

酵素の新規可溶性発現技術の開発

富山県立大学工学部生物工学科 松井 大亮

【略歴】

2005年3月 関西大学工学部卒業
2007年3月 関西大学大学院工学研究科博士課程前期課程修了
2011年3月 関西大学大学院工学研究科総合工学専攻博士課程後期課程修了 博士（工学）取得
2011年4月 富山県立大学ほくりく健康創造クラスター博士研究員
2012年4月 富山県立大学 ERATO 浅野酵素活性分子プロジェクト博士研究員
2016年4月 富山県立大学工学部助教

従来の可溶性発現技術

異種発現系で酵素遺伝子を発現させた場合、封入体の形成などで活性を示さないことが多く、この点が異種宿主による酵素の大量発現における問題点となっている。こ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未解明であることに起因しており、それを解決しようとして、これまでに様々な試みがなされてきた。例えば、大腸菌で異種タンパク質を発現させる手法として、菌体培養条件の検討、正しい立体構造を形成させるシャペロンと共発現させる方法、シグナルペプチドや溶解度を向上させるタグと融合させて発現させる方法、あるいは封入体を形成したタンパク質を変性剤で解きほぐした後、正しい高次構造に巻き戻すリフォールディング方法などが挙げられる。また、酵母や昆虫あるいは動物の培養細胞で、酵素遺伝子を発現させる方法や、遺伝子の転写から翻訳までのすべてを試験管内で行う無細胞翻訳系も解決法として開発されてきた。しかし、これらの方法は、原理の理解が進んでいないために、多数のトライアルアンドエラーが必要であり、培養条件の検討やシャペロン遺伝子との共発現でも封入体が解消されない酵素も多く存在する。

新規可溶性発現技術のきっかけとなった植物酵素の可溶性発現

Asanoらは、大腸菌で封入体を形成する植物キャッサバ由来ヒドロキシニトリルリアーゼ (EC4.1.2.37) 遺伝子のランダム変異ライブラリーから、大腸菌で活性を持つ酵素として発現する変異型酵素の取得に成功し、変異点の飽和変異の結果から、親水性のアミノ酸である His を疎水性アミノ酸に変異すれば可溶性が増加する傾向を示すことを報告した (Asano et al, *Protein Eng. Des. Sel.* (2011))。このような変異による活性型可溶性発現は、従来にはほとんど報告が無く、タンパク質に変異を付与して可溶性発現させる方法に一般性が見出せれば、全く新しい応用法や研究分野を創出できる可能性があると考えられた。そこで、この考えに基づき、変異型酵素を多数得て、可溶性発現に関与する変異点を統計的に推定する方法の開発に着手した。

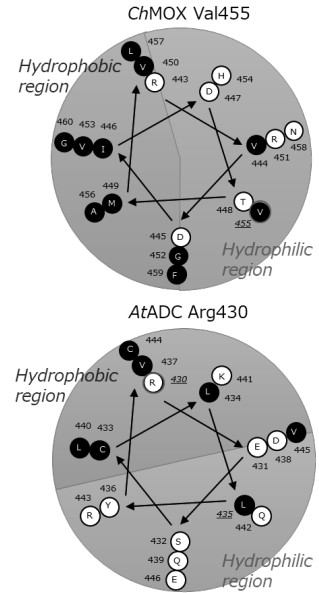
変異導入で活性を示す異種発現酵素の探索

動植物由来のアミノ酸代謝関連酵素遺伝子などから、大腸菌で不溶性タンパク質として発現する 16 種の酵素を試験用酵素として得た。遺伝子修復能を欠損した大腸菌 XL-1Red によるランダム変異導入法を用い、コロニーピッカーを導入し、約 1,200 コロニー/30 分程度で植菌した。さらにアミノ酸酸化酵素の比色法を用いてコロニーを直接呈色させる方法や 96 穴マイクロプレートリーダーを用いて、スクリーニングの迅速化をはかった。また、不活性タンパク質として発現する酵素と変異によって活性型酵素になった酵素を効率よく選別する方法として、目的タンパク質遺伝子の 5' 末端側にフレオマイシン耐性タンパク質遺伝子をレポータータンパク質として融合させる方法も用いた。本方法は、酵素の変異型遺伝子が可溶性発現すると、抗生物質耐性遺伝子も共発現し、抗生物質耐性能を示す原理によるものであ

る (Matsui and Asano, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2015))。得られた可溶性に発現する変異型酵素の変異部位について、二次構造との関係、アミノ酸残基の保存性、アミノ酸の疎水性度を解析し、それらの共通性を解析した。続いて、他の不溶性に発現する酵素の遺伝子に、共通性要因に基づいて変異を導入し、可溶化について検討した。

新規可溶性発現技術の開発

不溶性に発現するヤンバルトサカヤスデ由来のマンデロニトリル酸化酵素 (*ChMOX*, EC1.1.3.49) 遺伝子のランダム変異ライブラリーから V455A 変異酵素が活性を示した。Val455 を他のアミノ酸に飽和変異した結果、Val よりも親水度が高いアミノ酸の方が高い活性を示した。本酵素の二次構造を推定した結果、Val455 は、 α -ヘリックス構造のアミノ酸配列中に存在することが明らかになった。さらに、ヘリカルホイールを描いた結果、右図のように Val455 は、親水性領域に存在する疎水性アミノ酸であった。シロイヌナズナ由来 L-アルギニン脱炭酸酵素 (*AtADC*, EC4.1.1.19) では、Arg430 を Leu や Ala、Val に置換すると、活性を示すことを明らかにした。*AtADC* Arg430 も α -ヘリックス構造のアミノ酸配列中に存在しており、疎水性領域に存在する親水性アミノ酸残基であった。キロショウジョウバエ由来の L-グルタミン酸脱水素酵素 (EC1.4.1.2) および L-オルニチン脱炭酸酵素 (EC4.1.1.17) においても、同様の共通性が見られた。これらの結果から、「 α -ヘリックス構造部分の親水性領域に存在する疎水性アミノ酸残基を親水性アミノ酸に変異すること、または同部分の疎水性領域に存在する親水性アミノ酸残基を疎水性アミノ酸に変異することで活性を持つ可溶性酵素として発現できる可能性がある」と考えた。



次に、その共通性をもとに変異点を予測し、変異を導入して活性型酵素を探索した結果、細菌 *Sporosarcina ureae* 由来の L-フェニルアラニン脱水素酵素 (EC1.4.1.20)、並びに海洋性プランクトン *Metridia pacifica* 由来のルシフェラーゼやヒト成長ホルモンなどでも可溶性発現が可能であった。これらの実例から、二次構造予測法から得られた α -ヘリックス構造部分のヘリカルホイールを作図し、親水性領域および疎水性領域に存在する性質の相反するアミノ酸を抽出し、変異導入する「 α -ヘリックス法」を開発した (Matsui et al, *Sci. Rep.* (2017))。

今後の展望

- 「 α -ヘリックス法」は構造情報や相同性の高い配列が存在しない新規酵素においても利用できる特徴を持っており、動植物などの新規酵素の異種発現系構築に貢献できる。
- 今回の帰納法により得られた可溶性発現手法「 α -ヘリックス法」をきっかけとして、今後新たな法則性が開発され、これまで生産が難しかった酵素・タンパク質の生産可能になることが期待される。
- これまでに研究が行われてきた可溶性発現手法（可溶性発現し易いタンパク質との共発現やシャペロンの利用など）と組み合わせることによる可溶性発現効率などの向上が期待される。
- 本研究成果は、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、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できる。

謝辞

本研究は JST ERATO 浅野酵素活性分子プロジェクトおよび富山県立大学工学部生物工学科酵素化学工学講座において行われたものです。本研究の機会を与您にいただき、日頃から惜しみないご指導とお力添えを賜っている浅野泰久先生に厚く御礼申し上げます。また、磯部公安先生（岩手大学名誉教授）を含むプロジェクトメンバー、酵素化学工学講座のスタッフ及び学生諸氏に心より感謝申し上げます。