

現代生物学概論  
2013年4月15日



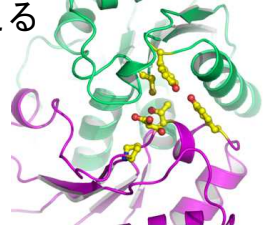
# 酵素の探索と機能改変



理工学部  
生命情報学科  
准教授 宮本憲二

## 講義内容

- 酵素とは？
- 欲しい酵素を探す
- 酵素の機能を変える
- 機能改変の例
- X線結晶構造解析



皆さんの酵素に対するイメージを変えます

酵素の基質特異性は狭い。  
→ 様々な非天然化合物を受け入れる物もあります。

酵素は堅く締まった構造をしている。  
→ しなやかに動いています。

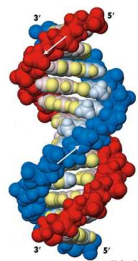
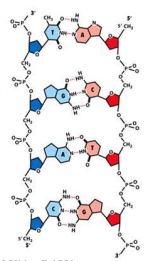
酵素反応は遅い。  
→ F1のエンジンよりも高速で働く物もあります。

酵素は、熱に弱い。  
→ 100度でも活性を持つものがあります。

酵素の性質は変えることができない。  
→ 自由にデザインできるようになってきました。

## セントラルドグマ

DNA (情報貯蔵物質) → 転写 → RNA (情報伝達物質) → 翻訳 → タンパク質 (機能物質)

遺伝暗号(コドン)	
U	C A G
U	Phe Ser Tyr Cys U
	Leu Ser Tyr Cys C
	Leu Ser Stop Stop A
	Leu Ser Stop Stop G
C	Leu Pro His Arg U
	Leu Pro Gln Arg C
	Leu(Met)* Pro Gln Arg G
A	Ile Thr Asn Ser U
	Ile Thr Asn Ser C
	Ile Thr Lys Arg A
	Met(Start)* Thr Lys Arg G
G	Val Ala Asp Gly U
	Val Ala Asp Gly C
	Val(Met)* Ala Glu Gly G

Molecular Cell Biology, Sixth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

## タンパク質を構成する20種類のアミノ酸

疎水性アミノ酸: Alanine (Ala or R), Valine (Val or V), Isoleucine (Ile or I), Leucine (Leu or L), Methionine (Met or M), Phenylalanine (Phe or F), Tyrosine (Tyr or Y), Tryptophan (Trp or W)

親水性アミノ酸:
 

- Basic amino acids: Arginine (Arg or R), Lysine (Lys or K), Histidine (His or H)
- Acidic amino acids: Aspartate (Asp or D), Serine (Ser or S), Threonine (Thr or T)
- Polar amino acids with uncharged R groups: Glutamine (Gln or Q), Asparagine (Asn or N), Glutamate (Glu or E), Alanine (Ala or A), Glycine (Gly or G), Proline (Pro or P)

特別なアミノ酸: Cysteine (Cys or C), Glycine (Gly or G), Proline (Pro or P)

Molecular Cell Biology, Sixth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

## タンパク質の1次構造

(a)  $H_2N-CH(R_1)-COO^- + H_2N-CH(R_2)-COO^- \rightarrow H_2N-CH(R_1)-CO-NH-CH(R_2)-COO^- + H_2O$

(b) N末端:  $H_2N-CH(R_1)-CO-NH-CH(R_2)-CO-NH-CH(R_3)-CO-NH-CH(R_4)-CO-NH-CH(R_5)-COO^-$  C末端

(c) Peptide bond

Molecular Cell Biology, Sixth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

### タンパク質の2次構造

**αヘリックス**  
(らせん構造)

**βシート**  
(何本か横に束ねた構造)

N末端

3.6残基/ターン

C末端

(a) Top view

(b) Side view

Molecular Cell Biology, Sixth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

### タンパク質の構造

(a) 1次構造(配列)  
-Ala-Glu-Val-Thr-Asp-

(b) 2次構造(局所的な折りたたみ)

αヘリックス

βシート

(c) 3次構造(広範囲な折りたたみ)

(d) 4次構造(多量体形成)

Molecular Cell Biology, Sixth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

### 酵素触媒の特徴

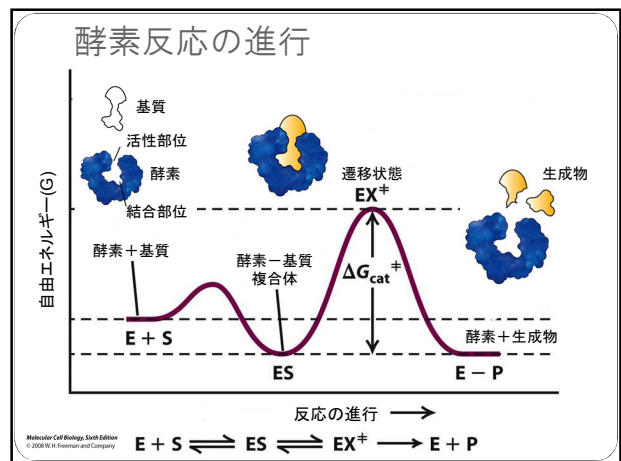
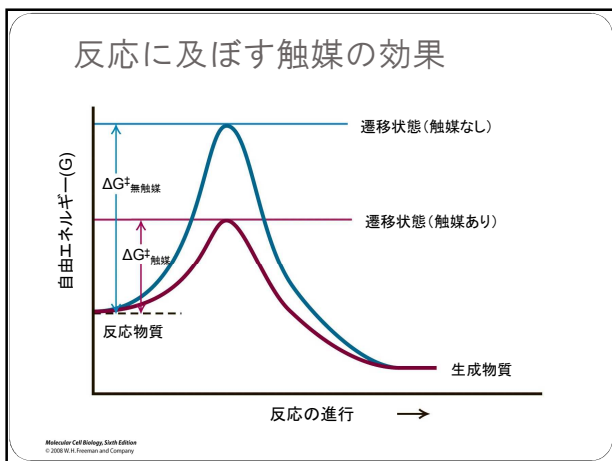
- 化学触媒(レアメタル)は高騰や枯渇が問題となっているが、酵素は培養によりいくらでも増やすことができる
- 高い選択性を持つ
- 非天然化合物にも作用する

↓

**生体触媒(Biocatalyst)として注目**  
(グリーンケミストリー、ホワイトバイオテクノロジー)

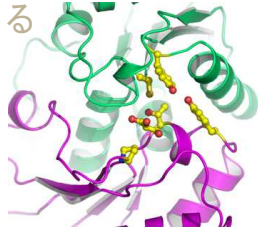
### リパーゼの基質特異性

酵素は意外と寛容だ!  
鍵と鍵穴と教えられたのに……! ?


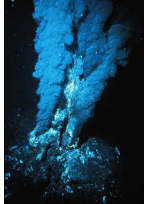


講義内容

- 酵素とは？
- 欲しい酵素を探す
- 酵素の機能を変える
- 機能改変の例
- X線結晶構造解析



環境により得られる酵素の性質は異なる

温泉  海底熱水鉱床 

PCR反応

変性: 95°C

アニーリング: 50~60°C

伸長: 72°C

1 cycle 終了

2 cycle 終了

超好熱酵素

環境により得られる酵素の性質は異なる



低温性酵素

様々な汚れに対応できるように、トップには3つの酵素が配合されています

- リパーゼ 黄ばみのもと、皮脂を分解する
- プロテアーゼ 繊維や食べ残しに含まれるタンパク質を分解する
- アミラーゼ ガンコな食べこぼし汚れを分解する

低温活性フリーチ



酵素の安定性と反応速度

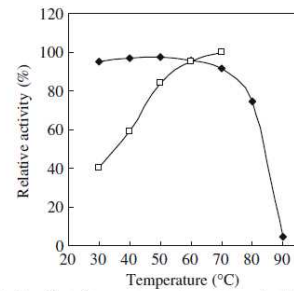
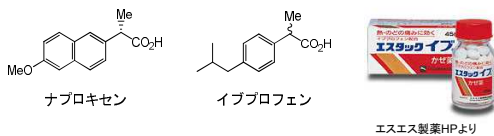


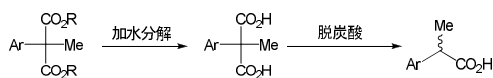
Fig. 3 The effect of temperature on the activity and stability. The remaining activity after incubation for 1 h at various temperatures (closed diamond). The relative activity at various temperatures (open square)

α-アリールプロピオン酸とその合成法

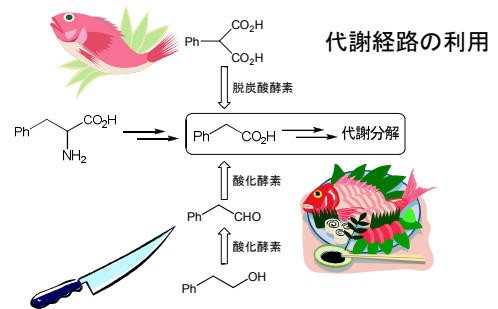
非ステロイド系抗炎症薬



マロン酸エステル合成



各種酵素のスクリーニング



### 代謝経路を利用したスクリーニング

脱炭酸酵素無し→生育できない

脱炭酸酵素 → 代謝分解

*Alcaligenes bronchisepticus*



### 脱炭酸酵素と物質生産

脱炭酸酵素 → 代謝分解

脱炭酸酵素 → 代謝分解 (X)

光学活性体

D isomer / L isomer

### 不斉脱炭酸反応 (菌体)

Ar	Yield (%)	e.e. (%)
	90	98
	96	98
	85	98

K. Miyamoto et al, J. Am. Chem. Soc., 112, 4077 (1990)

### 酵素精製と電気泳動

精製ステップ	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)
無細胞抽出液	8630	10950	1.26	100
熱処理	4280	9540	2.22	87
硫酸分画	2840	10350	3.64	95
DEAE-トヨバール	244	5868	24.1	54
Butyl-トヨバール	14.7	3391	231	31
QAE-トヨバール	4.32	1627	377	15

K. Miyamoto et al, Eur. J. Biochem., 210, 475 (1992)

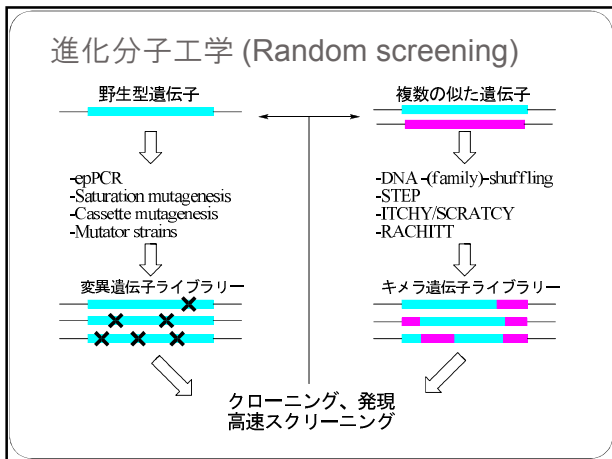
### 速度論的パラメーターの測定

Ar	R	Km (mM)	kcat (s <sup>-1</sup> )	Relative activity (%)
	H	13.9	353	100
	H	87.4	5321	240
	H	19.4	1728	350

↓

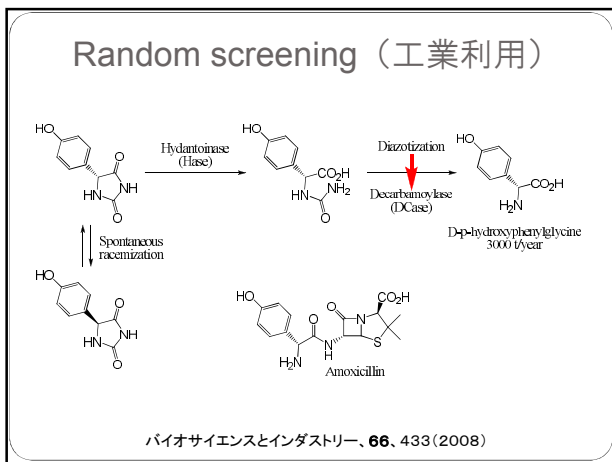
アリールマロン酸脱炭酸酵素と命名  
F1のエンジン回転: 19000rpm = 316 s<sup>-1</sup>





### 講義内容

- 酵素とは？
- 欲しい酵素を探す
- 酵素の機能を変える
- 機能改変の例
- X線結晶構造解析

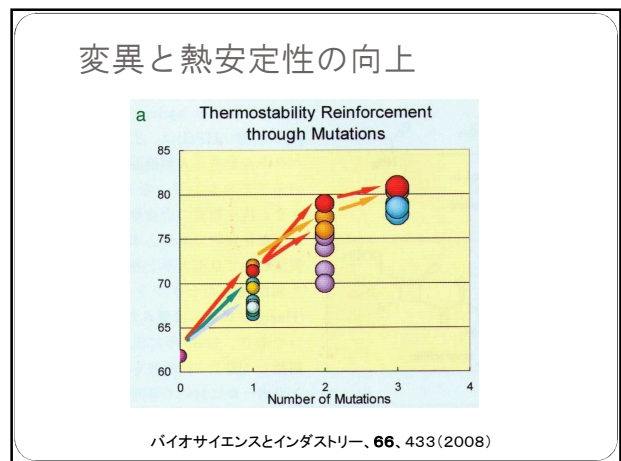
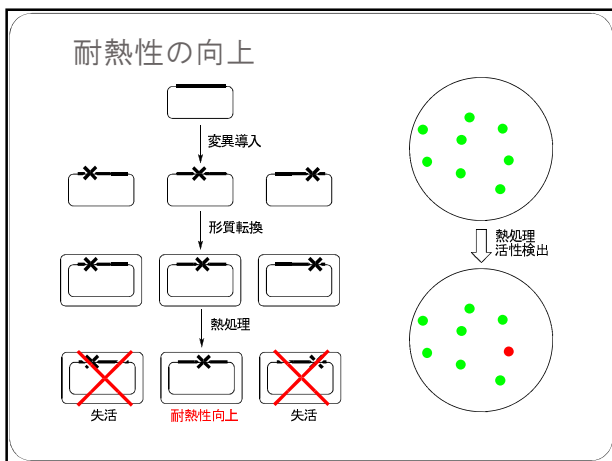


### プロセス上の問題点

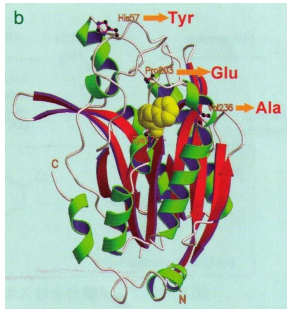
- 化学的なカルバモイル基の除去では、大量の廃棄物が発生する
- DCaseを用いると廃棄物は発生しないが、熱安定性が低いので工業利用できない

→ Random screeningによる熱安定性の向上

D-p-hydroxyphenylglycine  
3000 t/year



構造と熱安定性向上の関連



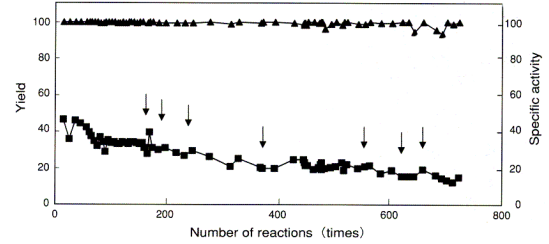
**His57Tyr**  
近傍疎水性アミノ酸との疎水性相互作用強化

**Pro203Glu**  
主鎖のひずみ解消と新たなイオン結合形成

**Val236Ala**  
Val側鎖の立体障害の解消

バイオサイエンスとインダストリー、66、433(2008)

安定酵素による実生産



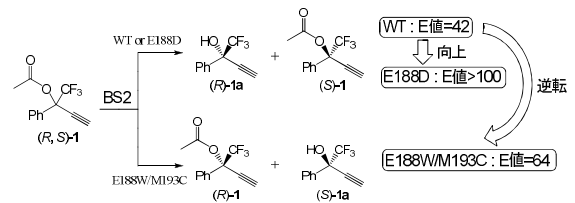
3重変異体  
熱安定性が19°C向上  
↓  
半年以上の実生産が可能

バイオサイエンスとインダストリー、66、433(2008)

Random screening

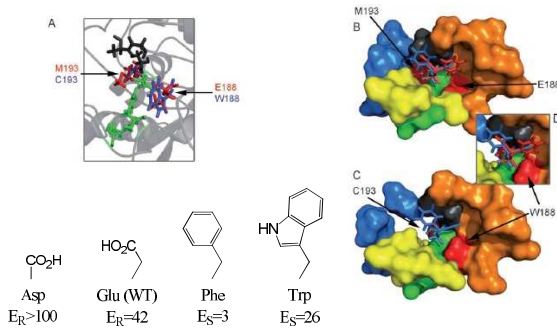
- 変異部位が予測不可能な場合、有効な手段である
- 大量の変異体を迅速にスクリーニングする方法が必要である
- 得られた配列と機能の関連性は、他の酵素の機能改変に有用な情報となる

立体選択性の逆転(Rational design)



Dr. Robert Kourist, Prof. Uwe Bornscheuer (Germany)

活性部位の比較



Dr. Robert Kourist, Prof. Uwe Bornscheuer (Germany)

Rational design

- 立体構造が既知で、基質との結合部位がわかっていたらデザインは可能
- 変異箇所が特定できても、どのアミノ酸が最善かはやってみないとわからない
- 変異が数カ所の場合は、変異ライブラリーを構築しスクリーニングする必要がある

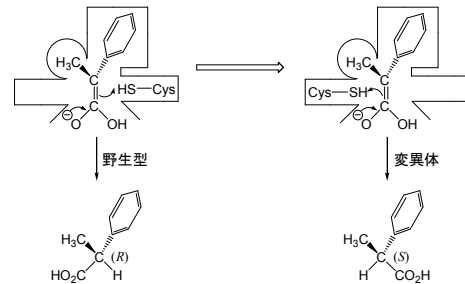
### アリールマロン酸脱炭酸酵素の改変



#### 研究の目的

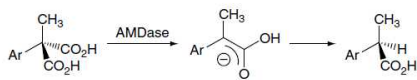
- ・ 逆の選択性を持つ酵素が欲しい
- ・ 立体構造を知りたい
- ・ 活性を上げたい

### 立体選択性の逆転 (Rational design)



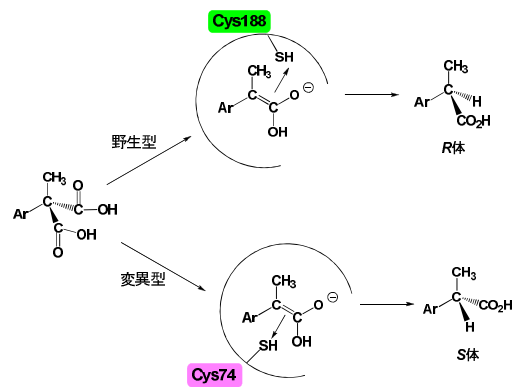
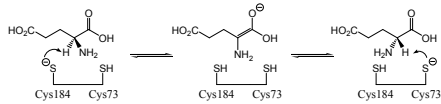
Y. Terao et al. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 45 (2007) 15–20

### 変異導入箇所の特定

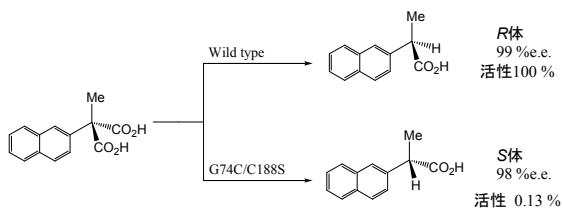


Glu racemase	--MDNRE--VKMMVVA	C	NTATAAA--VKTLIMG	C	TRHFFFLAP~
Asp racemase	---MEN--ENFVFLA	C	NTAHYFF--CEKVLIG	C	TELSLMNE~
Hydantion racemase	---S--VDAFVIA	C	---RG--REALLIG	C	ARMSEFAD~
Maleate isomerase	---MKT--KMTKAYL	C	LVAIMAQ--DAVLESA	C	TKMSEPEA~
AMDase	MQQASTP--AAVVSIM	G	TSLSFYR--SDGILLG	C	GSLLTLEDA~

#### グルタミン酸ラセマーゼの反応機構



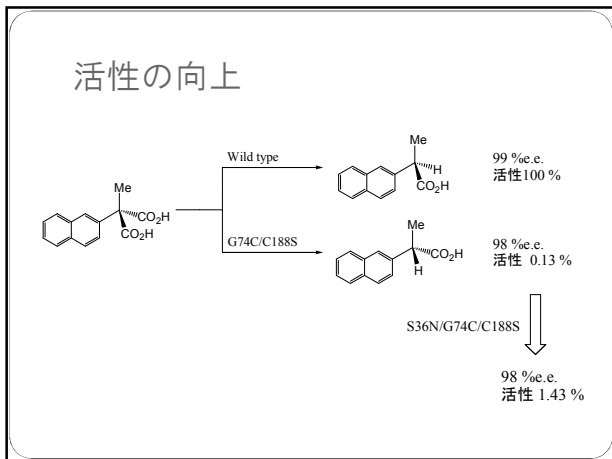
### 選択性の逆転



### ランダム変異による活性の向上

*E. coli* XL1-Red (Stratagene社製)  
DNA修復遺伝子が欠失され、その結果短時間で多くの変異が起こる



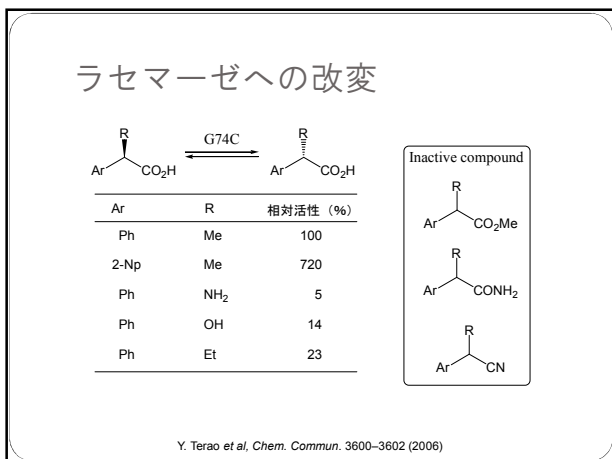
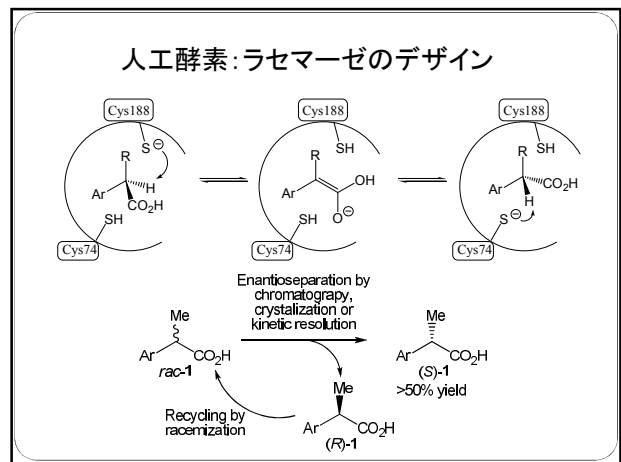
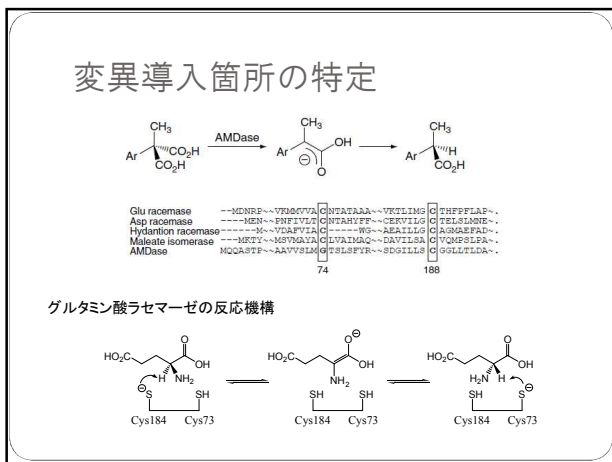


### Screening results of mutation library

Variant	Specific activity (U/mg)	K <sub>m</sub> (mM)	k <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	Rel. Act. (%)	e.e. (%)
G74C/C188S	0.040	7.5	0.020	1.0	8 (S)
G74C/C188G	0.10	3.3	0.050	5.6	9 (S)

↓

Dramatically improvement



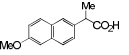
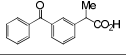


### Substrate specificity of G74C/V43A

AMDase	Decarboxylation <sup>a)</sup>			Racemization <sup>b)</sup>		
	K <sub>m</sub> (mM)	k <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	Relative activity (%)	K <sub>m</sub> (mM)	k <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	Relative activity (%)
Wild type	13.9	353	97700	no reaction		0
G74C	10.4	0.27	100	30.2	0.60	100
G74C/M159L	18.3	0.063	14	30.0	1.0	165
G74C/V43A	11.4	0.022	8	29.7	1.1	185

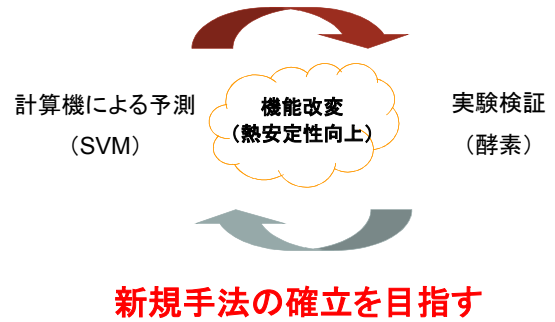
R. Kourist and K. Miyamoto, Chemistry-A European Journal, in press

Substrate specificity of G74C/V43A

Substrate	Relative activity (%)		Activity increase
	G74C	G74C/V43A	
	100	183	1.8
	8	40	5
	770	2100	3
	1.5	50	30

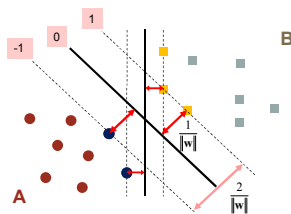
R. Kourist and K. Miyamoto, *Chemistry-A European Journal*, in press

バイオインフォマティクスによる機能予測



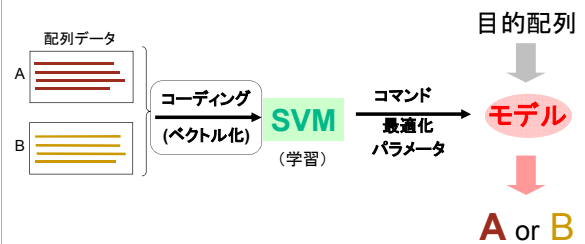
SVMとは

- Support Vector Machine (SVM)
  - パターン認識手法の一つ
  - データを二つのクラスに分類



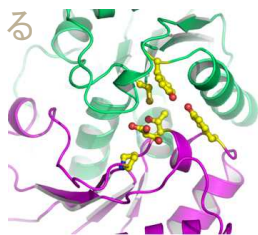
実験の流れ

- 榊原研究室との共同研究
- 課題：SVMを使ってタンパク質を分類

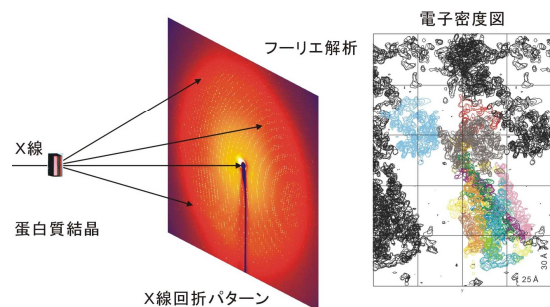


講義内容


- 酵素とは？
- 欲しい酵素を探す
- 酵素の機能を変える
- 機能改変の例
- X線結晶構造解析



X線結晶構造解析



酵素の結晶と大型放射光施設(SPring-8)

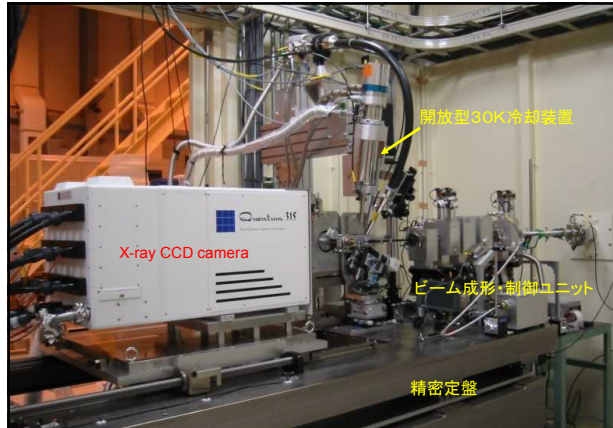


200  $\mu\text{m}$

SPring-8 HPより

SPring-8

酵素の結晶  
(物理学科 中迫教授提供)



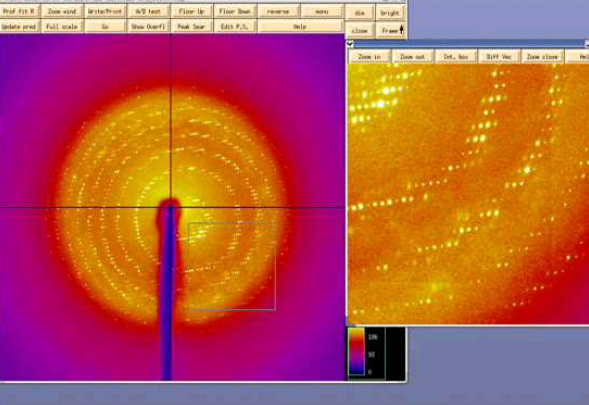
開放型30M冷却装置

X-ray CCD camera

ビーム成形・制御ユニット

精密定盤

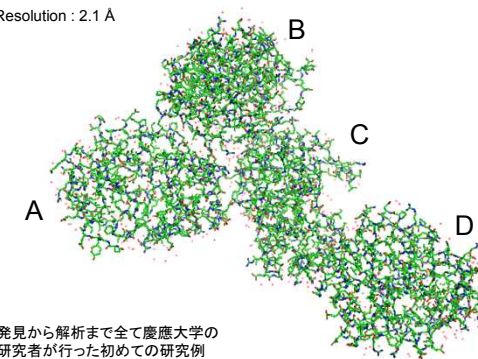
BL41XU for macromolecular crystallography SPring-8 BL45PX HPより



AMDaseのX線回折パターン

1個のユニットには4個のサブユニットが存在

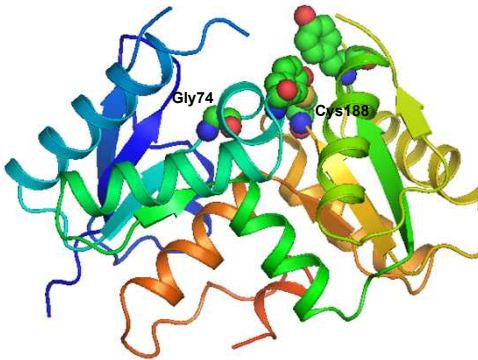
Resolution : 2.1 Å



A B C D

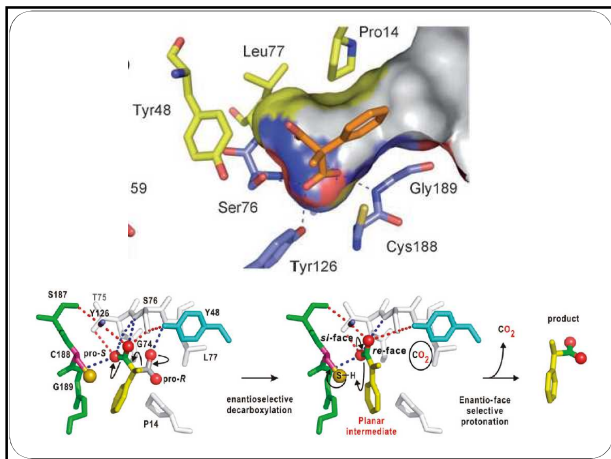
発見から解析まで全て慶應大学の研究者が行った初めての研究例

酵素は堅いのか?

Gly74

Cys188



## 酵素と機能改変（まとめ）

- 酵素
  - ・ アミノ酸で構成されるタンパク質である
  - ・ 様々な環境から様々な性質のものが得られる
  - ・ 触媒として機能し、非天然化合物にも働く
  - ・ 高い立体選択性を持つ（ものもある）
  - ・ しなやかに動いている
- 酵素機能の改変
  - ・ 変異により色々な性質のものを作り出せる
  - ・ ランダムな方法と合理的にデザインする方法がある
  - ・ まだ完全にデザインはできていない

## レポート課題

- 感想を書いて提出してください
- 期 限： 4月22日 16:45まで
- A4レポート用紙1枚以内
- 所属学部、学年、名前を忘れないこと！