

研究終了報告書

「酵素の K_m 値再考察:最適値を決める因子の探索」

研究期間: 2020年12月~2023年3月

研究者: 千葉 洋子

1. 研究のねらい

環境負荷が低く持続可能な社会の実現に貢献する方法として、生物を用いた物質生産が今後一層求められる。そこで重要になるのが、目的の物質生産に最適な代謝経路をデザインするための設計指針である。代謝は一連の酵素反応によって触媒される。そのため本研究では、代謝を適切に機能させるためには、各酵素にどのような性質を与えるのが好ましいか?という問いに答えるための第1歩として、現存生物における酵素の動力的パラメータがどのように定まっているのかを解明することを目的とした。

酵素の最も本質的な性質である活性(反応速度)は、ミカエリスメンテン式 $V = k_{cat}[E][S]/(K_m + [S])$ で表される。 K_m と k_{cat} は互いに影響をおよぼす定数であり、反応速度 V を大きくするために k_{cat} を大きくすること、 K_m を小さくすることはトレードオフの関係にある。そのため、これまで k_{cat}/K_m が酵素活性の指標として使われてきた。しかしこれには、 k_{cat}/K_m を大きくして反応速度を高めるために、 K_m と k_{cat} (および本パラメータのもとになる速度定数)に具体的にどの値を与ればよいかという指針がないという問題がある。さらに、生物において K_m と k_{cat} が酵素活性を最大化するように定められているのか、もしくは別の因子に対して適切な値を取っているのかも不明である。

そこで本研究では k_{cat}/K_m を用いたこれまでの動力的パラメータの評価の限界を打破するため、人工触媒の改良指針として使われる考え方(サバティエ則およびボルケーノプロット)を導入する。サバティエ則とは、基質と触媒の吸着エネルギーには、活性を最大化する極大値があるという法則で、X軸に吸着エネルギーを、Y軸に反応速度をプロットすると、火山型のプロット(ボルケーノプロット)になる。 K_m は吸着エネルギーに類似のパラメータであることから、触媒化学の手法を用いると、 K_m と k_{cat} の関係を評価することが可能となると期待される。そこで生化学と触媒化学を融合し、酵素化学に新たな評価手法を導入することにより、現存生物の有する酵素の K_m を比較し、その違いが何に起因するか検証することを目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

現存生物における酵素の動力的パラメータがどのように定まっているのかを解明するための第1歩として、本研究ではセリン合成 phosphoserine phosphatase (PSP) をモデル系として用いた。PSP はホスホセリンをセリンと遊離リン酸に加水分解する反応を触媒する酵素で、ミカエリスメンテン式に従う。また、3ドメインにわたる幅広い生物種に存在し、アミノ酸配列に相同性がない機能ホモログが3タイプ存在することから、宿主生物の性質・アミノ酸配列の相同性と動力的パラメータの関係の検証に適しているため、これを選択した。

3ドメインにまたがる10種類の生物由来のPSP精製酵素を調整し、 K_m および k_{cat} を求めた。40°Cにおいて、PSPの K_m は由来する生物種によって3桁異なり、 k_{cat} も2桁異なった。10種類の酵素の K_m をX軸、各基質濃度での反応初速度をY軸にプロットしたところ、ボルケーノ型になったことから、PSP活性は K_m が中間的な値の際に最大となる、すなわち少なくとも大局的にはサバティエ則に従うことが示された。加えて本結果より、アミノ酸配列に相同性がないため、分子系統解析やタンパク質立体構造比較など既存の分子生物学・生化学的手法を

用いての比較が困難な機能ホモログについて、本手法を用いれば触媒化学の視点で比較可能なことが示された。

次に K_m を決定する因子を探索した。まず、アミノ酸配列の類似度 (PSP のタイプ) と K_m の間には明確な関係が認められなかった。また、PSP の由来となった生物の増殖速度および栄養要求性 (独立栄養増殖が可能か否か) と K_m の間にも、明確な関係が認められなかった。

K_m と反応速度のプロットから、一部の生物は K_m が大きく反応速度が小さい (すなわち k_{cat}/K_m が小さい)、一見性能の低い PSP を有することが明らかとなった。この一見性能の低い PSP が存在する理由について、周辺の代謝へ適応するためである可能性が示唆された。これについては今後実験的検証を加える必要がある。

(2) 詳細

研究テーマ I 「各タイプの PSP それぞれについて各基質濃度での反応速度と K_m を求める」

起源の異なる (故にアミノ酸配列に相同性のない) 3 タイプの PSP を幅広い生物種から選定し、測定条件を統一して K_m および k_{cat} を求めた。Type2 PSP において、アミノ酸配列末端への軽微な変異が K_m , V_{max} 値に大きな影響を与えることが知られているため、タグをつけず、野生型配列と全く同じアミノ酸配列のタンパク質を大腸菌にて発現させた。これを SDS-PAGE および CBB 染色で単一のバンドになるまで精製して活性測定を行い、ミカエリスメンテンプロットから K_m と k_{cat} を算出した。酵素活性測定は 40°C および熱耐性があるものについては 70°C で行い、ホスホセリンから脱離する遊離リン酸をマラカイトグリーン法で検出した。40°C において、PSP の K_m は由来する生物種によって 3 桁異なり、 k_{cat} も 2 桁異なった。すなわち PSP において経験的に知られていた K_m の違いは、反応条件 (反応温度や pH など) や活性測定方法の違いではなくアミノ酸配列の違いに起因することが証明された。

研究テーマ II 「 K_m と活性データを触媒化学の手法で解析し、酵素の性能を評価する」

テーマ I で得られた各 PSP の K_m を X 軸に、各基質濃度での活性を Y 軸にプロットし、PSP のタイプによらず、 K_m が 0.5 mM 付近の時に活性が最大となり、それより K_m が小さい場合および大きい場合は活性が小さくなることを示した (図 1)。このようなボルケーノ型プロットが得られたことにより、PSP のタイプ (すなわちアミノ酸配列の相同性の有無) によらず、 K_m に活性を最大化する極大値が存在すること、すなわち PSP 活性が大局的にはサバティエ則に従うことが示された。本研究により、アミノ酸配列に相同性がなくアライメントが取れないような酵素間であっても、触媒化学の視点で比較可能なことが初めて実験的に示された。さらに、 K_m と関連のある因子を探索した。

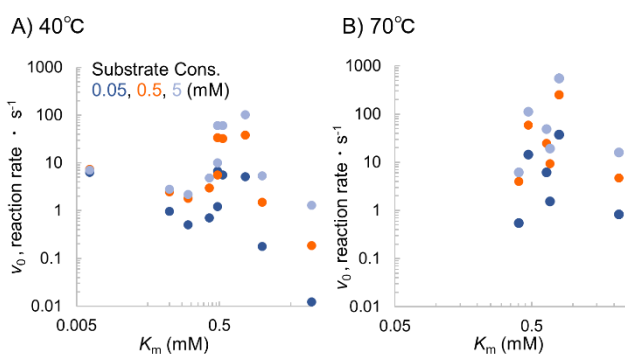


図 1: K_m と各基質濃度における反応初速度の関係

Phosphoserine の細胞質内濃度はマウス腎臓細胞で 0.44 mM と報告されており、中央代謝系代謝産物濃度の増殖条件や生物種による変動幅は多くの場合 10 倍以下であることから、0.05–5mM の基質濃度における初速度を示した。40°C でのデータから、 $K_m = 0.5$ mM 付近に活性の極大値が存在することが読み取れる。

研究テーマ III 「理論的に最適な K_m 値を有する酵素を実際の細胞に導入した場合の効果の検証」

研究テーマ II を通じて生じた仮説を *in vivo* 試験で検証するため、*in vivo* 実験系をデザインした。なお、本プロジェクト申請時は実験系のデザインまでを研究期間(2022 年度)内に行う予定であったが、ACT-X 同期との共同研究により予備試験も終わっている。その結果、理論的に最適な K_m 値を有する酵素の実証実験には、当初考えていた *in vivo* 試験ではなく、まずは *in vitro* 試験が適していることが明らかとなった。

その他 ACT-X を通じた広義の成果

・本 ACT-X 研究で始めた研究の展開方向を探り、また研究者ネットワークを構築するため、2022 年度日本農芸化学会大会においてシンポジウム「新・代謝制御ストラテジー」を世話人として企画し、採択された。本シンポジウムでは ACT-X「生命と化学」の採択者にも登壇いただき、領域の垣根を超えた研究交流を行った。

・本 ACT-X 研究で用いるためにある生物の PSP ホモログを大腸菌発現したところ、PSP 活性が認められなかった。本発見を通じて、本生物が新たなセリン生合成経路を有している可能性に気づき、現在新規代謝経路の同定を進めている。

・本 ACT-X での研究成果が認められ、研究実施機関で無期雇用職員として登用され、かつ上級研究員に昇進した。さらに、筑波大学生命環境系の連携大学院准教授に登用された。これらの昇進により、独自のアイデアに基づく研究を安定的に行い、加速・発展させる基盤を固めることができた。

3. 今後の展開

本研究により、一部の生物が(理論的にはより「よい」酵素を獲得できるにもかかわらず) K_m が大きく活性が小さい、一見性能の悪い動力的パラメータを有する PSP を有することが明らかとなった。今後は、この一見性能の悪い動力的パラメータを有する酵素の意義を検証する。検証には数理学計算、*in vitro* 実験、そして最終的には *in vivo* 実験を行う。まずは今後 1-2 年で *in vitro* 実験を行い、数理学計算の結果と矛盾しないかどうか検証する。*In vivo* 実験は 5 年以内に行う。将来的には合理的な動力的パラメータ設計指針を提示し、代謝進化の理解および生物工学の発展に貢献することを目指す。

4. 自己評価

本申請研究はACT-Xに採択されてから0から始めたプロジェクトであったが、当初計画していた以上の成果を得ることができた。具体的には、必ず実行するテーマI、挑戦するテーマIIを確実に実行できたことに加えて、実験をデザインすることを計画していたテーマIIIについても、デザインした実験を実際に行い、実験デザインの問題点を洗い出し、今後の課題を明確にすることができた。

本研究の独自性は、酵素の動力学パラメータ K_m の意義を、物理化学(触媒化学)の考え方を導入して考察することにある。サバティエ則およびその評価方法を生化学に導入することで、生物において酵素は必ずしも活性を最大化するように進化しているわけではないことが示され、本発見から生物にとって適切な動力学的パラメータに関する新たな仮説を生み出すことができた。また、触媒化学者との共同研究により、そもそも活性を最大化するために速度定数をどう設定すればよいかについても新たな知見を得つつある。すなわち、本研究を通じて、100年以上酵素化学の基盤となってきたミカエリスメンテン定数に新たな意義を見出す基盤を作ることができた。

研究費も予定通り執行しており、本研究費で雇用した研究補助員のおかげで時間のかかる実験を効率的に行うことができた。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 2件

- Ooka, Hideshi; Chiba, Yoko; Nakamura, Ryuhei; Universal Design Principle to Enhance Enzymatic Activity using the Substrate Affinity, bioRxiv, 2023.02. 01.526728 (2023)
- Chiba, Yoko; Ooka, Hideshi; Wintzer, Marie; Tsunematsu, Nao; Suzuki, Takehiro; Dohmae, Naoshi; Nakamura, Ryuhei; Diverse Phosphoserine Phosphatases Exhibit Maximum Activity at an Intermediate Binding Affinity in Accord with the Sabatier Principle of Catalysis, bioRxiv, 2023.03. 10.532031 (2023)

※これら論文は学術誌に投稿され、現在それぞれin revision/ under reviewである。

(2) 特許出願

なし

(3) 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)

学会発表

- 日本農芸化学会 2022 年度大会 (2022 年 3 月、オンライン) シンポジウム
酵素ミカエリスメンテン定数 (K_m 値) による代謝制御
千葉洋子, 大岡英史, Marie Wintzer, 常松奈緒, 中村龍平
- 電気化学会第 90 回大会 (2023 年 3 月、東北工業大学) 口頭発表



酵素活性を最大化する結合性相互作用の予測

大岡英史, 千葉洋子, 中村龍平

- ・日本農芸化学会 2023 年度大会 (2023 年 3 月、オンライン) 口頭発表

酵素動力学パラメータの新たな評価方法—触媒化学の Sabatier 則を用いた均一系酵素の解析

千葉洋子, 大岡英史, Marie Wintzer, 常松奈緒, 中村龍平

著作物

- ・酵素工学ニュース (86) 8-12 2021 年 10 月

「セリン生合成酵素と酵素の動力学パラメータの多様性に関する発見と考察」 千葉洋子

その他

- ・日本バイオインダストリー協会(JBA)のセミナー ACT-X「環境とバイオテクノロジー」は地球環境の危機を救う！において、研究紹介を行った。(2021 年 3 月)
- ・JBA 機関紙に第 2 回 ACT-X セミナー(2022 年 4 月)の報告書を寄稿した。

