

# 特異なタンパク質進化Circular permutation による酵素の機能改変

天野エンザイム株式会社 マーケティング本部フロンティア研究部  
石原 聡

## 【略歴】

2005年 東京大学大学院 理学系研究科 生物科学専攻 博士課程修了  
2007年 東京工業大学 統合研究院 博士研究員  
2010年 天野エンザイム株式会社 入社  
2015年 Amano Enzyme USA Co. Ltd.  
2017年 天野エンザイム株式会社 マーケティング本部 フロンティア研究部

## 1. はじめに

近年、酵素の産業利用は、低環境負荷で反応を行える利点を活かして様々な分野に拡大している。しかしながら、それぞれの用途において能力、性質が不十分な場合がある。そこで、優れた性質を有する酵素の自然界からのスクリーニングに加え、タンパク質工学的に酵素を改良する技術は酵素メーカーにとって必須となっている。

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、触媒機構、相同性のあるアミノ酸配列などの情報から有効と思われる変異を設計して、アミノ酸変異を導入する。一方、進化分子工学は構築したランダム変異ライブラリーからスクリーニングを行う。いずれも、アミノ酸を1つまたは複数置換することで酵素の性質を改変して、用途に即した酵素を開発していく。

一方、自然界でのタンパク質進化においては、稀にアミノ酸置換変異よりも大規模な変異が知られている。Circular permutation (円順列置換)はその例であり、タンパク質の末端の位置が異なる以外は、ほとんど同じ配列のタンパク質が報告されている [1]。このようなタンパク質の進化を模倣して、本来のN末端とC末端を人工的なリンカーで連結し、新たな部位にN末、C末を導入するタンパク質工学の手法をCircular permutation (CP) 変異法と呼ぶ (図1) [2]。

本講演では、天野エンザイムとEmory大学 Stefan Lutz教授との共同研究で行ったCP変異法を用いた酵素の機能改変について報告する。

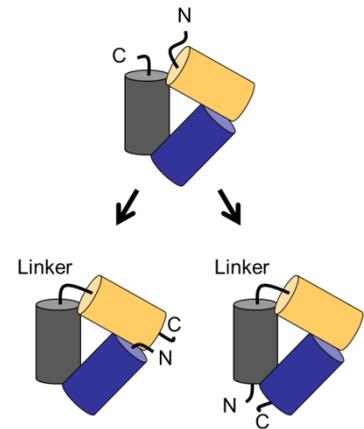


図1 : Circular permutation (CP) 変異法の模式図

人工的なリンカー配列で本来の N 末と C 末を連結して、別な位置に新しい N 末と C 末を持つ変異酵素を作製する

## 2. CP変異法による酵素の改良

糸状菌由来のFAD依存性グルコースデヒドロゲナーゼ (FAD-GDH; EC 1.1.5.9)は、マルトースに反応しないため血糖値測定用酵素として優れた性質を有するが、血中に夾雑物として混入する可能性のあるキシロースにもある程度反応する。そのため、高精度測定が可能な酵素としてキシロースに反応しない酵素が望まれている。Lutz教授は、FAD依存性酸化酵素であるOld yellow enzymeを用いて、CP変異法により基質特異性が変化することを報告している[4]。さらに、立体構造解析の結果、その変化は基質ポケットを構成する主鎖の位置がわずかに変わること起因すると報告している [5]。そこで、FAD依存性酸化酵素の1つであるFAD-GDHを対象に、CP変異法による改良を検討した。

*Aspergillus iizukae*由来FAD-GDHは、社内菌株ライブラリー13,000株からスクリーニングして得られた新規FAD-GDHであり、基質特異性が高いGDHとして開発された [3]。最初に、アミノ酸配列からホモロジーモデリングを行い、立体構造を予測した。次に、N末とC末を結合できるリンカー配列を検討した結果、6アミノ酸から18アミノ酸の長さのリンカー配列で酵素活性が保持されており、最も高い活性を保持していた17アミノ酸のリンカーを選択した。次に、CP変異を網羅的に導入するため、4アミノ酸ずつN末とC末の位置を変えたCP変異酵素ライブラリーを作製しスクリーニングした結果、16種類のCP変異酵素がグルコース酸化活性を保持していた。

出芽酵母で発現させたCP変異酵素は、生産性が低く詳細な解析が困難であったため、発現宿主を麹菌に変えて、野生型ならびにCP変異酵素について基質特異性を比較した。

その結果、2種類のCP変異酵素において、キシロースに対する反応性が低下していた。また、マルトースに対する反応性も野生型より低下した (表1)。

表1. CP変異酵素の基質特異性

	野生型	CP変異酵素A	CP変異酵素B
グルコース	100%	100%	100%
キシロース	9.1%	7.5%	4.3%
マルトース	0.9%	0.6%	0.5%

### 3. まとめ

CP変異法によるタンパク質工学により、キシロース反応性が低下したFAD-GDHを開発した。N末の位置が変わり酵素のフォールディングの順序が変わることで、基質ポケットの構造が変わり、基質をより厳密に選択すると推定している。今後は、CP変異酵素の立体構造解析などを行い、酵素の基質選択機構に関する洞察を深めていきたい。

### 4. 参考文献

- [1] Weiner, J. and Bornberg-Bauer E. (2006). *Molecular biology and evolution* 23(4): 734.
- [2] Qian Z. and Lutz S. (2005). *J Am Chem Soc* 127(39): 13466.
- [3] Nishio K. et al., WO2017077924A1
- [4] Daugherty A. B., et al. (2013). *J Am Chem Soc* 135(38): 14425.
- [5] Daugherty A. B., et al. (2015). *ACS Catal* 5(2): 892.