

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和2（2020）年度 研究進捗評価用〕

平成29年度採択分
令和2年3月31日現在

動植物酵素の異種宿主における可溶性発現技術の開発と
それらの有用物質生産への利用

Development of soluble expression technology and
utilization of enzymes from plants and animals

課題番号：17H06169

浅野 泰久（ASANO, YASUHISA） 富山県立大学・工学部・教授



研究の概要（4行以内）

動植物由来などのタンパク質遺伝子の変異によって、異種宿主での可溶性発現させる合理的手法を確立する。ヤンバルトサカヤスデのゲノム解析を行う。シアン代謝に関与する種々の酵素、例えばヒドロキシニトリルリアーゼ（HNL）などの構造解析および酵素改変を行い、酵素触媒による有用物質の合成などを行う。

研究分野：酵素化学工学

キーワード：遺伝子発現、酵素、可溶性変異、節足動物

1. 研究開始当初の背景

微生物、動植物のシアン代謝系路「アルドキシムニトリル経路」を提唱し、ニトリルヒドラターゼやヒドロキシニトリルリアーゼ（HNL）を始めとして、アルドキシムやニトリルの代謝に関する種々の酵素を明らかにした。また、タンパク質の一次構造の変異により異種宿主において可溶性に発現される現象を統計的に解析する研究を開始した。

2. 研究の目的

課題1：動植物などのタンパク質を変異によって、異種宿主での可溶性発現させる際に、「 α -ヘリックス則」および「INTMSAlign-HiSol」プログラムを用いる改善手法の有効性と一般性を確立する。
課題2：ヤスデのゲノム解析を行う。ヒドロキシニトリルリアーゼ（HNL）などのX線結晶構造解析および酵素改変による光学活性シアノヒドリンの合成などを行う。

3. 研究の方法

課題1：可溶性変異をランダムに引き起こし、変異箇所を統計的に解析することにより、構造上の規則を見出す。その結果から、変異箇所を指摘しどのアミノ酸に変異すれば可溶性発現するかを予測する「 α -ヘリックス則」および「INTMSAlign-HiSol」などのソフトウェアを発展させる。本技術を用いれば、動植物由来のタンパク質の大腸菌などでの可溶性発現が可能となり代謝・酵素研究に威力を発揮することが期待される。

課題2：ヤスデのゲノム解析などからシアン代謝に関与するアルドキシムニトリル経路などの遺伝子の帰属を行う。シアン代謝に関与する動植物由来の種々の酵素、例えばヒドロキシニトリルリアーゼ（HNL）などの構造解析および酵素改変を行い、酵素触媒による有用物質の合成などを行う。

4. これまでの成果

ORFeomeとして得られる各種の生物種由来の遺伝子群を大腸菌で発現させ、それらを可溶性と不溶性に分類し、不溶性のタンパク質に変異を与えて可溶性になる変異を多数集めて、解析を行った。多数の酵素遺伝子が、大腸菌で不溶性タンパク質として発現する。これらにランダム変異を導入し、活性を持つ酵素として発現する変異型酵素を探索した。構造との対応を行ったところ、 α -ヘリックス構造上に比較的多く変異が挿入されていることを明らかにした。

不活性型酵素のランダム変異法で得られる活性型変異酵素の変異点について、その共通性を調べた。帰納法的に法則性を探った結果、 α -ヘリックス構造部分の、親水性領域に存在する疎水性アミノ酸を親水性アミノ酸に置換する、または、同部分の疎水性領域に存在する親水性アミノ酸を疎水性アミノ酸に置換する方法で、活性型酵素として発現できた。これを「 α -ヘリックス則」と呼ぶ。さらに、保存性が相対的に低いアミノ酸の、少なくとも一つを保存性の高いアミノ酸に置換する方法も、活性型酵素として発現させる

ために有効であった。Blast 検索の結果から多数回のアライメントと解析を行う「INTMSAlign」ソフトウェアを発展させた。アミノ酸の疎水性インデックスを加味したHiSol値を用いてホットスポットを見だし、予想したアミノ酸に置換する手法が(INTMSAlign-HiSol)法である。

*Thermus thymophilus*由来タンパク質配列と、その大腸菌における可溶性及び不溶性発現の情報を用いて、人工知能を用いた機械学習を行い、それぞれのタンパク質の可溶性になる計算上の割合を算出できるようにした(富山県大工学部榑原・中村教授と共同)。

変異の組合せによるスクリーニングが可能になったことで、「 α -ヘリックス則」とINTMSAlign-HiSolによる変異導入法の応用の幅が広がった。多くの大学などと可溶性発現について検討し、可溶性発現の改善が見られた。

大腸菌で不溶性にしか発現しない β -シートが豊富な酵素として微生物のPeptide: N-glycosidase Fを選択しホットスポット(Asn17)を見出した。 β -シート構造においても α -helix ruleと同様にアミノ酸残基の親水性・疎水性が重要な因子であると考えられる。

ヤンバルトサカヤスデ由来HNL(ChuaHNL)の結晶構造解析と反応機構の解明のため、静岡、八丈島、鹿児島での採捕、酵素精製、および糖鎖解析を行った。2017年秋に大発生したヤスデDNAについてゲノム解読作業を開始した。ヤスデのゲノムシーケンズデータをアッセンブルし、112のスカフォールド(N50 16.6 Mbp, Total size 148.7 Mbp)からなる、ドラフトゲノムを得た。また、ヤスデ各組織のRNA-seqデータを利用して、ヤスデゲノム上の遺伝子を推定し、13235遺伝子を得た。ヤスデのシアン化水素発生に関与するChuaHNL遺伝子は多くのChuaHNL-like遺伝子とクラスターを形成していたことから、ChuaHNLの祖先遺伝子がゲノム上で多重化していく過程でHNL活性を獲得したと推察した。ChuaHNL-like遺伝子の発現組織を検討した結果、触覚で高発現しているものが複数認められた。

ヤスデのゲノムシーケンズデータを解析し、推定された遺伝子群を用いてゲノム解読済みの節足動物と系統解析を行ったところ、これまでの系統解析と矛盾しない結果を得た。さらにシアン代謝などに関与する遺伝子の機能解析を行った。また、ヤスデのマンドロニトリル合成に関与するシトクロムP450を探索し、アルドキシム合成酵素様P450を見出した。

ChuaHNLのX線構造解析を行ったところ、リポカリン類に分類できる立体構造を有していた。さらに各種のヤスデのHNL遺伝子のクローニングと発現を行い、いくつかの遺伝子が大腸菌でも発現できた。ChuaHNLのX線構造解析を行った。さらにヤケヤスデ*Oxidus g*

*racillis*由来のHNLと(*R*)-マンドロニトリル(Man)、(*R*)-2-Cl-Manとの複合体の結晶構造を明らかにした。構造解析の結果から、本酵素の触媒機構を想定した。また、MOEソフトウェアを用いて、(*R*)-Manおよび(*R*)-2-Cl-Manの両基質について、エナンチオ選択性を改善させる合理的な設計を行った。

5. 今後の計画

変異箇所を指摘しどのアミノ酸に変異すれば可溶性発現するかを予測する「 α -ヘリックス則」および「INTMSAlign-HiSol」などのソフトウェアを発展させる。ヤスデのゲノム解析を行う。HNLなどのX線結晶構造解析および酵素改変による光学活性シアノヒドリン合成などを行う。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

・Nuylert, A., Motojima, F., Khanongnuch, C., Hongpattarakere, T., and Asano, Y. (2020) Stabilization of hydroxynitrile lyases from two variants of passion fruits, *Passiflora edulis* Sims and *Passiflora edulis* forma *flavicarpa* by C-terminal truncation, *ChemBioChem*. **21**: 181-189.

・Zhai, Z.-Y., Nuylert, A., and Asano, Y. (2019) Effects of codon optimization and glycosylation on the high-level production of hydroxynitrile lyase from *Chamberlinius hualienensis* in *Pichia pastoris*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **46**: 887-898.

・Yamaguchi, T., Nuylert, A., Ina, A., Tanabe, T., and Asano, Y. (2018) Hydroxynitrile lyases from cyanogenic millipedes: molecular cloning, heterologous expression, and whole-cell biocatalysis for the production of (*R*)-mandelonitrile, *Sci. Rep.* **8**: 3051.

・Yasukawa, K., Motojima, F., Ono, A., and Asano, Y. (2018) Expansion of the substrate specificity of porcine kidney D-amino acid oxidase for (*S*)-stereoselective oxidation of 4-Cl-benzhydrylamine, *ChemCatChem*. **10**: 3500-3505.

・生物学賞受賞(2018)「微生物から動植物へと展開する酵素利用技術とその基盤開拓」

7. ホームページ等

<https://www.pu-toyama.ac.jp/BR/asano/>