



## 産業用酵素群の実用化を指向した酵素科学・工学的研究

名古屋大学大学院生命農学研究科 応用生命科学専攻・講師 ガムナニョヴィッチ ヤスミナ

## はじめに

自然界に存在する酵素は、それぞれの生命環境下で適切に機能するように、その触媒活性、基質特異性、安定性などが進化してきた。近年のタンパク質工学の進展により、それらの酵素の特性は、我々が望むように改変可能となっている。一般的には、3つの主要な戦略、すなわち合理的設計、定向進化、半合理的設計が用いられてきた。合理的設計とは、部位特異的に選択されたアミノ酸残基を他の残基に置換することにより機能を変化させる試みであり、構造と機能の関係を正確に理解することに依存する。定向進化は、ランダム変異とクローン選択を繰り返す手法であり、ハイスループットなスクリーニングシステムが必要になる。一方半合理的設計は、酵素遺伝子の選択された位置に対する部位飽和突然変異をランダムに誘発し、その後スクリーニングを行うものである。この戦略は、合理的設計の大きなボトルネックである構造-機能関係に関する知識に部分的にしか依存せず、また、ライブラリーサイズが小さくスクリーニングが容易な「フォーカスライブラリー」を用いることが可能である。

著者はこれまで、上記の3つの戦略とさまざまなスクリーニング技術を組み合わせて、酵素に対するタンパク質工学・酵素工学的な研究を行ってきた。まず多様なリン脂質の精密合成を目的として、微生物由来ホスホリパーゼDのトランスホスファチジル化反応を対象に、その耐熱性の向上、基質特異性の改変に成功した。次に筆者は、トランスグルタミナーゼの基質プロファイリング解析を目的として、一分子ディスプレイと次世代シーケンシングとバイオインフォマティクスを組み合わせたシステムを開発した。現在この手法を基盤として、酵素活性を指標とした分子選択が可能な一分子ディスプレイプラットフォームの開発を進めている。本稿では、これらの試みの中で、いくつかのトピックスに絞って解説する。

## 1. ホスホリパーゼD (PLD) のタンパク質工学とその生理活性リン脂質合成への応用

## 1-1. 熱安定性のため PLD のタンパク質工学

1-ホスファチジルイノシトール (1-PI) は、血中のコレステロールを減少させ、代謝症候群の症状を緩和する価値のある機能性リン脂質である。しかしながら1-PIの工業生産は、化学合成は複雑な工程が必要のため大変高価であり、天然資源からの抽出も収量が低く困難であった。そこで、著者の博士論文の指導教員である岩崎教授は、安価なホスファチジルコリンと

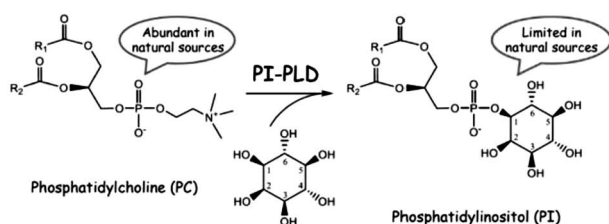


図1. 進化工学的手法で得たPI-PLDを触媒とする1-PIの酵素合成。

*myo*-イノシトールから1-PIを合成できるPI-PLD酵素を進化工学的手法によって開発した(図1)(1)。このPI-PLDは、熱安定性を向上させるために、熱揺らぎを示すB因子が高いアミノ酸に相当する位置にランダムな変異を導入し、熱安定性を高めた。複数の変異体(D40HおよびT291Y)が得られた(2)。さらなる熱安定化を目指して、D40を含むタンパク質表面の柔軟なループの除去により、70°Cでの活性半減期を11.7倍増加させた(3)。PI合成は熱安定性PI-PLDを使用することで、高温で行うことが可能になり、PI収量は最大2倍増大した。

## 1-2. PLDの基質特異性を改変するためのPLDのタンパク質工学

イノシトールには6つのOH基があるが、天然のPIは、リン脂質部分がイノシトールの1-OH基が結合した1-PIである。しかし、変異型PI-PLDは、1-PI以外の構造異性体を合成していた。そこでPI-PLDの基質結合領域への変異導入により、1-OHに対する位置特異性の向上を試み、異性体純度97%で1-PIを生産できる1-PI特異的PI-PLD(G186T, W187N, Y191Y, Y385R)を開発し、純度97%で1-PIを生産できた(4)。興味深いことに、反応温度を下げると、異性体純度が向上した(図2)。さらに、1-PI特異的PI-PLDとの反応系を最適化し、1-PIの収量を約35%にまで向上させることができた(5)。1-PI特異的PI-PLDの立体構造解析により、野生型と1-PI特異的PI-PLDの間の基質結合様式と活性部位の大きさに顕著な違いがあることを明らかにした(6)。さらに、1-PI特異的PI-PLDは、結合する基質によって、触媒機構がメインルートから、異なる化学反応によって進行する代替ルートに切り替わることが示唆された。

また、他のPI-PLD変異体を利用して、希少生理活性リン脂質である、1-ホスファチジル-β-D-グルコース(7)やホスファチジルトレオニン(8)の酵素合成も成功した。ホスファチジルトレオニンは生物学的に活性なリン脂質で、トレオニンがリン脂質骨格に結合している。野生型PLDは、ホスファチジルコリンとトレオニンからホスファチジルトレオニンを合成することは、*myo*-イノシトールの場合と同様に、立体障害により不可能であった。しかしながら、W187FとY385Lの変異を持つPI-PLDは、30%の収率でPTを合成することができた。興味深いことに、PI-PLDは4つのスレオニン異性体(L-Thr, D-Thr, L-*allo*-Thr, D-*allo*-Thr)のうち、D-Thr以外の3つの異性体を受け入

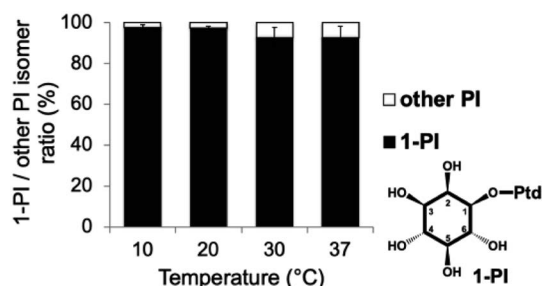


図2. 異なる温度で1-PI特異的PI-PLDによって合成されたPIの異性体純度(参考文献4より転載)。

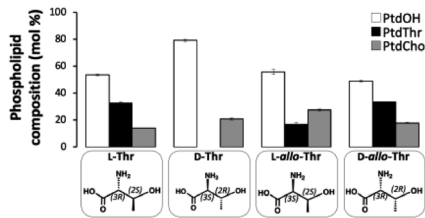


図3. 4種のトレオニン立体異性体からのホスファチジルトレオニン (PtdThr) の合成。白, 黒, および灰色のカラムはそれぞれホスファチジン酸 (PtdOH; 副生物), PtdThr, およびホスファチジルコリン (PtdCho; 基質) を示す (参考文献8より転載)。

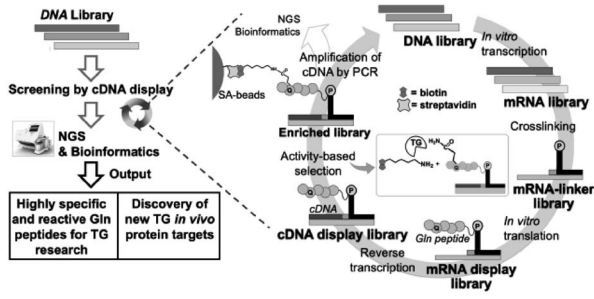


図4. TG基質プロファイル解析のための *in vitro* セレクションシステムの概要 (参考文献9より転載)。

ることができた (図3)。ドッキングシミュレーションの結果, D-Thr と PI-PLD は, 反応性の-OH基が触媒残基の反対側を向いた非生産的な配向で結合することが明らかになった。

## 2. 一分子ディスプレイ法を駆使したトランスグルタミナーゼの網羅的基質特異性解析

トランスグルタミナーゼ (TG) は, 多くの生理学的過程や疾患において役割を持ち, またタンパク質架橋酵素として近年非常に注目されている酵素群である。トランスグルタミナーゼの研究を進めるとともに, その利用技術を開発するためには, その基質プロファイルに関する網羅的な解析が必要である。そこで, mRNA/cDNA ディスプレイ技術に, 次世代シーケンシング (NGS) およびバイオインフォマティクスを組み合わせた解析系を構築した (図4)。mRNA/cDNA ディスプレイは, 無細胞タンパク質合成系を利用して遺伝情報 (mRNA または cDNA) とタンパク質との間に物理的なリンクを形成する一分子ディスプレイ技術であり, 原理的に究極的なライブラリーサイズと, 迅速な選択 (最大 $10^{14}$ の異なるペプチド・タンパク質とその遺伝情報を同時に, 数日で選択できる) が可能である。

本手法により, TG ペプチド基質のランダムライブラリーを作製し, 各種 TG と反応させてその反応性を解析し, TG2 (9) および TG1 (10) の包括的な基質プロファイルが得られた (図5)。この情報を用いることで, 各 TG アイソザイムに対して高い反応性と特異性を有する TG ペプチド基質を開発した。さらに解析によって得られた基質プロファイルを用いてヒトプロテオームに適用することで, TG2 および TG1 に対する既存の標的タンパク質分子を検出しただけなく, これまで知られていなかった新規な標的タンパク質分子候補を特定した。

おわりに

PLD 研究においては, わずか数アミノ酸の変異の組み合わせにより, 酵素の性質は大きく変えられることを実感した。さら TG 基質プロファイリングの研究行い, 一分子ディスプレイシステムと NGS・バイオインフォマティクスの組み合わせは, 非常に効率的な解析手法を提供してくれることを目の当たりにした。そして一分子ディスプレイ技術・NGS 解析・バイオ

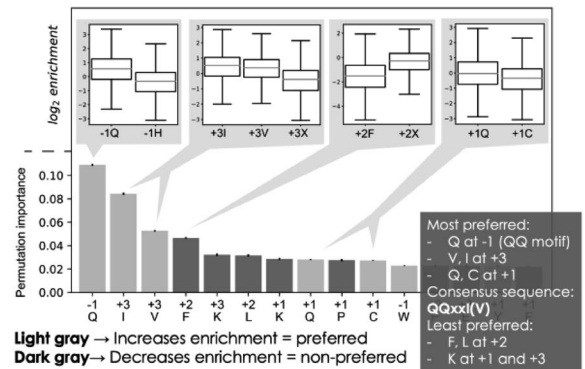


図5. TG2基質プロファイルのバイオインフォマティクス解析結果 (参考文献9より転載)。

インフォマティクスの組み合わせは, 酵素研究のみならず, タンパク質工学の究極のアプローチになりうると確信した。

現在, 筆者は mRNA/cDNA ディスプレイを基盤とした, Single Molecule Assay on Ribonucleic acid by Translated product (SMART 技術) と名付けた新しい技術コンセプトを開発している。酵素活性を活性酵素ディスプレイ複合体のビオチン化に変換する特別な補助ユニットを一分子ディスプレイ系に組み込むことで, 一定の選択条件下で触媒活性を示す酵素分子のみを, 最大 $10^{14}$ の変異体プールからその遺伝情報である mRNA/DNA とともに濃縮することができる。

SMART 技術は, ヒドロラーゼ, トランスフェラーゼ, オキシドレダクターゼなどの酵素を対象として, 実証実験を進めている。これが可能になれば, 変異体酵素の安定性, 基質特異性などの改善を目指した, タンパク質ライブラリーの, 膨大な変異ライブラリーからのセレクションやインフォマティクス解析が効率化され, 酵素科学の発展に貢献するとともに, その産業利用をより強力に援護できると考えている。

## (引用文献)

- Masayama et al., ChemBioChem, Vol.9, 974-981, (2008).
- Damnjanovic et al., Protein Eng. Des. Select., Vol. 25, 415-424, (2012).
- Damnjanovic et al., Biotechnol. Bioeng., Vol.111, 674-682, (2014).
- Damnjanovic et al., Biotechnol. Bioeng., Vol.111, 62-71, (2016).
- Muraki et al., J. Biotechnol. Bioeng., Vol.122, 276-282, (2016).
- Samantha et al., Biochem. J., Vol.478, 1749-1767, (2021).
- Inoue et al., ChemistrySelect, Vol.1, 4121-4125, (2016).
- Damnjanovic et al., Eur. J. Lipid Sci. Technol., Vol.120, 1800089, (2018).
- Damnjanovic et al., Sci. Rep., Vol.12, 13578, (2022).
- Munaweera et al., bioRxiv, <https://doi.org/10.1101/2023.10.22.563423>, (2023).

謝辞 良い時も辛い時も, 親身になって研究を支えてくれた恩師や同僚たちに, 心から感謝したい。名古屋大学の中野秀雄教授, 中部大学の岩崎雄吾教授, 名古屋大学の人見清隆教授, 埼玉大学の根本直人 教授, 名城大学の児島孝明准教授, 名古屋大学のハマニヤ・マウリツィオ 博士, 東京工業大学の朱博 博士, 西オーストラリア大学のヴリーリンク・アリス教授, 西オーストラリア大学のアリエラ・サマンサ博士, 名古屋大学の加藤晃代 助教, そして多くの指導学生の協力なくしては, このような成果は得ることはできませんでした。またジーンフロンティアの金森 隆志博士には, PUREflex の試薬と, 試験管内翻訳に関する貴重な示唆を提供してくださったことに大変感謝しています。