

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25年 3月31日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2012

課題番号：21350096

研究課題名（和文） 構造情報と機能・配列相関の統合による酵素機能の改変

研究課題名（英文） Modification of enzyme functions by integration of conformational information and function and sequence

研究代表者

宮本 憲二 (MIYAMOTO KENJI)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号：60360111

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、研究代表者が見いだした極めて新規性の高いアリールマロン酸脱炭酸酵素をモデル酵素として用いた。そして、構造情報と性質の異なる多数の酵素の配列情報を対応づけることで、今まで不明な点が多かった構造と機能の関連性の全容解明を目的とした。そして、高精度での酵素機能の分子進化手法の開発や、従来最も困難とされていた活性向上などの機能改変を達成した。

研究成果の概要（英文）：In this application, a novel arylmalonate decarboxylase (AMDase) was used to be a model enzyme. Conformational information on various enzymes is associated with sequence information. The relativity of the structure and the function with a lot of uncertain points up to now is assumed to be clear. Based on the results, the molecular evolution technique of the enzyme function in high accuracy is developed. The function modifications of the enzyme that had been thought to be difficult were achieved.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2012年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
総計	12,400,000	3,720,000	16,120,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：アリールマロン酸脱炭酸酵素 ラセマーゼ 機能改変 活性向上 立体構造

1. 研究開始当初の背景

バイオインフォマティクスの目覚ましい進歩により、酵素の立体構造や基質との結合予測が可能になってきた。しかし、構造情報のみを利用して酵素の安定性、選択性や活性などの機能を改良することは困難である。なぜなら、機能改変のためには構造情報だけでなく、構造と酵素機能の相関情報が必要不可欠だからである。しかし、構造と機能の関連性は未だ解明されていない点が多いことから、機能改変にはランダム変異が多用されて

きた。そこで研究代表者は、極めて新規性の高いアリールマロン酸脱炭酸酵素（以下AMDase）の探索を継続して実施し、複数の性質の異なる酵素とその配列情報を得ることに成功した。

更に、AMDaseのX線結晶構造解析により詳細な構造情報を得ることに成功し、酵素機能と構造(配列)の関連性を統合・深化することがまさに可能となった。本研究課題では、このAMDaseをモデル酵素として、構造情報と性質の異なる多数の酵素の配列情報の

対応づけを行う。そして、構造と機能の関連性の全容解明を目的とする。そして、その結果をもとに高精度での酵素機能の分子進化手法の開発や、従来最も困難とされていた活性向上などの機能改変を試みる。

2. 研究の目的

以下の4点をサブテーマとして、従来理解の遅れていた酵素の構造と機能の関連性の解明と、その情報を用いた有効酵素の創出を目指す。

(研究課題1) AMDase の反応メカニズム解析とマリンエンザイム

(研究課題2) 構造情報を用いた酵素活性の向上

(研究課題3) 構造・配列情報の統合理解による至適 pH の改変と応用

(研究課題4) 新規ラセマーゼの創出

まず研究課題1で、今まで謎であったAMDaseの反応メカニズムを解明する。そして、機能改変に向けた基礎となる情報を集める。次いで研究課題2において、酵素の機能改変に於いて最も困難な課題とされてきた触媒活性の向上を目指す。変異導入による酵素の機能改変は、一般的な手法である。しかし、変異導入後の酵素は、野生型と比較して酵素活性が大幅に低下することが、問題となっていた。合理的デザインにより酵素活性が向上できれば、酵素の機能改変の研究に於いて非常に有用な情報を提供できると考える。研究課題3では、各酵素に特有の性質である至適 pH の改変を試みる。複数の酵素を組み合わせることで反応を行う場合、至適 pH が一致せず反応を最も効率的な条件で行えないことが多い。至適 pH を自由に改変できれば、非常に有効な手段にあると考える。最後の研究課題4では、脱炭酸酵素から人為的に創り出したラセマーゼの機能改変を実施する。このラセマーゼは、自然界に存在しないユニークな活性を持つものである。そこで、実用化を目指して、活性の向上や基質特異性の拡張を行う。

3. 研究の方法

1) AMDase の反応メカニズム解析とマリンエンザイム

X線結晶構造解析により決定したAMDaseの立体構造を参照とし、反応に関与する残基を特定して機能改変のための基礎となる情報を得る。また、今まで対象としてきた土壌細菌とは異なった性質を持つと考えられる海洋微生物から、「新規海洋酵素 (マリンエンザイム)」の分離・解析を試みる。

2) 構造情報を用いた酵素活性の向上

AMDase の基質進入経路上には、基質の接近を妨げる残基やループが存在している。そこ

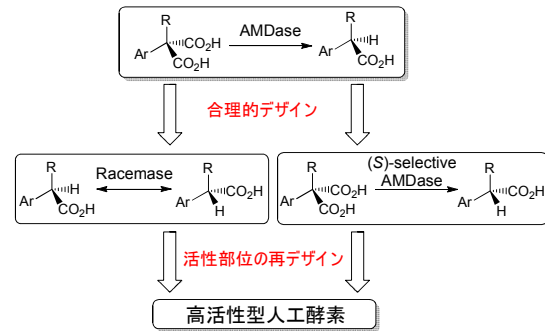
で、これら残基の改変やループ長の最適化により、一般的に非常に困難な課題である酵素活性の向上を目指す。そして得られる知見を、活性は著しく低い有用性の極めて高い二重変異体 (G74C/C188S) に適用し、100 倍程度の高活性化を目指す。

3) 構造・配列情報の統合理解による至適 pH の改変と応用

申請者らが新たに発見した酸性に至適 pH を持つ AMDase と、中性付近に至適の AMDase のアミノ酸配列を比較し、変異実験により至適 pH の改変を試みる。pH がシフトした変異体は、X線結晶構造解析を行いその要因を探る。

4) 新規ラセマーゼの創出

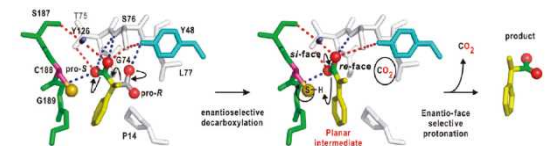
変異体 (G74C) は、カルボン酸を効率的にラセミ化することを見いだしている。しかし、カルボン酸は通常目的物でありラセミ化させても生産プロセス上あまり意味はない。そこで、合成前駆体であるエステルに作用して、カルボン酸には作用しない エステルラセマーゼへの改変を試みる。



4. 研究成果

1) AMDase の反応メカニズム解析とマリンエンザイム

AMDase の立体構造から、活性発現に関与していると考えられるアミノ酸を推定し、アラニンに置換した変異体を作成し活性を測定した。その結果、P14A、T75V、S76A、Y126A 変異体では、完全に脱炭酸活性が消失した。したがって、これらのアミノ酸残基が活性発現に関与していることが強く示唆された。



また、石垣島のリーフより採集した微生物から海洋性の AMDase のクローニングに初めて成功し、その諸性質を明らかとした。その結果、土壌より単離した酵素と比較して 90% 程度の配列が一致していた。また、Km 値は海洋性 AMDase の方が良い値を示したが、

安定性は海洋性の方が低かった。

2) 構造情報を用いた酵素活性の向上

反応メカニズムおよび立体構造を参考に活性の低かった S 体選択的 AMDase の活性向上を試みた。迅速にスクリーニングを行う為に、96 穴プレートを用いたスクリーニング系を構築した。その系を用いて反応のトリガーである疎水性ポケットについて変異を導入したところ、約 920 倍と劇的に脱炭酸活性の向上した変異体の取得に成功した。この変異体は、非ステロイド系抗炎症剤として有用な S 体のナプロキセンの生産に有効であり、特許出願を行った。

Variant	Specific activity (U/mg)	K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹)	Relative activity (%)
G74C/C188S	0.040	7.5	0.020	1.0
G74C/C188G	0.10	3.3	0.050	5.6
G74C/C188G/M159L	6.20	5.9	3.3	207
G74C/C188G/M159L/Y48F	24.0	4.6	14.9	920

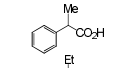
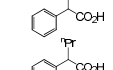
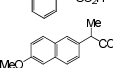
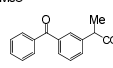

また、活性の向上した変異体の中から、フェニルメチルマロン酸に対して高い活性を示す変異体 (G74C/V156I/M159L/C188G) に対して、2 カ所同時変異を導入した。具体的には、疎水性ポケットを構成する Va143 と、疎水性ポケットでは無いが Va143 の近傍に存在する A1a125 に対して、2 カ所に対して同時に変異を導入した。そして、高速スクリーニングを行ったところ、活性が数倍向上した変異体の取得に成功した。シークエンスにより配列確認を行ったところ、V43M/G74C/A125P/V156L/M159L/C188G であることがわかった。現在、酵素学的諸性質の解析を行っており、まとめ次第論文発表を行う予定である。

3) 構造・配列情報の統合理解による至適 pH の変更と応用

C 末端配列に変異導入を行い最適 pH のシフトを試みたが、目的とする変異体を得ることはできなかった。

4) 新規ラセマーゼの創出

反応メカニズムを参考として AMDase より創出したラセマーゼの活性向上と基質特異性の拡張を行った。その結果、脱炭酸酵素活性はほぼ消失し、ラセミ化活性の向上した完全な人工ラセマーゼの創出に成功した。この変異体を様々な基質に対して作用させたところ、ケトプロフェンでは 33 倍もの活性向上を達成した。また、従来基質とならなかった α 位にプロピル基を持つような嵩高い化合物についても、ラセミ化を行うことが可能となり基質特異性の拡張にも成功した。

Substrate	Relative activity (%)		Activity increase (fold)
	G74C	G74C/N43A	
	100	183	1.8
	8	40	5.0
	0	0.7	∞
	770	2100	2.7
	1.5	50	33

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 5 件)

- ① R. Kourist, Y. Miyauchi, D. Uemura and K. Miyamoto, Engineering the Promiscuous Racemase Activity of an Arylmalonate Decarboxylase, *Chemistry-A European Journal*, 17, 557-563 (2011) (査読有)
- ② R. Kourist and K. Miyamoto, Protein engineering of Arylmalonate Decarboxylase G74C, an artificial racemase, *Biotech international*, February/March, 23, 6-11 (2011) (査読無)
- ③ 宮本憲二、アリアルマロン酸脱炭酸酵素の機能改変、酵素工学研究会「酵素工学ニュース」トピックス、64, 5-10(2011) (査読無)
- ④ R. Kourist, P. Domínguez de María and K. Miyamoto, Biocatalytic strategies for the asymmetric synthesis of profens – recent trends and developments, *Green Chemistry*, 13, 2607-2618 (2011) (査読有)
- ⑤ Y. Miyauchi, R. Kourist, D. Uemura and K. Miyamoto, Dramatically improved catalytic activity of an artificial (S)-selective arylmalonate decarboxylase by structure-guided directed evolution, *Chemical Communications*, 47, 7503-7505 (2011) (査読有)

[学会発表] (計 20 件)

- ① 榎純一、宮内祐介、吉田昭介、宮本憲二、合理的デザインによる変異酵素の劇的活性向上、日本化学会第 93 春季年会(2013)、2013 年 3 月 22~25 日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス
- ② 宮本憲二、自然界に存在しない酵素を創りだし、性能を向上する、新規素材探索研究会、2012 年 6 月 8 日、新横浜フジビューホテル (新横浜)

- ③ 榎純一、宮内祐介、吉田昭介、宮本憲二、Directed evolutionによるアリアルマロン酸脱炭酸酵素の酵素活性向上、第16回生体触媒化学シンポジウム、2012年11月29日、富山県民会館
- ④ Kenji Miyamoto、Dramatically improved catalytic activity of an artificial (S)-selective arylmalonate decarboxylase by directed evolution、Gordon research conference、2012年7月8-13日、Bryant University (USA)
- ⑤ 九門孝志、和田玲奈、吉田昭介、宮本憲二、好熱性古細菌由来エステラーゼを用いた不斉ドミノ型反応の開発と選択性の向上、日本化学会第92春季年会(2012)、2012年3月27日、慶應義塾大学(横浜)
- ⑥ KOURIST Robert、吉田昭介、宮本憲二、非天然化合物に作用するラセマーゼの創製と機能向上、日本化学会第92春季年会(2012)、2012年3月27日、慶應義塾大学(横浜)
- ⑦ 榎純一、宮内祐介、吉田昭介、宮本憲二、S体選択的アリアルマロン酸脱炭酸酵素変異体の活性向上、日本化学会第92春季年会(2012)、2012年3月27日、慶應義塾大学(横浜)
- ⑧ 宮内祐介、ロバート・コウリスト、榎純一、吉田昭介、宮本憲二、活性部位の再デザインによるアリアルマロン酸脱炭酸酵素変異体の機能向上、第15回生体触媒化学シンポジウム、2011年12月22日、慶應義塾大学薬学部(芝共立キャンパス)
- ⑨ Kenji Miyamoto、Dramatically improved catalytic activity of an artificial (S)-selective arylmalonate decarboxylase by structure-guided directed evolution、16th Japanese-German Workshop on Enzyme Technology、2011年9月14日、富山国際会議場
- ⑩ 九門孝志、和田玲奈、ロバートコウリスト、上村大輔、宮本憲二、耐熱性古細菌由来エステラーゼを用いた不斉ドミノ型反応の開発と選択性の向上、日本化学会第91春季年会、2011年3月26日、神奈川大学(横浜)
- ⑪ ロバートコウリスト、上村大輔、宮本憲二、アリアルマロン酸脱炭酸酵素の機能改変によるラセマーゼの創製、日本化学会第91春季年会、2011年3月26日、神奈川大学(横浜)
- ⑫ R. Kourist, Y. Miyauchi, K. Miyamoto、Protein engineering of arylmalonate decarboxylase variants with promiscuous racemising activity、Dechema Jahrestagung der Biotechnologen、2010年9月22日、Aachen (Germany)
- ⑬ Kenji Miyamoto、Asymmetric Decarboxylation by Arylmalonate Decarboxylase and Thermostable Esterase, Gordon Research Conference (Biocatalysis) 2010年7月14日 Bryant University (USA)
- ⑭ R. Kourist, K. Miyamoto、Protein engineering of Arylmalonate Decarboxylase G74C, a cofactor-independent racemase, Pafichem2010, 2010年12月18日、Hawaii (USA)
- ⑮ Y. Miyauchi, R. Kourist, D. Uemura, K. Miyamoto、Structure-Guided Site-directed Mutagenesis of Arylmalonate Decarboxylase, Pafichem2010, 2010年12月18日、Hawaii (USA)
- ⑯ T. Kumon, R. Wada, K. Miyamoto, D. Uemura, Asymmetric Domino Reaction by an Esterase from Sulfolobus tokodaii Strain 7, Pafichem2010、2010年12月18日、Hawaii (USA)
- ⑰ R. Kourist, Y. Miyauchi, K. Miyamoto、Protein engineering of arylmalonate decarboxylase variants with promiscuous racemising activity、Biocat2010、2010年9月1日、Hamburg (Germany)
- ⑱ 宮内祐介、宮本憲二、太田博道、上村大輔、アリアルマロン酸脱炭酸酵素の機能改変、第14回生体触媒化学シンポジウム、2010年9月24日、グランシップ静岡(静岡)
- ⑲ 和田玲奈、太田博道、宮本憲二、上村大輔、好熱性個最近由来エステラーゼを用いた新規ドミノ型反応の開発、日本化学会第90春季年会、2010年3月28日、近畿大学
- ⑳ 和田玲奈、太田博道、宮本憲二、上村大輔、好熱性古細菌由来エステラーゼ ST0071 を用いた新規ドミノ型反応の開発、第13回生体触媒化学シンポジウム、2009年12月3日、香川大学

〔図書〕(計1件)

Kenji Miyamoto, Robert Kourist, Shosuke Yoshida, Hiromichi Ohta, WILEY, Asymmetric decarboxylation of arylmalonates and racemization of profens by arylmalonate decarboxylase and its variants, Practical Methods for Biocatalysis and Biotransformations 2 (2012), 274-280.

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：S 体選択的高活性型変異型アリアルマ
ロン酸脱炭酸酵素
発明者：宮本憲二
権利者：慶應義塾
種類：特願
番号：2011-43085
出願年月日：2011年2月
国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bio.keio.ac.jp/labs/kmiyamoto/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 憲二 (MIYAMOTO KENJI)
慶應義塾大学工学部・准教授
研究者番号：60360111

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし