

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 25日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20780076

研究課題名（和文）不斉反応を触媒する酵素群の分子育種：非天然アミノ酸
ケミカルライブラリーの構築研究課題名（英文）Molecular breeding of the enzymes catalyzing the asymmetric reaction:
Construction of a chemical library of unnatural amino acids

研究代表者

村松 久司（MURAMATSU HISASHI）

高知大学・教育研究部総合科学系・准教授

研究者番号：90437343

研究成果の概要（和文）：*Pseudomonas putida* 由来の *dpkA* 遺伝子にエラープローン PCR でランダム変異を導入し、耐熱性が向上した変異型酵素 V117M、Q302R を取得した。野生型酵素と耐熱化酵素 V117M、Q302R、V117M/Q302R を精製して機能解析した。耐熱化酵素は野生型酵素よりも温度や pH の変化に対して高い安定性を示したが、基質特異性に変化はなく、様々な *N*-メチル-L-アミノ酸の生産に利用できると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The *dpkA* gene from *Pseudomonas putida* was introduced random mutation by error-prone PCR and the thermostabilized mutant enzymes, V117M and Q302R were obtained. The wildtype enzyme, V117M, Q302R and V117M/Q302R were purified and characterized. The mutant enzymes showed higher thermal and pH stability than wildtype enzyme, but substrate specificities of mutant enzymes did not change. Therefore, the thermostabilized mutant enzymes were useful for synthesis of various *N*-methyl-L-amino acids.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：不斉合成、タンパク質の耐熱化、非タンパク質性アミノ酸、*N*-メチル-L-アミノ酸脱水素酵素、*Pseudomonas putida*

1. 研究開始当初の背景

(1) 工業材料としての非天然アミノ酸

ジペプチド、オリゴペプチド、アミノ酸ポリマーが持つ生理機能や先端ナノ材料としての利用法に関する研究が活発に展開されている。これらの利用範囲はプラスチック、医薬品、繊維、化粧品、先端ナノ材料、食品

加工など多分野に渡り、大きな可能性を持つ新素材として注目を集めている。通常のタンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸以外の非天然アミノ酸をブロックとしてペプチドやポリマーを合成できれば、これまでにない全く新しい機能を有するバイオ素材を創造できる可能性がある。しかし、高キラリティー・高純度の非天然アミノ酸を低価格で安定

供給するのは困難であり、現在のところ、実際に、工業製品の原料として汎用するのは現実的ではない。

(2) II型リンゴ酸・乳酸脱水素酵素ファミリー

II型リンゴ酸・乳酸脱水素酵素ファミリーのタンパク質は常温細菌、超高熱性古細菌、真核生物まで広範な生物種に分布している。また、本ファミリーの酵素は種々の2-オキソ酸を不斉還元し、キラル化合物を生成する共通点がある。2-オキソ酸は、そのカルボニル基を不斉還元すれば、光学活性アミノ酸やヒドロキシン酸などを合成でき、不斉合成システムの出発原料として好都合な化合物の1つである。実際に、本ファミリーに属する酵素DpkAを用いて、医薬品・農薬品の原料として有用な *N*-メチル-L-フェニルアラニン (*TETRAHEDRON:ASYMMETRY*. 15(18), p.2841, 2004) や L-ピペコリン酸 (*Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70(9), p.2296, 2006)、とその類縁体 (*TETRAHEDRON:ASYMMETRY*. 17(12), p.1775, 2006) を高い光学純度で合成できることが報告されている。不斉合成に有用な本ファミリーのタンパク質を改良し、耐熱化や基質特異性・反応性の変換を行えば、様々な非天然アミノ酸の不斉合成システムに利用できると考えられる。

2. 研究の目的

低価格で高キラリティーの非天然アミノ酸を合成する手法の1つとして微生物や酵素による発酵法がある。発酵法による非天然アミノ酸合成を実現するには、高い基質特異性、立体選択性、安定性を持つ酵素が不可欠である。II型リンゴ酸・乳酸脱水素酵素ファミリーには、非天然アミノ酸の不斉合成に利用できることが既に立証されている DpkA など、不斉反応を触媒すると推定される多くの酵素が属している。そこで本研究では、安定性が低い点が課題になっている DpkA を中心に、II型リンゴ酸・乳酸脱水素酵素ファミリーの酵素を利用した非天然アミノ酸ケミカルライブラリーの構築を目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Pseudomonas putida* NBRC100650 由来 *dpkA* 遺伝子発現系の構築

P. putida NBRC100650 の *dpkA* 遺伝子を PCR で増幅し、pET21a(+) の *NdeI*-*HindIII* 部位に挿入した。構築したプラスミドで *Escherichia coli* BL21(DE3) を形質転換して *dpkA* 遺伝子発現系を構築した。

(2) 酵素活性測定

10 mM ピルビン酸ナトリウム、60 mM 塩化メチルアンモニウム、100 mM グリシン-NaOH 緩衝液 (pH 10.0)、0.2 mM NADPH を含む反応液に粗酵素液、または精製酵素を添加して、30°C で加温した。分光光度計で波長 340nm の吸光度の変化を経時的に測定し、NADPH の減少量から *N*-メチル-L-アミノ酸脱水素酵素活性を算出した。

(3) エラープロードン PCR

1×PCR 緩衝液、4 μM dATP、250 μM dGTP、250 μM dCTP、250 μM dTTP、0.335 μM プライマー、3.4 ng 鋳型DNA、0~50 μM MnCl₂、4.2 U *Taq* ポリメラーゼを含む 100 μl の PCR 溶液を 94°C で 1 分間、55°C で 1 分間、72°C で 1 分間の順に加温した。このサイクルを 10 回繰り返した後、PCR 溶液に 250 μM dATP を加えて、さらに、94°C で 1 分間、55°C で 1 分間、72°C で 1 分間のサイクルを 25 回繰り返した。増幅した PCR 産物を pUC18 の *BamHI*-*EcoRI* 部位に連結し、*E. coli* JM109 を形質転換した。

(4) 耐熱化酵素のスクリーニング

形質転換体を 100 μg/ml アンピシリンと 1mM IPTG を含む LB 培地で 19 時間、37°C で振とう培養して、集菌体を 0.5 mg/ml リゾチーム溶液で処理 (37°C、1 時間) し、遠心分離した上清を粗酵素液とした。粗酵素液を 40、45、50°C で 30 分間処理した後、マイクロプレートリーダーを用いて *N*-メチル-L-アミノ酸脱水素酵素活性を測定した。残存活性を野生型酵素と比較して、耐熱性が向上した変異型酵素を選抜した。耐熱性が向上したと判断された変異型酵素を発現する大腸菌株を同様に培養し、集菌体を超音波破碎して粗酵素液を調製し、40、45、50°C で 30 分間処理した後に分光光度計で経時的に *N*-メチル-L-アミノ酸脱水素酵素活性を測定した。野生型酵素と比較して耐熱性が向上した変異型酵素を耐熱化酵素とした。

(5) 部位特異的変異導入

QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE) を用いて、キットに添付されたマニュアルに従って変異を導入した。

(6) 酵素の精製

形質転換体を 100 μg/ml アンピシリンと 1mM IPTG を含む LB 培地で 19 時間、37°C で振とう培養して、遠心分離で集菌体を得た。集菌体を氷上で超音波破碎して遠心分離して粗酵素液を調製した。粗酵素液を Ni-NTA カラムクロマトグラフィーに供し、常法にて酵素を精製した。

4. 研究成果

(1) 耐熱化 DpkA のスクリーニング

dpkA 遺伝子に1クローンあたり1~2カ所の塩基置換がランダムに導入されるようにエラーブローン PCR 条件 (MnCl₂ 濃度、鋳型 DNA 濃度) を最適化した。この方法でランダムに変異が導入された *dpkA* 遺伝子を調製し、pUC18 に連結して *E. coli* JM109 を形質転換して、2,447 コロニーの変異型酵素を発現する大腸菌株を作製した。各コロニーを 100 μg/ml アンピシリンと 1mM IPTG を含む LB 培地で培養した。

① 一次スクリーニング：マイクロプレートリーダーを用いた耐熱化酵素の選抜

変異型酵素を発現する大腸菌集菌体をリゾチームで処理して粗酵素液を調製した。40、45、50℃で粗酵素液を処理した後、マイクロプレートリーダーを用いて *N*-メチル-L-アミノ酸脱水素酵素活性を測定した。なお、酵素活性は、酵素添加直後と 10 分間、30℃で加温した後の吸光度を測定し、測定値の差から算出した。この方法で、2,447 コロニーの変異型酵素ライブラリーから耐熱性が向上したと考えられた 62 コロニーを選抜した。

② 二次スクリーニング：分光光度計を用いた耐熱化酵素の選抜

変異型酵素を発現する大腸菌集菌体を超音波破碎して粗酵素液を調製し、40、45、50℃で処理した後、分光光度計を用いて *N*-メチル-L-アミノ酸脱水素酵素活性を測定した。なお、酵素活性は 30℃で経時的に吸光度の変化を測定し、算出した。この方法で一次スクリーニングで選抜した 62 コロニーから 3 コロニー (D-331、E-129、I-6) を選抜した。

③ 耐熱化酵素の変異箇所

形質転換体 D-331、E-129、I-6 を培養してプラスミドを抽出し、変異型酵素遺伝子の塩基配列を解析したところ、I-6 の変異型酵素遺伝子では、99 番目のシトシンがチミンに、349 番目のグアニンがアデニンに置換されていた。また、D-331 と E-129 の変異型酵素遺伝子では、905 番目のアデニンがグアニンに置換されていた。つまり、I-6 では 117 番目のバリンがメチオニンに置換 (V117M) され、D-331 と E-129 では 302 番目のグルタミンがアルギニンに置換 (Q302R) されたことで耐熱性が向上したと考えられた。以降、それぞれの変異型酵素を V117M、Q302R と示す。また、2つの変異を持つ V117M/Q302R を部位特異的変異導入法で作成し、実験に供した。既に X 線結晶構造解析により立体構造が明らかにされている *P. syringae* pv. *Tomato* DC3000 の A11D の構造 (PDB ID: 1WTJ) と比較する

と 117 番目のバリンはサブユニットの境界面付近に位置し、302 番目のグルタミンはタンパク質表面に位置すると考えられた。

(2) 耐熱化酵素の機能解析

野生型酵素、V117M、Q302R、V117M/Q302R をそれぞれ精製して、諸性質を比較した。

45℃、30 分間の熱処理を行うと、野生型酵素は 3.5% の残存活性を示したが、V117M は 74%、Q302R は 35%、V117M/Q302R は 89% の残存活性を示した。さらに、野生型酵素、V117M、Q302R は 50℃、30 分間の熱処理で完全に失活したが、V117M/Q302R は 53% の残存活性を示した。以上より、熱に対する安定性は、V117M/Q302R > V117M > Q302R > 野生型酵素であることがわかった。(図 1)

pH の変化に対する安定性について調べたところ、30℃、30 分間の処理で、野生型酵素は pH6.5~9.0 の範囲で 80% 以上の残存活性を示したが、V117M は pH6.0~11.0、Q302R は pH6.0~10.5、V117M/Q302R は pH5.0~11.0 の範囲で 80% 以上の残存活性を示し、pH に対する安定性も、V117M/Q302R > V117M > Q302R > 野生型酵素であることがわかった。(図 2)

温度と pH に対する酵素反応速度の依存性について調べたところ、野生型酵素、V117M、Q302R は 40℃、pH9.5 で最も高い活性を示したが、V117M/Q302R は 45℃、pH9.0 で最も高い活性を示した。

2-オキソ酸に対する基質特異性について調べたところ、野生型酵素、3 種類の変異型酵素ともに、ピルビン酸に対して最も高い活性を示した。他に、フェニルピルビン酸、ヒドロキシピルビン酸、フッ化ピルビン酸、2-オキソ酪酸、2-オキソ吉草酸、2-オキソカプロン酸、2-オキソイソカプロン酸といった比較的大きな側鎖を持つ 2-オキソ酸に対しても作用したが、β位に枝分かれ構造を持つ 2-オキソ-3-メチル吉草酸や 2-オキソイソ吉草酸には作用しなかった。アミンに対する基質特異性について調べたところ、野生型酵素、3 種類の変異型酵素ともに、メチルアミンに対して最も高い活性を示し、わずかではあるが、エチルアミンやプロピルアミンに対しても活性を示した。また、野生型酵素と 3 種類の変異型酵素はアンモニアに対して全く作用しなかった。補酵素に対する特異性を調べたところ、野生型酵素、3 種類の変異型酵素ともに、NADPH を良い補酵素とし、NADH を補酵素とした場合にもわずかに活性を示した。

以上の結果から、*N*-メチル-L-アミノ酸合成への利用が期待される耐熱化 DpkA の作製に成功した。これらの耐熱化 DpkA は様々な *N*-メチル-L-アミノ酸の生産に利用できるものと考えられる。

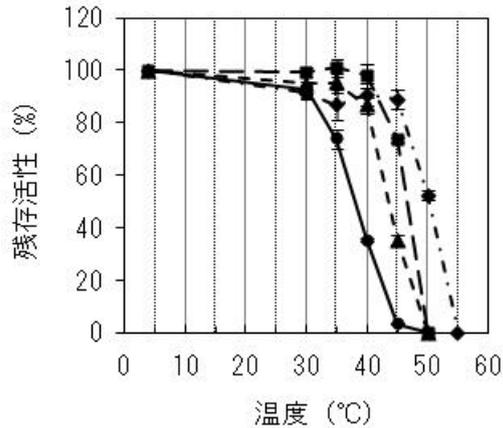


図1. 熱に対する安定性の比較
それぞれの温度で30分間処理した。
●：野生型酵素、▲：V117M、■：Q302R、◆：V117M/Q302R.

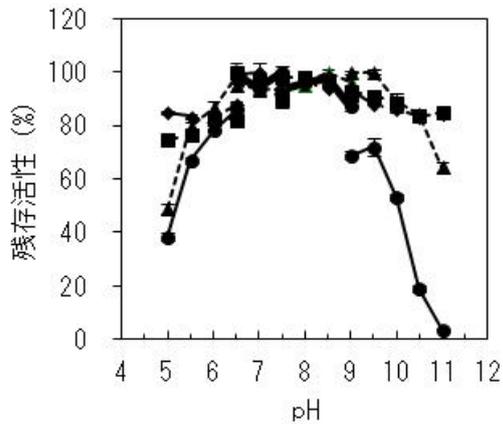


図2. pHに対する安定性の比較
それぞれのpHで30°C、30分間処理した。pH
5.0 - 6.5：酢酸ナトリウム緩衝液、pH 6.5 -
7.5：リン酸カリウム緩衝液、pH 7.5 - 9.0：
トリス塩酸緩衝液、pH 9.0 - 11.0：グリシン
-NaOH 緩衝液。●：野生型酵素、▲：V117M、
■：Q302R、◆：V117M/Q302R.

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)

[学会発表] (計3件)

- ① 松井祐士 (村松久司)、*N*-メチル-L-アミノ酸脱水素酵素の耐熱化、日本生化学会中四国支部例会、2012年5月18日、岡山大学 (岡山県)
- ② 松井祐士 (村松久司)、エラープローンPCRによる *N*-メチル-L-アミノ酸脱水素酵

素の耐熱化、日本農芸化学会中四国支部講演会、2012年1月21日、鳥取大学 (鳥取県)

- ③ 松井祐士 (村松久司)、ランダム変異導入による *N*-メチル-L-アミノ酸脱水素酵素の改変、日本農芸化学会中四国支部講演会、2010年9月25日、香川大学 (香川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村松 久司 (MURAMATSU HISASHI)
高知大学・教育研究部総合科学系・准教授
研究者番号：90437343

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし