

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19780075

研究課題名 (和文) 酵素のキラル分子認識機構の熱力学的解析

研究課題名 (英文) Thermodynamic analysis of chiral molecule recognition of enzymes

研究代表者

古賀 雄一 (KOGA YUICHI)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：30379119

研究成果の概要：

Burkholderia cepacia 由来リパーゼの 3-phenylbutyric acid に対する光学選択性を熱力学的、構造学的に解析を行った。光学選択性の改変された 4 重変異体 4 種類の大量生産系構築を行った。1 リットルの培養液当たり 233mg 以上の組換えリパーゼの発現が確認された。精製酵素を用いて結晶化実験を行い、20-30%のイソプロパノールを共沈剤として用いた条件で針状結晶がえられ、X 線回折データの取得を行った。また、キラルカラムを用いて、ラセミックな基質に対する選択的分解を観察する手法を開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	0	1,400,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	210,000	2,310,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：タンパク質工学、リパーゼ、光学選択性、結晶構造解析、機能改変

1. 研究開始当初の背景

生体内では、酵素が極めて精緻に光学異性体を識別し特異的に化学反応を触媒する事から、一方の光学異性体のみが選択的に利用されたり、光学異性体によって全く違う生理活性を示すことになり、これが、生物学的にも医学的にも重要な意義を持っている。しかし、酵素の光学選択性を分子論的に解析し、その理論的な説明に成功した

研究はまだすくなくかった。

酵素分子は水素結合、イオン結合、疎水性相互作用といった、「弱い相互作用」の共役によって立体構造やその反応性が制御されている。酵素分子の光学選択性を考える場合、この弱い相互作用が一方のキラル化合物に強い指向性を持った共役効果を示すことで、精緻な分子認識が行われていると

考えられる。この場合弱い相互作用の共役効果とは、酵素がキラル化合物と遷移中間体を形成する際の分子-基質複合体の秩序の変化のことであり、活性化エントロピー変化として表す事ができる。酵素の光学選択性を熱力学的な数値として表現できれば、構造-機能相関の理論的モデルの構築が可能になると考えられ、酵素機能の理解、予測、デザインに結びつくと考えられる。そのためには、適切なモデル酵素の選択が必要である。

リパーゼは光学活性化合物の不斉合成に最も良く使われている酵素である。その光学選択性の改変を目指した研究が、世界的酵素生産会社(Novozyme社、Diversa社)や日米欧の蛋白質工学者らの手によって非常に盛んに行われている。しかし、これまで、リパーゼの光学選択性改変は、限られた立体構造情報による経験的アプローチや、ランダム変異による偶然性に支配された進化工学的アプローチによって行われているのが現状で、結果的に光学選択性を改変できた例は少なくないが、そうなった理屈を、一般化できる理論的なモデルにできた例はまだ無かった。その理由として、立体構造情報が基質選択性の説明に十分ではないこと、変異箇所が全くランダムなため変異酵素同士の比較研究がおこないにくいことが考えられた。我々は独自の変異酵素スクリーニング技術であるSIMPLEX法(Koga Y et al., J. Biosci. Bioeng., 579, 5781-5784, 2002)を用いて網羅的ライブラリー解析を行い、リパーゼの基質結合部位への変異の組み合わせによって酵素活性を損なう事なく光学選択性が完全に反転できる事を発見した(Koga Y et al., J. Mol. Biol., 331, 585-592, 2003)。この結果は、リパーゼの光学選択性の改変には基質結合

部位から離れた箇所への変異が有効であるとしていた当時の主要な研究者らの先行研究を覆す結果であったが、その後のReetz MTやKazlauskas Rらの研究によっても基質結合部位への変異の組み合わせが有効である事が確認されている(Kazlauskas R, Nature, 436(7054), 1096-1097, 2005, Reetz MT, Methods Enzymol., 388, 238-56, 2004)。我々が見つけた一連の変異リパーゼは分子全体の構造変化が極めて少ないことが示唆されており、基質結合部位の変異箇所のわずかな変化が、光学選択性の完全な反転に貢献していると考えられた。この一連の変異酵素は、構造-機能相関の比較研究に非常に有効な材料であるといえた。

2. 研究の目的

研究代表者らは、モデル光学活性化合物である 3-phenylbutylester に対して高い光学選択性を有する *Burkholderia cepacia* 由来の lipase について、酵素活性をほとんど変えることなく、光学選択性の無を完全に反転させた酵素を約 20000 クローン (2401 種類) の変異酵素の、ライブラリーの中から 4 種類取得している。そこで、これらの変異リパーゼの光学選択性の変化と、変異による構造変化を定量的に数値化するために、熱力学的アプローチで光学選択性を解析する。これらの変異酵素と野生型酵素の結晶構造と光学選択性の熱力学的特性を比較し、光学選択性の改変に関わる因子を抽出し、タンパク質工学的な機能改変を行う際のデザイン原理を創出することを目的とした。

3. 研究の方法

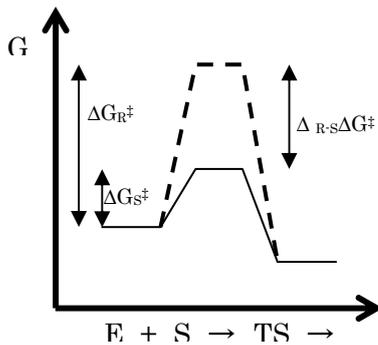
本研究計画では、*Burkholderia cepacia* 由来のリパーゼ (リパーゼ KWI-56) と光学選択性が改変した変異リパーゼを選び①野生型および、変異リパーゼの大量調製と酵素学的解析、②光学選択性の熱力学的解析、③構造学的解析を試みた。

① 野生型および、変異リパーゼの大量調製と酵素学的解析

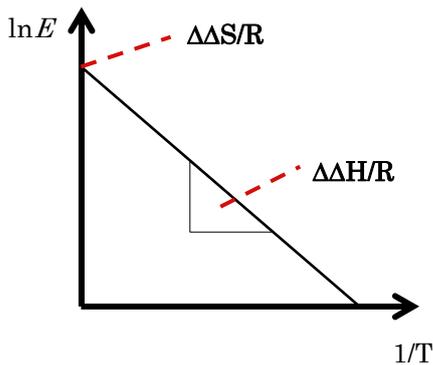
リパーゼ KWI-56は大腸菌を宿主とした通常の組換え発現では不溶化してしまい大量調製に適さない。また、単離源である *Burkholderia cepacia* は組換えリパーゼを発現するのに適しているが、通常施設での培養が困難である。そこで、*Pseudomonas* 属を宿主とした分泌発現系の構築を行い、酵素活性測定、酵素物性測定、結晶構造解析に必要な安定した酵素供給を試みた。また、並行してすでに実績のある、*Burkholderia cepacia* からの組換え酵素の取得を行った。

② 光学選択性の熱力学的解析

光学選択性のある酵素の反応過程の自由エネルギー変化を考えた時、R体基質とS体基質では左図のように遷移状態にいたるまでの活性化自由エネルギー ΔG^\ddagger に差があることが予想される。この



E: 酵素、S: 基質、TS:遷移中間体、P: 反応産物



場合、光学異性体間の活性化エネルギーの差 ($\Delta_{R-S}\Delta G^\ddagger = \Delta G_{R^\ddagger} - \Delta G_{S^\ddagger}$) は、平衡論的記述とギブスの自由エネルギーの定義からそれぞれ次式のように表すことができる。

$$\Delta_{R-S}\Delta G^\ddagger = -RT \ln E \quad \dots (1) \quad E: \text{光学選択性}$$

$$\Delta_{R-S}\Delta G^\ddagger = \Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger - T \Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger \dots$$

(2)

$\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$: 活性化エンタルピー変化の差

$\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$: 活性化エントロピー変化の差

(1) (2)式を解くと次式のアレニウス型の式が導かれる。

$$\ln E = - (\Delta\Delta H/R)(1/T) + \Delta\Delta S/R \dots (3)$$

この式は左図のように、光学選択性 E 値と温度の関係式として表され、両者の関係から $\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$ と $\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$ が導かれる。

そこで本研究では、野生型リパーゼ KWI-56 と変異リパーゼをそれぞれラセミックなモデル基質と様々な温度で反応させ、その反応産物を①と同様にキラルカラムを用いて分析し、 E 値の温度依存性を決定する。その相関関係から、それぞれの酵素の $\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$ と $\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$ を決める。これらの熱力学的パラメーターと、光学選択性の変化を比較し、それらの相関を精査する。光学選択性の変化がエントロピー依存的であるか、エントロピー変化の差と光学選択性の定量的な関係等、光学選択性と言う酵素特性を定量的な数値で表すことで、光学選択性という現象を分析することができる。

③結晶化およびX線立体構造解析

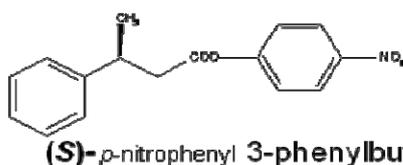
野生型リパーゼ KWI-56 と変異体リパーゼについて、既知の類似リパーゼ結晶化条件に加え、400 種類の結晶化条件で構造解析に適した良好な結晶の作成を行う。また、酵素単独の結晶の他に、モデル基質との複合体結晶の作成も行った。また、相同性 97% の類似リパーゼの結晶構造から分子モデルを作成し考察した。

4. 研究成果

本酵素の大量調製系の構築に当たり、*Pseudomonas* 属、*Brevibacillus* 属の分泌発現系を構築したが、目的のリパーゼを十分に分泌することはできなかった。本酵素は、Type II 分泌酵素で、本酵素に特異的なシャペロンとペリプラズム層で会合

しなくては正常な形にホールドできないといった構造形成上の制約がある。これが、異種宿主での発現を困難にしているといえる。そこで、*Burkholderia cepacia* のを用いて野生型、変異型酵素の大量調製系を確立し、SDS-PAGE でシングルバンドとなるまで精製した酵素を 1L 培養液当たり 0.2mg 程度取得することができるようになった。

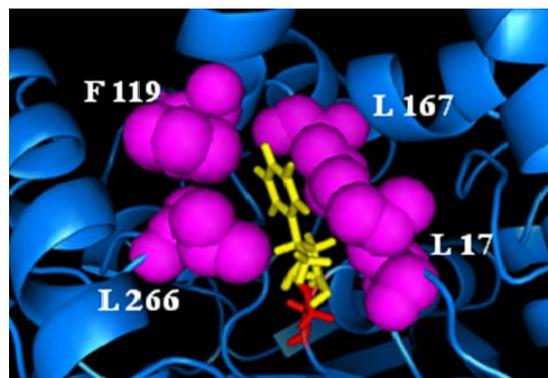
本酵素を用いて、その光学選択性を解析する目的で、pNP-3-phenylbutyrate の合成を行った。



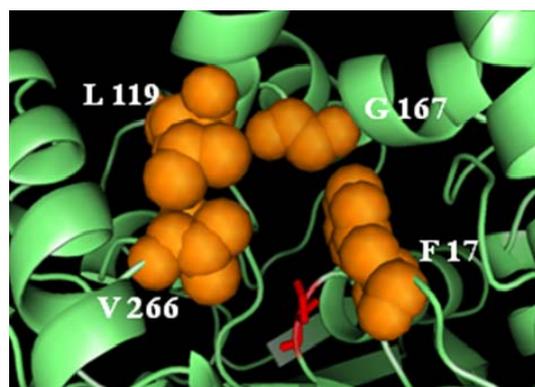
本化合物は R 体、S 体、ラセミ体をそれぞれ合成し、キラルカラム (CHIRALCEL OD-H;ダイセル) を用いて、メタノール:TFA = 99.5:0.5 でそれぞれのピークを分けることに成功した。本条件で酵素反応産物と基質の解析を行い、野生型酵素における光学選択性を解析し、S 体基質に対する光学選択性を $3E = 33$ と算出することができた。また、変異体のうち FLGV は R 体基質に対する光学選択性が 32 程度であり、先行試験で図った値に比べ小さくなっている傾向が読み取れた。

また、変異型酵素の一部について結晶を得て、X線回折像を得ることができたが、十分な解像度を得ることができず、基質結合部位の側鎖の配向を確認することができなかったが、複合体結晶の作成に不可欠な、結晶化条件と、クライオ (不凍液処理) 条件を決めることができた。

さらに本酵素の 4 種の変異体について、構造モデルを作成し、変異と基質結合パターンの考察を行った。



WT(LFLL)



FLGV

上記の図は、R 体選択性が最も高かった変異体 L17F, F119L, L167G, L266V (FLGV) の基質結合ポケットを野生型 (WT) と比較したものである。他の変異体 (FLAV, FVG V, LLGV) についても同様の比較を行った。その結果、野生型においては、S 体基質のフェニル基が 119 番目のフェニルアラニン側鎖と非常に近接しているが、変異型酵素においてはちょうど反対側の 17 番目の位置にフェニルアラニンが位置しており、これが R 体基質の安定な結合に貢献していることが示唆された。また、WT に比べ、変異酵素はいずれも 167 番目と 266 番目のアミノ酸側鎖のサイズが小さくなっており、その結果疎水ポケットの容積が大きくなり、R 体基質のメチル基との立体障害を回避していることが示唆されている。この結果、本研究で用いたモデル基質については、基質結合ポケットのデザインにおいて、空間の拡張と、フェニル基に

よる基質の配向により、基質選択性が大きく
改変する事が出来ることを示すことができ
た。

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)

〔図書〕(計 1 件)

蛋白質結晶の新展開 第5章 「酵素の機能
改変における結晶構造の役割」 CMC 出版
pp251-261

6. 研究組織

(1)研究代表者

古賀 雄一(KOGA YUUCHI)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：30379119

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし