

進化情報に基づく酵素の耐熱化設計

東京薬科大学生命科学部応用生命科学科 赤沼 哲史

【略歴】

- 1998年3月 東京工業大学生命理工学研究科バイオサイエンス専攻博士課程修了 博士（理学）取得
- 1998年4月 理化学研究所基礎科学特別研究員
- 2001年5月 ケルン大学博士研究員（Alexander von Humboldt フェロー）
- 2003年3月 科学技術振興機構研究員
- 2005年4月 食品総合研究所特別研究員
- 2006年4月 東京薬科大学生命科学部 助手・助教

はじめに

酵素の耐熱化設計は、アミノ酸配列-立体構造-安定性の関連の解明を目的にすると同時に、産業利用可能な酵素を開発するという応用面においても重要な課題である。酵素の耐熱化には、主として合理的設計または進化分子工学が利用されてきた。合理的設計法では、酵素の立体構造情報を参考に、二次構造を安定化、分子表面のイオンペアを増加、サブユニット間相互作用を強化、分子内疎水性コアのパッキングを改善するようなアミノ酸置換を標的酵素に導入する。しかし、個々のアミノ酸置換の効果は周辺の構造環境に依存するため、ある酵素の耐熱化には寄与するアミノ酸置換が、必ずしも別の酵素の耐熱化にも寄与するわけではなく、合理的設計による酵素の耐熱化の成功率は決して高くはない。進化分子工学的手法は、ダーウィン型進化を試験管内で模倣した生体分子の設計法であり、標的酵素をコードする遺伝子へのランダム突然変異導入などを通じた多様化した遺伝子集団（ライブラリー）の構築と、目的の性質を獲得した変異型酵素をコードする変異型遺伝子の選択、あるいはスクリーニングをおこなう。酵素の耐熱化を目的とした進化分子工学では、遺伝子ライブラリーから耐熱化した酵素をコードする遺伝子をスクリーニング、あるいは、選択するための方法をあらかじめ開発しておかねばならない。さらに、その都度膨大な実験が必要となるため、必ずしも簡便な方法とは言えない。

我々は、簡便で多くの酵素に適用できる耐熱化設計法として祖先型設計法を考案した。この方法は、相同アミノ酸配列の分子系統解析から推定した祖先型アミノ酸を、対象とする酵素に導入することによって耐熱化を試みる手法であり、必要な入力情報は、標的酵素の相同アミノ酸配列のみである。本研究では、酵素の耐熱化設計法としての祖先型設計法の有用性を検証した。

祖先型設計法概念

祖先型設計法概念は、祖先生物が超好熱菌であったので、祖先生物の酵素は高い耐熱性を有していたとする仮説から着想された。つまり、祖先酵素が持っていたアミノ酸は祖先酵素がもっていなかったアミノ酸と比べ、酵素の耐熱性に大きく寄与するだろうという考えに基づいた耐熱化設計法である。酵素の耐熱性や立体構造に関する一切の知識無しに耐熱性酵素を設計できる点も祖先型設計法の魅力である。

祖先配列の推定

祖先アミノ酸配列を推定するために、まず、公共データベースから標的酵素の相同アミノ酸配列を収集した。次に、マルチプルアライメント作成プログラムを用いて、配列を相同性に基づいて整列させた。プログラムによって自動的に作成されたアライメントを目で見て確認し、必要がある場合には修正した。さらに、最尤法による進化系統樹作成プログラムを用いて系統樹を構築した。系統樹の作成に用いたアミノ酸配列と系統樹の樹形から、系統樹の根元に相当する位置の祖先型アミノ酸配列を推定した。

アミノ酸置換による耐熱化

祖先型設計法の有効性は、いくつかの高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来酵素に、推定した祖先型アミノ酸をアミノ酸置換として導入することで検証されてきた。全生物共通祖先生物が有していたと思われる 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH) のアミノ酸配列を推定し、次いで、推定した祖先型アミノ酸を *T. thermophilus* IPMDH にアミノ酸置換として導入した。得られた変異型 IPMDH の耐熱性を調べたところ、12 個の変異型酵素のうちの 6 変異体が野生型 IPMDH よりも高い耐熱性を示した (Watanabe *et al.*, 2006)。 *T. thermophilus* 由来グリシル tRNA 合成酵素 (GlyRS) を用いた類似研究からも同様の結果が観察され、作製した 8 変異体中 6 つの変異体が野生型 GlyRS よりも高い耐熱性を示した (Shimizu *et al.*, 2007)。さらに興味深いことに、祖先型アミノ酸を導入すると活性も大きくなる傾向が見られた。

祖先型アミノ酸配列の全合成

本研究では、祖先型アミノ酸配列を丸々復元し、その耐熱性と活性を調べることもおこなった。推定した祖先型アミノ酸配列を逆翻訳し、祖先型アミノ酸配列をコードする祖先型遺伝子配列を人工合成した。合成した遺伝子を、大腸菌を宿主に用いて発現させ、祖先型酵素を精製し、耐熱性と触媒活性を解析した。配列全長を、推定された祖先型アミノ酸で構築した DNA ジャイレース由来 ATPase ドメイン (Akanuma *et al.*, 2011) とヌクレオシド二リン酸キナーゼ (Akanuma *et al.*, 2013) を作製したところ、両者とも好熱菌または超好熱菌並みの耐熱性を有しており、祖先型設計法が耐熱性酵素を創出する有効な方法であることが示された。また、合成した祖先型酵素は、いずれも現存する (超) 好熱菌のもつ酵素と同じか、あるいは、さらに高い酵素活性を有した。

まとめと展望

分子系統解析により推定された祖先型アミノ酸を、元々高い耐熱性を有する複数の好熱菌由来酵素にアミノ酸置換として導入すると、高い確率でさらに耐熱性の向上が見られた。また、推定した祖先型アミノ酸配列を完全に復元した祖先型酵素も、天然に存在する (超) 好熱菌由来相同酵素と同程度かそれ以上の高い耐熱性を示した。祖先型アミノ酸は、相同アミノ酸配列情報のみから推定可能で、詳細な立体構造や耐熱化酵素を選択するためのセレクション・スクリーニング系を必要としない。したがって、簡便で優れた酵素の耐熱化設計法と言える。今後、様々な局面で耐熱性酵素の利用価値が高まると予想される。そこで、潜在的工業用途を有しながらも、安定性の低さが工業利用を妨げている酵素の耐熱化設計を試みることで、酵素の工業利用を推進することを今後の展望としたい。

参考文献

- Akanuma *et al.* Experimental evidence for the thermophilicity of ancestral life, *PNAS* **110**, 11067–11072 (2013)
- Akanuma *et al.* Phylogeny-based design of a B-subunit of DNA gyrase and its ATPase domain using a small set of homologous amino acid sequences, *JMB* **412**, 212–225 (2011)
- Shimizu *et al.* Extremely thermophilic translation system in the common ancestor Commonote: Ancestral mutants of glycyl-tRNA synthetase from the extreme thermophile *Thermus thermophilus*, *JMB* **369**, 1060–1069 (2007)
- Watanabe *et al.* Designing thermostable proteins: Ancestral mutants of 3-isopropylmalate dehydrogenase designed by using a phylogenetic tree, *JMB* **355**, 664–674 (2006)

謝辞

本研究は、東京薬科大学生命科学部極限環境生物学研究室でおこなわれたものであり、山岸明彦教授、玉腰雅忠准教授、横堀伸一講師、ならびに、本研究に関わった大学院生、学部学生に心より感謝致します。