

## どうやって探す？ 理想の酵素光学選択性

古賀 雄一

光学純度の高いキラル化合物は、医薬品をはじめ多くの生理活性物質として利用されており、その市場規模は年間27億ドル（2007年）程度で、なお年10%ずつの成長が見込まれている。その成長には、酵素の光学選択性を利用した合成技術の貢献が大きいといわれている。酵素を光学活性化合物の生産に用いる場合、まず直面する問題が酵素と基質のマッチングである。天然の酵素の中から目的の化合物を基質として認識し、理想的な光学選択性を示すものを見いだすことは非常に困難である。そこで、人為的に光学選択性を改変した酵素を選抜してくる試みが行われている。ここにその例をいくつか紹介したい。

まず、挙げられるのはタンパク質工学的アプローチである。タンパク質工学とは、タンパク質（酵素）を構成するアミノ酸配列の一部を人為的に別のアミノ酸配列に置き換えることで、変異導入された酵素は分子構造が変化し、さまざまな酵素学的性質が影響を受け変化する。これを理想的な光学選択性を持つ酵素を創ることに使うというものだ。しかし、アミノ酸配列の置換から酵素が受ける機能変化を予想することは非常に困難であり、光学選択性の改変においても数多くの課題を解決すべく、試行錯誤が重ねられてきた。

Reetzらは*Pseudomonas aeruginosa*由来のリパーゼに対して、無作為に変異を導入するというランダム変異と、光学選択性が改変されたもののみを選抜するというスクリーニングを通して、光学選択性を約10倍改善することに成功した<sup>1)</sup>。このような手法は指向性進化法と呼ばれ、不明瞭な構造と機能の関係に左右されず、目的の機能を持った酵素を取得できることから、酵素の機能改変において、もっともよく利用される手法である。さらに人間の頭ではデザインできないような斬新な変異酵素が見つかることもこの手法の優れた点であった。一方、ランダム変異による機能改変には、スクリーニングする上での技術的な課題もある。遺伝子工学的技術のお陰で、ターゲット酵素の遺伝子上の変異の種類は指数関数的に増やすことができるが、膨大な数の変異遺伝子から変異タンパク質を発現させ、その機能変化を調べることができる数には限りがある。たとえば100残基からなるタンパク質分子全体に20種類の変異を導入した場合、その組み合わせは20の100乗（ $10^{130}$ ）もの数になる。しかし現在の技術では、一回の実験でスクリーニングできる現実的な変異酵素の数はせいぜい $10^9 \sim 10^{13}$ くらいであり、とてつすべての可能性を網羅することはできない。

そこで、いかに少ない変異の中から効率的に光学選択性の改変された酵素を選抜するかということが課題となっている。

Kogaらは*Burkholderia cepacia*由来リパーゼの基質結合ポケットに着目し、変異の数を限定した小規模ライブラリーを構築し、光学選択性を完全に反転させた変異酵素を取得することに成功した<sup>2)</sup>。このような手法はfocused directed evolutionと呼ばれ、そのライブラリーサイズの限定の仕方が、結果を左右する重要なポイントとして、タンパク質工学研究者の興味の対象となっている。Reetzはこの問題に対して基質結合部位における有効な変異の同定法、変異の効率的な組合せ探索法を開発し成果を挙げている。さらに、それぞれの変異箇所を導入する変異の種類を構造的にバランスのとれた12種類のアミノ酸に限定するという大胆な発想により、変異ライブラリーの規模を大幅に縮小する工夫も試みられている<sup>3)</sup>。

一方、Hohneらは、タンパク質工学とは少し異なる視点からの提案をしている。酵素（アミノトランスフェラーゼ）の光学選択性の改変について、光学選択性の異なる酵素の構造情報を基にしたアミノ酸配列の比較データを作成し、基質結合に関与するアミノ酸の位置、機能改変に必要なと思われるアミノ酸置換のデータを抽出し、変異のパターンをデザインする。この変異のパターンを、既存の天然タンパク質のデータベースのなかから探索してくるのである。完全に*in silico*なやり方であるが、何百万年もかけて進化してきた天然の酵素を利用するという発想である。彼らのアルゴリズムで選抜された酵素のうちの50%は、当初の目的に対して有用な機能を持っていることが確かめられている<sup>3)</sup>。従来の進化工学的手法が数千～数万分の1の確率でしか目的とする機能改変酵素に行きつけないのに対して、驚異的な成功率であるといえる。

酵素の光学選択性を改変させることは、砂にまぎれた一粒の砂金を探し当てるのに似て非常に困難な作業である。しかし、酵素の機能にはまだまだ可能性が広がっており、知恵とアイデア次第で未知の機能を持った酵素に出会えるかもしれない。

- 1) Reetz, M. T.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 2 (2010).
- 2) Koga, Y. et al.: *J. Mol. Biol.*, **331**, 585 (2003).
- 3) Hohne, M. et al.: *Nat. Chem. Biol.*, **6**, 807 (2010).