

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 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

研究成果の概要（和文）：

ファインケミカル製品等の製造プロセスにバイオ技術を導入することにより、これらのプロセスを環境適応型製造プロセスに転換することが可能となるが、ファインケミカル製品等の製造プロセスで溶媒として一般的に用いられている有機溶媒の存在下では、既存の生体触媒（酵素・微生物）を用いることができない。有機溶媒存在下では酵素は不安定で容易に失活するためである。そこで、有機溶媒存在下でも失活しない有機溶媒耐性生体触媒が切望されている。本研究では、酵素の有機溶媒耐性の原因解明とタンパク質工学的的手法による新規有機溶媒耐性酵素の開発および、および有機溶媒耐性酵素や有機溶媒耐性微生物を高効率で用いるための工学的研究等、以下の項目について検討した。

- (1) 酵素の有機溶媒耐性の原因解明
- (2) 有機溶媒耐性付与が望まれる酵素の遺伝子の取得
- (3) 有機溶媒耐性酵素遺伝子の発現系の構築
- (4) タンパク質工学的的手法による有用な基質特異性を有する有機溶媒耐性酵素の作成

研究成果の概要（英文）：

Enzymes are very good catalysts, because they effectively and specifically catalyze many kinds of reactions under mild conditions. Then they do not produce by-products and not consume a lot of energy. When enzyme are used as a catalyst in a chemical process, it is possible to reduce process steps, to increase yield, to reduce raw materials, waste materials, solvents, energy, equipment, utilities, production costs, environment pollution, and to increase profits and competitiveness. However, sometimes some advantages of enzymes become disadvantages. Although enzymes are active under mild condition, they are easily denatured and lose catalytic activity under extreme conditions, such as low pH, high pH and temperature, and also in the presence of organic solvents. Especially, although most fine chemicals are insoluble in water, they are soluble in organic solvents. Then organic solvent-tolerant enzymes are required as catalysts to produce fine chemicals. In this research, clarification of organic solvent-tolerance of enzymes and development of new organic solvent-tolerant enzymes using protein engineering were performed. The examined item in this research is as follows.

- (1) Understanding of the organic solvent-tolerance of enzyme
- (2) Gene cloning of the enzyme in which organic solvent tolerance is desired
- (3) Construction of the gene expression system of the organic solvent tolerant enzyme
- (4) Development of the organic solvent tolerant enzyme having useful substrate specificity by the protein engineering

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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、プロテアーゼ、プロモペルオキシダーゼ、アスパルテーム

1. 研究開始当初の背景

経済的、社会的、および環境的に十分な配慮が要求される先進国の化学産業では製品単価の安いバルク製品から製品単価の高い機能性製品やファインケミカル製品の製造に移行している。このようなファインケミカル製品の多くは複雑な構造をしており、また、極めて純度の高いものが必要とされる。一つ一つのファインケミカル製品の生産量は、バルク製品に比べ遙かに少量であるが、製品当たりの資源・エネルギー使用量や廃棄物量はバルク製品より遙かに多い。ファインケミカル製品の構造が複雑であるため、製造中に副生成物が多量に発生し、さらに、高純度にする工程や薬品を必要とするためである。ファインケミカル製品当たりの資源・エネルギーや廃棄物の量はバルク製品の数十倍にもなることも珍しくない。さらに、ファインケミカル製品の種類は極めて多いため、全ファインケミカル製品の製造に必要な資源・エネルギーや廃棄物の量は莫大である。それ故、現在の高エネルギー負荷や副産物の生成の問題等を解決し、環境負荷の抜本的低減を図るための革新的製造法の開発が必要とされている。

2. 研究の目的

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。

3. 研究の方法

(1) 酵素の有機溶媒耐性の原因解明

タンパク質工学的に有機溶媒耐性酵素を開発する、あるいは、有用な基質特異性を有した酵素への有機溶媒耐性付与を行うためには、まず、酵素の有機溶媒耐性の原因を解明することが重要である。そのためには、有機溶媒耐性酵素と既存の酵素を比較すること、あるいは有機溶媒耐性酵素を基に酵素の有機溶媒耐性の原因を解明することが最も効果的である。現在のところ、研究代表者が見出した有機溶媒耐性酵素と同程度あるいはそれ以上の有機溶媒耐性を有する酵素の発見に関する報告はない。そこで、比較生物学的手法や分子進化工学的手法による酵素の有機溶媒耐性に関与する部位・領域を同定する。

(2) 有機溶媒耐性付与が望まれる酵素の遺伝子の取得

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る。

(3) 有機溶媒耐性酵素遺伝子の発現系の構築

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、本微生物の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を試みる。

(4)タンパク質工学的的手法による有用な基質特異性を有する有機溶媒耐性酵素の作成

有機溶媒存在下ではプロテアーゼを用いた場合、加水分解の逆反応が可能となり、ペプチド合成反応が可能となる。例えば、年間世界で1万5000トン製造されているアスパルテームの前駆体は有機溶媒存在下でサーモライシンを用いることにより、製造可能である。しかし、サーモライシンの有機溶媒存在下での安定性は低い。一方、有機溶媒耐性微生物 *Pseudomonas aeruginosa* PST-01 株由来の PST-01 プロテアーゼは有機溶媒存在下で安定であるが、アスパルテームの前駆体の合成活性はサーモライシンほど高くない。これは、それぞれの酵素の基質特異性が異なることに起因すると考えられる。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する。

4. 研究成果

(1) 酵素の有機溶媒耐性の原因解明

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。

これら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おり、変異には共通するいくつかの特徴が見出された。また、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) 有機溶媒耐性付与が望まれる酵素の遺伝子の取得

高価な補酵素等を必要とせず、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 株由来の非金属型プ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、本遺伝子の発現や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) 有機溶媒耐性酵素遺伝子の発現系の構築

有機溶媒耐性微生物 *Pseudomonas aeruginosa* LST-03 株が産生する有機溶媒耐性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ことがわかった。そこで、次の項目について検討し、成果を得た。

① 大腸菌で高発現を達成するプラスミドの構築

強力な大腸菌プロモーターの下流に有機溶媒耐性リパーゼ遺伝子を配するとともに、高発現が達成されるよう遺伝子を改変した。また、分子シャペロンの発現系も構築した。

② 発現したタンパク質の可溶化と高純度化に関する検討

発現したタンパク質の局在を調べると共に、高効率な可溶化と高純度なタンパク質の取得法を検討した。

③ 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

分子シャペロンを用いた有機溶媒耐性リパーゼの高効率活性化条件について検討した。

(4) タンパク質工学的的手法による有用な基質特異性を有する有機溶媒耐性酵素の作成

酵素の基質特異性は酵素の活性中心の構造に依存するので、有機溶媒耐性微生物 *Pseudomonas 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に成功した。

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, 査読有、Vol. 23, No. 3, 2010, pp. 147-152, DOI: 10.1093/protein/gzp086
- ② T. Kawata and H. Ogino, Amino acid

residues involved in organic solvent-stability of the LST-03 lipase、Biochemical and Biophysical Research Communications、査読有、Vol. 400、No. 3、2010、pp. 384-388

DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.08.080

- ③河田拓也、井上相祐、安田昌弘、荻野博康、組換え LST-03 リパーゼの活性と安定性におよぼすカルシウムイオンの影響、化学工学論文集、査読有、Vol. 36、No. 5、2010、pp. 143-148
DOI: 10.1252/kakoronbunshu.36.143
- ④N. Doukyu and H. Ogino、Organic solvent-tolerant enzymes、Biochemical Engineering Journal、査読有、Vol. 48、No. 3、2010、pp. 270-282
DOI: 10.1016/j.bej.2009.09.009
- ⑤荻野博康、有機溶媒耐性の向上したリパーゼの開発、バイオサイエンスとインダストリー、査読無、Vol. 68、No. 3、2010、pp. 206-207
- ⑥T. Kawata and H. Ogino、Enhancement of the organic solvent-stability of the LST-03 lipase by directed evolution、Biotechnology Progress、査読有、Vol. 25、No. 6、2009、pp. 1605-1611
DOI: 10.1002/btpr.264
- ⑦荻野博康、有機溶媒耐性酵素、生化学、査読無、Vol. 81、No. 12、2009、pp. 1109-1118
- ⑧荻野博康、非水系バイオプロセスを可能にする有機溶媒耐性生体触媒、ケミカルエンジニアリング、査読無、Vol. 54、No. 10、2009、pp. 744-751
- ⑨荻野博康、有機溶媒存在下で機能する酵素、化学工学、査読無、Vol. 73、No. 7、2009、pp. 336-340
- ⑩H. 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、査読有、Vol. 40、No. 3、2008、pp. 507-511
DOI: 10.1016/j.bej.2008.01.022
- ⑪H. Ogino、H. Nakayama, H. China, T. Kawata, N. Doukyu, and M. Yasuda、Characterization of recombinant glyoxylate reductase from thermophile *Thermus thermophilus* HB27、Biotechnology Progress、査読有、Vol. 24、No. 2、2008、pp. 321-325
DOI: 10.1021/bp0702469

[学会発表] (計 49 件)

- ① H. Ogino、Development of organic solvent-tolerant enzymes、Biotrans 2011、

2011 年 10 月 4 日、Sicily, Italia

- ②H. Ogino、Development of enzymes which have high activity and high stability in the presence of organic solvents、The 6th Joint China-Japan Chemical Engineering Symposium (CJCES-6)、2011 年 6 月 22 日、Wuhan, China
- ③ H. Ogino、An organic solvent-stable protease having high peptide synthetic activity、The Asian Congress on Biotechnology 2011 (ACB-2011)、2011 年 5 月 12 日、Shanghai, China
- ④ H. Ogino、Activation of an organic solvent-stable lipase with a lipase-specific foldase and calcium ion、The 16th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC2010) Symposium、2010 年 11 月 21 日、Taoyuan, Taiwan
- ⑤ 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
- ⑥H. Ogino、Development of the high active and high stable enzyme which synthesizes aspartame precursor、The Asia Pacific Biochemical Engineering Conference 2009、2009 年 11 月 27 日、Kobe, Japan
- ⑦H. Ogino、Enhancement of activity of an organic solvent-stable lipase expressed by heterologous host、Enzyme Engineering XX、2009 年 9 月 21 日、Groningen, The Netherlands
- ⑧H. Ogino、Development of high permanence enzymes for environmentally friendly chemical processes、The 4th International Symposium on Material Cycling Engineering、2009 年 3 月 11 日、Sakai, Japan
- ⑨ H. Ogino、Development of organic solvent-stable enzymes、The 14th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC2008)、2008 年 11 月 31 日、Tokyo, Japan
- ⑩ H. Ogino、Enhancement of aspartame precursor synthesis activity of an organic solvent-stable protease、The 14th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC2008)、2008 年 11 月 31 日、Tokyo, Japan
- ⑪H. Ogino、Development of an aspartame precursor synthesis enzyme which is active and stable in the presence of organic solvents、The Tenth Japan-

China-Korean Joint Symposium on Enzyme Engineering、2008年11月3日、Busan, Korea

- ⑫T. Kawata and H. Oginō、Enhancement of the organic solvent-stability of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LST-03 by directed evolution、The Tenth Japan-China-Korean Joint Symposium on Enzyme Engineering、2008年11月3日、Busan, Korea

〔図書〕（計1件）

- ①荻野博康（分担）、株式会社エヌ・ティー・エス、酵素利用技術大系、2010、1064

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：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

発明者：荻野博康

権利者：公立大学法人大阪府立大学

種類：特許

番号：特願 2008-217928

出願年月日：2008年8月27日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 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