

自己評価報告書

平成23年 4月 1日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008~2011

課題番号：20780076

研究課題名 (和文) 不斉反応を触媒する酵素群の分子育種

: 非天然アミノ酸ケミカルライブラリーの構築

研究課題名 (英文) Molecular breeding of enzymes catalyzing the asymmetric reactions
: construction of the unnatural-amino-acids chemical library.

研究代表者

村松 久司 (MURAMATSU HISASHI)

高知大学・教育研究部総合科学系・准教授

研究者番号：90437343

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：不斉合成、タンパク質の耐熱化、非タンパク質性アミノ酸

1. 研究計画の概要

本研究課題では、①Ⅱ型リンゴ酸・乳酸脱水素酵素ファミリーに属する DpkA に分子進化工学的手法により産業用酵素としてより優れた性質を付与 (耐熱化、補酵素特異性の変換) し、作製した改良型酵素を利用して高効率な *N*-アルキル-L-アミノ酸生産システムを構築すること、②Ⅱ型リンゴ酸・乳酸脱水素酵素ファミリーに属する機能未知タンパク質の性質を明らかにし、不斉反応を触媒する新たな産業用酵素として利用する方法を開発することを主な目的としている。本研究の研究成果はⅡ型リンゴ酸・乳酸脱水素酵素ファミリーに属するタンパク質の構造機能相関に対しても新たな知見を与えるものと考えている。

2. 研究の進捗状況

改良型酵素の取得法として、研究開始当初は好熱菌由来でⅡ型リンゴ酸・乳酸脱水素酵素ファミリーに属する酵素をコードする遺伝子を用いて、DNA シャッフリング法により *Pseudomonas putida* 由来の *dpkA* 遺伝子を改良する予定であったが、同時期に実験を開始したエラープロン PCR 法による *dpkA* 遺伝子の改良で良好な実験結果が得られ始めたので、DpkA の機能改変には当初予定していなかった後者の方法を採用した。*dpkA* 遺伝子に 1~2 カ所の塩基置換が導入されるようにエラープロン PCR の条件を設定した。また、マイクロプレートリーダーを用いた耐熱型酵素のスクリーニング系を構築した。今回の研究で確立した変異導入法を用いて 2,447 株の変異酵素を発現する大腸菌を作製し、この中から野生型酵素よりも高い耐熱性を持った 2 種類 (#331、#6) の改良型

酵素の取得に成功した。野生型酵素と 2 種類の改良型酵素をカラムクロマトグラフィーで均一に精製して性質を比較した。45℃、30 分間の熱処理を行った場合、野生型酵素はほぼ完全に失活するのに対して、#331 は 35%、#6 は 74% の残存活性を示した。pH の変化に対する安定性について調べたところ、野生型酵素は pH6.5~9.0 で 80% 以上の残存活性を示したのに対して、#331 は pH5.5~10.5、#6 は pH6.0~11 で 80% 以上の残存活性を示した。基質特異性について検討したところ、野生型酵素、#331、#6 の 3 種類ともピルビン酸、フェニルピルビン酸や 2-オキソカプロン酸といった比較的大きな側鎖を持つケト酸など、様々な 2-ケト酸に作用した。一方、アミンに対しては、野生型酵素、#331、#6 の 3 種類ともメチルアミンが最も良い基質となり、アンモニアには作用しなかった。さらに、野生型酵素、#331、#6 の 3 種類とも NADPH を良い補酵素とし、NADH を補酵素とした場合にも僅かに反応は進行した。以上の結果から、*N*-メチル-L-アミノ酸合成への利用が期待される耐熱型 DpkA の作製に成功した事がわかった。

3. 現在までの達成度

③やや遅れている。

(理由)

非常に高い耐熱性を持った改良型酵素の作製に成功した事はこれまでの大きな研究成果であるが、変異型酵素の作製がランダムな変異導入による手法であり、目的達成までに当初予定していた期間よりもやや長い時間を要した。また、Ⅱ型リンゴ酸・乳酸脱水素酵素ファミリーに属する好熱菌由来の機

能未知タンパク質をコードする遺伝子のクローニングは既に行っているものの、遺伝子産物の分子機能の同定には至っておらず、若干ではあるが、当初予定したスケジュールよりも遅れが生じている。

4. 今後の研究の推進方策

本研究課題のボトルネックとなる耐熱型酵素の作製に成功したため、今後は、引き続き耐熱型酵素の分子機能解析を進めるとともに、耐熱型酵素を利用した *N*-メチル-L-アミノ酸の生産系を構築し、野生型酵素を利用した生産系と比較する予定である。また、X線結晶構造解析による立体構造の解明、あるいはホモロジーモデリングによる立体構造予測を試み、DpkA の耐熱化メカニズムについて考察する予定である。さらに、既に遺伝子クローニングを行った、II型リンゴ酸・乳酸脱水素酵素ファミリーに属する好熱菌由来の機能未知タンパク質の分子機能について生化学的な検証を試みる予定である。

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)

[学会発表] (計1件)

①松井祐士 (村松久司)、ランダム変異導入による *N*-メチル-L-アミノ酸脱水素酵素の改変、日本農芸化学会中四国支部大会、2010年9月25日、香川大学 (香川県)