

新規インシリコ酵素探索技術の開発と高機能化人工酵素配列設計への展開

静岡県立大学 食品栄養科学部 食品生命科学科 中野 祥吾

【略歴】

2007 年 3 月 広島大学理学部化学科卒業

2012 年 3 月 広島大学大学院理学研究科数理分子生命理学専攻 博士課程後期修了 博士(理学) 取得

2012 年 4 月 ERATO 浅野酵素活性分子プロジェクト 博士研究員

2015 年 4 月 静岡県立大学食品栄養科学部食品生命科学科 助教

2020 年 12 月 科学技術振興機構さきがけ 「自在配列と機能」 研究員 (兼任)

2021 年 4 月 静岡県立大学食品栄養科学部食品生命科学科 准教授 (現在に至る)

1. 研究の背景

バイオテクノロジー分野の技術革新により、数億のタンパク質 (酵素含む) のアミノ酸配列がデータベースに登録されており、現在もその数は拡大し続けている。膨大な数の配列データを解析し、産業応用が期待される高機能な酵素配列を選抜するインシリコ酵素探索技術と、それらを用いて高機能な人工酵素配列を設計できる技術は、今後数年のうちに酵素工学分野において中心的な役割を担うことが予測される。我々はこれまでの研究で、上述した技術を開発するため、アミノ酸配列データのみを利用する新規インシリコ酵素探索技術である iAngler 法を着想、プログラムの開発と検証を行ってきた。加えて、iAngler 法を人工酵素配列の設計に適用、酵素機能を産業応用レベルまで高める課題に挑戦している (1-3)。開発中の iAngler 法は、鋳型となる一つの酵素配列を起点とし、新規離散的モチーフ配列を数学的同定、酵素の分類に用いる事で、新たな活性や高い機能を有する酵素をデータベースより選抜する技術である (Fig. 1)。更に、iAngler 法で選抜された配列群に、祖先型設計法 (ASR 法) や完全コンセンサス法を適用することで、データベース由来の天然型にはない配列をもった、高機能な人工酵素を設計、検証も行ってきた。本発表では、これら研究成果に関して報告する。

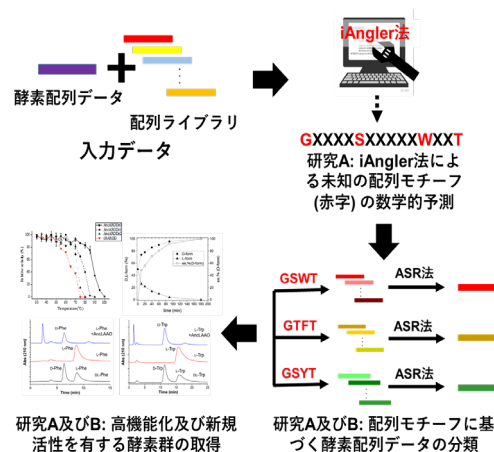


Fig. 1, iAngler 法の概念図

2. iAngler 法を用いた高機能化 L-アルギニン酸化酵素 (AROD) の設計

Fig. 1 に示したように、iAngler 法は未知の配列モチーフを数学的に予測、それに基づいて配列データを分類する手法である。iAngler 法の有効性について、帰納法的な証明を目指した研究を実施した。第一に iAngler 法を用いた高機能化人工 AROD の設計を行った。AROD は特異的に L-アルギニンを認識し、その主鎖アミドの酸化反応を触媒する FAD 依存型酸化酵素である。本酵素の研究に関して、発見当時は *Pseudomonas* sp. TPU7192 由来 AROD (PtAROD) が一つだけ報告されていた (4)。つまり AROD の配列データ分類に立体構造および変異体実験データを利用することができず、本酵素の分類は iAngler 法の検証実験に適していると考えた。PtAROD の配列を iAngler 法で解析、複数残基から構成される配列モチーフを予測し、これを有する配列をデータベースより探索することで、最終的に 10 個の AROD 候補配列を取得した。取得した配列の内、PtAROD

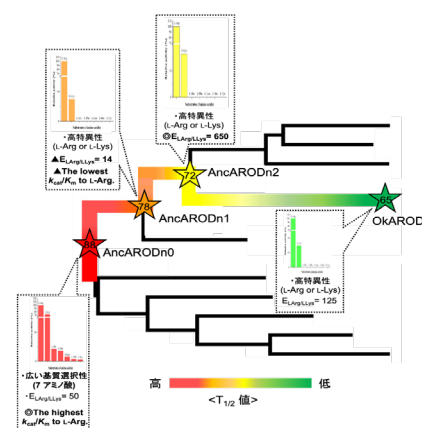


Fig. 2, 高機能化した AncAROD の設計

と最も相同性の低かった 1 つの候補配列に関して発現、酵素生化学解析を実施し、AROD 活性を有することを確認した。また分類した配列群を用いて ASR 法にて人工 AROD (AncAROD) を設計した。AncAROD は自然界由来 AROD と比べ、反応性 (k_{cat}) は同等に保持しつつ、耐熱性が 20°C 近く向上していることが判明した。上記結果より、iAngler 法を用いて高機能化した人工酵素を設計可能なことを確かめた (Fig. 2) (5)。

3. 広い基質選択性を有する新規 L-アミノ酸酸化酵素 (LAAO) の探索と D-アミノ酸誘導体の光学分割への応用

次に本手法を用いた新規酵素のインシリコ探索への応用を目指した以下の研究を実施した。iAngler 法で分類した 10 個の AROD 候補配列に対し、パラログ配列の探索を実施した。探索は Blastp を用いて行い、E 値が 1.0×10^{-5} 以下のパラログ配列を探索した。解析の結果、*Pseudoalteromonas* 属において上記の条件を満たし、かつ AROD と配列相同性が 20% 程度のパラログ配列を有することを確認した。本配列は大腸菌発現系で可溶性画分に得られず、本配列を高機能化する必要性に迫られた。そこで取得したパラログ配列を鋳型とし、iAngler 法を用いた分類により 6 配列をデータベースから取得後、ASR 法を用いて人工パラログ配列を設計した。設計した人工配列は可溶性画分に大量に得ることができた (50 mg/L 以上)。得られたサンプルを用いて酵素生化学解析を行ったところ、本配列は 9 種類の L-アミノ酸を酸化できる酵素であることが判明した。以上の結果から、設計した人工パラログ配列を以下人工 LAAO (AncLAAO) と呼ぶ。AncLAAO は大腸菌発現系で初めて大量発現に成功した LAAO である。AncLAAO は広い基質選択性を有することから、様々な D-アミノ酸誘導体の光学分割へ応用できることが期待された。そこでラセミ体のフェニルアラニン及びトリプトファン誘導体に AncLAAO と還元剤 ($\text{NH}_3\text{:BH}_3$) を添加した条件で反応を実施したところ、16 種類の誘導体に関して高い光学純度 (>99% ee) かつ収率 (68–85%) で D-アミノ酸誘導体を得ることができたことを確かめた。上記の結果から、iAngler 法を用いて新規活性を有する酵素をデータベースより探索できることが示された (6)。加えて AncLAAO の構造機能解析を行い、本酵素の基質認識機構を解明することに成功した (7)。

4. 今後の展望

申請者の開発した iAngler 法を用いることで、配列データのみを用いてアミノ酸配列データベースを数学的に分類し、高機能化酵素及び新規活性を有する酵素群の探索及び人工設計することが可能になりつつある。今後は iAngler 法の自動化や膜タンパク質や糖質関連酵素など、iAngler 法による解析が難しいタンパク質群への適用を目指したアルゴリズムの改良を行う計画である。

5. 謝辞

本研究は富山県立大学、静岡県立大学において行われたものです。浅野 泰久教授並びに伊藤 創平准教授をはじめ、多大なるご支援とご指導頂きました共同研究者の皆様に深く感謝いたします。

6. 参考文献

1. S. Nakano and Y. Asano, *Sci. Rep.*, **5**, 8193, (2015)
2. S. Nakano, T. Motoyama, Y. Miyashita, Y. Ishizuka, N. Matsuo, H. Tokiwa, S. Shinoda, Y. Asano and S. Ito, *Biochemistry*, **57**, 3722–3732, (2018)
3. T. Motoyama, N. Hiramatsu, Y. Asano, S. Nakano and S. Ito, *Biochemistry*, **59**, 3823–3833, (2020)
4. D. Matsui, A. Terai, and Y. Asano, *Enzyme Microb. Technol.*, **82**, 151–157, (2016)
5. S. Nakano, M. Niwa, Y. Asano and S. Ito, *Appl. Env. Microbiol.*, **85**, e00459–00419 (2019)
6. S. Nakano, Y. Minamino, F. Hasebe and S. Ito, *ACS Catal.*, **9**, 10152–10158 (2019)
7. S. Nakano, K. Kohei, Y. Minamino, H. Karasuda, F. Hasebe and S. Ito, *Commun. Chem.* **3**, 181 (2020)