

研究終了報告書

「構造情報に基づいた in silico 酵素改変が先導するスマート代謝経路設計」

研究期間：2020年12月～2023年3月

研究者：二井手 哲平

1. 研究のねらい

再生可能資源からの微生物を利用した物質生産プロセスが注目されて久しいが、未だ化石資源からの生産規模に遠く及ばない。研究代表者は、工業生産できる化成品を大幅に増やすには現在の試行錯誤的な菌株育種から、分子レベルでの代謝メカニズムの理解と酵素工学と代謝工学の統合的な経路設計指針がブレークスルーを生むと考える。

そこで本研究では、まず代謝酵素をどの様に改変するかを 1. 基質特異性・2. 構造安定性・3. 活性・4. 制御の 4 因子に分け、酵素設計プロセスを開発する中で、それぞれがどの様に決定されるかを同定することを目指した。酵素を含むタンパク質は基本的には 20 種類のアミノ酸が脱水縮合により連結した高分子であり、そのアミノ酸の並びがタンパク質の立体構造を決め、最終的に機能が決まる。微生物からヒトまで保存されているタンパク質は多く存在しており、これらは全て同じ共通祖先から生じていると考えられる。そしてこれらタンパク質配列・構造は相同性を有しており、この相同配列に機能を司る情報があるのだろうと予想できる。

本 ACT-X の研究期間内において、酵素の進化情報からまず 1. 基質特異性を決定するアミノ酸残基を同定することを目指した。次に、2. 構造安定性を司るアミノ酸残基の同定を試みた。構造が安定化することで発現量の改善が見込めると期待した。今後は、3. 活性と 4. 制御に関わるアミノ酸残基と高保存残基の関係を明らかにすることを目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では産業利用に資する微生物育種を代謝工学とタンパク質工学の融合研究の観点から取り組むことを念頭に、まずは酵素の設計手法の開発に取り組んだ。ACT-X 研究期間の1年目は、目的物質として非標準アミノ酸とその関連医薬品の生合成に関わる 5 経路 19 酵素について、その発現や活性を調査した。その結果、4 経路 16 酵素の可溶化体として発現が確認でき、内 2 酵素は活性を測定できた。ここで課題となったのは、多くの代謝酵素の活性測定におけるスループット性の低さである。この低スループットな検出系を用いる限り代謝酵素の改変は困難を伴うと判断し、当初より計画にあった配列保存度情報を活用した酵素設計を実施した。まずは活性測定が容易なモデル酵素で取り組むことで、コンセプトの証明を目指した。

まず、「機械学習を利用した基質特異性を司るアミノ酸残基の同定とタンパク質工学への応用」と題して、リンゴ酸酵素の補酵素特異性変換に取り組んだ。データベースからリンゴ酸酵素をランダムに 1000 配列取得し、NAD 型と NADP 型に分類した。重複を除き、アライメントによりギャップを含めて配列長を揃えた。これを one-hot 表現に転換し、Logistic 回帰モデルを用いて学習させた。この時、NAD 型リンゴ酸酵素を 0、NADP 型を 1 とラベル付けした。学習の結果、学習器は NAD 型と NADP 型のリンゴ酸酵素を 99.3%の正答率を示し、高い精度分類可



能であることがわかった。学習モデルの偏回帰係数から各アミノ酸の補酵素特異性に関わる寄与度を算出し、ランキング付けした。このランキングに基づき NADP 型リンゴ酸酵素へ 10 箇所ずつ 100 箇所に変異を導入した。その結果、70 箇所変異導入まで可溶性画分から変異体酵素を取得できた。さらに、補酵素特異性は 30 箇所の変異で完全に NAD 型へ切り替わることが示された(*ACS Synth. Biol.* 2022)。

(2) 詳細

機械学習を利用した基質特異性を司るアミノ酸残基の同定とタンパク質工学への応用

進化情報を利用した酵素の耐熱化に関する研究を実施した結果、基質特異性も変化できるのではと考えるに至った。基質特異性の改変は代謝経路設計における強力な手段となり得るため、本プロジェクトを通じて挑戦することとした。酵素の基質特異性を変えるには、基質ポケットの周囲の空間的に隣接した位置に複数の変異を導入する必要がある。本実験では系統的な解析を機械学習に応用することで、基質特異性に対する各アミノ酸残基の寄与を推定可能かを評価した。モデルとして、結晶構造で酵素が同定されていない大腸菌由来のリンゴ酸酵素 (ME) のレドックス補酵素変換を選んだ。

機械学習からタンパク質工学による基質特異性変換に至るスキームを下記図に示す。KEGG データベースから NADP+依存型と NAD+依存型両方の ME の配列をランダムに収集し、変異位置と補酵素嗜好変換の候補アミノ酸を調査した。1000 個の ME アミノ酸配列を収集し、重複を削除して 952 個 (NAD+依存性 432 個、NADP+依存性 520 個) のユニークな配列が得られた。このユニークな配列をアラインメントし、点変異、挿入、欠失を検出した。また、ギャップを含めた配列長が同一であることが有利である。最後に、ベンチマークデータセットの 30%にあたる 286 の配列データ (NAD+依存 138、NADP+依存 148) をモデル検証のためのテストセットとして、残りをトレーニングセットとして使用した。モデルの評価はキャリブレーションプロットおよび k 分割交差検証で実施し、本モデルの予測精度は 99.7%であり、過学習の無い高い予測精度を持つモデルが生成できた。

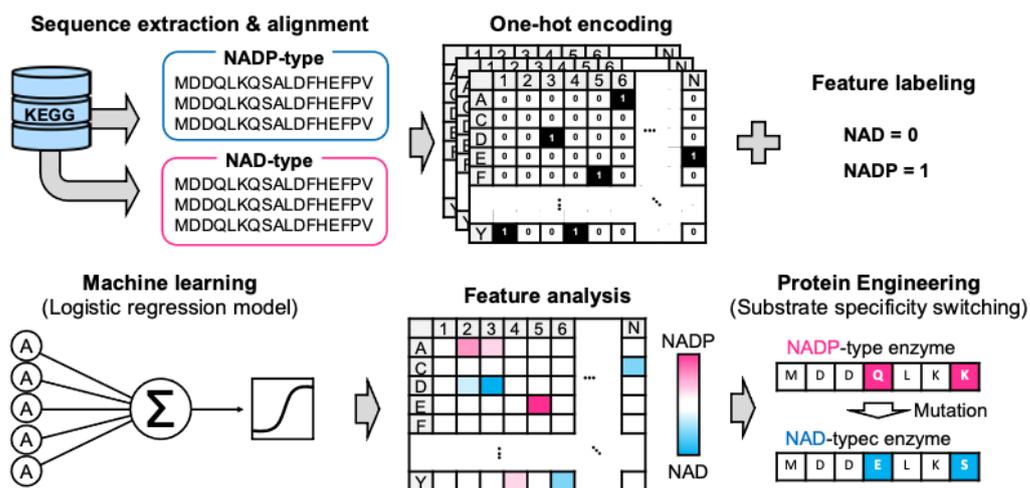


図 MLに基づく酸化還元酵素特異性変換のための酵素設計を示すキーステップ

本モデルの偏回帰係数は各アミノ酸の補酵素特異性への寄与度であると仮定できる。そこ

で、大腸菌由来リンゴ酸酵素の ME ドメイン（以下 trcMaeB と表記する）の補酵素特異性を NADP 型から NAD 型へと変化させる変異を導入した。trcMaeB に一度に 10 個ずつ最大 100 個の変異を導入した trcMaeB 変異体 (trcMaeB10-100) を作製した。設計した trcMaeB 変異体は、大腸菌発現系を用いて調製した。その結果、ランキング順位 10-70 位の変異を導入した trcMaeB10-70 は可溶性画分への発現が確認された。収率も天然型と比べて最大 73%、最低 22%であり、多くの変異が導入されているにも関わらず大きな収率低下無くタンパク質を発現させることができた。

取得した trcMaeB10-70 について、補酵素特異性を評価した。MaeB および trcMaeB は NADP 型であり、既報の結果と一致したのに対し、変異体は NADP に対する活性は消失し、NAD に対する活性が発現した。trcMaeB10 は NAD⁺に対して触媒活性を示し、NADP⁺に対しては親和性とターンオーバー数が減少し、KM 値は 2.8 倍に増加し、k_{cat} 値は 1/5 に減少していた。trcMaeB20 は NAD⁺に対する親和性とターンオーバー数が増加し、NADP⁺と NAD⁺に親和性を持つプロミスキャス型であることが示された。trcMaeB30 は NADP⁺に対する親和性を失い、NAD⁺に対する特異性を獲得した。我々の ML モデルでは、trcMaeB の補酵素特異性を切り替えるには 20 から 30 の変異で十分であり、発現量に大きな影響はないことが分かった。trcMaeB50 は NAD⁺に対して最も優れた k_{cat}/K_M 値を示した。trcMae60 は酵素機能が低下し、trcMaeB70 はいずれの補酵素も認識しないことから、ML ランキングの低い変異は NAD⁺機能への寄与が弱く、触媒活性に害を及ぼす可能性があることが示唆された。タンパク質中の数十個のアミノ酸を置換し、配列情報のみから基質特異性を変換することは、ランダムな変異やキュレーションに基づく点変異に依存する従来のタンパク質工学では不可能であった。本研究の ML モデルは、構造情報だけでは発見できない変異位置やアミノ酸候補を絞り込むことができる。

Rosetta を使って比較モデルを作成し、変異位置と構造に対する変異誘発の効果を明らかにした。変異は構造全体に散在しており、順位に依存しないことがわかった。基質ポケットの周辺に顕著な集積が見られるが、基質ポケットから離れたアミノ酸残基にも変異が観察された。*Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 と Aster yellows witches'-broom phytoplasma (AYWB) の ME は、trcMaeB とそれぞれ 61.8%と 47.9%の相同性を有している。*B. bacteriovorus* HD100 の NADP⁺依存性 ME との NAD⁺依存性 ME の結晶構造から既知の基質ポケット内のアミノ酸残基を比較検討した。NADP⁺のリン酸基は *B. bacteriovorus* HD100 由来の ME の 250 位のリジンと相互作用するが、AYWB 由来の NAD⁺依存性 ME では同じ位置 (231 位) にグルタミンが存在していた。237 位のリジンをグルタミンに変異させた trcMaeB 変異体は 21 位であった。それ以上の基質ポケットへの変異は、累積変異の 70 位まで ML で同定されなかった。これらの結果は、trcMaeB の補酵素選択性が 237 位の残基によって決定されていることを示唆している。そこで、trcMaeB K237Q を trcMaeB への点突然変異により調製し、大腸菌 AG1 株で発現させ、これまでの trcMaeB タンパク質と同様に固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、補酵素選択性への影響を評価した。trcMaeB K237Q は trcMaeB と同じレベルで発現したが NAD⁺とは反応しなかった。さらに、NADP⁺に対する本来の活性は失われていた。このことから、trcMaeB では基質と相互作用する残基のみの変異では基質特異性が不十分であり、基質ポケット周辺の小さな構造変化が必須であることが示唆された。結晶構造だけ

からこれらの変異を探し出すことは困難であり、MLによるタンパク質工学の有効性を示せた。

3. 今後の展開

ACT-X 研究期間で私は、生物が持つアミノ酸配列を系統解析することにより、タンパク質の進化の歴史の中で保存されたアミノ酸残基を同定し、これが機能と構造形成に関わることを見出した（例えば *ACS Synth. Biol. In press*）。しかし、酵素の触媒活性は予測できず、設計した変異体酵素活性は天然型と比べて高くなることは稀であることが明らかとなった。大局的な視点に立つとこれは、相同配列を持つ酵素群の保存度配列を抽出して用いるという仕組み上、機能は用いた相同酵素群の”中位”になると考えられる。この仮説が正しいなら、出発点となる酵素の初期値が低い場合には活性向上が見込める一方で、予め機能が高いものについては機能が低下してしまう。機能を司るアミノ酸残基位置はタンパク質中のどこに分布するのか、また特徴は何かを知ることができれば、基質特異性の改変と活性保持または向上の両立できると期待できる。そのためには、どのアミノ酸残基が活性を向上させるかのできるだけ多くのデータが必要であり、活性ベースのスクリーニングのハイスループット化が必要である。そこで現在、ハイスループット進化実験系の確立に取り組んでおり、活性に関わるアミノ酸残基位置の情報取得を目指している。

4. 自己評価

当初の研究目的とは変化は無いが、研究の流れの中で僅かに進め方が変化してしまった。結果としては、私のこれまでの想像を超えて研究テーマが飛躍し、将来につながるアイデアを創出でき、概ね順調に研究が推進できた。これにより、ACT-X 発の論文をアメリカ化学会の発行する *ACS Synthetic Biology* 誌に成果を発表することができた。さらにこの論文は、所属の大阪大学と JST との共同でプレスリリースすることができ、社会にアウトリーチすることができた。また、予算の執行状況は計画通り進んだ。

加えて、私自身の独自のアイデアで実験を展開できた点も ACT-X 研究の良かった点に挙げられる。その他、異分野の研究者とのネットワークを形成でき、他の ACT-X 研究者と共同研究を始めることができた。

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

1. S. Sugiki, **T. Niide***, Y. Toya, S. Shimizu*, Logistic Regression-Guided Identification of Cofactor Specificity-Contributing Residues in Enzyme with Sequence Datasets Partitioned by Catalytic Properties, *ACS Synth. Biol.*, In press

酵素の基質・補酵素特異性を変えるには、基質ポケット周辺の空間的に隣接する位置に複数の変異を導入する必要があるが、酵素は反応の過程でダイナミックな構造変化を起こすため、結晶構造情報のみからでは困難である。そこで我々は、ロジスティック回帰を用いた系統的な解析により、各アミノ酸残基の基質特異性への寄与を推定する方法を提案した。本手法は、変異候補アミノ酸を順位付けして推定できるため、可読性が高く、タンパク質工学に



用することが可能である。我々は、結晶構造の解明がまだ進んでいない大腸菌のリンゴ酵素のレドックス補酵素変換をモデルとして、この概念を実証した。補酵素特異性で分類したアミノ酸配列を用いたロジスティック回帰を用いると、NADP+依存性のリンゴ酵素が、実用的なスクリーニング段階を経ずに補酵素特異性を NAD+依存性に完全に転換することが示された。

2. R. Kawai, Y. Toya, K. Miyoshi, M. Murakami, **T. Niide**, T. Horinouchi, T. Maeda, A. Shibai, C. Furusawa, H. Shimizu*, Acceleration of target production in co-culture by enhancing intermediate consumption through adaptive laboratory evolution, *Biotechnol. Bioeng.*, 119 (3), 936–945 (2022)

共培養は代謝経路を複数のモジュールに分割し、変換過程を複数の菌株で共有することで、代謝負荷を軽減する有望な方法であるが、中間体は環境中で希釈されるため、中間体の取り込み速度を高めることが、ターゲットの生産性を高めるために重要である。本研究では、実験室適応的進化により大腸菌のメバロン酸消費量の増加を実証し、その進化株を大腸菌(上流:グルコース→メバロン酸)-大腸菌(下流:メバロン酸→イソプレノール)共培養におけるイソプレノール生産に応用した。5回の並行進化実験では、すべての増殖速度が徐々に上昇し、5つの進化株を得ることができた。全ゲノム再塩基配列決定とリバースエンジニアリングにより、メバロン酸消費の促進に関与する3つの変異を同定した。進化株を用いたイソプレノール生産量は親株を用いた場合の3.3倍となった。

(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)

- ・ 酵素工学会第 87 回講演会 招待講演
- ・ プレスリリース (大阪大学、JST ACT-X 共同)

<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20221103/index.html>