アリールマロン酸脱炭酸酵素の機能改変 -合理的デザインによる立体選択性の逆転と劇的活性向上—

宮本 憲二

近年,進化分子工学的手法による酵素の機能改変が盛 んに行われている.そして,構造情報を参考にした合理 的デザインにより,立体選択性の向上や基質特異性の改 変などの機能改変ができるようになってきた.しかし, 機能向上を目的に作成された大半の変異酵素は,野生型 と比較して活性が低下する問題点があった.一方で,変 異酵素の触媒活性の向上は,いまだ解決されていない課 題として残されている.なぜなら,活性と構造の相関は 複雑であり,十分に理解されていないからである.

本稿で対象とする酵素は、非天然化合物であるアリー ルマロン酸(1)に作用し、光学的に純粋なα-アリールプ ロピオン酸(2)へと変換する能力を持っている(図1)¹⁾. 活性の発現に補酵素も必要でなく、定量的な収率で光学 的に純粋な生成物が得られるため物質生産の観点からも 注目されている.

筆者らは,配列や構造情報に基づいて本酵素に最小限 の変異を導入することにより,従来合理的デザインでは 困難と考えられていた立体選択性の逆転や酵素活性の向 上に成功したので紹介したい.

アリールマロン酸脱炭酸酵素

全国各地の土壌から、フェニルマロン酸(3)を単一炭 素源として集積培養を行い、フェニルマロン酸資化能を 持つ土壌細菌 Alcaligenes bronchisepticus を分離した²⁾. この株から無細胞抽出液を調製し、フェニルマロン酸に 作用させたところ、脱炭酸生成物であるフェニル酢酸の 生成を確認した、培養条件を検討したところ、本酵素は フェニルマロン酸によってのみ誘導される誘導酵素で あった、そこで、各種クロマトグラフィーにより本酵素 を均一に精製し、酵素学的特徴を明らかとした、その結 果,分子量約24,000のモノマー酵素であり,活性の発 現に補酵素を要求しない新奇な脱炭酸酵素であることが わかった³⁾. 基質特異性を調べたところ,二置換より一 置換のアリールマロン酸の方が高い反応性を示したこと から,「アリールマロン酸脱炭酸酵素(以下AMDase)」 と命名した.現在では,[EC 4.1.1.76]に分類されて いる.

ゲノムDNAのショットガン法により,AMDase遺伝 子を取得した.シークエンスの結果,720 bpのORFが コードするタンパク質の分子量は24,737であり,*A.* bronchisepticusから精製したAMDaseの分子量(約24,000) とよく一致した.また,ORFより推定されるタンパク 質のN末端配列は,精製酵素からエドマン分解法により 決定した配列と完全に一致した⁴⁾.以上の結果から,本 ORFがAMDaseをコードしていることがわかった.ま た,大腸菌における過剰発現にも成功し,機能改変への 準備が整った.

阻害実験からシステイン残基が活性中心に存在するこ とが示唆された.そこで,酵素内のシステインをアラニ ンに置換した変異体を作成し活性を測定したところ, 188番目のシステインが活性の発現に深く関与している ことがわかった⁵⁾.さらに,反応の詳細なメカニズムを 明らかとするために,プロキラルなカルボキシル基の一 方を¹³Cでラベルした光学活性な基質を合成し酵素反応 を試みた(図2).その結果,脱炭酸反応は完全に立体反 転により進行しており,脱炭酸後に生成したエノール型 の中間体に対して,システインから面選択的なプロトン 化が起こっていることがわかった⁶⁾.



図1. アリールマロン酸脱炭酸酵素による不斉脱炭酸反応



図2. 脱炭酸反応のメカニズム

著者紹介 慶應義塾大学理工学部生命情報学科(准教授) E-mail: kmiyamoto@bio.keio.ac.jp

立体選択性の逆転

我々の見いだしたAMDaseはR体のカルボン酸のみ を生成するが、逆の選択性の酵素があればさらに汎用性 が高まると考えられる.そこで、S体選択性AMDaseを 求めて、我々を含めた複数の研究機関でスクリーニング が実施された.しかし、R体選択的な酵素はいくらでも 見つかるものの、S体選択的AMDaseはいまだ報告され ていない.そこで、自然界にないものは自分の手で創り 出すしかないと考えて、立体選択性の逆転に挑戦した.

AMDaseの配列を用いてホモロジー検索を実施した ところ,アミノ酸ラセマーゼやイソメラーゼと低いなが らも相同性を示した(図3).アミノ酸ラセマーゼに関し ては詳細な反応機構が解明されており,2つのシステイ ンが共同してプロトンの引き抜きと供与を行う二塩基機 構が提唱されている(図4).

AMDaseとラセマーゼの配列を比較すると、AMDase の活性中心にはシステインが一つしか存在しないことが わかる.そこで、エノール型中間体に対して一方の面か らのみシステインがプロトン供与を行い、光学活性なカ ルボン酸が生成するのではないかと推定した.

酵素の立体選択性を逆転することは,酵素の機能改変 の中でもっとも困難な課題の一つである. AMDaseの 立体選択性を逆転する場合,以下の二つの方法が考えら れる(図5).

一つは、基質のフェニル基とメチル基が入るバイン ディングサイトに変異を導入し、ポケットへの入り方を 反転することである.しかし、この方法ではポケットの 大規模な改変が必要であり難易度は非常に高い.二つ目 は、プロトン供与を行うシステインの位置をエノール中 間体の逆側に移動することである.この場合、188番目 のシステインをプロトン供与能の低いものに置換し、反 対側にシステインを導入するだけで比較的単純である. 問題は移動先の特定であるが、アミノ酸ラセマーゼとの 配列比較から74番目のグリシンに注目した(図3).こ のようなデザインを基に二重変異体(G74C/C188S)を 作成し反応を試みた.すると、期待通り野生型AMDase とまったく逆の選択性を示したが、その活性は野生株の 約1/20,000 に低下していた⁷⁾.

酵素に変異を導入するとしばしば酵素活性の低下という深刻な問題に直面する. 配列や構造からデザインして 酵素活性を向上できればよいが, 現時点では非常に困難 である. そこで, Random Mutationによる活性の向上 を試みた. 変異導入には, 修復系の遺伝子が欠損した

Glu racemase	MDNRP~~VKMMVVA	C NTATAAA~~VKTLIM	C THFPFLAP~
Asp racemase	MEN~~PNFIVLT	C NTAHYFF~~CEKVIL	C TELSLMNE~
Hydantion racemase	M~~VDAFVIA	CWG~~AEAILLO	GCAGMAEFAD~
Maleate isomerase	MKTY~~MSVMAYA	C LVAIMAQ~~DAVILS	C VQMPSLPA~
AMDase	MQQASTP~~AAVVSLM	G TSLSFYR~~SDGILLS	GGLLTLDA~
			100

図3. AMDaseとラセマーゼの配列比較



図4. アミノ酸ラセマーゼの反応機構



図5. 立体選択性の逆転のコンセプト

Mutator Strainを用いた. AMDase遺伝子を含むプラス ミドでStratagene社製*E. coli* XL1-Redを形質転換し, 数回植え継ぐことでランダムに変異を導入した. 得られ た変異を含むプラスミドを用いて発現用の大腸菌を形質 転換した. そして, 脱炭酸活性を色の変化で識別可能な プレートを用いて約5万株のスクリーニングを行ったと ころ, 1株がヒットした. 配列を解析したところ, 二重 変異体 (G74C/C188S) に対して新たにG36N変異が導 入されており, 活性の向上率は約10倍であった⁸⁾. この ようにランダム変異ライブラリーから活性の向上した変 異体は得られたが, その向上率は高くなくヒットの効率 も低いものであった. 改めて, 変異導入による活性向上 の困難さを痛感させられた.

構造解析と反応機構

我々⁹⁻¹⁰と他のグループ¹¹⁻¹³は、独立にAMDaseのX 線結晶構造解析に成功した.我々は、野生型AMDase だけではなく、立体選択性の逆転した変異型についても 構造解析に成功した.その結果、野生型と変異型の活性 部位は、ほとんど変化がないことがわかった.また、基 質が活性部位に結合することにより、開いた構造から閉 じた構造に変化することが明らかとなった.そして、代



図6. AMDaseの活性部位の構造

表的な基質であるα-フェニル-α-メチルマロン酸(4)を 用いて結合モデルを作成し、反応機構を考察した.その 結果、基質が活性部位へと入り、pro-Sのカルボキシル 基が水素結合により安定化される.すると、酵素が構造 変化を起こし、L40などによって構成される疎水性ポ ケットが極性の高いpro-Rのカルボキシル基に接近す る.それによりpro-Rのカルボキシル基の不安定化が起 こり、それがトリガーとなり炭酸反応が始まる.そして、 生成したエノール型中間体に対して188番目(G74C/ C188S変異体では74番目)のシステインがプロトン供 与を行い、光学活性カルボン酸が生成するという反応メ カニズムを推定することができた(図6).

合理的デザインによる酵素活性の向上

詳細な立体構造と反応メカニズムが明らかとなったの で、合理的デザインによる酵素活性の向上にチャレンジ した. G74C/C188S変異型をテンプレートとして分子進 化を行った.迅速に優れた変異体を取得するために,脱 炭酸に伴うpH変化を高感度で検出するアッセイ系を考 案した. そして, 96 穴プレートを用いるハイスループッ トスクリーニング系を構築した.スクリーニングには、 脱炭酸活性の低い変異体でも検出可能な基質であるフェ ニルマロン酸(3)を用いた. 最初に, 188番目のSerが 立体的に大きすぎるのではないかと考えて、この残基を ターゲットとしNNKコドンを用いた site-saturation mutagenesisを行った. その結果,相対活性が5.6倍向 上したG74C/C188G変異型を得た.次に,脱炭酸反応 のトリガーとして重要な働きをしている疎水性ポケット をリデザインすることにした.具体的には、疎水性ポケッ トを構成する残基 (L40, V43, Y48, L77, V156, M159) をターゲットとした site-saturation mutagenesis

表1. 変異体と比活性

	Specific activity (U/mg)		
Variant	$ \bigcirc \begin{matrix} H \\ CO_2H \\ CO_2H \\ 3 \end{matrix} \bigcirc \begin{matrix} Me \\ CO_2H \\ CO_2H \\ 4 \end{matrix} $		
G74C/C188S	0.040	0.0015	
G74C/C188G	0.10	0.010	
G74C/C188G/Y48F	0.82	0.014	
G74C/C188G/M159L	6.2	1.3	
G74C/C188G/Y48F/M159L	24	0.63	
Wild-type	550	13	

表2. 高活性型変異体の基質特異性

	Specific (U/	activity mg)	(Relative activity (%))
Variant	мео	Me CO ₂ H 5	Me CO ₂ H 6
G74C/C188S	0.11	(0.13)	No reaction (0)
G74C/C188G/M159L	7.35	(8.4)	0.20 (37.7)
G74C/C188G/M159L+1変異	7.43	(8.5)	0.39 (73.6)
G74C/C188G/M159L+3変異	16.8	(19.2)	1.34 (253)
Wild-type	87.5	(100)	0.53 (100)

を行った. その結果、フェニルマロン酸に対する相対活 性が210倍向上した3重変異型(G74C/C188G/M159L) と、920倍向上した4重変異型(G74C/C188G/Y48F/ M159L)を得ることに成功した¹⁴⁾.しかし、光学活性 体が生成する基質であるα-フェニル-α-メチルマロン酸 (4) に対する反応性を調べたところ、フェニルマロン酸 にはもっとも高活性であった4重変異体より3重変異体 (G74C/C188G/M159L)の方が高いことがわかった(表 1). これは、フェニルマロン酸を用いてスクリーニン グしたため、フェニルマロン酸に最適化された変異体が 得られたと考えられた. そこで,進化の方向性を光学活 性体の製造に適するようにするために、 スクリーニング 条件を変更した、すなわち、スクリーニング基質として α-フェニル-α-メチルマロン酸(4)を用いて, 現時点で α-フェニル-α-メチルマロン酸に対する活性がもっとも 高い3重変異体(G74C/C188G/M159L)をテンプレー トとして高活性変異体の探索を行うこととした.

疎水性ポケットをターゲットとして数ラウンドの変異 導入と活性スクリーニングを行った(表2). その結果, 2重変異体(G74C/C188S)と比較して相対活性が9500 倍に上昇した6重変異体を取得することに成功した(投 稿中). この6重変異体は医薬品として利用可能な嵩高 いアリール基(5, 6)を持つ基質に対しても高い活性を 示した.特に,非ステロイド系抗炎症薬であるイブプロ フェンが生成する基質(6)に対して,6重変異体は野生 型より253%も高い活性を示した.

まとめ

以上述べてきたように、合理的デザインにより従来困 難と考えられていた、酵素機能の改変に成功した.そし て、活性部位のリデザインを行うことにより、触媒活性 を向上できることを示すことができた.さらに、野生型 酵素と立体選択性が逆で、尚かつ比活性において野生型 を凌駕する変異体を創出することに成功した.

本稿で紹介した研究は,慶應義塾大学理工学部で行われた ものであり,太田博道 慶應義塾大学名誉教授をはじめとし た共同研究者や実際に手を動かしてくれた多くの学生の皆様 に感謝致します.なお,研究の一部は文部科学省科研費補助 金基盤研究(B)の助成のもとで行われたものであり,ここに 感謝致します.

文 献

- 1) Miyamoto, K. and Ohta, H.: J. Am. Chem. Soc., 112, 4077 (1990).
- 2) Miyamoto, K. and Ohta, H.: Biocatalysis, 5, 49 (1991).
- Miyamoto, K. and Ohta, H.: *Eur. J. Biochem.*, 210, 475 (1992).
- Miyamoto, K. and Ohta, H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 234 (1992).
- 5) Miyazaki, M. et al.: Bull. Chem. Soc. Jpn., 70, 2765 (1997).
- 6) Miyamoto, K. et al.: J. Am. Chem. Soc., 114, 6256 (1992).
- 7) Terao, Y. et al.: J. Mol. Catal., B Enzym., 45, 15 (2007).
- 8) Terao, Y. et al.: Appl. Microbiol. Biotechnol., 73, 647 (2006).
- 9) Nakasako, M. et al.: Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun., F64, 610 (2008).
- 10) Obata, R. and Nakasako, M.: *Biochemistry*, **49**, 1963 (2010).
- 11) Okrasa, K. et al.: Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 48, 1 (2009).
- 12) Okrasa, K. et al.: Chem. Eur. J., 14, 6609 (2008).
- 13) Kuettner, E. B. et al.: J. Mol. Biol., 377, 386 (2008).
- 14) Miyauchi, Y. et al.: Chem. Commun., 47, 7503 (2011).