

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32657

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07401

研究課題名(和文) 医薬品原料 アミノ酸の光学分割に有用な新規アミノアシラーゼの構造機能相関解析

研究課題名(英文) Analysis of structure-function relationship of novel amino-acylases useful for optical resolution of beta-amino acids used as pharmaceutical raw materials.

研究代表者

夏目 亮 (NATSUME, Ryo)

東京電機大学・工学部・教授

研究者番号：60637651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：enantiopureなR体 フェニルアラニンの生産に役立つ酵素 フェニルアラニンアミノアシラーゼの構造機能相関を明らかにする目的で、2種の微生物に由来する当該酵素の組換え発現と精製、結晶化、結晶構造解析、生化学解析を行った。Burkholderia属細菌由来酵素の結晶構造解析に成功し、部位特異的変異体を用いた構造機能相関解析を進められるようになった。Variovorax属細菌由来酵素の結晶化と2.5 分解能を超える回折像収集は出来たが、結晶がtwinであったためまだ構造決定には至っていない。生化学解析から、Variovorax属細菌由来酵素は絶対的なエナンチオ特異性を示すことが判明した。

研究成果の概要(英文)：In order to reveal the structure-function relationship of beta-phenylalanine aminoacylase capable of enantiopure (R)-beta phenylalanine production, in this study, recombinant expression, purification, crystallization, x-ray crystallographic analysis, biochemical analysis of beta-phenylalanine aminoacylases derived from two micro-organisms, Burkholderia sp. and Variovorax sp., were performed. The crystal structure of the Burkholderia enzyme was successfully determined at 2.1 angstrom resolution. The structure-function relationship analyses of the Burkholderia enzyme utilizing site-specific mutants are in progress. The Variovorax enzyme was crystallized and the diffraction images beyond 2.5 angstrom resolution were collected. However, the crystal structure of the Variovorax enzyme has not been determined, because all collected images were from twinned crystals. Biochemical analyses showed that the Variovorax enzyme has an absolute specificity for R-enantiomer substrate.

研究分野：蛋白質化学

キーワード： アミノ酸 光学分割 アミノアシラーゼ 結晶構造解析 構造機能相関

1. 研究開始当初の背景

β 位の炭素にアミノ基が結合した β アミノ酸の一種 β -フェニルアラニン(β -Phe)は、医薬品の合成原料として有用な物質である。 β -Pheは有機化学合成法により全合成できるものの、*S*体と*R*体の両エナンチオマーがほぼ等量で混在したラセミ体で生成する。そのため、医薬品合成原料として β -Pheを利用するには、*S*体と*R*体のエナンチオマーを分離する必要がある。*R*体は抗がん剤の一種 Paclitaxel、*S*体は抗ピロリ菌薬の一種 Pyloricidin の合成原料としてそれぞれ用いられるため、2000年代初頭より β -Pheのエナンチオマー分離法の開発がなされ、複数の酵素法が開発・報告された。しかし、それらはいずれも環境負荷が高いハロゲンなどの物質が反応副産物として生じる方法であった。

そのような状況下、本研究の連携研究者である川崎寿教授らにより、反応副産物として酢酸しか生じない、環境負荷が低い方法の開発を目指した研究が開始された。ラセミ体の β -Pheのアミノ基をアセチル化して得られる*N*-アセチル β -Phe(*(R,S)*-*N*-Ac- β -Phe)を基質とし、そのアミド結合をエナンチオ特異的に加水分解して enantio-pure な β -フェニルアラニンを生産する酵素(以下、 β -フェニルアラニンアミノアシラーゼ、あるいは、 β PheAAと表記する)の生産菌をターゲットに、環境中の土壤微生物よりスクリーニングが行われた。その結果、2種類の微生物 *Variovorax* 属細菌および *Burkholderia* 属細菌が、*R*体特異的 β -フェニルアラニンアミノアシラーゼ(*R*- β PheAA)生産菌として単離された(Kawasaki et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**(1), 99-106, 2006)。これが当該活性を有する酵素の最初の報告例である。当該酵素に関する報告例は他になく、当該酵素の応用の基盤となる構造機能相関解析が行われた例もない状況であった。なお、当該酵素と相同なアミノ酸配列を持つ酵素の立体構造解析例も存在しない。

申請者が本研究を開始する以前にすでに川崎教授らによって、*Variovorax* 属細菌の酵素(*V-R*- β PheAA)のショットガン法による遺伝子クローニング、*N*末端 His タグ融合型 *V-R*- β PheAA(*His-V-R*- β PheAA)発現プラスミドの構築までは完了していた。また、小スケールでの組換え発現・精製についても試みられていた。しかし、高純度な組換え酵素が得られておらず、申請者が東京電機大学に着任した当時、学内における β PheAAに関する研究は実質的に中断された状況にあった。申請者は β PheAAが産業応用上の魅力を秘めていることに着目し、 β PheAAに関する研究を引き継いで、その構造機能相関研究を開始することにした。その後科研費の助成が開始されるまでの間に、*Burkholderia* 属細菌の酵素(*B-R*- β PheAA)の遺伝子クローニング、*N*末端 His タグ融合型 *B-R*- β PheAA(*His-B-R*- β PheAA)発現プラスミドの構築を

進め、*His-V-R*- β PheAA および *His-B-R*- β PheAA の大量発現・精製・精製酵素の活性分析などを行う実験系を立ち上げ、組換え *R*- β PheAA の研究環境を整えた。難航したものの、タグフリー型の組換え *R*- β PheAA の高発現系・精製系についても確立し、2種類の微生物それぞれに由来する酵素の*N*末端 His タグ融合型およびタグフリー型の合計4種類の組換え *R*- β PheAA を高純度な試料として扱えるようになった。予備実験として結晶化を試みたところ、*His-B-R*- β PheAA については結晶化に成功した。

2. 研究の目的

β -フェニルアラニンアミノアシラーゼ(β PheAA)の反応機構解析や酵素機能改良の研究基盤を構築するために、*Burkholderia* 属細菌および *Variovorax* 属細菌に由来する β PheAAの構造機能相関を明らかにすることを本研究の目的とした。具体的には、(1)組換え酵素の発現・精製・結晶化、(2)結晶構造解析、(3)酵素の基本的な性質の生化学的解析、(4)変異型酵素の設計ならびにその性質についての生化学的解析、の実施を計画した。

3. 研究の方法

(1)組換え酵素の発現・精製・結晶化

Burkholderia 属細菌由来酵素については、すでに結晶が得られていた*N*末端 His タグ融合型酵素 *His-B-R*- β PheAA に加えて *C*末端 His タグ融合型酵素 *B-R*- β PheAA-*His* の発現系も構築し、Ni-affinity、陰イオン交換、ゲルろ過の3段階のカラムクロマトグラフィーで *His-B-R*- β PheAA と *B-R*- β PheAA-*His* を精製した。結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法で行った。異常分散法を用いた結晶構造解析を行うために、セレノメチオニン置換型 *B-R*- β PheAA-*His* の組換え発現・精製・結晶化も行った。また、タグフリー型の *B-R*- β PheAA の組換え発現・精製も行った。*B-R*- β PheAA の精製は、硫酸アンモニウム分画、疎水カラム、陰イオン交換、ゲルろ過、疎水カラム、陰イオン交換、の6段階の手順で進めた。

Variovorax 属細菌由来酵素についても *N*末端 His タグ融合型酵素 *His-V-R*- β PheAA に加えて *C*末端 His タグ融合型酵素 *V-R*- β PheAA-*His* の発現系も構築し、Ni-affinity、陰イオン交換、ゲルろ過の3段階のカラムクロマトグラフィーで *His-V-R*- β PheAA と *V-R*- β PheAA-*His* を精製した。結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法で行った。異常分散法を用いた解析を試みるために、セレノメチオニン置換型 *V-R*- β PheAA-*His* の組換え発現・精製・結晶化も行った。また、タグフリー型の *V-R*- β PheAA の組換え発現・精製・結晶化も行った。*V-R*- β PheAA の精製は、硫酸アンモニウム分画、疎水カラム、2種類の陰イオン交換、ゲルろ過、の5段階の手順で進めた。

精製した組換え酵素の一部を凍結して保存し、生化学実験に用いた。

(2)結晶構造解析

回折像の収集は、高エネルギー加速器研究機構(KEK)の放射光共同利用実験に以下の課題を申請して実施した。*Burkholderia*属細菌由来酵素についての課題は、「*Burkholderia*属細菌由来βフェニルアラニンアミノシラーゼのX線結晶構造解析」(H27年度~H28年度、2015G094)と「*Burkholderia*属細菌由来エナンチオ特異的βフェニルアラニンアミノシラーゼの結晶構造解析」(H29年度~H30年度、2017G184)である。*Variovorax*属細菌由来酵素についての課題は、「*Variovorax*属細菌由来βフェニルアラニンアミノシラーゼのX線結晶構造解析」(H28年度~H29年度、2016G137)である。H28年度からは測定にUni-puckを取り入れた。1年間近く測定が成立せずに試行錯誤したが、H28年度末からはUni-puckを用いて問題なくデータを収集できるようになった。回折データの収集はKEKの各ビームラインに備え付けの検出器とシステムを用いた。回折データの処理はHKL2000あるいはxdsを用いて行った。結晶構造解析はCCP4 suiteおよびPhenixの各種プログラムを用いて行った。

(3)酵素の基本的な性質の生化学的解析

Burkholderia 属細菌自体および *Variovorax* 属細菌自体が生産した酵素を用いた先行研究での実験条件を参考に、ラセミ体の *N*-アセチル β-Phe(*R,S*)-*N*-Ac-β-Phe)を基質として、酵素反応の pH 依存性、温度依存性、熱処理後の残存活性を調べた。至適反応条件において(*R,S*)-*N*-Ac-β-Phe に対して酵素を長時間作用させ、エナンチオ特異性を評価した。上記反応では、2 種類のキラルカラムを用いた HPLC 分析で反応基質(*R,S*)-*N*-Ac-β-Phe および反応産物(*R*)-β-Phe を定量した。また、至適反応条件における酵素学的パラメーター(k_{cat} , K_m)を求めた。酵素学的パラメーターを求める際は、酵素反応によって基質から遊離した酢酸を F-キット(酢酸)を用いて定量した。溶液中における酵素分子のサブユニット会合状態を分析するために、静的光散乱検出器を用いた手法(SEC-MALS)で、精製試料の分子量分析を行った。

(4)変異型酵素の設計ならびにその性質についての生化学的解析

Burkholderia 属細菌由来酵素については、決定した結晶構造情報を基に、基質結合・認識部位を形成すると考えられる残基を Ala に置換した部位特異的変異型酵素の発現系を設計した。部位特異的変異型酵素は C 末端 His タグ融合型で発現させ、精製は C 末端 His タグ融合型野生型酵素と同様に行った。野生型酵素における至適反応条件で、部位特異的変異型酵素の比活性を評価した。この反応では、2 種類のキラルカラムを用いた HPLC 分析で反応基質(*R,S*)-*N*-Ac-β-Phe および反応産物(*R*)-β-Phe を定量した。

4. 研究成果

(1)組換え酵素の発現・精製・結晶化

Burkholderia 属細菌由来酵素については、本研究期間開始前から結晶が得られていた N 末端 His タグ融合型酵素 His-*B-R*-βPheAA の結晶を量産した。C 末端 His タグ融合型酵素 *B-R*-βPheAA-His も高純度な試料が得られるようになったため、His-*B-R*-βPheAA の結晶化条件を基に *B-R*-βPheAA-His も結晶化して結晶を量産した。His-*B-R*-βPheAA よりも *B-R*-βPheAA-His の方が結晶の成長が良好であったため、セレノメチオニン置換型酵素の結晶化は *B-R*-βPheAA-His について行った。

Variovorax 属細菌由来酵素については、N 末端 His タグ融合型酵素 His-*V-R*-βPheAA、C 末端 His タグ融合型酵素 *V-R*-βPheAA-His、タグフリー型酵素 *V-R*-βPheAA-His を用いて結晶化条件をスクリーニングした結果、*V-R*-βPheAA-His についてのみ、結晶が成長する条件を見出した。結晶化条件を改良した結果、再現よく *V-R*-βPheAA-His の結晶を成長させることができるようになった。同様の結晶化条件で、セレノメチオニン置換型 *V-R*-βPheAA-His の結晶も得られた。

(2)結晶構造解析

Burkholderia 属細菌由来酵素については、N 末端 His タグ融合型酵素 His-*B-R*-βPheAA の回折像がまず得られ、空間群は $P4_12_1$ 、格子長は $a = b = \text{約 } 112$ 、 $c = \text{約 } 342$ であった。本結晶については最大約 2.85 分解能の回折データセットが得られた。セレノメチオニン置換型酵素 *B-R*-βPheAA-His についてもセレンの吸収端波長で最大約 3.2 分解能の回折データセットが得られた。その回折データセットを用いて Se-SAD 法で位相を決定し、9 割弱の残基のモデルを構築した。構築したモデルを用いた MR 法で His-*B-R*-βPheAA の結晶構造を最大約 2.85 分解能で決定し、モデリングと結晶学的精密化を進めた。現在の His-*B-R*-βPheAA のモデルの *R*-work および *R*-free はそれぞれ 21.9%、26.5%である。結晶構造の詳細については本稿では述べないが、本酵素は 3 つのドメインからなる 3 次構造を持つこと、4 次構造はホモダイマーを形成することが判った。His-*B-R*-βPheAA の結晶構造決定後は C 末端 His タグ融合型酵素 *B-R*-βPheAA-His に注力して回折像の収集を進めた。これまでに最大約 2.1 分解能の回折データセットが得られており、そのデータセットを用いた *B-R*-βPheAA-His モデルの *R*-work および *R*-free はそれぞれ 16.1%、19.2%である。また、基質結合部位を実験的に明らかにする目的で、*B-R*-βPheAA-His の結晶に β-Phe を soaking して回折像収集を進めた。その結果、β-Phe の完全なモデルを組めるほどの電子密度ではないが $F_o - F_c$ map で β-Phe のものと考えられる電子密度が観察される領域がどこか判ってきた。本酵素の基質結合部位についてはほぼ特定できたと考えている。

Variovorax 属細菌由来酵素については、*V-R-βPheAA-His* 結晶の最大約 2.5 分解能の回折データセットが得られている。セレノメチオニン置換型 *V-R-βPheAA-His* 結晶の最大約 3.1 分解能の回折データセットも得られている。本酵素結晶の結晶学的パラメータは、空間群は $P2_1$ 、格子長は a = 約 86、 b = 約 180、 c = 約 101、格子軸間角度は β = 約 90.07° と考えられるが、おそらく twin の結晶であり断定できないのが現状である。結晶化条件や回折像収集条件の改良を続けているが twin ではない回折データセットはこれまでに得られておらず、本酵素については結晶構造をまだ決定できずにいる。分子のパッキングが異なる結晶が得られることを期待して、現在、末端領域を欠損させた酵素の組換え発現・精製・結晶化に取り組んでいる。

なお、本稿執筆時点で *Burkholderia* 属細菌由来酵素については合計 300 個以上の結晶を、*Variovorax* 属細菌由来酵素については合計 130 個以上の結晶を、それぞれ測定に用いている。これまでの回折像の測定結果を踏まえ、*Burkholderia* 属細菌由来酵素についてはリガンドの電子密度がはっきり確認できる回折データセットの収集が今後の課題であると認識している。*Variovorax* 属細菌由来酵素については twin ではない回折データセットの収集と構造決定が今後の課題である。

(3) 酵素の基本的な性質の生化学的解析

Burkholderia 属細菌由来酵素については、N 末端 His タグ融合型 His-*B-R-βPheAA*、C 末端 His タグ融合型 *B-R-βPheAA-His*、タグフリー型 *B-R-βPheAA* いずれも、pH7.5–pH8.0 が反応至適 pH であった。反応至適温度はいずれの組換え酵素も 65 付近であった。熱処理後の残存活性を評価したところ、55–60 までの熱処理では十分活性が認められ、70–75 の熱処理で完全に失活する結果となった。エナンチオ選択性を評価したところ、反応基質となる (*R*)-*N-Ac-β-Phe* が残存している時点では反応産物である (*R*)- β -*Phe* の鏡像異性体過剰率が 99.9% 以上と非常に高いエナンチオ選択性を示すものの、(*R*)-*N-Ac-β-Phe* が消費され尽くすと (*S*)-*N-Ac-β-Phe* が徐々に加水分解されて (*S*)- β -*Phe* が生じて (*R*)- β -*Phe* の鏡像異性体過剰率が 99% を下回ることが判った。N 末端 His タグ融合型 His-*B-R-βPheAA*、C 末端 His タグ融合型 *B-R-βPheAA-His*、タグフリー型 *B-R-βPheAA* の至適反応条件 (pH7.75, 50.0) における酵素学的パラメータは、 k_{cat} がそれぞれ 28.6×10^3 cycle/min、 23.2×10^3 cycle/min、 23.7×10^3 cycle/min、 K_m がそれぞれ 3.22 mM、2.85 mM、3.04 mM、 k_{cat}/K_m がそれぞれ 8.91 (cycle/min) \cdot mM⁻¹、 8.13 (cycle/min) \cdot mM⁻¹、 7.79 (cycle/min) \cdot mM⁻¹、であった。

一方、*Variovorax* 属細菌由来酵素については、N 末端 His タグ融合型 His-*V-R-βPheAA*、C 末端 His タグ融合型 *B-V-βPheAA-His*、タグ

フリー型 *V-R-βPheAA* いずれも、pH6.5–pH7.0 が反応至適 pH であった。反応至適温度はいずれの組換え酵素も 50 付近であった。熱処理後の残存活性を評価したところ、45–50 までの熱処理では十分活性が認められ、60–65 の熱処理で完全に失活する結果となった。エナンチオ選択性を評価した結果、反応基質となる (*R*)-*N-Ac-β-Phe* が残存している時点では反応産物である (*R*)- β -*Phe* の鏡像異性体過剰率が 99.9% 以上であること、また、(*R*)-*N-Ac-β-Phe* が消費され尽くしても (*S*)-*N-Ac-β-Phe* の加水分解産物となる (*S*)- β -*Phe* が全く検出されないことが判った。N 末端 His タグ融合型 His-*V-R-βPheAA*、C 末端 His タグ融合型 *V-R-βPheAA-His*、タグフリー型 *V-R-βPheAA* の至適反応条件 (pH6.65, 47.5) における酵素学的パラメータは、 k_{cat} がそれぞれ 11.7×10^3 cycle/min、 17.4×10^3 cycle/min、 13.9×10^3 cycle/min、 K_m がそれぞれ 0.82 mM、0.96 mM、0.95 mM、 k_{cat}/K_m がそれぞれ 14.3 (cycle/min) \cdot mM⁻¹、 18.2 (cycle/min) \cdot mM⁻¹、 14.6 (cycle/min) \cdot mM⁻¹、であった。

溶液中における精製組換え酵素の分子量を SEC-MALS 法で分析した結果、*B-R-βPheAA-His* と *V-R-βPheAA-His* はそれぞれ 163 kDa、181 kDa であった。アミノ酸配列に基づく両酵素サブユニットの分子量がそれぞれ 83.5 kDa、87.4 kDa であることから、両酵素はともに溶液中でホモ二量体を形成する酵素であると考えられる。

(4) 変異型酵素の設計ならびにその性質についての生化学的解析

Burkholderia 属細菌由来酵素について、決定した結晶構造情報を基に、基質結合・認識部位を形成すると考えられる残基のうち 5 残基を Ala に置換した部位特異的変異型酵素 5 種類 Y385A、Y422A、E507A、N533A、E643A について比活性を評価した。Y422A については比活性が野生型酵素に比べて若干低下しただけであったが、残りの 4 種類はほとんど活性を示さなかった。Y385、E507、N533、E643 の各残基は基質と直接相互作用しているのではと考えられる。しかし、4 種類の変異型酵素の活性が大幅に低下した理由が misfolding によるものかそうではないのかについては現時点では未確認である。今後、野生型酵素を含めて精製試料の CD スペクトル分析を行う必要があると考えている。

(5) 今後の展開

Burkholderia 属細菌由来酵素については、高分解能なりガンド結合型結晶構造の解析、上述した部位とは別の部位の変異体についての活性分析、基質特異性の解析、をさらに行い、構造機能相関解析を進める。*Burkholderia* 属細菌由来酵素よりも総じて高性能な *Variovorax* 属細菌由来酵素については、末端欠損型の derivative シリーズを結晶化し

て結晶構造解析を実現する。*Burkholderia* 属細菌由来酵素と *Variovorax* 属細菌由来酵素の共通性・相異性を構造情報に立脚して見出し、当該酵素の機能改良のための研究基盤を構築する。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

加藤 雄己、川崎 寿、夏目 亮、*Burkholderia* sp.由来(*R*)- β -フェニルアラニンアミノアシラーゼの構造機能相関解析、2018 年 9 月、国立京都国際会館(京都府・京都市) 望月 徹、加藤 雄己、夏目 亮、川崎 寿、*Burkholderia* 属細菌由来(*S*)- β -Phe アミノアシラーゼの生化学的解析、ConBio2017 (2017 年度 生命科学系学会合同年次大会・第 40 回 日本分子生物学会年会・第 90 回 日本生化学会大会)、2017 年 12 月 7 日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

加藤 雄己、和田 英嗣、野上 真央、川崎 寿、夏目 亮、*Burkholderia* sp.由来(*R*)- β -フェニルアラニンアミノアシラーゼの結晶構造解析、第 16 回 日本蛋白質科学会年会、2016 年 6 月 8 日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

加藤 雄己、野上 真央、川崎 寿、夏目 亮、enantio-pure な(*R*)- β -Phe の生産に役立つ酵素の構造解析及び生化学解析、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 29 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

加藤 雄己、山崎 穰、川崎 寿、夏目 亮、*Burkholderia* 属細菌由来(*R*)- β -Phe アミノアシラーゼの構造解析及び機能解析、BMB2015 (第 38 回 日本分子生物学会、第 88 回 日本生化学会 合同年会)、2015 年 12 月 2 日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

加藤雄己、夏目亮、*Burkholderia* 属細菌由来(*R*)- β -Phe アミノアシラーゼの結晶学的研究、平成 27 年度日本結晶学会年会、2015 年 10 月 17 日、大阪府立大学(大阪府・堺市)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

夏目 亮 (NATSUME, Ryo)
東京電機大学・工学部・教授
研究者番号：60637671

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

川崎 寿 (KAWASAKI, Hisashi)
東京電機大学・工学部・教授
研究者番号：90349788

(4) 研究協力者

()