

# 異なるタンパク質発現系を用いて生産した 酵素の機能転換の実証

菊川 寛史\*

## Inversion of Enzyme Function by Using Different Protein Expression Systems

Hiroshi KIKUKAWA\*

To date, bacteria selectively oxidizing only one hydroxymethyl group of propanediols were discovered. Genome and proteome analyses identified a gene encoding the asymmetric oxidase responsible for the *R*-selective reaction. Stereoselectivity depended on the expression host: enzyme produced in a *Rhodococcus* expression system showed moderate *R*-selectivity in whole-cell reactions, whereas enzyme produced in *E. coli* became nearly racemic and, without a His-tag, showed slight *S*-selectivity. Purified enzymes converted diols to hydroxyalkanoic acids in vitro, but conversion dropped from 100% (whole cells) to ~10% after purification. Control experiments ruled out host metabolism. Activity and selectivity were also strongly pH-dependent, with little activity at pH 6.0 and slight *S*-selectivity at pH 7.0.

### 1. 背景

生体触媒である酵素の立体選択性は、酵素と基質の立体適合性により生じると考えられる。酵素の基質受容ポケットに基質が入ると、ポケットの空間的制約および酵素と基質間の相互作用により基質の向きが固定されて触媒作用する面が決定される<sup>(1)</sup>。この結果、特定の立体異性体が安定化されることで、酵素は高光学純度で生成物の立体選択的変換が可能となると考えられている。

これまでに申請者は、2,2-アルキル-1,3-プロパンジオールの構造中にある片側のヒドロキシメチル基だけを *R* 体あるいは *S* 体選択的に不斉酸化する *Rhodococcus* 属細菌を発見した<sup>(2,3)</sup>。さらに、この細菌のゲノム解析およびプロテオーム解析から、*R* 体選択的な反応を担う不斉酸化酵素 (alcohol dehydrogenase) 遺伝子を発見した。そこで、本遺伝子産物としての酵素の機能性を評価するなかで、非常に興味深い現象を発見した。近縁種である *Rhodococcus erythropolis* のタンパク質発現系を用いて生産した本酵素は、元の *Rhodococcus* 属細菌株と同じく軽度の *R* 体選択性を示した。一方、大腸菌発現系を用いて生産した本酵素はわずかに *S* 体選択性を示した (図1)。このように、発現宿主株の違いによって酵素の立体選択性が転換したと推測された。この要因として、酵素の立体構造などが変化した可能性があると考えられる。

本研究では、異なるタンパク質発現系を用いて酵素生産することで、本酵素活性が転換する現象を精査する。また、“活性転換”した酵素の構造情報から、立体選択性をはじめ酵素活性を発現する構造デザインの基礎知見の取得を目指す。

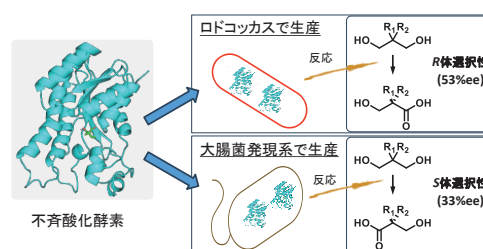


図1 発現系の違いによる立体選択性の転換。

### 2. 精製酵素を用いた酸化反応の基礎情報の精査

初めに、酵素遺伝子に His タグ配列を付加して、*Rhodococcus* 発現系ならびに大腸菌発現系に用いるプラスミドベクターに組み込んだ。このプラスミドベクターを用いて *Rhodococcus* および大腸菌の各発現系に酵素遺伝子を導入し、各種発現系での発現誘導による遺伝子産物としての酵素タンパク質の高生産を行った。酵素を高発現した菌体を用いて本酵素反応を行った。その結果、*Rhodococcus* 発現系の菌体反応では約 60%ee (80% *R* 体および 20% *S* 体) の *R* 体選択性を示したのに対して、大腸菌発現系の菌体では約 0.5%ee の *R* 体選択性 (50.25% *R* 体および 49.75% *S* 体) とほぼラセミ化反応を

2026年2月27日 受理

\* 豊田理研スカラー

北海道大学大学院工学研究院応用化学部門

示した. 先行研究で示したように大腸菌発現系の酵素は *S* 体選択性を示さなかったものの, 大腸菌で発現することで顕著な *R* 体合成の減少および *S* 体合成の増加が見られることが分かった. 実際, His タグを付加しない酵素遺伝子を発現してみると, 選択性の過剰率はやはり低いものの, 大腸菌発現系では 5.3% ee の *S* 体選択性を示した. このように, 発現系および発現する酵素の構造・様態によって, その立体選択性に大きく影響を及ぼす可能性が確認された.

続いて, 各発現系の細胞を超音波破碎し, 細胞破碎液のニッケルカラムを用いた精製により, 各発現系で生産した酸化酵素の精製タンパク質を得た. 得られた精製酵素を用いて, *in vitro* (試験管内) で酵素反応を行ったところ, 想定通り, 基質ジオールをヒドロキシアルカン酸へと変換することを確認した. また, 本酵素反応にはプロトンの受容体として NAD<sup>+</sup> を使用することで反応の進行を確認した.

ここで, 菌体反応による変換効率は, 10 mM のジオール基質に対して 100% の変換率を示した. 一方で, 精製酵素を用いた反応においては, *Rhodococcus* および大腸菌のどちらの発現系においても 10% 程度の変換率に低下した. そこで, 菌体反応, 細胞破碎後のタンパク質溶液および精製酵素で変換率を比較すると, 精製が進むにつれて変換率が大きく減少することを確認した. この結果より, 以下の 2 つの仮説を考えた: ① 本酸化反応に関与する酵素反応が菌体内に存在する, ② 精製が進むにつれて, 構造変化あるいは必要とする構造・活性安定化因子が欠損している. そこで, ① について確認を行った. まず, 精製酵素に酵素遺伝子の非発現株の細胞破碎液を添加して酵素反応を行ったが, 生成物への変換量に大きな変化は見られなかった. さらに, 酵素遺伝子の発現株と非発現株の菌体反応で比較しても, 非発現株では基質消費は見られず, また, 発現株においても消費基質と生成物量が一致しており, 菌体内での代謝も否定された. 一方, ② の仮説について明確な証明は未達成であり, 今後の精査が必要である.

本酵素反応の不安定性を示す実験として, 大腸菌由来精製酵素を用いた反応において, pH 条件により活性および立体選択性が大きく変化することを見出した (図 2). pH が上昇するにつれて生成物量が増加していることがわかり, pH 6.0 ではほとんど活性が無いこと, pH 7.0 のときに僅かに *S* 体選択性を示していることが確認された. 本酵素は条件変化に非常に影響を受けやすいと考えられる.

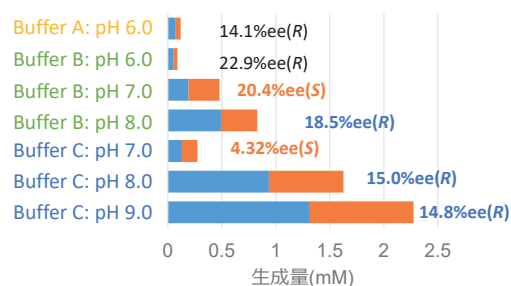


図 2 精製酵素反応における pH の影響.

### 3. AlphaFold の立体構造予測に基づく基質受容性の解析

AlphaFold2 を用いた酵素の立体構造予測結果をもとに, 基質とのドッキングシミュレーションおよび親和性解析を行った. シミュレーションの結果, 基質はどちらの面でも活性中心に入ると予想され, 親和性についても差が無かった. この結果からも, コードされている情報では本酵素反応はラセミ化反応に近いこと, 発現・反応条件あるいは未解明の因子により活性が転換することが示唆される.

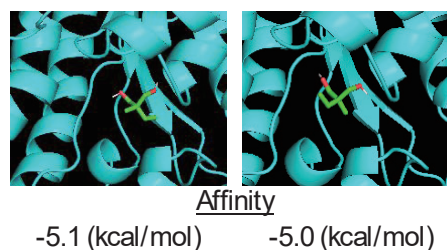


図 3 AlphaFold の予測構造と基質とのドッキング.

### 4. まとめと今後の展望

本研究では, 酵素の発現系の違いによる酵素活性・立体選択性の違いに着目して, 酵素反応の精査を行ってきた. その結果, 更なる追究は必要ではあるが, 本酵素が反応条件に大きく影響を受けやすいこと, それにより酵素活性および立体選択性に影響を与えることを確認した. 今後の本研究の進展により, 同じ遺伝子でも発現宿主を変更するだけで異なる酵素活性を得る知見・技術が期待でき, 酵素生産条件・反応条件の違いで, 同一酵素に異なる機能性を付与する基礎知見の確立と応用基盤 (適用可能な様々な酵素・発現系のカatalog化) の拡充を目指す.

### 5. 謝辞

本研究の遂行を助成いただきました, 公益財団法人 豊田理化学研究所に深く感謝申し上げます. また, 本研究の遂行に当たり, 共に研究を進展させてくれている原田新也さんおよび関係者に心より感謝いたします.

### REFERENCES

- 1) 宮本憲二, *生物工学会誌*, **92** (2014) 424-427.
- 2) H. Kikukawa, *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **83** (2019) 768-773.
- 3) H. Kikukawa, *et al.*, *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, **19** (2019) 101108.