

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24560966

研究課題名(和文)好熱菌酵素を低温高活性化するためのガイドラインの構築

研究課題名(英文) Establishment of a guideline to improve the low-temperature activity of thermophilic enzymes

研究代表者

赤沼 哲史 (Akanuma, Satoshi)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：10321720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：高い耐熱性を持つが常温・低温での活性が小さい好熱菌酵素の工業利用を推進するには、低温活性の改善法の確立が望まれる。研究代表者は、本研究以前に2つの好熱菌由来脱水素酵素の低温活性を、補酵素との結合に関わるアミノ酸の置換によって改善した。本研究に於いても同様に補酵素結合アミノ酸の置換によって超好熱菌由来グルコース脱水素酵素の低温高活性化に成功した。つまり、補酵素のアデニンと結合する非極性アミノ酸の側鎖体積をメチル基一つ分変化させることによって、多くの好熱菌由来脱水素酵素の低温高活性化が達成できることを明らかにした。この手法によって、これまで以上に酵素の産業利用を推進できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Thermophilic enzymes are generally stable and potentially useful for industrial processes. However, a crucial drawback for their use is that they are often nearly inactive at moderate and low temperatures. I previously reported that a small change in side-chain volume of a non-polar residue that interacts with the adenine moiety of the coenzyme NAD enhances the catalytic efficiency of the thermostable 3-isopropylmalate dehydrogenase and lactate dehydrogenase from the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. In this study, I produced mutants of the glucose-1-dehydrogenase from the hyperthermophile *Sulfolobus tokodaii* in which one of the coenzyme-binding, non-polar residues was replaced by another non-polar residue. Because the mutant showed the improved low-temperature activity, I conclude that a small volume change of a non-polar residue's side chain that interacts with the adenine of NAD(P) in a dehydrogenase will provide a general method to improve its low temperature activity.

研究分野：生体触媒工学

キーワード：酵素工学 好熱菌酵素 酵素利用

### 1. 研究開始当初の背景

酵素は高い基質特異性、反応特異性、環境への低負荷等、工業利用上の多くの利点があるが、安定性の低さがしばしば問題となり、工業利用を妨げている。一方、高温環境に生息する好熱菌が持つ酵素は様々な条件下で安定であり、安定性の問題を克服している。ところが、常温での触媒活性が常温生物由来酵素と比べると著しく小さい場合が多く、この点が利用上の難点である。つまり、天然の酵素は宿主生物の生息環境に極めてよく適応しているがために、かえって工業利用を難しくしている。したがって、酵素の工業利用を推進するには、高い安定性と常温を含む広い温度域で高い活性を持つ酵素を効率よく設計する方法の確立が重要な課題である。

常温生物酵素の安定性を改善するため、国内外の他の研究者や申請者らにより多くの合理的な改良方法が提案されていた。例えば、疎水性相互作用の強化、イオン結合の導入等の安定化要因のアミノ酸置換による導入(1,2、他グループからの報告は、文献(3)を参照されたい)、多量体タンパク質のサブユニット融合(4,5)、祖先型設計(6)といった酵素の安定化法が挙げられる。このうちのいくつかの改良法は、実際に産業酵素の安定化に適用されてきた。しかし、このような設計法ですべての酵素の安定化が達成できるわけではなく、安定化が困難な酵素も多くあった。さらに、個々の効果は必ずしも大きくないため、複数の要因を組み合わせても、常温生物由来酵素に好熱菌酵素並みの安定性を付与することが難しい場合も多く見られた。

逆の発想で、好熱菌酵素の高い耐熱性を損ねずに低温での活性を向上させることによっても、常温で高活性な耐熱酵素を創出できるはずである。少ないアミノ酸置換で耐熱性を損ねずに好熱菌酵素の低温活性を改善した例がこれまでも報告されてきた(7-10)。しかし、これらの研究から推定された好熱菌酵素の低温高活性化の分子機構は様々であり、低温高活性化のための一般則の確立には至っていなかった。さらに、耐熱性の犠牲を払うことなく好熱菌酵素の低温活性を常温生物酵素レベルまで高活性化できるかという問いも未解決であり、「耐熱性と活性の大きさの間のトレードオフ」の有無についても明確な結論が得られていなかった。

### 2. 研究の目的

高温だけに限らず、一般に酵素を失活させる傾向にある様々な条件に対して安定性を示す好熱菌酵素は、潜在的に多くの工業用途が期待できる。ところが、常温での触媒活性の小ささが、しばしば利用の妨げとなってきた。好熱菌酵素の工業利用を全面的に推進するためには、弱点である低温での低い活性を改善する方法の確立が望まれる。本研究では、好熱菌酵素の低温高活性化設計法のガイドラインを確立するため、これまで未解決であった以下の

2つの課題に取り組んだ。

(1) 補酵素のアデニンと接する非極性アミノ酸の置換によって2つの好熱菌脱水素酵素が低温高活性化することが見出されていた(11)。本研究課題では、この改良法が多く好熱菌由来酵素の低温高活性化に有効な general な合理的設計法であるか検証することを目的の一つとした。

(2) 相乗効果が期待される複数のアミノ酸置換を組み合わせることによって、好熱菌酵素の常温での活性を常温生物由来酵素と同程度にまで高めることも本研究課題の目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 好熱菌由来脱水素酵素の補酵素結合、非極性アミノ酸の置換が低温高活性化のための general な改良手法となり得るかを検討するために、*Thermus thermophilus* 由来イソクエン酸脱水素酵素の補酵素結合部位にある非極性アミノ酸を他の非極性アミノ酸に置換した変異型酵素を作製し、25 °Cでの酵素活性を測定した。

(2) 同様の目的で、好熱性古細菌 *Thermoplasma acidophilum* と超好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来グルコース脱水素酵素の補酵素結合部位にある非極性アミノ酸を他の非極性アミノ酸に置換した変異型酵素を作製し、25 °Cでの酵素活性を測定した。低温活性が改善した変異型酵素については熱変性測定もおこない、低温活性の改善が耐熱性の劣化を伴うか検討した。

(3) 「補酵素のアデニンと相互作用する非極性アミノ酸の置換」による低温高活性化設計原理が、「基質の反応前後で変化しない官能基と結合する残基の置換による低温高活性化」へと発展できるかを明らかにするため、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来ラッカーゼについて、メディエータ型基質である ABTS の反応前後で変化しない環状官能基部分と相互作用する非極性アミノ酸を、他の非極性アミノ酸に置換した変異型酵素を作製し、常温での活性の大きさを解析した。

(4) *T. thermophilus* 由来 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の低温高活性化に寄与する複数のアミノ酸置換の効果の加算を検証するため、単独で好熱菌由来 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の低温高活性化に寄与したアミノ酸置換を複数組み合わせることで相乗効果が得られるか検討した。

(5) *T. thermophilus* 由来 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の低温活性をより大きく改善するために、好熱菌 *T. thermophilus* 由来酵素と常温菌である大腸菌由来 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素のアミノ酸配列の比較による高活性化戦略の探索をおこなった。

#### 4. 研究成果

(1) 好熱菌 *T. thermophilus* 由来イソクエン酸脱水素酵素の補酵素のアデニンと結合する非極性アミノ酸であるグリシン 262 をアラニンに置換した変異型酵素 G262A を作製し、精製した。25 での比活性を測定し、野生型酵素の 25 での比活性と比較したところ、G262A 変異型酵素においてわずかに低温活性が改善されたことが観察された。

(2) 好熱菌由来 NAD 依存型グルコース脱水素酵素の補酵素のアデニンと結合する非極性アミノ酸を別の非極性アミノ酸に置換した変異型酵素を作製し、野生型酵素と比較して低温高活性化するか検討した。

好熱性古細菌 *T. acidophilum* 由来 NAD 依存型グルコース脱水素酵素の 192 番目のイソロイシン残基をバリンに置換した変異体を作製し、25 での比活性を測定し、野生型酵素の 25 での比活性と比較した。その結果、変異型酵素においてわずかに低温活性が改善されていた。

さらに、超好熱菌 *S. tokodaii* 由来 NAD 依存型グルコース脱水素酵素のアデニン結合残基であるイソロイシン 189 番をバリンに置換した変異体 I189V と、同じくアデニン結合残基であるバリン 254 番をイソロイシンに置換した V254I 変異体を構築し(図 1) 比活性を解析した。その結果、V254I 変異体の 25 における酵素活性が野生型酵素より向上していることがわかった。さらに反応温度を 10 刻みで 75 まで上昇させて比活性を測定したところ、すべての測定温度で野生型酵素よりも V254I 変異体の方が大きい比活性を示すことが分かった(図 2)。

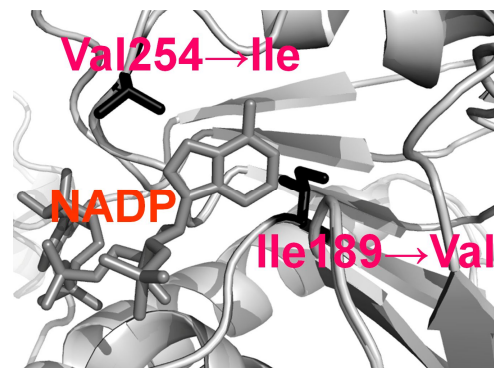


図 1 . *S. tokodaii* 由来 NAD 依存型グルコース脱水素酵素のアデニン結合残基

また、V254I 変異体の熱変性解析を、222 の楕円率の温度変化を測定することによっておこなったところ、野生型酵素と同程度の熱変性温度を保持していることが分かった(図 3)。したがって、耐熱性を犠牲にすることなく低温高活性化が達成できることも明らかにした。

以上の結果から、本研究計画の主要な目的の一つであった、補酵素のアデニンと結合する非極性アミノ酸の側鎖体積をメチル基一

つ分変化させることが、好熱菌由来脱水素酵素の低温高活性化のための general な改変方法となり得ることを明らかにし、論文発表をおこなった(12)。

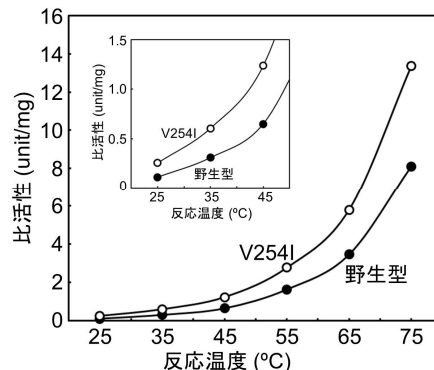


図 2 . *S. tokodaii* 由来 NAD 依存型グルコース脱水素酵素と V254I 変異体の比活性の温度依存性の比較

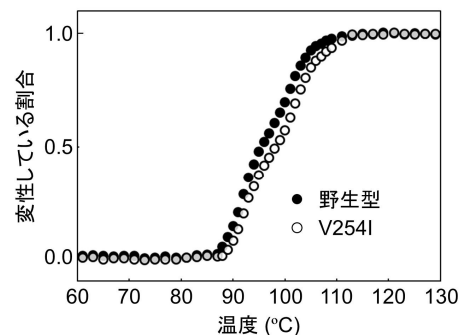


図 3 . *S. tokodaii* 由来 NAD 依存型グルコース脱水素酵素と V254I 変異体の熱変性曲線

(3) ラッカーゼはマルチ銅オキシダーゼに属する酵素で、フェノール性化合物の酸化反応を触媒する。比較的基質特異性が緩く、様々な化合物を基質とすることができ、パルプの漂白、環境汚染物質の分解、バイオ燃料電池の電極への利用が期待されている。しかし、現在注目されている真菌由来ラッカーゼは安定性の低さが利用の妨げとなっている。そこで、好熱菌 *T. thermophilus* 由来ラッカーゼに着目し、低温高活性化を試みた。その際、好熱菌「基質の反応前後で変化しない官能基と結合する残基の置換」によって、好熱菌 *T. thermophilus* 由来ラッカーゼの低温高活性化が達成されるか検討した。ラッカーゼのメデイータ型基質である ABTS の環状官能基部分と相互作用する非極性アミノ酸を、他の非極性アミノ酸に置換した変異型酵素を作製し、40 での比活性の向上の可能性を検討したが、期待された低温高活性化は観察されなかった。そこで、好熱菌野生型ラッカーゼ遺伝子を鋳型に、校正機能を持たない DNA ポリメラーゼを用いた PCR 増幅をおこなうことによって、ランダム変異を導入した。大腸菌を宿主として、変異が導入されたラッカーゼ遺伝子を発現させ、96 ウェルマルチプレート

を用いて 40 における活性を測定したところ、野生型ラッカーゼよりもわずかに比活性が向上した変異体 Val378Ala を得ることに成功した。このアミノ酸置換部位である 378 番アミノ酸はラッカーゼの補因子である銅結合領域にあり、ここでも、補因子との結合に関わる非極性アミノ酸を別の非極性アミノ酸に置換することによって好熱菌酵素の低温活性が改善されることが示された。

(4) 研究開始当初に本研究計画のもう一つの主要な目的に設定した、好熱菌酵素の低温活性を常温菌相同酵素と同程度まで向上させるため、*T. thermophilus* 由来 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の低温高活性化に寄与する複数のアミノ酸置換の効果の加算を検証した。

単独で低温高活性化に寄与したアミノ酸置換を複数個同時に導入した変異体を作製し、解析したところ、検討したすべての組み合わせでさらなる低温高活性化は観察されず、むしろ、検討したすべての組み合わせで、単独のアミノ酸置換に比べ、酵素活性の減少が見られた。この結果は、複数のアミノ酸置換を同時に活性部位近傍に導入すると、活性部位の構造変化が大きくなりすぎるためであると解釈された。補酵素結合残基の置換による低温高活性化が、いずれも側鎖体積のわずかな変化によってもたらされていることから、活性部位近傍に複数のアミノ酸置換を導入することは効果的ではないと結論づけた。多重アミノ酸置換により好熱菌酵素を加算的に高活性化するためには、活性部位から離れたアミノ酸残基の置換を組み合わせる必要があるという指針を確立した。

(5) 好熱菌酵素の低温活性を常温菌酵素と同程度にまで高活性化させるための新たな戦略を確立することを目的として、好熱菌 *T. thermophilus* 由来 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素と常温菌である大腸菌由来 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素のアミノ酸配列を比較した。両者でアミノ酸が異なる部位に、常温菌型のアミノ酸置換を導入する、ただし、活性部位から 0.8nm 以内にあるアミノ酸部位のみ対象とする、③アミノ酸配列および立体構造上で近接するアミノ酸置換は同時に導入する、というルールに従って好熱菌酵素の変異体を作製し、解析をおこなった。

その結果、図 4 に示すように *T. thermophilus* 由来 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の 25 における酵素活性を大きく向上させるアミノ酸置換を同定することに成功し、常温菌由来相同酵素とのアミノ酸配列の比較に基づく、好熱菌酵素を低温高活性化するための新しいガイドラインを構築した。本成果は特許出願した(特願 2014-040270)。

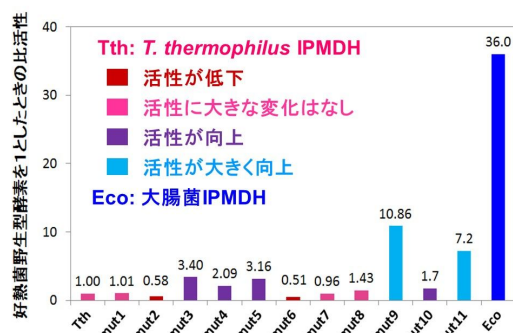


図 4 . 好熱菌 *T. thermophilus* IPMDH の一部の アミノ酸残基を大腸菌 IPMDH の対応する部位に見られるアミノ酸に置換した変異体 (mut1-11) の比活性の大きさの相対値

(6) 本研究の成果をまとめると、当初の目的通り、補酵素のアデニンと結合する非極性アミノ酸の側鎖体積をメチル基一つ分変化させるといふ、多くの好熱菌由来脱水素酵素に適用できる低温高活性化のためのガイドラインの構築に成功した。

低温活性が改善した好熱菌酵素変異体は多くの場合耐熱性を保持したので、耐熱性を犠牲にすることなく、好熱菌酵素の低温活性を改善できることを明らかにした。

加えて、(a) 常温菌由来酵素とのアミノ酸配列の比較をおこなう、(b) 両者でアミノ酸が異なる部位に、常温菌型のアミノ酸置換を導入する、(c) ただし、活性中心から 0.8 nm 以内にあるアミノ酸部位のみを対象とする、(d) アミノ酸配列および立体構造上で近接する部位のアミノ酸置換は同時に導入する、という好熱菌酵素を低温高活性化するための新たなガイドラインも構築した。

#### < 引用文献 >

- Akanuma et al. *Protein Sci.* 7, 698-705, 1998
- Akanuma et al. *Eur. J. Biochem.* 260, 499-504, 1999
- 赤沼 & 山岸 *生化学* 81, 1064-1071, 2009
- Akanuma & Yamagishi *J. Mol. Biol.* 382, 458-466, 2008
- Akanuma et al. *J. Biochem.* 147, 371-379, 2010
- Akanuma et al. *J. Mol. Biol.* 412, 212-225, 2011
- Merz et al. *Biochemistry* 39, 880-889, 2000
- Sriprapundh et al., *Prot. Eng.* 16, 683-690 2003
- Sasaki et al. *Prot. Eng. Des. Sel.* 21, 721-727, 2008
- Zhong et al. *Biotechnol. Bioeng.* 104, 862-870, 2009.
- Hayashi et al., *Biochemistry* 50, 8583-8593, 2011.



Sugii et al., *J. Biosci. Bioeng.* 118, 367-371, 2014.

## 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)

Sugii T, Akanuma S, Yagi S, Yagy K, Shimoda Y, Yamagishi A. Characterization of the low-temperature activity of *Sulfolobus tokodaii* glucose-1-dehydrogenase mutants, *J. Biosci. Bioeng.* 118(4), 367-371 (2014)  
DOI, 10.1016/j.jbiosc.2014.03.002

### [学会発表](計 11件)

赤沼哲史、徳永千尋、下田有希子、木村彦乃、柳生一樹、山岸明彦、「低温高活性化した好熱菌由来脱水素酵素変異体の熱力学的解析」、第12回日本蛋白質科学会年会、2012年6月、名古屋

赤沼哲史、林清香、大貫若菜、徳永千尋、杉井太亮、木村彦乃、坂本さやか、八木創太、横堀伸一、山岸明彦、「酵素の温度適応化：好熱菌酵素の低温高活性化と祖先配列推定による安定化酵素の設計」、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月、神戸

Akanuma S, Yamagishi A. "Enhancing the low-temperature activities of thermophilic dehydrogenases." *Thermophiles* 2013, Regensburg (Germany), September (2013)

赤沼哲史、「進化情報に基づく古代タンパク質の復元とタンパク質設計への応用」、第23回内毒素・LPS研究会、2014年6月、東京

赤沼哲史、木村彦乃、筒井聡志、内山清、八木創太、山岸明彦、好熱菌酵素の効率的低温高活性化改変法の開発、第66回日本生物工学会大会、2014/9、札幌

### [図書](計 2件)

赤沼哲史、山岸明彦、「進化分子工学を利用したタンパク質分子育種技術」、進化分子工学 -高速分子進化によるタンパク質・核酸の開発-、エヌ・ティー・エス、343-353 (2013)

玉腰雅忠、八木創太、赤沼哲史、山岸明彦、「高機能タンパク質創製技術の現状と展望」技術予測レポート 2023 上巻、日本能率協会総合研究所、pp. 80-91 (2013)

### [産業財産権]

出願状況(計 1件)

名称：低温における酵素活性を向上させた好熱菌由来酵素の改変体の取得方法、及び低温における酵素活性が向上しているサーマス・サーモフィラス由来3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の改変体

発明者：赤沼哲史、木村彦乃、山岸明彦、八尾理文

権利者：学校法人東京薬科大学、ユニチカ株式会社

種類：特許

番号：特願 2014-040270

出願年月日：平成 26 年 3 月 3 日

国内外の別：国内

### [その他]

ホームページ等

<http://www.f.waseda.jp/akanuma/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

赤沼 哲史 (AKANUMA Satoshi)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：10321720