

低温菌 *Cytophaga* sp. KUC-1 の亜鉛含有耐熱・低基質特異性アルコールデヒドロゲナーゼとアルデヒドデヒドロゲナーゼ：酵素科学的性質とアルコール定量への応用

数岡孝幸, 村岡郁夫, 吉田雅博, 神澤範行,
荒川憲昭, 老川典夫, 左右田健次
(関西大学・工学部*)

Zinc-containing Thermostable Alcohol Dehydrogenase with Low Substrate Specificity, and Aldehyde Dehydrogenase from Psychrophile, *Cytophaga* sp. KUC-1: Characterization and Application to Alcohol Determination

Takayuki KAZUOKA, Ikuo MURAOKA, Yoshihiro YOSHIDA, Noriyuki KANZAWA,
Noriaki ARAKAWA, Tadao OIKAWA and Kenji SODA
Faculty of Engineering, Kansai University

Summary

The overexpression systems of *Cytophaga* alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in *Escherichia coli* were constructed, and both enzymes were purified to homogeneity. The alcohol dehydrogenase contained 2 atoms of zinc per subunit, but the aldehyde dehydrogenase was independent of any metals. Both enzymes showed low substrate specificities. They showed thermostability, although were produced by a psychrophilic bacterium: the half-life times of *Cytophaga* alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase were over 200 and 65 min at 50°C, respectively. The K_m value of *Cytophaga* alcohol dehydrogenase is 40-50 times lower than that of the *Saccharomyces* enzyme, and the k_{cat}/K_m value of the *Cytophaga* enzyme is much higher than that of the *Saccharomyces* enzyme. Ethanol was determined with about 175 times less *Cytophaga* alcohol dehydrogenase than the *Saccharomyces* enzyme. The addition of *Cytophaga* aldehyde dehydrogenase led to an increase in sensibility.

アルコールデヒドロゲナーゼ (AlcDH) とアルデヒドデヒドロゲナーゼ (AldDH) は共にアルコールとアルデヒド代謝に中心的位置を占め、前者は各基質の可逆的、後者は不可逆的脱水素反応を触媒する NAD(P) 要求性酵素である。馬肝臓の AlcDH は Zn を含み¹⁾、哺乳類、常温性微生物由来の両酵素に関する研究は多いが極限微生物起源のこれらの酵素については不分明なままである。我々は先に南極海水由来の低温菌 *Cytophaga* sp. KUC-1 株が著量の AlcDH 及び AldDH を生産することを見いだした。本研究ではこの両酵素の酵素化学的諸性質を明らかにするとともに高発現系を構築し、その精製酵素を用いる高感度のアルコール定量法を開発した。

実験方法

高発現系の構築—*Cytophaga* sp. KUC-1 の AlcDH と AldDH をコードする遺伝子をそれぞれ pET3b・pET17b に挿入し、宿主として *E. coli* BL21(DE3) を用いて高発現系を構築した。両酵素の発現は 0.4 mM IPTG の添加によって行われた。

*所在地：大阪府吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

AlcDHの精製—粗酵素液を50℃で30分熱処理し、遠心分離後の上清を10 mMリン酸カリウム緩衝液(KPB) (pH7.0)で透析した。酵素液をDEAE Toyopearlカラムに通し、AlcDH活性を含む非吸着画分を回収した。酵素液に1.5 Mとなるように硫酸アンモニウムを添加後、Phenyl Toyopearlカラムに通し、1.35 Mの硫酸アンモニウムを含む10 mM KPB (pH7.0)で洗浄後、1.15 Mの硫酸アンモニウムを含む10 mM KPB (pH7.0)で酵素を溶出した。酵素液を0.15 M NaClを含む10 mM KPB (pH7.0)で透析後、5'-AMP Sepharoseカラムに通し、吸着した酵素を1 mMのNAD⁺を含む10 mM KPB (pH7.0)で溶出した。

*Saccharomyces cerevisiae*由来AlcDHはオリエンタル酵母から購入し、酵素液を0.15 M NaClを含む10 mM KPB (pH7.0)で透析後、5'-AMP Sepharoseカラムに通し、吸着した酵素を1 mMのNAD⁺を含む10 mM KPB (pH7.0)で溶出した。

AldDHの精製—粗酵素液を50℃で30分熱処理し、遠心分離後の上清を10 mM KPB (pH7.0)で透析した。酵素液をDEAE Toyopearlカラムに通し、酵素を10-150 mM KPBの濃度グラジエントで溶出させ、活性画分を回収した。酵素液に1 M硫酸アンモニウムを添加後、Butyl Toyopearlに通し、吸着した酵素を1-0.5 Mの硫酸アンモニウムの濃度グラジエントで溶出させ活性画分を回収した。酵素液を1 Mの硫酸アンモニウムを含む10 mM KPB (pH7.0)で透析後、Phenyl Toyopearlに通し、0.8 Mの硫酸アンモニウムを含む10 mM KPB (pH7.0)で洗浄後0.65 Mの硫酸アンモニウムを含む10 mM KPB (pH7.0)で酵素を溶出させた。活性画分を回収し、10 mM KPB (pH6.5)で透析後、Red Sepharoseに通し、0-0.1 mM NADP⁺の濃度グラジエントで酵素を溶出した。

金属定量分析—Polarized Zeeman Atomic Absorption Spectrophotometer Z-8200 (島津)を用い、Ni, Mn, Fe, Cu, およびZnの分析を行った。

アルコールの定量—400 μ lの98 mM CHES (pH9.0), 2 mM NAD⁺を含む溶液に100 μ lの1.7 U/ml *Cytophaga* AlcDHあるいは300 U/ml *Saccharomyces* AlcDHを添加し、30℃で5分保温後、反応系に0-2.5 mMのエタノール溶液10 μ lを加えて30℃で10分反応後生成したNADHに由来する340 nmにおける吸光度を測定した。またその反応系に0.5 Uの*Cytophaga* AldDHを添加して吸光度を測定した。

結果と考察

Cytophaga AlcDH及びAldDHは*E. coli* BL21 (DE3)の可溶性タンパク質のそれぞれ20, および38%を占めるまで発現された。AlcDHとAldDHの精製酵素標品の比活性はそれぞれ43.0, 14.1 U/mgであり、AlcDHは必須金属としてサブユニットあたり2原子の亜鉛を含有していた。50℃における活性半減時間を測定するとAlcDHは200分以上、AldDHは65分と両酵素とも低温菌由来の酵素であるにもかかわらず高い熱安定性を示した。AlcDHの反応速度論的定数の温度依存性を調べると K_m 値は15°-20℃で最も低い値を示した(表1)。これは本菌の最適生育温度(15℃)に近い温度域である。また k_{cat}/K_m 値を同条件で測定した*Saccharomyces* AlcDHの値と比較するとかなり高い値を示した(表1)。基質特異性を調べるとAlcDHは短鎖から長鎖にわたる1級・2級アルコール、芳香族アルコールなど広い基質特異性を示した。AldDHは長鎖のよりも短鎖のアルデヒドに高い活性を示し、分岐鎖のアルデヒドに対して最も高い活性を示した(表2)。アルコール定量の際、吸光度の経時的変化を見ても1.7 U/mlの*Cytophaga* AlcDHと300 U/mlの*Saccharomyces* AlcDHでほぼ同様の推移を示した(図1)。これは*Cytophaga* AlcDHの触媒効率が*Saccharomyces* AlcDHのそれよりもかなり高いためだと考えられる。またAlcDHとAldDHの共役系を用いることにより0-2.5 mMのアルコールを定量的、かつ高感度に測定することができた(図2)。AlcDH及びAldDHは共に、基質特異性が広い耐熱性酵素でありエタノール以外のさまざまなアルコールの定量への応用が可能である。

参考文献

- 1) Branden, C. I., Jornvall H., Eklund H., and Furugren B. (1975) *Enzymes*, 3rd Ed. 11, Academic press, New York: pp 104 - 190.

Table 1 Effect of temperature on kinetic parameters

Temperature (°C)	<i>Cytophaga</i> AlcDH		<i>Saccharomyces</i> AlcDH I	
	K_m (mM, EtOH)	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ mM ⁻¹)	K_m (mM, EtOH)	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ mM ⁻¹)
10	0.190	12600	9.03	1670
20	0.147	25500	5.70	4550
30	0.168	39100	8.56	5510
40	0.248	38900	12.1	4440
50	0.430	36600		
60	1.04	27400		

Kinetic constants were determined by measurement of initial velocities at various concentrations of one substrate at several fixed levels of the other substrate. Apparent maximum velocities (V_{max}) and apparent Michaelis constants (K_m) were determined by Lineweaver-Burk double reciprocal plots. The maximum velocity (V_{max}) and the Michaelis constant (K_m) were determined with the plots of $1/V_{max}$ against the reciprocal of cosubstrate concentrations. The substrate concentrations used were as follows; ethanol: 0.05-5 mM, and NAD^+ : 0.05-1 mM.

Table 2 Substrate specificity of *Cytophaga* AlcDH and AldDH

(A)		(B)		(C)	
Substrate	Specific activity (U/mg)	Substrate	Specific activity (U/mg)	Substrate	Specific activity (U/mg)
Methanol	0	Formaldehyde	9.53	Formaldehyde	7.30
Ethanol	30.9	Acetaldehyde	327	Acetaldehyde	7.22
1-Propanol	30.9	Propionaldehyde	171	Propionaldehyde	10.5
1-Butanol	28.7	Butanal	168	Butylaldehyde	3.26
1-Pentanol	22.8	Pentanal	147	Isobutylaldehyde	26.5
1-Hexanol	30.8	Hexanal	104	Valeraldehyde	2.30
1-Heptanol	35.6	1-Heptanal	95.3	Isovaleraldehyde	11.7
1-Octanol	38.4	1-Octanal	104	Hexylaldehyde	3.03
1-Nonanol	40.3	1-Nonanal	120	Heptylaldehyde	1.66
1-Decanol	70.2	1-Decanal	161	Octylaldehyde	1.34
2-Propanol	3.01	Acetone	0.500	Benzaldehyde	14.1
2-Butanol	2.58	2-Butanone	0.472	<i>p</i> -Isopropylbenzaldehyde	2.17
2-Pentanol	1.64	2-Pentanone	0.589	<i>p</i> -Chlorobenzaldehyde	4.99
2-Hexanol	1.22	2-Hexanone	0.258	<i>m</i> -Chlorobenzaldehyde	4.98
2-Heptanol	3.25	2-Heptanone	0.430	<i>o</i> -Chlorobenzaldehyde	0
2-Octanol	7.14	2-Octanone	0.705	<i>p</i> -Fluorobenzaldehyde	10.5
2-Nonanol	7.53	2-Nonanone	0.763	<i>m</i> -Fluorobenzaldehyde	5.72
(S)(+)-2-Nonanol	15.2	2-Decanone	1.04	<i>o</i> -Fluorobenzaldehyde	14.1
(R)(-)-2-Nonanol	0.01	Benzylaldehyde	51.2	<i>p</i> -Bromobenzaldehyde	1.90
2-Decanol	9.90			<i>m</i> -Bromobenzaldehyde	3.88
3-Decanol	2.30			<i>o</i> -Bromobenzaldehyde	0
<i>t</i> -Butanol	0.152			<i>o</i> -Methoxybenzaldehyde	2.54
Benzylalcohol	2.01			Glyceraldehyde	1.95
Allylalcohol	39.5				

(A): Substrate specificity of *Cytophaga* AlcDH for oxidative reaction of alcohols. The enzyme was spectrophotometrically examined by monitoring NADH formed at 340 nm with a reaction mixture (3 ml) consisting of 1 mM substrate, 1 mM NAD^+ and 0.5% Triton X-100 in a 100 mM CHES, pH9.0 and enzyme at 30°C. 0.5% Triton X-100 was added to solubilize the substrate, and it showed no effect on enzyme activity. (B): Substrate specificity of *Cytophaga* AlcDH for reductive reactions of aldehydes and ketones. The enzyme was spectrophotometrically assayed by monitoring NADH reduced at 340 nm with a reaction mixture (3 ml) consisting of 1 mM acetaldehyde, 0.2 mM NADH in 100 mM HEPES, pH 7.0 and enzyme at 30°C. (C): Substrate specificity of *Cytophaga* AldDH. The enzyme activity was determined by monitoring spectrophotometrically the rate of reduction of NAD^+ at 340 nm at 30°C. The reaction mixture (3 ml) contained 1 mM substrate, 1 mM NAD^+ , 0.1 M glycine-NaOH buffer (pH 10.0) and enzyme.

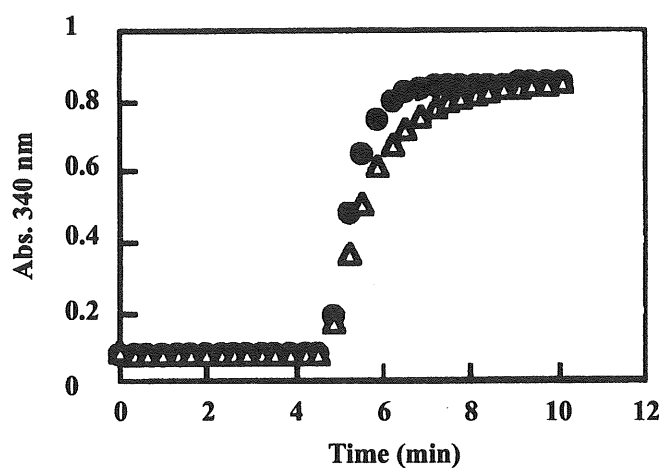


Fig. 1 Time dependence curves of absorbance at 340 nm during ethanol determination.

The reaction mixture was contained 400 μ l of 98 mM CHES (pH9.0) and 2 mM NAD^+ , 100 μ l of 1.7 U/ml *Cytophaga* AlcDH or 300 U/ml *Saccharomyces* AlcDH and 10 μ l of 2.5 mM ethanol. ●; *Cytophaga* AlcDH, △; *Saccharomyces* AlcDH I.

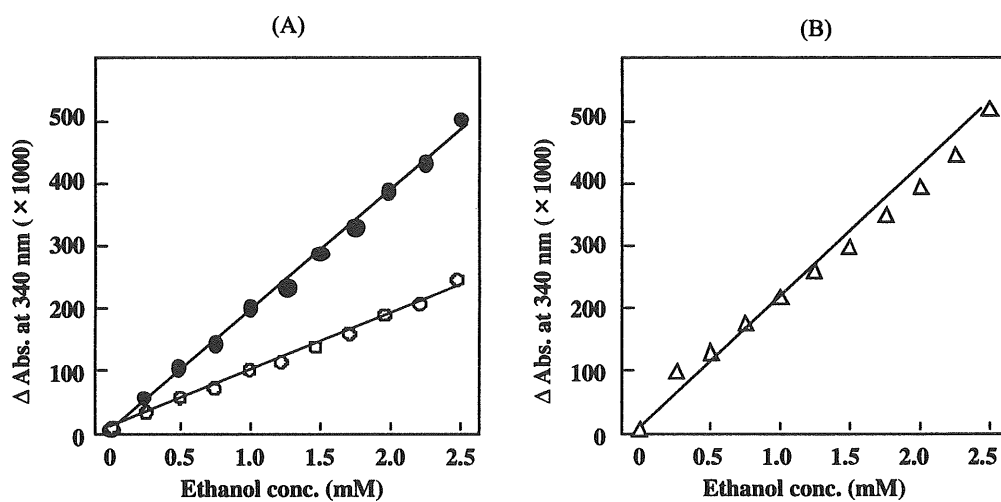


Fig. 2 Calibration curves of ethanol

(A) The calibration curves for ethanol with *Cytophaga* AlcDH (○) and *Cytophaga* AlcDH + AldDH (●). (B) The calibration curve for ethanol with *Saccharomyces* AlcDH I + *Cytophaga* AldDH (△).