

酵素・活性・分子 —スクリーニング研究をスクリーニングする—

浅野泰久^{1, 2}

¹ 富山県立大学生物工学研究センターおよび工学部生物工学科

² ERATO 浅野酵素活性分子プロジェクト、JST

【経歴】

1975年3月 京都大学農学部農芸化学科卒業

1980年3月 京都大学大学院農学研究科博士課程単位取得

1982年3月 農学博士

1982年4月 アメリカパデュー大学薬およびオハイオ州立大学理博士研究員

1984年4月 (財)相模中央化学研究所研究員

1990年4月 富山県立大学工学部助教授

1995年4月 富山県立大学大学院工学研究科教授

2006年4月 富山県立大学生物工学研究センター所長 (2010年3月まで)

日本化学会化学技術賞(2004)、日本農芸化学会賞(2008)、バイオインダストリー協会賞(2008)、紫綬褒章(2011)、Enzyme Engineering Award (2013)、Biocat Award (2014)

富山県立大学工学部生物工学科および2012年から開始されたERATOプロジェクトでは、微生物・植物・動物から見いだされる新たな酵素を活性分子として活用し、有用化合物合成法や健康診断法を開発するための基盤的研究に取り組んでいる。プロジェクト内で酵素の立体構造解析を行い、データベースや計算機利用のメリットを生かして、以下のテーマに挑戦している。

1. 新規酵素遺伝子資源の探索
2. アミノ酸置換による組換えタンパク質可溶性発現に関する研究
3. 有用物質生産法の確立 —酵素的結晶変換の利用—

1. 微生物、植物、動物の「アルドキシム-ニトリル経路」の比較と利用

植物 植物のシアンの発生の能力は3,000種もの多くの植物に分布しているとされているが、シアン発生に関与するヒドロキシニトリルリアーゼ (HNL) 活性は比較的狭い植物種にしか認められない。HNLは光学活性シアノヒドリンを生成する可逆反応を触媒する有用酵素であり、植物のスクリーニングにより中国雲南省由来 *Baliospermum montanum* の葉に S-HNL 活性を、その他5種類の植物に R-HNL 活性を発見した。そして、*Prunus mume* (梅) において、L-Phe が2種類の P450 によってアルドキシムを経てシアノヒドリンへと変換されることを明らかにし、さらにアルドキシムからニトリルを生成する *Fallopia sachalinensis* (オオイタドリ) の P450 反応との違いを明らかにした (秋田県立大学、野下先生との共同研究)。

動物 シアンを発生する動物としてヤスデに着目し、新規な HNL を見出した。本酵素は FAD を有さず、糖鎖が付加された2個の同等なサブユニットから成る、分子量が約 47300 の極めて安定な酵素である。本酵素の一次構造はデータベース上の他のタンパク質と相同性がほとんどなく、他の HNL との相同性も認められなかった。(R)-マンデロニトリルの合成の比活性は 7,420 U/mg であり既知の HNL 中で最高値を示した。ヤスデは本酵素と共に新しいシアン代謝酵素であるマンデロニト

リル酸化酵素を防御用酵素として有している。

微生物 微生物のアルドキシム-ニトリル経路には、工業用酵素として著名なニトリルヒドラーターゼおよびアルドキシム脱水素酵素が含まれ、動植物とは大きく異なっている。動植物のアルドキシム-ニトリル経路は、明らかにアミノ酸代謝経路として機能しているが、多くの微生物では、アミノ酸からアルドキシムを生成する酵素活性は認められていない。わずかに *Streptomyces coelicolor* や *Actinoalloteichus cyanogriseus* がモノオキシゲナーゼにより、それぞれ L-Trp やアミンからアルドキシムを生成することが報告されているが、微生物のアルドキシム-ニトリル経路の役割については、今後さらに研究が必要である。

これらの酵素の利用として、*Arabidopsis* の P450 79A2 と *Bacillus* sp. OxB-1 由来のアルドキシム脱水酵素を大腸菌で共発現し、L-Phe からのフェニルアセトニトリルの微生物合成に初めて成功した。また、ラセミ体フェニルアラニノニトリルからダイナミックな光学分割により効率よく (R)-フェニルアラニン合成した。INTMSAlign プログラムを利用してゲノム情報より、分布が限られているアミノ酸アミドラーゼを効率良く探索できた。アルドキシム脱水酵素を用いて光学活性なニトリルの合成に成功した。

2. アミノ酸置換による組換えタンパク質可溶性発現に関する研究

キャッサバ (*Manihot esculenta*) 由来 S-HNL (MeHNL) 遺伝子を大腸菌内で発現させるとほとんどが封入体として発現される。そこで MeHNL 遺伝子に変異を導入した結果、大腸菌で活性型として発現される酵素 (His103Met や His103Leu) へと進化させることができた。リフォールディング実験では、野生型酵素は再活性化しないが、変異型酵素はそれぞれ 33 および 47 % の再活性化が認められた。このように進化分子工学を用いてタンパク質 (酵素) の可溶性発現を可能にした事例は、ほとんどなかった。変異による可溶化について例を挙げて説明する。

3. 有用物質生産法の確立 —酵素的結晶変換の利用—

酵素的結晶変換法は、水を溶媒として、溶解度が低い生成物を効率的に合成しようとする手法であり、データベースを強化して合理的に反応を探索している。実例として、新たに分離した *Microbacterium* 属細菌の休止菌体反応および培養によって蛍光プローブや有機半導体材料として有用なルミクロムを効率的に生産する方法を開発した。

その他、ブタ腎臓由来 D-アミノ酸酸化酵素の結晶構造解析結果に基づき、自然界に存在しない R 選択的アミン酸化酵素の作出に成功し、得られた変異体酵素 (Y228L, R283G) の構造解析を行うと共に、デラセミ化反応によって、(R, S)-メチルベンジルアミンを原料とする (S)-メチルベンジルアミンの定量的な合成を可能にした。また、本酵素が酵素的ストレッカー反応を触媒することを明らかにした。