

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410172

研究課題名(和文) タンパク質分子表面改変に基づく新規poly-extremozymeの創製

研究課題名(英文) Creation of novel poly-extremozymes by modifying protein surfaces

研究代表者

中村 聡 (NAKAMURA, SATOSHI)

東京工業大学・生命理工学研究科・教授

研究者番号：50227899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：GHファミリー11アルカリキシラナーゼXynJの分子表面への塩基性アミノ酸の導入により、耐アルカリ性、耐熱性および耐塩性が向上した。また、GHファミリー18耐塩キシナーゼChiN1の分子表面への酸性アミノ酸の導入により、耐塩性ないし有機溶媒耐性が向上した。一方、GHファミリー10超耐熱性キシラナーゼXynTBについては、進化分子工学による耐アルカリ性および比活性の向上に成功した。

研究成果の概要(英文)：Alkalitolerancy, thermotolerancy and halotolerancy of a GH family 11 alkaline xylanase, XynJ, were improved by introducing basic amino acids on its protein surface. Halotolerancy and organic solvent-tolerancy of a GH family 18 halotolerant chitinase, ChiN1, were improved by introducing acidic amino acids on its protein surface. Alkalitolerancy and specific activity of a GH family 10 hyper-thermotolerant xylanase, XynTB, were improved by directed evolution.

研究分野：生体関連化学

キーワード：極限環境微生物 極限酵素 分子表面電荷 タンパク質工学 進化分子工学 極限環境耐性 比活性

1. 研究開始当初の背景

極限環境微生物が生産する酵素「極限酵素」は極限条件において機能する。極限酵素の極限環境耐性機構については不明な点が多いが、タンパク質分子表面のアミノ酸が極限環境耐性に大きな影響を及ぼしている例が少なくない。酵素機能の向上を考えた場合、触媒部位近傍の改変が有効であることは言うまでもないが、極限環境耐性の向上と引き替えに触媒活性そのものを損なう危険性も秘めている。一方で、触媒部位から遠く離れた分子表面の改変によって触媒活性が損なわれる可能性は低く、極限環境耐性付与と触媒活性維持の両立が可能と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では極限酵素の分子表面アミノ酸に注目し、極限酵素がもつ固有の極限環境耐性発現の分子機構を解明し、耐アルカリ性・耐熱性・耐塩性の分子機構における普遍性と独立性を調べた上で、複数の極限環境耐性を有する新規極限酵素(poly-extremozyme)を創製することを目的とする。

3. 研究の方法

各種発現型プラスミドは、いずれも pET-21b(+)ベクター (Novagen) を用いて作製した。

部位特異的変異導入には、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) を使用した。

エラープローン PCR には GeneMorph II Random Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) を使用した。xynTB 遺伝子に対してランダム変異を施し、Megaprimer PCR of whole plasmid (MEGAWHOP)法によりベクター部分の DNA 鎖を合成した。制限酵素 Dpn I 処理により鑄型プラスミドを消化した後、大腸菌 BLR(DE3) 株に形質転換し、ランダム変異ライブラリーを構築した。

4. 研究成果

アルカリキシラナーゼ、耐塩キチナーゼおよび超耐熱キシラナーゼの分子表面に荷電アミノ酸(塩基性および酸性アミノ酸)を導入した各種変異型酵素を調製し、耐アルカリ性・耐熱性・耐塩性を調べることで、分子表面電荷と各種極限環境耐性との関連性を明らかにした。また、超耐熱キシラナーゼの進化分子工学検討により、耐アルカリ性および比活性

の向上に成功した。以下に、研究成果を項目毎に概説する。

(1) アルカリキシラナーゼの極限環境耐性に及ぼす荷電アミノ酸導入の効果

キシランはキシロースが β -1,4 結合で直鎖状に連なった多糖であり、その β -1,4 結合を加水分解する酵素がキシラナーゼである。好アルカリ性 *Bacillus* sp.41M-1 株由来アルカリキシラナーゼ (XynJ) は GH ファミリー 11 に属するマルチドメイン酵素である。

ある種の強アルカリ酵素は、通常アルカリ酵素に比して、分子表面に塩基性アミノ酸である Arg を多く含むことが指摘されている。このことを受け XynJ の触媒ドメイン領域のみからなる欠失型酵素を基盤として、分子表面に 5 つの Arg を導入した変異型酵素 R5 が調製された。性質検討の結果、R5 は耐アルカリ性化ならびに耐熱化していることが明らかになった。また、分子表面の電荷がタンパク質の耐塩性を担うともいわれているため、R5 の Arg のかわりに、Lys, Asp, Glu を導入した変異型酵素 K5, D5, E5 がそれぞれ調製され、性質検討がなされた。しかしながら、分子表面電荷と耐塩性、耐アルカリ性、耐熱性との関連は不明であった。

ホフマイスター系列は水溶液系の物理現象に及ぼす各イオンの影響力の序列である。本研究では、分子表面に過剰な電荷を導入した変異型酵素を用い、種々のホフマイスター塩効果を調べることにした。

分子表面に過剰な電荷を導入した変異型酵素に対する各種塩の影響

pH 5.5 および 7.0 では、分子表面に導入した過剰の塩基性アミノ酸の正電荷が耐塩性に重要な役割を果たす可能性が考えられた。また、正電荷が弱まる pH 8.5 においては、分子表面の正電荷のみならず、Arg の存在自体も耐塩性に寄与していることが示唆された。分子表面に多くの酸性アミノ酸を含むことで耐塩性を獲得していると考えられている高度好塩性古細菌タンパク質の場合とは異なり、分子表面に導入した過剰な負電荷は耐塩性向上には寄与しないことがわかった。野生型酵素および各種変異型酵素の相対活性は、塩溶液に含まれるアニオンのホフマイスター系列とは逆の傾向を、塩溶液に含まれるカチオンのホフマイスター系列に準じる傾向を示した。

種々の残基数の Arg を導入した変異型酵素に対する各種塩の影響

R5 に導入した Arg の影響を詳細に調べるため、R5 の 5 つの Arg のうち 2 つないし 3 つの Arg のみを導入した変異型酵素 R2 および R3 を用いて各種塩溶液中における塩濃度依存性を測定した。NaI 溶液中における相対

活性向上には、R2 に導入した 2 残基両方の Arg 導入が必要であることがわかった。また、NH₄I および NH₄Cl 溶液中における相対活性向上のためには、R5 に導入した 5 残基すべての Arg の導入が必要であると考えられた。

(2) 耐塩キチナーゼの各種極限環境耐性に及ぼす荷電アミノ酸導入の効果

キチンは N-アセチル-D-グルコサミンが β-1,4 グリコシド結合で直鎖状に連なった多糖であり、その β-1,4 結合を加水分解する酵素がキチナーゼである。高度好塩性古細菌 *Halobacterium salinarum* NRC-1 株のゲノム上にキチナーゼ遺伝子 (*chiN1*) が見出され、高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* における高効率分泌発現に成功している。この系によって発現される組換えキチナーゼ (*ChiN1*) は、1 M 以上の NaCl 存在下において安定であることが明らかとなっている。

一般に、高度好塩性古細菌が生産する耐塩タンパク質は酸性アミノ酸含量が高いという特徴をもつ。すなわち、分子表面の酸性アミノ酸のもつ電荷が溶媒の水分子を強固に保持し、水分含量の少ない環境でも活性を維持することができると考えられている。また、分子表面の Lys はその長いアルキル鎖によって疎水性表面を増大させるため、耐塩タンパク質にとって不都合であると考えられている。これまで、これらの仮説を元に *ChiN1* の分子表面に酸性アミノ酸を導入、あるいは分子表面に存在する溶媒露出表面積の大きい Lys を Ala など短い側鎖をもつアミノ酸に置換することで、耐塩性の向上を目指してきた。耐塩性を有する酵素は、高塩濃度環境と同じく水分含量の低い水-極性有機溶媒においても機能すると予想される。有機溶媒耐性を有するキチナーゼの獲得は、糖転移活性を利用した新規オリゴ糖の合成に利用する上で有用である。

本研究では、部位特異的アミノ酸置換の手法を用い、*ChiN1* の分子表面に露出した酸性アミノ酸および Lys と耐塩機構との関連を明らかにすることを目的とする。また、アミノ酸置換による *ChiN1* の反応至適塩濃度および有機溶媒耐性の向上を目指す。

酸性アミノ酸を導入した変異型 *ChiN1* の性質検討

もともと多くの酸性アミノ酸を含む *ChiN1* の分子表面にさらに酸性アミノ酸を導入した変異型酵素について、各 NaCl 濃度下におけるキチン加水分解活性を野生型 *ChiN1* と比較した。その結果、Asn357 を Asp に置換した変異型酵素 N357D において、野生型に比して高塩濃度下での活性の向上がみられた。しかしながら、*ChiN1* の立体構造モデルにおける Asn357 の位置を詳細に調べたところ、

Asn357 の位置は分子内部に埋没傾向にあり、必ずしも分子表面に露出していないことが明らかとなった。これより、反応至適 NaCl 濃度の向上は、分子表面電荷の変化によりもたらされたものではない可能性も考えられた。また、反応系に代表的な極性有機溶媒である DMSO を加えた際に活性向上が認められ、いくつかの変異型酵素において、野生型に比して DMSO 耐性が高いことがわかった。

Lys を除去した変異型 *ChiN1* の性質検討
溶媒露出表面積の大きい Lys を、側鎖がより短く、また統計的に高度好塩性古細菌タンパク質での含有率が高い Ala に置換し、各 NaCl 濃度下におけるキチン加水分解活性を野生型 *ChiN1* と比較した。その結果、いずれの変異型酵素も、野生型と同様の NaCl 濃度依存性を示すにとどまった。また、DMSO 耐性を調べたところ、いくつかの変異型酵素において、野生型に比して DMSO 耐性が高いことがわかった。

これらの結果より、分子表面へのアミノ酸置換の効果は、耐塩性よりも DMSO 耐性に対して強く見られることがわかった。高塩濃度環境と水-極性有機溶媒環境は水分活性の低い環境である点は共通であるが、*ChiN1* がもつ耐塩機構と極性有機溶媒耐性機構は必ずしも同一ではないことが示唆された。

(3) 超耐熱キシラナーゼへの荷電アミノ酸導入による各種極限環境耐性の付与

これまでに本研究室において、超好熱性細菌 *Thermotoga maritima* MSB8 株が生産する GH ファミリー 10 キシラナーゼ (*XynTB*) の遺伝子クローニングと組換え酵素の性質検討が行われている。*XynTB* は反応至適温度が 110 と高い耐熱性を保持しているものの、アルカリ性ではほとんど活性を示さない。そこで本研究では、新たに高精度かつ定量的なハイスループットスクリーニング系の構築を行い、アルカリ性での比活性が向上した変異型 *XynTB* の取得を試みた。

中性もしくはアルカリ性での比活性が向上した変異型 *XynTB* の取得

エラーブローン PCR を用いて *xynTB* 遺伝子に対してランダム変異を施した後、大腸菌 BLR(DE3) 株に形質転換し、ランダム変異ライブラリーを構築した。2,972 株のクローンに対し、96 穴マイクロプレートを用いたジニトロサリチル酸 (DNS) 法に基づくハイスループットスクリーニングを実施した結果、野生型に比して比活性が向上したと思われる変異型 *XynTB* を産生する 4 株のクローン (R40K/Q236H, R41G, R41K/D62E/E78G/E102G および N50D/E60G) を取得した。無細胞抽出液の熱処理により大腸菌由来の夾雑タンパク質を取り除いた変異型 *XynTB* 粗精

製標品を用い、pH 6.0, 8.0 および 9.0 における可溶性キシラン加水分解活性を測定した。その結果、R40K/Q236H は野生型に比して測定したすべての pH での比活性が向上していた。また、R41G, R41K/D62E/E78G/E102G および N50D/E60G は野生型 XynTB に比して pH 6.0 および pH 8.0 での比活性が向上していた。

中性もしくはアルカリ性での比活性が向上した変異型 XynTB の解析

単独のアミノ酸置換を導入した変異型 XynTB の性質検討の結果、R40K および R41K は野生型 XynTB に比して中性およびアルカリ性での可溶性キシランに対する比活性が向上していた。また、高温での比活性の向上のみならず、低温側でのより一層の比活性向上が確認された。一方、N50D は野生型 XynTB に比して中性での可溶性キシランに対する比活性が向上していた。さらに、不溶性キシランに対する比活性が大きく向上していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には二重下線)

[雑誌論文](計 18 件)

Cloning of a Chitinase Gene from Newly Isolated Alkaliphilic *Nocardiopsis* sp. Strain F96 and Extracellular Production of the Recombinant Protein in *Escherichia coli*, K. Endo, X. Xing, S. Nakamura et al. (他4人, 7番目), J. Jpn. Soc. Extr., 14, 21-29 (2015) 査読有

Complete Biosynthetic Pathway of the C₅₀ Carotenoid Bacterioruberin from Lycopene in the Extremely Halophilic Archaeon *Haloarcula japonica*, Y. Yang, R. Yatsunami, S. Nakamura et al. (他4人, 7番目), J. Bacteriol., 197, 1614-1623 (2015) 査読有

Improved Artificial Pathway for Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with High C6-monomer Composition from Fructose in *Ralstonia eutropha*, C. Insomphun, S. Nakamura, T. Fukui et al. (他4人, 6番目), Metab. Eng., 27, 38-45 (2015) 査読有

New Insight into the Role of the Calvin Cycle: Reutilization of CO₂ Emitted through Sugar Degradation, R. Shimizu, S. Nakamura, T. Fukui et al. (他4人, 4番目), Sci. Rep. 5, 11617; doi: 10.1038/srep11617 (2015) 査読有

Non-antigen-contacting Region of an

Asymmetric Bispecific Antibody to Factors IXa/X Significantly Affects Factor VIII-mimetic Activity, Z. Sampei, S. Nakamura, K. Hattori et al. (他7人, 9番目), mAbs, 7, 120-128 (2015) 査読有

The Role of Phosphodiesterase 4B in IL-8/LTB₄-induced Human Neutrophil Chemotaxis Evaluated with a Phosphodiesterase 4B Inhibitor, O. Suzuki, S. Nakamura, H. Maeda et al. (他2人, 4番目), Acta Pharm., 65, 191-197 (2015) 査読有

Identification of Carotenoids from the Extremely Halophilic Archaeon *Haloarcula japonica*, R. Yatsunami, S. Takaichi, S. Nakamura et al. (他10人, 13番目), Front. Microbiol., 5, 100; doi: 10.3389/fmicb.2014.00100 (2014) 査読有

Genetic Examination and Mass Balance Analysis of Pyruvate/Amino Acids Oxidation Pathways in the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakarensis*, K. Nohara, S. Nakamura, T. Fukui et al. (他2人, 3番目), J. Bacteriol., 196, 3831-3839 (2014) 査読有

Modification of β -Oxidation Pathway in *Ralstonia eutropha* for Production of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from Soybean Oil, C. Insomphun, S. Nakamura, T. Fukui et al. (他3人, 5番目), J. Biosci. Bioeng., 117, 184-190 (2014) 査読有

Metabolite Profiles of Polyhydroxyalkanoate-producing *Ralstonia eutropha* H16, T. Fukui, K. Chou, S. Nakamura et al. (他5人, 7番目), Metabolomics, 10, 190-202 (2014) 査読有

Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoate Copolymers from Methanol by *Methylobacterium extorquens* AM1 and the Engineered Strains under Cobalt-deficient Conditions, I. Orita, S. Nakamura, T. Fukui et al. (他1人, 4番目), Appl. Microbiol. Biotechnol., 98, 3715-3725 (2014) 査読有

Characterization and Gene Deletion Analysis of Four Homologues of Group 3 Pyridine Nucleotide Disulfide Oxidoreductases from *Thermococcus kodakarensis*, P. Harnvoravongchai, S. Nakamura, T. Fukui et al. (他3人, 4番目), Extremophiles, 18, 603-616 (2014) 査読有

Enhancement of Glycerol Utilization

Ability of *Ralstonia eutropha* H16 for Production of Polyhydroxyalkanoates, T. Fukui, I. Orita, S. Nakamura et al. (他 1 人, 4 番目), Appl. Microbiol. Biotechnol., **98**, 7559-7568 (2014) 査読有

Gene Analysis, Expression, and Characterization of an Intracellular α -Amylase from the Extremely Halophilic Archaeon *Haloarcula japonica*, M. Onodera, R. Yatsunami, S. Nakamura et al. (他 4 人, 7 番目), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 281-288 (2013) 査読有

Gene Expression and Characterization of Aerotaxis Transducer HemAT from Extremely Halophilic Archaeon *Haloarcula japonica* TR-1, T. Tadikara, R. Yatsunami, S. Nakamura et al. (他 8 人, 11 番目), J. Jpn. Soc. Extr., **12**, 29-32 (2013) 査読有

Combination of Site-directed Mutagenesis and Calcium Ion Addition for Enhanced Production of Thermostable MBP-fused Heparinase I in Recombinant *Escherichia coli*. S. Chen, S. Nakamura, X. Xing *et al.* (他 6 人, 7 番目), Appl. Microbiol. Biotechnol., **97**, 2907-2916 (2013) 査読有

Evaluation of the Therapeutic Index of a Novel Phosphodiesterase 4B-selective Inhibitor Over Phosphodiesterase 4D in Mice, O. Suzuki, S. Nakamura, H. Maeda *et al.* (他 10 人, 12 番目), J. Pharmacol. Sci., **123**, 219-226 (2013) 査読有

Detection of Phase-dependent Transcriptomic Changes and Rubisco-mediated CO₂ Fixation into Poly (3-hydroxybutyrate) under Heterotrophic Condition in *Ralstonia eutropha* H16 Based on RNA-seq and Gene Deletion Analyses, R. Shimizu, S. Nakamura, T. Fukui *et al.* (他 3 人, 5 番目), BMC Microbiol., **13**, 169; doi: 10.1186/1471-2180-13-169 (2013) 査読有

[学会発表](計 50 件)

Tactic Responses of Extremely Halophilic Archaeon *Haloarcula japonica* Overexpressing Its Aerotaxis Transducers, T. Matsubara, T. Tadikara, S. Nakamura et al. (他 2 人, 5 番目), PACIFICHEM2015, December 15-20, 2015, Hawaii, USA 国際会議
Bacterioruberin Biosynthesis in Extremely Halophilic Archaeon *Haloarcula japonica*, R.

Yatsunami, Y. Ying, S. Nakamura et al. (他 3 人, 6 番目), ISC2014, June 29-July 4, 2014, Utah, USA 国際会議

Improvement of Specific Activity of GH Family 18 Chitinase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. J813 by Directed Evolution, W. Tsukimura, U. Schwaneberg, S. Nakamura et al. (他 6 人, 9 番目), 10th APCCS, October 5-8, 2013, Tottori, Japan 国際会議

Characterization of a haloarchaeal chitinase: Effect of aspartates, glutamates and lysines on its protein surface, K. Toyama, K. Sakagami, S. Nakamura et al. (他 8 人, 11 番目), 10th APCCS, October 5-8, 2013, Tottori, Japan 国際会議

Characterization of *crtI* Homologs and Antioxidant Capacity of Carotenoids from Extremely Halophilic Archaeon *Haloarcula japonica*, R. Yatsunami, A. Ando, S. Nakamura et al. (他 9 人, 12 番目), Halophiles 2013, June 23-27, 2013, Connecticut, USA 国際会議

Characterization of Aerotaxis Transducers Htr8 and HemAT from Extremely Halophilic Archaeon *Haloarcula japonica*, T. Matsubara, T. Tadikara, S. Nakamura et al. (他 2 人, 5 番目), Halophiles 2013, June 23-27, 2013, Connecticut, USA 国際会議

Preparation and Characterization of Chimeric Transducers of Htr8 and HemAT from Extremely Halophilic Archaeon *Haloarcula japonica*, T. Matsubara, T. Tadikara, S. Nakamura et al. (他 2 人, 5 番目), September 22-26, 2013, Enzyme Engineering XXII: Emerging Topics in Enzyme Engineering, Toyama, Japan 国際会議

[図書](計 5 件)

極限環境生命 (共著), 伊藤政博, 道久則行, 中村 聡ほか (他 6 人, 9 番目), コロナ社, 東京 (2014) (総ページ: 220 ページ; 担当: 25 ページ)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

[その他]

東京工業大学
大学院生命理工学研究科 生物プロセス専攻
(2016 年 4 月 1 日より, 生命理工学院)
中村 (聡)・八波研究室ホームページ
<http://www.nakamura.bio.titech.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中村 聡 (NAKAMURA SATOSHI)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
教授

(2016年4月1日より,東京工業大学・生命理
工学院・生命理工学系・教授)

研究者番号: 50227899

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし