

学位論文題名

X線結晶構造情報に基づいた酵素の高機能化とその応用に
関する研究

学位論文内容の要旨

タンパク質の構造情報は、近年飛躍的に増加し、Protein Data Bank (PDB) に現在登録されている構造も 9 万近くまで増加している。酵素の高機能化を目指す場合、ランダム変異導入法等の手法が一般的であるが、近年、タンパク質の構造情報を用いた基質特異性や活性の向上を目指した改変が積極的に検討されてきており、今後、ますますその応用が増えてくるものと予想される。筆者は産業用酵素の中でも血糖値測定用の酵素として実際に応用が期待されている *Bacillus megaterium* IAM 1030 由来 NAD(P)⁺依存性グルコース脱水素酵素 (BmGlcDH)、および骨粗しょう症治療薬として使用される活性型のビタミン D₃ (VD₃) を不活性型から水酸化反応により活性型に変換する希少放線菌 *Pseudonocardia autotrophica* 由来 VD₃ 水酸化酵素 (Vitamin D₃ hydroxylase; シトクロム P450 Vdh) の構造と機能解析に関する研究を行ってきた。

Bacillus 属細菌由来 NAD(P)⁺依存性グルコース脱水素酵素は現在、血糖値診断用酵素として利用されている。*B. megaterium* IAM 1030 は 4 つの NAD(P)⁺依存性グルコース脱水素酵素 (BmGlcDH-I、-II、-III、-IV) を有しており、これらの酵素は短鎖型脱水素酵素／還元酵素ファミリーに属している。BmGlcDH は、単一成分（分子量 28 KDa）からなる四量体構造を示す事が報告されている。*B. megaterium* IAM 1030 の 4 種のアイソザイムのうち、BmGlcDH-IV は、比較的热安定性が高く、活性も高いが、D-グルコース以外の糖にもわずかに反応する為、より基質特異性が向上した酵素の取得が求められていた。そこで、BmGlcDH-IV の基質複合体の X 線結晶構造解析を行い、基質特異性改変に向けた基盤情報の取得を行った。その結果、基質フリー、NADH 複合体、D-グルコース複合体の X 線結晶構造解析を行う事が出来た。興味深い事に、酵素-D-グルコース複合体の構造では、隣のサブユニットの C-末端が活性部位に入り込むように伸びてきており、D-グルコースの C4、C6 の水酸基と直接水素結合している事が明らかとなった。そこで、BmGlcDH-IV の C-末端の G261、G259、A258 に部位特異的な変異導入を行う事により、C-末端構造を不安定化させ基質特異性の向上を目指した。合計で 6 種の変異体 (G261A、G261V、ΔG261、G259A、G259V、A258F) を構築し、基質特異性、活性、熱安定性を調べたところ、G259A 変異体が熱安定性や活性を維持しつつ、最も優れた基質特異性を示した。このことから、C-末端部位へ飽和変異導入等を行う事により、さらなる高機能化変異体を取得できる可能性が示された。

シトクロム P450 はオキシゲナーゼの一種であり、2 つの電子を使って還元的に酸素を活性化し、不活性な炭化水素鎖に一原子酸素添加反応を触媒するヘム

タンパク質である。P450は、高等動物においては、薬剤の解毒、ホルモンの合成、脂肪酸代謝などの反応に関与し、微生物においては複雑な抗生物質の合成に寄与するなど多岐にわたる生理機能を示す。P450はその相同性から多くのファミリーやサブファミリーとして分類されており基本的な立体構造は類似している。しかし、自然界では基質特異性が異なるP450が多数存在しているため、基礎・応用の面から興味深い分子の一つであり、これまで多くのX線結晶構造解析が報告されている。筆者らは、組換え*Rhodococcus* 属放線菌を用いた活性型VD₃の効率的な生産系を構築する為、VD₃水酸化酵素 (P450 Vdh) の発現系構築や、進化工学により高いVD₃水酸化活性を示し基質結合能も大きく上昇したVdh変異体 (Vdh-K1) を取得している。しかしながら、同変異体は野生型に比べ分子の熱安定性及び細胞内タンパク質発現量が低下していた。そこで本研究では、Vdhの構造安定性に影響を及ぼさず、かつ電子伝達タンパク質からの電子供給能が向上した高活性型Vdh変異体の取得を目指した。

これまでの研究から、Vdhへ最も効率よくNAD(P)Hから電子伝達を行なう事が判明している*Acinetobacter* sp. OC4 由来電子伝達タンパク質 (フェレドキシン (AciB) 及びフェレドキシン還元酵素 (AciC)) を用いて実験を行った。Vdh分子表面に局在しAciBとの結合が予想されるアミノ酸に変異を導入し、VD₃水酸化活性が向上する変異体の取得を行ったところ、構築した8種の変異体のうち、Vdh-K1とほぼ同等の高活性を示すT107A変異体を見出した。T107A変異体の基質結合スペクトルアッセイ及びAciBとの相互作用解析を行ったところ、基質との結合能は野生型と差が見られないものの、AciBとの相互作用能が明らかに向上している事が判明した。そこで、T107A変異体の活性向上をもたらした構造学的要因を探るべく、X線結晶構造解析を行なった。その結果、進化工学的手法によって取得されたVdh-K1変異体とほぼ同様、構造変化による分子表面の電荷分布が大きく変化していることが観察された。P450とフェレドキシン両分子の相互作用には、相互作用部位の電荷が重要であると示唆されていることから、T107Aの構造変化はAciBとの相互作用能向上に寄与していると推定される。

また筆者らは、組換え*Rhodococcus* 属放線菌に抗菌ペプチド、ナイシンを添加することにより、VD₃水酸化効率を向上させることを既に報告している。ナイシンは、グラム陽性菌に作用し細胞膜に孔を形成する。この孔を介してVD₃が細胞内に移行することで同基質の細胞膜透過性の障害を取り除くことが出来る。今回取得したT107A変異体、電子伝達タンパク質、更に*B. megaterium* IAM 1030由来BmGlcDH-IVを共発現した細胞をナイシンで処理しVD₃水酸化効率を検証すると、NAD(P)Hの再生供給も円滑化し、単位時間辺りのVD₃変換効率を既存の報告より劇的に向上させることに成功した。今後、活性型VD₃の市場はさらに拡大する事が見込まれているので、本論文で構築した系を基にした発展系が実用化される事を期待したい。

学位論文審査の要旨

主 査	客員教授	田 村 具 博
副 査	教 授	横 田 篤
副 査	客員教授	鎌 形 洋 一
副 査	客員准教授	湯 本 勳
副 査	客員准教授	森 田 直 樹

学 位 論 文 題 名

X線結晶構造情報に基づいた酵素の高機能化とその応用に 関する研究

本論文は和文 112 項、図 35、表 13、6 章からなり、参考論文（原著論文 6 編）が付されている。

タンパク質は、構成するアミノ酸の種類やその配列により高次構造や機能が決定されるが、現在の科学においてもなお、1 次構造の情報のみではそれら高次構造や機能を予想することは容易ではない。タンパク質工学的手法による標的酵素の機能改変は、ランダム変異導入による手法などが一般的であり現在も多くの研究が行われている。一方、標的酵素の立体構造が決定されれば、構造情報を基盤とした部位特異的な変異導入が可能となり、目的とする機能改変体の作成効率を高くできる可能性がある。

本論文では、産業的に有用性の高い 2 酵素（グルコース脱水素酵素とビタミン D 水酸化酵素）について、構造情報をもとにした機能改変を試み、その結果をまとめたものである。

1) 古細菌由来グルコース脱水素酵素の機能解析

好熱好酸性の腐食古細菌である *Thermoplasma acidophilum* より、既知相同分子とは基質特異性が全く異なる新しいアルドヘキソース脱水素酵素 (AldT) が所属研究室より同定されている (28 kDa 成分の単一 4 量体)。各サブユニットの C-末端アミノ酸数残基が、隣り合うサブユニットの基質結合ポケット入り口を完全に覆っていることから、AldT の C-末端のアミノ酸数残基を欠失させた変異体を 4 種類構築し ($\Delta 254$ 、 $\Delta 253$ 、 $\Delta 252$ 、 $\Delta 249$)、D-マンノースを基質として野生型酵素との活性を比較した。その結果、2 残基の欠失 ($\Delta 253$) で約 300 分の 1 に、3 残基の欠失 ($\Delta 252$) で 530 分の 1 にそれぞれ活性が低下した。更に 6 残基の欠失 ($\Delta 249$) では活性が検出されなかった。次に、C-末端の P254 と相対して配位する Y86 の疎水性相互作用を検討するため、P254G 及び Y86G 変異体を構築し活性を比較すると、 $\Delta 253$ 及び $\Delta 252$ 変異体と同様酵素活性が著しく低下することを見出した。これらのことから、AldT 同様の構造をもつ酵素ファミリーは、C-末端領域が酵素の活性に対して大きく影響することを示す重要な知見が得られた。

2) NAD(P)⁺依存性グルコース脱水素酵素 (GlcDH) の改変

血糖値測定用の酵素として *Bacillus* 属由来 NAD(P)⁺依存性グルコース脱水素酵素 (BmGlcDH) が実用化されているが、一般的にグルコース脱水素酵素は基質特異性が広く、血糖値測定においてその数値の取扱いに注意を要する場合がある。そこで、本論文では、

Bacillus megaterium IAM 1030 由来 BmGlcDH を用いて基質特異性の改変を目指した研究を展開した。BmGlcDH は AldT と同じタンパク質ファミリーに属し、単一 4 量体酵素で立体構造も両者間で類似していることが知られている。本研究では 4 種の BmGlcDH アイソザイム (I~IV) の内、BmGlcDH-IV に対して基質フリー、NADH 複合体、D-グルコース複合体の X 線結晶構造解析を行った。D-グルコース複合体の構造より、隣のスブユニットの C-末端が活性部位に入り込むように伸びてきており、D-グルコースの C4、C6 の水酸基と水素結合していることを新たに見出し、AldT とは異なる構造を持つことが明らかになった。この知見をもとに C-末端構造を不安定化させることにより基質特異性がどのように変化するか 6 種の変異体 (G261A、G261V、ΔG261、G259A、G259V、A258F) を作製し、基質特異性、活性、熱安定性を調べた。その結果、D-グルコースを基質とし野生型酵素と比較すると、各変異体ともに活性の低下が確認されたが、G259A 変異体のみ熱安定性や活性を維持しつつ基質特異性の著しい向上が確認された。このことは、AldT や BmGlcDH などを含む短鎖型脱水素酵素／還元酵素ファミリーは、C-末端領域に活性のみならず基質特異性に影響を及ぼす特有の構造を持つことが示唆され、機能改変に向けた有用な知見が得られたと高く評価される。

3) ビタミン D 水酸化酵素の機能改変とビタミン D 水酸化体生産への応用

骨粗しょう症や乾癬などの治療薬として使用される活性型ビタミン D₃ をビタミン D₃ (VD₃) から一段階で活性化する反応を触媒するシトクロム P450 酵素 (Vdh) が、希少放線菌 *Pseudonocardia autotrophica* より同定され、化学合成に置き換わる生産手法として研究が進められてきた。既に Vdh の進化工学による高活性型変異体 (Vdh-K1) の取得は行われているが、細胞内安定性が低く実細胞を用いた変換反応には不具合が生じていた。そこで本研究では、視点を変え、Vdh のレドックスパートナー (RP) からの電子供給効率を高める Vdh 変異体の取得を目指した。Vdh への変異導入部位は、P450cam と RP 分子のフェレドキシン CamB が相互作用するアミノ酸残基の情報、Vdh へ電子伝達可能な *Acinetobacter* sp. OC4 由来フェレドキシン AciB と本来の RP 分子である P450 AciA の配列情報をもとに決定した。8 種の Vdh 変異体を作製し、AciB を介した酵素活性を比較すると、T107A 変異体は、野生型に比べフェレドキシンとの親和性 (K_m) が約 3 倍向上し、 V_{max} は約 28 倍向上することを見出した。また同変異体は細胞内安定性も高く細胞内発現量も安定していた。更に X 線結晶構造解析から、T107A 変異体は高活性型 Vdh-K1 変異体と同様の構造変化が観察され、Vdh 分子表面の電荷分布が大きく変化していることが観察された。これらの結果は、わずか 1 残基の点変異のみで P450 を高機能化することが可能であることを示し、多種多様な P450 分子への機能改変に対する基盤情報が取得できたと考えられ高く評価される。

この T107A 変異体を発現した細胞を用い、抗菌ペプチド、ナisin を利用した VD₃ 水酸化反応を行った。ナisin は VD₃ の細胞膜透過性を著しく改善するので、VD₃ の水酸化活性の向上が期待できる。変換に用いた細胞は、BmGlcDH-IV を共発現し、NAD(P)H 再生環境を整えた。その結果、得られた単位時間あたりの VD₃ 水酸化体生産速度 (286.5 µg/mL/hr) は、野生型酵素を発現しているナisin 未処理細胞 (2.21 µg/mL/hr) と比較して約 130 倍、野生型酵素を発現している細胞にナisin 処理を施した場合 (8.96 µg/mL/hr) と比較して約 32 倍高くなることが判明した。この変換効率は、過去報告のある活性型 VD₃ 生産系の中で最も高い値を示し、本研究による新規変換系の構築は高く評価される。

上記、産業利用可能な酵素 (グルコース脱水素酵素や P450) の研究は、構造情報を基盤とした酵素の改変が機能改変体を取得する上で有用な手法であることを示す優れた研究成果である。特にビタミン D₃ の水酸化反応系については、実用化に耐えうるレベルの変換速度が達成されており、化学合成に置き換わる技術として期待される。

よって、審査員一同は、西岡 大樹氏が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。