

## 【基盤研究(S)】

### 生物系(農学)



## 研究課題名 動植物酵素の異種宿主における可溶性発現技術の開発とそれらの有用物質生産への利用

富山県立大学・生物工学科・教授 あさの やすひさ  
浅野 泰久

研究課題番号: 17H06169 研究者番号: 00222589

研究分野: 酵素化学工学

キーワード: 遺伝子発現、酵素、可溶性変異、節足動物

### 【研究の背景・目的】

我々は、微生物のみならず植物および動物のシアン代謝系を遺伝子および酵素レベルで詳細に解明し、「アルドキシム-ニトリル経路」を提案した。この代謝系にある酵素として発見したニトリルヒドラーゼ (NHase) に続いて、微生物、動植物において、アルドキシムやニトリルの代謝に関する種々の酵素を明らかにした。さらに、節足動物ヤスデに新しいヒドロキシニトリルリアーゼ (HNL) 類を見出した。トランスクリプトーム解析からヤスデは未知タンパク質・酵素の宝庫であると想定される。

一方、大腸菌において封入体として不溶性にしか発現されない植物酵素が、変異型酵素は活性を有する酵素として可溶性に発現される現象を発見した。このような可溶性変異を多くの遺伝子にランダムに引き起こし、変異箇所を統計的に解析することにより、構造上の規則性を見出しつつある。

本研究は、酵素工学の分野において、お互いに連関している2つの大きな課題を解決することを目的とする。課題1: 動植物などのタンパク質・酵素を変異によって、異種宿主での可溶性発現させる際に、我々が提案している「 $\alpha$ -ヘリックス則」および

「INTMSAlign-HiSol」プログラムを用いる改善手法について、その有効性と一般性を確立する。課題2: ヤスデのタンパク質の多くが、新しい構造を有することが確実であることから、ゲノム解析を行いシアン代謝に関与する「アルドキシム-ニトリル経路」や一次代謝に関与する酵素遺伝子などの発見と帰属を行う。ヒドロキシニトリルリアーゼ (HNL) のX線結晶構造解析、酵素改変による光学活性シアノヒドリン合成などへの高度利用を行う。

### 【研究の方法】

可溶性変異をランダムに引き起こし、変異箇所を統計的に解析することにより、構造上の規則性を見出す。その結果から、変異箇所を指摘しどのアミノ酸に変異すれば可溶性発現するかを予測する「 $\alpha$ -ヘリックス則」および「INTMSAlign-HiSol」などのプログラムを発展させる。本技術を用いれば、動植物由来のタンパク質の大腸菌などでの可溶性発現が可能となり代謝・酵素研究に威力を発揮することが期待される。

ヤスデのトランスクリプトーム解析などからシアン代謝に関与するアルドキシム-ニトリル経路など

の遺伝子の帰属を行う。数多くのタンパク質 cDNA を可溶性に発現させ、質量分析法を用いて代謝産物からの生成物を検出し酵素遺伝子を同定する。ヤスデ由来 HNL 類の結晶構造解析により反応機構を明らかにする。タンパク質工学による酵素の改変により、HNL の基質特性を改善させる。さらに光学活性シアノヒドリン合成などに利用する。

### 【期待される成果と意義】

一次配列の変異情報から、可溶性を引き起こす変異部位および変異アミノ酸、その他の諸性質などの法則性を確認し、予測に利用する。従来、そのような顕著な研究分野や、研究者は知られていなかった点、本研究構想は挑戦的であると言える。

ヤスデのゲノム解析からシアン代謝や一次代謝に関与する酵素遺伝子を中心にして、それらの帰属を行う。そのタンパク質の多くは、新しい構造を有していると考えられる。可溶性発現技術を縦横に使い、質量分析機等を用いて酵素の生成物を網羅的に同定し、多くの新規構造の酵素タンパク質を同定することは、前人未踏の領域である。

### 【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Y. Asano, M. Dadashpour, M. Yamazaki, N. Doi, and H. Komeda, Functional expression of a plant hydroxynitrile lyase in *Escherichia coli* by directed evolution: Creation and characterization of highly *in vivo* soluble mutants, *Protein Engineering Design and Selection*, **24** (8), 607-616 (2011).
- S. Nakano, and Y. Asano, Protein evolution analysis of *S*-hydroxynitrile lyase by complete sequence design utilizing the INTMSAlign software, *Scientific Reports*, **5**, 8193 (2015).

### 【研究期間と研究経費】

平成 29 年度 - 33 年度 157,700 千円

### 【ホームページ等】

<http://www.pu-toyama.ac.jp/BR/asano/homepage.html>  
<http://www.jst.go.jp/erato/asano/index.html>