

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18688

研究課題名(和文) 配列データベース由来人工L-アミノ酸脱水素酵素群の合理的設計とその応用

研究課題名(英文) Rational design and application of artificial L-amino acid dehydrogenases from sequence database

研究代表者

中野 祥吾 (NAKANO, SHOGO)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：80748541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：L-アミノ酸脱水素酵素の幾つかは、血中アミノ酸の濃度定量に応用が期待されている。本研究ではそのような酵素の中で、特にL-スレオニン脱水素酵素(SDR-TDH)を研究対象とした。SDR-TDHを高機能化するため、配列データベースを用いて人工SDR-TDHを2つ設計した。いずれの人工SDR-TDHも自然界由来SDR-TDHと比べ、耐熱性、NAD<sup>+</sup>親和性及び生産性に優れることが判明し、酵素活性パラメータも遜色がないことを確認した。

また本研究遂行の過程で得られたモノマー型SDR-TDHの構造機能解析を通して、SDR-TDHの生成物脱離機構を解明することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Several L-amino acid dehydrogenases are expected to apply to quantify amino acid concentration in plasma. In this study, we utilized L-threonine dehydrogenase as research target. Two artificial SDR-TDHs were designed by utilizing sequence database to improve their enzymatic function. The artificial SDR-TDHs bore high thermal stability, NAD<sup>+</sup> affinity and productivity compared with native SDR-TDH. Furthermore, enzyme kinetics parameters of the artificial SDR-TDHs are almost identical to the native SDR-TDH.

In addition, we can elucidate product release mechanism of SDR-TDH through structural and functional analysis of monomeric SDR-TDH.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：L-スレオニン脱水素酵素 祖先型設計 完全コンセンサス設計 構造機能解析

## 1. 研究開始当初の背景

酵素は環境にやさしい触媒として今日、食品や医療、化学合成の分野などに利用されている。中でもアミノ酸代謝に関わる酵素は”アミノ酸誘導体の合成”や”血中アミノ酸定量”に応用されている。本研究で対象とした短鎖型 L-スレオニン脱水素酵素 (以下 SDR-TDH) は、L-スレオニン側鎖の  $\beta$ -ヒドロキシ基の脱水素化反応を触媒する  $\text{NAD}^+$  依存型酵素で、生成物として 2-アミノ 3-ケトブチル酸 (AKB) と  $\text{NADH}$  を生成する (図 1)。SDR-TDH の高い特異性を生かし、血液を含む様々なサンプル中の L-スレオニン濃度の定量に応用が期待されている。

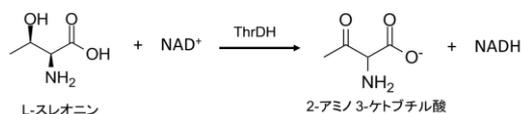


図 1, SDR-TDH の反応機構

SDR-TDH が有する高い特異性を、その他のアミノ酸や各種ヒドロキシ酸に示すよう酵素改変できれば、本酵素の有用物質生産など更なる応用が期待できる。

## 2. 研究の目的

SDR-TDH が持つ高い特異性を、L-スレオニン誘導体に示すよう変換できれば、有用物質生産への応用が期待できる。しかし報告されている SDR-TDH は、L-Thr 以外のアミノ酸やヒドロキシ酸とは反応しない。また SDR-TDH の特異性に関する分子機構も不明な点が多い。よって SDR-TDH を用いた応用研究を行うためには、“本酵素が高い特異性を示す理由を解明”するとともに、“進化工学及び合理的設計手法を用いて、本酵素の機能を目的に応じて変換”する必要がある。

上記の研究背景、及びこれまでの研究成果をもとに、SDR-TDH を用いた有用物質の生産や化合物定量法の開発を目指した研究を行った。まずは PubMed などのデータベースから SDR-TDH ファミリーに属するタンパク質配列を抽出し、INTMSAlign を用いて、変異に強い人工 SDR-TDH を設計することをおこなった。次に人工 SDR-TDH の機能について、X 線結晶構造解析、生化学的解析、熱化学的測定、及び分子動力学法など計算化学解析を用いた複合的アプローチにより、分子レベルで明らかにすることを行った。設計した人工 SDR-TDH の酵素化学的性質を確認することで、基質特異性の評価を行った。

加えて本研究の遂行中に、偶然にも単量体型 SDR-TDH (mtTDH) を得ることができた。ちなみに SDR-TDH は、二量体か四量体で働くと報告されている。mtTDH を用いて単量体で SDR-TDH 活性を発現できる理由、および生成物である AKB の脱離機構を、X 線結晶構造解析、計算化学解析及び酵素化学的解析を用いて明らかにすることを行った。

## 3. 研究の方法

変異導入に強い安定な人工 SDR-TDH を得ることを目指し、研究代表者が開発したオリジナルな配列解析ソフトウェア、INTMSAlign を用いて、本酵素の配列を人工設計することを行った。PubMed から自然界由来 SDR-TDH である、*Cupriavidus necator* 由来 SDR-TDH のホモログに関する一次配列データを、できる限り多く取得した (5000 配列以上)。取得したデータを解析し、SDR-TDH 活性をもつと予測される配列を、87 配列まで選抜した。選抜した配列を、INTMSAlign を用いたマルチプルシーケンスアラインメント (MSA) により解析し、最も高く保存されているアミノ酸残基 (コンセンサス残基) を同定した。最後に、一次配列が全てコンセンサス残基で構成されている人工 SDR-TDH、FcTDH-N1 を設計した。加えて MEGA を用いて最尤法により系統樹を作成、そのデータと MSA を基に祖先型 SDR-TDH (AncTDH) の設計を行った。これらの酵素に関しては pET15b 発現系を用いて可溶性画分に発現させることに成功した。mtTDH (GenBank ID: ADD93128.1) についても pET15b ベクターを用いて同様に発現させた。

## 4. 研究成果

本研究では、人工 SDR-TDH の設計と構造機能解析に関する成果、および mtTDH の生成物脱離機構の解明という研究成果が得られた。以下に詳細を記載する。

## a. 人工 SDR-TDH の設計と構造機能

自然界由来 SDR-TDH より機能の優れた人工 SDR-TDH を設計するため、実験方法に記載した手法により FcTDH-N1 と AncTDH を設計した。CnTDH と比べ、FcTDH-N1, AncTDH には、それぞれ 74, 88 個の変異が導入されていた。また設計した人工 SDR-TDH はいずれも自然界には存在しない配列であることを確認した。

次に CnTDH, FcTDH-N1 および AncTDH の酵素学的諸性質の比較解析を行った。まずは 20 種類の L-アミノ酸、および複数のヒドロキシ酸を基質として用いることで、比活性の測定を行った。結果、L-Thr 以外にも微弱ではあるが、R-3-ヒドロキシ酪酸や L-Ser にも活性を有することを確認した。現在、これら活性を向上させる変異点を探索中である。等温滴定カロリメトリ (ITC) を用いた解析を行い、 $\text{NAD}^+$  に対する親和性を確かめた (図 2)。結果、AncTDH は最も  $\text{NAD}^+$  に対する親和性が高く、 $K_d$  値は CnTDH と比べて 1/8 以下であった。FcTDH-N1 は AncTDH と比べて親和性は低かったが、CnTDH と比べて 1/2 程度の  $K_d$  値を有していた。次に耐熱性に関して、円二色性分散計 (CD) を用いて評価した。222nm における CD スペクトルの温度依存変化から、 $T_m$  値を算出した。結果、FcTDH-N1 および AncTDH は CnTDH と比べて 10, 5 °C ほど高

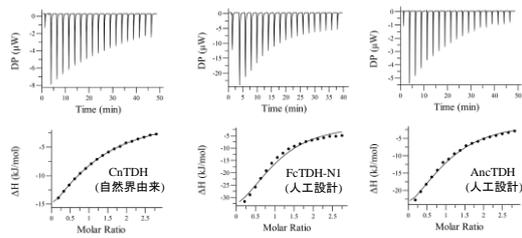


図 2, CnTDH, FcTDH および AncTDH の NAD<sup>+</sup> をリガンドとした時の ITC スペクトル。CnTDH, FcTDH-N1, AncTDH の  $K_d$  値はそれぞれ 282.7, 132.7, 37.5  $\mu\text{M}$  であった。

い  $T_m$  値を有していた。また酵素活性測定を行ったところ、設計した人工 SDR-TDH は CnTDH と比べて、特に 30 °C、40 °C における酵素効率 ( $k_{cat}/K_m$ ) が類似していた。以上の結果から、今回設計した人工 SDR-TDH は、自然界由来の SDR-TDH と比べて酵素活性は保ちつつ、耐熱性・NAD<sup>+</sup> 親和性を向上させることができたといえる。

このような人工 SDR-TDH の機能向上がもたらされた理由を構造学的に考察するため、FcTDH-N1 と AncTDH の立体構造を X 線結晶構造解析により決定した。なお CnTDH の立体構造は既に構造決定が完了している。構造比較の結果、人工 SDR-TDH の全体構造は CnTDH と比べてほぼ相同なことが判明した。事実、CnTDH と比べた時の RMSD 値 (Ca 原子) は 1.0 Å 以下であった。人工 SDR-TDH の変異導入部位を CnTDH 構造上に図示した (図 3A)。結果、変異導入部位は活性中心から 7Å 以上離れたタンパク質表面上に集中していた (図 3B)。以上の結果から、X 線結晶構造のみから、機能変化が生じた理由を説明で

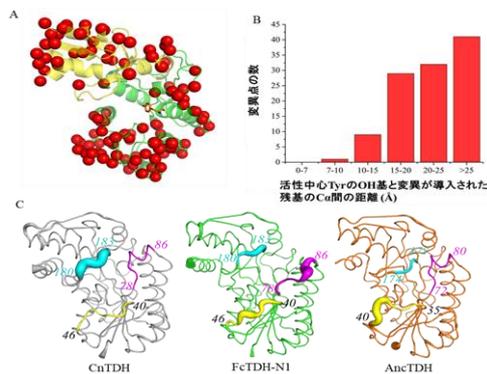


図 3, 人工設計により変異が導入された箇所の解析 (A)。CnTDH と比べて、活性中心から 7Å 以上離れた位置に変異が導入されていた (B)。分子動力学シミュレーションによる溶液中での動きの違いに関する解析 (C)。基質特異性や活性発現に重要なループ領域のみ、動きが異なることが判明した。

きなかつた。そこでこれら 3 つの SDR-TDH に関して分子動力学計算を行った。結果、L-Thr など基質認識に重用なループ部位と NAD<sup>+</sup> 結合ループの動きがおおきく異なることが判明した (図 3C)。以上の結果から、人工 SDR-TDH に導入された変異は酵素構造のダイナミクスを変化させるようにはたらき、これにより酵素活性が変化すると示唆された。本成果についてはアメリカ化学会の生化学専門誌、*Biochemistry* 誌に掲載されている。

## b. mtTDH の生成物脱離機構の解明

a の研究実施中に、新規な単量体型 SDR-TDH、mtTDH が得られた。mtTDH の構造解析を行ったところ、1.2 Å 分解能近い超高分解能 X 線回折データが得られた。これら結果を基に、本酵素の構造機能解析を通して、未解明であった SDR-TDH の生成物脱離機構の解明を目指した研究を行った。

まずは mtTDH の apo, NAD<sup>+</sup>, NAD<sup>+</sup>-L-Ser, および NADH-AKB 結合型の X 線結晶構造解析を行い、1.2-1.9 Å 分解能で構造を決定することに成功した。全体構造の比較から、mtTDH は基質 (L-Thr) や補酵素 (NAD<sup>+</sup>) 結合により開閉構造を切り替えていることが明らかとなった。また活性中心の構造比較から、開閉構造の切り替えと Asp179 の側鎖の構造変化が連動していることが予測された。フラグメント分子軌道法によるタンパク質-基質間の相互作用解析の結果、Asp179 は基質結合に不利に働く、いわゆる反発相互作用を形成していることが判明した。しかし Asp179 の変異体解析の結果は、この残基が開閉構造の調節に重要な役割を果たすことを示していた。

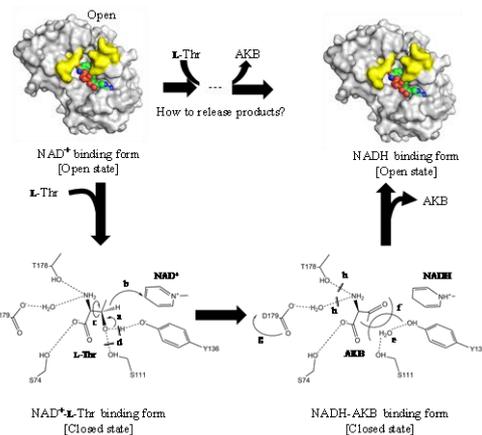


図 4, 本研究から予測した mtTDH の生成物脱離機構。特に Asp179 は反応が完了して生成物である AKB ができたことを感知するセンサー残基である可能性が高い。

以上の結果から、Asp179 は mtTDH が反応を完了したことを検知するセンサーのような残基として働くことを予測し、図 4 のような反応機構を提唱した。本成果についてはア

メリカ化学会の *Biochemistry* 誌に掲載されている。

#### 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 Shogo Nakano<sup>\*</sup>, Tomoharu Motoyama, Yurina Miyashita, Yuki Ishizuka, Naoya Matsuo, Hiroaki Tokiwa, Suguru Shinoda, Yasuhisa Asano<sup>\*</sup>, and Sohei Ito<sup>\*</sup>, (2018), Benchmark analysis of native and artificial NAD<sup>+</sup>-dependent enzymes generated by sequence based design method with or without phylogenetic data, *Biochemistry*, doi:10.1021/acs.biochem.8b00339, in press, \*Corresponding Author

② Tomoharu Motoyama<sup>1</sup>, Shogo Nakano<sup>1\*</sup>, Yuta Yamamoto, Hiroaki Tokiwa, Yasuhisa Asano, Sohei Ito, (2017), Product release mechanism associated with structural changes in monomeric L-threonine 3-dehydrogenase, *Biochemistry*, **56**, 5758-5770  
<sup>1</sup>Equally contribution, \*Corresponding Author

③ Daisuke Matsui<sup>1</sup>, Shogo Nakano<sup>1</sup>, Mohammad Dadashpour, and Yasuhisa Asano, (2017), Rational identification of aggregation hotspots based on secondary structure and amino acid hydrophobicity, *Scientific reports*, **7**, 9558, doi:10.1038/s41598-017-09749-2  
<sup>1</sup>Equally contribution

④ Shogo Nakano, Kazuyuki Yasukawa, Takaki Tokiwa, Takeshi Ishikawa, Erika Ishitsubo, Naoya Matsuo, Sohei Ito, Hiroaki Tokiwa, and Yasuhisa Asano, (2016), Origin of stereoselectivity and substrate/ligand recognition in an FAD-dependent R-selective amine oxidase, *J. Phys. Chem. B.*, **120**, 10736-10743

⑤ 中野 祥吾, (2017), “ウェット・ドライ融合によるタンパク質工学研究の今”, 生物工学会誌、バイオメディア (日本生物工学会) 95, 22

[学会発表] (計 8 件)

① Shogo Nakano, Sohei Ito and Yasuhisa Asano, Development of INTMSAlign software to design artificial proteins and assign enzymes (国際シンポジウム)、2017 年度日本生物工学会大会、9/11-14、2017、(invited), Waseda, Tokyo

② Shogo Nakano and Yasuhisa Asano, Application of INTMSAlign to protein engineering, ICC05-AEM2016 (Toyama, Japan), Sept. 2016 (oral)

Yasuhisa Asano, and Sohei Ito, Structure and functional analysis of newly discovered L-threonine 3-dehydrogenase from metagenome library database, ICC05-AEM2016 (Toyama, Japan), Sept. 2016 (poster)

④ 中野 祥吾, Wet-Dry 融合による新たな蛋白質工学的手法の開発 ~INTMSAlign の開

発と応用~, 2016 年度日本生物工学会 中部支部例会, 名古屋, 2016 年 8 月 (招待講演)

⑤ Yuka Hayashi, Masaya Nakamura, Shin-ichi Sakasegawa, Shogo Nakano, Sohei Ito, Yasuhisa Asano, Daisuke Sugimori “Thermostability enhancement of L-glutamate oxidase from *Streptomyces sp.* NT1 by the artificial protein design”, 日本生物工学会 北日本支部 福島シンポジウム, 12/25, 2017, 福島市, 福島 (最優秀賞受賞) (ポスター)

⑥ 清水 奏, 宮下 由里奈, 山本 雄大, 中野 祥吾, 伊藤 創平, 沼本 修孝, 伊倉 貞吉, 伊藤 暢聡, 加来田 博貴, 常盤 広明 “パーシャルアゴニストが結合した hRXR $\alpha$  受容体複合体に関する構造生物学及び計算化学的解析”, 第 28 回レチノイド研究会学術集会, 11/18-19, 2017, 神戸市, 兵庫 (学生優秀発表賞受賞) (口頭)

⑦ Tomoharu Motoyama, Shogo Nakano, Yasuhisa Asano, and Sohei Ito, Novel L-threonine 3-dehydrogenase from genome library database: Structure and functional analysis, 第 21 回静岡健康・長寿学術フォーラム, 静岡, 2016 年 11 月 (ポスター, ポスター賞)

⑧ 松尾 直也、Vladimir Sladek、Sundaram Arulmozhiraja、岡崎 誠司、中野 祥吾、伊藤 創平、武井 健太、中川 嘉、島野 仁、常盤 広明、共役因子を含む PPARs/アゴニスト複合体の理論的解析, 第 60 回日本薬学会関東支部大会, 2016 年 9 月 (口頭, 優秀口頭発表賞)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: L-スレオニン脱水素用タンパク質 (酵素)、目的活性を有するタンパク質のスクリーニング方法及び調製方法

発明者: 浅野 泰久、中野 祥吾、伊藤 創平、  
本山 智晴、松永 玲実

権利者: 富山県立大学、静岡県立大学

種類: 特許

番号: 2016-234857

出願年月日: 2016-12-02

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

中野 祥吾 (NAKANO Shogo)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：80748541