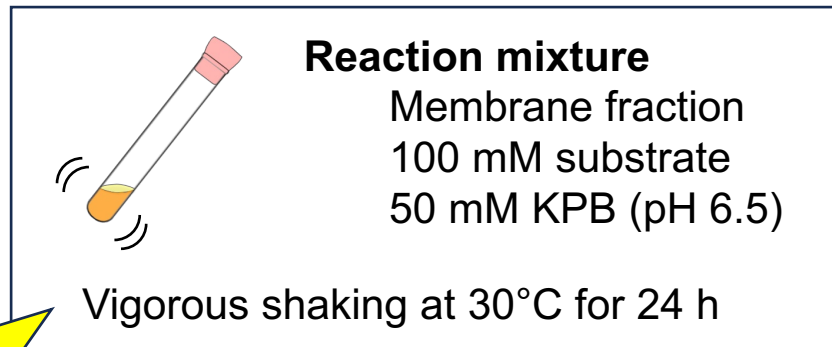
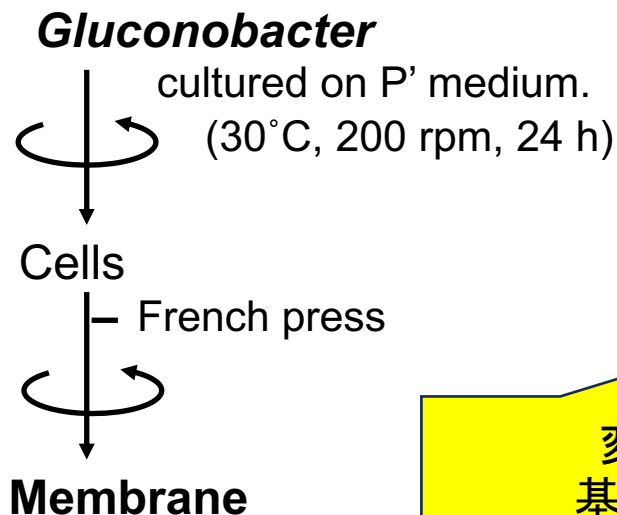
ジヒドロキシアセトン (U/mg)			
	野生型	m1変異体	m6変異体
GLDH activity	0.11	0.08	0.71
Cell suspension	0.95	1.01	1.12
Membrane	0.09	0.07	0.70

L- ソルボース (U/mg)			
	野生型	m1変異体	m6変異体
GLDH activity	0.03	0.03	0.70
Cell suspension	0.09	0.10	0.25
Membrane	0.01	0.04	0.59

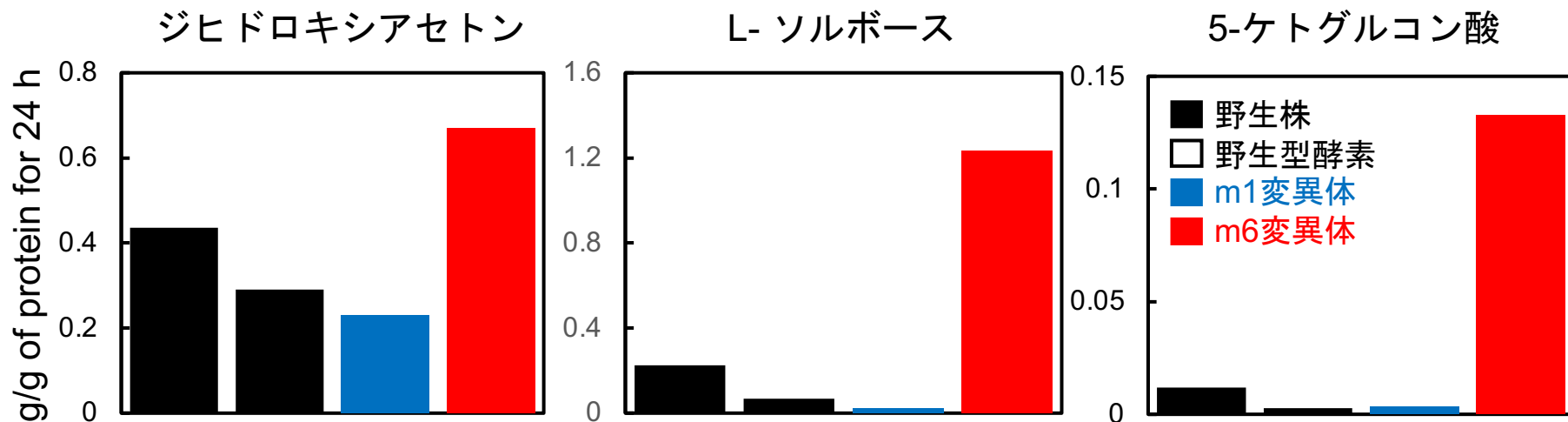
5-ケトグルコン酸 (U/mg)			
	野生型	m1変異体	m6変異体
GLDH activity	0.02	0.03	0.18
Cell suspension	0.02	0.02	0.03
Membrane	0.04	0.03	0.23

酵素活性と相関して
m6変異体の呼吸活性
が増加した!

細胞膜画分での物質生産



変異体細胞の細胞膜と
基質を混ぜて反応させる



細胞膜画分では、どの基質でも大きく物質生産が向上していた

まとめ

- ☑ 安定な類似酵素のアミノ酸配列を参考にして変異を導入し、
不安定なGLDHの酵素機能を安定化させることに成功した
- ☑ 安定化したm6 変異体では、生育を伴わない細胞での物質生産で、
不安定な5-ケトグルコン酸生産が4倍も向上していた
- ☑ 細胞内代謝を排除し、細胞膜での物質生産を検討すると、
m6変異体の呼吸活性および5-ケトグルコン酸生産は6倍も向上した



安定化に成功したGLDH変異体は、補酵素PQQの結合性が強化されており、特に不安定な5-ケトグルコン酸生産に大幅な向上をもたらした

バイオマス資源を原料にした5-ケトグルコン酸生産は、生分解性ポリマーなどの中間原料となる物質で、持続可能社会の実現に寄与できる