

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550180

研究課題名(和文) ペプチド分解酵素を提示した全細胞触媒の創出と ポリアスパラギン酸合成への応用

研究課題名(英文) Cell surface display of beta-peptide hydrolase and its application for beta-poly(Asp) synthesis

研究代表者

平石 知裕 (HIRAISHI, TOMOHIRO)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・専任研究員

研究者番号：20321804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新奇な酵素である ペプチド分解酵素(PahZ1)を提示した全細胞触媒を作製し、これを利用した高効率な ポリアスパラギン酸( $\beta$ -PAA)合成法の開発を目指した。本研究により、PahZ1の基質認識機構に関する詳細な知見が得られ、これに基づいた進化学によって本酵素の優良変異体を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop the effective beta-poly(Asp) (beta-PAA) synthesis system by using whole-cell biocatalyst expressing PahZ1. The present results provided the detailed information about the substrate recognition of the enzyme. On the basis of this finding, we conducted the directed evolution of PahZ1 for the improvement of its function.

研究分野：複合新領域

キーワード：ペプチド ポリアスパラギン酸 分解酵素 細胞表層工学 酵素合成 進化学

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 熱重合ポリアスパラギン酸(tPAA)の構造と性質

化石資源由来のポリアクリル酸は、水溶性機能性ポリマーとして長年使用されてきている。しかしながら、その非バイオマス・非生分解性といった性質から、これに代わる代替バイオポリマーの開発が望まれている。その一つとして、生分解性を有する水溶性バイオポリマーであるポリアミノ酸が挙げられる。特に熱重合ポリアスパラギン酸(tPAA)は、L-Asp を原料として化学的に合成することにより、大量かつ安価に得られるプロセスが確立されている。この tPAA は、分子内に様々なイレギュラー構造を有していることが知られており、70%のβペプチド、50%のD体ユニットを含むことが大きな特徴の一つである。

### (2) tPAA の生分解とβペプチド分解酵素の発見

これまで、tPAA の合成法および構造・物性に関して数多くの報告がある。一方、その生分解機構に関しては、活性汚泥等による生分解に関するものばかりであり、単一微生物・単一酵素による分解機構に関する知見はなかった。そこで我々は、分解微生物・酵素の単離とそれらによる tPAA 生分解に関する研究に取り組んできた。その結果、βペプチドの連鎖のみを認識して分解するβペプチド分解酵素(PahZ1)を世界で初めて発見した(Biomacromolecules 2003, 4, 80-86, Macromol. Biosci., 2009, 9, 10-19)。

### (3) βポリアスパラギン酸(β-PAA)の合成

一般に、ポリマーの機能を最大限に発揮するには、ユニット構造を精密に制御することが重要である。例えば、βペプチドのみから構成されるβポリアスパラギン酸(β-PAA)を合成できれば、易分解性を改良した材料として代謝耐性が必須である生体内での利用が期待できる。

現在、β-PAA は固相合成法や NCA 法により得られる。しかしながら、前者は分子量が高くなるのに伴って高コスト化・合成困難となる。後者は有毒なホスゲンを用いるため、いずれも好ましい合成方法とは言えないことから新しい合成法が開発が望まれている。

一方、酵素によるバイオポリマー合成では、加水分解酵素を利用したプロセスが提案されている。その中でも、プロテアーゼを利用したポリアミノ酸合成は代表例である。これらの視点から、我々は PahZ1 の基質特異性を利用すれば β-PAA の創製につながると考えた。そこで、触媒として PahZ1 を、モノマーとして L-Asp ジエチルエステルを用い、β-PAA 合成を行った(Macromol. Biosci. 2011, 11, 187-191)。48 時間反応を行い、得られたポリマーを解析したところ、その構成成分は全て βペプチドであったが、その分子量は

2,000 程度にとどまっていることが分かった。

この系では多量の精製酵素が必要な上、酵素の再利用が出来ない欠点があった。さらに本反応は、有機溶媒中での比較的長時間の反応であるため、酵素を安定して長時間使用できることが重要である。また、得られた β-PAA の分子量が 2000 程度であるため、酵素活性化によるポリマー高分子量化が望ましい。これらのことから、我々の系は有望ではあるが、反応系の抜本的な改良が必須と言えた。

### (4) 細胞表面工学による全細胞触媒の創成

細胞表面工学技術は、大腸菌上に酵素を提示することで大腸菌を全細胞触媒に変えることができる。得られた全細胞触媒は、自己増殖能・細胞毒性回避・酵素安定化・酵素精製不要といった優れた性質を有する。我々は、これまでにポリヒドロキシブタン酸(PHB)分解酵素を大腸菌表面に提示し、この全細胞触媒が PHB 分解反応に使用可能であることを明らかにした(Macromol. Biosci. 2012, 12, 218-224)。さらに我々は、この系を応用して PHB 分解酵素の分子進化に取り組んでおり、予備的ではあるものの優良変異酵素の取得に成功している。しかし、この酵素提示技術が他の分解酵素にも適用できるかどうかは分かっていなかった。

## 2. 研究の目的

地球環境問題と資源有効利用の両面から、バイオマスを原料とし、生物由来である酵素を触媒としたバイオポリマー製造技術の開発が望まれる。我々が最近発見した PahZ1 は、反応の可逆性から L-Asp から新奇なポリマーである β-PAA を合成できる。一方、細胞表面工学技術は、酵素を細胞表面へ提示することで、細胞を自己増殖可能な全細胞触媒へと変えることができる。そこで本研究では、本酵素を大腸菌表面に提示し、全細胞触媒の有する優れた能力(自己増殖能・細胞毒性回避・酵素安定化等)を利用した β-PAA 合成法を開発を目指した。さらに、進化学による酵素の高性能化を行い、本系の効率化を目的とした。具体的項目を以下に示す。

### (1) PahZ1 の大腸菌細胞表面への提示技術の構築

これまでの予備実験の結果、PHB 分解酵素を活性状態で大腸菌表面に提示できている(Macromol. Biosci. 2012, 12, 218-224)。そこで、PahZ1 を大腸菌表面に提示させ、β-PAA 合成及び PahZ1 の進化学に使用可能な全細胞触媒の作製を行う。

### (2) ハイスループットな PahZ1 の進化学システムの構築

一般に、酵素によるポリアミノ酸の分解および合成反応では、ポリアミノ酸-酵素複合体の形成過程が重要であると考えられる。従って、高い分解活性を示す分解酵素は、ポリア

ミノ酸-酵素複合体の形成能も高く、更には高いポリアミノ酸合成活性を有しているものが多いと考えられる。この考えは PahZ1 にも適用できると推察され、本酵素の分解能強化は  $\beta$ -PAA 合成能向上を導くと予想される。そこで、「ランダム変異誘発・飽和変異導入・DNA 再構築」を基盤とするハイスループットな本酵素の進化工学システムを構築する。

### (3) 高性能化 PahZ1 の創出

(2) で構築した進化工学システムを用いた本酵素の進化工学を実施し、高活性化された酵素変異体の獲得を目指す。得られた複数の高性能化 PahZ1 では、それぞれ異なる「ホットスポット」部位でアミノ酸変異が生じていることが予想されるため、これら優良変異を組み合わせて  $\beta$ -PAA 合成に最適な酵素を作製する。

## 3. 研究の方法

### (1) PahZ1 の大腸菌細胞表層への提示技術の構築

*Pseudomonas* 由来膜タンパク質の C 末端側に PahZ1 が連結するように融合タンパク質を設計し、その融合タンパク質遺伝子を大腸菌発現ベクターに導入した。次に、PahZ1 の細胞表層での局在を免疫蛍光顕微鏡で観察した。次いで、提示された PahZ1 の分解活性を  $\beta$ -L-Asp3 量体の分解により評価した。

### (2) ハイスループットな PahZ1 の進化工学システムの構築

「ハイスループットな PahZ1 の進化工学システムの構築」に当たって重要なファクターの一つである基質の選択に関する研究を行った。これまでの研究から、PahZ1 は  $\beta$ -Asp ユニット間のペプチド結合を認識することが分かっているが、その光学異性体認識に関する知見は得られていない。そこで、PahZ1 の光学異性体基質認識に関する詳細な知見を得ることを目的として、D 体及び L 体の様々な連鎖を有する  $\beta$ -Asp3 量体を設計し、精製した本酵素による酵素分解反応を行った。

また、細胞表層提示系では酵素発現量及び活性が、ハイスループットスクリーニングには不十分な可能性が生じたため、pET システムによるスクリーニング系の構築も行った。

### (3) 高性能化 PahZ1 の創出

(2) で構築した進化工学システムを用いた PahZ1 の進化工学を実施した。まず、PCR を利用して PahZ1 遺伝子にランダム変異を誘発し、変異 PahZ1 の集団(1st 変異体ライブラリー)を作製した。次いで、組換え大腸菌内に変異 PahZ1 を発現させた。その際には、マイクロプレート上に 1 細胞/1 ウェルとなるように大腸菌を接種した。最後に、変異 PahZ1 を発現した大腸菌による分解活性を測定し、活性が上昇した変異体の取得を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) PahZ1 の大腸菌細胞表層への提示技術の構築

目的酵素である PahZ1 が従来の活性を維持したまま、大腸菌表層へ提示されることが、本研究を遂行する上で最も重要である。そこでまず、PahZ1 にも Opr1 を利用した系を適用し、 $\beta$ -PAA 合成および PahZ1 の進化工学に使用可能な全細胞触媒の作製を行った。その結果、PahZ1 を大腸菌表層へ提示させることに成功し、その局在を免疫蛍光顕微鏡法により確認した。次に、PahZ1 を提示した大腸菌の  $\beta$ -L-Asp3 量体に対する分解活性を評価したところ、分解活性を確認することが出来なかった。その原因として、提示した酵素の活性及び発現量が十分でなかったことが考えられた。

### (2) ハイスループットな PahZ1 の進化工学システムの構築

進化工学システムに使用する酵素基質に関する知見を得るため、L 体及び D 体の全ての組合せを有する 8 種類の  $\beta$ -Asp3 量体をデザインし、PahZ1 による分解反応を行った。その結果、本酵素の活性中心について以下のことが分かった：①PahZ1 の活性中心は少なくとも 4 つのサブサイト(2, 1, -1, -2)からなる、②サブサイト 1 は L 体のみを認識し、他のサブサイトは DL 体いずれも認識できる、③中央二つのサブサイト(サブサイト 1 及び-1)にとって(L-Asp)-(D-Asp)の連鎖が最も好ましい連鎖である。従って、 $\beta$ -PAA 合成では L-Asp のジエチルエステル体を基質とすることから、 $\beta$ -PAA 合成の効率化にはサブサイト 2, -1, -2 で L-Asp の認識能を高める必要があることが示唆された。

上述のように、PahZ1 を提示した大腸菌を用いた系では、十分な分解活性がみられなかったことから、新たなスクリーニング系の構築を試みた。その結果、高活性な PahZ1 の効率発現が可能である pET システムによるスクリーニング系を構築したところ、PahZ1 の進化工学に適用可能であることが分かった。

### (3) 高性能化 PahZ1 の創出

前項で構築した「ハイスループットな PahZ1 の進化工学システム」を用いて、PahZ1 の進化工学を実施した。まず、ランダム変異導入によって変異酵素ライブラリーを作製した。次いで、 $\beta$ -L-Asp3 量体分解活性を指標として第 1 次スクリーニングを行った。その結果、第 1 世代の変異酵素群から、野生型に比べ分解活性が向上しているものが数クローン得られた。今後これらの解析を行い高活性化の要素因子を解明して、高い  $\beta$ -PAA 合成活性を有する生体触媒開発につなげていきたい。

## 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 4 件)

①T. Liu Tzea, T. Hiraishi, K. Sudesh, and M. Maeda  
Effects of mutation at position 285 of *Ralstonia pickettii* T1 poly[(R)-3-hydroxybutyrate] depolymerase on its activities  
Appl. Microbiol. Biotechnol., 2014, 98, 7061-7068.(査読有)  
DOI: 10.1007/s00253-014-5660-4

②T. Liu Tzea, T. Hiraishi, K. Sudesh, and M. Maeda  
Directed evolution of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] depolymerase using cell surface display system: Functional importance of asparagine at position 285  
Appl. Microbiol. Biotechnol., 2013, 97, 4859-4871.(査読有)  
DOI: 10.1007/s00253-012-4366-8

③Y. Kikkawa, M. Fukuda, N. Ichikawa, A. Kashiwada, K. Matsuda, M. Kaneshato, and T. Hiraishi  
Tuning the enzymatic hydrolysis of biodegradable polyesters and its application to surface Patterning  
J. Mater. Chem. A, 2013, 1, 4667-4670. (査読有)  
DOI: 10.1039/c3ta01670f

④T. Hiraishi, K. Yamashita, M. Sakono, J. Nakanishi, T. Liu Tzea, K. Sudesh, H. Abe, and M. Maeda  
Display of functionally active PHB depolymerase on *Escherichia coli* cell surface  
Macromol. Biosci., 2012, 12, 218-224.(査読有)  
DOI: 10.1002/mabi.201100273

〔学会発表〕(計 7 件)

①平石知裕、久野玉雄、阿部英喜、城宜嗣、前田瑞夫  
*Pedobacter* sp. KP-2 由来ポリアスパラギン酸分解酵素の構造と機能  
第 63 回高分子討論大会、長崎・長崎大学、2014 年 9 月 24-26 日

②久野玉雄、平石知裕、南皓介、榎田エリ子、阿部英喜、前田瑞夫、城宜嗣  
ポリアスパラギン酸分解酵素の結晶構造  
第 63 回高分子討論大会、長崎・長崎大学、2014 年 9 月 24-26 日

③平石知裕、前田瑞夫  
*Pedobacter* sp. KP-2 由来ポリアスパラギン酸分解酵素のオリゴアスパラギン酸分解  
第 63 回高分子学会年次大会、名古屋・名古屋国際会議場、2014 年 5 月 28-30 日

④T. Hisano, T. Hiraishi, K. Minami, E. Masuda, H. Abe, M. Maeda, and Y. Shiro  
Crystal structure of poly- $\beta$ -aspartate hydrolase from *Pedobacter* sp. KP-2  
International Conference on Bio-based Polymers (ICBP 2013), Seoul, Korea, 25-28 Sep. (2013)

⑤久野玉雄、平石知裕、南皓介、榎田エリ子、阿部英喜、前田瑞夫、城宜嗣  
ポリ- $\beta$ -アスパラギン酸分解酵素とオリゴマー基質との複合体の結晶構造  
第 36 回日本分子生物学会年会、神戸・神戸ポートアイランド、2013 年 12 月 3-6 日

⑥久野玉雄、平石知裕、南皓介、榎田エリ子、阿部英喜、前田瑞夫、城宜嗣  
ポリアスパラギン酸分解酵素の結晶構造解析  
日本結晶学会平成 25 年度年会、熊本・熊本大学、2013 年 10 月 12-13 日

⑦久野玉雄、平石知裕、南皓介、榎田エリ子、阿部英喜、前田瑞夫、城宜嗣  
ポリアスパラギン酸分解酵素の結晶構造解析  
第 13 回日本蛋白質科学会年会、鳥取・とりぎん文化会館、2013 年 6 月 12-14 日

〔図書〕(計 1 件)

①T. Hiraishi, and S. Taguchi  
Protein engineering of enzymes involved in bioplastic metabolism, Protein engineering - Technology and application, InTech, 2013, pp. 133-165.

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.riken.jp/lab-www/bioengineering/index.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者  
平石知裕 (HIRAISHI TOMOHIRO)  
理化学研究所・前田バイオ工学研究室・専任研究員  
研究者番号：20321804

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし