

研究報告書

「ラン藻由来アルカン合成関連酵素の高活性化」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年10月～平成27年3月

研究者: 新井 宗仁

1. 研究のねらい

石油に代わる再生可能エネルギーを効率的に生産できる基盤技術の開発は、人類の持続的繁栄のために必須の課題です。藻類は、軽油や重油の主成分であるアルカンの生産能力が高いことから、非枯渇性資源であるバイオ燃料の生産源として注目されています。しかし現在、藻類によるバイオ燃料の生産効率は低く、その高効率化が急務となっています。

ラン藻によるアルカン合成には、アシルーアシル輸送タンパク質還元酵素(AAR)とアルデヒド脱カルボニル化酵素(AD)という2つの酵素が関与しています。AAR は、脂肪酸アシル ACP を基質としてアルデヒドを合成します。次に AD は、アルデヒドから軽油相当のアルカンを合成します。これらの酵素を大腸菌で共発現させると大腸菌がアルカンを合成可能になることから、AARとADがアルカン生合成の鍵を握っています。しかし、その酵素活性は低く、また、立体構造や機能発現機構も未解明でした。そこで本研究では、これら2つの酵素の立体構造や機能発現機構を解明するとともに、それに基づいて酵素活性を向上させた変異体を創出し、ラン藻によるアルカン合成を高効率化することを目的としました。

2. 研究成果

(1)概要

本研究では、ラン藻由来のアルカン合成関連酵素である AAR と AD の活性を向上させた変異体を創出するために、次の A～E の研究を行い、下記の成果を得ました。

研究テーマ:

- A. AD の網羅的変異解析
- B. AAR の網羅的変異解析
- C. AD, AAR の立体構造解析
- D. 進化分子工学による高活性化
- E. ラン藻への導入

得られた成果:

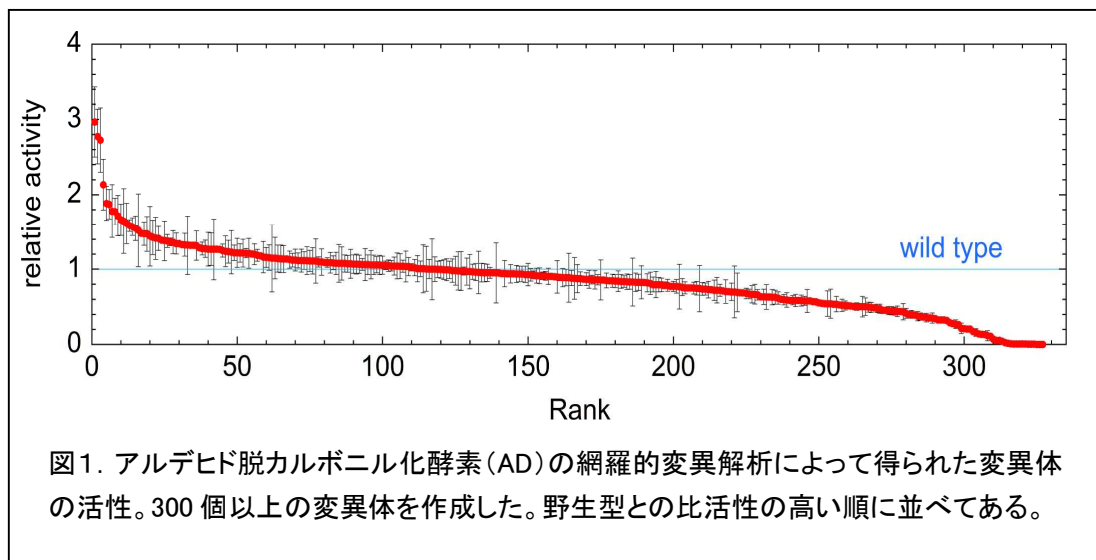
- ・AD の酵素活性を3倍に向上させる変異体を得られた。
- ・様々な生物種由来 AAR の活性と基質特異性が明らかになった。
- ・AD と AAR の機能発現に重要なアミノ酸部位が明らかになった。
- ・NMR 法を用いたリガンド結合部位同定法を開発した。
- ・AD と AAR の立体構造とダイナミクスについての知見を得られた。
- ・AAR を高活性化するための進化分子工学的手法を開発した。
- ・野生型の AD と AAR をラン藻に導入し、アルカン合成量の増大を確認した。

(2) 詳細

研究テーマA「AD の網羅的変異解析」

Nostoc punctiforme PCC 73102 由来 AD (NpAD) の全部位を1つずつアラニンに置換した変異体 231 個を作成し、それらの活性を測定するという網羅的なアラニンスキャン変異解析を行いました。実験を高速化するために、AARとADを共発現させた大腸菌によるアルカン(アルケン)の合成量を酵素発現量で規格化し、酵素活性を求めました。その結果、ADの機能発現に重要な部位や、変異によって高活性化しうる部位が明らかになりました。1か所をアラニンに置換するだけで2倍近く活性が向上する部位もありました。また、このような高活性化変異部位を様々な種類のアミノ酸に網羅的に置換する飽和変異解析を行った結果(100 変異体以上を作成)、1アミノ酸置換だけで活性が3倍に向上する変異体が得られました(図1)。さらに、高活性変異体の可溶性を向上させるために多重変異体の作成も行いました。

ADタンパク質中にはフリーのシステイン残基が3つ存在します。これらが非天然のS-S結合を形成して凝集体形成や失活などを引き起こす可能性があるため、システイン残基の数を減らしたAD変異体を作成しました(論文発表2)。これらの変異と、上記の高活性化変異を組み合わせることにより、システイン残基数の少ない高活性型ADが得られると期待されます。



研究テーマB「AAR の網羅的変異解析」

まず、様々なシアノバクテリアに由来するAARを比較した結果、*Synechococcus elongatus* PCC 7942 由来 AAR (SeAAR) は酵素活性と可溶性が高く、アルカン生合成の実用化に有用であることがわかりました。また、由来する生物種によってAARの基質特異性が異なることが明らかになりました(論文執筆中)。SeAARとは基質特異性の異なる *Synechococcus* sp. PCC 7336 由来 AAR は可溶性が極めて低かったのですが、SeAARに近づけるようなアミノ酸置換を1つ導入するだけで可溶性が大幅に向上し、アルカン合成量の増大が可能になりました(論文執筆中)。

次に、最も高活性だったSeAARに対して、網羅的なアラニンスキャン変異解析を行いました(340個の変異体を作成)。その結果、AARの機能発現に重要な部位、特に、触媒活性に必須のシステイン残基やNADPH結合部位などが同定されました(論文執筆中)。また、AARよりも

ADの活性が低く、アルカン生合成における律速段階はADによる触媒反応であることが明らかになりました。

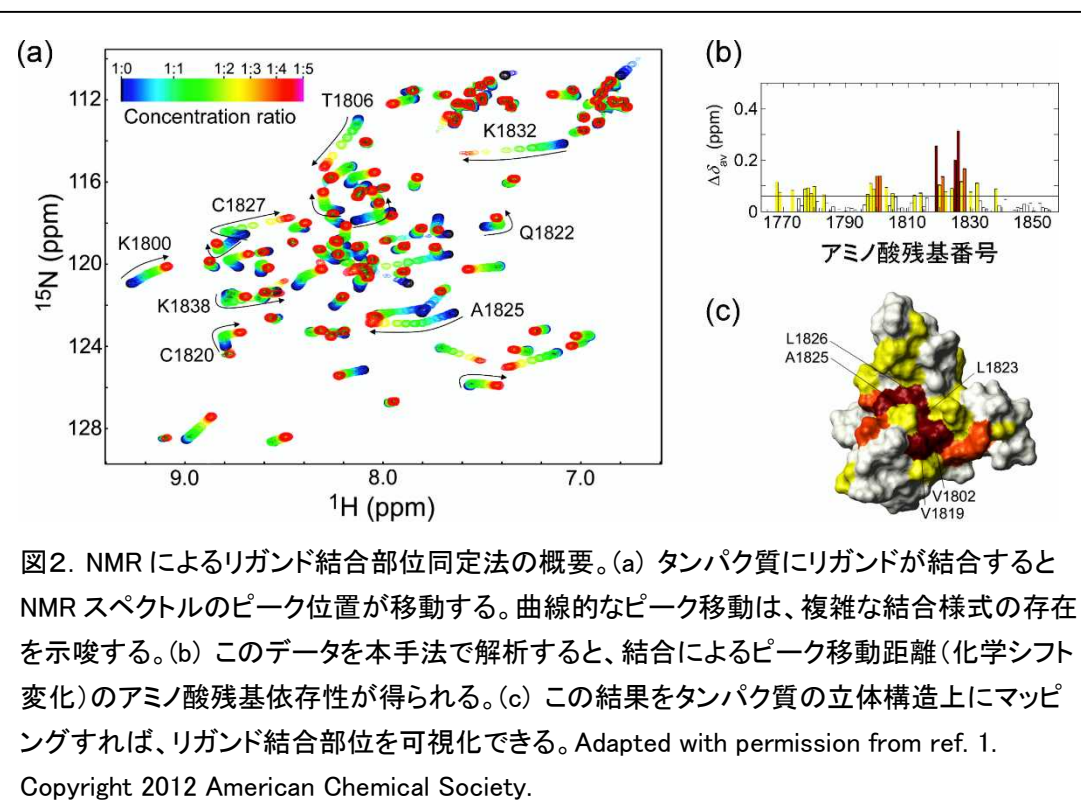
研究テーマC「AD, AARの立体構造解析」

NMR法、X線結晶構造解析、X線溶液散乱法などの構造生物学的手法を用いて、AARとADの立体構造や基質結合部位の同定、および、機能発現に重要なダイナミクスの検出等を目指しました。

まず、NMR法により、酵素の基質結合部位の同定を目指しました。その際に、NMR法を用いてタンパク質上のリガンド結合部位を解析する新たな手法を開発しました。この手法では、特異値分解法とグローバル解析法という数学的手法を組み合わせ、NMR滴定実験のデータを解析することにより、複雑な結合様式であっても、リガンド結合部位と結合の強さを正確に求めることができます(図2)(論文発表1、著作物1)。開発された解析法をADとAARに適用することにより、基質や補酵素の結合部位や結合の強さを同定することができます。この情報に基づいて、結合部位周辺に様々なアミノ酸置換を導入し、酵素の高活性化が可能になると期待されます。

MIT9313由来ADの結晶構造は既知であったため、この構造に基づいた相同性モデリングにより*NpAD*の立体構造を予測しました。次に、*NpAD*の構造を用いた分子動力学シミュレーションにより、酵素活性に重要なダイナミクス(動きや揺らぎ)を調べました。この結果は、ADの高活性化変異を導入する上で有用です。

AARの立体構造は未知であったため、X線結晶構造解析による構造決定を目指しました。しかしAARは非常に凝集しやすい性質を持っていたため、結晶化は難航しました。最近、可溶性



の高い AAR を得ることができ、X線溶液散乱法や円二色性スペクトルによる構造解析も行いました。今後、この高可溶性 AAR の結晶化を進めていく予定です。一方、理論的な手法を駆使して AAR の立体構造予測を行った結果、上記の変異解析結果とコンシステントな立体構造モデルを得ることができました(論文執筆中)。

研究テーマD「進化分子工学による高活性化」

ランダムに変異を導入して高活性変異体を迅速にスクリーニングする進化分子工学実験を行うために、AAR の酵素活性を大腸菌コロニーの発光で検出できるシステムを開発しました。現在、このシステムを用いて、AAR の進化分子工学実験を行っています。また、この手法は、高活性型 AD の進化分子工学実験にも適用可能です。

研究テーマE「ラン藻への導入」

野生型の *SeAAR* と *NpAD* を染色体上に導入した *Synechocystis* sp. PCC 6803 の変異株を作成しました。その結果、ラン藻によるアルカン合成量が2倍に増加することを確認しました。

3. 今後の展開

本研究により、ラン藻由来のアルカン合成関連酵素 AAR と AD の立体構造や機能発現機構、高活性化変異部位などが明らかになりつつあります。これらの基礎データを用いた変異解析(飽和変異、組み合わせ変異など)および進化分子工学実験によって更なる活性向上が可能と期待されます。得られた高活性型変異体をラン藻に導入することにより、ラン藻によるアルカン合成の高効率化が期待されます。

本研究では、ラン藻によるアルカン合成の最終段階にある酵素の最適化を試みました。今後、ラン藻によるアルカン合成の更なる高効率化のためには、AAR の基質合成までの過程にある様々な酵素の高活性化や、各酵素の発現量の調節、アルカン分泌系の構築など、ラン藻というシステム全体の最適化も必要です。また、タンパク質デザイン研究の最先端分野である新規高活性酵素の理論的設計にも取り組んでいきたいと考えています。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究では、「タンパク質の立体構造に基づく合理的設計」と「網羅的変異解析に基づく経験的設計」の2つのアプローチ法により、ラン藻由来のアルカン合成関連酵素 AD と AAR の高活性化を目指して研究を開始しました。これらは相補的なアプローチであり、どちらか一方が困難であっても、酵素活性を確実に向上できると期待されました。研究開始当初は、両アプローチを並行して進めましたが、酵素の立体構造解析が難航したため、2年目以降は網羅的変異解析に基づく酵素高活性化に注力して研究を進めました。アルカン生合成における律速段階が AD による触媒反応であることが明らかになったため、特に AD の高活性化を目指しました。その結果、1アミノ酸置換だけで野生型の3倍の活性を持つ AD 変異体を得ることができました。また AAR については、進化分子工学的手法による高活性化を進めるための技術開発を行うことができました。さらに、AD と AAR を合わせて 1000 個近い変異体を用いた網羅的変異

解析によって、両酵素の機能発現に重要な部位などの基礎的な知見も多く得ることができ、今後、何本もの論文として発表していく予定です。立体構造解析についても、理論的手法の活用や高可溶性 AAR の探索などにより、有用な知見が得られつつあります。研究費は主に、アルカンを定量するための装置や細胞培養関係の装置、および、変異解析のための消耗品費等に使用し、適切に執行されたと考えております。

以上のように、AD と AAR の両酵素を、変異解析と構造解析の2つのアプローチで徹底的に研究することにより、「酵素の立体構造や機能発現機構の解明」および「酵素活性を向上させた変異体の創出」については、当初の目標は概ね達成できたと考えています。一方、本研究では、最終的には、高活性化した酵素をラン藻に導入し、アルカン合成の高効率化を達成することを目指していました。野生型の AD と AAR をラン藻に導入し、アルカン合成量の増大を確認する段階までは実施できましたが、今後、高活性化した AD と AAR の変異体をラン藻に導入し、ラン藻によるアルカン合成の飛躍的な高効率化の達成を実現することが課題として残されています。

本研究で用いた酵素 AAR と AD は、ラン藻や大腸菌などを用いて軽油相当のアルカンを生合成する上で鍵となる酵素です。高活性化した AAR と AD をラン藻や大腸菌などに導入することにより、今後、石油に代わる再生可能エネルギーの効率的な生産の実現が期待されます。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

(研究総括)

ラン藻由来のアルカン合成関連酵素であるAARとADの網羅的変異解析を行い、ADの酵素活性を3倍に向上させる変異体を得ることができた。また、AARとADの機能発現機構や立体構造に関して様々な基礎的知見を得ることができ、今後、これらの酵素をラン藻によるアルカン合成に適用する上での基礎を築くことができた。非常に手間のかかる手法ながら、新しい考え方で酵素活性の向上にアプローチし、着実に研究を進めた点は評価できる。また、精力的に研究を実施し、研究者としてのスタイルができつつある。これは「さきがけ」の成果である。

次には、高活性化した酵素をラン藻や大腸菌に導入して実際に応用へとすすめ、物質生産性として本成果を評価するところまで進められることを期待する。また、今後さらに、成果を論文としてまとめることが期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. [Arai, M.](#), Ferreon, J.C., & Wright, P.E. Quantitative analysis of multisite protein ligand interactions by NMR: binding of intrinsically disordered p53 transactivation subdomains with the TAZ2 domain of CBP. *J. Am. Chem. Soc.* (2012) 134(8), 3792–3803.
2. Hayashi, Y., Yasugi, F., & [Arai, M.](#) Role of cysteine residues in the structure, stability, and alkane producing activity of cyanobacterial aldehyde deformylating oxygenase. *PLoS ONE*. (2015) in press.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

1. 新井宗仁、渡辺尚大、袖山浩平「ラン藻由来アルカン合成関連酵素の高活性化」、日本化学会第92春季年会 JST さきがけ四領域国際シンポジウム、2012年3月(横浜)
2. 新井宗仁、渡辺尚大、八杉文隆、灘広至郎「ラン藻由来アルカン合成関連酵素の高活性化」、第64回日本生物工学会大会、2012年10月(神戸)
3. 新井宗仁「NMRによるタンパク質-リガンド相互作用の定量解析法」、第14回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「解離定数とストイキオメトリーを考えた分子間相互作用解析」、2014年6月(横浜)(招待講演)
4. 新井宗仁「ラン藻由来アルカン合成関連酵素の網羅的変異解析」、ラン藻ゲノム交流会2014、2014年7月(東京)(招待講演)
5. 新井宗仁、八杉文隆「Comprehensive mutagenesis reveals residues critical for aldehyde producing activity of acyl-ACP reductase」、第52回日本生物物理学会年会、2014年9月(札幌)

著作物

1. 新井宗仁「NMRによるタンパク質-リガンド相互作用の定量解析法」、生物物理(2013)53(6), 305-308.