

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：23401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658095

研究課題名(和文) ループデザインによる耐熱性好冷酵素の創出

研究課題名(英文) Cold adaptation of thermostable enzymes by surface loops' mutagenesis

研究代表者

日比 隆雄 (Hibi, Takao)

福井県立大学・生物資源学部・教授

研究者番号：00285181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：室温で高活性を示す好冷性酵素は化学反応プロセスの省エネ化への応用が期待される。本研究では、熱安定性を維持しつつ室温で高い酵素活性を示す尿酸酸化酵素W279L+P287G変異体について結晶構造を決定した。得られた立体構造並びに速度解析等の結果から、インターフェースループIIの可動性増大により本酵素が好冷化したことが示唆された。これらの解析結果に基づき、枯草菌由来 α -アミラーゼについて表面ループのヒンジ領域にある7残基に変異を導入した。標的残基のうち5残基の変異で120%-300%デンプン分解活性が増大し、かつ安定な好冷性酵素を得た。

研究成果の概要(英文)：The high activity of psychrophilic enzymes offers potential benefits through substantial energy savings in large-scale chemical processes. Trp279 and Pro287 of *Bacillus* sp. TB-90 uricase were predicted to be located at hinges of the interface loop II. The optimum temperature of the W279L+P287G mutant decreased from 50 degree to 30 degree without loss of its thermal stability. Here, we determined its crystal structure at a 2.1 angstrom resolution. The residues 284-289 were missing and the other residues in the loop showed higher temperature factors. The flexibility of the loop may be responsible for the successful cold adaptation. The saturation mutagenesis studies on seven residues in the surface loops of α -amylase from *Bacillus subtilis* were also performed. Psychrophilic mutants of five residues were obtained by the screening using the starch degradation assay. They showed 120-300% increases of the activities with having kept thermal stability.

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 酵素 分子設計

1. 研究開始当初の背景

好冷性酵素は、一般に室温以下の温度領域で高い活性を示す酵素を指し、食品加工・洗剤・繊維加工・酵素分析など様々な分野で産業応用が期待されている (Filler & Gerday (2003) *Nature Reviews*, **1**, 200-8; Yamagishi (2006) *Netsu Sokutei*, **33**, 2-9)。一般に、好冷性生物由来の好冷性酵素は不安定であるため、これまで遺伝子工学的な手法による好冷性酵素の安定性向上 (D'Amico *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 25791-6) や安定性に優れた耐熱性酵素の低温適応化 (Lönn *et al.* (2002) *Eur. J. Biochem.*, **269**, 157-63) が検討されたが、50 以上での高い熱安定性を持ち、且つ 20 以下で十分高い活性を示す改変酵素は得られなかった。活性化エンタルピーが小さいという好冷性酵素の特徴は、低温でのタンパク質構造の柔軟性が遷移状態の安定化に寄与することで説明され (D'Amico *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 7891-6; Cavicchioli *et al.* (2006) *Methods Microbiol.*, **35**, 395-436)、その結果、熱安定性は犠牲にされたと解釈された。しかし、酵素の不安定性と低温活性の間で厳密な直線的関係は成立せず (Wintrode *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 31635-40) 高い安定性と低温活性の両立が可能かどうかは未解決であった。

申請者らは、*Bacillus sp.* TB-90 由来尿酸酸化酵素ウリカーゼ (Nishiya *et al.* (2000) *J. Anal. Bio-Sci.*, **23**, 443-6) について、表面ループの柔軟性に着目し、その結晶構造に基づいてループ中央のプロリン残基とヒンジ部分のトリプトファン残基 2 残基を選択的に改変することで、至適温度 45 の野性型酵素から至適温度が 20 に大きく低下した変異体酵素を得ることに成功した。本変異体は野性型酵素と同様 65 近傍まで熱安定性を保つことも CD 測定などから示された。

2. 研究の目的

50 以上での高い熱安定性と 20 以下での高い酵素活性をもつ実用的好冷酵素の分子設計支援法の確立のため、ウリカーゼのフレキシブルループ改変により作製した好冷性変異体ウリカーゼ W279L+P287G をモデルとし、好冷化の分子機構の解明を目指した。さらに、枯草菌由来の耐熱性酵素を用いて、蛋白質の表面近傍に存在するフレキシブルループ中のヒンジ領域に相当する残基を選抜して改変酵素を作製し、好冷化の分子設計が可能かどうかについて検証した。

3. 研究の方法

(1) 好冷性変異体ウリカーゼ W279L+P287G の好冷化機構の解析

好冷性変異体ウリカーゼ W279L+P287G を結晶化し、X 線結晶構造解析を実施した。変異体酵素の結晶化は、PEG 8000 を結晶化剤としハンギングドロップ蒸気拡散法により行った。放射光実験施設 Photon Factory のビームライン BL17A において X 線回折強度測定を行った。野性型酵素の結晶構造モデル 1J2G を初期構造とし、好冷化酵素分子の立体構造を決定した。

酵素活性の測定は、尿酸濃度の経時的な減少を測定し求めた。また、活性の温度依存性を調べ、好冷化の機構について速度解析を行った。

(2) 枯草菌由来耐熱性酵素の好冷化の検討

枯草菌ゲノムから α -アミラーゼの遺伝子をサブクローニングした。大腸菌発現系を用い、発現ベクターに組み込んだ酵素を発現・精製を行い、X 線結晶構造解析により分子の立体構造を決定し、既報の枯草菌由来 α -アミラーゼの構造が保存されていることを確認した。表面ループ構造を同定した後、ヒンジ部分の 7 アミノ酸残基について他の 19 種類のアミノ酸に置換した変異体酵素を作製し、それぞれ酵素活性について評価した。

4. 研究成果

(1) 好冷性変異体ウリカーゼ W279L+P287G の好冷化機構の解析

今回得られた 2.1Å 分解能の好冷性変異体ウリカーゼ W279L+P287G と野性型ウリカーゼについて立体構造を比較すると、両者の構造はよく一致した (図 1、ペプチド主鎖の二乗平均偏差は 0.42) が、変異体ウリカーゼではインターフェースループ II (277-300 残基) 中の 8 残基 (283-290 残基) の電子密度が消失していた。

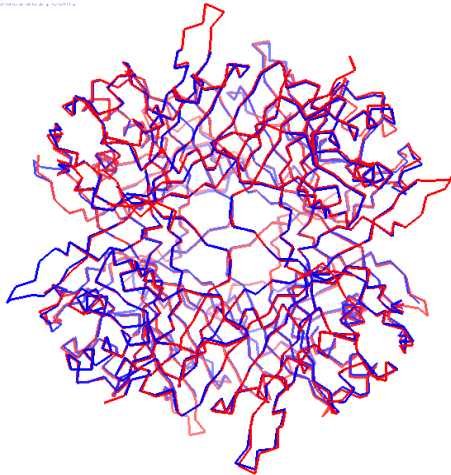


図 1 : bUOD W279L+P287G 変異体(青)と野性型 bUOD (赤) の主鎖構造比較

さらにインターフェースループ II 周囲のアミノ酸残基の側鎖に有意な構造変化が認められた (図 2)。以上の結果から、本ループのコンフォメーションの揺らぎが変異により増大したことが示唆された。

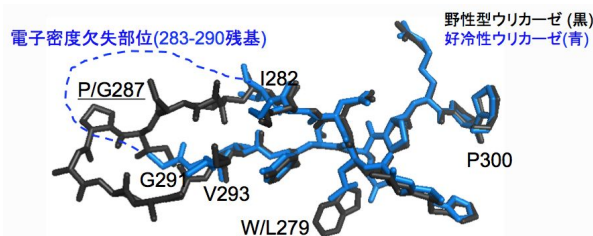


図 2 : 野性型ウリカーゼと好冷性ウリカーゼ変異体のインターフェースループ II の構造比較

次に、酵素反応速度定数の温度依存性を調べた結果、25 未満の低温では頻度因子の増加により活性化するのに対して、25 以上の

高温で活性化エネルギーが低下しており、異なる触媒機構をとることが示唆された。蛍光スペクトルや CD スペクトル測定を行ったが、25 前後での有意な構造変化は認められなかった。

一方、本ウリカーゼの熱安定性を示差走査型熱量測定およびゲルろ過クロマトグラフィーにより分析した結果、四量体である本酵素は熱変性の際に二量体への解離を伴うこと、硫酸イオンの結合がサブユニットの解離を抑制し、熱安定性を上昇させることが示された (Hibi *et al.* (2014) *Biochemistry, in press*)。そこで、野性型ウリカーゼとウリカーゼ W279L+P287G 変異体のサブユニット解離を調べたところ、ウリカーゼ W279L+P287G 変異体のサブユニットの方が解離し易く、温度変化の影響を強く受けることが示唆された。今後、インターフェースループ II 周辺の構造のゆらぎやサブユニット解離と活性化エネルギーの低下の関係について解析することで好冷化機構の詳細を明らかにする予定である。

(2) 枯草菌由来耐熱性酵素の好冷化の検討

枯草菌由来 α -アミラーゼは、デンプンの糖化に用いられる加水分解酵素である。

本酵素の X 線結晶構造解析を行い、分解能 2.3 Å、 $R = 20\%$ 、 $R_{\text{free}} = 26\%$ で立体構造を決定した。この結晶構造に基づいて変異の標的残基として α -アミラーゼ表面ループのヒンジ部分にある 7 カ所のアミノ酸残基について他の 19 種類のアミノ酸残基への置換を行い、各 90 コロニーを選抜し酵素活性について調べた結果、5 カ所の残基の変異体について好冷性変異体候補を得た。それぞれの酵素を精製し、可溶性デンプンに対する比活性を測定したところ、可溶性デンプンに対する加水分解活性が 120% から 300% まで高活性化した好冷性変異体酵素が得られたことが判明した (図 3)。これらの変異体は野性型と同程

度の熱安定性を保持していた。現在、更に変異体酵素の諸性質について解析を行っている。

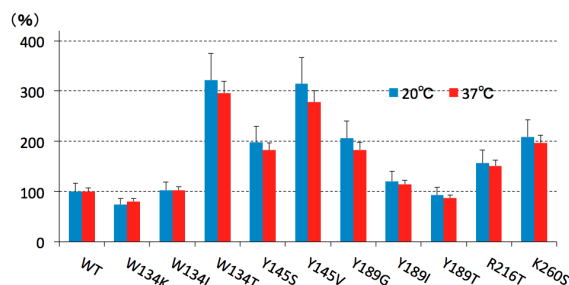


図3：変異体 アミラーゼの酵素活性

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 1件)

Hibi T, Hayashi Y, Fukada H, Itoh T, Nago T, Nishiya Y,

Intersubunit Salt Bridges with a Sulfate Anion Control Subunit Dissociation and Thermal Stabilization of *Bacillus* sp. TB-90 Urate Oxidase.

Biochemistry, 査読有、2014、*in press*

DOI: 10.1021/bi500137b

〔学会発表〕(計 6件)

日比 隆雄、伊藤 貴文、林 祐太、西矢 芳昭 .硫酸イオン塩架橋による *Bacillus* sp.TB-90 ウリカーゼの耐熱化、日本農芸化学会 2014年度大会、2014年3月27日、東京都

日比 隆雄、伊藤 貴文 . 枯草菌由来 - アミラーゼの好冷化変異体作製、2013年度酵素補酵素研究会、2013年6月21日、草津市

日比 隆雄、伊藤 貴文、林 祐太、西矢 芳昭 . 超耐熱型好冷性ウリカーゼを用いた尿酸簡易測定法、日本農芸化学会 2013年度大会、2013年3月25日、仙台市

Takao Hibi, Takafumi Itoh, Yoshiaki

Nishiya, Crystal structure of engineering psychrophilic mutant of *Bacillus* urate oxidase”, AsCA12, 2012年12月、アデーレード(オーストラリア)

小川 智輝、伊藤 貴文、岸本 高英、西矢 芳昭、日比 隆雄 . 耐熱性を有する好冷性変異体 *Bacillus* ウリカーゼの構造機能解析、日本農芸化学会 2012年度大会、2012年3月、京都市

小川 智明、林 祐太、横山 加奈、伊藤 貴文、西矢 芳昭、日比 隆雄、部位特異的変異により作製した超耐熱型好冷性ウリカーゼ、北陸合同バイオシンポジウム 2011年11月、黒部市 .

6. 研究組織

(1)研究代表者

日比 隆雄 (HIBI, Takao)

福井県立大学・生物資源学部・教授

研究者番号：00285181

(2)研究分担者

伊藤 貴文 (ITOH, Takafumi)

福井県立大学・生物資源学部・講師

研究者番号：10402827

西矢 芳昭 (NISHIYA, Yoshiaki)

摂南大学・理工学部・教授

研究者番号：70612307