

令和元年5月23日現在

機関番号：23201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17996

研究課題名(和文) 効率的なニトリル合成を視野に入れた広い基質特異性のアルドキシム脱水酵素の単離

研究課題名(英文) Screening of aldoxime dehydratase with broad substrate specificity for nitrile synthesis

研究代表者

松井 大亮 (Matsui, Daisuke)

富山県立大学・工学部・助教

研究者番号：40748513

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)：アルドキシム脱水酵素(Oxd)は、猛毒シアンを用いず、アルドキシムから医薬中間体のニトリルを合成できる酵素である。しかし、毒性のあるアルドキシムが培養によるOxd探索に不向きなことから報告例が少なく、既知のOxdはかさ高い置換基をもつ化合物に対して活性が低い。本研究では、ニトリラーゼ遺伝子を導入した大腸菌で、Oxd遺伝子が発現した際に、アルドキシムを代謝することで生育する仕組みを利用した(大腸菌への「アルドキシム-ニトリル経路」の導入)。この手法で自然界から新たなOxd配列の取得や、変異導入により広い基質特異性や可溶性発現量の多い変異型酵素を取得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光学活性ニトリルの合成法開発が課題になっており、シアンを用いない、環境にやさしい酵素的合成法を開発することは、グリーンケミストリーの立場から非常に重要である。本研究では、Oxdの基質特異性の拡張についての検討で、窒素源としてアルドキシムを用いることで新しいOxd配列の取得や異なる特性を有した変異型酵素を取得した。また、アミノ酸からアルドキシムを合成する酵素の単離にも発展が可能であり、将来的には様々なニトリルの発酵生産が期待できる。このように物質生産を視野に入れた新しい酵素の単離は、医薬中間体合成において非常に意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：Aldoxime dehydratase (Oxd) is an enzyme that synthesizes nitriles of a pharmaceutical intermediate from aldoximes without using poisonous cyanide. But there are few reports since toxic aldoximes are not suitable for the screening and the known Oxd is less active against compounds having bulky substituents. In this study, we utilized the mechanism of growth by metabolizing aldoxime when Oxd gene is expressed in Escherichia coli harboring a nitrilase gene (introduction of "aldoxime-nitrile pathway" into E. coli). Using this method, we obtained two Oxd sequences, and obtained mutant enzymes that exhibit broad substrate specificity or high solubility by random mutagenesis.

研究分野：酵素化学、応用微生物学

キーワード：アルドキシム脱水酵素 ニトリラーゼ ニトリル アルドキシム-ニトリル経路

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

応募者が所属する研究室は浅野泰久教授を中心として、細菌や植物、動物におけるニトリル代謝関連酵素を見出し、アミノ酸代謝経路「アルドキシム - ニトリル経路」を提唱している(図1)。さらに当研究室はアルドキシム脱水酵素(Oxd)を発見し、酵素化学的諸性質を明らかにすると共に、世界で初めてヘム鉄を有する新規な立体構造を解明している。様々な光学活性ニトリルは医薬品や農薬原料として、今後も幅広い分野で利用されることから、より低コストで効率的、また環境負荷の少ない合成法の構築が必要であった。

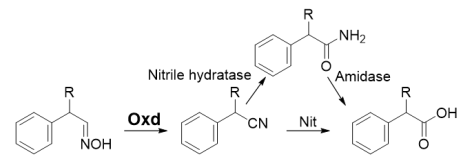


図1. アルドキシム - ニトリル経路

本酵素は、猛毒シアンを用いず、アルドキシムから医薬中間体のニトリルを合成できる酵素である。しかし、毒性のあるアルドキシムが従来の培養による探索に不向きであり、活性測定に高速液体クロマトグラフィーが必要で迅速な探索に適さないことから報告例が少なく、既知のOxdの基質特異性が限られていた。つまり、2-フェニルプロピオンアルドキシムなど2位の置換基が異なる化合物に対する活性はフェニルアセトアルドキシム(PAOx)と比べ著しく低く、様々なニトリル化合物の合成にはより多くのOxdの種類が必要であった。

2. 研究の目的

応募者は自然界から微生物由来新規酵素の単離や進化分子工学による基質特異性の改変に成功しているが、これらの酵素探索には難点がある。前者では難培養微生物は単離できないことや、後者では比色定量法などの迅速な活性測定ができない酵素が多く、探索法が煩雑である。応募者はこの問題を解消するために、十分に異種発現系の技術が確立されている大腸菌を用いた酵素の探索に取り組んできた(抗生物質耐性を指標にしたスクリーニング系や、要求株に新たな代謝系を導入し、要求化合物を相補することによる酵素の単離に成功している)。つまり、目的酵素の機能が大腸菌に付加されることで生育できる系を設定することで、難培養微生物でもその遺伝子からの探索が可能であるし、簡易な活性測定系が無くてもその酵素反応で単離することが可能である。さらに本手法は異種発現することで成立することから、物質生産などへの応用も容易である。

そこで本研究では大腸菌に「アルドキシム - ニトリル経路」を導入し、単一窒素源のアルドキシムの資化と生育が連動する仕掛けを用いた迅速なOxd探索法を構築することを目的とした。つまり、ニトリラーゼ(Nit)遺伝子を導入した大腸菌で、Oxd遺伝子が発現した際に、アルドキシムを代謝することで生育する仕組みを利用し、自然界や変異型酵素群から広い基質特異性のOxdを単離する(図2)。

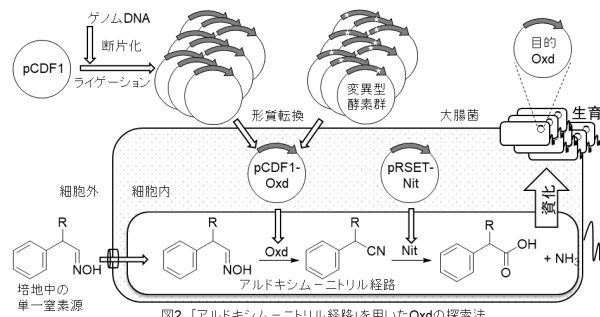


図2 「アルドキシム - ニトリル経路」を用いたOxdの探索法

3. 研究の方法

- (1) 大腸菌 BL21(DE3)株に発現プラスミドに挿入した *Bacillus* sp. OxdB-1 由来 Nit 遺伝子を導入した。フェニルアセトニトリルを単一窒素源とした最少培地に、形質転換体を植菌し、生育を確認した。さらに、同株由来の Oxd 遺伝子を発現プラスミドに挿入し、上記の Nit 遺伝子発現株に導入した。PAOx を単一窒素源とした最少培地に形質転換体を植菌し、同様に生育を確認した。
- (2) PAOx を窒素源としたようなスクリーニング培地を用いて、PAOx を資化できるような微生物を取得し、高速液体クロマトグラフィーで活性測定し、活性が得られた微生物からゲノム抽出を行い、制限酵素で断片化した後に発現プラスミドに挿入した。得られた発現プラスミドを図2のスクリーニング系に導入し、Oxdを単離した。
- (3) *Pseudomonas*、*Bacillus*、*Rhodococcus* の Oxd 配列にランダムに変異導入し、得られた変異ライブラリーを図2のスクリーニング系に導入し、構造上高い2,2-ジフェニルアセトアルドキシムを用いて探索した。得られた変異型酵素の変異部位を特定した。また、*Fusarium* の Oxd 配列にランダムに変異導入し、同様の手法で高い可溶性発現の変異型酵素を探索した。
- (4) 高速液体クロマトグラフィーを用いて、得られる生成物の立体異性体を明らかにした。酵素の基質特異性、安定性、最適温度などの諸性質を明らかにした上で、光学活性ニトリルの合成に適用した。

4. 研究成果

- (1) ニトリル化合物を生合成する植物の表面から微生物を単離し、その一部の微生物に Oxd 活性を有していることを確認した。そこでその表面の微生物からゲノムを抽出し、発現プラスミドに挿入し、Nit 遺伝子とともに共発現株を作成した。設定した培養条件で生育させることにより、2種類の Oxd 活性を持つ遺伝子配列を取得した。それぞれの配列はともに

Pseudomonas 属由来の Oxd と高い相同性を示した(配列相同性 70%以上)。

- (2) 既知酵素に変異を導入し、基質特異性を改変するため、2,2-ジフェニルアセトアルドキシムなどの嵩高い基質を合成し、*Bacillus* および *Fusarium* 由来の Oxd の変異ライブラリーを用いてスクリーニングを行った。基質ポケット内の一部残基に変異が入ることで、Oxd 活性が 1.5 倍程度上昇した変異型酵素を取得した。
- (3) 変異部位の効果を明らかにするために *Bacillus* 由来 Oxd の結晶化スクリーニングを行ったが、結晶を取得することは出来なかった。そこで、メチル化修飾と変異導入法で結晶化スクリーニング用の酵素を調製した。野生型酵素へのメチル化修飾：タンパク質表面のリジン残基の疎水性度の向上が結晶形成を促進する報告例から、リジン残基をメチル化した Oxd で結晶スクリーニングを行い、rod cluster 様の結晶を観察した。アミノ酸変異導入：表面のリジンやグルタミン酸残基がタンパク質の結晶の形成に影響する報告例から、K49A/K50A、E83A/E85A、E213A/E215A、K103A/K104A に各々変異導入したところ、いずれの変異体も封入体を形成した。そこで一点変異体 (K50A、E85A、K104A、E215A) を作成し、活性を確認することができ、これまでに変異型酵素 K104A において plates 様の結晶の取得に成功している。以上の結果から、Oxd においてリジン残基のメチル化もしくは変異導入による疎水性度の向上で、結晶の形成が促進されることが明らかになった。
- (4) 自然界からのスクリーニングや基質特異性の改変だけでなく、その他の機能改変に本スクリーニング系を利用できると考え、可溶性発現の低い *Fusarium* 由来 Oxd の変異型酵素のスクリーニングを実施した。大腸菌 XL-1Red を用いて本酵素のランダム変異ライブラリーを調製し、本スクリーニング条件で変異酵素を探索した結果、複数の可溶性発現量が上昇した変異型酵素を取得することができた。変異部位を明らかにした結果、N 末端側の同一の部分に変異が入っていることが明らかとなった。本酵素を精製後、野生型酵素と諸性質を比較した結果、基質特異性などには影響はなく、約 10 度の熱安定性が上昇していることが明らかとなった。さらに、本変異型酵素の結晶構造解析のための結晶化スクリーニングを行い、結晶を取得した。ちなみに今回結晶化に成功した *Bacillus* と *Fusarium* 由来 Oxd の配列は、これまでに知られている *Rhodococcus* や *Pseudomonas* 由来の配列とは相同性が低い(配列相同性 30%程度)。今後上記 や で得られた結晶を用いて、結晶構造解析を実施する。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Daisuke Matsui, and Yasuhisa Asano, (2018), 変異導入による酵素の可溶性発現, 生物工学会誌, 第 96 号, 568-572

Daisuke Matsui, Shogo Nakano, Mohammad Dadashpour, and Yasuhisa Asano, (2018), タンパク質の二次構造とアミノ酸の疎水性度に基づいた凝集に関連するホットスポットの合理的同定法, 酵素工学ニュース, 第 80 号, 14-18

Daisuke Matsui, Shogo Nakano, 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

〔学会発表〕(計 6 件)

Daisuke Matsui, Shogo Nakano, and Yasuhisa Asano, Rational identification of aggregation hotspots based on secondary structure and amino acid hydrophobicity, 9th International Congress on Biocatalysis biocat2018, 2018

Daisuke Matsui, Shogo Nakano, and Yasuhisa Asano, Rational identification of aggregation hotspots based on secondary structure and amino acid hydrophobicity, 第 5 回富山・パーゼル医薬品研究開発シンポジウム, 2018

森智也、松井大亮、浅野泰久、*Bacillus* sp. OxdB-1 由来アルドキシム脱水酵素の構造解析に向けた結晶スクリーニング、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018

浅野泰久、松井大亮、中野祥吾、動植物酵素の開発とそれらの変異による可溶性発現について、ビタミン B 研究委員会第 451 回研究協議会、2018

Daisuke Matsui, and Yasuhisa Asano, Structural informatics for gene expression of industrial enzymes with correct folding, 第 69 回日本生物工学会大会, 2017

Daisuke Matsui, and Yasuhisa Asano, Screening of mutated enzymes by “metabolic tuning”, Biotrans, 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。