

モノボディを介した酵素基質特異性の改良 ーオリゴ糖合成酵素をモデルにー

天野エンザイム株式会社 米国先端技術研究所 田中 俊一

【略歴】

2008年 大阪大学大学院 工学研究科 生命先端工学専攻 博士課程修了
2009年 大阪大学大学院 工学研究科 生命先端工学専攻 博士研究員
2010年 天野エンザイム株式会社 入社 マーケティング本部 フロンティア研究部 研究員
2012年 シカゴ大学出向 (小出昌平教授)

1. はじめに

酵素の利用分野は、食品、医薬、診断、洗剤、環境、バイオエネルギーなど、多岐に渡っている。一方、各用途において酵素の基質特異性などの触媒能力が不十分な場合があり、その能力の改良は産業利用における重要な課題である。

現在、酵素を改良する技術として理論設計と進化分子工学が広く用いられている。理論設計では、立体構造や活性中心構造、触媒機構についての詳細な情報を基に、有効と思われる変異を導入して改良を進める。一方、進化分子工学は構造情報には依存せず、大腸菌などの異種宿主発現によって構築した膨大な変異ライブラリーから、ハイスループットアッセイ法を用いたスクリーニングにより改良を進める。いずれも対象とする酵素を直接改変する技術であり、酵素改良の成功例が報告されている。

しかしながら、産業界で利用されている酵素には、理論設計で必須とされる立体構造が未決定のもの、あるいは、進化分子工学に適したハイスループットアッセイ法や異種宿主発現系が未確立なものが少なくなく、新たな改良技術の開発が求められている。

2. モノボディによる酵素改良 ーコンセプトー

新たな改良技術として、我々はシカゴ大学 小出昌平教授との共同研究により、対象酵素は直接改変せず、人工結合蛋白質（モノボディ）を酵素の活性中心近傍に結合させることで基質特異性などの改良が可能ではないかと考え、その技術開発に取り組んでいる（図1）。

モノボディとは、小出教授が開発された、フィブロネクチンIII型ドメイン（FN3）を鋳型とする約100アミノ酸から成る人工結合蛋白質である。構造表面のループのアミノ酸配列を多様化したコンビナトリアルライブラリーから、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイによる選別を経て、ターゲットに対して高い特異性と親和性を持つモノボディを効率的に創出することができる [1]。

モノボディは活性中心のような機能性部位に好んで結合する性質を持つため、酵素の活性中心近傍に結合するモノボディの取得は比較的容易であると考えられた。また、約100アミノ酸という小さな構造を生かすことで、活性中心近傍の一部分のみに結合し、基質特異性を改変するモノボディを得ることも十分に可能であると考えられた（図1）。

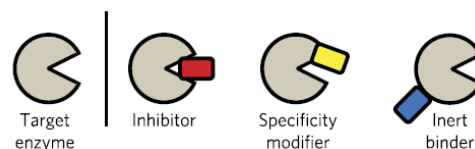


図1 モノボディによる酵素改良

本研究では基質特異性を改良するモノボディ(右から2番目)に焦点を当てた

3. モノボディによる酵素改良 ー実証研究ー

今回、実証研究として、*Bacillus circulans* 由来のβ-ガラクトシダーゼをモデルに基質特異性の改良を試みた [2]。本酵素はガラクトオリゴ糖 (GOS) 生成能に優れ、多様な鎖長を持つオリゴ糖を生成する（図2、上） [3]。GOS の機能として、腸内細菌叢の改善による整腸作用、ミネラル吸収促進作用、免疫調節作用、炎症性腸疾患の予防・改善作用などが報告されているが、特に3糖のGOS (4'-ガラクトシルラクトース) にその機能が高いことが知られている [4]。したがって、本酵素による4糖以上のGOSの生成を抑制し、

3糖 GOS の生成量を高めるような基質特異性の改良が望まれる。そこで、本酵素をモデルに、モノボディによる4糖以上の GOS 生成を抑制するような基質特異性の改良を試みた。

我々はまず、本酵素の基質結合部位は、他の糖分解・転移酵素の一般的な活性中心構造のように、複数のサブサイトから構成されると想定した。そして、サブサイトの一つをモノボディによりブロックすることで、4糖以上の生成を抑制できると予測した(図2、下)。

予測したモノボディの結合部位は触媒中心(図2中の赤三角)より離れているため、ラクトース分解活性への影響はほとんどないはずである。そのため、モノボディの選別においては、活性中心近傍には結合するが、ラクトース分解活性への影響が少ないものを選別した。

上記選別から得られたモノボディの結合部位を同定するため、ラクトース、3糖、4糖、5糖 GOS との競合結合実験を行った。その結果、本モノボディはラクトースと3糖 GOS とは競合しないが、4糖以上の GOS とは競合することが分かった。これは、本モノボディが予測したサブサイトに結合していることを強く示唆するものであった(図2)。

最後に、得られたモノボディの GOS 合成活性に対する効果を調べた。その結果、本モノボディは4糖以上の GOS の生成を大きく抑制する一方、3糖以下 GOS の生成を増やすことが分かった(図3)。したがって、モノボディの結合により酵素の基質特異性の改良が可能であることを実証できた。

4. まとめ

今回の研究では、対象とする酵素を直接改変することなく、人工結合蛋白質を酵素に結合させることにより基質特異性が改良できることを示した。本手法では、従来技術で必須とされていた立体構造情報、ハイスループットアッセイ法は必要とはされなかった。今回のように立体構造情報に頼ることなく、酵素の基質結合部位の構造と、目的とするモノボディの結合部位・効果を想定して戦略的に選別することで、目的とするモノボディの効率的な取得が可能であった。実際、今回の例では約20個のモノボディを評価するだけで、Modifier モノボディを取得することに成功している。この数は通常の変異解析数よりも格段に少ない。

従来技術を使うことが難しく、改良が諦められていた産業用酵素は少なくない。今回の研究では、そのような酵素でも改良が可能であることを示すことができた。今後、より多くの酵素で改良を実現しその産業利用が広がるように、モノボディによる酵素改良技術の汎用性・実用性強化に取り組んでいきたい。

5. 謝辞

本研究を遂行するに当たり、御支援と御指導を賜りました小出昌平教授、小出明子博士研究員、小出研究室のメンバー一同、天野エンザイム関係者各位に深く感謝申し上げます。

[1] Koide *et al.* (2012) *J. Mol. Biol.* **415**, 393-405.

[2] Tanaka *et al.* (2015) *Nature Chem Biol.* **11**, 762-764.

[3] Torres *et al.* (2010) *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* **9**, 438-454.

[4] Depeint *et al.* (2008) *Am. J. Clin. Nutr.* **87**, 785-791.

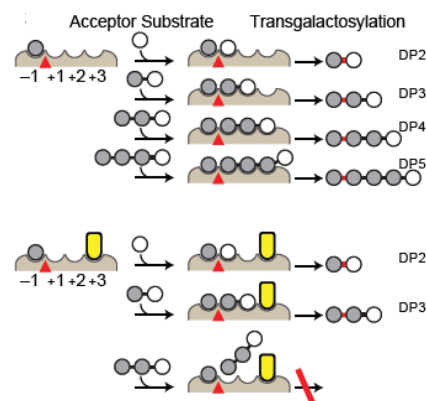


図2 サブサイトの一つに結合するモノボディがβ-ガラクトシダーゼの4糖以上のGOS合成反応を抑制(下図)

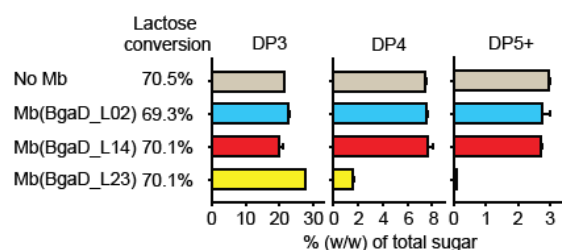


図3 モノボディのGOS合成活性に対する効果(GOSが最大量に達したポイントで比較)4糖以上のGOSの生成量を低下させるモノボディが得られた