

## 好熱菌 *Rubrobacter xylophilus* 由来 D-アミノ酸オキシダーゼを用いたD-バリンセンサーの構築

高山勝己<sup>\*1</sup>, 坂元知里<sup>1</sup>, 高橋祥司<sup>2</sup>, 阿部 勝正<sup>2</sup>, 廣部綾乃<sup>1</sup>, 越桐武児<sup>1</sup>

<sup>1</sup>福井工業高等専門学校物質工学科 (〒916-8507 福井県鯖江市下司町)

<sup>2</sup>長岡技術科学大学生物機能工学専攻 (〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町)

\*takayama@fukui-nct.ac.jp

### Construction of a D-valine sensor using D-amino acid oxidase of *Rubrobacter xylophilus*

Katsumi TAKAYAMA<sup>\*1</sup>, Chisato SAKAMOTO<sup>1</sup>, Shouji TAKAHASHI<sup>2</sup>,  
Katsumasa ABE<sup>2</sup>, Ayano HIROBE<sup>1</sup>, and Takeji KOSHIGIRI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry & Biology Engineering, Fukui National College of Technology  
(Geshi, Sabae 916-8507, Japan)

<sup>2</sup>Department of Bioengineering, Nagaoka University of Technology  
(Kamitomioka, Nagaoka 940-2188, Japan)

(Received September 20, 2016; Accepted October 20, 2016)

#### Abstract

A biosensor for D-valine was constructed by using D-amino acid oxidase of *Rubrobacter xylophilus* (RxDAO) as a biocatalyst. This enzymatic reaction consists of enzymatic and nonenzymatic reactions. During the enzymatic reaction process, an imino acid is produced that is accompanied by oxygen consumption and hydrogen peroxide formation. In this study, RxDAO was trapped on horseradish peroxidase and an osmium polymer-modified carbon paste electrode (RxDAO-HRP-Os CPE). The detection limit of RxDAO-HRP-Os CPE was about 5  $\mu\text{M}$  for D-valine. The response of RxDAO-HRP-Os CPE to amino acids corresponded with the substrate selectivity of RxDAO without D-tyrosine. The micromolar concentration level of D-valine can be detected with the coexistence of 1 mM L-valine. The linear relationship of the calibration curve was between 80  $\mu\text{M}$  and 1 mM. The response was maintained over 2 weeks. RxDAO was not deactivated at 50°C.

**Keywords:** D-valine, *Rubrobacter xylophilus*, D-amino acid oxidase, biosensor, HRP osmium polymer

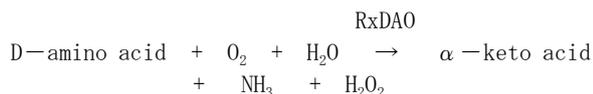
#### 1. はじめに

アミノ酸はグリシンを除いてD,L体が存在する。生体タンパク質はL体で構成されており、L体の生化学的重要性はすでによく知られているところである。これに対して、D-セリンとD-アスパラギン酸の存在(哺乳類体内で他のD-アミノ酸に比べて高濃度に含まれているため)が最初に確認されたのをスタートに、D体のもつ生理的役割も近年明らかにされつつあり、神経伝達ならびにホルモン分泌制御や食品成分としての有用性が注目されている[1]。これに伴い、D-アミノ酸分析に対する重要性が次第に増している。アミノ酸の分析方法として代表的なものとしては、高速液体クロマトグラフィー法(HPLC

法)による光学異性体分離分析があるが、アミノ酸誘導体化やキラル固定相の使用が必要となり、装置も高価である[1, 2]。一方、酵素を用いる方法は、特定のアミノ酸のみが分析の対象になってしまうが、HPLC分析に必要な不可欠な前処理を必要とせず、D体またはL体に対する立体選択的な定量分析を可能とする[1]。さらに、これらの酵素を認識素子として用いるアミノ酸分析用バイオセンサーは、酵素の繰り返し使用を可能とし、迅速かつ簡便な分析手法となりうる[3-6]。

高橋らは、好熱性細菌 *Rubrobacter xylophilus* から新規のD-アミノ酸オキシダーゼ (RxDAO) の取得に成功し、その立体構造を初めとした各種特性解析を行い、そ

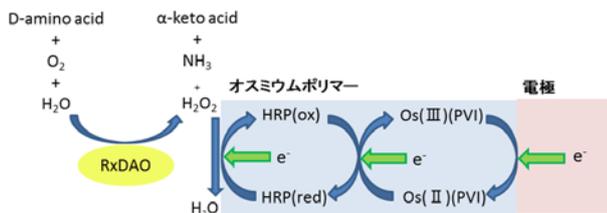
の結果を報告した[7]. RxDAOはFAD結合性の耐熱性酵素であり、D-バリンに基質特異性がある. 本研究ではRxDAOを用いたD-アミノ酸(D-バリン)バイオセンサーの構築を考えた. RxDAOによるD-アミノ酸酸化反応に対する全反応スキームをscheme1に示した. ただし実際の反応は、D-アミノ酸のRxDAOによる酵素触媒作用による酸化反応ステップ(イミノ酸と過酸化水素を生成する)と、その後の非酵素的ステップ(α-ケト酸とアンモニアが生成する)の大きく2つに分けられる. ここで反応の酸素分子は補酵素FADの再酸化に用いられる[8].



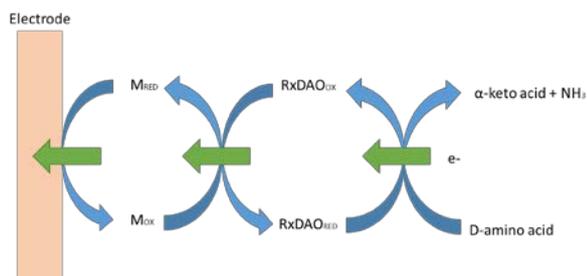
**Scheme 1** Overall reaction scheme of D-amino acid oxidation by RxDAO.

この反応スキームから RxDAO を触媒とするバイオセンサーのタイプとして、1) 溶存酸素の消費をモニターする、2) 過酸化水素 (またはアンモニア) の生成を検出する、3) 除酸素条件下で適当なメディエーターを用いて RxDAO と電極間の電子移動により検出するなどが考えられる.

そこで本研究では、2) の原理に基づいた西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を含有した市販のオスmiumポリマーを用いるバイオセンサーと、3) のメディエータータイプのバイオセンサーを構築し、それぞれのバイオセンサーの応答特性評価を行うことにした. 各タイプのバイオセンサーの応答メカニズムを Fig. 1 (a), (b) に示した.



(a)



(b)

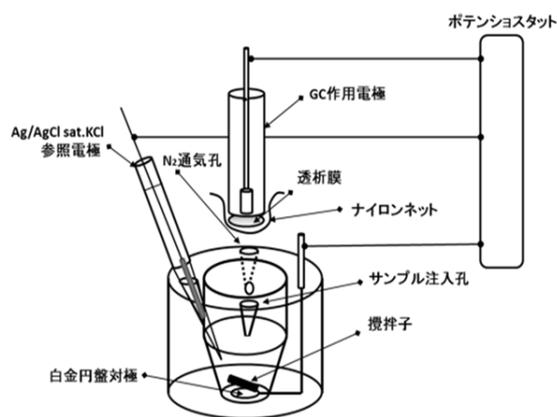
**Fig. 1** Schematic diagram of response mechanism of biosensor, (a):Hydrogen peroxide monitoring type, (b) electron mediation type.

## 2 実験方法

### 2.1 バイオセンサーの作製と応答特性評価

カーボンペースト (CP) 0.26 g, グリセリン 50 μL を乳鉢でよく混合し, CP 電極 (BAS 製: 6 mm i. d.) の孔に詰め, CP 表面を葉包紙上にこすりつけて円滑にした. CP 上に HRP 含有オスmiumポリマー (HRP-0s) 10 μL (BAS 製) を滴下し, 4°C で一夜乾燥した. さらに RxDAO 10 μL (比活性: 58.5 U/mg, タンパク濃度: 7.62 mg/mL, 0.29 U) を滴下し 4°C で乾燥した後, 円形 (6mm i. d.) に切り取った透析膜をのせ, その上から全体をナイロンネットで包み, パラフィルムでナイロンネットの外周を電極側部に固定し RxDAO-HRP-0s バイオセンサーを作製した.

自作のアクリルセル (Fig. 2) に, リン酸緩衝溶液 (1/15 M PBS, pH 7.0) を 1 mL 入れ, 作製した RxDAO-HRP-0s バイオセンサーをポテンシostat に接続し, 電圧を印加 (0 V vs. Ag/AgCl sat. KCl) して電流-時間曲線を記録した. 溶液は常にスターラーで攪拌し, 任意濃度の L-バリン, D-バリンに対する応答を調べた.



**Fig. 2** Electrochemical measurement cell.

### 2.2 最適 pH 条件の検討

pH 変化が RxDAO-HRP-0s バイオセンサーの D-バリン (1.0 mM) 応答に及ぼす影響を調べた (pH 4 と 5 は 1/5 M McIlvaine 緩衝液, pH 6~8 は 1/5 M リン酸緩衝液を使用). 測定方法は 2.1 と同様に行った.

### 2.3 耐熱性の検討

温度変化 (25°C と 50°C) が RxDAO-HRP-0s バイオセンサーの D-バリン (1.0 mM) 応答に及ぼす影響を検討した. 測定方法は 2.1 と同様に行った.

### 2.4 経日変化

RxDAO-HRP-0s バイオセンサーの D-バリン (1.0 mM) に対する応答を, バイオセンサー作製直後から 3 週間 (22 日目) まで隔日でモニタリングを行った (使用しないときは冷蔵庫 4°C で pH 7, 1/5 M リン酸緩衝液に浸して保管). 測定方法は 2.1 と同様に行った.

## 2.5 アミノ酸応答の選択性評価

各種 1.0 mM D-アミノ酸 (バリン, ロイシン, グルタミン酸, アラニン, チロシン, リシン, セリン) に対する応答を調べた. 測定方法は 2.1 と同様に行った.

## 2.6 メディエーター型 RxDAO バイオセンサーの検討

CP電極表面に, RxDAO 10  $\mu$ L (比活性: 58.5 U/mg, タンパク濃度: 7.62 mg/mL, 0.29 U) のみをトラップした電極, RxDAOバイオセンサーを作製し, 2.1と同様の方法で, 任意濃度のD-バリンに対する応答を測定した. ただし, 測定溶液中にメディエーター (ジクロロフェノールインドフェノール (DCIP), ビタミン $K_3$ (VK $_3$ ), フェナジンメトサルフェート (PMS)) について, 各1つを5 mMになるように添加した. 溶液は攪拌し, 窒素通気により除酸素した.

## 3 結果と考察

### 3.1 RxDAO-HRP-0s バイオセンサーの基本応答特性

Fig. 3 に RxDAO-HRP-0s バイオセンサーの D-バリンに対する電流-時間応答曲線を示した. 矢印で示した時点で終濃度 250  $\mu$ M となるように, D-バリンを順次添加した. Fig. 4 に D-バリンに対する検量線を示した (縦軸は D-バリンの添加前と添加後の定常電流値の差とする). 80  $\mu$ M から 1mM の範囲で直線性が得られた (検出限界は S/N = 3 で 5  $\mu$ M 程度). さらに, 1mM の L-バリン (バイオセンサーは応答しない) 共存下であっても, 数  $\mu$ M オーダーの D-バリンを検出できることを確認した.

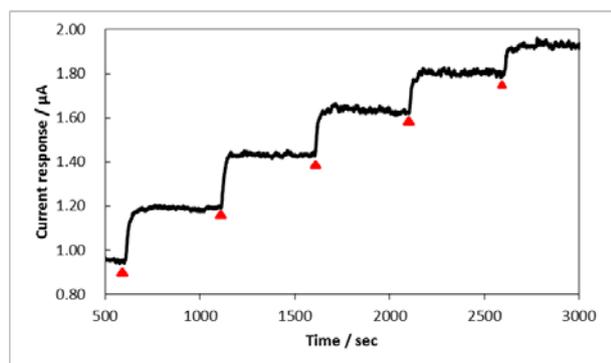


Fig. 3 Current-Time response curve for D-valine by RxDAO-HRP-0s biosensor.

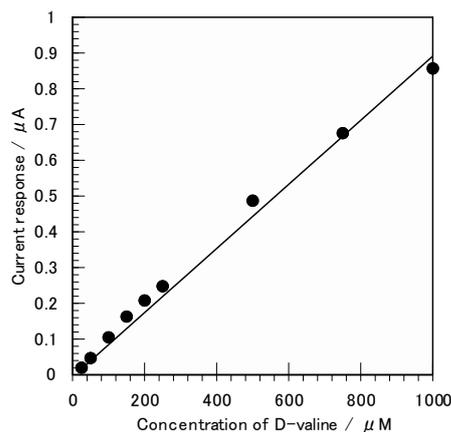


Fig. 4 Calibration curve for D-valine by RxDAO-HRP-0s biosensor.

### 3.2 RxDAO-HRP-0s バイオセンサー応答に対する pH の影響

Fig. 5 に各 pH における 1 mM D-バリンに対する応答値を pH 7 における応答値を 1 として相対値で示した. pH 7.5 で最適値 (最大応答が得られる) が得られた.

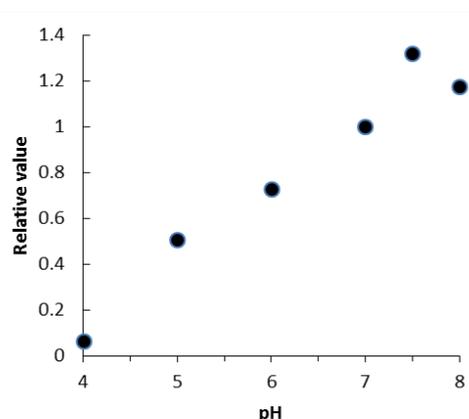


Fig. 5 Effect of pH on response of RxDAO-HRP-0s biosensor for D-valine

### 3.3 RxDAO-HRP-0s バイオセンサーの耐熱性評価

25  $^{\circ}$ C と 50  $^{\circ}$ C における D-バリンに対する RxDAO-HRP-0s バイオセンサーの応答値を比較した. 50 $^{\circ}$ C での応答値は 25 $^{\circ}$ C の時の約 1.86 倍となった, 再び 25 $^{\circ}$ C で測定を行ったときの応答値の減少 (熱による酵素の失活) はなかった.

### 3.4 RxDAO-HRP-0s バイオセンサー応答の経日変化

RxDAO-HRP-0s バイオセンサー作製直後から 1 mM D-バリンに対する応答値を隔日で測定した結果を Fig. 6 に示した. 電極を使用しない場合は, pH7.0, 1/5 M PBS 中, 4 $^{\circ}$ C で保管した. 電極作製後の 3 日は応答値の増加があり, その後 10 日間はほぼ一定値を示し, 2 週間経過後, 急激に応答が劣化することがわかった.

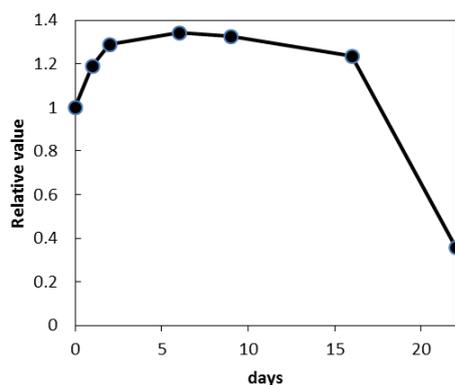


Fig. 6 Effect of storage at 4°C on response of RxDAO-HRP-0s biosensor.

### 3.5 各種アミノ酸に対する RxDAO-HRP-0s バイオセンサー一応答選択性

各アミノ酸に対する RxDAO-HRP-0s バイオセンサーの応答値を D-バリンを基準として相対値で比較した結果を Table 1 に示した. 精製酵素の各種アミノ酸基質特異性の文献値[7]も付記した. RxDAO-HRP-0s バイオセンサーの応答は酵素の基質特異性と立体特異性にほぼ一致したが, D-ロイシンに比較的高く応答しているのが特徴といえる.

Table 1 Substrate response selectivity of RxDAO-HRP-0s biosensor.

Amino acid	Relative response	Relative activity*
D-Valine	100	100
D-Leucine	79	27.0
D-Glutamic acid	6	5.0
D-Alanine	5	1.6
D-Tyrosine	3	17.6
D-Lysine	3	2.4
D-Serine	1	1.3
L-Glutamic acid	5	-
L-Tyrosine	3	-
L-Valine	0	<1.0
L-Leucine	0	<1.0
L-Lysine	0	-
L-Alanine	0	-
L-Serine	0	-

- : N.D., \*:the value was cited from Ref.7

### 3.6 メディエーター型 RxDAO バイオセンサーの構築

RxDAO のみをカーボンペースト電極上に固定したバイオセンサーを作製し, 印加電位を-0.2 V (vs. Ag/AgCl sat.

KCl) に固定した際の, D-バリンに対する電流応答は, 数  $\mu$ A 程度の応答がみられた. これは, RxDAO の補酵素である FAD と電極間の電子移動が一部生じているためと考えられる. さらに, 測定溶液系にメディエーターとして 0.5 mM ジクロロフェノールインドフェノール (DCIP), 0.5 mM ビタミン K<sub>3</sub> (VK<sub>3</sub>), 5 mM フェナジンメトサルフェート (PMS) のいずれか一つを添加し, 印加電位を +0.2 V (vs. Ag/AgCl sat. KCl) に固定し, 窒素通気による除酸素下において, D-バリンに対する電流-時間応答曲線を比較したものを Fig. 8 に示した. RxDAO の FAD と電極間の各種メディエーターを仲介した電子移動がいずれも可能であることがわかった.

ただし比較した 3 種の中では PMS がメディエーターとして最適であり, その検量線を Fig. 9 に示した. RxDAO-HRP-0s バイオセンサーに比べて, メディエーター型 RxDAO バイオセンサーは感度が一桁低く, 検量線が直線性を示す範囲は 1 mM から 8 mM の範囲であった.

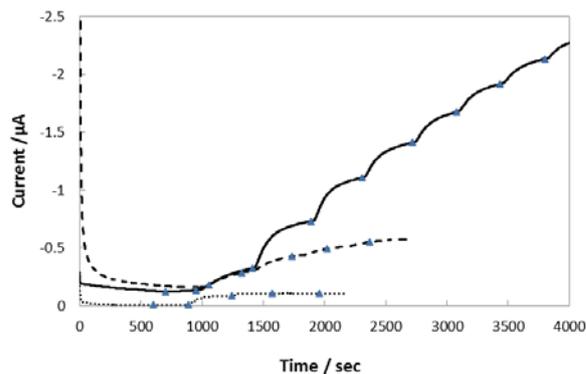


Fig. 8 Current-Time response curve for D-valine by RxDAO biosensor. Each curve was measured in solution containing following mediator. Solid line: PMS, Dashed line: DCIP, Dotted line: VK<sub>3</sub>.

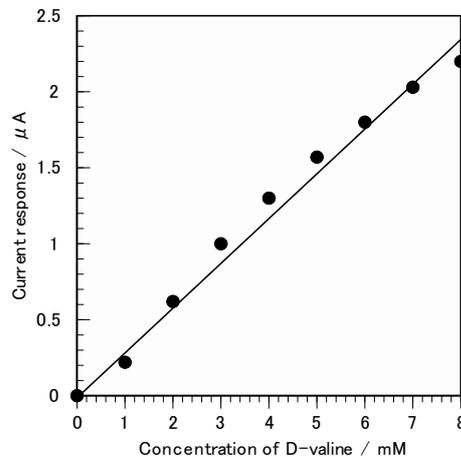


Fig. 9 Calibration curve for D-valine by RxDAO biosensor. PMS was used as a mediator.

#### 4 結論

好熱性細菌 *Rubrobacter xylophilus* 由来の D-アミノ酸オキシダーゼ (RxDAO) を用いた RxDAO-HRP-0s バイオセンサーは、D-バリンと D-ロイシンに高い基質選択性と立体選択性を有し、5  $\mu$ M 程度の D-バリンを検出できることがわかった。電極の長期安定性の向上には、酵素の固定化法を工夫すること（親水性ポリマー中への包括固定など）で改善できると考える。また実際の食品分析への応用を考えた場合、例えば高濃度のアスコルビン酸が含まれる食品等には、比較的低電位においてもアスコルビン酸が電気化学的に応答する（バックグラウンドが増大する）ため、アスコルビン酸干渉抑制策（例：陽イオン交換膜による電極被覆）を行う必要がある。

#### 謝辞

本研究は、平成 26 年度高専長岡技術科学大学共同研究事業助成金の援助を得て行われたものであり、ここに感謝の意を表す。

#### 参考文献

- 1) 牟田口祐太, 大森勇門, 大島敏久, “乳酸発酵と D-アミノ酸生産”, *化学と生物*, 53 (1) 18-25 (2015) .
- 2) 浜瀬健司, “実試料における微量 D-アミノ酸の二次元 HPLC 精密分析法”, *生化学*, 82 (2), 150-154 (2010) .
- 3) Silvia Sacchi, Elena Rosini, Laura Caldinelli, and Loredano Pollegioni, “Biosensors for D-amino acid

detection”, *Methods in molecular biology*, 794, 313-324(2012).

- 4) Elena Rosini, Gianluca Molla, Carlo Rossetti, Mirella S. Pilone, Loredano Pollegioni, and Silvia Sacchi, “A biosensor for all D-amino acids using evolved D-amino acid oxidase”, *J. biotech.*, 135, 377-384(2008).
- 5) Suman Lata and C.S.Pundir, “Fabrication of an amperometric D-amino acid biosensor based on nickel hexacyanoferrate polypyrrole hybrid film deposited on glassy carbon electrode”, *Bioprocess., Biosyst. Eng.*, 36, 81-89(2013).
- 6) Suman Lata, Bhawna Batra, Pankaj Kumar, C.S. Pundir, “Construction of an amperometric D-amino acid biosensor based on D-amino acid oxidase/carboxylated multiwalled carbon nanotube/copper nanoparticles/polyaniline modified gold electrode”, *Anal. Biochem.*, 437, 1-9(2013).
- 7) Shouji Takahashi, Makoto Furukawa, Keishi Omae, Namiho Tadokoro, Yayoi Saito, Katsumata Abe, and Yoshio Kera, “A highly stable D-amino acid oxidase of the thermophilic bacterium *Rubrobacter xylophilus*”, *App. and Environ. Microbiol.*, 80(23), 7219-7229(2014).
- 8) Christopher Walsh, *Enzymatic Reaction Mechanisms*, W. H. Freeman and Company, Chapter 11, 392(1979).