

アリアルマロン酸脱炭酸酵素の機能改変 —合理的デザインによる立体選択性の逆転と劇的活性向上—

宮本 憲二

近年、進化分子工学的手法による酵素の機能改変が盛んに行われている。そして、構造情報を参考にした合理的デザインにより、立体選択性の向上や基質特異性の改変などの機能改変ができるようになってきた。しかし、機能向上を目的に作成された大半の変異酵素は、野生型と比較して活性が低下する問題点があった。一方で、変異酵素の触媒活性の向上は、いまだ解決されていない課題として残されている。なぜなら、活性と構造の相関は複雑であり、十分に理解されていないからである。

本稿で対象とする酵素は、非天然化合物であるアリアルマロン酸(1)に作用し、光学的に純粋な α -アリアルプロピオン酸(2)へと変換する能力を持っている(図1)¹⁾。活性の発現に補酵素も必要でなく、定量的な収率で光学的に純粋な生成物が得られるため物質生産の観点からも注目されている。

筆者らは、配列や構造情報に基づいて本酵素に最小限の変異を導入することにより、従来合理的デザインでは困難と考えられていた立体選択性の逆転や酵素活性の向上に成功したので紹介したい。

アリアルマロン酸脱炭酸酵素

全国各地の土壌から、フェニルマロン酸(3)を単一炭素源として集積培養を行い、フェニルマロン酸資化能を持つ土壌細菌 *Alcaligenes bronchisepticus* を分離した²⁾。この株から無細胞抽出液を調製し、フェニルマロン酸に作用させたところ、脱炭酸生成物であるフェニル酢酸の生成を確認した。培養条件を検討したところ、本酵素はフェニルマロン酸によってのみ誘導される誘導酵素であった。そこで、各種クロマトグラフィーにより本酵素を均一に精製し、酵素学的特徴を明らかとした。その結

果、分子量約24,000のモノマー酵素であり、活性の発現に補酵素を要求しない新奇な脱炭酸酵素であることがわかった³⁾。基質特異性を調べたところ、二置換より一置換のアリアルマロン酸の方が高い反応性を示したことから、「アリアルマロン酸脱炭酸酵素(以下AMDase)」と命名した。現在では、[EC 4. 1. 1. 76]に分類されている。

ゲノムDNAのショットガン法により、AMDase遺伝子を取得した。シーケンスの結果、720 bpのORFがコードするタンパク質の分子量は24,737であり、*A. bronchisepticus*から精製したAMDaseの分子量(約24,000)とよく一致した。また、ORFより推定されるタンパク質のN末端配列は、精製酵素からエドマン分解法により決定した配列と完全に一致した⁴⁾。以上の結果から、本ORFがAMDaseをコードしていることがわかった。また、大腸菌における過剰発現にも成功し、機能改変への準備が整った。

阻害実験からシステイン残基が活性中心に存在することが示唆された。そこで、酵素内のシステインをアラニンに置換した変異体を作成し活性を測定したところ、188番目のシステインが活性の発現に深く関与していることがわかった⁵⁾。さらに、反応の詳細なメカニズムを明らかとするために、プロキラルなカルボキシル基の一方を¹³Cでラベルした光学活性な基質を合成し酵素反応を試みた(図2)。その結果、脱炭酸反応は完全に立体反転により進行しており、脱炭酸後に生成したエノール型の中間体に対して、システインから面選択的なプロトン化が起こっていることがわかった⁶⁾。

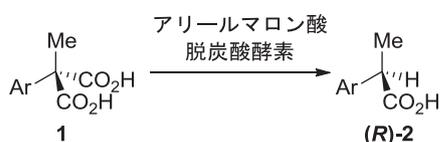


図1. アリアルマロン酸脱炭酸酵素による不斉脱炭酸反応

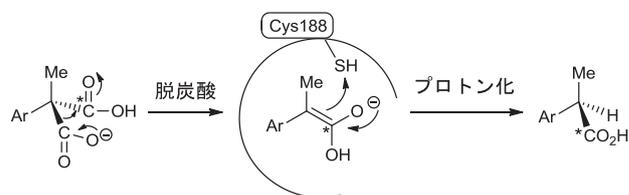


図2. 脱炭酸反応のメカニズム

著者紹介 慶應義塾大学理工学部生命情報学科(准教授) E-mail: kmiyamoto@bio.keio.ac.jp

立体選択性の逆転

我々の見いだしたAMDaseはR体のカルボン酸のみを生成するが、逆の選択性の酵素があればさらに汎用性が高まると考えられる。そこで、S体選択性AMDaseを求めて、我々を含めた複数の研究機関でスクリーニングが実施された。しかし、R体選択的な酵素はいくらでも見つかるものの、S体選択的AMDaseはいまだ報告されていない。そこで、自然界にないものは自分の手で創り出すしかないと考えて、立体選択性の逆転に挑戦した。

AMDaseの配列を用いてホモロジー検索を実施したところ、アミノ酸ラセマーゼやイソメラーゼと低いながらも相同性を示した(図3)。アミノ酸ラセマーゼに関しては詳細な反応機構が解明されており、2つのシステインが共同してプロトンの引き抜きと供与を行う二塩基機構が提唱されている(図4)。

AMDaseとラセマーゼの配列を比較すると、AMDaseの活性中心にはシステインが一つしか存在しないことがわかる。そこで、エノール型中間体に対して一方の面からのみシステインがプロトン供与を行い、光学活性なカルボン酸が生成するのではないかと推定した。

酵素の立体選択性を逆転することは、酵素の機能改変の中でもっとも困難な課題の一つである。AMDaseの立体選択性を逆転する場合、以下の二つの方法が考えられる(図5)。

一つは、基質のフェニル基とメチル基が入るバイディングサイトに変異を導入し、ポケットへの入り方を反転することである。しかし、この方法ではポケットの大規模な改変が必要であり難易度は非常に高い。二つ目は、プロトン供与を行うシステインの位置をエノール中間体の逆側に移動することである。この場合、188番目のシステインをプロトン供与能の低いものに置換し、反対側にシステインを導入するだけで比較的単純である。問題は移動先の特定であるが、アミノ酸ラセマーゼとの配列比較から74番目のグリシンに注目した(図3)。このようなデザインを基に二重変異体(G74C/C188S)を作成し反応を試みた。すると、期待通り野生型AMDaseとまったく逆の選択性を示したが、その活性は野生株の約1/20,000に低下していた⁷⁾。

酵素に変異を導入するとしばしば酵素活性の低下という深刻な問題に直面する。配列や構造からデザインして酵素活性を向上できればよいが、現時点では非常に困難である。そこで、Random Mutationによる活性の向上を試みた。変異導入には、修復系の遺伝子が欠損した

Glu racemase	--MDNRP--VKMMVVA	C	NTATAAA--VKTLMG	C	THFFFLAP~
Asp racemase	---MEN--PNFIVLT	C	NTAHYFF--CEKVLG	C	TELSLMNE~
Hydantion racemase	---M--VDAFVIA	C	---WG--AEAILG	C	AGMAEFAD~
Maleate isomerase	---MKTY--MSVMAYA	C	LVATMAQ--DAVILSA	C	VQMPSLPA~
AMDase	MQQASTP--AAVVSIM	G	TSLSFYR--SDGILLS	C	EGLLTLDA~
			74		188

図3. AMDaseとラセマーゼの配列比較

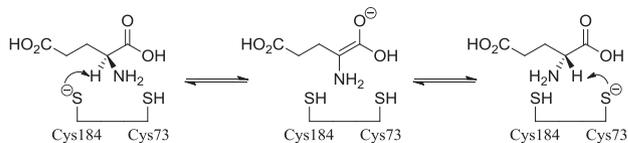


図4. アミノ酸ラセマーゼの反応機構

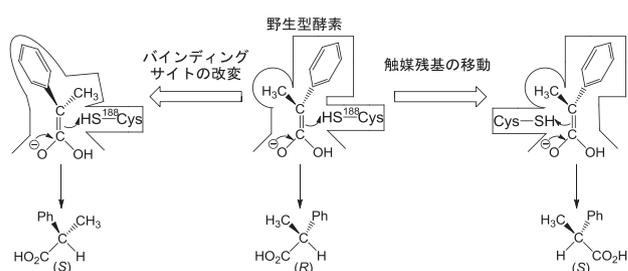


図5. 立体選択性の逆転のコンセプト

Mutator Strainを用いた。AMDase遺伝子を含むプラスミドでStratagene社製*E. coli* XL1-Redを形質転換し、数回植え継ぐことでランダムに変異を導入した。得られた変異を含むプラスミドを用いて発現用の大腸菌を形質転換した。そして、脱炭酸活性を色の変化で識別可能なプレートを用いて約5万株のスクリーニングを行ったところ、1株がヒットした。配列を解析したところ、二重変異体(G74C/C188S)に対して新たにG36N変異が導入されており、活性の向上率は約10倍であった⁸⁾。このようにランダム変異ライブラリーから活性の向上した変異体は得られたが、その向上率は高くなくヒットの効率も低いものであった。改めて、変異導入による活性向上の困難さを痛感させられた。

構造解析と反応機構

我々⁹⁻¹⁰⁾と他のグループ¹¹⁻¹³⁾は、独立にAMDaseのX線結晶構造解析に成功した。我々は、野生型AMDaseだけではなく、立体選択性の逆転した変異型についても構造解析に成功した。その結果、野生型と変異型の活性部位は、ほとんど変化がないことがわかった。また、基質が活性部位に結合することにより、開いた構造から閉じた構造に変化することが明らかとなった。そして、代

特 集

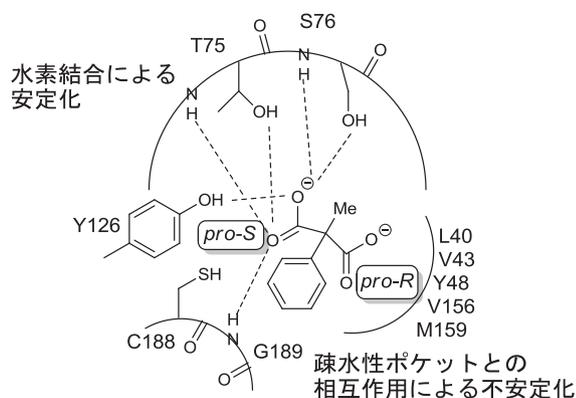


図6. AMDaseの活性部位の構造

表的な基質である α -フェニル- α -メチルマロン酸(4)を用いて結合モデルを作成し、反応機構を考察した。その結果、基質が活性部位へ入り、*pro-S*のカルボキシル基が水素結合により安定化される。すると、酵素が構造変化を起こし、L40などによって構成される疎水性ポケットが極性の高い*pro-R*のカルボキシル基に接近する。それにより*pro-R*のカルボキシル基の不安定化が起こり、それがトリガーとなり炭酸反応が始まる。そして、生成したエノール型中間体に対して188番目(G74C/C188S変異体では74番目)のシステインがプロトン供与を行い、光学活性カルボン酸が生成するという反応メカニズムを推定することができた(図6)。

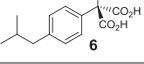
合理的デザインによる酵素活性の向上

詳細な立体構造と反応メカニズムが明らかとなったので、合理的デザインによる酵素活性の向上にチャレンジした。G74C/C188S変異型をテンプレートとして分子進化を行った。迅速に優れた変異体を取得するために、脱炭酸に伴うpH変化を高感度で検出するアッセイ系を考案した。そして、96穴プレートを用いるハイスループットスクリーニング系を構築した。スクリーニングには、脱炭酸活性の低い変異体でも検出可能な基質であるフェニルマロン酸(3)を用いた。最初に、188番目のSerが立体的に大きすぎるのではないかと考えて、この残基をターゲットとしNNKコドンを用いたsite-saturation mutagenesisを行った。その結果、相対活性が5.6倍向上したG74C/C188G変異型を得た。次に、脱炭酸反応のトリガーとして重要な働きをしている疎水性ポケットをリデザインすることにした。具体的には、疎水性ポケットを構成する残基(L40, V43, Y48, L77, V156, M159)をターゲットとしたsite-saturation mutagenesis

表1. 変異体と比活性

Variant	Specific activity (U/mg)	
		
G74C/C188S	0.040	0.0015
G74C/C188G	0.10	0.010
G74C/C188G/Y48F	0.82	0.014
G74C/C188G/M159L	6.2	1.3
G74C/C188G/Y48F/M159L	24	0.63
Wild-type	550	13

表2. 高活性型変異体の基質特異性

Variant	Specific activity (U/mg)	(Relative activity (%))
		
G74C/C188S	0.11 (0.13)	No reaction (0)
G74C/C188G/M159L	7.35 (8.4)	0.20 (37.7)
G74C/C188G/M159L+1 変異	7.43 (8.5)	0.39 (73.6)
G74C/C188G/M159L+3 変異	16.8 (19.2)	1.34 (253)
Wild-type	87.5 (100)	0.53 (100)

を行った。その結果、フェニルマロン酸に対する相対活性が210倍向上した3重変異型(G74C/C188G/M159L)と、920倍向上した4重変異型(G74C/C188G/Y48F/M159L)を得ることに成功した¹⁴⁾。しかし、光学活性体が生成する基質である α -フェニル- α -メチルマロン酸(4)に対する反応性を調べたところ、フェニルマロン酸にはもっとも高活性であった4重変異体より3重変異体(G74C/C188G/M159L)の方が高いことがわかった(表1)。これは、フェニルマロン酸を用いてスクリーニングしたため、フェニルマロン酸に最適化された変異体が得られたと考えられた。そこで、進化の方向性を光学活性体の製造に適するようにするために、スクリーニング条件を変更した。すなわち、スクリーニング基質として α -フェニル- α -メチルマロン酸(4)を用いて、現時点で α -フェニル- α -メチルマロン酸に対する活性がもっとも高い3重変異体(G74C/C188G/M159L)をテンプレートとして高活性変異体の探索を行うこととした。

疎水性ポケットをターゲットとして数ラウンドの変異導入と活性スクリーニングを行った(表2)。その結果、2重変異体(G74C/C188S)と比較して相対活性が9500倍に上昇した6重変異体を取得することに成功した(投稿中)。この6重変異体は医薬品として利用可能な高

いアリアル基(5, 6)を持つ基質に対しても高い活性を示した。特に、非ステロイド系抗炎症薬であるイブプロフェンが生成する基質(6)に対して、6重変異体は野生型より253%も高い活性を示した。

まとめ

以上述べてきたように、合理的デザインにより従来困難と考えられていた、酵素機能の改変に成功した。そして、活性部位のリデザインを行うことにより、触媒活性を向上できることを示すことができた。さらに、野生型酵素と立体選択性が逆で、尚かつ比活性において野生型を凌駕する変異体を創出することに成功した。

本稿で紹介した研究は、慶應義塾大学理工学部で行われたものであり、太田博道 慶應義塾大学名誉教授をはじめとした共同研究者や実際に手を動かしてくれた多くの学生の皆様に感謝致します。なお、研究の一部は文部科学省科研費補助金基盤研究(B)の助成のもとで行われたものであり、ここに感謝致します。

文 献

- 1) Miyamoto, K. and Ohta, H.: *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 4077 (1990).
- 2) Miyamoto, K. and Ohta, H.: *Biocatalysis*, **5**, 49 (1991).
- 3) Miyamoto, K. and Ohta, H.: *Eur. J. Biochem.*, **210**, 475 (1992).
- 4) Miyamoto, K. and Ohta, H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 234 (1992).
- 5) Miyazaki, M. *et al.*: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **70**, 2765 (1997).
- 6) Miyamoto, K. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 6256 (1992).
- 7) Terao, Y. *et al.*: *J. Mol. Catal., B Enzym.*, **45**, 15 (2007).
- 8) Terao, Y. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73**, 647 (2006).
- 9) Nakasako, M. *et al.*: *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **F64**, 610 (2008).
- 10) Obata, R. and Nakasako, M.: *Biochemistry*, **49**, 1963 (2010).
- 11) Okrasa, K. *et al.*: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **48**, 1 (2009).
- 12) Okrasa, K. *et al.*: *Chem. Eur. J.*, **14**, 6609 (2008).
- 13) Kuettner, E. B. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **377**, 386 (2008).
- 14) Miyauchi, Y. *et al.*: *Chem. Commun.*, **47**, 7503 (2011).