

平成30年6月7日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2015～2017

課題番号：15KT0139

研究課題名(和文) アルカン合成関連酵素の構造ゆらぎ制御に基づく遷移状態制御

研究課題名(英文) Regulation of the transition states of the enzymes for alkane production by controlling their conformational fluctuations

研究代表者

新井 宗仁 (Arai, Munehito)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：90302801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：最近、酵素反応における遷移状態の形成には酵素のグローバルな構造変化が必要であり、これが触媒反応の律速段階となることが明らかとなってきた。そこで本研究では、バイオエネルギー生産に重要な酵素AARとADOをモデルとして用い、分子動力学シミュレーション(理論)とNMR緩和測定(実験)によって酵素の構造揺らぎを検出した。次に、酵素の構造揺らぎを制御する上で重要なアミノ酸残基を探索し、それらの部位に変異を導入することにより、酵素の遷移状態を制御可能なことを示した。また、600個以上の変異体を作製する網羅的な変異解析により、両酵素の活性を制御する上で重要な残基の同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：Recent advances in protein chemistry have revealed that global conformational change of an enzyme is closely related to formation of the transition state and thus constitutes the rate-determining step in an enzyme reaction. Here, using two enzymes, acyl-ACP reductase (AAR) and aldehyde-deformylating oxygenase (ADO), which are indispensable for biofuel production, we detected conformational fluctuations of enzymes by molecular dynamics simulations (theory) and NMR relaxation measurements (experiment). We then searched for residues essential for controlling conformational fluctuations of the enzymes. Introduction of mutations at these residues resulted in changes of activities, indicating that regulation of the transition state of an enzyme is possible by such mutations. We also performed comprehensive mutational analysis including alanine-scanning mutagenesis on AAR and ADO by making more than 600 mutants and succeeded in identifying the residues important for controlling activities.

研究分野：生物物理学

キーワード：タンパク質 酵素反応 分子動力学 NMR バイオエネルギー

1. 研究開始当初の背景

生体高分子であるタンパク質(酵素)は触媒反応により有用物質を創製できる。しかし触媒活性の低い酵素も多く、産業利用に向けて高活性化が必要である。最近、酵素反応における遷移状態構造の形成には、酵素のグローバルな構造変化が必要であり、これが触媒反応の律速段階となることが明らかとなってきた。したがって、酵素の構造揺らぎを制御し、遷移状態を制御(安定化)することにより、酵素反応の高速化が可能と期待される。シアノバクテリア由来のアシル ACP 還元酵素(AAR)とアルデヒド脱ホルミル化オキシゲナーゼ(ADO)は、軽油相当のアルカンを合成できる酵素として注目されているが、酵素活性が低いため、実用化するためには両酵素の高活性化が急務である。

2. 研究の目的

そこで本研究では、酵素の構造揺らぎを検出し、構造揺らぎを制御する上で重要なアミノ酸残基を探索することにより、酵素の遷移状態の安定性を制御することを目指す。特に、バイオアルカン生産に重要な酵素 AAR と ADO をモデルとし、実験と理論の両アプローチから、次の研究を行う。これらを通して、AAR と ADO の活性向上に重要な残基の同定を目指す。

(1) 分子動力学シミュレーション(理論)により、酵素の構造揺らぎを明らかにする。

(2) NMR 分光法(実験)により、酵素の構造揺らぎを明らかにする。

(3) 構造揺らぎを制御する上で重要な残基を探索後、その部位に変異を導入し、酵素活性(すなわち遷移状態の安定性)を制御可能なことを検証する。

(4) 配列比較や網羅的変異解析などにより、酵素の活性を制御する上で重要な残基を同定する。

3. 研究の方法

分子動力学シミュレーションは AMBER ソフトウェアを用いて行った。Nostoc punctiforme PCC 73102 由来 ADO(73102ADO)の X 線結晶構造を初期構造とし、金属の有無と生成物(ヘプタデカン)の有無の組み合わせで計4通りの状態それぞれについて、400 ns 程度ずつのシミュレーションを行った。

NMR 測定においては、Thermosynechococcus elongatus BP-1 由来 ADO を大腸菌で大量発現させ、Ni カラムクロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーによって高純度に精製した。二次元と三次元 NMR 測定のために、 ^{15}N と ^{13}C ラベルを導入

した。NMR 測定は Bruker 社の Avance500 と Avance800 を用いて行った。

AAR と ADO のアラニンスキャン変異解析では、N 末端を除くすべての残基を1つずつアラニンに置換した変異体を作製した。ただし、元々アラニンの部位はグリシンに置換した。AAR (*Synechococcus elongatus* PCC 7942 由来 AAR, 7942AAR)では340個、73102ADO では231個の変異体を構築した。AAR の活性評価時には野生型 ADO と変異型 AAR を大腸菌内で共発現させ、我々が以前開発した *in vivo* での活性評価方法(引用文献①)を用いて活性、基質特異性、可溶性タンパク質の量などを求めた。逆に ADO の活性評価時には野生型 AAR と変異型 ADO を共発現させた。

4. 研究成果

(1) ADO のグローバルな構造揺らぎを理論的に可視化し、機能発現に重要と考えられる構造揺らぎを検出するために、ADO の分子動力学シミュレーションを行った。その結果、基質進入/生成物解離部位においてゲートの開閉運動が起きる様子が観測された。また、金属結合の有無や生成物の有無などによって立体構造やダイナミクスが変化の様子が観測され、反応サイクルを通して構造揺らぎが変化する可能性が示唆された。

(2) ADO のグローバルな構造揺らぎを実験的に可視化するために、ADO の NMR スペクトル測定を行った。試料や測定条件等の最適化を行うことにより、良好な NMR スペクトルを得ることができた。次に、基質アナログの存在下と非存在下で NMR スペクトルを測定し、緩和測定(R_1 , R_2 , NOE 測定)を行った。その結果、基質アナログの添加によって ADO の構造揺らぎが変化の様子が観測された。

(3) ADO のシミュレーション結果に基づき、構造揺らぎを引き起こす上で重要と期待される部位(ゲート開閉運動の蝶番となるような残基)を探索し、それらの残基をアラニンやグリシンに置換した変異体を作製した。実験の結果、これらの変異によって活性が大幅に減少した。したがって、構造揺らぎの制御によって活性(すなわち遷移状態の安定性)を制御しうることを示唆された。

(4) AAR の結晶構造は未知であるため、AAR のシミュレーションを行うためには構造決定が必要である。そこで X 線溶液散乱法によって AAR の構造解析を行った結果、理論的な予測構造とよく一致していたことから、予測構造の妥当性が検証された。

(5) AAR は ADO と結合することにより、生成したアルデヒドを ADO に基質として効率的に受け渡すことが知られている。そこでアミノ酸置換変異解析を行うことにより、ADO

上の AAR 結合部位を同定した。また、X 線溶液散乱法を用いることにより、AAR/ADO 複合体の立体構造解析を行った。

(6) 高活性型の AAR を探索するために、12 種類のシアノバクテリアに由来する AAR の活性を比較した。その結果、*Synechococcus elongatus* PCC 7942 由来 AAR が特に高活性であることが明らかになった。また、由来する生物種に応じて AAR の基質特異性が異なり、AAR を用いて寒冷地用の軽油を生産できる可能性が示唆された。さらに、低活性型 AAR を同定できた。同様に、高活性型の ADO を探索するために、10 種類のシアノバクテリアに由来する ADO の活性を比較した結果、高活性型と低活性型の ADO を同定できた。

(7) AAR の活性向上に重要なアミノ酸残基を同定するために変異解析を行った。高活性型 AAR のアミノ酸配列に近づけるように、低活性型 AAR のアミノ酸配列の様々な部位（非保存部位）にアミノ酸置換変異を導入し、41 種類の変異体を構築した。その結果、AAR の活性や可溶性等を決める上で重要な部位の同定に成功した。同様に、ADO の活性向上に重要な部位を同定した。これらの部位は、AAR と ADO の構造揺らぎを制御する上で重要な部位と考えられる。

(8) ADO の網羅的なアラニンスキャン変異解析を完了させた（231 個の変異体を作製）。その結果、ADO の活性を向上もしくは低下させる変異部位が多数同定された。同様に、AAR の網羅的なアラニンスキャン変異解析を完了させた（340 個の変異体を作製）。その結果、AAR の活性を向上もしくは低下させる変異部位が多数同定された。また、AAR の基質特異性を変えるアミノ酸置換も多数同定された。これらの結果は今後、両酵素の活性や基質特異性を制御するための新たな遷移状態制御法を開発する上で有用である。

(9) 進化分子工学的手法によって酵素を高活性化させるためのスクリーニング系の構築も行った。また、タンパク質の構造揺らぎを検出する方法の開発やタンパク質間相互作用の測定等も行った。さらに、シアノバクテリア由来タンパク質の立体構造予測や物性解析等も行った。

<引用文献>

- ① [Hayashi, Y., Yasugi, F., & Arai, M.](#) Role of cysteine residues in the structure, stability, and alkane producing activity of cyanobacterial aldehyde deformylating oxygenase. *PLoS ONE* 10(4), e0122217 (2015).

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 7 件)

- ① [Kujirai, J., Nanba, S., Kadowaki, T., Oka, Y., Nishiyama, Y., Hayashi, Y., Arai, M., & Hihara, Y.](#) Interaction of the GntR-family transcription factor Sll1961 with thioredoxin in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Scientific Reports* 8, 6666 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-25077-5
- ② [Arai, M.](#) Unified understanding of folding and binding mechanisms of globular and intrinsically disordered proteins. *Biophysical Reviews* 10(2), 163-181 (2018). DOI: 10.1007/s12551-017-0346-7
- ③ [Takenaka, T., Nakamura, T., Yanaka, S., Yagi-Utsumi, M., Chandak, M.S., Takahashi, K., Paul, S., Makabe, K., Arai, M., Kato, K., & Kuwajima, K.](#) Formation of the chaperonin complex studied by 2D NMR spectroscopy. *PLoS ONE* 12(10), e0187022 (2017). DOI: 10.1371/journal.pone.0187022
- ④ [Otosu, T., Ishii, K., Oikawa, H., Arai, M., Takahashi, S., & Tahara, T.](#) Highly heterogeneous nature of the native and unfolded states of B domain of protein A revealed by two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* 121(22), 5463-5473 (2017). DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b00546
- ⑤ [新井宗仁, 林勇樹, 工藤恒](#)「ラン藻由来アルカン合成関連酵素の高活性化と軽油生産性の向上」、*月刊 ファインケミカル* 46(2), 19-25 (2017).
- ⑥ [日原由香子, 朝山宗彦, 蘆田弘樹, 天尾豊, 新井宗仁, 栗井光一郎, 得平茂樹, 小山内崇, 梶達也, 成川礼, 蓮沼誠久, 増川一](#)「多彩な戦略で挑むシアノバクテリア由来の燃料生産 — 持続可能な第三世代バイオ燃料生産の最前線」、*化学と生物* 55(2), 88-97 (2017).
- ⑦ [Kudo, H., Nawa, R., Hayashi, Y., & Arai, M.](#) Comparison of aldehyde-producing activities of cyanobacterial acyl-(acyl carrier protein) reductases. *Biotechnology for Biofuels* 9, 234 (2016). DOI: 10.1186/s13068-016-0644-5

[学会発表] (計 3 1 件)

- ① [工藤恒, 林勇樹, 新井宗仁](#)「ラン藻由来アシル ACP 還元酵素の変異解析による炭化水素合成量の向上」、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年
- ② [和田愛未, 林勇樹, 新井宗仁](#)「進化分子工学によるフィチン酸加水分解酵素の低温活性向上」、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年

- ③ 岡芳樹、竹内恒、林勇樹、新井宗仁「細胞内 GTP 定量センサーの開発」、第 4 回 KEK-筑波大連携セミナー「生命の機能と私たち」、2018 年
- ④ Yuuki Hayashi, Munehito Arai, "In vivo real-time measurement of fatty aldehyde and its application", 第 55 回日本生物物理学会年会、2017 年
- ⑤ 林勇樹、新井宗仁「細胞内酵素活性の可視化によるアシル ACP 還元酵素の進化分子工学」、第 69 回日本生物工学会大会、2017 年
- ⑥ 和田愛未、林勇樹、新井宗仁「進化分子工学によるフィチン酸塩加水分解酵素の活性向上」、第 17 回日本蛋白質科学会年会、2017 年
- ⑦ 工藤恒、名和良太、林勇樹、新井宗仁「ラン藻由来アルカン合成関連酵素の機能解析」、第 6 回日本生物物理学会関東支部会、2017 年
- ⑧ 和田愛未、林勇樹、新井宗仁「進化分子工学によるフィチン酸塩加水分解酵素の活性向上」、第 6 回日本生物物理学会関東支部会、2017 年
- ⑨ Manami Wada, Yuuki Hayashi, Munehito Arai, "Improving activity of a phytate-hydrolyzing enzyme by directed evolution", 第 54 回日本生物物理学会年会、2016 年
- ⑩ Hisashi Kudo, Ryota Nawa, Yuuki Hayashi, Munehito Arai, "Structural and functional analysis of a cyanobacterial enzyme for alkane biosynthesis", 第 54 回日本生物物理学会年会、2016 年
- ⑪ Masashi Nomura, Hisashi Kudo, Yuuki Hayashi, Munehito Arai, "Alanine scanning mutagenesis reveals functional roles of conserved residues in an enzyme for alkane biosynthesis", 第 54 回日本生物物理学会年会、2016 年
- ⑫ Yuma Suematsu, Yuji O. Kamatari, Yuuki Hayashi, Munehito Arai, "Structural dynamics of a cyanobacterial alkane synthase studied by NMR and molecular dynamics simulations", 第 54 回日本生物物理学会年会、2016 年
- ⑬ Mari Chang, Keigo Shinba, Yuuki Hayashi, Munehito Arai, "Search for the binding sites between two enzymes essential for cyanobacterial alkane biosynthesis", 第 54 回日本生物物理学会年会、2016 年
- ⑭ Keigo Shinba, Fumitaka Yasugi, Yuuki Hayashi, Munehito Arai, "Alanine scanning mutagenesis of a cyanobacterial alkane synthase", 第 54 回日本生物物理学会年会、2016 年
- ⑮ 工藤恒、名和良太、林勇樹、渡辺麻衣、池内昌彦、新井宗仁「ラン藻由来アルカン合成関連酵素を利用したバイオエネルギー生産」、酵素工学研究会 第 76 回講演会、2016 年
- ⑯ 林勇樹、新井宗仁「脂肪酸アシル ACP 還元酵素の *in vivo* 迅速活性評価法の開発」、第 68 回日本生物工学会年次大会、2016 年
- ⑰ 張マリ、林勇樹、新井宗仁「ラン藻でのアルカン合成に必要な 2 つの酵素間の結合部位の探索」、第 16 回日本蛋白質科学会年会、2016 年
- ⑱ 末松佑磨、鎌足雄司、林勇樹、新井宗仁「アルカン合成酵素 AD の NMR と分子動力学シミュレーションによるダイナミクス解析」、第 16 回日本蛋白質科学会年会、2016 年
- ⑲ 工藤恒、名和良太、林勇樹、新井宗仁「ラン藻由来アルカン合成関連酵素の構造機能解析」、第 16 回日本蛋白質科学会年会、2016 年
- ⑳ 新井宗仁「バイオエネルギーをつくる」、東京大学教養学部統合自然科学科 駒場サイエンス倶楽部、2016 年
- 21 新井宗仁「タンパク質のフォールディングとデザイン」、東京大学 大学院理学系研究科 物理学専攻 A7 サブコース 第 3 回シンポジウム「生物物理の新展開」、2016 年
- 22 工藤恒、名和良太、林勇樹、渡辺麻衣、池内昌彦、新井宗仁「ラン藻由来アルカン合成関連酵素の構造機能解析とバイオエネルギー生産への応用」、第 16 回 東京大学生命科学シンポジウム、2016 年
- 23 鯨井 純一、門脇太朗、新井宗仁、久堀徹、日原由香子「シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 における転写因子 Sll1961 とチオレドキシンの相互作用解析」、第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年
- 24 工藤恒、名和良太、林勇樹、渡辺麻衣、池内昌彦、新井宗仁「ラン藻由来アルカン合成関連酵素の構造機能解析とバイオエネルギー生産への応用」、第 5 回日本生物物理学会関東支部会、2016 年
- 25 張マリ、林勇樹、新井宗仁「ラン藻でのアルカン合成に必要な 2 つの酵素間の結合部位の探索」、第 5 回日本生物物理学会関東支部会、2016 年
- 26 工藤恒、名和良太、林勇樹、渡辺麻衣、池内昌彦、新井宗仁「シアノバクテリア由来アルカン合成関連酵素の機能解析及びバイオエネルギー生産への応用」、藍藻の分子生物学 2015、2015 年
- 27 Hisashi Kudo, Ryota Nawa, Yuuki Hayashi, Mai Watanabe, Masahiko Ikeuchi, Munehito Arai, "Functional analysis of the cyanobacterial enzyme for alkane biosynthesis and its application for bioenergy production", 第 53 回日本生物物理学会年会、2015 年
- 28 Yuma Suematsu, Yuuki Hayashi, Munehito Arai, "Structural dynamics of a

- cyanobacterial alkane-producing enzyme, aldehyde deformylating oxygenase, studied by NMR and MD simulations", 第 53 回日本生物物理学会年会、2015 年
- 29 Mari Chang, Yuuki Hayashi, Munehito Arai, "The search for the binding sites between two enzymes essential for cyanobacterial alkane biosynthesis", 第 53 回日本生物物理学会年会、2015 年
- 30 Keigo Shinba, Fumitaka Yasugi, Yuuki Hayashi, Munehito Arai, "Residues essential for the alkane producing activity of aldehyde deformylating oxygenase revealed by alanine scanning mutagenesis", 第 53 回日本生物物理学会年会、2015 年
- 31 工藤恒、名和良太、林勇樹、新井宗仁「シアノバクテリア由来アルカン合成関連酵素の変異解析」、第 16 回日本蛋白質科学会年会、2015 年

[その他]

ホームページ

<http://folding.c.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

新井 宗仁 (ARAI, Munehito)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：90302801

(2)研究分担者

林 勇樹 (HAYASHI, Yuuki)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：90444059