

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15371

研究課題名(和文) 基質特異性の理解に基づく酵素変異体の合理的な設計手法の確立

研究課題名(英文) Fabrication of a rational design method for enzyme mutants based on an understanding of substrate specificity

研究代表者

森 裕太郎 (MORI, YUTARO)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：50758539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、酵素の基質特異性への本質的な理解を深めることで、基質特異性を改変・拡張する。加えて酵素反応を高活性に触媒するための合理的な酵素変異体設計ルール構築を目的として研究を遂行した。基質スクリーニングの結果と、構築した酵素-基質結合モデルと比較することで、情報の蓄積を行った。その結果、酵素が基質を認識出来るかどうかの重要なファクターとして、酵素-基質間の親和力が重要なファクターであることが示唆された。実際に、*in silico*での計算によって活性の向上に寄与しやすいHOT SPOTが予測可能であることが推測された。最終的に酵素変異体を用いて、野生型と比較して2.8倍の活性向上を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで生体内の反応を触媒する酵素に着目し、アミノ酸変異を導入することで、既存の酵素反応の活性向上や新規の非天然化合物の生成を達成した研究は多数報告されている。しかしながら、これらの設計は使用する酵素次第のケースバイケースであり、数百数千の変異体を作製することで高性能な変異体の取得に成功したとしても、他の鑄型酵素を使用する場合にはまた一から変異体を構築しなければならなかった。そこで本研究がもたらす合理的な酵素変異体設計ルールにより、目的の性能値を持つ酵素変異体の迅速な獲得や、非天然有用な化合物の生産する酵素の短期間での開発が可能となれば、持続可能社会の実現に向けた大きな一助となると考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to modify and extend the substrate specificity of enzymes by deepening our intrinsic understanding. In addition, this study's objective is to establish rational rules for designing enzyme mutants to catalyze enzymatic reactions with high activity. Several types of information were accumulated by comparing the results of enzyme screening with the constructed enzyme-substrate binding model. The results suggest that the affinity between the enzyme and the substrate is an important factor for the enzyme to be able to recognize the substrate. In fact, it is suggested that the HOT SPOT, which is likely to contribute to increased activity, can be predicted by *in silico* calculation. Finally, a 2.8-fold increase in activity was achieved with the enzyme mutant compared to the wild type.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：酵素変異体 バイオプロダクション

1. 研究開始当初の背景

環境問題と資源枯渇問題の双方を解決し、持続可能な環境調和型社会を実現するために、再生可能資源であるバイオマスから様々なバイオベース製品を作り出すバイオリファイナリーは特に重要である。バイオベース製品の市場規模は、ここ 15 年間で 4 倍以上もの拡大を見せており、2030 年には 1.6 兆ドルに達するとの予測もある。バイオリファイナリーは低炭素社会を構築することができることから、環境と経済の両面から世界規模で求められている。

バイオリファイナリーにおいては微生物を物質生産工場として捉え、二酸化炭素の固定化により得られる C5 糖・C6 糖を基幹原料として、有用化合物へ変換する試みが重要とされる。将来的に化石資源由来の化合物をバイオベース化合物で代替することを考えると、微生物が天然に生産する化合物の生産量を増加させる研究と、新たな非天然化合物の生産を可能とする研究の双方が必須である。特に生体内の反応を触媒する酵素に着目し、アミノ酸変異を導入することで、既存の酵素反応の活性向上や新規の非天然化合物の生成を達成した研究は多数報告されている。しかしながら、これらの設計は使用する酵素次第のケースバイケースであり、数百数千の変異体を作製することで高性能な変異体の取得に成功したとしても、他の鋳型酵素を使用する場合にはまた一から変異体を構築しなければならなかった。

このように系統立った酵素変異体の設計手法が確立されていないのは、なぜその基質は酵素に認識されるのか、また基質ごとの反応の差はどこから生まれるのかという基質特異性への知見が未だに不十分であるからと申請者は考えた。そこで本研究では、酵素の基質特異性への本質的な理解を深めることで、基質特異性を改変・拡張するとともに、目的とする酵素反応を高活性に触媒するための合理的な酵素変異体設計ルールの構築を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、同じ酵素番号で分類される複数の異種由来酵素およびその変異体を用いて基質スクリーニングを行い、構築した酵素-基質結合モデルと比較することで、酵素活性と活性中心のアミノ酸残基との相関関係について情報の蓄積を行う。これらを基に、酵素基質結合部位において反応や基質認識に有利となる要素を基質ごとに抽出し、必要とする酵素活性を満たす酵素多重変異体を設計するためのルール構築を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

本申請では、同じ酵素番号で分類される酵素および作製した変異体を用いて、

- (1) 基質スクリーニングによる酵素の反応速度パラメータの算出
- (2) 酵素 基質結合モデルとの比較から基質特異性に関わる要素の抽出
- (3) 蓄積した情報から設計した酵素変異体について酵素活性・基質特異性の検討

を行うことで、基質特異性に基づく酵素の合理的変異体の設計ルールの構築を目指す。

4. 研究成果

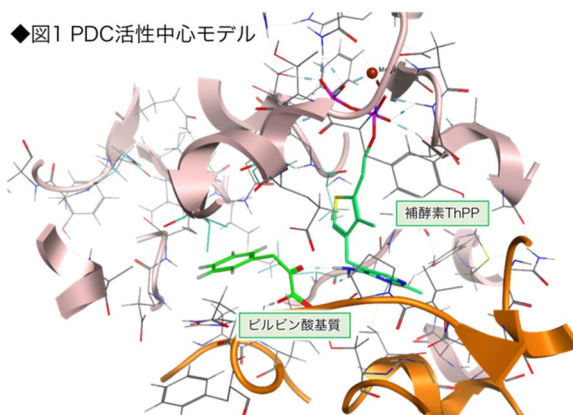
まず、複数種類の PDC について検討し、本来の基質を用いた活性測定を行うことで大腸菌での活性型での発現が可能かどうかを確認した。その結果、大腸菌以外を由来とする PDC について、脱炭酸反応後の生成物であるアルデヒド化合物が検出されたことから、大腸菌を用いたタンパク質発現に成功したと判断した。よってこれを用いて、構造の異なるピルビン酸基質を用いて基質スクリーニングを行った。その結果、例えばフェニルピルビン酸脱炭酸酵素とネーミングされているような酵素であっても、もっと小さい化合物を基質として反応を触媒することが可能であるものや、酵素によっては基質特異性が広いもの、また逆に非常に狭いものとバリエーションが有ることが明らかとなった。

構築した 3D 結晶構造モデルを元にした変異体設計戦略を確立することは、学術的に重要である。そこで、次にそれら複数種類の中から 1 つ PDC を選択し、3D 結晶構造モデルの構築および変異体構築と活性測定を行うことで、構造モデルの妥当性について検討を行った。その結果、基質認識に重要なアミノ酸残基を潰す変異を導入した場合、活性の欠落を確認するとともに、いくつかの基質結合部位への変異導入により、天然の基質に対する脱炭酸能力の向上を達成した。

次にこれら酵素活性測定結果とコンピューターシミュレーションソフトを用いて構築した PDC-基質結合構造モデルとの比較を行った。その結果、基質ポケットの大きさによる制限(大き

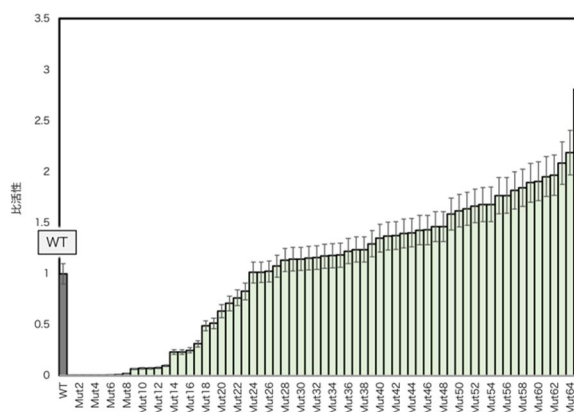
い酵素は比較的広い基質特異性を示す) 結合性残基による制限(たとえば本来 COOH 基を持つような小分子の反応を触媒するようなものは、正電荷を持つ小分子は基質として認識されにくい)などが明らかとなった。特に *in silico* で計算することが可能な酵素-基質間の親和力は、その化合物が基質として認識されうるかを示す重要なファクターであるということが推察された。実際に、活性を示す酵素と基質の組み合わせについては親和力が高いものが多かったが、しかしながら計算された酵素-基質間の親和力が良いものであっても活性を示さないものもあり、さらなるデータ蓄積が必要であると推察された。

◆図1 PDC活性中心モデル



次にその結晶構造を基に、変異体の構築と PDC 変異体の活性測定を行った。その結果、特にフェニルピルビン酸を基質とした場合に、野生型の PDC と比較して約 2.8 倍活性の高い PDC 変異体の獲得に成功した。今回は基質が芳香環を持つような構造であったことから、疎水性アミノ酸残基の導入により、顕著な酵素活性向上が達成された。実際に、計算された親和力変化と比較すると、アミノ酸導入により親和力が向上したものは、酵素活性としても向上しやすい傾向にあることを確認した。しかしながら上記のように、計算値としては活性向上が期待されるアミノ酸変異導入箇所候補が、実際には活性が向上しなかったものもあったことから、単純な親和力以外のファクターも考慮する必要がある。

◆図2 PDC変異体酵素活性測定結果



最後に、実際に、再生可能資源であるグルコースからの物質生産の検討として、上記 PDC 変異体を用いることで、香料にも使用される有用化合物フェニルエタノールの生産を試みた。最後に有用化合物であるフェニルエタノールの生合成により実用可能性を検討する。フェニルエタノールは PDC とアルデヒド還元酵素 (ALR) の反応により、フェニルピルビン酸から 2 段階で生成されるが、生体内に多数存在する類似化合物との競合により PDC の反応が律速であることが知られている。よって改変により活性を向上させるとともに基質を限定することで、反応速度の上昇と競合反応の回避による律速段階の解消を狙う。その結果、野生型の PDC を用いた場合と比較して、1.2 倍程度高い生産量を達成した。酵素活性を行った結果よりも、野生型と比較した活性向上分が低く出てしまっているのは、大腸菌内におけるフェニルピルビン酸生産経路の最適化が不十分で、その結果、十分な基質の供給が行われなかったからかもしれない。今後さらなる検討を行って、培養条件等の最適化の後に論文化を行う予定である。

また直接本申請で用いた PDC ではないものの、同じような脱炭酸反応を触媒する鋳型酵素に対して、本申請で蓄積したデータと酵素変異体の設計戦略を応用することにより、非天然基質に対する酵素活性の向上と、それに伴う有用化合物の生産を達成している。今後、酵素変異体開発の更なる発展によって、化石資源からしか作ることができなかった化合物が一つずつ再生可能資源から生産できるようになることにより、真の持続可能な循環型バイオエコノミー社会の実現が近づくと期待する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mori Yutaro, Noda Shuhei, Shirai Tomokazu, Kondo Akihiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Direct 1,3-butadiene biosynthesis in Escherichia coli via a tailored ferulic acid decarboxylase mutant	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-22504-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森 裕太郎
2. 発表標題 有用物質生産に資する酵素変異体の合理的設計に関する研究
3. 学会等名 酵素工学研究会 第86回講演会
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 サッカロミセス由来フェルラ酸デカルボキシラーゼ変異体、及びそれを用いた不飽和炭化水素化合物の製造	発明者 森 裕太郎, 白井 智量, 和田 理恵子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-172227	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------