

2018年度 生物工学賞 受賞



微生物から動植物へと展開する
酵素利用技術とその基盤開拓

浅野 泰久



Development of microbial, plant and animal enzymes
and their basis for application

Yasuhisa Asano (*Biotechnology Research Center and Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Toyama Prefectural University, 5180 Kurokawa, Imizu, Toyama 939-0398*)
Seibutsu-kogaku **97**: 3-12, 2019.

はじめに

筆者は、微生物のみならず植物や節足動物において、ニトリルやシアン配糖体の生合成や分解に関与する「アルドキシム-ニトリル経路」の存在を明らかにし、それらの構造と機能の関係を解明して、アミノ酸、ニトリル、アミド、アミン、シアノヒドリンなどの有用物質生産に利用してきた。産業用酵素の供給源は、90%以上が微生物由来とされている¹⁾。その理由は、微生物は培養により酵素の供給が可能であるが、植物、動物は、材料の局在、収量が季節などに依存し酵素の探索や大量調製をしにくいこと、酵素調製には遺伝子組換え技術が威力を発揮するが、代謝酵素の遺伝子がクラスターを形成しておらず解析を行いにくいこと、代謝物質レベルの情報が少ないこと、異種宿主における遺伝子発現が充分ではないことなど、すべての情報や周辺技術が不足していることにある。しかし、驚異的な速度で進行するゲノム情報の蓄積は動植物にも及んでおり、それらの遺伝子情報をより精度高く解釈する手法の開発が必要になっている。

筆者は、酵素タンパク質の一次構造から三次構造に関する情報を、酵素遺伝子の探索から酵素の改変に至るまで積極的に取り入れ、着想の源とすることが必要であると考えた²⁾。また、新規酵素や機能改変酵素を用いて有用物質の合成反応を構築し、酵素をさらに有効利用するには、動植物に関する酵素利用技術の課題に挑戦することが必要だと感じた。このようにして、本研究では、新

しく見いだした酵素群の代謝における重要性を明らかにしつつ、あらゆる手段を使って、優れた性能を持つ酵素を天然界から引き出すこと、および酵素タンパク質の膨大な情報から、新しく構造と機能に関する知見を得て、種々の酵素工学研究上の課題を解決することを目的とした。

1. 動植物におけるアルドキシム-ニトリル経路

従来、酵素の探索は、ほとんどが微生物を対象として行われてきたが、植物や節足動物（ヤスデ）に酵素探索の範囲を拡大し、特に植物および動物の「アルドキシム-ニトリル経路」について遺伝子および酵素レベルで詳細に調べ、細菌との違いを明らかにした(図1)³⁻⁹⁾。筆者は2000年頃に植物のヒドロキシニトリルリアーゼ(HNL)の研究を開始する機会に恵まれた^{4,10)}。HNLは、

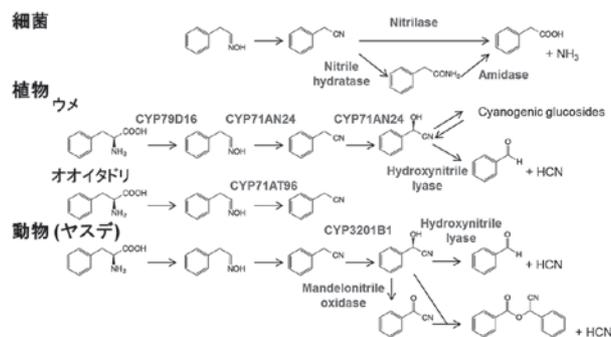


図1. 細菌、動物および植物のアルドキシム-ニトリル経路

ドイツなど欧州で200年間以上研究がなされてきた。1837年にドイツのLiebigとWöhlerは、アーモンド抽出液をエムルシンと呼び、それによってシアン配糖体アミグダリンを基質としてHCNが遊離されることを観察している。1908年にはベンズアルデヒドにシアンが付加する酵素反応が明らかにされ、現在では光学活性なマンデロニトリルなどの工業的製造に用いられている。このアーモンド由来HNLの開発は、活性を見いだしてから産業化まで約200年を要したことになり、近年の微生物酵素が探索を経て産業利用される過程とは異なっている⁴⁾。このような状況で、あえて植物を題材に探索研究を開始した理由は、微生物酵素に関する研究と比較して、植物酵素化学の論文は少なく、遺伝子クローニング技術をはじめ、種々の研究手法を導入すれば、植物の酵素化学研究に大いに貢献できる余地があると感じたからである。

研究開始当初、市販のアーモンドチョコレート中のアーモンドが、HNL活性を有するかどうか疑問に思い、取り出して確認の実験を行った。しかし、活性は認められず、製菓会社に尋ねると、アーモンドを蒸煮処理していることが分かった。一方、ご分与いただいた生アーモンドには、HNL活性があることを初めて確認した。次に、青果市場において、果物として取り扱いがあるウメ、ザクロ、パッションフルーツなどを購入し、さらに長崎県庁のご紹介で長崎県の組合からビワを大量に得て、酵素化学研究を展開できたことは幸運であった。また、富山県立大学の近くに位置する富山県中央植物園と共同研究をさせていただいたことが研究を大きく進展させた。植物園は、約5,000種の植物を保有しており、定期的な剪定の際に葉、茎、根などをもらい受け、ドライアイスで凍らせた後に緩衝液で酵素を抽出した。植物体の無細胞抽出液は、粘性が高いものや、酸化されて漆黒になるサンプルが多く微生物とは大きく異なっていた。抽出液の多くは着色しており、紫外部吸収ではマンデロニトリルの分解を測定できなかったので、光学活性体の合成をHPLCで直接検出することでスクリーニングを行った。HPLCの普及が比較的最近であることから、以前になされていない研究であると確信した。約2年間以上かけて、計174種類の植物種のスクリーニングを行い、8種に新しいHNLを発見した(世界のHNLの約30%)。そのうち、中国雲南省由来の*Baliospermum montanum* HNLは、*S*-選択性を示し(図2)¹¹⁾、他は*R*-選択性を有していた⁴⁾。富山県中央植物園のご助力によって、アーモンドが属するバラ科を中心にして、幅広い植物種を探索できたおかげである。植物のHNL研究を10年以上にわたって行い、新しいHNLの酵素化学的諸性質の解明、各種シアノヒ

ドリンの合成、cDNAクローニングに続いて、変異による選択性の向上、それらのX線構造解析、反応機構の推定などを行った(表1)^{4,9,12-17)}。

これらの研究で、微生物酵素から植物酵素の分野に展開したことで、チャレンジングな研究を新しく経験できた。論文によると、2,650から2,700種もの植物がシアン生成能も持つとされていたので、かなりの数の新しいHNLがあるはずだと考え、タイの大学との共同研究で、留学生にタイの植物園の現場で多数の植物体を少量潰し、簡易検出法でシアン生成能を測定してもらった。ところが、多数の植物がシアンを発生すると認められたにもかかわらず、実験室に持ち帰ってHPLCで分析するとHNL活性はなく、シアノヒドリンの非酵素的な分解のみを行う植物がほとんどであることが分かった。また、高価な果物であるパッションフルーツの種に活性を検出し、次いで富山県中央植物園の温室にあるパッションフルーツの葉にも強い活性を見つけた。しかし、数年して枯れてしまったために実験を継続できず、それを契機にタイや中南米の熱帯地域で栽培されているパッションフルーツを直接得ようと考えた。チェンマイ近郊の山岳地帯に故ブミボン国王が主宰されたロイヤルプロジェクトの農園があり、ケシを撲滅する代わりに大量のパッションフルーツが栽培されていることを知った。チェンマイ大学との共同研究で葉を大量に採取し、HNLの大量調製を行った。酵素化学的諸性質の検討、遺伝子のcDNAクローニングに続いて、X線構造解析を行ったところ、これまでに知られているHNLの中でもっとも小さい(14 kDa, 121 アミノ酸)新規のHNLであった(図3)^{15,16)}。ウメは、安価に大量に購入できるので実験材料として好適である。研究員総出で果肉を除き、種を割って仁を集め、HNLを精製した。しかし、仁にはHNLに対応するmRNAの存在は認められなかった。そこで、ウメの種を水栽培することにより、若い芽からHNLのmRNAを抽出することができた。また、東京の夢の島熱帯植物館で、HNLを作るとされているキャッサバ(*Manihot esculenta*)が栽培されていることを知り、赴いて植物体をご分与いただき実験室に送ったが、活性が認められず、植物の研究が容易ではないことを知った。そこで、*M. esculenta*のHNL遺伝子を合成し大腸菌で発現させたが、HNLの多くは不活性な封入体としてしか発現されなかった。基質であるアルデヒド耐性の変異型酵素を得るために、表面に存在しているリシン残基に着目してランダム変異を行ったところ、ある変異型酵素が活性を有する状態で可溶性に大量に発現される現象を発見し、それが後述するタンパク質遺伝子の可溶性発現の課題を設定する契機になった^{3,18)}。

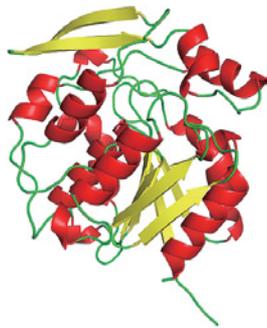


図2. *Baliospermum montanum*由来のS-選択的HNLのモノマー構造

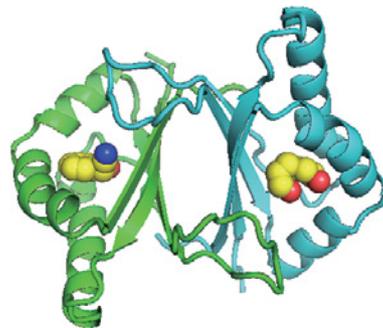


図3. パッションフルーツ (*Passiflora edulis*) 由来のR-選択的HNLの基質-酵素複合体のダイマー構造

表1. 各種HNLの比活性と構造

酵素源	分類	立体選択性	合成反応における比活性 (U/mg)	構造	PDB ID	引用論文
<i>Chamberlinius hualiensis</i>	動物	R	7,420	リボカリンファミリー	—	19, 22
<i>Eriobotrya japonica</i>	植物 (びわ)	R	41*	FAD	—	12
<i>Passiflora edulis</i>	植物 (パッションフルーツ)	R	136	α/β バレル	5XZQ, 5XZT, 5Y02	15, 16
<i>Prunus mume</i>	植物 (ウメ)	R	220	FAD	3RED	23
<i>Nandina domestica</i>	植物 (ナンテン)	R	763	non-FAD	—	17
<i>Manihot esculanta</i>	植物 (キャッサバ)	S	145	α/β	4YK7 (His103Leu); 3X3H (K176P, K199P, K224P)	18, 48
<i>Baliospermum montanum</i>	植物	S	52	α/β	3WWO, 3WWP	11, 13 14

*分解活性

次に、同じくシアンを発生する動物 (ヤスデ) に着目した。微生物、植物の探索研究を行ってこそヤスデに到達したと言える。従来、微生物酵素としては、ニトリルヒドラーゼ、アルドキシム脱水酵素 (Oxd) などを発見し、「アルドキシム-ニトリル経路」を提唱してきた。また、この経路において、工業化や実用に至った有用酵素を見いだしている。微生物由来の酵素探索において、集積培養法を用いると、培地組成によって一握の土からでもきわめて多様な微生物を取り出すことができることはスクリーニングの醍醐味である。また、微生物を環境に馴化させ菌株を分離する馴養培養法も多用してきた。植物スクリーニングでは植物園の植物が微生物の保存菌に相当するものとなる。一方、動物ではどうだろうか。以前、土壌中の生物に関する書物を読み、長野県の小海線付近で7~8年に一度、キシヤスデが大発生し、列車をストップさせるという記述があり、どのようなメカ

ニズムで大発生するのかに大変興味を持った。ヤスデはシアン生成能を持つと知り、それならHNL活性があるのではないかと考えた。しかし、どのように研究に着手できるか見当がつかなかった。2010年11月に南九州で台湾原産のヤンバルトサカヤスデが大発生して、列車をストップさせたという記事を見て、急きょ現地に赴いた。現地の役場の方のご助力により一日で数キログラムのヤスデを採捕した。実験室に持ち帰り、無細胞抽出液を調製し、ただちにHNL活性を確認できた。本酵素は、糖鎖修飾のために電気泳動ゲルでは広いバンドが現れ、かつ、高い比活性のために均一に精製することはなかなか困難であったが、これらの問題を解決し、内部アミノ酸配列の決定、およびcDNAクローニングに成功した。昆虫培養細胞、酵母、大腸菌を宿主とする遺伝子発現の系を検討し、酵素化学的諸性質の解明、およびX線結晶構造解析により立体構造を明らかにし、その反応機構を

推定した。ヤスデ由来の酵素は、応用酵素一般としても著しく高い比活性 (7,420 U/mg) を有し、データベースからの類推ができない新しい構造であることが分かった。そして、これらの酵素が各種の有用な (*R*)-シアノヒドリン合成に利用できることを示した¹⁹⁾。

ヤンバルトサカヤスデのトランスクリプトーム配列を解析した結果、NCBIの non-redundant protein database 上の配列と相同性を示す配列は半数未満 (43.9%) であった。また、相同性が認められた配列もその相同性は低く、ヤスデの酵素と他の生物由来酵素とは類似性が低いと考えられ、ヤンバルトサカヤスデで発現している遺伝子および近縁の生物の遺伝的情報は、データベース上に存在しないことが明らかとなった。すなわち、ヤンバルトサカヤスデの半数以上の遺伝子は、配列情報からその機能を推定することは困難であることが分かった。日常生活ではそれらの小動物を目にしている、脳は見えておらず無視している。しかし、それらにも酵素があり、代謝を行っている事実を改めて考えさせられた。よって、たとえばヤンバルトサカヤスデは、新規酵素の探索対象として有望であると考えられた。さらに、新規酵素マンデロニトリル酸化酵素を見いだすとともに²⁰⁾、シアンや過酸化水素を生合成して防御物質とする経路を明らかにした²¹⁾。

続いて、国内外での広範囲におよぶ国産ヤスデの探索により、10種類以上のヤスデから HNL 遺伝子を得ることができた²²⁾。このような広範囲の動植物からのいずれも異なる HNL の発見を通して、植物および動物が今後有用酵素の新たな探索源になる可能性を示した (表1)。また、ウメ、オオイタドリ、ヤンバルトサカヤスデなどについて、アルドキシム-ニトリル経路あるいは配糖体の生合成遺伝子を同定した²³⁻²⁵⁾。植物遺伝子と細菌遺伝子を大腸菌に共発現させてアミノ酸からニトリルを生合成させた²⁶⁾。

2. 新規反応のタンパク質工学による探索および産業上有用な酵素の開発

第二に、酵素の産業利用をさらに拡大するための基盤整備を目的として、新規反応の探索、タンパク質工学による産業上有用な酵素の開発、および酵素的結晶変換法による物質生産技術の開発を行った。

新規反応の探索では、微生物由来の Oxd を用いて、シアン化物を使用しないエナンチオ選択的ニトリル合成反応を可能にした。本酵素は、微生物に存在するアルドキシム-ニトリル経路に存在し、ニトリルの生合成に関与する。E/Z体の両アルドキシムを基質とする脱水反応により定量的なニトリル合成を触媒する酵素として筆者

らが発見命名したものである。近年、光学活性ニトリルの合成法開発が緊急の課題になっている。たとえば、光学活性ニトリルに由来する部分構造が、サクサグリブチンなどの医薬に見られるが、これらの合成法は、いずれも猛毒シアンを用いるニトリル合成と、それに続く光学分割法が主流である。よって、シアンを用いない、環境にやさしい酵素的合成法を開発することは、グリーンケミストリーの立場から非常に重要である。

自然界から選抜した酵素をそのまま使うだけではなく、X線構造解析などの構造解析の結果に基づいて、酵素に合理的改変を加え、promiscuity (反応機構から想定される未知反応) を引き出し、新しい含窒素有用物質を合成する2種類の反応の構築に挑戦した。アルドキシム脱水酵素について、ヘム酵素で初めて、アルドキシムの窒素原子が二価の還元型ヘム鉄に直接結合するアルドキシム脱水酵素の基質酵素中間体の構造を明らかにしている^{4,27)}。本酵素利用のメリットは、猛毒のシアンを使用せずとも付加価値の高いニトリル類を温和な条件で合成できる点にある⁸⁾。Oxd反応が、Kemp脱離反応と類似していることに着目し、天然型OxdがKemp脱離反応を高効率で触媒することを予想した。すなわち、2-*E/Z*-フェニルプロピオンアルドキシムから光学活性ニトリルの合成²⁸⁾を報告した *Bacillus* sp. OxB-1 の同酵素が、新規酵素反応として Kemp 脱離反応を触媒することを見いだした (図4)²⁹⁾。

酵素遺伝子の変異技術の進展により、実験室では酵素タンパク質のアミノ酸を変異させる実験が日常的に行われている。私達は、世界に先駆けて、進化分子工学の手法を用いて変異型酸性フォスファターゼの利用によるイノシン酸の工業的製造に成功している³⁰⁾。一方で、タンパク質工学の課題の一つとして、地球上に存在が知られていない未知の酵素が求められたとして、進化分子工学によってその酵素に至ることを計画した場合、どのような既存の酵素から進化させれば良いかななどの方法論や手

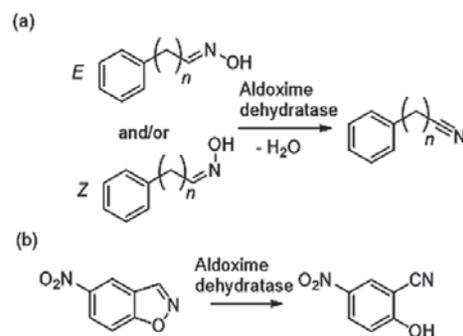


図4. アルドキシム脱水酵素が触媒する反応。(a) アルドキシム脱水反応、(b) Kemp脱離反応。

法は未開拓であった。プロキラルな化合物から両鏡像体を作ったり、ラセミ体の光学分割に用いたりするために、立体異性体のいずれかのエナンチオマーに作用する酵素が立体構造とともに分類・整理されており、エナンチオ補完的酵素 (enantio-complementary enzymes) と呼ばれている³¹⁾。L-アミノ酸酸化酵素 (蛇毒) とブタ腎臓 D-アミノ酸酸化酵素 (pkDAO) の活性中心では、それぞれの基質である L-および D-アミノ酸の、 α 炭素とアミノ基がイミン構造を取る際の窒素がフラビンに対して取る配向性は同じであるが、カルボキシル基とアミノ酸の置換基の向きは逆になり、それらを認識する酵素側のタンパク質は同様な残基を用いている³²⁾。つまり、活性中心を取り巻く酵素側の残基が、お互いに鏡像のように対称的に配置されていることは、酵素の進化を考えるうえできわめて興味深い。

具体的課題として、医薬品原料となる光学活性アミンの酵素的な合成に関する研究に注目が集まっている。そこで R-立体選択的アミノ酸化酵素が必要となり、結局 D-アミノ酸酸化酵素から進化させることができた。考えた経緯は以下の通りである。類似の反応を触媒する S-立体選択的アミノ酸化酵素 [*Aspergillus niger* 由来 L-アミノ酸酸化酵素の変異型酵素 (PDB: 2VVV)] と L-アミノ酸酸化酵素 [*Calloselasma rhodostoma*, 蛇毒由来 (PDB: 2IID)] は、基質特異性はまったく異なるが、その立体構造は同じアミノ酸化酵素ファミリーに属している。一方、L-アミノ酸酸化酵素とブタ腎臓 D-アミノ酸酸化酵素 (PDB: 1VA9) は、立体選択性だけでなく、立体構造も異なるファミリーに属しているが、活性中心が鏡像体関係を形成しており、上記のようにお互いが「エナンチオ補完的酵素」の関係である。つまり、未知の R-立体選択的アミノ酸化酵素が存在するとすれば、D-アミノ酸酸化酵素群と同じファミリーに属するはずであると考えた。そこで、出発酵素として、pkDAO を選定し、

その変異により自然界に存在が知られていない R-立体選択的アミノ酸化酵素の創製を計画した。pkDAO は、D-アミノ酸の定量に用いられる重要な酵素であり、我が国で最初に X線構造解析がなされた³³⁾。阻害剤である *o*-アミノ安息香酸との共結晶構造において、そのカルボキシル基と相互作用している Tyr228 と Arg283 に着目して飽和変異を導入し、アミノ酸化酵素のスクリーニングを行った。その結果、アミノ酸との反応性を完全に失い、新しいアミノ酸化酵素となった変異型酵素 (Y228L/R283G) を得た (図5)³⁴⁾。本変異型酵素を用いて還元剤の共存下、ラセミ体アミンを原料にしてデラセミ化反応を行い、各種の光学活性アミンを合成した³⁵⁾。アミノ酸のデラセミ化反応については、左右田らの優れた研究がある³⁶⁾。さらに、pkDAO の変異型酵素 (Y228L/R283G) の X線結晶構造解析の結果に基づいて、医薬を構成する光学活性アミン成分やその類縁体合成に適用できる変異型 D-アミノ酸酸化酵素の創製研究を展開した^{37,38)}。X線結晶構造解析の結果から、変異点を予測し、上記と同様な飽和変異により、もっとも高い触媒効率を示す変異型酵素 (I230A/R283G) を選択した (図6)³⁹⁾。異なる 2か所の変異点を有する酵素がかさ高い (S)-モノクロロベンジルヒドリルアミン (CBHA) の酸化反応を触媒することを認め、光学活性な (R)-CBHA の合成が可能であることを示した。(S)-CBHA に対して還元剤を組み合わせたデラセミ化反応を応用し、ラセミ体 CBHA から (R)-CBHA を光学純度 96% *e.e.* で合成した (図7)³⁹⁾。変異型酵素 (I230A/R283G) と基質である (S)-CBHA との複合体の X線結晶構造解析の結果から、I230A の変異により、(S)-CBHA の 4-Cl-フェニル基が位置するための十分な空間が、新たに形成されていることを確認した (図6)^{39,40)}。

変異型 R-立体選択的アミノ酸化酵素 pkDAO Y228L/R283G は、(R)- α -メチルベンジルアミン (MBA) のア

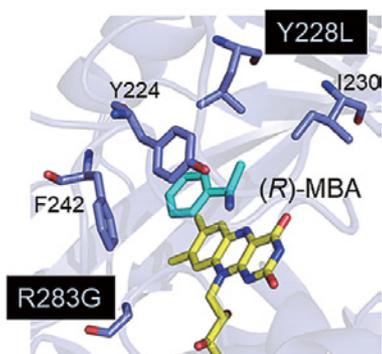


図5. 変異型 D-アミノ酸酸化酵素 (Y228L/R283G) の活性中心: α -methylbenzylamine との基質-酵素複合体の構造 (PDB: 3WGT).

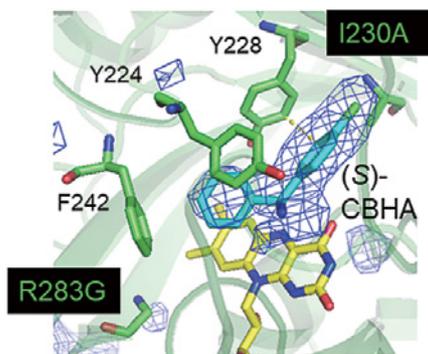


図6. 変異型 D-アミノ酸酸化酵素 (I230A/R283G) の活性中心: (S)-4-Cl-benzhydrylamine との基質-酵素複合体の構造 (PDB: 5WWV).

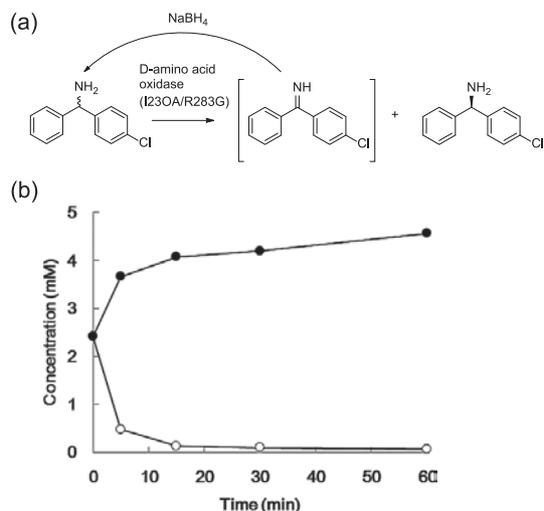


図7. 変異型D-アミノ酸化酵素 (I230A/R283G) が触媒するデラセミ化反応. (a) (R)-4-Cl-Benzhydrylamineの合成, (b) (R)-4-Cl-Benzhydrylamine合成の時間的経過.

ミノ基をイミンに酸化する. このイミンにシアニドが付加すればストレッカー反応と同一の反応を酵素触媒を用いて行うことができ, α -メチルアミノ酸の合成中間体であるアミノニトリルを酵素的に合成することが可能になる. そこで, シアン共存下で(R)-MBAとpkDAO Y228L/R283Gを反応させ, 2-メチル-2-フェニルグリシノニトリル (2MePGN) が生成することを確認した. 次に, この反応にメタゲノムより同定されたニトリラーゼAY487533を追加し, 2MePGNから2-メチル-2-フェニルグリシン (2MePG) への変換を検討した. その結果, (R)-MBAから, 2MePGNを経由して, 2-MePGを収率98%で得ることができ, その鏡像体過剰率は40% (R)であった. さらに, 生成するイミンにシアンを付加して, ニトリラーゼAY487533の存在下, 2-エチルフェニルグリシンおよび*p*-フルオロ-2-メチルフェニルグリシンを, それぞれ α -エチルベンジルアミンおよび α -メチル*p*-フルオロベンジルアミンから合成した (図8)⁴¹⁾. さらに, 非酵素的なストレッカー合成とニトリラーゼAY487533を組み合わせたアミノ酸の不斉合成にも成功した⁴²⁾.

北原らは, *Lactobacillus brevis*由来フマラーゼを用いたL-リンゴ酸の生産法の報告において, フマラーゼが触媒するフマル酸のリンゴ酸への可逆的な水付加反応の平衡を, 塩化カルシウムを添加して, リンゴ酸側に移動させた. この方法は, 生成物であるリンゴ酸を, 水への溶解度が低いリンゴ酸カルシウム塩として結晶状に析出させ, 結晶状態の基質から, 同じ結晶状態の生成物に変換されているように見えたことから, この種の酵素反応を, 酵素的結晶変換法 (enzymatic transcrystallization)

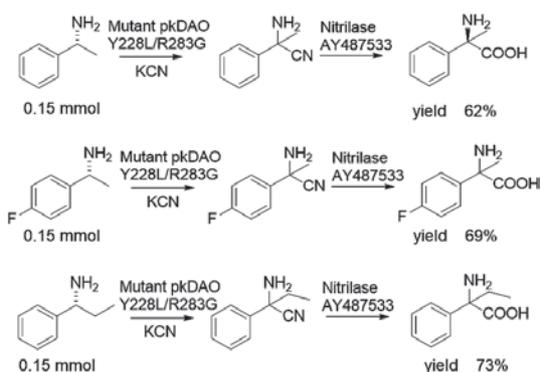


図8. 変異型D-アミノ酸化酵素 (Y228L/R283G) が触媒するシアン付加反応およびニトリラーゼ共存によるアルキルアミノ酸の合成

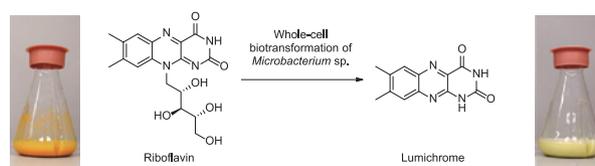


図9. 酵素的結晶変換によるリボフラビンからのルミクロムの合成

として提唱した. 酵素的結晶変換法には以下のような利点がある.

- ①懸濁状態で反応を行うため, 少量の反応液で大量の物質生産ができる.
- ②生成物が結晶として反応系外に移動するため, 可逆反応を完結できる.
- ③生成物が結晶として蓄積するため, ろ過や洗浄などの簡単な操作で精製できる.

本法は, 省エネルギーかつ環境にやさしい反応であり, 将来の酵素利用への大きな可能性を秘めている. 結晶状の ω -ラウロラクタムを水に溶解しない状態で加水分解酵素を用いて, 結晶状の12-アミノラウリン酸を208 g/L合成できる⁴³⁾. しかし, 一般に, 基質の溶解度を越えた懸濁状態で酵素反応を行うことは稀であり, 酵素的結晶変換法の報告は数例にすぎない. 酵素的結晶変換法を積極的に活用するために, 応用例を蓄積し, 実施するために必要な要件を明らかにした. リボフラビンの光分解産物であるルミクロムは, 蛍光プローブや有機半導体材料として利用可能な化合物であり, 安価な製造法の開発が求められていた. リボフラビンとルミクロムの水への溶解度が, それぞれ220 μ M (82.5 mg/L), 20 μ M (4.8 mg/L) と低いことに着目し, 高濃度のリボフラビンを原料にして, 酵素的結晶変換法によるルミクロムの効率的な製造法を検討した (図9)⁴⁴⁾. 培養法および休止菌体法を用いて行った結晶状態のリボフラビンから結晶状態のル

ミクロムへの酵素的結晶変換法は、ルミクロムの収量および収率において、従来の方法を大幅に上回った。スケールアップも容易になり、酵素的結晶変換法の有用性を実証した。

3. 酵素の可溶性発現

バイオインフォマティックスの手法を、酵素の探索などの研究に融合させ、酵素タンパク質遺伝子の大腸菌などにおける可溶性発現技術を創出した。現在、遺伝子組換え技術は、酵素を安価に生産することを可能にし、酵素の産業利用のためにきわめて重要な技術の一つとなっている。しかし、現在の技術では、封入体が形成されるなどの障害があり、しばしば酵素の実用化の律速となっている。

*M. esculenta*由来HNL (MeHNL) 遺伝子が大腸菌を宿主として発現させると、多くは封入体として不溶性画分にしか発現しないが、進化分子工学的手法により改変すると可溶性酵素として良好に発現することを偶然見いだした。すなわち、研究当初、基質のベンズアルデヒドは反応阻害剤としても作用するため、アルデヒドが作用すると思われるMeHNLの20か所のLys残基に着目し変異を導入した。他のS-HNLと相同性のある残基、 β -シート上に位置する残基など、立体構造や基質特異性に影響を与えると予想される6残基を選出し、まず飽和変異を行い、著しく活性が高い変異型酵素を発見した¹⁸⁾。アルデヒド耐性は有していなかったが、酵素表面の3か所のLysをProに置換した変異型酵素であるLys176Pro, Lys199Pro, Lys224Proを得た。次にランダム変異を行ったところ、His103Met, His103Leu, His103Val, His103Ile, His103Cysなどは、大腸菌において活性を有する酵素として可溶性画分に発現した。これらの変異により発現レベルが約10倍以上に改善された。ランダム変異の結果ホットスポットとして認められたHis103を疎水性アミノ酸に変異すると、大腸菌においてきわめて安定に可溶性画分に著量発現することを発見した。

上記のような異種宿主における可溶性変異は従来文献にほとんど記録されておらず、どのようにして研究を進めるべきかの手本はなかった。つまり、構造の変化がどのような影響を及ぼしたから可溶性画分に発現したのか、またその機構解明などの事例は皆無であった。遺伝子工学の発展により、各種起源のタンパク質遺伝子の異種発現実験が行われてきたが、いまだ多数のタンパク質が封入体として不溶性画分にしか発現しないため、それらの機能を明らかにできない問題点が数多く存在しており、生物工学における酵素やタンパク質の利用において

大きな問題となっている。異種発現系で酵素遺伝子を発現させた場合の封入体の形成の問題は、タンパク質のフォールディングに関する基礎的研究が分子生物学の盲点として未解明の課題を多く含むことに起因している。大腸菌で異種タンパク質を発現させる手法としては、以下のようなトライアルアンドエラーによる方法しか知られていなかった。すなわち、菌体培養条件の検討、シャペロンとの共発現、シグナルペプチドなど溶解度を向上させるタグとの融合、封入体タンパク質を変性後リフォールディングする方法などである。また、酵母、昆虫や動物の培養細胞による発現や、無細胞翻訳系も利用されている。しかし、これらの方法でも封入体形成が解消されない酵素タンパク質も多く存在する。また操作が煩雑な点や高額な点などから、簡便で汎用性がある活性型酵素の新しい発現技術の開発が求められている。

アンフィンゼンは、リボヌクレアーゼAを用いた変性とリフォールディングの実験により「タンパク質の立体構造はその一次構造によって一意に規定される」という説を唱えた。現在では、プリオンなど二つの立体構造を有するタンパク質の存在や、翻訳後の糖鎖修飾などが、フォールディングや安定性などにきわめて大きな影響を与えることが知られているが、翻訳後修飾されていない多くのタンパク質・酵素は、このドグマに従い、可溶性発現の性質を含む酵素化学的諸性質が、まずは一次構造に規定されていると考えられる。

遺伝子工学の重要な基本技術であるタンパク質・酵素の遺伝子が大腸菌や酵母などの宿主において、異種発現させる場合において、それらを可溶性画分に発現させるための法則性は知られていない。タンパク質がリボソーム上で刻々と生合成され活性を持つ構造へと(可溶性に)折りたたまれる現象は、結晶化と類似した発熱反応であり、タンパク質構造との関連付けが可能であると考えられる。異種タンパク質の変異導入による可溶性発現の一般性を明らかにすれば、合理的設計に基づく、1から数か所の変異導入による可溶性発現法が可能になり、タンパク質・酵素利用、X線結晶構造解析などに供することができる。その利便性は、生物学者すべてにとっての大きな福音となるはずである。

まず、可溶性という性質を酵素化学的諸性質の一つとして認めることが重要である。次に、変異によって引き起こされた性質の変化であるから、酵素の構造との相関関係を導けるはずであると考えた。まず、複雑な現象は要素に分ける。要素を解析する。解析された要素を視点として帰納法的に調べ、共通する要素をあげる。一般化できれば再度多くの例で検証する。仮説に問題が出れば、得られた知見を踏まえて要素を解析する。このような研

究を繰り返す行ことになる。

これらの変異型酵素の大腸菌での可溶性発現機構を明らかにするために、MeHNLの変異型酵素について、温度やpHに対する安定性、動力学的定数の算出などの生化学および生物物理学的性格付けを行い、野生型酵素と比較した。その結果、上記のように変異型酵素は1点から3点の変異により、変性状態から活性型へと再フォールディングする能力を獲得したことが認められた。まず、変異型酵素を精製し、温度やpHに対する安定性、動力学的定数の算出などの性格付けを行い、野生型酵素と比較した。また、円偏光二色性は、各種の条件下で野生型酵素および変異型酵素のいずれにも、わずかな違いしか認められなかった。熱による失活では、変異型酵素が野生型酵素に対して熱安定性を5°C程度失っていた。グアニジン塩酸による酵素の失活とL-アルギニン水溶液中での再フォールディング実験では、野生型酵素がまったく再活性化しないのに対して、His103MetやHis103Leuの変異型酵素が、それぞれ33および47%再活性化することを発見した。したがって、これらの変異型酵素に見られる変性と再フォールディングにおけるフレキシブルな性質が、変異型HNLが大腸菌内において活性型として高次構造を形成する際に有効に機能するのではないかと考えられる。次に、MeHNL変異型酵素が、各種異種宿主において可溶性発現する機構について検討した。MeHNL変異型酵素His103Leu遺伝子の発現について、大腸菌、酵母*Pichia pastoris*、動物細胞*Leishmania tarentolae*、および大腸菌由来のWakoPUREシステム、および小麦胚芽システムにおいて検討した結果、変異型酵素His103LeuやHis103Met遺伝子が野生型と比較して顕著に可溶性発現される現象は大腸菌の系のみであることが判明した⁴⁵⁾。酵母、動物細胞、および小麦胚芽の系では、それらに含まれるシャペロンがHNLの可溶性発現に対して有効に機能すると考えられる。以上のように、*M. esculenta*由来の変異型S-HNLの変異型酵素は一次構造を変化させることにより、変性に対してフレキシブルな性質を獲得し、それが大腸菌内のタンパク質合成直後の正しいフォールディングと高次構造の形成過程において有効に機能したと考えられた⁴⁾。

次に、近年、ORFeomeとして得られる各種の生物種由来の遺伝子群を大腸菌で発現させ、それらを可溶性と不溶性に分類し、不溶性のタンパク質に変異を与えて可溶性になる変異を多数集めて、解析を行った。酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) 由来の多数の遺伝子が、大腸菌で不溶性タンパク質として発現することを確認し

た。これらの不溶性タンパク質をコードする遺伝子にランダム変異を導入し、それぞれの活性を指標として、活性を持つ酵素として発現する変異型酵素を探索した。また、研究室で日常的に行われている大腸菌を用いる遺伝子発現において、不溶性タンパク質としてしか発現しない課題を抱えていた多くの酵素遺伝子についても検討した。

不活性型になる酵素のランダム変異ライブラリーから活性を示す変異型酵素を探索し、見いだした活性型酵素を解析した。変異導入法や活性検出法を改良し、従来と比較して格段に迅速化したスクリーニング法を構築した⁴⁶⁾。次に、ランダム変異法で得られた活性型変異酵素の変異点について、その共通性を調べた。帰納法的に法則性を探った結果、二次構造予測法で α -ヘリックス構造と推定される部分の、親水性領域に存在する疎水性アミノ酸を親水性アミノ酸に置換する、または、同部分の疎水性領域に存在する親水性アミノ酸を疎水性アミノ酸に置換する方法で、活性型酵素として発現できる「 α -ヘリックス則」を提案した⁴⁷⁾。さらに、保存性が相対的に低いアミノ酸の、少なくとも一つを保存性の高いアミノ酸に置換する方法も、活性型酵素として発現させるために有効であることを見いだした。変異箇所を指摘し、どのアミノ酸に変異すれば可溶性発現するかを予測するために、中野らが開発したBlast検索の結果から多数回のアライメントと解析を行う「INTMSAlign」プログラムを発展させた⁴⁸⁾。すなわち、アミノ酸の疎水性インデックスを加味したHiSol値を用いてホットスポットを見だし、予想したアミノ酸に置換する手法 (INTMSAlign-HiSol法) である。これらの合理的なアミノ酸置換法による異種タンパク質の可溶性発現は、従来、封入体などの形成で遅れていた酵素タンパク質の開発研究の進展を著しく加速する技術として期待されている。「 α -ヘリックス法」は、相同性の高い配列が存在しない新規酵素にも利用できる利点がある。一方、「HiSol法」は、 α -ヘリックス構造以外からも候補残基を見いだすことが可能であり、置換に用いるアミノ酸候補も推定できる利点がある。したがって、両方法は単独あるいは複合的に使用することができる。たとえば、本研究を開始するきっかけとなったMeHNLで可溶性発現に関与するHis103は、 β -シート構造に位置すると推定され、「HiSol法」で見いだすことができた。そして、これらの技術の有用性と信頼性をさらに高めるために、タンパク質構造と上記の方法が適応できるタンパク質の範囲について検討し、本開発技術が各種の構造のタンパク質に対して有効であるとの結果を得た。これらの経緯については、本誌の最近の特集にまとめているので、参照されたい^{49,50)}。また、

INTMSAlignプログラムを有効に用いて、ゲノム情報から α -アミノ ε -カプロラクタムラセマーゼの探索を行い、目的酵素をきわめて効率的に見いだせることを明らかにした^{51,52}。

おわりに

卒業研究、米国Purdue大学やOhio州立大学、さらに(財)相模中央化学研究所で有機化学の洗礼を受け、大学院で専門とした応用微生物学・酵素化学との境界領域を歩くことになった。現在では、新しい酵素反応の探索と有用物質合成への利用研究は、境界領域とは言えないほど大きな分野に成長した。また、微生物酵素の探索と利用法の開発研究に携わり、共同研究者の皆様のおかげで、幸運にも実用化に至った例もいくつかあり、それらの発見の過程に感ずる楽しさが忘れられず、応用微生物学で行われる探索手法の植物への適用、さらにヤスデの酵素の開発など、研究を楽しむことができた。植物酵素を手掛けたことを契機にして、タンパク質・酵素の可溶性発現法の分野に切り込んだ。本研究で開発した「構造」に着目した初めての方法により、可溶性発現に至る確率を高めることができる。今後さらに基礎研究を継続することにより、可溶性発現研究の更なる発展および酵素の結晶構造解析や物質変換などへの利用に関する研究の発展に寄与し、将来、微生物のみならず、植物や動物由来の酵素を産業界で広く利用するために貢献することを期待している。

謝 辞

本研究は、主として富山県立大学工学部で行われたものであり、1990年の富山県立大学の開学以来、生物工学研究センターの建設、開所、機器の設置、大学院に続いて学科新設などの機会に恵まれ、常に良好な環境を与えていただいた富山県知事、初代センター所長山田秀明先生に感謝申し上げます。また、研究室の立ち上げから実験に至るまで常にご支援を頂いた加藤康夫博士(現富山県立大学教授)、米田英伸博士(現富山県立大学教授)、富宿賢一博士(現明星大学准教授)はじめ、酵素化学工学講座の日比慎准教授、松井大亮助教、学生、博士研究員、留学生、構成員の皆様の献身的な努力に深く感謝申し上げます。植物材料をご提供いただいた富山県中央植物園長の内村悦三先生、中田政司先生、および大宮徹博士に御礼申し上げます。パッションフルーツの葉の採取のご指導をいただいたタイ王国チェンマイ大学のChartchai Khanongnuch教授、プリンスオブソンクラ大学のAran H-Kittikun教授に感謝申し上げます。ヤスデの生態についてご指導を賜りました熊本大学の田辺力教授、ヤスデ採捕にご協力いただいた鹿児島県、静岡県、八丈島の皆様に感謝申し上げます。FMO計算などの計算化学でご指導をいただきました立教大学の常盤広明教授、X線構造解析において名古屋大学工学部の山根隆教授および分子科学研究所の青野重利教授に感謝申し上げます。本

受賞内容は、特に最近の研究に焦点を当てており、ERATO浅野酵素活性分子プロジェクト(JST, JPMJER1102)の多くの研究員のおかげによるものです。特に磯部公安先生、桑原保正先生、松田元規博士(現信州大学助教)およびJSTの皆様は大変お世話になりました。論文に名前を掲げた多くの研究員の皆様に感謝申し上げます。また、日本学術振興会科学研究費補助金のご援助を受けたことを感謝いたします。三菱ケミカル(株)、および日本触媒(株)など企業からのご支援に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Godfrey, T. and West, S.: *Industrial Enzymology*, 2nd Edition, Macmillan Press (1996).
- 2) 浅野泰久, 荒木通啓: 生物工学, **96**, 568 (2018).
- 3) 浅野泰久, 山崎瑞恵: 生物工学, **85**, 406–408 (2007).
- 4) 浅野泰久: 化学と生物, **52**, 651–658 (2014).
- 5) Asano, Y. and Kaul, P.: *Comprehensive Chirality* (Carreira, E. M. and Yamamoto, H. Eds.), **7**, p. 122–142, Elsevier (2012).
- 6) Asano, Y.: *Science of Synthesis, Biocatalysis in Organic Synthesis* (Faber, K., Fessner, W.-D., Turner, N. J. Eds.), **1**, p. 255–276, Thieme (2015).
- 7) Asano, Y. and Okazaki, S.: *Future Directions in Biocatalysis 2nd Edition* (Matsuda, T. Eds.), p. 173–187, Elsevier (2017).
- 8) Asano, Y. and Metzner, R.: *Modern Biocatalysis: Advances Towards Synthetic Biological Systems* (Williams, G. and Hall, M. Eds.), p. 28–52, Royal Society of Chemistry (2018).
- 9) Dadashipour, M. and Asano, Y.: *ACS Catal.*, **1**, 1121–1149 (2011).
- 10) 浅野泰久: 現代化学, **539**, 48–53 (2016).
- 11) Nakano, S., Dadashipour, M., and Asano, Y.: *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.*, **1844**, 2059–2067 (2014).
- 12) Ueatrongchit, T., Komeda, H., Asano, Y., and H-Kittikun, A.: *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **56**, 208–214 (2009).
- 13) Kawahara, N. and Asano, Y.: *ChemBioChem*, **16**, 1891–1895 (2015).
- 14) Asano, Y. and Kawahara, N.: *Ind. Biotechnol.*, **12**, 91–97 (2016).
- 15) Nuylert, A., Ishida, Y., and Asano, Y.: *ChemBioChem*, **18**, 257–265 (2017).
- 16) Motojima, F., Nuylert, A., and Asano, Y.: *FEBS J.*, **285**, 313–324 (2018).
- 17) Isobe, K., Kitagawa, A., Kanamori, K., Kashiwagi, K., Matsui, D., Yamaguchi, T., Fuhshuku, K., Semba, H., and Asano, Y.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **82**, 1760–1769 (2018).
- 18) Asano, Y., Dadashipour, M., Yamazaki, M., Doi, N., and Komeda, H.: *Protein Eng. Des. Sel.*, **24**, 607–616 (2011).
- 19) Dadashipour, M., Ishida, Y., Yamamoto, K., and Asano, Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 10605–10610 (2015).
- 20) Ishida, Y., Kuwahara, Y., Dadashipour, M., Ina, A.,

- Yamaguchi, T., Morita, M., Ichiki, Y., and Asano, Y.: *Sci. Rep.*, **6**, 26998 (2016).
- 21) Kuwahara, Y., Yamaguchi, T., Ichiki, Y., Tanabe, T., and Asano, Y.: *Sci. Nat.*, **104**, 19 (2017).
 - 22) Yamaguchi, T., Nuylert, A., Ina, A., Tanabe, T., and Asano, Y.: *Sci. Rep.*, **8**, 3051 (2018).
 - 23) Yamaguchi, T., Yamamoto, K., and Asano, Y.: *Plant Mol. Biol.*, **86**, 215–223 (2014).
 - 24) Yamaguchi, T., Noge, K., and Asano, Y.: *Plant Mol. Biol.*, **91**, 229–239 (2016).
 - 25) Yamaguchi, T. and Asano, Y.: *FEBS Open Bio*, **7**, 335–347 (2017).
 - 26) Miki, Y. and Asano, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 6828–6836 (2014).
 - 27) Metzner, R., Okazaki, S., Asano, Y., and Gröger, H.: *ChemCatChem*, **6**, 3105–3109 (2014).
 - 28) Betke, T., Higuchi, J., Rommelmann, P., Oike, K., Nomura, T., Kato, Y., Asano, Y., and Gröger, H.: *ChemBioChem*, **19**, 768–779 (2018).
 - 29) Miao, Y.-F., Metzner, R., and Asano, Y.: *ChemBioChem*, **18**, 451–454 (2017).
 - 30) Suzuki, E., Ishikawa, K., Mihara, Y., Shimba, N., and Asano, Y.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **80**, 276–286 (2007).
 - 31) Mugford, P. F., Wagner, U. G., Jiang, Y., Faber, K., and Kazlauskas, R. J.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 8782–8793 (2008).
 - 32) Pawelek, P. D., Cheah, J., Coulombe, R., Macheroux, P., Ghisla, S., and Vrieland, A.: *EMBO J.*, **19**, 4204–4215 (2000).
 - 33) Setoyama, C., Nishina, Y., Tamaoki, H., Mizutani, H., Miyahara, I., Hirotsu, K., Shiga, K., and Miura, R.: *J. Biochem.*, **131**, 59–69 (2002).
 - 34) Yasukawa, K., Nakano, S., and Asano, Y.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 4428–4431 (2014).
 - 35) 浅野泰久, 安川和志, 中野祥吾: 月刊化学, **69**, 45–49 (2014).
 - 36) Asano, Y. and Hölsch, K.: *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis* 3rd Edition (Drauz, K., Gröger, H., and May, O. Eds.), p. 1607–1684, Wiley (2012).
 - 37) 浅野泰久, 安川和志: バイオインダストリー, **31**, 49–56 (2014).
 - 38) Asano, Y., Okazaki, S., and Yasukawa, K.: *Green Biocatalysis* (Patel, R. N. Ed.), p. 489–502, Wiley (2016).
 - 39) Yasukawa, K., Motojima, F., Ono, A., and Asano, Y.: *ChemCatChem*, **10**, 3500–3505 (2018).
 - 40) Nakano, S., Yasukawa, K., Tokiwa, T., Ishikawa, T., Ishitsubo, E., Matsuo, N., Ito, S., Tokiwa, H., and Asano, Y.: *J. Phys. Chem. B*, **120**, 10736–10743 (2016).
 - 41) Kawahara, N., Yasukawa, K., and Asano, Y.: *Green Chem.*, **19**, 418–424 (2017).
 - 42) Kawahara, N. and Asano, Y.: *ChemCatChem*, **10**, 5000–5006 (2018).
 - 43) Fukuta, Y., Komeda, H., Yoshida, Y., and Asano, Y.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 980–986 (2009).
 - 44) Yamamoto, K. and Asano, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 7360–7367 (2015).
 - 45) Dadashpour, M., Fukuta, Y., and Asano, Y.: *Protein Expr. Purif.*, **77**, 92–97 (2011).
 - 46) Matsui, D. and Asano, Y.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **79**, 11473–1480 (2015).
 - 47) Matsui, D., Nakano, S., Dadashpour, M., and Asano, Y.: *Sci. Rep.*, **7**, 9558 (2017).
 - 48) Nakano, S. and Asano, Y.: *Sci. Rep.*, **5**, 8193 (2015).
 - 49) 松井大亮, 浅野泰久: 生物工程学, **96**, 569–572 (2018).
 - 50) 中野祥吾: 生物工程学, **96**, 573–577 (2018).
 - 51) Payoungkiattikun, W., Okazaki, S., Nakano, S., Ina, A., H-Kittikun, A., and Asano, Y.: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **176**, 1303–1314 (2015).
 - 52) Payoungkiattikun, W., Okazaki, S., Ina, A., H-Kittikun, A., and Asano, Y.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **44**, 677–685 (2017).