

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05592

研究課題名(和文) 環境メタゲノムスクリーニングによる新規ラッカーゼの探索と機能性材料合成への応用

研究課題名(英文) Screening of novel laccases from metagenomic libraries and their applications for synthesis of functional materials

研究代表者

平石 知裕 (HIRAISHI, Tomohiro)

国立研究開発法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・専任研究員

研究者番号：20321804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、環境試料から直接DNAを抽出してメタゲノムライブラリを作製し、ラッカーゼ活性を指標としたスクリーニングによる新規ラッカーゼの獲得を目指した。さらに、基質スクリーニングを行った後、基質材料開発を目指した酵素の高性能化・高機能化を行った。本研究により、高活性を有するラッカーゼの高効率発現に関する知見が得られ、これを利用した進化工学によって本酵素の優良変異体を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is the screening of novel laccases from metagenomic libraries of environmental samples and the directed evolution of the enzymes for synthesis of functional materials. The present results provided the detailed information about the recombinant expression of the laccases having a high activity. On the basis of this finding, we conducted the directed evolution of the laccases for the function improvement.

研究分野：複合新領域

キーワード：ラッカーゼ 環境メタゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 市販ラッカーゼの性質

ラッカーゼは、分子内に銅を含むマルチ銅オキシダーゼで、植物・菌類・細菌などに広く含まれている。現在市販されているラッカーゼは一部を除いて全て真菌由来のものであるが、使用可能な pH 域が狭い（特にアルカリ性では使用不可）こと、異種発現が困難であるため遺伝子改変が容易でない上に酵素生産収率も低いことなどの短所がある。

### (2) 微生物由来ラッカーゼの組換え発現

*Bacillus* 由来ラッカーゼ (CotA) や大腸菌由来ラッカーゼを大腸菌内で組換え発現させた際、通常の培養条件では不完全な銅の取り込みによるラッカーゼの不活性化が見られる。Martins ら及び Khajeh らは、組換え CotA の発現時に攪拌を止める（微好氣的培養）ことで活性型 CotA の生産に成功している (J. Biol. Inorg. Chem., 2008, 13, 183; J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2010, 37, 863)。一方、大腸菌由来ラッカーゼに関しては *in vitro* における再構成が知られているだけで、微好氣的培養法が適用可能か否かは分かっていなかった (J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, 2005)。そこで申請者は、予備実験において、微好氣的培養法を用いて組換えラッカーゼを生産し、大腸菌由来ラッカーゼにも本手法が適用可能であることを示した。これらのことから、微好氣的培養法は未知のラッカーゼ生産においても有効な手段であることが予想された。さらに、ラッカーゼ遺伝子を破壊した大腸菌を宿主として使用することで、組換えラッカーゼが活性型で得られるかどうかを容易に判断できるシステムを構築した。

### (3) メタゲノムスクリーニングによるラッカーゼの獲得

通常、目的とする微生物酵素を得るには、その生産菌を単離・培養することが必須である。しかし、環境中に存在する 99% 以上の微生物は現在の技術では培養できない。従来は、その 1% 未満の培養可能微生物から目的酵素を取得する努力をしていたが、未使用の残り 99% を利用できれば有用酵素の収集量は遥かに増大すると考えられる。

これまでにメタゲノムスクリーニングによるラッカーゼの獲得例として、3 報の論文と 1 件の特許が存在する (J. Biol. Chem., 2006, 281, 22933; Appl. Microbiol. Biotechnol., 2010, 87, 1023; Appl. Microbiol. Biotechnol., 2010, 87, 1103; 特開 2009-201481)。しかしながら、これらの文献では、問題①宿主大腸菌が有するラッカーゼ活性の影響の排除（ノイズの低下）、及び問題②培養時における微好氣的培養法などのスクリーニングの最適化（シグナルの増加）が行われていない。そのため、これまでの系では、至適条件下でスクリーニングを実

行していれば獲得可能であった多数のラッカーゼを見逃している可能性が高かった。

### (4) ラッカーゼを触媒とした機能性材料合成

ラッカーゼは広い基質特異性を有していることから、酵素漂白・環境汚染物質分解・リグニン重合および分解・フェノール系ポリマー合成など様々な分野での利用が期待されている。

フェノール系ポリマーは安価で優れた物性を有することから幅広く利用されてきたが、従来法では毒性の高いホルマリンを用いなければならないため、フェノール系ポリマーの使用が制限されつつある。このような現状から、新しいフェノール系ポリマー合成法が囑望されていた。そこで近年、市販ラッカーゼによるフェノール系ポリマー合成法が提案されてきた。ラッカーゼによる重合法の特徴として、①毒性ホルマリンは不要、②従来法では困難な幅広いフェノール類の重合が可能、③反応条件により構造制御が可能、④温和な反応条件、⑤操作が簡便、が挙げられる。一方、本酵素法では、通常の酵素反応で用いられる酵素量の 100 倍以上のラッカーゼを必要とした (3 mg ラッカーゼ/0.4 g フェノール系ポリマー) (Macromolecules 1996, 29, 3053)。反応系の改良手段として反応条件の検討が挙げられるが、これにも限界があることからラッカーゼの高性能化・高機能化などの抜本的アプローチを導入しなければならない。

## 2. 研究の目的

ラッカーゼは様々な芳香族化合物を酸化する能力を有しており、染色・脱色・エンジニアリングプラスチック合成などに活用されているが、反応によっては大量の酵素が必要である。主要な市販ラッカーゼは真菌（カビ・キノコ）由来であり、異種発現による大量生産や遺伝子工学による高活性化・高機能化が難しい。さらに現在使用可能な全ての酵素は、環境中の培養可能な 1% 未満の微生物から得られたものであり、残り 99% の微生物資源の有効利用が望まれている。そこで本研究では、環境試料から直接 DNA を抽出してメタゲノムライブラリを作製し、ラッカーゼ活性を指標としたスクリーニングを行い、難培養微生物由来新規ラッカーゼの獲得を目指した。さらに、基質スクリーニングを行った後、機能性材料開発を目指した酵素の高性能化・高機能化を行った。具体的項目を以下に示す。

- (1) 環境 DNA メタゲノムライブラリの構築とハイスループットスクリーニング。大腸菌を宿主としたスクリーニング系を構築し、難培養微生物由来新規ラッカーゼを獲得する。
- (2) ラッカーゼの効率発現・精製と基質スクリーニング。(1) で得られるラッカーゼは複

数種類と予想されるため、それぞれのラッカーゼを発現・精製して基質スクリーニングを行い、(3)に最も相応しい酵素を決定する。  
(3) 人工進化ラッカーゼの創成と機能性材料合成への応用。ラッカーゼの高性能化・高機能化を目指した進化学を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 環境 DNA メタゲノムライブラリの構築とハイスクリーン

竹林を初めとする様々な環境サンプルから環境 DNA を抽出・増幅した後、5 kbp 程度に断片化した。次いで、断片化 DNA を発現ベクターに導入した後、大腸菌を形質転換してライブラリを作製した。その後、ラッカーゼ活性を指標としたスクリーニングを行った。

また、ラッカーゼ活性を指標としたスクリーニング以外に、ラッカーゼ保存配列を利用した PCR スクリーニングも実施した。

#### (2) ラッカーゼの効率発現・精製と基質スクリーニング

(1) のメタゲノムスクリーニングと平行して大腸菌由来ラッカーゼの発現系をデザインした。まず、His タグを付加した発現プラスミドを作製し、(1) および予備実験を参考にして発現条件(温度、攪拌、銅イオン濃度)の最適化を行った。次いで、His タグを利用したアフィニティー精製を行った。さらに、得られた精製酵素の基質スクリーニングを各種芳香族化合物に対して行った。

#### (3) 人工進化ラッカーゼの創成と機能性材料合成への応用

進化学システムは、「ランダム変異誘発」→「変異体ライブラリ作製」→「活性による評価(スクリーニング)」→「機能マッピング」からなる。そこでまず、PCR を利用してラッカーゼ遺伝子にランダム変異を誘発し、変異体ライブラリを作製した。次いで、マイクロプレート上に1細胞/1ウェルとなるように大腸菌を接種し、(2)で決定した発現条件で培養した。最後に、変異ラッカーゼによる酸化反応を測定し、活性が上昇した変異体の取得を試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) 環境 DNA メタゲノムライブラリの構築とハイスクリーン

難培養微生物由来新規ラッカーゼ獲得を目指した大腸菌を宿主とするスクリーニング系の構築を行った。まず、竹林を初めとする様々な環境サンプルから環境 DNA を抽出・増幅した後、5 kbp 程度に断片化した。次いで、断片化 DNA を発現ベクターに導入した後、大腸菌を形質転換してライブラリを作製した。ラッカーゼの異種発現において、銅濃度等の発現条件の最適化が重要である。そこで、大腸菌由来ラッカーゼをモデル酵素として、ラッカーゼ発現に最適な培養条件の検討を

行った。その結果、1mM Cu<sup>2+</sup>存在下で微好氣的培養を行うことで、ラッカーゼ活性の最大化が達成できた。そこで、最適条件下で培養したライブラリを用いて、ラッカーゼ活性を指標としたスクリーニングを行ったが、高活性を有するクローンを取得することは出来なかった。

また、ラッカーゼ活性を指標にしたスクリーニングと平行して、PCR によるメタゲノムスクリーニングを行った。ラッカーゼ酵素中に見られる保存配列を基にプライマーを設計し、degenerate PCR により目的酵素遺伝子の獲得を試みた。その結果、部分配列ではあるもののラッカーゼと思われる配列を有するクローンが得られた。そこで、得られた部分配列情報を基に inverse PCR を試みたが、目的酵素遺伝子の全長を得ることは出来なかった。

#### (2) ラッカーゼの効率発現・精製と基質スクリーニング

モデル酵素として使用した大腸菌由来ラッカーゼの活性とその反応特性を調べた。その結果、最適条件下で発現させた本酵素は、従来報告されているものと比較して、高活性を有していることが分かった。そこで、本酵素の基質スクリーニングを行ったところ、本酵素は様々な芳香族化合物の酸化反応を効率よく触媒できることが明らかとなった。

#### (3) 人工進化ラッカーゼの創成と機能性材料合成への応用

(2)において、大腸菌由来ラッカーゼが機能性材料合成における有用な触媒になり得ることが示唆された。そこで、(2)で構築した組換え発現系を用い、高活性化を目指した大腸菌由来ラッカーゼの進化学を実施した。まず、ランダム変異導入によって変異酵素ライブラリを作製した。次いで、酸化活性を指標として第1次スクリーニングを行った。その結果、第1世代の変異酵素群から、野生型に比べ分解活性が向上しているものが数クローン得られた。今後これらの解析を行い高活性化の要素因子を解明して、高い合成活性を有する生体触媒開発につなげていきたい。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

#### ① T. Hiraishi

Poly(aspartic acid) (PAA) hydrolases and PAA biodegradation: current knowledge and impact on applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, 100, 1623-1630. (査読有)

DOI:10.1007/s00253-015-7216-7

② T. Hiraishi, Hideki Abe, and M. Maeda  
Substrate stereoselectivity of poly(Asp)

hydrolase-1 capable of cleaving  $\beta$ -amide bonds as revealed by investigation of enzymatic hydrolysis of stereoisomeric  $\beta$ -tri(Asp)s. *AMB Express*, 2015, 5, 31. (査読有)  
DOI:10.1186/s13568-015-0118-3

[学会発表] (計 11 件)

① T. Hiraishi, H. Abe, and M. Maeda  
「Expression of recombinant laccase from *E. coli* and its characteristics」  
: The 10th International Conference of Modification, Degradation and Stabilization of Polymers (MoDeSt2018), The University of Tokyo, Tokyo Japan, 2-6 Sept., 2018.

② 平石知裕、阿部英喜、前田瑞夫  
「大腸菌由来ラッカーゼの芳香族化合物に対する反応特性」  
: 第7回 JACI/GSC シンポジウム、神戸・ANA クラウンプラザホテル神戸、2018年6月14-15日

③ 平石知裕、久野玉雄、阿部英喜、城宜嗣、前田瑞夫  
「ポリアスパラギン酸分解酵素の基質認識機構」  
: 第66回高分子討論大会、愛媛・愛媛大学、2017年9月20-22日

④ T. Hiraishi, H. Abe, and M. Maeda  
「Properties of poly(Asp) hydrolase-1 capable of cleaving  $\beta$ -amide bonds and its application to  $\beta$ -peptide synthesis」  
: The 11th SPSJ International Polymer Conference (IPC2016), Fukuoka International Congress Center, Fukuoka Japan, 13-16 Dec. (2016)

⑤ 平石知裕  
「バイオポリマー代謝関連酵素の機能解明・開発」  
: 産総研・触媒化学融合研究センター・第39回講演会、つくば・産業技術総合研究所、2016年11月25日 (招待講演)

⑥ 平石知裕、久野玉雄、阿部英喜、城宜嗣、前田瑞夫  
「ポリアスパラギン酸分解酵素の構造と機能」  
: 第65回高分子討論大会、神奈川・神奈川大学、2016年9月14-16日

⑦ 平石知裕、阿部英喜、前田瑞夫  
「ポリアスパラギン酸分解酵素の基質認識機構」  
: 第5回 JACI/GSC シンポジウム、神戸・ANA クラウンプラザホテル神戸、2016年6月2-3日

⑧ 平石知裕、木内玲子、橘弘一郎、阿部英喜、前田瑞夫、朝倉則行  
「大腸菌由来ラッカーゼの組換え発現とその反応特性」  
: 第65回高分子学会年次大会、神戸・神戸国際会議場、2016年5月25-27日

⑨ T. Hiraishi, H. Abe, and M. Maeda  
「Substrate stereoselectivity of poly(Asp) hydrolase-1 capable of cleaving  $\beta$ -amide bonds」  
: 2015 Pacificchem, Hawaii, USA, 15-20 Dec. (2015)

⑩ 平石知裕、久野玉雄、阿部英喜、城宜嗣、前田瑞夫  
「*Pedobacter* sp. KP-2 由来ポリアスパラギン酸分解酵素の基質認識機構」  
: 第64回高分子討論大会、仙台・東北大学、2015年9月15-17日

⑪ 平石知裕、木内玲子、橘弘一郎、朝倉則行、阿部英喜、前田瑞夫  
「大腸菌由来ラッカーゼの組換え発現とその性質」  
: 第64回高分子学会年次大会、北海道・札幌コンベンションセンター、2015年5月28-30日

[図書] (計 1 件)

① T. Hiraishi, and S. Taguchi  
Enzymes catalyzing the synthesis and degradation of beta-linked biopolymers and their applications, In: Rohman G (ed) *Biodegradable polymers: Recent developments and new perspectives*, IACP Publishing, Zagreb, Croatia, 2017, pp 1-132 (pp 1-32). ISBN 978-953-56942-5-0

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等  
<http://www.riken.jp/lab-www/bioengineering/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平石 知裕 (HIRAISHI Tomohiro)  
国立研究開発法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・専任研究員  
研究者番号: 20321804

(2)研究分担者

朝倉 則行 (ASAKURA Noriyuki)  
東京工業大学・生命理工学院・講師  
研究者番号：40401559

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし