

研 究 主 論 文 抄 録

論文題目

有用酵素の開発と探索に向けた一アミノ酸変異酵素の機能解析と DNA 均一化法の改良

熊本大学大学院自然科学教育部 工学専攻 物質生命化学教育プログラム

(主任指導 山口 佳宏 准教授)

論文提出者 上之菌 優也

主論文要旨

酵素は生体中に存在する触媒である。触媒とは化学反応を促進する物質であり、化学産業の分野では無機触媒が多く利用されている。一般的に酵素は無機触媒と比較して、常温、常圧、中性付近の条件で活性を有し、活性中心を持ち基質特異性が高く反応効率が高い。これらの特徴から、酵素は多くの産業で利用されるようになった。近年では、多くの酵素は目的の機能を持つように改良され、洗剤や、研究試薬、医薬品などとして利用されている。我々の生活をより良くするためには、さらなる酵素の開発・改良が望まれる。有用な酵素を開発・改良するためには、既存の酵素のアミノ酸レベルでの微細な構造と機能の関係を解明し、合理的にアミノ酸を変異させる方法、全く新しい酵素を探索する方法が有効である。

既存酵素の微細な構造と機能の解明には、X線結晶構造解析による酵素の微細な構造データ、類縁の酵素（ファミリー）との構造と機能の比較、さらにそれらのデータの蓄積による構造と機能の紐付けが必要である。例えば、バイオ系の研究によく用いられる DNA ポリメラーゼは、構造と機能に関する研究が進んでおり、アミノ酸に任意の変異を導入することで、高効率、高活性化することができている。また、基質が異なる二種類の同ファミリーの酵素に対して、基質ポケットに変異を加えることで、基質特異性を変換することも可能である。さらに、常温生物と高熱菌の同様の機能を持つ酵素の構造を比較することで、耐熱性の酵素に見られる特徴が発見されている。しかし、研究対象の酵素ファミリーには偏りがあり、全ての酵素の微細な構造と機能が紐付けされてはいない。そのため、あらゆる酵素を合理的に開発・改良するためには、まだまだ多くの酵素に関する微細な構造と機能に関するデータの蓄積が必要である。

未発見な酵素（遺伝子）の探索は、環境中の微生物群集の持つゲノム DNA（メタゲノム）中から行われることが多い。メタゲノムから新規遺伝情報を得るためのスクリーニング方法として、配列ベースのスクリーニングと機能ベースのスクリーニングがある。配列ベースのスクリーニングには、次世代シーケンサーを用いたシーケンス解析がよく利用され

る。この方法では、多くの遺伝情報を得ることができるが、参照遺伝子配列（既知の遺伝子配列）が必要である。機能ベースのスクリーニングでは、メタゲノム DNA の断片を含むメタゲノムライブラリーを作成し、DNA 断片ライブラリーをベクターに組み込み、異種宿主に導入して遺伝子を発現させる。したがって、機能ベーススクリーニングは、遺伝情報が不明な新規遺伝子を得ることが可能である。しかし、完全長の遺伝子や遺伝子発現のためのプロモーターが必要であるという点で制約がある。また、どちらの方法にも共通する問題点として、環境中に優先的に存在する微生物由来の遺伝子ばかりが発見され、希少な微生物から新規の遺伝子が発見する確率が非常に低い点が挙げられる。そのため、発現量の少ない未発見の酵素（希少遺伝子）を獲得することは現在の技術では困難である。発現量の少ない未発見の酵素を探索するためには、希少な微生物由来の遺伝子にアプローチする技術の開発が必要である。その一つの方法として注目されている技術が均一化法である。均一化技術は高コピー数の DNA 断片の量と低コピー数の DNA 断片の量を同程度にする技術として知られている。均一化技術では DNA 変性と二本鎖再形成の現象を利用する。一般的に DNA は二本鎖として存在するが、温度や pH を調整することで一本鎖に変性でき、この現象は可逆的である。二本鎖を再形成する速度は一本鎖 DNA の初期濃度 C_0 に依存し、高コピー数の DNA は二本鎖を速く再形成する一方で、低コピー数の DNA はほとんど二本鎖再形成しない。すなわち、二本鎖再形成した DNA のみを除去することで低コピー数の DNA 断片と同程度の量まで高コピー数の DNA 断片を減らすことができる。均一化技術は主に真核生物の cDNA ライブラリーを均一化する目的で利用されてきたが、環境中の微生物群集に応用され、希少遺伝子を獲得した例は私が調べた範囲内では報告されていない。また、どの程度低コピー数の DNA 断片が均一化でき、獲得できるかについての評価実験も報告されていない。

本論文では、有用酵素の開発に向けた酵素の微細な構造と機能の解明、未発見の酵素を探索するための均一化技術の評価モデル実験の構築および均一化技術の改良を目指す。そこで本稿第 2 章では、既存酵素の微細な構造と機能の関係を解明するために、一アミノ酸という微細な活性中心構造の変異により、基質特異性が変化するユニークな加水分解酵素（メタロ- β -ラクタマーゼ）について、チオール化合物を使用した β -ラクタマーゼに対する阻害実験を行った。

メタロ- β -ラクタマーゼである IMP-1 及び IMP-6 は、活性中心に Zn イオンを二つ持つ複核金属酵素であり、基質として抗生物質である β -ラクタム剤を加水分解する。IMP-1 の 262 位の Ser は、IMP-6 では Gly に置換されており、わずか一アミノ酸が異なるのみで、基質特異性に変化が生じている。この微細な構造変化が酵素の機能にどのような影響を与えるかを調べるために、阻害効果の期待できるチオール化合物を使用して β -ラクタマーゼに対する阻害実験を行った。その結果、チオール化合物である ethyl 3-mercaptopropionate は IMP-1 に対して競合的に阻害するが、IMP-6 に対しては非競合的に阻害することがわかった。わずか一アミノ酸変異で引き起こされる、阻害効果や阻害様式の違いの原因を構造的に解明するため、IMP-1 (PDB code: 5EV6) と IMP-6 (PDB code: 6LVJ) の結晶構造を比較した。その結果、IMP-1 では Ser262 の側鎖と Cys221 の間に水素結合があるが、IMP-6 では

水素結合がなく、活性中心の Zn 配位環境のアミノ酸残基の柔軟性が高くなっていると考えた。活性中心の Zn 配位環境をより詳細に調べるために、キレート剤 EDTA の存在下で IMP-1 と IMP-6 の脱メタル化速度を調べたところ、脱メタル化反応は一次速度定数を持つ速い反応と遅い反応があり (IMP-1 は $k_{fast} = 1.76 \text{ h}^{-1}$, $k_{slow} = 0.108 \text{ h}^{-1}$, IMP-6 は $k_{fast} = 14.0 \text{ h}^{-1}$, $k_{slow} = 1.66 \text{ h}^{-1}$)、IMP-6 では IMP-1 よりも Zn イオンが脱離しやすいことがわかった。これらの結果から、IMP-1 と IMP-6 の Zn 配位環境の柔軟性の違いは、脱メタル化速度、チオール化合物の阻害効果に影響を及ぼすと考えた。

本稿第 3 章では、希少微生物種から希少遺伝子の遺伝情報を得るために、DNA 均一化技術を用いて存在量の異なる DNA 断片を均一化し、低コピー数の DNA 断片がどの濃度まで獲得可能なのか評価するためのモデル実験の構築を目指した。また、DNA 均一化技術を改良することで、さらに低コピー数の DNA 断片を獲得することを目指した。具体的には、コピー数が 100 万倍まで異なる二種類の抗生物質耐性遺伝子を用いて評価系を構築した。両遺伝子を任意の濃度比で混合し(1:1–100 万:1)、これらの遺伝子を含む高コピー数と低コピー数の DNA 断片の混合物を、熱変性、二本鎖再形成させ、ハイドロキシアパタイト樹脂を用いて一本鎖 DNA と二本鎖 DNA 断片を分離することにより均一化した。均一化した DNA 断片をベクターに組み込み大腸菌に導入し、各種薬剤耐性を有する大腸菌コロニーをカウントすることで DNA 均一化を評価するモデル実験を構築した。さらに、プライマーと鋳型間のミスマッチを強く認識する HiDi DNA polymerase を用いて DNA 断片にアダプター配列を効率的に付加し、低コピー数の DNA 断片を増幅する方法を改良し、DNA 均一化の効率を向上させた。本研究では、DNA 断片の量が 10 万倍異なるサンプルを均一化して 1–10 倍の差まで近づけ、コロニーカウント法で DNA 均一化を定量的に評価した。また、DNA 均一化を行う前は獲得することのできなかつた 150 fg という微量な DNA 断片を獲得した。

本論文では、一アミノ酸変異という微細な構造変化による酵素機能への影響とそのメカニズムを明らかにした。また、希少な遺伝子を探索するための均一化技術の評価モデルの構築と改良を行った。これらの成果を組み合わせることで、新規酵素の開発・改良、あるいは探索に繋がり、我々の生活をより豊かにする酵素が誕生することが期待される。以上のことを第 4 章で総括した。