

逆進化は“specialist”の壁を破るか？—酵素工学の視点から—

亀谷 将史

酵素の産業利用において、その基質特異性の改変は重要なテーマである。基質特異性を変えられれば、基質として使用できる化合物が変わり、それまで不可能だった反応にも酵素を利用できるようになるからだ。

酵素の改変には、これまでに多くの手法が知られている。酵素のアミノ酸残基にランダムに変異を導入する random mutagenesis、立体構造を考慮し基質ポケットの形を変えるような変異を入れる rational design、既存酵素を切り貼りしてキメラ酵素を作り出す DNA recombination といった手法は特によく用いられている。こうした手法・戦略の開発は現在も日進月歩であるが、本稿ではそのような研究の中から、生物と酵素の進化に着目したアプローチを紹介したい。

生命の誕生から今日まで多様な酵素が進化してきたが、基質特異性に関しては概して“generalist”から“specialist”へと変化してきたと推測されている。すなわち、基質特異性の低い酵素から高い酵素へと進化してきた、とする仮説だ。原始生命は現存生物よりはるかに単純なつくりをしており、少ない種類の酵素しか有していなかった。そのため個々の酵素は複数の反応をかけもちで触媒し、基質特異性の低い“generalist”として機能していただろう。時代が下るとともに遺伝子重複で娘遺伝子が生まれ、それぞれが独自の反応のみを触媒するよう進化し、現在のような基質特異性の高い“specialist”による多様な酵素ファミリーが形成されたと推定される。

この説に立った場合、祖先型の酵素は“generalist”であり、現存の酵素にはないような広い基質特異性を有していることが期待される。こうした性質を備えた祖先型酵素は産業利用において有望であるが、残念ながらこのような祖先型酵素は地球上に現存しない。そこで、現存する子孫の酵素の配列を基に、祖先型酵素を復元することが試みられてきた。すなわち、現存酵素を祖先型へと逆進化させることで、基質特異性の異なる酵素が得られないか、というアプローチである¹⁾。祖先型酵素を復元するためには、現存の子孫酵素の塩基またはアミノ酸配列をアラインメントし、系統樹を作製する。そして各分岐点での配列を推定することで、祖先型酵素の配列が決定される。

このようなアプローチで酵素の逆進化を試み基質特異性を検討した例としては、hydroxynitrile lyase と esterase という酵素ファミリーに着目した Kazlauskas と Dean らの研究例があげられる²⁾。彼らは両酵素の共通祖先型の酵素を復元し、両酵素いずれの基質とも反応性を併せ持っていることを示している。さらに、天然には存在しない基質と反応させた際は現存酵素よりも高い活性を示し、広い基質特異性を有する“generalist”であることが裏づけられた。また Huang らのグループは、carboxyl methyltransferase の祖先型酵素を複数再構築し、各進化

段階における基質特異性の変遷を実証している³⁾。これらの結果から、逆進化により祖先型酵素を復元することで、“generalist”や新たな基質特異性を有する酵素が得られる可能性が期待される。

なお、こうした逆進化による祖先型酵素の復元は、基質特異性以外の観点からも進められている。Akanuma らの研究では逆進化的手法により、祖先型タンパク質が耐熱性であったこと、さらには原始生命の生育環境が高温環境であったことまでが推定されている⁴⁾。こうしたアプローチは、応用のみならず基礎科学の見地からも強力な切り口と言えよう。

さて、逆進化的アプローチによる基質特異性の改変における今後の課題は何であろうか。第一に、実際の成功例がまだ少なく、どれだけの酵素で利用可能な手法であるかは今後検証を待たねばならない。また使用する配列に一定以上の保存性がなければ祖先型推定の信頼性が担保できないため、基質特異性の異なるファミリー間でどこまで保存性が共有されているか、適用できる酵素の範囲を見極める上で検討が必要であろう。また、現存の配列から推定した祖先型酵素がどこまで正しいのか、明確に証明する手段がないこともこのアプローチの難しさの一つである。

また逆進化的手法に限られない課題であるが、“specialist”から“generalist”を作り出す研究の進展に比べ、逆に“specialist”を作ることに限っては個々の成功例はあるものの決め手となる戦略に欠けるのが現状である。前述の rational design を例にとれば、基質特異性を下げ“generalist”を作る場合は「基質ポケットの残基を小さい残基に変える」などの戦略が取れるが、ある化合物のみに高い特異性を示す“specialist”を作るような改変の推定は一段階難しくなる。定量用の酵素など“specialist”の存在が求められる場も多いが、多くの工夫がしばしば必要となり⁵⁾、酵素工学の次のステップとしてその打破が望まれる。

以上私見も交えつつ、昨今の研究の動向とその課題についてご紹介した。今後基礎・応用の両面から、これまでの知見・技術の壁を破る研究の発展を期待したい。

- 1) Khersonsky, O. et al.: *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **10**, 498 (2006).
- 2) Kazlauskas, R. and Dean, A.: *Catalytic Mechanisms by Biological Systems*, Proceedings, p. 27 (2012).
- 3) Huang, R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 2966 (2012).
- 4) Akanuma, S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 11067 (2013).
- 5) Kameya, M. and Asano, Y.: *Enzyme Microb. Technol.*, **57**, 36 (2014).