

コンピュータの目で酵素を改変および探索する ～GABA 合成酵素の改変とピラジン生合成経路の発見を例に～ 静岡県立大学 大学院薬食生命科学総合学府 伊藤 創平

【略歴】

1998 年 3 月 東京大学 農学生命科学研究科 卒業
2003 年 3 月 東京大学 大学院農学生命科学研究科博士課程 修了
2003 年 4 月 日本学術振興会 特別研究員
2003 年 10 月 静岡県立大学 大学院生活健康科学研究科 助教
2012 年 4 月 静岡県立大学 大学院薬食生命科学総合学府 准教授（現在に至る）



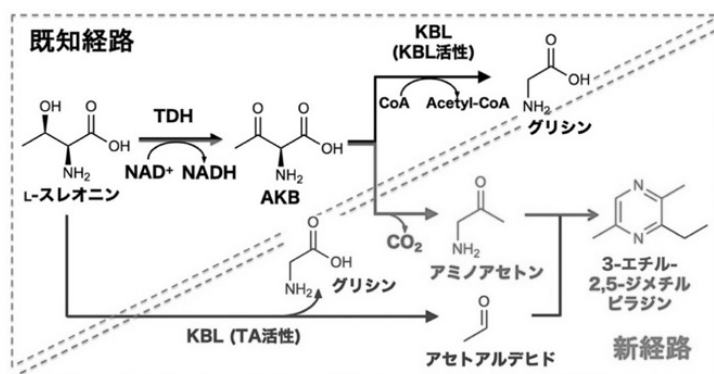
はじめに：立体構造を見て酵素を改変しようとする、わずか1箇所の変異により活性が無くなったり、不溶性になってしまう事がある。一方で、微生物等から見いだされる酵素を比較すると、多くの変異が入っているにもかかわらず、基質特異性・反応特異性がしっかり保存されている。基質特異性・反応特異性が保存されているとは対照的に、生産性、安定性、温度や pH 依存性などの機能は保存されていない。酵素応用を志す研究者は、いかにして生物が変異を選んできたのかに思いを馳せるが、女心と秋の空と同じく、なんだかよくわからない。静岡県立大学の研究チームは、この変異と機能の「よくわからない関係」に着目、酵素の配列に潜む規則性を解析し活用する方法論の開発を鋭意進めてきた。配列解析を基軸とすることで、酵素の種類を問わない汎用性に加え、既存の方法では改変が困難な、生産性や安定性といった副次的な機能の改変に成功してきた。また、変異の規則性等を評価基準とすることで、性質の良い配列をインシリコでスクリーニングすることも可能となっている。本シンポジウムでは、主に GABA 合成酵素と新しいピラジン生合成経路について紹介する。

GABA 合成酵素の改変：GABA 合成酵素 (GAD) は様々な植物や微生物に広く存在している。GABA の商業生産は、乳酸菌や小麦胚芽の GAD によりグルタミン酸から変換する方法と、化学合成法がある。食品として使う場合、前者の方法により合成された GABA が高値で取引されている。しかし、乳酸菌や小麦胚芽により高濃度で GABA を生産させると、変換速度や変換効率や低下するという問題点がある。また、天然に存在する GAD のスクリーニングや改変の報告は多数あるが、酵素としての耐熱性、生産性、活性の問題で産業応用はされていない。そこで、配列情報を活用し、GAD の改変を試みた。*Lactococcus lactis* の GAD をクエリとし、BLAST で 10000 個の相同な配列を取得した。重複する配列を削除するなどの処理を行った後、iAngler 法¹⁾にて解析、配列モチーフ K89/C130/G164/W169/I178/M185/I211/T254/L267/P285 を同定した。このモチーフが保存されていた 16 配列の GAD を用い、完全コンセンサス法および祖先型設計法により、FcGAD および AncGAD を設計した。設計された GAD を、組み換え大腸菌にて調製、精製後、活性の pH 依存性、温度依存性、耐熱性などを評価したところ、特に FcGAD が、生産性、酸や熱に対する安定性に加え、活性も向上していた。そこで、FcGAD を発現させた大腸菌の休止菌体 3.0g とグルタミン酸 26.4g を用い、GABA 生産試験を実施した。結果、1 時間の反応時間で、収率 93%、純度 95%以上の GABA 粉末が調整された。本成果は、ChemBioChem 誌の表紙に選ばれた²⁾。

ピラジンの新しい生合成経路：ピラジンはコーヒー、ほうじ茶、鰹節などの加工食品に加え、チョコレート、焼き肉、納豆など、食品の好ましい香りに寄与する。特に加熱した食品に広く存在、アミノ酸などのアミノ化合物と糖から非酵素的に産生される。近年、このピラジンが、細菌の細胞間コミュニケーションや、動物の行動を調節するフェロモン様の機能を持つことが報告され、生合成経

路の存在が示唆されていた。

我々は、アミノ酸代謝関連酵素のインシリコスクリーニングをする課程において、*Cupriavidus necator* を含むいくつかの細菌ゲノムの L-スレオニン脱水素酵素 (TDH) 遺伝子の近傍に、機能不明の PLP 依存性酵素が保存されていることを見出した。そこで、両酵素を組み換え大腸菌にて調整、精製後、各種アミノ酸と反応させたところ、L-スレオニンを基質とした際に、香ばしい香りが発生した。本物質を LC-MS および SPME-GC/MS で分析、3-エチル-2,5-ジメチルピラジン (EDMP) と同定した。CoA と添加すると、EDMP の生成が抑制されグリシンが産生されたことから、機能不明の PLP 依存性酵素を二機能性 2-アミノ-3-ケトブチル酸 CoA リガーゼ/L-スレオニナルドラーゼと命名した。この新しいピラジン合成経路は、30 度以下の常温の水中で効率的に進行したこと、水分の少ない食品を加熱することにより生じるピラジン合成経路とは対照的であり、生物がピラジンの産生を常温で行っている可能性が示唆された³⁾。



今後の展望: ツンデレ酵素の機能改変には、悩みが尽きない。酵素機能の間にはトレードオフの関係があるのかなんとかで、耐熱性や安定性は高いけど常温では働いてくれないとか困ったヤツが多い。加えて、標的でない蛋白質まで標識してしまうのでどうにかしてほしいとか、活性が高すぎて扱いにくいとか、低温でも働くようにしてほしいとか、よくわからない機能のよくわからない改変の依頼まである。しかし、データベースに存在する膨大な数の配列をメンターとし、配列や構造をいじくりたおしていると、よくわからない課題が解決し、補酵素がガッツリ結合したり、活性化エネルギーが低下し低温でも踏ん張れる愛しい酵素が誕生したりする^{4,5)}。一つ確かなことは、保存性が無くデタラメにみえる配列であっても、35 億年の進化の歴史がうっすら刻まれているようである。適当なパーツに分解すると機能も分解したりするし、機能間のトレードオフはただの迷信なのかもしれない⁶⁾。

今後の展望であるが、酵素によって構造と機能の相関が異なる上に、(主に立体構造の違いに起因する)、ニーズも様々であるため、課題と酵素の特性を理解した上で、アドホックな解析が引き続き必要である。検証結果を元に、様々なアイデアを解析アルゴリズムに反映、ノウハウの蓄積とデザイン技術を向上させ、共同研究者のニーズに合わせた改変が提案できるよう鋭意努力したい。中野先生、藤浪先生、学生と共に、配列と構造を見て「酵素のキモチ」がわかる研究チームを目指します。

謝辞: 本研究は、静岡県立大学博士後期課程に所属した高木啓詞博士(現在 静岡工業技術研究所)、本山智晴博士(現在 三井化学株式会社)、中野祥吾助教(現在 静岡県立大学 准教授・JST さきがけ研究員)が中心となって行いました。また、解析アルゴリズムの開発および検証は、富山県立大学の浅野泰久教授、愛媛大学の澤崎達也教授をはじめ、多くの企業、大学の皆様にご支援、ご協力いただきました。深く感謝いたします。

1. 中野 祥吾 第 22 回 酵素応用シンポジウム
2. Takagi H, et al., ChemBioChem, 2021
3. Motoyama T, et al., Communications Chemistry, 2021
4. Kido K, et al., eLife, 2020
5. Motoyama T, et al., Biochemistry
6. Kozuka K, et al., Biochemistry, 2021