

自己評価報告書

平成23年4月1日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20310139

研究課題名（和文） タンパク質工学的手法による有機溶媒耐性酵素の作成

研究課題名（英文） Development of organic solvent stable enzymes by protein engineering

研究代表者

荻野博康（OGINO HIROYASU）

大阪府立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：80233443

研究分野：生物工学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：酵素、有機溶媒耐性、タンパク質工学、リパーゼ、進化分子工学、プロテアーゼ、アスパルテーム、部位特異的変異

1. 研究計画の概要

日本を始めとする先進国における化学産業はバルク製品の製造から、より付加価値の高いファインケミカル製品の製造に移行している。これらのファインケミカル製品の製造の触媒として基質特異性の高い酵素を利用することは、環境調和型の化学プロセスを構築する上で大変有用である。しかしながら、ファインケミカル製品の多くは難水溶性の化合物であり、高効率に製造するために用いられる有機溶媒存在下では酵素は容易に変性し、その触媒機能を喪失する。本研究では、酵素の有機溶媒耐性の要因を検討し、有機溶媒耐性生体触媒の創製に必要な知見を得ると共に、それらの知見を基にして、有機溶媒耐性生体触媒を創製する。

2. 研究の進捗状況

(1) 有機溶媒耐性微生物 *Pseudomonas aeruginosa* LST-03 株由来の LST-03 リパーゼ遺伝子にランダム変異を誘発し、有機溶媒耐性の異なるリパーゼの取得を試みた。その結果、有機溶媒耐性が向上した数種の変異リパーゼの取得に成功した。ランダム変異を誘発により取得した有機溶媒耐性が向上した数種の変異リパーゼの変異箇所を同定したところ、これらの変異酵素には複数の変異が導入されており、変異には共通するいくつかの特

徴が見出された。さらに部位特異的変異により単一の変異を有する変異リパーゼを種々作成し、有機溶媒耐性に関与する部位・領域を同定した。また、計算科学的手法を用いて、有機溶媒耐性向上の理由についても考察した。

(2) 新たな有機溶媒耐性酵素の創製を目指し、補酵素を必要としない酸化還元酵素遺伝子の取得を試みた。具体的には、高価な補酵素等を必要とせずに、反応性の高いハロゲン化中間体を合成する酸化還元酵素の 1 つである *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762 株由来の非金属型ブロモペルオキシダーゼを選択し、当該遺伝子をクローニングや異種宿主での発現系を構築した。また、遺伝子産物の精製手法を確立するとともに、当該酵素の活性や安定性等の諸性質について検討し、産業酵素としての有用性を評価した。

(3) 有機溶媒耐性微生物 *P. aeruginosa* PST-01 株由来の PST-01 プロテアーゼとサーモライシンの活性中心の構造を比較し、アスパルテーム前駆体合成活性に及ぼすプロテアーゼの活性中心付近の構造について検討した。その検討結果を基に、PST-01 プロテアーゼの活性中心のアミノ酸を部位特異的変異導入により改変し、高い有機溶媒耐性を有し、アスパルテーム前駆体合成活性に優れた高い酵素を開発した。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

当初の計画以上に進展している部分や、やや遅れている部分があるが、全体的にはおおむね順調に進展している。

4. 今後の研究の推進方策

リパーゼは難水溶性の脂質のエステル結合を加水分解する酵素である。また、水分濃度が低い場合には、その逆反応が進行し、機能性食品油やバイオディーゼルなどの合成に利用される。これらリパーゼの基質は難水溶性であることや、水分濃度を低くするために、リパーゼの反応は有機溶媒存在下で用いられることが多い。一般の酵素は有機溶媒存在下で容易に変性し、その触媒機能を喪失するが、有機溶媒耐性リパーゼを産生する有機溶媒耐性微生物が取得されている。しかしながら、本微生物はバイオセーフティーレベルグループ2に分類される微生物であり、有機溶媒耐性リパーゼの生産性はあまり高くないため、有機溶媒耐性リパーゼの大量取得を目的とした生産株としては必ずしも最適ではない。高効率な多量取得には異種宿主とした高発現系の構築が必要である。また、本リパーゼ遺伝子をクローニングし、発現機構を検討したところ、本リパーゼ遺伝子の下流にはリパーゼ特異的分子シャペロンの遺伝子が存在しており、リパーゼの活性発現には分子シャペロンが必要である。そこで、大腸菌で高発現を達成するプラスミドの構築、発現したタンパク質の可溶化と高純度化に関する検討、分子シャペロンを用いた有機溶媒耐性リパーゼの活性化などの項目について検討する。

5. 代表的な研究成果

(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13件)

1. H. Ogino, S. Tsuchiyama, M. Yasuda, and N. Doukyu, Enhancement of the aspartame precursor synthetic activity of an organic solvent-stable protease, *Protein*

Engineering, Design and Selection **23**, 147-152 (2010). 査読有

2. T. Kawata and H. Ogino, Amino acid residues involved in organic solvent-stability of the LST-03 lipase, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **400**, 384-388 (2010). 査読有

3. T. Kawata and H. Ogino, Enhancement of the organic solvent-stability of the LST-03 lipase by directed evolution, *Biotechnology Progress* **25**, 1605-1611 (2009). 査読有

4. H. Ogino, S. Inoue, R. Akagi, M. Yasuda, N. Doukyu, and K. Ishimi, Refolding of a recombinant organic solvent-stable lipase, which is overexpressed and forms an inclusion body, and activation with lipase-specific foldase, *Biochemical Engineering Journal* **40**, 507-511 (2008). 査読有

5. H. Ogino, H. Nakayama, H. China, T. Kawata, N. Doukyu, and M. Yasuda, Characterization of recombinant glyoxylate reductase from thermophile *Thermus thermophilus* HB27, *Biotechnology Progress* **24**, 321-325 (2008). 査読有

[学会発表] (計37件)

1. H. Ogino, Development of organic solvent-tolerant enzymes, *The International Seminar on Fundamentals and Applications of Chemical Engineering (ISFACHE) 2010*, 2010年11月4日, Bali, Indonesia.

[図書] (計2件)

1. 荻野博康, 株式会社エヌ・ティー・エス, *酵素利用技術大系*, 526-530 (2010).

2. H. Ogino, Nova Science Publishers, *Protein Adaptation in Extremophiles*, 193-236 (2008).

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

1. 変異型プロテアーゼ及び該プロテアーゼを用いたペプチド合成方法, 荻野博康, 公立大学法人大阪府立大学, 特許出願2008-217928, 2008年8月27日, 国内