
健康で豊かな生活を実現する

スマートタンパク質工学戦略的研究拠点

平成 27 年度～平成 29 年度 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

研究成果報告書

」

平成 30 年 4 月

学校法人名 東京薬科大学

大学名 東京薬科大学

研究組織名 生命科学研究科

研究代表者 山岸 明彦

(東京薬科大学生命科学部教授)

は し が き

「健康で豊かな生活を実現するスマートタンパク質工学戦略的研究拠点」は平成27年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業に採択され3年間の活動を行い、当初の目標を達成する成果を上げた。

遺伝子操作の発展に伴い、1980年代より盛んにタンパク質工学の研究が行われた。本来工学では、既存の理論や知識に基づいて初期の目的とする製品を設計生産する。タンパク質工学においても遺伝子の入手およびその改変は随意に実施可能である。しかし、設計した遺伝子から発現したタンパク質が折りたたまれるかどうか、その安定性や活性などの性質を予想することは現在でもできない。これまでのタンパク質工学は、既知のタンパク質安定化理論によりタンパク質の安定化設計を行う事、酵素の反応中心残基を置換することで反応特性を変化させる理論的方法が中心であった。もう一つの方法として、安定性、活性、結合特性などのタンパク質や酵素の特性を選択するシステムを構築し、性質の変化した変異型を選択するという方法、進化分子工学が用いられてきた。しかし、進化分子工学的手法も、その選択システムの構築が容易ではなく、利用範囲は限定されていた。

一方で、サンガー法による初代DNAシーケンサーから、第4世代にいたるシーケンサーの急速な開発によって、DNA塩基配列決定は安価で高速に実施可能となっている。その結果、DNAデータベースに蓄積された情報は急速に増加し続けている。その情報を用いる事で、酵素の改変が容易になりつつある。また、計算機の計算速度および費用も、ムーアの法則として知られるように指数関数的な進歩を遂げている。まだ数十残基の極めて小さいタンパク質を除けば、配列情報から構造を予測することはまだ出来ないが、計算機を用いた方法の今後の発展も期待される。本研究拠点では、今後の発展が予想されるこの二つの方法を理論、実験的実証、応用の3つの段階を結合し、その結果を還元することで実際に利用可能な手段として開発を目指した。その結果、3つの段階の連携とそれぞれの段階での成果を得ることができた。

本拠点研究のもう一つの開発目標は、バイオナノテクノロジーである。天然のタンパク質の中には、H⁺ATPase や鞭毛のように、複数のタンパク質が自己組織化して駆動素子として機能するものがある。しかし、こうした自己組織化分子を設計することは極少数の例にとどまり、容易ではない。本拠点形成研究では、進化分子工学、理論的設計と分子動力学計算を結合することで、金属とタンパク質の結合面設計、およびタンパク質-タンパク質結合面設計に取り組んだ。その結果、この二つの課題に対応する実例を入手し、動力学計算から設計指針を得ることに成功した。さらに、設計されたタンパク質-タンパク質結合面は他のタンパク質にも移植可能であることが示された。これは、当初想定した目標を超える大きな成果である。

本報告書では拠点形成研究の3年間の成果をまとめた。これらの研究を今後も継続的に実施する予定であり、今後の発展を目指した拠点形成が目的通り達成されたといえる。

平成30年3月

健康で豊かな生活を実現するスマートタンパク質工学戦略的研究拠点代表

東京薬科大学生命科学部 教授 山岸明彦

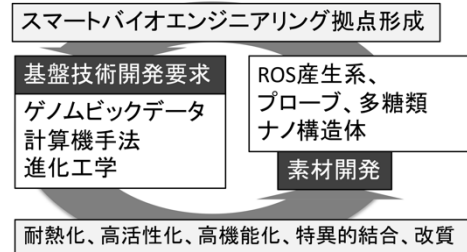
目 次

1. 研究成果の概要.....	3
(1) 研究プロジェクトの目的・意義及び計画の概要.....	3
(2) 研究組織.....	4
(3) 研究施設・設備等.....	5
(4) 研究成果の概要.....	5
2. 全体の運営について.....	21
3. 研究成果の詳細.....	29
A. ビックデータを用いた酵素高安定化設計方法の開発.....	29
A-1 理論:酵素安定化理論の高度化:.....	29
A-2 活性酸素種(ROS)発生系と検出蛍光タンパク素子の開発.....	37
A-3 免疫アジュバント開発.....	65
A-4 でんぷん改質酵素安定化.....	79
B. ビックデータを用いた好熱菌安定酵素の高活性化技術の確立.....	87
B-1 理論・実証: 好熱菌酵素の汎用的な低温高活性化改変技術の確立.....	87
B-2 過酸化水素検出素子開発.....	94
C. 金属(金、白金等)と特異的に結合するタンパク質設計技術の開発.....	101
C-1 金属 (金、白金等) と特異的に結合するタンパク質設計技術の開発 (理論).....	101
C-2 実証(梅村知、宮川): 白金と結合する多種の配列の取得と解析.....	107
C-3 応用: 導電性タンパク質を利用した新規バイオプロセスの開発.....	111
D. タンパク質-タンパク質接合面設計法の開発.....	123
D-1 理論:タンパク質-タンパク質接合面設計法の開発.....	123
D-2 実証:タンパク質-タンパク質結合法の開発.....	128

1. 研究成果の概要

(1) 研究プロジェクトの目的・意義及び計画の概要

【目的】酵素の高安定化、高機能化、バイオナノ技術開発を目指したスマート(情報高度集約型)タンパク質工学の基盤技術開発をおこなう。理論研究から応用研究まで技術移転と課題対応のサイクルで結ばれた、研究拠点を創成する。



【意義】酵素は、生物がもつ天然のタンパク質性触媒であり、これまでタンパク質工学で多くの研究が行われてきた。タンパク質の自己組織化能は、バイオナノ素材として期待されているが、タンパク質相互作用の自由な設計は不可能であった。大量ゲノム情報の蓄積、計算能力の指数関数的増加から、タンパク質工学を情報高度集約的に行うことが可能となってきた。本計画ではゲノムビッグデータの活用と計算機手法を進化工学と組み合わせることから、本来環境低負荷で高機能の酵素(タンパク質)の設計技術の高度化、バイオナノ技術の開発研究拠点を形成する。これは健康で豊かな生活を実現するための技術革新となる。技術移転と課題対応のサイクルで、加速的に進化する研究拠点を形成する。

【計画】理論研究で課題対応、実証研究で検証、応用研究に技術移転する。テーマに対応して、各年度ステージを進める。

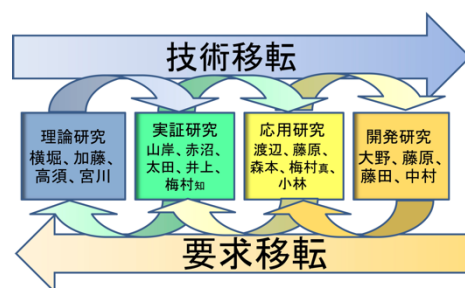
27 年度:既に開発したタンパク質安定化技術を応用研究に移転する。低温適応化に関する理論研究を行う。ナノ技術は、金属結合および蛋白-蛋白結合の両開発に成功しているが、その理論化と実証研究を進める。

28 年度:安定化技術移転で見えてくる課題を理論研究で解決する。実証研究で明らかになった実証データをもとに安定化、金属結合、タンパク質結合理論の高度化を行う。安定化、活性化、結合理論を実証研究で検証し、応用研究で実際に応用する。すなわち、技術移転で応用研究を実施、課題を理論研究、実証研究で解決するサイクルをまわす。

29 年度:サイクルは2週目に入る。理論巧緻化と理論技術移転、設計された応用酵素を完成させる。開発された技術の公表を行い研究を広める。

(2) 研究組織

この分野の高い実績を持つ山岸 (PNAS)が全体を統括する。実績ある研究者の理論研究から実証研究、応用研究へのサイクルで太く結ばれた加速的に進化する研究体制をとる。理論研究はゲノムデータの系統学的解析から、耐熱化設計と低温・常温での触媒活性向上



に成功している横堀 (NAR)が、最高性能の配列解析ソフト(MAFFT)を開発した加藤(MBE)、計算科学のエキスパート高須、宮川とともに実施する。実証研究を山岸、赤沼、太田とナノテク専門家梅村知(AdvMater)が担う。応用研究は、個々の酵素とその利用系の専門家井上、森本 (CurrBio)の知識と経験を生かして若手と共に担当する。渡邊 (ProNAS)がナノエレクトロニクス材料開発を、光合成専門家藤原、藤田、中村がデンプン改質酵素開発を行う。免疫専門家大野 (NatureCom)が高機能アジャバント開発を行う。

研究協力者当初 15 名 (うち学外 2 名) に追加で学外 2 名。その他、学内研究協力者と共に研究する学内研究者 7 名の合計 24 名。学部学生 18 名大学院生 31 名、PD3 名 (戦略 1 名、科研費 1 名、学振 1 名)、RA14 名。RA の内 2 名は期間中に PD となった。研究計画 A, B, C, D 何れも理論と実証・応用研究が相互に共同している。更に、A-2 は 4 つのグループで共同している。大学学務、経理、人事諸課が研究事務を支援した。アルバイトを 1 名雇用して研究支援した。早稲田大学、秋田県立大学、大阪大学と連携している。

研究プロジェクトに参加した主な研究者

山岸明彦	応用生命科学科・教授	全体総括および酵素高活性化実証研究
横堀伸一	応用生命科学科・講師	高安定高活性酵素理論研究
高須昌子	分子生命科学科・教授	バイオナノメカニクス技術開発
宮川 毅	情報教育研究センター・助教	バイオナノエレクトロニクス理論研究
渡邊一哉	応用生命科学科・教授	バイオナノエレクトロニクス応用研究
太田敏博	応用生命科学科・教授	高機能酵素開発
藤原祥子	応用生命科学科・教授	高機能酵素開発
梅村知也	分子生命科学科・教授	バイオナノ技術実証
梅村真理子	応用生命科学科・助教	高機能酵素開発

井上英史	分子生命科学科・教授	高機能酵素開発
森本高子	分子生命科学科・准教授	高機能酵素開発
小林豊晴	分子生命科学科・助教	高機能酵素開発
大野尚仁	薬学部・教授	高機能酵素開発

(共同研究機関等)

藤田直子	秋田県立大・生物資源科学部・ 生物生産科学科・准教授	高機能酵素開発
加藤和喜	大阪大学・免疫学フロンティア 研究センター・特任教授	高安定高活性酵素理論研究

(平成 29 年 4 月 1 日より)

赤沼哲史	早稲田大学・人間科学学術院・ 准教授	高機能酵素開発
中村保典	秋田県立大学・名誉教授、 東京薬科大学客員研究員	高機能酵素開発

(3) 研究施設・設備等

研究 3 号館 (4,645m²) 研究者 40 名中 16 名が本戦略研究に参加。

研究 4 号館 (6,823m²) 研究者 29 名中 6 名が本戦略研究に参加。

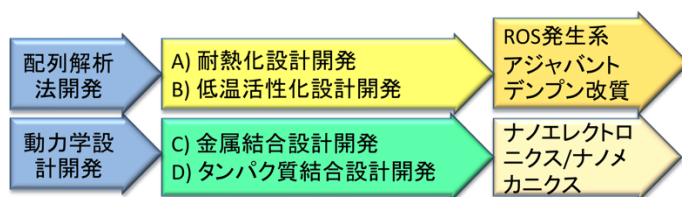
床置型超遠心機 (27 年度購入) 60 時間

ジャーファーマンター (28 年度購入) 450 時間

キャピラリー型 DNA シークエンサー (19 年度購入) 1,000 時間/年

(4) 研究成果の概要

本計画全体では A~D、4つのテーマに取り組んだ。究めて優れた特性をもつタンパク質であるが一般に安定性が低い。一方、好熱菌酵素は安定である



が常温での活性が低い。安定性と高活性の両特性を併せ持つ理想的酵素の設計を A と B で行った。A と B では理論を応用して ROS 発生系、アジャバント、デンプン改質、プローブの開発研究

を行った。

これまでタンパク質の改変は、試行錯誤の域を出なかった、ゲノムデータ大量蓄積と計算機の数関数的能力向上から、情報高度集約的にタンパク質を改変設計することのできる時代が来ている。ナノエレクトロニクスとナノメカニクスの基盤技術開発を C と D で行った。C ではナノエレクトロニクス開発の基礎研究として金属結合タンパク質設計を、D ではナノメカニクスの基礎研究としてタンパク質結合設計技術開発を行った。

研究成果発表は、雑誌論文 46 報、図書 6 報、国際学会 26 件、国内学会 96 件である。

A. ビックデータを用いた酵素高安定化設計方法の開発

(A-1 理論) 蓄積しているゲノムデータを活用して酵素の安定化手法の巧緻化を図り、その理論を下記に応用した。(A-2) 活性化酸素種 (ROS) の発生系を開発し、それを生体内外で応用する。(A-3) ROS に反応してポリフェノールを合成することから新規免疫アジュバント開発を行う。(A-4) デンプン改質に用いるブランチング (枝作り) 酵素の安定化を行う。

A-1 理論: 酵素安定化理論の高度化:

【当初の目標】これまでのタンパク質安定化手法である理論的耐熱化手法は試行錯誤を必要とし、効率的な手法の開発が望まれていた。横堀ら (Akanuma et al. 2011 J. Mol. Biol. 412: 212-225; Akanuma et al. 2013. PNAS 110: 11067-11072) は配列データから系統解析によって安定化推定を行う画期的方法を開発した。この方法は、相同遺伝子の配列アライメントから、祖先生物がもっていた配列を推定するという方法である。祖先生物が高温に生息していたということが明らかとなっており、祖先生物が持っていた祖先配列を標的タンパク質に変異導入することによってタンパク質を高効率で安定化することに成功した。しかし、正確な配列アライメントに時間を要するという課題が明らかになった。そこで、本課題ではアラインメントの高速高精度 (巧緻化) 技術を開発し、それを祖先型酵素再生で確認した。

【得られた成果】加藤が開発した最高性能ソフト (MAFFT: MBE、HotPaper 引用率上位 0.1%) でも、配列類似性の低い配列部分のアライメントが問題となった。そこで、配列の領域ごとに区切る手法により、時間の短縮に成功した。アライメント検証のために全生物が持つアミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS) の複合アライメントを行い、配列類似性の低い配列に関して満足のいく配列アライメントを得ることができ検証できた(*5, 31,32)。

これまでに祖先配列再生に用いられたのは 400 残基以下の真正細菌祖先以降の配列であった。今回は 700 残基以上の、かつ、全生物共通祖先の挑戦的アラインメントを行った。すなわちバ

リンを tRNA に結合する酵素 ValRS とイソロイシンを tRNA に結合する酵素 IleRSI、それぞれの共通祖先タンパク質配列 (ValRS-com、IleRS-com) を推定した。推定した遺伝子を合成し、大腸菌内で発現、タンパク質精製を行った。その結果、ValRS-com と IleRS-com はバリンとイソロイシンをそれぞれ特異的に tRNA に結合する反応を触媒することがわかった(*35)。 IleRS-com は、これまで復元された中で最も長く (757 アミノ酸長)、このような大きなタンパク質の酵素活性を保持した復元が可能となったのは、アライメント作製技術巧緻化成功の証拠と言える。初期の目標を 100%達成した。

A-2 活性酸素種(ROS)発生系と検出蛍光タンパク素子の開発

4つの研究室が共同で、高機能化酵素の応用として活性酸素種 (Reactive oxygen species; ROS) 発生系とそれを細胞内外で検出する蛍光タンパク質素子の開発を実施した。

A-2-1 ROS 産生系および ROS 検出蛍光タンパクの開発

【当初の目標】好気性生物の呼吸鎖等で「活性酸素種 (Reactive oxygen species; ROS 主にスーパーオキシドや H_2O_2)」が発生することが知られている。ROS は「レドックスシグナリング」を担う分子として認知されるようになってきた。しかし、既存の方法では、 H_2O_2 の発生場所・量・タイミングを制御できない。本研究では、D-アミノ酸と赤色酵母由来 D-アミノ酸オキシダーゼ (rgDAAO) の組み合わせを改変することによって、生体への影響の少なく量的・時間的に H_2O_2 発生するシステムの構築を目的とした。また、これまで生体内での検出が非常に困難であったスーパーオキシドを検出できる蛍光タンパクの開発を目的とした。

【得られた成果】1) 有用な rgDAAO 変異体: まず高い触媒回転を有する *Rhodotorula gracilis* 由来の DAAO (rgDAAO) を用い、高選択的に合成 D-アミノ酸と反応する rgDAAO 変異体の開発を行った。野生型 rgDAAO^{WT} の M213 および近傍アミノ酸の種々の変異酵素を作成し、その中から M213 を V に変換した rgDAAO^{MV} を得た、この改変体と低い K_m 値を持つ D-アミノ酸のペアを得ることに成功した。つまり当初の目的である有用な rgDAAO 変異体-基質ペアを得ることができた(*4,6)。2) ついでこの変異体を線虫に導入する検討を行った。線虫の餌として利用する大腸菌は、細胞壁成分として D-Ala を含む。そこで D-Ala に対する K_m 値が大きく H_2O_2 産生能が低い変異型 rgDAAO^{MV} を用いることで、D-Ala の代謝を最低限に抑えることができる。コドン線虫に最適化した rgDAAO^{MV} の DNA 配列を線虫にインジェクションし、rgDAAO^{MV} 発現トランスジェニック線虫を得ることに成功した。現在までに、咽頭筋・体壁筋・神経組織に rgDAAO が発現した 3 種類のトランスジェニック線虫を得ることに成功した。3) ついで、細胞内局所で機能する D-アミノ酸-DAO システムを構築した。まず rgDAAO^{WT} 安定発現細胞を取得した。これらの rgDAAO^{WT} 発現細胞に D-ア

ミノ酸を添加して時空間的制御可能な H_2O_2 産生レドックス擾動系を構築出来た(*5,7,8)。4) スーパーオキシド特異的に不均化反応を触媒し H_2O_2 を産生するスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)を、 H_2O_2 検出蛍光プローブ roGFP2-Orp1 と融合するという分子デザインに基づき、細胞内スーパーオキシドの検出を可能とする蛍光プローブ N-SOD を開発した。N-SOD は、phenazine methosulfate(PMS)によって、細胞内で発生したスーパーオキシドを検出できる蛍光プローブとして機能することを明らかにした。以上、当初の目標を 100%達成した。

A-2-2 過酸化水素発生素子となる D-アミノ酸の合成

【当初の目標】細胞内局所的に発生可能な H_2O_2 の産生系の構築を目指し、rgDAAO を用い、1)rgDAAO 変異体と高選択的に応答する合成 D-アミノ酸の開発を行った。2)また H_2O_2 の発生を蛍光としてリアルタイムに観察するための蛍光色素の開発を行った。

【得られた成果】1) 生体内で H_2O_2 発生系に利用する非天然型 D-アミノ酸の開発:基質特異性の広い rgDAAO M213A 変異体(A-2-1 班の成果)をターゲットとして非天然型 D-アミノ酸として①フェニルグリシン誘導体を候補化合物として合成した。その結果 D-1-ナフチルグリシンを合成することに成功した。②またトリアゾール誘導体の合成を試み、メチル基を有する 1,2,3-トリアゾール誘導体を合成した。2) 細胞内局所的な H_2O_2 発生確認をモニタリングできる D-アミノ酸の開発: Weber と Farris によって開発された prodon はナフタレン環の2位にジメチルアミノ基、6位にカルボニル基を有する環境応答型蛍光分子である。そこでナフタレン環上2位にピロリジン環を有する 2-ナフチルグリシン由来のケト酸を合成し、メタノール溶液に 365 nm の紫外線を照射することで青色の蛍光を発することを確認した。すなわち、目的とする化合物の合成を 100%達成した。

A-2-3 ROS 発生系の細胞応用

【当初の目標】本課題では、細胞内で安定的発現し、活性が高いrgDAAOの変異型を開発し H_2O_2 の発生系を構築して、 H_2O_2 の発生を評価すること、また、構築した H_2O_2 発生系を用いて ROS 発生による生体への影響を解析することを目的とした。

【得られた成果】1) rgDAAO の細胞内発現系の構築: rgDAAO を pcDNA3.1 ベクターに挿入したrgDAAO 発現ベクターを構築し、培養細胞を用いたrgDAAO の発現系を構築した。2) rgDAAO 変異体の作成: rgDAAO は立体構造および基質との結合解析が行われている (*Adv. Synth. Catal.* 2006, 348, 2183 - 2190)。非天然 D 型アミノ酸である D-ナフチルグリシンのナフタレンと rgDAAO213 番目のメチオニン(M213)が立体障害を起こすことが予想されている。そこで、本研究では A-2-1 で作成した rgDAAO の M213 および近傍アミノ酸の変異酵素をヒト乳がん細胞 MCF-7 細胞で発現させた。この中で M213V や M213H が安定発現し、野生型比べて、D 型メチオニンに対する特異性が高くなっていた。3) H_2O_2 検出および、 H_2O_2 暴露の表現型解析方法の確立: ア

クチンは、真核生物に多量に存在し球状アクチンが重合して、繊維状アクチン(F-アクチン)を形成する。アクチンの構造変化に H_2O_2 が関与しており、 H_2O_2 酸化ストレスにより、細胞形態が変化する。そこで、アクチンを指標にして、 H_2O_2 の細胞内の影響を解析した。まず、酸化ストレス応答に重要な役割を果たす **ATF5** の解析を通して、酸化ストレス応答検出系を構築した。つまり **ATF5** の発現を **Neuro2a** 細胞において抑制すると、神経突起の伸長が抑制された(*1-3)。 H_2O_2 暴露した **Neuro2a** 細胞においてアクチンを **Actin-stainn488** で染色し観察したところ、神経突起の伸長が阻害され、アクチン骨格が減少し、成長円錐の減少が見られた。この方法で H_2O_2 の影響を神経培養細胞において解析できる。4) 神経細胞における H_2O_2 発現系の構築：蛍光タンパク質 **mCherry** 融合型 **rgDAAO-M213V** 変異体(**rgDAAO^{MV}**)発現ベクターを **Neuro2a** 細胞に導入し、分化誘導後 **D** 型メチオニン (**D-Met**) を添加したところ、**rgDAAO^{MV}** 発現した **Neuro2a** 細胞において H_2O_2 の発生が検出された。つまり、利用しやすい過酸化水素発生系が構築できた。5) 過酸化水素発生系を用いた細胞への影響解析：構築した新規細胞内過酸化水素発生系を用いて過酸化水素の細胞への影響を解析した。**Neuro2a** 細胞に **rgDAAO^{MV}** 発現ベクターを導入し、分化誘導後 **D-Met** を添加し、 H_2O_2 発生を誘導すると、細胞周辺に局在する F-アクチンが消失し、成長円錐への F-アクチンの集積も減少していた。この時、他の影響(アポトーシスやオートファジーなどの細胞死へと繋がる細胞ダメージ)は引き起こさず過酸化水素の影響を調べることができた。すなわち **ROS** 発生による生体への影響を解析する目標を **100%** 達成した。

A-2-4 ROS 検出・発生系の生体応用

【当初の目標】1) ショウジョウバエを用いて、**ROS** を発生する実験系を検討すること。2) その実験系を用い、寿命と **ROS** 発生量との関係を調べることから、ショウジョウバエ個体内での、**ROS** のレドックスシグナル分子としての機能や、酸化ストレスの個体に対する影響、特に、老化と脳機能への関わりについて明らかにすることを目的とした。

【得られた成果】1) ショウジョウバエ **ROS** 発生システムの構築：ショウジョウバエの外来蛋白質発現システムとして、**Gal4-UAS** システムが広く使われている。このシステムは、酵母由来転写因子 **GAL4** と **GAL4** 結合制御配列 **UAS** を組み合わせる。**UAS** 配列の下流に目的遺伝子を持つトランスジェニックハエ (**UAS** 系統) と、組織特異的に **Gal4** を発現する系統を交配させるだけで、目的の部位に目的の蛋白質を発現させることができる。本研究では、まず **UAS** 配列の下流に野生型 **DAAO** の遺伝子配列をもつトランスジェニックハエを作成し、**Gal4-UAS** 法を用いて、光受容器細胞に **DAAO** を発現させ、えさに、**D-アミノ酸** を添加した。目が小さくなる等のマクロなレベルでの変化は見られなかったが、**D-アミノ酸** の添加で神経突起が細くなっている様子が観察された。さらに、筋肉細胞に **DAAO** を発現させたところ、幼虫の動き方の違いなどが見られた。すなわち、局所的

ROS 産生に成功した。2) ROS 産生の影響を調べるための行動実験系の確立: ROS による酸化ストレスは、細胞の老化を引き起こすと考えられている。細胞の老化と脳機能の低下の関係はよくわからない点も多い。また、ROS が様々な脳疾患、例えば、記憶障害や精神疾患などと関与する可能性も考えられる。まず、視運動反応を定量化する実験系を確立し報告した(*1)。次に、老化により失われる機能として学習・記憶について検討できる実験系を構築した。PPI は、パルス音などによる驚愕反応が直前の弱いパルス音により抑制される現象である。これまで、ショウジョウバエで、PPI が起こる事が報告されていなかったが、我々は、幼虫の驚愕反応において PPI が起こることを見出した(*11,16)。さらに、幼虫の意思決定を調べる実験系も確立できた(*4)。神経細胞に野生型 DAAO を発現させ、D-アミノ酸を添加したエサで飼育したショウジョウバエ幼虫を用いた場合には ROS 産生による PPI の変化は検出できなかった。一方、全細胞に DAAO を発現させ、D-アミノ酸を添加したエサで飼育したショウジョウバエの生育速度を調べたところ、生育の遅れが観察できた。つまり、個体の生育に対する ROS の効果を見ることに成功した。

A-3 免疫アジュバント開発

【当初の目標】大野(NatureCom)は免疫の専門家であり、腐朽菌由来のラッカーゼの単離を行った。それをもとに万能高安定ラッカーゼを安定化設計する。その万能ラッカーゼを用いて、重合ポリフェノールを基盤にした新規免疫アジュバントの開発を行い評価を行う。

【得られた成果】様々な自然免疫活性化物質の中で、免疫学教室では薬用茸として知られている、*Agaricus brasiliensis* の生理活性作用の解析を行ってきた。*A. brasiliensis* のポリフェノール類が酵素により酸化重合した、重合ポリフェノールに着目し解析を進めてきた。しかし、重合ポリフェノールは複雑な構造であるために、構造の細部や機能解析は未だ不明な点が多く、また、天然から高純度の重合ポリフェノール(リグニン)を抽出、精製することは困難である。そこで、A-3 で *A. brasiliensis* のポリフェノール酸化酵素の一種であるラッカーゼの遺伝子をクローニングし、発現させて重合ポリフェノールを合成することをめざした。天然型の発現は極めて困難であったが、遺伝子を祖先型に改変することで、ピキア酵母にタンパク質発現させることに成功した(*1,6,7)。さらに、改変ラッカーゼを酸化重合触媒として高純度な重合ポリフェノール (mL2a-pCA) の合成に成功した。mL2a-pCA の免疫賦活化作用の解析ならびに免疫賦活化剤としての応用について検討した。その結果、マウス腹腔内におけるマクロファージの形態変化や増殖といった他の免疫賦活化剤にはない特徴的な作用が観察された。さらに mL2a-pCA の生理活性作用の詳細な解析によって、マクロファージからのケモカインやサイトカインなどを産生誘導していることを明らかにした。これらの活性は細胞内のシグナル伝達に関与する Rac1 と呼ばれる細胞内タンパク質のリン酸化に

よって引き起こされていることを明らかにした。これまで、重合ポリフェノールの免疫賦活化作用の詳細なメカニズムは明らかになっていなかったが、祖先型改変ラッカーゼを用いて初めて重合ポリフェノールの免疫賦活化作用(アジャバント)の作用機序の一部を明らかにすることに成功した(*2-5,8)。すなわち当初の目標を **100%**達成した。

A-4 でんぷん改質酵素安定化

【当初の目標】生物の貯蔵多糖のなかでもグリコーゲン、デンプン等の α -グルカンは食品や工業原料としても注目される。 α -グルカンは、 α -1,4 結合からなる直鎖と α -1,6 結合の枝分かれからなる構造をもつが、その枝分かれの頻度・分布により、グリコーゲン、アミロペクチン、アミロース、と大きく物性の異なるグルカンとなる。この構造は、伸長酵素、ブランチングエンザイム、デブランチングエンザイムにより形作られるが、なかでも枝分かれ構造を作るブランチングエンザイムにより、水への溶解度等の物性を大きく変化させることができ、デンプンから高分子高分岐グルカンや高度分岐環状デキストリンといった水に溶解性の様々な物性の多糖類を製造できる。しかし、ブランチングエンザイムの耐熱性は概して低く、その工業利用には耐熱化が強く望まれている。そこで、本研究では、ビッグデータを用いた安定化設計方法の開発を応用し、イネ、原始紅藻、シアノバクテリアのブランチングエンザイムの系統解析手法による高安定化設計を行うことを目的とした。

【得られた成果】約 1300 種のグリコーゲン/デンプンブランチングエンザイムのなかから、約 250 種類のデータを選別した。アラインメントの確認・改良を行い、ブランチングエンザイムの祖先型酵素配列の推定を行った。そして、シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 と原始紅藻シズンのブランチングエンザイムへの祖先型配列の導入を設計し、G339N、A343P、S349T の3種類の変異を導入した。3 種類の変異体の内、A343P 変異体は、50°Cでも高い活性を持つことが確認され、耐熱化が期待された。しかしより正確な解析からは両者の高温耐性はほぼ同程度で、明確な耐熱性向上には至らなかったが、系統樹利用耐熱化設計を試み、解析し耐熱化設計に反映するという当初の目標は **100%**達成した。

B. ビッグデータを用いた好熱菌安定酵素の高活性化技術の確立

本研究課題では、配列情報をもとに好熱菌がもつ安定酵素を低温あるいは常温で高活性化する技術開発を行い。その技術を過酸化水素検出素子開発に応用する。

B-1理論・実証: 好熱菌酵素の汎用的な低温高活性化改変技術の確立

【当初の目標】酵素利用では、しばしば安定性の悪さが問題となる。一方、好熱菌が持つ酵素は

高い耐熱性を持つが、常温や低温での活性が著しく低い。そこで本課題では、好熱菌酵素の高い耐熱性を損ねることなく、常温・低温活性を改善することを試みる。

研究期間開始以前に、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* が持つイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素(以下 TtIPMDH)を対象に、進化分子工学手法により多くの常温・低温高活性化型変異体を獲得した。さらに、アミノ酸置換を組み合わせて多重アミノ酸置換変異体の獲得を試みたが、むしろ活性が低下するケースが多く、常温菌酵素並の活性をもつ変異体は得られなかった。そこで、1) *T. thermophilus* IPMDH と常温菌である大腸菌由来 IPMDH のアミノ酸配列の比較をおこない、アミノ酸置換を好熱菌野生型 IPMDH に導入することによって、大腸菌 IPMDH に近い常温・低温活性を持つ変異型酵素を創出すること。2) 低温高活性化型変異体の低温高活性化の熱力学的な機構を明らかにすること。3) 耐熱性とトレードオフ無しに低温・常温活性の改善が可能かを明らかにすることを目標とした。

【得られた成果】1) 本研究では、TtIPMDH の活性部位近傍のアミノ酸を網羅的に大腸菌由来 IPMDH の同じ部位に見られるアミノ酸に置換した。18 個の変異体を作製し触媒活性の解析をおこなった結果、9 変異体で 25°C での比活性が向上し、最大で好熱菌野生型 IPMDH の 7.6 倍にまで高活性化した。これらのアミノ酸置換を複数組み合わせることで好熱菌野生型 IPMDH と比べて 25°C での比活性が 14 倍向上した変異体(mut9/21)を獲得した(*1-3)。2) その活性化機構の解明を行い、ミカエリス複合体と遷移状態との間の自由エネルギー変化が小さいと反応速度が速く、低反応温度でのミカエリス複合体の不安定化が低温高活性化機構であることが明らかになった。3) 低温活性化 mut9/21 変異体の熱変性温度を求めた。その結果、変異体の熱変性温度はわずかに 2°C だけ野生型より低い 85°C であった。つまり酵素活性と耐熱性のトレードオフは必然ではないことを明らかにした(*4,5)。以上のように、当初の研究目的を 100% 達成した。さらに、活性上昇した好熱菌 IPMDH の変異アミノ酸を共通祖先アミノ残基を比較したところ、好熱菌 IPMDH のアミノ酸が共通祖先配列のアミノ酸と一致する場合、25°C の比活性が 2 倍以上向上する確率が高いことが明らかとなった。以上、実証データを収集し、理論研究に反映し、目標を 130% 達成した。

B-2 過酸化水素検出素子開発

【当初の目標】過酸化水素は環境負荷が低い酸化剤であり、パルプ漂白、排水処理、半導体洗浄、飲料容器殺菌剤として広く利用されている。そこで過酸化水素の残存量の簡便な検出法が必要となっている。現在は主に電流検出型化学センサーが用いられているがバイオセンサーとして大腸菌の過酸化水素に特異的なセンサータンパク質 OxyR と 緑色蛍光タンパク質 GFP を用いた過酸化水素素子が開発されている。そこで高度好熱菌 *T. thermophilus* のタンパク質を用い

て安定高活性過酸化水素素子の開発を目的とした。

【得られた成果】 1) 高度好熱菌 OxyR 遺伝子の同定:ゲノム配列のデータベース検索および系統樹による解析から、TTC1871 遺伝子を OxyR であると推定した。その欠損株が野生株より過酸化水素に対して高い感受性を示すことから、TTC1871 が OxyR をコードしていると結論した(*3)。つぎに、OxyR に保存されていた過酸化水素の受容に重要なシステイン残基をアラニンに置換した変異体 *oxyR* (*oxyR* C88A, *oxyR* C199A, *oxyR* C208A) を作製した。高度好熱菌の OxyR は 208 番目のシステインが過酸化水素受容に重要な働きを担っていることを明らかにした(*1)。2) OxyR 標的遺伝子の探索: OxyR 欠損株が野生株と比較して高い過酸化水素感受性を示しことから、細胞抽出液中に含まれるタンパク質を変性2次元ゲル電気泳動により解析した。5スポットが野生株/ Δ *oxyR* 株比で増加、同様に5スポットで減少が認められた。そのプロモーター上流には大腸菌や *Pseudomonas* の OxyR 結合配列に類似した配列が存在した(*3)。3) OxyR 標的遺伝子の発現と機能解析: *bfr* 遺伝子、*mn-cat* 遺伝子の *oxyR* 依存の発現変化をレポーターアッセイにより解析した。その結果、両遺伝子とも *oxyR* に依存した発現の減少が認められた。以上:過酸化水素素子の開発には至らなかったが、OxyRレポーターアッセイ系作製の基礎となる OxyR 結合配列の同定に成功した。達成率は 80%程度と言える。

C. 金属(金、白金等)と特異的に結合するタンパク質設計技術の開発

本課題では金属に特異的に結合するタンパク質の設計技術の開発を行った。実験研究では、ファージディスプレイを用いてランダム配列の中からも、金属結合配列の選択をおこない、その特徴を抽出する。理論研究では、実験により明らかになった白金電極に野生型に比べ強く結合する LARFH タンパク質を分子動力学法に基づき解析した。

C-1 金属(金、白金等)と特異的に結合するタンパク質設計技術の開発(理論)

【当初の目標】これまでの実験研究によって、LARFH タンパク質と呼ばれるタンパク質のループ部分にランダム配列を導入したライブラリーから白金に強く結合する配列が選択された。その配列はアミノ酸の1文字表記で YKRGYK という配列を持っていた(詳細は C-2)。実験から得られたペプチドと白金の結合解離定数から結合エネルギーは水素結合(生体分子における水素結合)未満であると推定された。そこで、本研究課題では LARFH タンパク質の変異型を分子動力学法で解析し、特異的に白金に結合する機構を解明する。

【得られた成果】 1) 一分子 LARFH および一分子ペプチドの水溶液中でのシミュレーション: 白金結合型 LARFH および YKRGYK、のうちの一残基をアラニンに置換した アラニン置換 LARFH の

モデル構造を作成し初期構造とした。白金結合同型ペプチドとアラニン置換型ペプチドに対しては直鎖状のモデル構造を作成し、分子動力学シミュレーションの初期構造とした。分子動力学シミュレーションから LARFH タンパク質の全体構造の安定性を解析した結果、アラニン置換型 LARFH の結合力の構造要因が特定された(*1-5)。2) 一分子ペプチドの水-金界面への接着のシミュレーション: 白金結合同型ペプチドとアラニン置換ペプチドに対して、金表面とアミノ酸、炭化水素相互作用を表す力場 GoIP を用いて、金表面-水-ペプチド系での分子動力学シミュレーションを行った。アンブレラサンプリング法を用いて結合自由エネルギーをそれぞれ計算し、白金結合同型ペプチドでは 30.54 kcal/mol、Y5A ペプチドでは 45.60 kcal/mol という値を得た。この結果から、水溶液中では Y5A ペプチドの方が白金結合同型ペプチドよりも強く金表面と結合するといえる。3) 一分子 LARFH の水-金界面への接着のシミュレーション: 白金結合同型 LARFH とアラニン置換型 Y5A LARFH に対しても、GoIP を用いて、金表面-水-ペプチド系での分子動力学シミュレーションを行った。これにより白金結合同型 LARFH では 13.52 kcal/mol、Y5A LARFH は 36.15 kcal/mol という値を得た。この結果から、水溶液中において Y5A LARFH は白金結合同型 LARFH に比べて接着面積が大きいため、より強く金表面と結合するといえる。以上、**金属(金、白金等)と特異的に結合するタンパク質の計算機での評価を行うことに成功し目標を 100%達成した。**

C-2実証(梅村知、宮川): 白金と結合する多種の配列の取得と解析

【当初の目標】 タンパク質や酵素のバイオセンサーやバイオデバイスにとしての用途には、タンパク質を他の分子(金属材料や他のタンパク質)と相互作用させる必要がある。従来のセンシングタンパク質の電極への結合方法として、ポリアクリルアミドを接着剤として用いる方法や、タンパク質末端にタグを付ける方法が採用された。本研究では、タンパク質表面の任意の領域に、**白金結合部位を創出する設計手法**を開発することを目的とした。

【得られた成果】 1) 白金結合同型タンパク質の創出: これまでに、人工 four-helix bundle タンパク質 LARFH (Akanuma *et al.*, *J. Biochem.* 2010) のループの一つに白金結合部位を創出した白金結合同型 LARFH を開発した。LARFH を構成する4本の α ヘリックスを連結する3つのループのうちの一つに含まれる SGQGGG 配列(アミノ酸一文字表記で)をランダム配列に置換したライブラリーを作製し、T7 フェージディスプレイ法を用いて白金結合能を有する LARFH 改変体を選択し 97 クローンの配列確認を行なったところ、50 クローンが YKRGYK 配列をループ上に持っていた(*1-8)。

2) LARFH 改変体と白金との相互作用解析: そこで、YKRGYK 配列を持つ LARFH 改変体と白金との結合をフロー型水晶振動子マイクロバランス(F-QCM)測定によって解析した。その結果、白金結合同型 LARFH 改変体は親和性が 3 倍向上しており、金との結合も観察された(*1-8)。3) 白金

結合型ペプチドの解析:白金結合アミノ酸配列 YKRGYK と野生型 LARFH のループ配列 SGQGGG 配列を含む 10 アミノ酸ペプチドの白金との結合を F-QCM によって測定した。野生型ペプチドは白金との結合は見られなかった。一方、YKRGYK ペプチドでは、解離定数は 5.9 μM であった。すなわち、YKRGYK 配列はペプチドそのものが白金結合特性を持つことを明らかにした(*1-8)。4) YKRGYK 配列中の一つのアミノ酸をアラニンに置換し、その白金結合特性を解析するアラニンスキャニング解析をおこなった。その結果、ペプチドの Lys や Arg 等の正電荷アミノ酸の存在が白金との相互作用に重要であることが示された(*1-8)。

以上の様に、白金と強く結合する LARFH タンパク質改変体を得て、その YKRGYK が白金と結合すること、YKRGYK 配列の正電荷アミノ酸が白金との結合に大きく寄与していることを見出した。以上、白金結合部位を創出する目標を 100%達成した。

C-3 応用:導電性タンパク質を利用した新規バイオプロセスの開発

【当初の目標】近年、電極との電子授受(電流)を介してエネルギーを獲得し、増殖する微生物(electrochemically active bacteria; EAB)が相次いで発見されている。EAB には *Shewanella* 属の金属還元菌や *Acidithiobacillus* 属の鉄酸化細菌等が含まれ、これらの微生物はシトクロム c 等の導電性タンパク質から構成される電子伝達経路(細胞外電子伝達経路)を介して電極と電子の授受を行い、電極を電子供与体、もしくは電子受容体として増殖に必要なエネルギーを獲得する。そこで、EAB の有する導電性タンパク質を利用し、新たな有用ナノバイオエレクトロニクスプロセスを構築することを最終目標とした。

【得られた成果】 (1) *Shewanella* を用いた電気化学的脱窒プロセスの構築:脱窒能力を持つ *Shewanella loihica* PV-4 株に電極から電子を与え、硝酸から窒素ガスへの変換反応が生じることを実証した。(2) *Acidithiobacillus* を用いた電気化学的窒素固定プロセスの構築:*Acidithiobacillus ferrooxidans*において窒素固定酵素(ニトロゲナーゼ)を高発現させ、電極から電子を与えることにより、窒素ガスからアンモニアへの変換反応が生じることを実証した(*1,2)。またアンモニアの同化反応の阻害剤を添加することにより、アンモニアの合成量を顕著に増加させることに成功した(*3)。以上の成果により、電気活性微生物の導電性タンパク質と酸化還元酵素を活用することで、化学的な電極反応だけでは実現困難な有用プロセスを構築できることが示された。目的を 100%達成した。

D. タンパク質-タンパク質接合面設計法の開発

バイオナノテクノロジーではタンパク質の自己組織化能力を、ナノマシンやナノエレクトロニクス

作製に応用しようというのが大きな目標である。その最大の基本技術は任意のタンパク質と任意のタンパク質間に新たに接合面を設計するという技術である。本研究計画では、タンパク質-タンパク質接合面の設計法を理論と実験の両面から開発する。

D-1 理論:タンパク質-タンパク質接合面設計法の開発

【当初の目標】八木らはタンパク質分子スレリスリンおよび LARFH に相互作用面を設計し、両者を結合させることに成功した(D-2)。八木らは、疎水性アミノ酸ロイシンをスレリスリンおよび LARFH のに導入した。また、負電荷アミノ酸アスパラギン酸をスレリスリンに導入し(スレリスリン変異型 I)、正電荷アミノ酸アルギニンを LARFH に導入した。こうして、疎水性相互作用および静電的相互作用によってスレリスリン変異型 I と LARFH の特異的結合を実現した。D-1 では、動力学シミュレーションでこの二つのタンパク質分子を出発構造とし粗視化モデルを用いて計算を行い、**接合面設計技法の改良**をおこなった。

【得られた成果】(1)スレリスリン変異型 I と LARFH のシミュレーション:スレリスリン変異型 I および LARFH の粗視化モデルを作製し、動力学計算によって両タンパク質の結合を模擬した。その結果、設計部位で接合することがわかった。また、LARFH の設計部位がスレリスリン変異型 I の持つグルタミン酸とよく接合していることが判明した(*2,4,5,6)。(2) スレリスリン変異型 II と LARFH のシミュレーション:グルタミン酸を他のアミノ酸に変えたスレリスリン変異体 II と LARFH 変異体各1分子の場合、および、スレリスリン変異体 II が2分子の場合について、粗視化モデルを用いた計算を行った。その結果、いずれの場合も、スレリスリン変異体 I を用いた場合と比べて、スレリスリン変異体 II が設計箇所で結合する頻度が増加しており、より効率的な線維化が可能であることがシミュレーションで確認できた。

以上の様に、スレリスリンと LARFH の動力学計算により、両タンパク質の結合が模擬できた。両タンパク質が結合する際、結合に関与するアミノ酸の種類が特定され、より繊維作製に適した構造を推定できた。以上のように当初の目標を 100%達成した。

D-2 実証:タンパク質-タンパク質結合法の開発

【当初の目標】タンパク質表面改変によって自己組織化を誘発しタンパク質線維など、幅広い産業分野への応用展開が期待できる。汎用的なタンパク質-タンパク質接合面設計方法を開発し、2つのタンパク質が交互に結合したタンパク質線維を構築することを目標とした。

【得られた成果】1)まずスレリスリンの2本の平行 α ヘルックスにロイシン残基を6つと負電荷アミノ酸を導入することで接合面を設計した(6L 型接合面)(*3)。もう一つのタンパク質 LARFH の1

本の α ヘリックスにロイシン残基を 3 つと正電荷アミノ酸を導入することで結合面を設計した(3L型結合面)。両者の混合で、静電相互作用と疎水性相互作用による結合を想定した。実際、両タンパク質の特異的なタンパク質間相互作用が確認できた(*2)。その結合の解離定数は 0.42 μM であった。つまり、本技術で十分強い結合を持つタンパク質タンパク質結合を創りだした(*2)。

2) 結合面を分子両端に導入したスルエリスリン改変体と LARFH 改変体を作成し混合すると、両者が共重合したタンパク質繊維を観察することができた。つまり、本技術で自己組織化繊維構造を構築した(*2,4-6,12-20)。

3) 非特異的な分子間相互作用の排除: 2)で構築したタンパク質線維には枝分かれ構造や凝集体も多かった。すなわち、改変したタンパク質分子間で非特異的に結合が生じていた。そこで、分子表面の正電荷アミノ酸を1つずつ中性もしくは負電荷アミノ酸へと置換したスルエリスリン改変体を計 19 個作製した。これらのうち 6 個は非特異的な相互作用が減少していた(*9)。また、動力学(MD)シミュレーション(D-1)で特定された非特異的結合残基と実験で見出した変異を総合し、非特異的な相互作用をほぼ抑制できた。

4) タンパク質間結合面の最適化: スルエリスリン接合面の6つの Leu を Val に置換した変異体を作製した。結合面は Val よりも Leu の方が適していることが分かった。また、負電荷アミノ酸も Glu よりも Asp の方が適していることが分かった(*8)。また、LARFH に結合面として導入した 3L 型結合面の最適化にも取り組んだ。始めに、3つの Leu 残基を疎水性アミノ酸(LIMFV)へランダムに置換し 125 通りの LARFH 遺伝子ライブラリーを作製し Pull-down 法(*7)で解析した。その結果 5.4 倍(Leu-Phe-Ile)、4.7 倍(Leu-Met-Val)、3.6 倍(Leu-Leu-Phe)結合力が上昇した改変体を得た。

5) 結合面の移植可能性の検証: タンパク質の多くはその分子表面に α ヘリックス構造を持つ。そこで、LARFH に設計した 3L 型結合面を好熱菌 *T. thermophiles* 由来 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素(IPMDH)と 2C-メチル-D-エリスリトール-2,4-シクロニリン酸キナーゼ(MECDPS)の2つのタンパク質の分子表面の α ヘリックス上に移植した。3L 型結合面を導入した IPMDH 改変体 12 個中 2 つはスルエリスリン改変体と相互作用した(*10,11)。また、3L 型結合面を導入した MECDPS 改変体 5 個中、3 つはスルエリスリン改変体と相互作用した。つまり、本プロジェクトで開発したタンパク質間結合面は他のタンパク質にも移植可能であることを示した。

以上、スルエリスリンと LARFH タンパク質の相互作用を人工的に創り、自己組織化タンパク質繊維を構築でき、目標を達成した。さらに、スルエリスリン改変体の非特異的な分子間相互作用を抑制すること、LARFH に導入した結合面を最適化すること、結合面は他のタンパク質へも移植可能であることを見いだした。以上、当初の目標を 150%達成した。

<優れた成果が上がった点>

A-1. 短期間でのアライメントが可能となった。また、アライメントに基づいて祖先タンパク質配列を推定、復元し、全生物の最後の共通祖先(LUCA もしくは Commonote)の持っていたタンパク質を、機能(酵素活性)を持った状態で復元した(*35)。これは、完全長を復元された最長最古のタンパク質である。これは、本課題の成果として特筆するべきものである。

A2-1. rgDAAO^{MV} 発現トランスジェニック線虫は、人工的に活性酸素を発生させるトランスジェニック動物の初めての例である。古くから活性酸素と疾患および老化の関係性が指摘されているものの、未だにその因果関係は明らかとなっていない。今後、個体における活性酸素の生理的意義などを明らかにする上で、線虫 *in vivo* 解析は非常に有用性が高い。

A2-3. 新規な過酸化水素発生系を構築し、その影響を調べることができた。この過酸化水素発生系は細胞死などの細胞ダメージが低く、過酸化水素の量をコントロールできる。

A-2-4. DAAO を生体内で発現する方法に使用できるトランスジェニックショウジョウバエが作成できた。また、脳機能を測定できる行動実験を立ち上げることができた(*1, 3,11,16)。

A3. 安定発現困難な *A. brasiliensis* ラッカーゼを祖先型改変で安定化発現させ、重合ポリフェノールのマクロフェージ活性化作用メカニズムの一端を初めて明らかにした。

C3. タンパク質と電極を用いたナノバイオプロセスの構築に向けた有用酵素探索の過程で、*Acidithiobacillus* の菌体自体がよく電極と相互作用し、窒素固定反応の触媒として優れた性質を示すことが見出された。電気活性微生物を利用して大気中の窒素ガスからアンモニアを電気合成することに世界で始めて成功した。将来的な産業利用も期待されることから特許出願*3 を行った。本菌株を利用すれば低コストかつ省エネルギーなアンモニア製造を実現できる可能性があるため、今後実用化を目指した研究開発を行っていく。

<課題となった点>:特にない。

<自己評価の実施結果と対応状況>:順調に推移し全体で 100%以上の到達といえる。

<外部(第三者)評価の実施結果と対応状況>初年度、シンポジウムの記載をしなかったために、その点を指摘されたため、2 年目以降報告書に記載した。指摘に対応して業績の総数を追記した。

<研究期間終了後の展望>

理論、検証、応用の連携研究が継続して実施されている。

<研究成果の副次的効果>

多くの学生が参加し、PDとなるなど学部学生、大学院生の教育に大きな効果を生んだ。

<雑誌論文・図書・学会発表>

各項目は本文各テーマ項目末尾に記載したが、本拠点研究全体での研究発表の状況を総計すると以下の様である。

雑誌論文:46報

図書(総説著書等):6報

国際学会発表:26件

国内学会発表:96件

<研究成果の公開状況>

シンポジウム・学会等の実施状況、インターネットでの公開状況等

<既に実施しているもの>

国際シンポジウム

1) Crossover Session on Geo Science and Life Science

---Toward the Protein Engineering using Big Data--- July 30, 2015

2) International Mini-symposium--Smart Protein Engineering--Nov. 29, 2016

学内報告会

1) 平成 27 年度年度末成果発表会 2016 年3月 24 日(木)

2) 平成 28 年度年度末報告会 2017 年3月 14 日(火)

3) 最終報告会 2018 年 3 月 19 日(月)

インターネットでの公開

<https://www.ls.toyaku.ac.jp/content/%E5%A0%B1%E5%91%8A%E4%BC%9A>

<これから実施する予定のもの>:本最終報告書公開予定

<「選定時」に付された留意事項>

特に無し。

<「選定時」に付された留意事項への対応>

該当せず。

<「中間評価時」に付された留意事項>

期間が3年間であり該当せず。

<「中間評価時」に付された留意事項への対応>

該当せず。

2. 全体の運営について

酵素は、無機触媒と比較して以下の優れた特性を持っている。それらは、1) 反応基質特異性。2) 反応特異性。3) エネルギー低コスト。4) 環境低負荷である。それらの特性を生かし、多くタンパク質が利用されている。一方、その不安定性が残された問題である。本拠点では、高い活性と高い安定性を併せ持つ酵素のビッグデータを用いた設計法を開発する。また、タンパク質は特異的自己組織化というナノ素材としてのすぐれた性質を持っている。すなわち、タンパク質はアミノ酸配列が内包する情報に依存して、タンパク質サブユニット同士が自発的に結合して四次構造をとる。本拠点では、金属結合とタンパク-タンパク結合という二つの基盤技術開発を理論、進化学と動力学計算を結合して開発する。

本拠点は、理論・実証・応用を一環してつなぎ、理論から応用へ技術移転をおこない、実証応用開発から課題を抽出して理論の精緻化を行う。本計画全体では、4つのテーマに取り組む、それらは、A-D の4つである。究めて優れた特性をもつタンパク質であるが一般に安定性が低い。好熱菌酵素は安定であるが常温での活性が低い。安定性と高活性の両特性を併せ持つ理想的酵素の設計を A と B で行う。これまでタンパク質の改変は、試行錯誤の域を出なかった、ゲノムデータ大量蓄積と計算機の指数関数的能力向上から、情報高度集約的にタンパク質を改変設計することのできる時代が来ている。ナノエレクトロニクスとナノメカニクスの基盤技術開発を C と D で行う。理論から応用までのサイクルを完成する。

本研究計画では、個々の研究テーマは薬学部を含むいくつかの研究室の連携で進められている。とりわけ、理論担当と実証・応用担当とは緊密な連絡・連携を行っている。また、いくつかのテーマは学外(大阪大学、早稲田大学、秋田県立大学)との連携で進められている。更に連携の強化と、進捗状況の相互把握のために定期的な国際シンポジウムおよび学内報告会を実施してた。最終報告会は「オルガネラ接触場の形成機構と破綻による疾患 平成 29 年度 成果報告会」と合同で開催した。これらの開催のプログラムとポスターを添付する。

国際シンポジウム

3) Crossover Session on Geo Science and Life Science

---Toward the Protein Engineering using Big Data--- 13:00 - 17:15, July 30, 2015

4) International Mini-symposium--Smart Protein Engineering--, 13:30 - 17:10, Nov. 29, 2016

学内報告会

4) 「健康で豊かな生活を実現するスマートタンパク質工学」戦略的研究拠点

平成 27 年度年度末成果発表会 2016 年3月 24 日(木)13:00-17:30

5) 「健康で豊かな生活を実現するスマートタンパク質工学」戦略的研究拠点

平成 28 年度年度末報告会 2017 年3月 14 日(火)10:00-17:15

6) 「健康で豊かな生活を実現するスマートタンパク質工学」戦略的研究拠点

最終報告会 2018年3月19日(月)12:30-17:40

(オルガネラ接触場の形成機構と破綻による疾患 平成29年度 成果報告会 との合同開催)

Crossover Session on Geo Science and Life Science

MEXT-supported Program for the Strategic Research Foundation

at Private Universities

---Toward the Protein Engineering using Big Data---

Date: July 30, 2015 Time: 13:00 – 17:15
Venue: Room1003, GF, Lecture Bild. (#1), TOYAKU.
http://www.toyaku.ac.jp/english_page/access/access_01.html
Correspondence: A. Yamagishi, TOYAKU
Inquire: Yokoi@toyaku.ac.jp, Phone: 042-676-7141

Chair parson: Akihiko Yamagishi (TOYAKU)

13:00-13:05 Opening Remarks Dene Fukami (School of Life Scie)

13:05-14:05 J. William Schopf (UCLA, CA, USA)

Two-billion-year-old Communities of “*LIVING FOSSILS*” Linchpin of Darwin’s Evolution?

14:05-14:45 Jane Shen-Miller (UCLA, CA, USA)

Century-old Living Fruits Sacred Lotus *Nelumbo nucifera*, China Antique: Unique Characteristics

14:45-15:25 Ken-ichiro Sugitani (Nagoya University)

Biotic diversity in early Precambrian shallow-water environments; evidence from 3.0- and 3.4-billion-years old microfossils

15:25-15:30 Intermission

Chair parson: Mikio Tsuzuki (TOYAKU)

15:30-16:00 Satoshi Akanuma (Waseda University)

Evidence of Ancient Environment revealed from Resurrected Ancient Enzymes.

16:00-16:20 Mariko Harada (The University of Tokyo)

Evidence of Ancient Oxygen Concentration revealed from Gene Promoter.

16:20-16:40 Ryutaro Furukawa (TOYAKU)

New Fusion Scenario of Eukaryotes evolved from Archaeobacteria

16:40-17:10 Akihiko Yamagishi (TOYAKU)

Life Search Projects in Space and on Mars.

17:10-17:15 Closing Remarks

17:30-19:30 Reception Party (Atrium, Magnolia) Booking needed

International Mini-symposium

MEXT-supported Program for the Strategic Research Foundation
at Private Universities

Smart Protein Engineering

Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences (TOYAKU)

Date: November 29 (Tue), 2016, Time: 13:30-17:10

Venue: 4301 Building 4, TOYAKU

Correspondence : A. Yamagishi (ex. 4301, 042-676-7139)

Part I Chair: Takako Morimoto, TOYAKU

13:30 Opening Remarks

13:35 Akihiko Yamagishi, TOYAKU

Smart protein engineering project

13:50 Reinhard Sterner, Univ. Regensburg, Germany

Using ancestral sequence reconstruction to characterize primordial enzyme complexes

14:50 Satoshi Akanuma, Waseda University

Creating stable proteins by ancestral design and improving the low-temperature activity of thermophilic enzymes

15:20 Coffee Break

Part II Chair: Yuji Takahashi, TOYAKU

15:30 Yuuta Fujikawa, TOYAKU

Construction of an intracellular site-specific H₂O₂-generating system with D-amino acid oxidase.

16:00 Sota Yagi, TOYAKU

Creation of an artificial protein fiber by an easy-to-use design method of protein-protein interaction

16:30 Masako Takasu, TOYAKU

Simulation of proteins for nano-fiber and electrodes

17:00 Closing Remarks

17:30 Reception Party

平成 27 年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業: 年度末報告会

健康で豊かな生活を実現するスマートタンパク質工学戦略的研究拠点

2016 年 3 月 24 日(木) 13:00-17:30 教育4号館 4301

- 13:00 開会の挨拶 生命科学部長 深見希代子
戦略的開発拠点形成事業について
極限環境生物学的研究室 山岸明彦
- ビックデータを用いた高機能酵素設計 座長 高須昌子 13:10-13:30
- 13:10 Non-homogeneous model に基づく分子系統解析によって配列推定され
た祖先 NDK の解析 極限環境生物学的研究室 横堀伸一
- 高機能化酵素応用技術の開発 座長 高橋勇二 13:30-15:30
- 13:30 好気性高度好熱菌の酸化防御に関する研究
応用微生物学的研究室 時下進一
- 13:50 ROS発生系の開発
分子生物化学研究室 藤川雄太
- 14:20 過酸化水素発生素子となる D-アミノ酸の合成
生物有機化学研究室 小林豊晴
- 14:30 ROS発生系の生体応用:培養細胞を用いた応用
環境応用動物学的研究室 梅村真理子
- 14:40 ROS検出・発生系の生体応用:ショウジョウバエを用いた応用
脳神経機能学研究室 森本高子
- 14:50 ラッカーゼによるポリフェノール重合と免疫活性について
免疫学研究室 大野尚仁
- 15:10 微細藻類における多糖の機能
環境応答植物学的研究室 藤原祥子、横堀伸一、中村保典(秋田県立大)
- 15:30 休憩
- ナノ構造体設計技術の開発 座長 井上英史 15:40-17:20
- 15:40 ヒアルロン酸ナノ繊維の開発と三次元組織培養への展望
生命分析化学研究室 内田達也
- 16:00 バイオナノ構造体設計法の開発
極限環境生物学的研究室 山岸明彦
- 16:20 IPMDH タンパク質の凝集の粗視化シミュレーションによる研究
生命物理研究室 高須昌子
- 16:40 ループに変異を導入した LARFH 変異体の分子動力学法による構造解析
生命物理科学研究室 宮川 毅
- 17:00 細胞外電子伝達タンパク質を利用した電気化学バイオセンサーの構築 生命エネ
ルギー工学研究室 高妻篤史
- 17:20 閉会の挨拶 都筑幹夫

平成 27 年度 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

健康で豊かな生活を実現する

スマートタンパク質工学戦略的研究拠点

平成 28 年度 年度末報告会

平成 29 年 3 月 14 日 (火) 10:00-17:15

教育 4 号館 3 階 4301 教室

- 10:00 開会の挨拶
- 10:05 マルチプルアライメント方法の進化とコドンの進化(25 分)
古川龍太郎、佐藤陸、宮下奈津美、横堀伸一、山岸明彦(極限環境)
- 10:30 祖先型酵素改変の進化(30 分)
赤沼哲史、渋江怜、張博文、羽室勇飛(早稲田大学)、笹本峻弘、別所瑞萌、横堀伸一、山岸明彦(極限環境)
- 11:00 スマート常温活性化酵素作成(30 分)
別所瑞萌(極限環境)、赤沼哲史(早稲田大学)木村彦乃、山岸明彦(極限環境)
- 11:30 改変ラッカーゼを用いた高分子ポリフェノールの合成(30 分)
大野尚仁(免疫学教室)田島克哉、松本明子、山中大輔、石橋健一、安達禎之(免疫学)、赤沼哲史(早稲田大学)
- 12:00 昼休み
- 13:10 微細藻類における貯蔵多糖合成機構の解明とブランチングエンザイムの耐熱化(20 分)
藤原祥子、都筑幹夫(環境応答)、横堀伸一、山岸明彦(極限環境生物学)、中村保典(秋田県立大学)
- 13:30 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 における酸化防御機構の解析(30 分)
時下進一(応用微生物)
- 14:00 生体内 ROS 産生系の構築と応用(60 分)
藤川雄太(分子生物化学)、梅村真理子(環境応用動物学)、小林豊晴(生物有機化学)、森本高子(分子神経科学)
- 15:00 細胞外電子伝達系を介した微生物電気化学的窒素変換(30 分)
高妻篤史、渡邊一哉(生命エネルギー工学)
- 15:30 休憩
- 15:10 スマートナノバイオテクノロジー(60 分)
八木創太、大場創太、吉原大貴、内山智尋、原田啓生、山岸愛実、山岸明彦(極限環境)、内田達也、梅村知也(生命分析化学)、赤沼哲史(早稲田大学)
- 16:10 LARFH と Sulerythrin の粗視化シミュレーションによる研究(30 分)
高須昌子(生命物理)小澤尚史、山田寛尚、宮川毅、森河良太(生命物理)
赤沼哲史(早稲田大学)、山岸明彦(極限環境)
- 16:40 ループに変異を導入した LARFH 変異体の分子動力学法による構造解析(30 分)
宮川毅(生命物理)、渡部真央、野本実咲、山田寛尚、森河良太、高須昌子(生命物理)、内田達也(生命分析化学)、山岸明彦(極限環境)
- 17:10 閉会の挨拶
- 17:30 懇親会 (マグノリア)

平成27年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
健康で豊かな生活を実現する

スマートタンパク質工学戦略的研究拠点

最終成果報告会

平成30年3月19日(月)12:30-17:40

教育4号館3階 4301講義室

- 12:30 開会の挨拶:本研究拠点の研究戦略
山岸明彦(極限環境・拠点代表)
- 第一部 ビックデータを用いた安定化設計方法の開発**
- 12:35 ビックデータを用いたタンパク質高安定化設計方法の開発
横堀伸一、古川龍太郎、山岸明彦(極限環境)、加藤和貴(阪大フロンティア)
- 12:50 細胞内H₂O₂産生系の構築と応用
藤川雄太(分子生物)、小林豊晴(生物有機)、梅村真理子(応用動物)、森本高子(分子神経)
- 14:00 万能ラッカーゼを創製し、重合ポリフェノールを基盤にした新規免疫アジュバントの開発を行う:
mutLac2a触媒重合ポリフェノールの免疫賦活化作用とそのメカニズムの解析
田島克哉(免疫学)、赤沼哲史(早大・人科)、松本明子、山中大輔、石橋健一、安達禎之、
大野尚仁(免疫学)
- 14:20 デンプンブランチングエンザイムの耐熱化とデンプン合成機構の解明
福良光起、宮内啓喜、中村保典、前野俊樹、都筑幹夫、藤原祥子(応用植物)
- 14:40 休憩
- 第二部 ビックデータを用いた好熱菌安定酵素の高活性化技術の確立**
- 14:50 好熱菌酵素の常温菌酵素域へまでの低温高活性化
赤沼哲史(早大・人科)、シュウギョウトウ(早大・人科)、別所瑞萌、木村彦乃、山岸明彦(極限環境)
- 15:10 高度好熱菌の過酸化水素センサー OxyR の機能
時下進一、小池榛名、小林幸平、太田敏博(応用微生物)
- 第三部 スマート・ナノテクノロジー**
- 15:30 タンパク質の研究におけるシミュレーションの役割
高須昌子(生命物理)
- 15:40 水溶液中および金表面上におけるLARFH 変異体の分子動力学法を用いた研究
渡部真央、山田寛尚、宮川毅、森河良太、高須昌子(生命物理)、内田達也(分析化学)、
山岸明彦(極限環境)
- 15:55 粗視化シミュレーションによる Sulerythrin と LARFH の研究
小澤尚史、山田寛尚、宮川毅、森河良太、高須昌子(生命物理)、赤沼哲史(早大・人科)、八木創太、
山岸明彦(極限環境)、
- 16:10 休憩
- 16:20 スマートナノバイオテクノロジー ～金属-タンパク質間相互作用およびタンパク質-タンパク質
間相互作用の創出～
八木創太、内山智尋、原田啓生、大場創太、塚本楓、富田麻未、馬場柁(極限環境)、赤沼哲史
(早大・人科)、小澤尚史、宮川毅、高須昌子(生命物理)、内田達也、梅村知也(分析化学)、
山岸明彦(極限環境)
- 17:20 高機能化微生物触媒を用いたアンモニアの電気合成
高妻篤史、山田祥平、渡邊一哉(生体エネルギー)
- 17:40 閉会の挨拶
井上英史(生命科学部長)

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 合同成果報告会

最終成果報告会

健康で豊かな生活を実現する スマートタンパク質工学戦略的研究拠点

平成29年度 成果報告会

オルガネラ接触場の形成機構と破綻による疾患

2018年3月19日(月)

会場：教育4号館3階 4301 講義室

【オルガネラ接触場】

- 9:30 はじめに
柳茂(分子生化学・拠点代表)
「ミトコンドリアダイナミクスの破綻と老化」
柳茂、徳山剛士(分子生化学)
- 9:50 「オルガネラ関連タンパク質の新機能に関する解析」
前本佑樹(細胞情報科学)
- 10:10 「オルガネラ崩壊を伴う好中球細胞死」
四元聡志、田中正人(免疫制御学)
- 10:30 「細胞膜リン脂質代謝酵素によるオートファジー制御」
佐藤礼子、深見希代子(ゲノム病態医科学)
- 10:50 「無細胞再構成系を用いたオルガネラ機能の解析」
橋本吉良(細胞制御医科学)
- 11:10 「レジオネラはsyntaxin 17を分解することで宿主防御機構を回避する」
新崎恒平、多賀谷光男(分子細胞生物学)



【スマートタンパク質工学】

- 12:30 開会の挨拶:本研究拠点の研究戦略
山岸明彦(極限環境・拠点代表)
- 第一部 ビックデータを用いた安定化設計方法の開発**
- 12:35 「ビックデータを用いたタンパク質高安定化設計方法の開発」
横堀伸一、古川龍太郎、山岸明彦(極限環境)、加藤和貴(阪大フロンティア)
- 12:50 「細胞内H₂O₂産生系の構築と応用」
藤川雄太(分子生物)、小林豊晴(生物有機)、梅村真理子(応用動物)、森本高子(分子神経)
- 14:00 「万能ラッカーゼを創製し、重合ポリフェノールを基盤にした新規免疫アジュバントの開発を行う: mutLac2a触媒重合ポリフェノールの免疫賦活化作用とそのメカニズムの解析」
田島克哉(免疫学)、赤沼哲史(早大・人科)、松本明子、山中大輔、石橋健一、安達禎之、大野 尚仁(免疫学)
- 14:20 「デンブンプランチングエンザイムの耐熱化とデンブンプ合成機構の解明」
福良光起、宮内啓吾、中村保典、前野俊樹、都筑幹夫、藤原祥子(応用植物)
- 14:40 休憩
- 第二部 ビックデータを用いた好熱菌安定酵素の高活性化技術の確立**
- 14:50 「好熱菌酵素の常温菌酵素域へまでの低温高活性化」
赤沼哲史(早大・人科)、シュウギョウトウ(早大・人科)、別所瑞萌、木村彦乃、山岸明彦(極限環境)
- 15:10 「高度好熱菌の過酸化水素センサー OxyR の機能」
時下進一、小池榛名、小林幸平、太田敏博(応用微生物)

第三部 スマート・ナノテクノロジー

- 15:30 「タンパク質の研究におけるシミュレーションの役割」
高須昌子(生命物理)
- 15:40 「水溶液中および金表面上におけるLARFH 変異体の分子動力学法を用いた研究」
渡部真央、山田寛尚、宮川毅、森河良太、高須昌子(生命物理)、内田達也(分析化学)、山岸明彦(極限環境)
- 15:55 「粗視化シミュレーションによる Sulerythrin と LARFH の研究」
小澤尚史、山田寛尚、宮川毅、森河良太、高須昌子(生命物理)、赤沼哲史(早大・人科)、八木創太、山岸明彦(極限環境)
- 16:10 休憩
- 16:20 「スマートナノバイオテクノロジー～金属-タンパク質間相互作用およびタンパク質-タンパク質間相互作用の創出～」
八木創太、内山智尋、原田啓生、大場創太、塚本禮、富田麻未、馬場柱(極限環境)、赤沼哲史(早大・人科)、小澤尚史、宮川毅、高須昌子(生命物理)、内田達也、梅村知也(分析化学)、山岸明彦(極限環境)
- 17:20 「高機能化微生物触媒を用いたアンモニアの電気合成」
高妻篤史、山田祥平、渡邊一哉(生体エネルギー)
- 17:40 閉会の挨拶 井上英史(生命科学部長)

問い合わせ先：東京薬科大学 生命科学部 極限環境生物学研究室、分子生化学研究室

Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

3. 研究成果の詳細

A. ビックデータを用いた酵素高安定化設計方法の開発

本課題では、蓄積しているゲノムデータを活用することから、酵素の安定化手法の巧緻化を図る (A-1 理論)。また、その理論を応用するが、その対象として以下の3つに取り組む。1. 活性化酸素種 (ROS) の発生系を開発し、それを生体内外で応用する (A-2)。2. ROS に反応してポリフェノールを合成することから新規免疫アジュバント開発を行う (A-3)。3. デンプン改質に用いるブランチング (枝作り) 酵素の安定化を行う (A-4)。

A-1 理論: 酵素安定化理論の高度化:

山岸明彦 (東京薬科大学・生命科学部・極限環境生物学研究室・教授)

横堀伸一 (東京薬科大学・生命科学部・極限環境生物学研究室・講師)

古川龍太郎 (東京薬科大学・生命科学部・極限環境生物学研究室・客員研究員)

加藤和貴 (大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任教授)

赤沼哲史 (早稲田大学・人間科学部・准教授)

1. 当初の研究目標

安定性の高いタンパク質をタンパク質工学の手法を用いて作製するには、理論的耐熱化手法が広く用いられてきた。しかしこの手法では様々な試行錯誤を必要とし、効率的な手法の開発が望まれていた。横堀ら (Akanuma et al. 2011 J. Mol. Biol. 412: 212-225; Akanuma et al. 2013. PNAS 110: 11067-11072) は配列データから系統解析によって、安定化推定を行う画期的方法を開発した。この方法は、相同遺伝子の配列アライメントデータから、進化系統樹を作製し、祖先生物がもっていた配列を推定するという方法である。祖先生物が高温に生息していたということが明らかとなり、祖先生物が持っていた祖先配列を標的タンパク質に変異導入することによってタンパク質を極めて高い効率で安定化することに成功した。しかし、この過程で祖先配列を用いた耐熱化手法の技術的問題点も明らかとなった。すなわち、正確な配列アライメントを得るステップに時間を要し、しかもコンピュータに依存できない過程を含むことが明らかになったことである。特に、実際に耐熱化を検討する対象とする酵素の配列保存性が低い場合には、アラインメントソフトの高性能化が求められた。

その実証研究から、出てきた課題は、配列を並べる (アライメント) ことの困難さである。実用的酵素の配列保存性は低く、アラインメントソフトの高性能化が求められる。加藤はその最高性能ソフト (MAFFT) を開発した (MBE, HotPaper 引用率上位 0.1%)。しかし、それを用いて酵

素安定化の実証を山岸が行ったところ、課題が抽出された。そこで山岸、横堀、古川と加藤の協力でこの課題に対応しアラインメント技術の巧緻化を目的として本研究を行った。

アラインメント技術を検証する対象として、アミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS) のうち、イソロイシル、ロイシル、バリル、メチオニル tRNA 合成酵素の 4 種 (それぞれ IleRS、LeuRS、ValRS、MetRS)、並びにチロシル、トリプトファン tRNA 合成酵素の 2 種 (それぞれ TyrRS、TrpRS)、それぞれの複合アラインメントの作成を行った。これまでに多くの研究者によって行われている配列解析は、生物史的に全生物の共通祖先 (コモノート) 以後の解析だった。今回研究対象としたモデルは、全生物の共通祖先以前の進化に対応した挑戦的アラインメントである。

2. 研究成果の概要

(1) アミノアシル tRNA 合成酵素(ARS)をターゲットとしたアラインメント技術の巧緻化

ARS は翻訳に使われる 20 種のアミノ酸のそれぞれに対応し、アミノ酸を tRNA に結合する反応を触媒する酵素である。ARS は構造の異なる 2 つのクラス (クラス I とクラス II) に分類され、それぞれのクラスのメンバーは共通祖先を持つと考えられている。また、各クラスはそれぞれ 3 つ (クラス I) または 4 つ (クラス II) のサブクラスに分類される (図 1)。

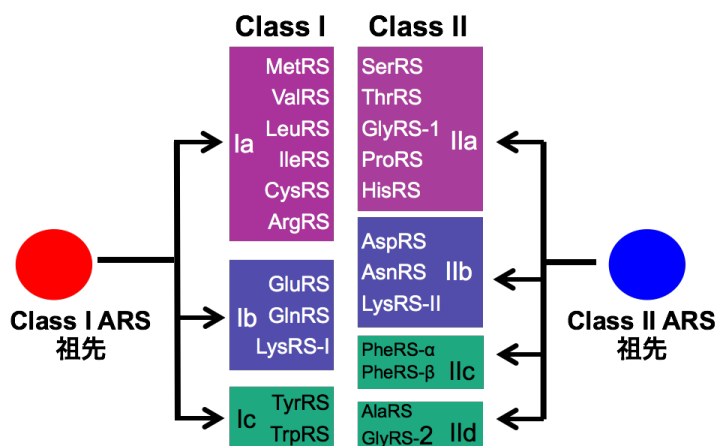


図 1。アミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS) の分類 (Pouplana & Schimmel 2001; Valencia-Sánchez et al. 2016)。

我々はまず 2 つのテストケースを検討した。1 つは、クラス Ia に属する 4 種の ARS、イソロイシル、ロイシル、バリル、メチオニル tRNA 合成酵素 (それぞれ IleRS、LeuRS、ValRS、MetRS) である。もう 1 つは、クラス Ic のチロシル、トリプトファン tRNA 合成酵素 (それぞれ TyrRS と TrpRS) である。これらの 2 種類の配列セットについて、アラインメントを行った。

ここで、アラインメントを行う際の問題点は、配列類似性の低い配列部分をいかにアラインメントするかという点にある。各アミノ酸に特異的な ARS のアラインメントではこうした問題点はあまり無い (*5) が、異なった ARS をアラインメントしようとすると配列類似性の低い部分が類似性の高い部分に挟まれて出てくる。類似性の低い部分のアラインメントが困難な課題であった。そこで、1) まず個々の ARS に関して MAFFT を用いて、加藤と共同で、解析パラメータのデータへの最適化を図りつつ、アラインメントを行った。2) クラス Ia (あるいはクラス Ic) に属する ARS の中から代表的な配列を選び出し、クラスごとにアラインメントを行った。3) その際、2 次構造を

考慮して2次構造の類似性に基づいてアラインメントを行った。4) 最後に 2)の過程で選ばなかった配列を3)の配列アラインメントに並べて戻した。以上の方法で配列類似性の低い配列に関して満足のいく配列アラインメントを得ることができ全生物共通祖先以前の ARS の進化を推定できた(*31,32)。

(2) クラス Ia ARS (IleRS、LeuRS、ValRS、MetRS) の分子系統解析

IleRS、LeuRS、ValRS はいずれも編集ドメインを持っている。編集ドメインとは、tRNA が間違っただけのアミノ酸でアミノアシル化されてしまったときに、アミノ酸と tRNA に加水分解するドメインのことである。それに対し、MetRS は編集ドメインを持たない。そこで MetRS をアウトグループとして、IleRS、LeuRS、ValRS の系統関係を最尤法並びにベイズ法を用いて推定した。その結果、IleRS と ValRS が一つのグループとなり、LeuRS はそのグループの姉妹群となった (図 2)。

この樹形に基づき、ValRS と IleRS のそれぞれの共通祖先タンパク質の配列 (ValRS-com、IleRS-com)、並びに ValRS と IleRS の共通祖先の配列 (IV-RS) を推定した。しかし、今推定しようとしている ValRS と IleRS の共通祖先 IV-RS 復元には大きな問題がある。すなわち、IV-RS がどのようなアミノ酸を tRNA に結合していたかによって、IV-RS そのものの配列に次の様な可能性が出てしまうことである。①イソロイシンとバリンを識別して使用している、②イソロイシンだけを使用している、③バリンだけを使用している、④イソロイシンとバリンを識別せずに使用している、と言う4種の可能性である。これを検証するため、①イソロイシンとバリンを配列に含む IV-RS (IV-RS-IV)、②イソロイシンは配列に含まれるがバリンは含まれない IV-RS (IV-RS-I)、③バリンは配列に含まれるがイソロイシンは含まれない IV-RS (IV-RS-V)、と言う3種の配列を推定した。④の可能性は作成が困難であるので今回は作製しなかった。以上の様に推定した ValRS-com、IleRS-com、IV-RS-IV、IV-RS-I、IV-RS-V の5種の祖先タンパク質の遺伝子を作製し、大腸菌内での発現を試みた。IV-RS-V 以外の4種はタンパク質発現したので、それぞれのタンパク質精製を行った。これらの内、ValRS-com と IleRS-com は精製にも成功し、その活性を、アミノアシル化反応で生じるピロリン酸を無機リン酸に分解して定量することで測定した。ValRS-com と IleRS-com の活性測定は、ATP と好熱菌 tRNA 存在下で、それぞれバリンとイソロイシンが存在する場合のみ、リン酸の生成が見られた。すなわち、ValRS-com と IleRS-com はバリンとイソロイシンをそれぞれ特異的に tRNA に結合する反応を触媒すると考えられる (*35 : Conbio2017における発表)。今回復元に成功した ARS のなかでも IleRS-com が最も長く 757 アミノ酸長を持っている。このような大きなタンパク質の酵素活性を保持した復元が可能となったのは、

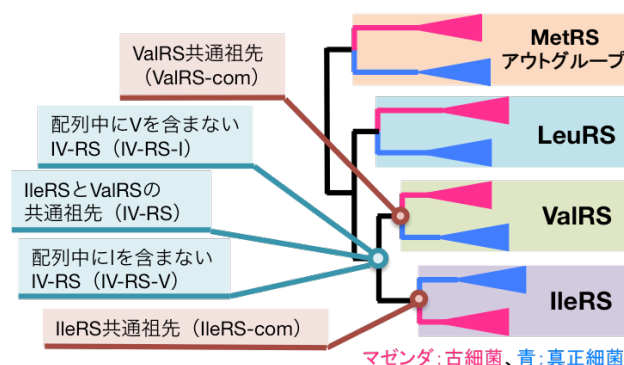


図 2. MetRS, LeuRS, ValRS, IleRS の複合系統樹。それぞれは単系統となった。古細菌と真正細菌の共通祖先(全生物の共通祖先)の ValRS と IleRS、さらに ValRS と IleRS が分岐する前の RS の祖先配列を推定した。

アライメント作製技術が巧緻化したことの証拠と考えられる。

(3) LysRS、GluRS、GlnRS の系統解析

系統解析を Class Ib のリシル、グルタミル、グルタミンル tRNA 合成酵素 (LysRS-class I、GluRS、GlnRS) についても、進めた。ここでは、LysRS-class I をアウトグループとして GluRS/GlnRS の分子系統樹を作製した (図 3)。GlnRS は真核生物の GluRS に近縁であり、GluRS から進化した。そこで、真核生物共通祖先の GluRS (GluRS-eukcom) と、GlnRS の共通祖先 (GlnRS-com) の配列を推定し、その復元 (大腸菌内での発現) を試みた。その結果、双方の祖先 ARS を発現し、精製することに成功した。また、これらのアミノアシル化触媒活性を測定し、GluRS-eukcom と GlnRS-com のいずれもが、tRNA にグルタミン酸を結合する GluRS としての活性を有することが示唆された。これらもアライメント作製技術が巧緻化したことの証拠と考えられる。

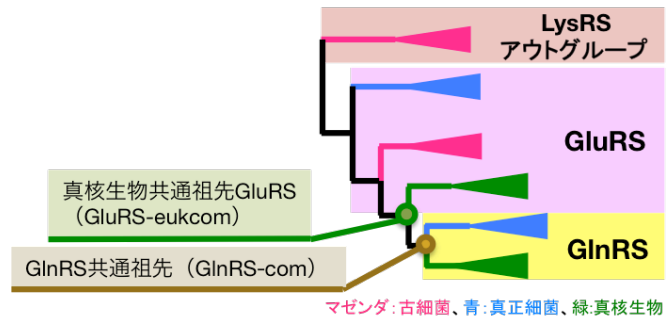


図 3. LysRS、GluRS、GlnRS の複合系統樹。GluRS が古細菌、真正細菌に分岐し、古細菌から真核生物が誕生した。真核生物 GluRS から GlnRS が誕生したことがわかる。真核生物祖先 GlnRS と GlnRS 共通祖先を再現することから GlnRS 誕生過程が推定できる。

3. 研究評価及び今後の研究計画

1年目の成果として、手動と自動の連携による Mafft を用いたアラインメントの巧緻化の成功が挙げられる。2年目には、前年度開発したアラインメントの巧緻化について、自動アラインメントのパラメーターを系統的に変化させるという手法により、要する時間並びに作業ステップ数の短縮化に成功した。また、700 アミノ酸を超える長いタンパク質の祖先配列推定を可能とするアラインメント技術の巧緻化に成功し全生物共通祖先以前の ARS の進化を推定できた(*31,32)。

2年目以降にはさらに2つの方向に研究を進めた。

まず、祖先タンパク質の復元とその機能解析と、その結果をフィードバックして配列アラインメントの技術の更なる精緻化、祖先タンパク質復元というサイクルを繰り返すことによる、アラインメント技術の発展と祖先タンパク質配列推定、耐熱性タンパク質作製技法の巧緻化である。

上記の様に、IleRS と ValRS の各々の共通祖先については、それぞれイソロイシンとバリンを tRNA に結合するアミノアシル化活性と、アミノ酸に対する基質特異性を持った祖先タンパク質を復元することに成功した (*35 : Conbio2017 における発表)。IleRS と ValRS の共通祖先である IV-RS-IV、IV-RS-I、IV-RS-V では、IV-RS-IV と IV-RS-I は発現したものの、活性測定には至らなかった。また、IV-RS-V は発現も見られなかった。これらの祖先 ARS について、再度アラインメントの再検討を行い、祖先配列を推定し、それぞれの発現用遺伝子の作製まで終了している。今後、こ

これらの祖先 ARS の発現、解析を進める。

TyrRS と TrpRS についても、アライメントを進めて祖先タンパク質の復元を試みたが発現に至らず、再度アライメントから分子系統解析、祖先配列推定と解析を進め、現在は新しく復元した祖先 ARS の発現を試みている。

2 つ目は、アライメント技術の他のタンパク質への応用である。上記の様に、GlnRS の共通祖先、そして真核生物共通祖先の GluRS については、その機能解析を行うまで解析が進行した。今後、これらの祖先 ARS のより詳細な機能解析と熱安定性等の解析を進める。

また、新たに、Class IIa のプロリル、セリル、トレオニル、ヒスチジル、グリシル tRNA 合成酵素 (ProRS、SerRS、ThrRS、HisRS、GlyRS) についての複合アライメントと、その部分アライメントである ProRS、SerRS、ThrRS の複合アライメントを作製した。後者のアライメントに基づき、分子系統解析、祖先タンパク質の配列推定を行い、発現用遺伝子の作製を行った。今後、これらの祖先 ARS の発現、解析を進める。

これらのアライメントの再検討並びに新規のアライメントの作製は、これまで進めてきたアライメントの精緻化技術の更なる問題点の抽出、改善により、**短期間で完成が可能となった**。この点において、本課題の目的は、**100%達成できたと考えられる**。また、この課題で作製したアライメントに基づいて祖先タンパク質配列を推定、復元した。このことにより、全生物の最後の共通祖先 (LUCA もしくは Commonote) の持っていたタンパク質を、機能 (酵素活性) を持った状態で復元された。これらのタンパク質は、祖先タンパク質復元法で完全長で復元された最古のタンパク質であると言える。これは、本課題の成果として特筆すべきものであると考えられる。

このアライメントの精緻化のプロセスのより幅広い応用を可能とするための技術の公開は、今後上記の祖先 ARS の解析の報告 (学術論文としての) の中で詳述すると共に、他の研究グループとの共同研究などを通じて進めていく。

4. 研究成果の発表

雑誌論文

1. Akanuma, S., S. Yokobori, Y. Nakajima, M. Bessho, & A. Yamagishi, Robustness of predictions of extremely thermally stable proteins in ancient organisms, *Evol.* **69**(11): 2954–2962(2015)
2. Semba, Y., Ishida, M., Yokobori, S., Yamagishi, A., Ancestral amino acids substitution improved thermal stability of recombinant lignin-peroxidase from white-rot fungi, *Phanerochaete chrysosporium* strain UAMH 3641, *Protein Engineer. Des. Select.* **28**(7): 221-230 (2015)
3. Fukuda, Y., A. Abe, T. Tamura, T. Kishimoto, A. Sogabe, S. Akanuma, S. Yokobori, A. Yamagishi, K. Imada, & K. Inagaki (2016) Epistasis effects of multiple ancestral-consensus amino acid substitutions on the thermal stability of glycerol kinase from *Cellulomonas* sp. NT3060. *J. Biosci. Bioeng.* **121**(5): 497–502.

4. Yokobori, S., Y. Nakajima, S. Akanuma, & A. Yamagishi (2016) Birth of Archaeal Cells—Molecular phylogenetic analyses of G1P dehydrogenase, G3P dehydrogenases, and glycerol kinase suggest derived features of archaeal membranes having G1P-polar lipids, *Archaea* Article ID 1802675
5. *Furukawa, R., M. Nakagawa, T. Kuroyanagi, S. Yokobori, & A. Yamagishi (2017) Quest for ancestors of eukaryal cells based on phylogenetic analyses of aminoacyl tRNA synthetases. *J. Mol. Evol.* **84**(1):51–66.
6. Garcia, A. K., J. W. Schopf, S. Yokobori, S. Akanuma, A. Yamagishi (2017) Reconstructed ancestral enzymes suggest long-term cooling of Earth's photic zone since the Archean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**: 4619-4624.

著書

7. Akanuma, S. and Yamagishi, A.; Ancestral Reconstruction of Enzymes, in "Understanding enzymes: Function, Design, Engineering and Analysis", Ed. Allan Svendsen, Pan Stanford Publishing. (2016) pp. 581-596
8. Akanuma, S., Yamagishi, A. Chapter 20 "A Strategy for Designing Thermostable Enzymes by Reconstructing Ancestral Sequences Possessed by Ancient Life", in Grand Challenges in Biology and Biotechnology "Biotechnology of Extremophiles: Advances and Challenges" Ed. Pabulo H. Rampelotto, Springer (2016) pp. 581-596

国際学会発表

9. Yamagishi, A., Evolution of Life revealed from genetic information, Astrobiology A Japanese-German Colluquimu, 2015/12, Kiel, Germany
10. Yokobori, S., Experimental evidence for the thermophilicity of ancestral life. Germany & Japan Workshop on Evolutionary Genomics. 2016/03, Mishima, Japan
11. Yokobori, S., Y. Nakajima, S. Akanuma, & A. Yamagishi. Derived Features of Archaeal Membranes Having G1P-Polar Lipids Suggested by Molecular Phylogenetic Analyses of G1P Dehydrogenase, G3P Dehydrogenases, and Glycerol Kinase. Extremophiles 2016. 2016/09, Kyoto, Japan
12. Akanuma, S., S. Yokobroi, & A. Yamagishi. Ancestral Sequence Reconstruction to Learn about the Environment of Early Life. Extremophiles 2016. 2016/09, Kyoto, Japan
13. Sasamoto, T., S. Akanuma, M. Bessho, S. Yokobori, & A. Yamagishi. Inferring the pH Environment of Ancient Organisms by Characterizing Resurrected Proteins. Extremophiles 2016. 2016/09, Kyoto, Japan
14. Furukawa, R., M. Nakagawa, T. Kuroyanagi, S. Yokobori, & A. Yamagishi. Searching for Ancestors of Eukaryotic Cells Based on Phylogenetic Analyses of Aminoacyl-tRNA Synthetase. Extremophiles 2016. 2016/09, Kyoto, Japan

15. Harada, M., R. Furukawa, S. Yokobori, E. Tajika, & A. Yamagishi. Evolution of cyanobacterial promoter sequences and its relationships to the rise of atmospheric oxygen 2.2-2.45 billion years ago. *Extremophiles* 2016. 2016/09, Kyoto, Japan

国内学会発表

16. 別所瑞萌、赤沼哲史、横堀伸一、山岸明彦、祖先生物超好熱菌説の確実さの検証、日本地球惑星科学連合 2015 年大会、2015/5, 千葉
17. 横堀伸一、別所瑞萌、笹本峻弘、中島慶樹、赤沼哲史、山岸明彦、古代タンパク質の復元に基づく全生物の最後の共通祖先の生育環境の復元、日本地球惑星科学連合 2015 年大会、2015/5, 千葉
18. 古川龍太郎、横堀伸一、山岸明彦、アミノアシル tRNA 合成酵素の分子系統樹から見た真核生物の起源、日本地球惑星科学連合 2015 年大会、2015/5, 千葉
19. 笹本峻弘、赤沼哲史、別所瑞萌、横堀伸一、山岸明彦、復元した祖先型タンパク質の耐熱性と触媒活性の pH 特性、日本地球惑星科学連合 2015 年大会、2015/5, 千葉
20. 山岸明彦、40 億年前の祖先タンパクの再生実験、日本進化学会第 17 回大会、2015/8、東京
21. Akanuma, S., M. Bessho, T. Sasamoto, S. Yokobori, A. Yamagishi. Reverification of the thermophilicity of ancient life. , 8th Astrobiology Workshop, 2015/11, Tokyo
22. 山岸明彦、系統学的データを用いた祖先型手法による効率的酵素耐熱化設計、BMB2015、2015/12、神戸
23. 別所瑞穂、赤沼哲史、横堀伸一、山岸明彦、実験により復元したタンパク質の変性温度から古代生物の生育環境温度を推定する、BMB2015、2015/12、神戸
24. 別所瑞萌、赤沼哲史、横堀伸一、山岸明彦、Non-Homogeneous モデルを用いて復元した祖先型 NDK の耐熱性、生命の起原および進化学会の第 4 1 回学術講演会、2016/3、鳴門
25. 赤沼哲史、横堀伸一、笹本峻弘、別所瑞萌、山岸明彦、現存生物の相同遺伝子の比較から古代タンパク質、生物、環境を探る、生命の起原および進化学会の第 4 1 回学術講演会、2016/3、鳴門
26. 原田真理子、古川龍太郎、横堀伸一、田近英一、山岸明彦。大酸化イベントに伴うシアノバクテリア SOD (Superoxide dismutase) 発現量の地球史的変動：祖先型プロモーター配列からの推定。日本進化学会第 18 回大会。2016/08、東京 (大岡山)。
27. 横堀伸一、中島慶樹、赤沼哲史、山岸明彦。古細菌細胞膜の起源：G1PDH、G3PDH、グリセロールキナーゼの分子系統解析に基づいて。アストロバイオロジーネットワークワークショップ 2016 年年会。2016/09、仙台。
28. 古川龍太郎、中川穂、黒柳拓也、横堀伸一、山岸明彦。アミノアシル tRNA 合成酵素の分子系統解析に基づく真核生物の起源。第 89 回日本生化学会大会。2016/09、仙台。
29. *横堀伸一、中島慶樹、赤沼哲史、山岸明彦。G1PDH と G3PDH の分子系統解析に基づく古細菌細胞膜の起源。第 39 回分子生物学会年会。2016/11、横浜。

30. *横堀伸一。アミノアシル tRNA 合成酵素の分子系統解析に基づく遺伝暗号進化経路の推定。新学術領域研究「冥王代生命学の創成」平成 29 年度 キックオフワークショップ。2017/05、東京。
31. *古川龍太郎、横堀伸一、山岸明彦。アミノアシル tRNA 合成酵素の分子系統解析に基づく初期翻訳系の進化。日本進化学会第 19 回大会。2017/08、京都。
32. *古川龍太郎、横堀伸一、山岸明彦。アミノアシル tRNA 合成酵素の分子系統解析に基づく生命の初期進化の解析。日本 Archaea 研究会第 30 回講演会。2017/09、仙台。
33. 横堀伸一。アミノアシル tRNA 合成酵素の分子系統解析に基づく遺伝暗号進化経路の推定。新学術領域研究「冥王代生命学の創成」第 2 回ワークショップ。2017/10、白馬、長野。
34. 古川龍太郎、横堀伸一、山岸明彦。ASGARD 古細菌を含めたアミノアシル tRNA 合成酵素の分子系統解析に基づく真核細胞の成立過程の推定。極限環境微生物学会第 18 回大会。2017/11、つくば。
35. *横堀伸一、古川龍太郎、横川隆志、笹本峻弘、佐藤陸、宮下奈津実、遠藤有紀、松田直樹、丸山真歩、木賀大介、赤沼哲史、山岸明彦。アミノアシル化 tRNA 合成酵素の分子系統解析と祖先酵素復元にに基づく標準遺伝暗号表の成立過程の推定。Conbio 2017。2017/12、神戸。
36. 張博文、赤沼哲史、笹本峻弘、横堀伸一、山岸明彦。再構成した祖先タンパク質の解析による全生物の共通祖先の生育環境 pH の推定。Conbio 2017。2017/12、神戸。

A-2 活性酸素種(ROS)発生系と検出蛍光タンパク素子の開発

本課題では、高機能化酵素の応用として活性酸素種(Reactive oxygen species; ROS)発生系とそれを細胞内外で検出するための検出蛍光タンパク質素子の開発を実施する。本課題では、4つの研究室が共同で取り組んでいる。

A-2-1 ROS 産生系および ROS 検出蛍光タンパクの開発

井上英史(東京薬科大学・生命科学部・分子生物化学研究室・教授)

藤川雄太(東京薬科大学・生命科学部・分子生物化学研究室・助教)

1. 当初の研究目標

好気性生物は呼吸鎖などでのエネルギー産生のために多くの酸素を消費しているが、その際に酸素がより反応性の高い分子種へと変換され、「活性酸素種(Reactive oxygen species; ROS)」が発生することが知られている。ROS は DNA の損傷や脂質の過酸化、タンパクのカルボニル化などといった不可逆的な酸化反応を引き起こす「酸化ストレス」の原因として知られてきた。酸化ストレスは、悪性腫瘍や各種神経変性疾患(アルツハイマー病やパーキンソン病など)、脳梗塞や心筋梗塞といった疾患をはじめとした多くの疾患の悪性化に関わる。しかしながら、その詳しいメカニズムおよび疾患との因果関係は未だ明らかとなっていない。例えばがんにおいては ROS が転移を促進するという報告も古くから知られている一方、ROS が転移を抑制するという報告もあり、統一的な理解には至っていない。

生体内における ROS の機能を解析するために、これまで、数多くの研究者によってその解析技術が開発されてきた。生体内で動的な挙動を示す ROS の解析には、「ROS 発生により細胞へ摂動を与えることにより解析する技術」と「生細胞内における特異的なライブイメージング技術」の開発が必須である。

前者としては、ミトコンドリア電子伝達系阻害剤の添加や、細胞外からの H_2O_2 曝露など古典的な方法が一般的に利用されてきた。しかし、このような古典的な方法では、 H_2O_2 の発生量などを厳密にコントロールできないため、レドックスシグナリング研究への実用性が乏しい。ゆえに、レドックス研究が、酸化ストレスの研究からレドックスシグナリングへの研究へとシフトしていることを考えると、場所・量・タイミングを制御した形で ROS を産生させる系の構築は喫緊の課題であり、人工的な ROS 産生系を用いて細胞への影響を解析することが、今後、生体内における ROS の機能を解析する重要な方法となる。

また、後者の「細胞内における動的挙動を見る可視化技術」に関して、これまで低分子性蛍光プローブや GFP 型蛍光センサーなどが次々と開発されてきた。特に近年では、低分子性 ROS 検出蛍光プローブや緑色蛍光タンパクをベースとした蛍光プローブを用いることで、オルガネラレベルの画像分解能で秒・分単位の ROS 濃度変化を検出することが可能となってきた(Meyer A., Dick TP. *Antiox. Red. Signal.* 2010)。しかし低分子性プローブは細胞内で非常に速く拡散することから、蛍光顕微鏡による生細胞イメージングによって ROS 産生が起きた場所を特定することは出来ない。また、タンパク性 ROS 感受性蛍光プローブ

は、その反応特性ゆえに標的分子は限られている。生体内で酸素の一電子還元反応により生じる ROS として、スーパーオキシドは特に重要である。スーパーオキシドは NO(一酸化窒素)と反応することにより、非常に酸化力の高いペルオキシナイトライトを生成し、酸化ストレスの原因となる。しかしながら一方では、 H_2O_2 へと変換され、酸化ストレスおよびレドックスシグナリングに関わる因子として機能する。そのため、生体内でスーパーオキシドの検出を解析する方法の開発が求められている。これまで Wang らによってスーパーオキシド検出蛍光プローブが報告されている(Wang et al., *Cell* 2008, 134, 279-290)ものの、その結果の信頼性には多くの疑問が残されている (Schwarzländer et al., *Biochem. J.* 2011, 437, 381-387, Schwarzländer et al., *Trends Cell Biol.* 2012, 22, 503-508, Demaurex et al., *Antioxid Redox Signal.* 2016 25, 550-551)。すなわち、実質的には特異性の高いスーパーオキシド検出蛍光プローブは未だ開発されていないのが現状である。

本研究では「ROS 発生により細胞へ摂動を与えることにより解析する技術」の開発(研究1および2)および「生細胞内における特異的なライブイメージング技術」の開発(研究3)を行う。

研究1及び2では、 H_2O_2 産生系として生体内に発現が少ないD-アミノ酸オキシダーゼ(DAAO)を改変することで有用な H_2O_2 産生系を構築する。その際、様々な種のDAAOのうち、酸化抵抗性が高いこと、補酵素との結合が強く、その結合が補酵素の酸化還元状態に依存しないといった点に着目し、赤色酵母(*Rhodotorula Gracillis*)由来DAAO(rgDAAO)を用いる。タンパク工学によりrgDAAO変異体を作製するとともに、変異体が優れた認識能を示す基質を見出し、生体システムに影響を与えない(高い生体直交性を有する) H_2O_2 産生系を構築する。また、培養細胞における細胞内局在型 H_2O_2 産生系を構築し、その機能性を評価する。細胞内局所で機能する H_2O_2 産生系を構築し、細胞内タンパクへの影響を検証する。

研究3では、生体内におけるスーパーオキシドの検出を目指し、蛍光タンパクを改変し、ROS 発生の初段階で発生するスーパーオキシドを検出可能な蛍光プローブを開発する。具体的には、スーパーオキシドと特異的な反応で H_2O_2 を産生させ、その近傍に存在する H_2O_2 プローブで H_2O_2 を検出するという戦略をとる。これによって、培養細胞で O_2^- 検出を可能にする特異的な蛍光プローブを開発する。

2. 研究成果の概要

1) 有用な rgDAAO 変異体-基質ペアの探索 ～ リコンビナントタンパク質からのアプローチ

まず、rgDAAO リコンビナントタンパクの性質および *in vitro* における D-アミノ酸への反応性を確かめた。大腸菌のコールドショック発現系ベクター pCOLD-I に rgDAAO-FLAG 配列を挿入し、リコンビナントタンパク発現用大腸菌 BL21(DE3)pLysS 株を発現ベクターで形質転換した。コールドショックにより、N-末端にヘキサヒスチジンタグが附加された野生型 rgDAAO (6xHis-rgDAAO^{WT}) が極めて良好に誘導されることが確かめられたため、大量発現させたタンパク質をヘキサヒスチジンタグによりバッチ精製することで、簡便に高純度のリコンビナントタンパクを得た。さらに精製後、酸素電極を利用して活性測定を行ったところ既存の報告と遜色ない活性を有することが明らかとなった。特に、反応液中に FAD を共存させた場合、非共存下とほぼ同等の活性を示したことから、大腸菌体内で補酵素が結合したホロ酵素となっている可能性が高く、その状態は精製中も維持されていることが示唆された。同様の検討を変異によって基質特異性が変

化することが明らかとなっている M213A (rgDAAO 中のメチオニン 213 番のアミノ酸がアラニンに置換されたもの, rgDAAO^{MA}) についても作成し、酵素活性を評価した。rgDAAO^{MA}も rgDAAO^{WT}と同様に FAD の有無による活性の変化が殆ど見られなかったため、以降の実験では系中には FAD を加えずに活性を測定した。以降のリコンビナントタンパクの活性評価については、多検体処理が可能であり簡便な測定法である AmplexRed/ Horse radish peroxidase(HRP)系を利用し、12 種類の基質について評価した。具体的には、各基質について濃度依存的な反応性を確認し、可能な場合ミカエリスメンテンプロットから最大反応速度 V_{max} およびミカエリス定数 K_m を算出した。本法によって、まず野生型 rgDAAO および M213A 変異体 (rgDAAO^{MA}) の D-アミノ酸を基質とした反応を評価した。その結果、特に芳香族性の側鎖を有する D-アミノ酸が高い反応性 (V_{max}/K_m) を示すこと、rgDAAO^{MA} 変異体ではいくつかの D-アミノ酸に対する反応性を向上させることができる一方、最も単純な構造をもつ D-アラニンに対する反応性を大きく低下できることが明らかとなった。すなわちこの結果から、M213 を変異させることで基質結合ポケットの構造を変化させ、特定の アミノ酸に対して高い結合性を有する D-アミノ酸基質を得ることが可能ではないかと考えられた。

そこでまず、培養細胞への応用を念頭に置き、培養細胞内における変異体タンパクの発現を検討した。6種類の rgDAAO M213 変異体 cDNA を含む培養細胞発現用プラスミドを作製し、MCF7 細胞における発現をウエスタンブロットにより確認した。その結果、アラニン、アスパラギン酸、ロイシン (M213A, M213D, M213L) 変異体は細胞内での発現が確認できなかった。一方、フェニルアラニン (M213F)、ヒスチジン (M213H)、バリン (M213V) 変異体の細胞内発現が確認できた。このうち M213H は細胞内で活性を確認することができなかったが、野生型および2種の変異体 M213F、M213V の H_2O_2 産生能が同程度であった。M213F に比べて M213V 変異体の細胞内発現レベルが高いことから、M213V 変異体 rgDAAO^{MV} を引き続き利用することとした。

次に酵素速度論的パラメータを精査するために M213V リコンビナントタンパク質 rgDAAO^{MV} を作製し、14 種類の基質に対する反応性パラメータを評価した。その結果、多少の例外はあるものの、直鎖アルキルを側鎖として持つ D-アミノ酸に対しておおむね非常に小さい K_m 値を示すことが明らかとなった (D-メチオニン: 0.055 mM、D-アリルグリシン: 0.0047 mM、D-ノルロイシン: 0.046 mM、D-ノルバリン: 0.017 mM)。一方、天然に存在する D-アラニンに対する K_m 値は、野生型 rgDAAO^{WT} に比べて 8 倍大きいことが確かめられた。 H_2O_2 を発生させるため培養細胞に D-アミノ酸を添加する際、D-アミノ酸による非特異的な影響を避けるためには、極力低濃度の D-アミノ酸を用いることが好ましい。その点を踏まえると、rgDAAO^{MV} に対して低い K_m 値を持つ D-アミノ酸を得られたことから、当初の目的である有用な rgDAAO 変異体-基質ペアを得ることができたといえる。

前述したように、rgDAAO^{MV} 変異体は rgDAAO^{WT} に比べて、天然に存在する D-アラニンに対する K_m 値が 8 倍大きく、D-Ala 存在下における H_2O_2 産生能は低い。この特性は線虫に対して本系を適用する際に利点となりうる。すなわち、線虫の培養の際に餌として利用する大腸菌は、細胞壁の構成要素として D-アラニンを多く含むため、rgDAAO^{WT} でなく rgDAAO^{MV} を用いることで、D-アラニンを代謝する活性を最低限に抑えることができる。そこで、線虫の特定組織において rgDAAO^{MV} を発現させた線虫を作製し、特定の組織で産生された H_2O_2 の影響を評価できる系を構築することを目指し、培養細胞において、以下の検討を行った。まず、赤色蛍光タンパク mCherry を rgDAAO^{MV} へと融合した (mCherry-rgDAAO^{MV}) を開発した。mCherry-rgDAAO^{MV} は、MCF7 細胞において高い発現量を示し、D-Met 投与により H_2O_2 を産生することから、mCherry との融合は、その機能に影響を与えない。mCherry 融合型とすることで、線虫体内でのタンパ

ク発現を顕微鏡により観察可能であること、ならびに、汎用的な mCherry に対する RNAi によって、rgDAAO ノックダウンを行い、コントロール実験を簡便に行うことができるためである。rgDAAO^{MV} のコドン線虫に最適化した DNA コンストラクトを線虫にインジェクションし、**組織特異的に mCherry の赤色蛍光を有するトランスジェニック線虫を得ることに成功した**(図1A-C)。これまでに、線虫においてこのような系が確立された報告はなく、今後、組織特異的な H₂O₂ の影響を検証する上で、有用なプラットフォームとなることが期待できる。

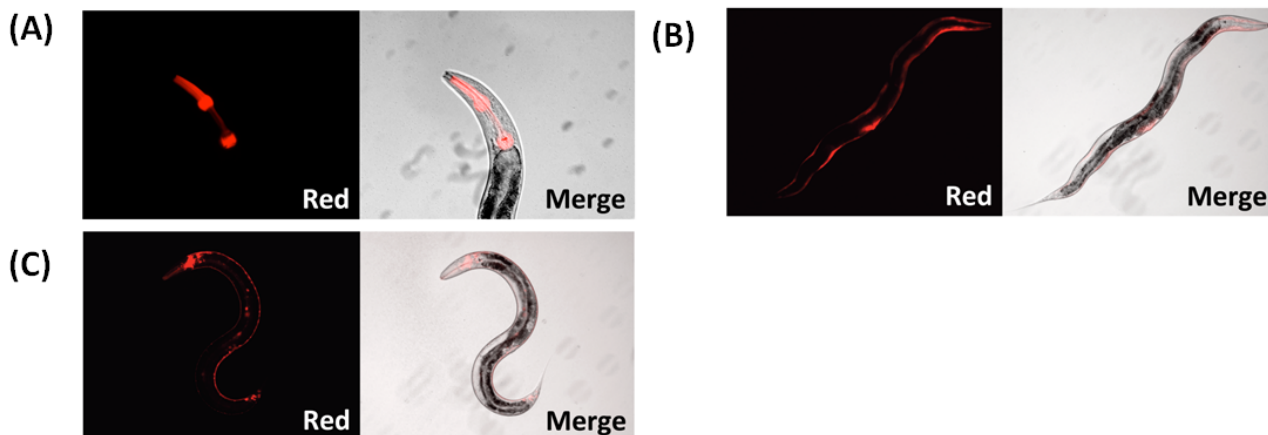


図 1. mCherry-rgDAAO^{MV} 発現トランスジェニック線虫

(A) myo-2プロモーターによる咽頭筋特異的mCherry-rgDAAO^{MV}発現、(B) myo-3プロモーターによる体壁筋特異的mCherry-rgDAAO^{MV}発現 (C) unc-119プロモーターによる全神経特異的mCherry-rgDAAO^{MV}発現 (Red; 赤色蛍光画像、Merge; 白色像と蛍光画像の重ね合わせ)

2) 培養細胞における細胞内局在型 rgDAAO^{WT} の発現及び機能性評価

本アプローチでは、培養細胞の細胞内局所で発生した H₂O₂ のレドックスシグナリングへの影響を精査するため、細胞内局所において機能する D-アミノ酸-DAO システムを構築する。

細胞内における rgDAAO^{WT} の発現を評価するために、まず、pIRES2-DsRed Express2 ベクターに rgDAAO^{WT}-FLAG 配列を挿入した発現プラスミドを構築した。本ベクターは IRES 下流から発現する DsRed の赤色蛍光を観察することで細胞内へのプラスミドの導入を確認できるので、顕微鏡下での1細胞ごとの機能性評価が容易である。局在シグナルの付与・交換を容易にするため、rgDAAO^{WT}-FLAG の開始コドンより前に2か所の制限酵素サイトを付与した。この発現ベクターを用いて、細胞内非局在型、核、細胞膜、ミトコンドリアマトリクス・膜間スペース・外膜を標的部位とした発現ベクターを構築した。

構築したプラスミドをヒト乳がん細胞である MCF7 に導入した後、ウェスタンブロットにより目的タンパクの発現を解析した。その結果、細胞内非局在型、核、ミトコンドリアマトリクス局在型は高い発現レベルを示すのに対し、細胞膜、ミトコンドリア膜間スペースおよび外膜局在型では発現レベルが低く、タンパク発現が検出できなかった。免疫組織化学染色により、rgDAAO^{WT}-FLAG の局在を精査したところ、細胞内非局在型、核、ミトコンドリアマトリクス局在型は予想通りの局在を確認することができた。但し、ミトコンドリア局在

型 rgDAAO^{WT}-FLAG の発現量が高い場合、ミトコンドリアの形が異常であったことから、その発現量をコントロールする必要があると考えられた。

次に、細胞内に発現させた rgDAAO^{WT} の活性が維持されているかどうかを評価するために、rgDAAO^{WT} を発現させた細胞の細胞溶解液あるいは生細胞そのものに対し D-アラニンあるいは L-アラニンを添加し、発生する H₂O₂ を AmplexRed/HRP アッセイにより検出した。その結果、細胞溶解液および生細胞のどちらにおいても、D-アラニン投与時に大きな蛍光強度上昇が確認できた。コントロールとして用いた L-アラニンでは全く蛍光強度上昇は見られなかった。さらに単位時間当たりの蛍光強度上昇(反応速度)は用いる D-アラニンの濃度依存的であった。以上から、培養細胞に発現させた rgDAAO^{WT} は酵素活性、高い立体異性体選択性を維持していることが確認できた。

細胞における一過的な発現による検討結果を踏まえ、安定発現細胞株の確立を試みた。レトロウイルス産生用ベクター *pCX4pur* に核局在型、細胞質局在型及び非局在型 rgDAAO^{WT}cDNA を挿入し、レトロウイルス発現用ベクターを作製した。これらのベクターをパッケージング細胞 Plat-A 細胞にトランスフェクションし、産生されたウイルスを標的細胞である MCF7 細胞へ感染させ、ピューロマイシンで選択し、安定発現株を得た。得られた細胞を用いて、rgDAAO^{WT} 発現をウエスタンブロット、細胞内局在を免疫組織化学染色により解析した結果、その発現および局在が確認できた。

そこで次に示す2つの方法によって機能性を評価した。まず1つ目の方法として、培養細胞における H₂O₂ 産生活性を AmplexRed を用いて評価した。その結果それぞれの安定発現細胞において、細胞数・基質濃度依存的な H₂O₂ 上昇を確認することができた。2つ目の方法として、産生された H₂O₂ によって内在性タンパクに影響をあたえるかどうかを確認した。H₂O₂ 除去酵素ペルオキシレドキシシン II (Prx2 モノマー) は、H₂O₂ によって酸化され、分子間ジスルフィド結合性酸化型ダイマー(以下、Prx2 ダイマー)を形成する。還元状態のチオール基を MMTS (*S*-Methyl methanethiosulfonate) でブロックした後、非還元条件における SDS-PAGE によって、Prx2 モノマーとダイマーを分離した後、Prx2 ダイマーの存在量をウエスタンブロットによって確認することによって、H₂O₂ を検出することができる。C-末端に Myc タグを付与した Prx2 (Prx2-Myc) を発現させた細胞に対し、D-メチオニン濃度系列を1時間処理し、それぞれから作製した細胞破碎液を非還元的 SDS-PAGE の後ウエスタンブロットにより解析した。その結果、酸化型ペルオキシレドキシシン (Prx2 ダイマー) の割合は D-メチオニン濃度に依存して増加することが明らかとなった。すなわち、安定発現細胞株への D-アミノ酸投与により H₂O₂ が発生し、発生した H₂O₂ が細胞内タンパクを酸化することが明らかとなった。

作製した rgDAAO^{WT} 安定発現細胞株を、以下 MCF7/Nt (非局在型 rgDAAO^{WT} 発現細胞)、MCF7/Nuc (核局在型 rgDAAO^{WT} 発現細胞)、MCF7/ Cyto (細胞質局在型 rgDAAO^{WT} 発現細胞)、また非発現細胞を MCF7/Empty (コントロール細胞、rgDAAO^{WT} 非発現細胞) とする。

3種類の rgDAAO^{WT} 発現細胞を用いて、細胞への H₂O₂ 曝露と D-アミノ酸投与による H₂O₂ 産生の細胞への影響を比較した。細胞内 H₂O₂ 濃度は、細胞へトランスフェクションした Prx2-Myc の H₂O₂ 依存的ダイマー形成を指標として評価した。まず、MCF7/Nt に対して、(1) H₂O₂ 処理 (20 μM および 100 μM) 時と D-メチオニン (0.1 および 1 mM) 投与時における Prx2 ダイマー量の経時的な変化を比較した。予想通り H₂O₂ 添加によって Prx2 ダイマーが形成することが確かめられた。また、H₂O₂ の直接的な曝露では、H₂O₂ 添加直後 Prx2 ダイマーが一過的に増加するが、時間とともにバックグラウンドレベルへと戻った。これに対し、D-メチオニン投与群では、D-メチオニン投与 30 秒後より 30 分後まで持続的な Prx2 ダイマーの存在が認めら

れた。この傾向は今回検討した 2 種類の D-メチオニン濃度で、同様に見られた。次に、(2) 局所における H_2O_2 発生が、どのように Prx2 を酸化させるかを確かめた(図 2)。

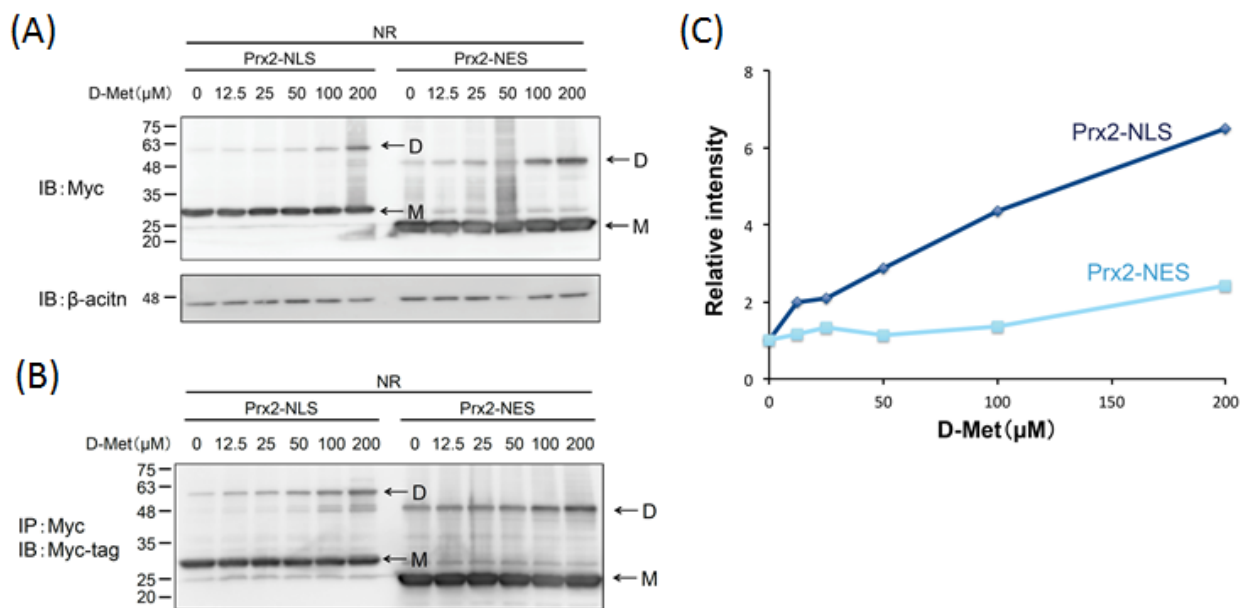


図 2. rgDAAO^{WT}核局在発現型 MCF7/Nuc 細胞における H_2O_2 産生の評価

(A) : gDAAO^{WT}核局在発現型 MCF7/Nuc における核局在型 Prx2 (Prx2-NLS) および細胞質局在型 Prx2 (Prx2-NES) の酸化状態の検出。図中に示した濃度の D-メチオニン (D-Met) を細胞に対して添加し、30 分間 CO_2 インキュベーターにてインキュベーションした。細胞上清 $10 \mu l$ を SDS-PAGE により分離後、抗 Myc 抗体を用いて検出した。ローディングコントロールとして、 β -アクチンを定量した。NR は 非還元 SDS-PAGE であることを示す。(B) : (A) の処理後、抗 Myc 抗体ビーズによる免疫沈降により、Prx2 を濃縮した。この濃縮サンプル $10 \mu l$ を SDS-PAGE により分離した後、抗 Myc 抗体を用いて Prx2 を検出した。D は Prx2 ダイマー、M は Prx2 モノマーの泳動位置を示す。(C) : (B) の IP サンプル中の Prx2 ダイマーバンドを定量した(相対値を示す)。

具体的には、核局在型 rgDAAO^{WT}発現細胞 MCF7/Nuc に対して、核局在型 Prx2 (Prx2-NLS) および細胞質局在型 Prx2 (Prx2-NES) をそれぞれ発現させ、D-アミノ酸 (0–200 μM) を投与し、30 分間処理した。それぞれの Prx2 を免疫沈降により回収し、ダイマー型 Prx2 をウエスタンブロットによって定量した(図 2B)。その結果、100, 200 μM の D-メチオニン濃度では、Prx2-NLS および Prx2-NES のダイマー化がともに促進された。これに対して、50 μM より低い D-Met 濃度では Prx2-NLS のみにおいて Prx2 ダイマー量の増加が見られた。すなわち、本システムでは、D-アミノ酸低濃度では核局所的な Prx2 ダイマーへの酸化を引き起こせることが明らかとなった。これらの結果から、本研究で構築した H_2O_2 産生系は、D-アミノ酸濃度や rgDAAO 発現部位を変化させることによって、時空間的な H_2O_2 産生を可能とするレドックス摂動系として機能することが明らかとなった。

これらの結果は、既存法である細胞外からの H_2O_2 曝露や薬剤処理によっては達成することができない細胞内のレドックス変化をもたらすことができる。最近、Dick らによって、ペルオキシレドキシシン (Prx) が H_2O_2 によって酸化された際に生じる Prx2 ダイマーが、シグナル伝達を司る他のタンパクを酸化する機能を果たすことが報告されている (Stöcker et al., *Nat. Chem. Biol.* 2018, 14, 148-155)。本研究において構築された細胞内局所における H_2O_2 産生系は、従来法と異なり、局所における Prx 酸化を引き起こすことが可能であり、

既報とは異なる Prx の標的タンパクが見いだされる可能性も高い。すなわち、本研究で確立したレドックス摂動法は、細胞内局所での Prx を介したレドックス制御メカニズムを明らかにする上で有用な方法と考えられる。

また、一般的に、細胞は受ける刺激が同じであっても、細胞内レドックス状態に応じて異なる応答を示すことが知られている。例えば我々は本プロジェクトの間に行った別の研究において、様々な生物活性を示す種々の化合物を得ている(論文発表1および2)。これらの生物活性を示す経路には、 H_2O_2 が関わる可能性が示唆されているものの、その詳細は明らかとなっていない。また、グルタチオン転移酵素(GSTP1)などの細胞内のレドックス感受性タンパクは、アポトーシス経路の活性化に伴い、ジスルフィド型ダイマーへと酸化、不活性化されることが知られている。我々は本プロジェクトの間、ここに示した研究と並行して、生きた状態の培養細胞内において、GSTP1 の活性イメージングを可能とする方法を開発した(論文発表3)。今後は、天然物の生物活性やレドックス感受性タンパクの生理学研究において、本レドックス摂動系を併用することにより、 H_2O_2 が担う役割を解明する方法としての利用が期待できる。

3) スーパーオキシド検出蛍光プローブの開発

これまで、移行シグナルあるいは特定のタンパクを融合させ、活性酸素種の発生部位と検出部位を近づけることで、いくつかの局所的に発生した H_2O_2 を検出するプローブが開発されている。そこで同様の戦略で分子をデザインすることにより、局所的に発生した O_2^- を検出することを検討した。すなわち、 O_2^- の検出にあたり、①高効率で O_2^- の不均化反応を触媒する分子と、②不均化反応によって生成する H_2O_2 を検出する蛍光プローブを融合させることで、間接的に O_2^- を検出することが可能でないかと考えた(図 3A)。

① の反応を起こす分子としては、二量体であるスーパーオキシドジスムターゼ1(SOD1)を、②の H_2O_2 検出プローブとしては、レシオ型 H_2O_2 検出蛍光プローブである roGFP2-Orp1 を用いた。SOD は、細胞内に存在する O_2^- 特異的な不均化酵素であり、触媒反応によって H_2O_2 を生じる。また、roGFP2(酸化還元感受性 roGFP2)は、405nm および 473nm の極大吸収波長を持ち、それぞれの波長によって励起された際に放出される蛍光強度の比であるレシオ値(Ratio 405nm/488nm)が、その酸化還元状態によって変化する。すなわち、還元型では低いレシオ値を示す一方、酸化型では高いレシオ値を示す。つまり、 H_2O_2 の発生をレシオ値の上昇によって確認できる蛍光プローブである。このように SOD と roGFP2-Orp1 を融合することによって、SOD による O_2^- の不均化反応で生じる H_2O_2 を近傍の roGFP2-Orp1 により検出する(図 3B)。

セリンとグリシンからなる 10 残基の Flexible linker を用いて、roGFP2-Orp1 の N 末端に SOD1 を繋いだ N 末端融合型プローブ SOD1-roGFP2-Orp1 (N-SOD) と、roGFP2-Orp1 の C 末端に SOD1 を繋いだ C 末端融合型プローブ roGFP2-Orp1-SOD1 (C-SOD)の二つをデザインした。また精製を容易に行えるように、N-SOD および C-SOD それぞれの N 末端にヘキサヒスチジンタグを付与し、大腸菌中で発現、リコンビナントタンパクを得た。得られたタンパク質を用いて、融合されたそれぞれのタンパクが元の活性を維持しているかどうかを確認するため、 H_2O_2 応答性およびダイナミックレンジ(プローブの応答幅)、SOD 活性をそれぞれ評価した。まずプローブ roGFP2-Orp1(コントロール、SOD 非融合型;No-SOD)、N-SOD および C-SOD を 20 mM の DTT で還元処理後、ゲル濾過で DTT を取り除き、それぞれアッセイ溶液で希釈し、マイクロプレートリーダーで蛍光レシオ値の H_2O_2 応答性測定を行った。測定開始から 90 秒後に 5 μ M の

H₂O₂を加え、経時的に蛍光測定を行った。一定時間後、100 μM DPS を加えプローブを完全に酸化させ、次に 10 mM DTT を加えて完全に還元させた。それぞれにおける蛍光強度を測定し、完全酸化状態および還元状態のレシオ値を算出した。その結果、C-SOD1 では H₂O₂添加によるレシオの上昇が見られなかったものの、N-SOD1 は No-SOD と同等の H₂O₂応答性を示すことが明らかとなった。

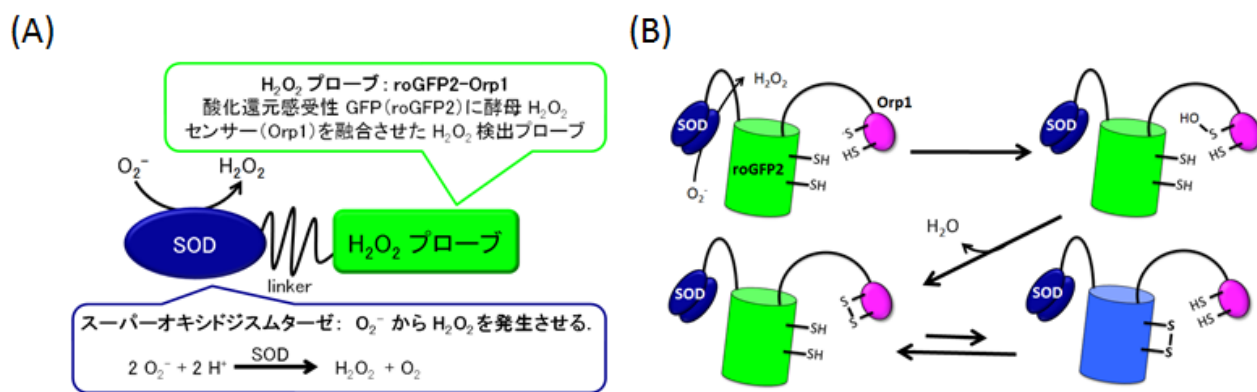


図 3. スーパーオキシド検出蛍光プローブのデザインとその作動原理

(A) SOD を利用した O₂⁻ 検出蛍光プローブのデザイン. SOD によって特異的に O₂⁻ へと変換された H₂O₂ は近傍に存在する H₂O₂ プローブによって蛍光検出される. (B) SOD 融合型 roGFP2-Orp1 による O₂⁻ 検出原理. SOD 活性によって O₂⁻ から生じた H₂O₂ は、近傍の Orp1 を酸化する. 酸化型 Orp1 は、roGFP2 を可逆的に酸化する.

次に、融合タンパクの SOD 活性が維持されていることを確かめるため、キサンチン-キサンチンオキシダーゼ (X-XO) 系を用いて SOD 活性を測定した。本アッセイでは、X-XO 系で発生した O₂⁻ が電子受容体である WST-1 を還元し、ホルマザンが生成されて呈色する。そこで、O₂⁻ の濃度減少速度からプローブの SOD 活性を評価した。SOD1 に roGFP2-Orp1 が融合しても SOD1 の O₂⁻ の濃度減少活性に大きな影響を与えないことが明らかとなった。すなわち、N-SOD タンパクは、H₂O₂ 応答性および SOD 活性が担保されていることが確かめられた。すなわち、O₂⁻ の濃度に応答して蛍光レシオ値が変化すると推定される。

以上の結果を踏まえ、蛍光プローブの生細胞内での O₂⁻ 応答性の検討を行った。まず、N-SOD プローブ発現プラスミドを MCF-7 細胞にトランスフェクションし、細胞内での発現および分布を共焦点レーザー顕微鏡で確認した。roGFP2-Orp1 は核を含めた細胞全体に分布しているのに対し、SOD 融合型プローブは細胞質のみに分布していることが確認できた。この結果は SOD 融合による分子の巨大化によって核膜孔を通過出来ないため、あるいは、SOD 内に存在する核外輸送シグナルによるため、と考えられる。またいくつかの細胞では、プローブによるアグリソーム形成が確認できた。そのような細胞では特に蛍光強度が強かったことから、タンパクの発現量が高い場合、アグリソームが形成しやすいタンパクである可能性が高いことは、今後の検討において留意すべき点であると考えられる。H₂O₂ に対する反応性は、N-SOD プローブにおいて、No-SOD と同程度の反応性を示したことから、細胞内でも H₂O₂ 反応性は維持されていることが確かめられた。

続いて、細胞内で発生するスーパーオキシドを検出することができるか、細胞内におけるスーパーオキシド発生試薬である PMS を利用し、N-SOD プローブを発現させた細胞を用いて評価した。No-SOD あるいは N-SOD を発現させた MCF-7 細胞に対して、20 μ M PMS を加え、コントロール(PMS 非添加時)とのレシオ値を比較した。roGFP2-Orp1 では、PMS 処理によるレシオ値の上昇は見られなかった(1.1 倍)のに対して、N-SOD プローブは PMS 処理によって 2 倍のレシオ値上昇を示した(図 4C)。この結果は、既存の H_2O_2 プローブである roGFP2-Orp1 ではほとんど応答が見られない O_2^- 検由来の H_2O_2 を検出していると考えられ、PMS 処理により生体内で発生した O_2^- を検出できていると推定された。以上の結果から、本研究で開発した N-SOD プローブは、細胞内で発生した O_2^- を検出することができる新規 O_2^- 検出蛍光プローブであることが示された。

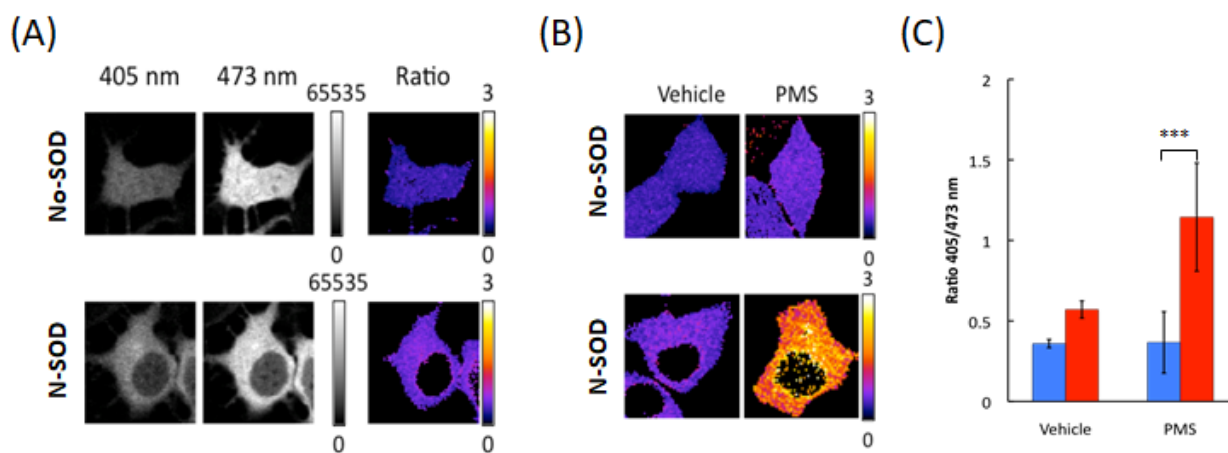


図 4. N-SOD プローブによる生細胞内で発生したスーパーオキシドの検出

(A) : No-SOD および N-SOD プローブの GFP 蛍光画像(励起波長:405nm、473nm それぞれにおける GFP 蛍光画像)およびそれに対応したレシオ画像(右). (B): N-SOD および C-SOD プローブ発現細胞に対し、スーパーオキシド発生を行う PMS を加えた際のレシオイメージング、Vehicle は PMS 未処理、PMS は 20 μ M の PMS で 60 分間処理したものを示した。(C) : (B)において PMS 処理した際のレシオの比較 グラフには細胞 10 個の平均値 \pm 標準偏差として示した。棒グラフは青色が No-SOD、赤色が N-SOD を表し、***は *t*-test で $p < 0.01$ であることを示す。

4. 研究評価及び今後の研究計画

1) 有用な rgDAAO 変異体-基質ペアの探索

本研究では、リコンビナントタンパク質発現培養細胞での検討結果を踏まえ、優れた rgDAAO 変異体-基質ペアを見出すことができた。さらに、この rgDAAO 変異体を、特定の筋組織や神経に発現する線虫を得ることに成功した。有用な rgDAAO 変異体-基質ペアを見出し、それに基づき個体レベルにおける ROS の機能解析において、有用な技術基盤が確立できたことから、本項目は当初の目標を 100%達成したと言える。古くから活性酸素と疾患および老化の関係性が指摘されているものの、未だにその因果関係は明らかとなっていない。今後は、本技術を利用し、組織特異的な H_2O_2 産生の影響を個体レベルで解析することで、一部の組織における H_2O_2 がどのように個体(疾患や老化)に影響を及ぼすか、病態生理学的なメカニ

ズムを明らかにする目的とした研究を計画している。

2) 培養細胞における細胞内局在型 rgDAAO の発現及び機能性評価

本研究では、培養細胞において、時空間的に H₂O₂ 産生を制御する技術基盤を確立できたことから、目標を 100% 達成した。培養細胞での検討において、産生された H₂O₂ によって、細胞内 H₂O₂ 感受性タンパクであるペルオキシレドキシシンを持続的に酸化し、レドックス状態をより酸化的に持続的にシフトさせる系として利用できることが示された。一般的に、細胞は同じ受容体刺激を受け取ったとしても、細胞内レドックス状態に応じて異なる細胞内シグナル伝達経路が活性化され、それに応じた応答を示すことが知られている。薬剤の作用機序やレドックス感受性タンパクの機能解析などに有用なツールとして、今後の基礎研究に利用することを計画している。

3) スーパーオキシド検出蛍光プローブの開発

本研究では、スーパーオキシド検出を可能とする蛍光プローブを開発し、培養細胞においてスーパーオキシドの検出に成功した。当初の目標を 100% 達成したと言える。今後、開発したタンパクに細胞内局在化シグナルなどを付与することによって、スーパーオキシド発生部位の近傍においてスーパーオキシド検出を可能とする蛍光プローブの開発などが期待できる。また、本プローブを動物個体などに発現させ、特定の組織でのスーパーオキシド検出とスーパーオキシドの影響の検討を行う。

4. 研究成果の発表

雑誌論文

1. Yun YS, Tajima M, Takahashi S, Takahashi Y, Umemura M, Nakano H, Park HS, Inoue H. Two Alkaloids from Bulbs of *Lycoris sanguinea* MAXIM. Suppress PEPCK Expression by Inhibiting the Phosphorylation of CREB. (2016) *Phytother. Res.* **30**(10), 1689-1695.
2. Yun YS, Noda S, Takahashi S, Takahashi Y, Inoue H. Piperine-like alkaloids from *Piper nigrum* induce BDNF promoter and promote neurite outgrowth in Neuro-2a cells. (2018) *J. Nat. Med.* **72**(1), 238-245.
3. Fujikawa, Y., Nampo, T., Mori, M., Kikkawa, M., and Inoue, H. Fluorescein diacetate (FDA) and its analogue as substrates for Pi-class glutathione S-transferase (GSTP1) and their biological application. (2018) *Talanta*, **179**, 845-852.

国内学会発表

4. 田邨瑞希, 藤川雄太, 井上英史. H₂O₂ の発生系のための *Rhodotorula gracillis* D-アミノ酸オキシダーゼの基質特異性評価. 日本薬学会第136年会, 2016年3月(横浜)

5. 青山 芙由子, 藤川 雄太, 井上 英史. 細胞内局所で H_2O_2 を産生するシステムの構築. 日本薬学会第136年会, 2016年3月(横浜)
6. 田邨 瑞希, 藤川 雄太, 井上 英史. *Rhodotorula gracillis* D-アミノ酸オキシダーゼに対する人工基質の速度論的解析. 第89回日本生化学会, 2016年9月(仙台)
7. 青山 芙由子, 藤川 雄太, 田邨 瑞希, 山崎 えりか, 井上 英史. D-アミノ酸オキシダーゼを用いた細胞内局所での H_2O_2 産生系の構築. 日本薬学会第137年会, 2017年3月(仙台)
8. 熊倉 夏希, 藤川 雄太, 井上 英史. D-アミノ酸オキシダーゼを用いた細胞内局所での H_2O_2 発生系の構築とその応用. 日本薬学会 第138年会 2018年3月(金沢)
9. 南保 泰希, 藤川 雄太, 森崎 芙美花, 佐々木 将, 齋藤 聡, 小島 宏建, 岡部 隆義, 長野 哲雄, 井上 英史. 新規 GSTP1 選択的阻害剤の開発およびその作用メカニズムと構造活性相関研究. 日本薬学会 第138年会 2018年3月(金沢)

A-2-2 過酸化水素発生素子となる D-アミノ酸の合成

小林 豊晴 (東京薬科大学・生命科学部・生物有機化学研究室・助教)

1. 当初の研究目標

過酸化水素 (H_2O_2) は、様々な生体分子の酸化損傷を引き起こす酸化ストレスの一因として知られているが、近年の研究から、生体の恒常性維持を担うレドックスシグナリングにおいても重要な役割を担っていると考えられるようになってきた。しかしながら、これまでの細胞内レドックスシグナリングの研究手法は、細胞外からの H_2O_2 の添加によるものが主であり、この方法では局所的な H_2O_2 の発生によるタンパク質のレドックス状態および細胞に対する影響を明らかにすることは困難であった。そこで、本研究では、細胞内で局所的に産生された H_2O_2 の詳細な機能解析と細胞へおよぼす影響の解明を目的として、細胞内において局所的に発生可能な H_2O_2 の産生系の構築を目指した。

はじめのアプローチとして、D-アミノ酸オキシダーゼ (DAAO) を用いた H_2O_2 産生系の構築を試みた。DAAO は D-アミノ酸の酸化反応を触媒する際に H_2O_2 を発生させる酵素であり、このメカニズムを利用することで H_2O_2 発生系の構築が想定できる。DAAO としては、立体構造が明らかとなっており、高い触媒回転を有する *Rhodotorula gracilis* 由来の DAAO (rgDAAO) を用いた。まず、この rgDAAO の活性部位を改変した変異体を新たに作製する。次いで作製した rgDAAO 変異体と高選択的に応答し、生体内に存在する他の DAAO とは応答しないもしくは反応性の低い合成 D-アミノ酸を開発出来れば、細胞内において局所的に発生可能な H_2O_2 の産生系の構築が期待できる。そこで rgDAAO 変異体と高選択的に応答する合成 D-アミノ酸の開発を行うこととした。rgDAAO 変異体の作製および細胞内での局所的な発現については共同研究者が担当する。

また細胞内において局所的に H_2O_2 が発生しているか実際に確認するため、酵素反応の進行をモニタリングできる D-アミノ酸の開発を目指すこととした。すなわち DAAO によって D-アミノ酸がケト酸へと酸化されることに着目し、酵素反応により生成するケト酸が蛍光分子として機能するような D-アミノ酸の設計、開発を行う。これが実現できれば、 H_2O_2 の発生を蛍光としてリアルタイムに観察することが可能になると考えられる。

以上のように (1) 生体内での過酸化水素発生素子に利用する非天然型 D-アミノ酸の開発および (2) 細胞内での局所的な H_2O_2 の発生確認を目的とした酵素反応の進行をモニタリングできる D-アミノ酸の開発を研究目標とした。

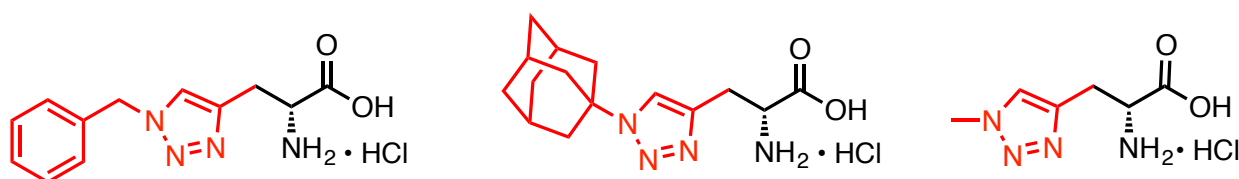
2. 研究成果の概要

- (1) 生体内での過酸化水素発生素子に利用する非天然型 D-アミノ酸の開発

平成27～28年度は共同研究者により作製され、*in vitro*の活性試験において良い結果が得られた rgDAAO の 213 番目のメチオニン残基をアラニンへと変換した rgDAAO M213A 変異体 (rgDAAO^{MA}) をターゲットとして非天然型 D-アミノ酸の開発を行った。rgDAAO^{MA}は、市販の D-アミノ酸を用いたアッセイにおいて、細胞内在性の D-アミノ酸である、D-アラニン、D-セリン また D-プロリンに対しては比較的大きい K_m 値を示し、フェニル基やナフチル基などの比較的大きい芳香環を有する、D-アミノ酸に対して比較的小さい K_m 値を示すことが明らかとなった。そこで rgDAAO^{MA} に対して高選択的に応答する D-アミノ酸として、天然に存在しない D-アミノ酸であり、ある程度大きな芳香族側鎖を有するものが適していると考えた。そこでそのような D-アミノ酸として①フェニルグリシン誘導体および②トリアゾール誘導体を候補化合物として合成することとした。フェニルグリシン誘導体は、一般的なアミノ酸がメチレン鎖を一つ挟んで側鎖が存在しているのに対して、直接アミノ酸部位にアリール基が結合していることから、立体および電子的要因が他のアミノ酸と大きくことなっている。そのため今回の酵素反応においても他のアミノ酸と異なる反応性を示すことが期待される。トリアゾール誘導体も天然には存在せず、合成が容易であるため、数多くの誘導体が合成可能であり、今回のスクリーニングに適しているものと考えた。

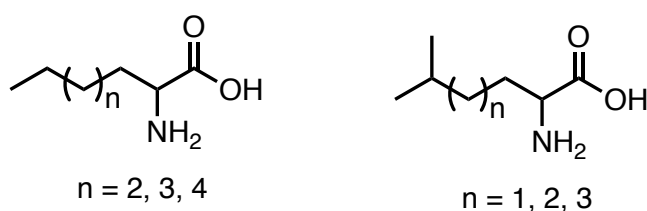
フェニルグリシン誘導体の合成法としては、2006年に Kim らにより報告された光学活性なベンゾスルタム誘導体を不斉補助基として用いる方法により合成することとした。その理由としては、不斉補助基を用いたジアステレオ選択的なアジド化により不斉点を構築しているため多くの基質に対して適応可能と考えられる点、またエバンスの不斉補助基など他の不斉補助基を用いた合成法に比べ選択性が最も高かったため、この合成法を用いることとした。平成27年度においてこの合成法が実際にフェニルグリシン誘導体の合成に適応可能か確認し、平成28年度は実際に D-ナフチルグリシンの合成を行い、D-1-ナフチルグリシンを合成することに成功した。また、より複雑な置換基を有する D-アミノ酸を合成するためには、不斉炭素原子の構築や立体選択的に炭素-炭素結合を形成するための新たな方法論が必要となる。そこで、それら方法論の開発研究も併せて行い、さらに開発した反応を用いて3つの天然有機化合物の立体選択的全合成を達成した。

また平成28年度において、トリアゾール誘導体をヒュスゲン環化付加反応(クリック反応)を利用して合成した。すなわち、市販の D-プロパルギルグリシンに対して、アミノ基の Boc 保護を行った後、カルボン酸を *t*-ブチルエステルへと変換した。その後、銅触媒を用いて、アジド化合物とのヒュスゲン環化付加反応(クリック反応)を行った。まずベンジルアジドとの反応を行い、その後塩酸処理を行うことで、ベンジル基を有する 1,2,3-トリアゾール誘導体を合成した。次いで、1-アジドアダマンタンを用いて同様の反応を行うことで、アダマンタンを有する 1,2,3-トリアゾール誘導体を合成した。また、トリメチルシリルメチルアジドと反応させた後、TMS 基の脱保護と塩酸処理を行うことで、メチル基を有する 1,2,3-トリアゾール誘導体を合成した。



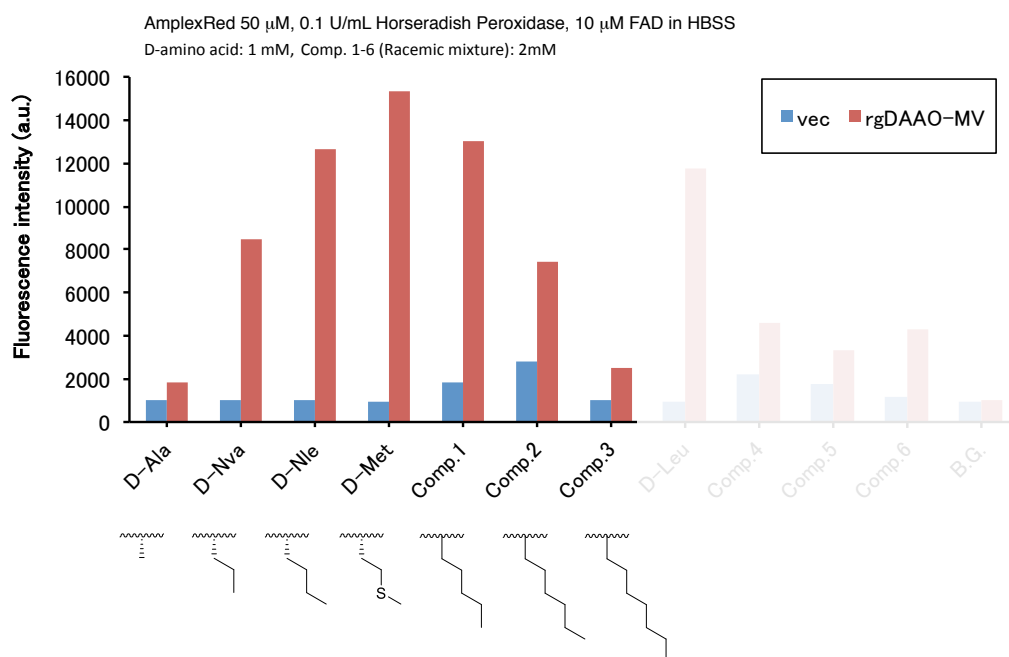
・図1. 合成した 1,2,3-トリアゾール誘導体

しかし、ターゲットとしていた、**rgDAAO^{MA}**は細胞内で発現しないことが明らかとなった。そこで細胞内での発現が確認された **rgDAAO M213V** 変異体(A-2-3 班 研究成果:**rgDAAO^{MV}**) に対してアッセイを行ったが、良い結果は得られなかった。そこで平成29年度は、**rgDAAO^{MV}**をターゲットとして、非天然型 D-アミノ酸の合成を行った。**rgDAAO^{MV}**は、市販の D-アミノ酸を用いたアッセイにおいて、ロイシン、ノルロイシンおよびノルバリンなどの鎖状のアルキル鎖を有するものに対して、比較的小さい K_m 値を示すことが明らかとなった(A-2-1 班 研究成果)。そこで、D-アミノ酸としては、鎖状のアルキル鎖を有するものをラセミ体として合成した(図2)。



・ 図2. 合成した鎖状のアルキル鎖を有するアミノ酸

合成した鎖状のアルキル鎖を有するラセミ体のアッセイをA-2-1班に実施依頼した。その結果、鎖状アルキル鎖の炭素数と過酸化水素発生量の間で図3に示した興味深い相関関係を示した。すわなち、鎖状アルキル鎖の炭素数の増加に伴い、過酸化水素発生量が増加していき、炭素数4または5で最大となり、その後炭素数の増加に伴い、過酸化水素発生量が減少していくことが明らかとなった。

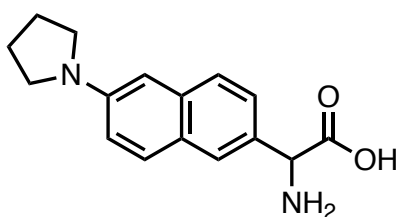


・ 図3. AmplexRed assay 結果

以上、当初合成した非天然型 D-アミノ酸ではないが、D-アミノ酸として D-メチオニンを用いる事で細胞内過酸化水素発生量のコントロールを可能とする D-アミノ酸-rgDAAO^{MV} ペアの開発に成功した。

(2) 酵素反応の進行をモニタリングできる D-アミノ酸の開発

Weber と Farris によって開発された prodon はナフタレン環の 2 位にジメチルアミノ基、6 位にカルボニル基を有する環境応答型蛍光分子である。Prodon は 2 位の電子供与基であるアルキルアミノ基と 6 位の電子求引基であるカルボニル基の存在が励起した際に電荷分離状態を引き起こすことで、蛍光スペクトルが大きくレッドシフトするとともに蛍光強度も増加し蛍光分子として機能している。そこで D-アミノ酸として合成予定の 2-ナフチルグリシンに着目した。2-ナフチルグリシンは DAAO によってケト酸へ酸化されると、ナフタレン環の 6 位にカルボニル基を有することになる。そこで 2-ナフチルグリシンのナフタレン環の 2 位にアルキルアミンであるピロリジンを導入しておけば、生じるケト酸が蛍光分子として機能するのではないかと考えた。27 年度は、ナフタレン環上 2 位にピロリジンを有する 2-ナフチルグリシン由来のケト酸を合成し、メタノール溶液に 365 nm の紫外線を照射することで青色の蛍光を発することを確認した。そこで、28 年度は実際にナフタレン環の 2 位にピロリジンを導入した 2-ナフチルグリシンの合成を検討した。光学活性体での合成を目指し、2-アセチル-6-メトキシナフタレンまたは 6-ブロモ-2-ナフタレンカルボン酸メチルを出発原料とする 2 通りの経路により検討を行ったが、目的の化合物を得ることはできなかった。平成 29 年度は、目的の化合物をラセミ体として合成することとし、ストレッカー反応を鍵反応として出発物質より 5 工程の変換で目的の 2 位にピロリジンを有する 2-ナフチルグリシンの合成に成功した。



・図 3. 2 位にピロリジンを有する 2-ナフチルグリシン

3. 研究評価及び今後の研究計画

1) 生体内での過酸化水素発生系に利用する非天然型 D-アミノ酸の開発

平成 27、28 年度は rgDAAO M213A 変異体をターゲットとして、1-ナフチルグリシンおよび

3種類の1,2,3-トリアゾール誘導体の開発について達成することができた。しかし、rgDAAO^{MA}は細胞内で発現しないことが明らかとなった。そこで細胞内での発現が確認されたrgDAAO^{MV}に対してアッセイを行ったが、良い結果は得られなかった。そこで平成29年度は、rgDAAO^{MV}をターゲットとして、非天然型D-アミノ酸の合成を行うこととした。rgDAAO^{MV}は、市販のD-アミノ酸を用いたアッセイにおいて、ロイシン、ノルロイシンおよびノルバリンなどの鎖状のアルキル鎖を有するものに対して、比較的小さい K_m 値を示すことが明らかとなった。そこで、アミノ酸として、鎖状のアルキル鎖を有するアミノ酸をラセミ体として合成した。現在、合成した鎖状のアルキル鎖を有するラセミ体のアッセイを共同研究者が行っており、好ましい結果が得られたものに関しては、光学活性体として合成する予定である。途中で標的タンパク質が変更となったため、望み通りのアッセイ結果は得られなかったが、当初計画していたD-アミノ酸の合成は達成することができ、目標を100%と達成した。

2) 酵素反応の進行をモニタリングできるD-アミノ酸の開発

平成27、28年度は目的のD-アミノ酸であるナフタレン環上2位にピロリジンを有する2-ナフチルグリシンを光学活性体として合成しようとしたが、合成経路を確立するには至らなかった。そこで平成29年度は、合成したアミノ酸がrgDAAO変異体に基質として認識されるか検討するため、ラセミ体での合成を検討した。その結果2位にピロリジンを有する2-ナフチルグリシンをラセミ体として合成することに成功した。

4. 研究成果の発表

雑誌論文

1. Kobayashi, T., Shioi, R., Ushie, A., Abe, H. and Ito, H, Catalytic Asymmetric Total Synthesis of Artalbic Acid, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 9391-9393.
2. Kobayashi, T., Yamanoue, K., Abe, H., and Ito, H., Diastereoselective Total Synthesis of (±)-Toxicodenane A, *Euro. J. Org. Chem.* **2017**, 6693-6699.
3. Kobayashi, T., Ishida, M., Imaida, K., Abe, H., and Ito, H., Total Synthesis of Pleurolactone, *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 3294-3295.

国内学会発表

4. 山野上琴乃, 小林豊晴, 阿部秀樹, 伊藤久央, Toxicodenane A の立体選択的全合成 第46回複素環化学討論会 2016年9月(金沢)
5. 山野上琴乃, 小林豊晴, 阿部秀樹, 伊藤久央, Toxicodenane A の全合成 日本薬学会第136年会 2016年3月(横浜)
6. 塩井隆太, 牛江亜衣, 小林豊晴, 阿部秀樹, 伊藤久央, artalbic acid の全合成 日本薬学会第136年

会 2016 年 3 月 (横浜)

7. 石田雅子, 今井田和紘, 小林豊晴, 阿部秀樹, 伊藤久央, 中国産食用キノコ由来テルペノイド類の合成研究 日本薬学会第 136 年会 2016 年 3 月 (横浜)

A-2-3 ROS 発生系の細胞応用

梅村真理子(東京薬科大学・生命科学部・環境応用動物学・助教)

1. 当初の研究目標

本研究課題では、タンパク質安定化設計技術を用いた活性酸素種(ROS)発生系開発を目的としている。活性酸素種(ROS)は酸素分子が反応性の高い化合物に変化したものであり、DNA 傷害やタンパク質の変性を引き起こす酸化ストレスの原因分子である。ROS は老化や動脈硬化、糖尿病などの疾患の原因であることが予想されている。ROS の中でも、活性酸素は細胞内でセカンドメッセンジャーとして機能し、アポトーシス、軸索反発、神経伝達物質制御等に関与していることが報告されている。しかし、過酸化水素(H₂O₂)を含む ROS の細胞や生体内での機能は不明な点が多い。これまで、細胞内での H₂O₂の影響を調べる手段として、細胞外から ROS や酸化剤を添加していたが、この方法は細胞内の H₂O₂の濃度や局在をコントロールできないことが問題であった。そこで、本研究では、この問題点を解決する新規な ROS 発生系を構築することを目的とした。

本研究では、細胞内で、赤色酵母 *Rhodotorula gracilis* 由来の D-amino acid oxidase (rgDAAO)を発現させ、H₂O₂を発生する系を構築することとした。DAAO は D-アミノ酸をケト酸へと酸化し、H₂O₂を発生させる(Umhau et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2000, 97, 12463-12468)。一方、細胞内や生体内で、野生型 rgDAAO を発現させ、基質として天然 D 型アミノ酸を添加した場合、野生型 rgDAAO が内在性の D 型アミノ酸を基質として利用してしまうことや、細胞や生体の内在性 DAAO が添加した天然型 D 型アミノ酸を基質として消費してしまうことが懸念された。そこで、タンパク質工学を利用し改変型 DAAO を開発し、有機化学の専門家と協力して非天然の人工型 D アミノ酸を合成し、内在性 D アミノ酸、内在性 DAAO に影響を受けない H₂O₂生産をコントロールできる系を構築するように設計することを A-2 グループの目標とした。特に、当研究室では、細胞内で安定的発現し、活性が高い改変型(変異型)rgDAAO を開発し H₂O₂の発生を評価すること、また、構築した H₂O₂発生系を用いて ROS 発生による細胞への影響を解析することを目的とした。これにより、新規な ROS の機能を解明できると期待された。

2. 研究成果の概要

1) rgDAAO の細胞内発現系の構築

rgDAAO を細胞内発現系構築のためのベクターを作成した。rgDAAO を pcDNA3.1 ベクターの CMV プロモーターの下流に挿入し、rgDAAO 発現ベク

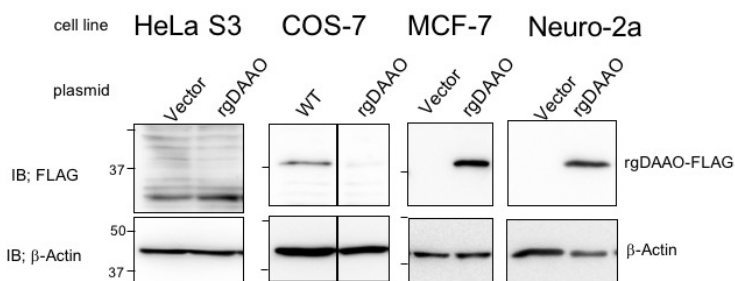


図1 rgDAAO 発現系の構築と、安定発現細胞の探索。rgDAAO ベクターをそれぞれの細胞に導入し、ウエスタンブロット解析を行った。Neuro-2a 細胞と MCF-7 細胞において、rgDAAO の発現量が高いことがわかった。

ターを構築した。それぞれの rgDAAO の C 末端側には FLAG タグ(1x)を挿入した。構築した FLAG 融合 rgDAAO 発現ベクターを細胞内に導入した。使用した細胞は、HeLaS3(ヒト子宮頸癌細胞)、COS-7(アフリカミドリザル腎細胞)、MCF-7(ヒト乳癌細胞)、Neuro-2a(マウス神経細胞芽腫細胞)である。この中で、COS-7 細胞、MCF-7 細胞、Neuro-2a 細胞では野生型 rgDAAO が安定発現することがわかった(図 1)。特に、MCF-7 細胞と Neuro-2a 細胞での発現が比較的安定であり、トランスフェクション効率に由来すると予想された。以上、培養細胞を用いた rgDAAO の発現系を構築することができた。今後 A-2-3 班では主に神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞を実験に用いる事とした。A-2-4 班がハエの神経細胞への rgDAAO 発現を試みる予定であるため、神経系の培養細胞を用いた rgDAAO 発現系の構築が A-2 班の連携に繋がると考えた。

2) rgDAAO 変異体の作成

rgDAAO は立体構造が明らかになっており、基質との結合解析が行われている(Adv. Synth. Catal. 2006, 348, 2183 – 2190)。非天然 D 型アミノ酸である D-ナフチルグリシンとの結合部位の解析では、側鎖であるナフタレンと rgDAAO の 213 番目のメチオニンが立体障害を起こすことが予想されている。そこで、本研究では、rgDAAO の 213 番目のメチオニンをグリシンとアラニンに置換した M213G 変異体と M213A 発現ベクターを Site directed mutagenesis 法により構築したところ、野生型 rgDAAO に比べて、顕著に発現量が低かった。基質のポケットを大きくしたことにより、細胞内在性の D アミノ酸を基質としてしまい過酸化水素が発生し細胞死がおこってしまったことも予想されたが、詳細な発現低下メカニズムは不明であった。そこで、A-2-1 班と共同で、F58A, F58D, F58L, M213D, M213H, M213H, M213L, M213V, Y238A, Y238F 変異体を作成した。この中で、M213V や M213H などがヒト乳癌細胞 MCF-7 細胞において安定発現し、野生型比べて、D 型メチオニンに対する特異性が高くなっている事を明らかにした。

3) H₂O₂ 発生の検出および、H₂O₂ 暴露の表現型解析方法の確立

アクチンは、真核生物に多量に存在し球状アクチン(G-アクチン)が重合して、繊維状アクチン(F-アクチン)を形成する。F-アクチンからなるアクチンフィラメントは、細胞骨格の主要なメンバーであり、細胞の形態変化や運動に深く関わる。また、神経細胞では、神経突起先端にある成長円錐にアクチンフィラメントが集積する。最近、H₂O₂ によってアクチンが酸化され、アクチンの機能が制御されること示されている。酸化された酸化型アクチンは 2 量体アクチンの形成やアクチンフィラメントの脱重合を引き起こし、アポトーシスによる細胞死を決定づける酸化還元のセンサーとなることが報告されている。また、神経細胞では低分子 G タンパク質 Rac がアクチン制御を促し、成長円錐の形成に関与している。このシグナルに H₂O₂ が関与しており、H₂O₂ による酸化ストレスにより、成長円錐が崩壊する。以上のことから、アクチンの変化を指標にして、H₂O₂ の発生による細胞内の影響を解析することとした。さらに、酸化ストレス応答に重要な役割を果たす ATF5 の解析を通して、酸化ストレス応答検出系を構築した。具体的には神経細胞の一種 Neuro2a 細胞を用いて ATF5 の発現を抑制すると、神経突起の伸長が抑制された(*1-3)。この解析において、Neuro2a 細胞の分化方法の最適化、突起解析方法の確立、神経突起上に局在するシナプスの発現手法の確率を行った。この解析方法を用いて、Neuro2a 細胞の分化に伴う神経突起やアクチン骨格形成に対する H₂O₂ 暴

露の影響の解析を行うこととした。

H₂O₂ 暴露した Neuro2a 細胞においてアクチンを Actin-stain488 にて染色し、レーザー共焦点顕微鏡にて観察したところ、突起の伸長が阻害され、アクチン骨格が減少し、成長円錐の減少が見られた。また、アポトーシス様の核の凝集も見られた。これにより、H₂O₂ の影響を神経培養細胞において解析できると考えられる。

4) 神経細胞における H₂O₂ 発現系の構築

2で述べたように、蛍光タンパク質 mCherry 融合型 rgDAAO-M213V 変異体(rgDAAO^{MV})発現ベクターを Neuro2a 細胞に導入し、分化させた。分化誘導後、D 型メチオニン(D-Met)を添加し Amplex Red 法により H₂O₂ 発生を検出した(図 2)ところ、rgDAAO^{MV} 発現 Neuro2a 細胞(rgDAAO(+))において、D-Met の容量依存的に蛍光量が増加し、H₂O₂ の発生が検出された。一方、rgDAAO^{MV} 発現細胞に、D-Met を加えないと、H₂O₂ が発生しないことから、内在性の D 型アミノ酸はこの系には作用しないことがわかった。さらに、rgDAAO^{MV} を発現していない Neuro2a 細胞(mock)に D-Met を添加しても、H₂O₂ は発生しないことがわかった。以上のことから、より利用しやすい過酸化水素発生系が構築できたと考えられる。

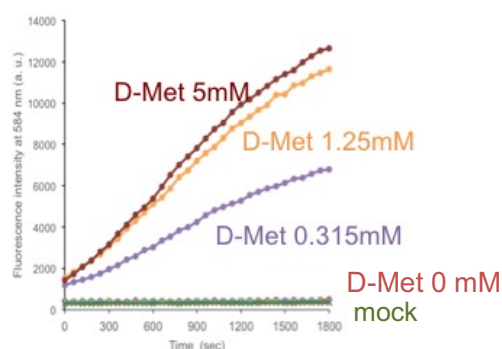


図 2 rgDAAO-M213V 発現 Neuro2a 細胞における H₂O₂ の発生。Amplex Red 法にて、H₂O₂ の発現を検出した。D-Met の容量依存的に H₂O₂ が発生することがわかった。

5) 構築した過酸化水素発生系を用いた細胞への影響解析

構築した新規細胞内過酸化水素発生系を用いて過酸化水素を解析した。D-Met を添加し H₂O₂ が発生すると、細胞周辺に局在する F-アクチンが消失し、成長円錐への F-アクチンの集積も減少していた(図 3)。

このとき、MAP2 陽性の神経突起の減少も見られることがわかった。神経突起の減少は起こるが、細胞体のシナプスの形成には影響を与えないことがわかった。そこで、アクチン結合タンパク質 Cofilin の過酸化水素による影響を解析した。Cofilin はアクチンの脱重合活性があり、H₂O₂ 暴露すると、凝集す

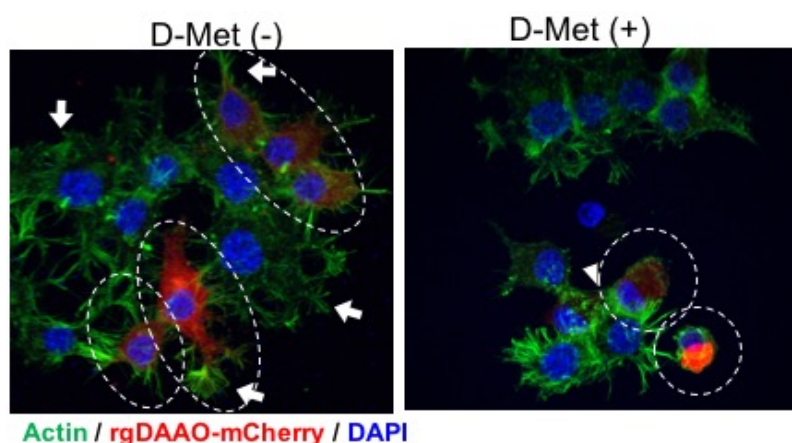


図 3 rgDAAO-M213V 変異体を発現した神経細胞 Neuro2a へ D-Met を添加し、F アクチンの形態を解析した。点線で示した細胞が rgDAAO-M213V-mCherry を導入した細胞であり、F-アクチンは成長円錐の細胞への影響を解析した。Neuro2a 細胞に mCherry 融合型 rgDAAO^{MV} 発現ベクターを導入し、分化誘導した。その後、D-Met を添加し、H₂O₂ 発生を誘導した。2~4 時間後、アクチン骨格を含む細胞への影響に集積し(矢印)、細胞周辺に局在して細胞骨格を形成している。D-Met を添加すると H₂O₂ が発生し、細胞骨格と成長円錐への F-アクチンの集積が減少した。また、核の凝集も観察された(矢頭)。

る。また神経細胞では、 H_2O_2 を暴露すると、Rod と言われるアクチンと Cofilin を含む棒状の凝集体ができ、アルツハイマー病の病態と関連が示唆されている。D-Met を加えた mCherry 融合型 rgDAAO^{MV} 発現 Neuro2a 細胞およびその周りの細胞で Cofilin の凝集体が増えていることが確認された(図 4)。

一方、この時 Cleaved Caspase3 と Cleaved PARP(ともにアポトーシスマーカー)の発現の上昇は見られなかった。また、LC3-II 陽性の小胞(オートファジ

ーマーカー)が増えていることは観察されなかった。したがって、今回用いた系では、細胞内からの過酸化水素が発生することにより、アポトーシスとオートファジーが亢進している結果は得られなかった。以上のことから、持続的に過酸化水素を発生して、暴露する系が構築できたと考えられる。この系は、細胞死に至るような細胞ダメージを与えてはいないが、過酸化水素は、細胞外に拡散し、周りの細胞にも過酸化水素を暴露した状況になることがわかった。

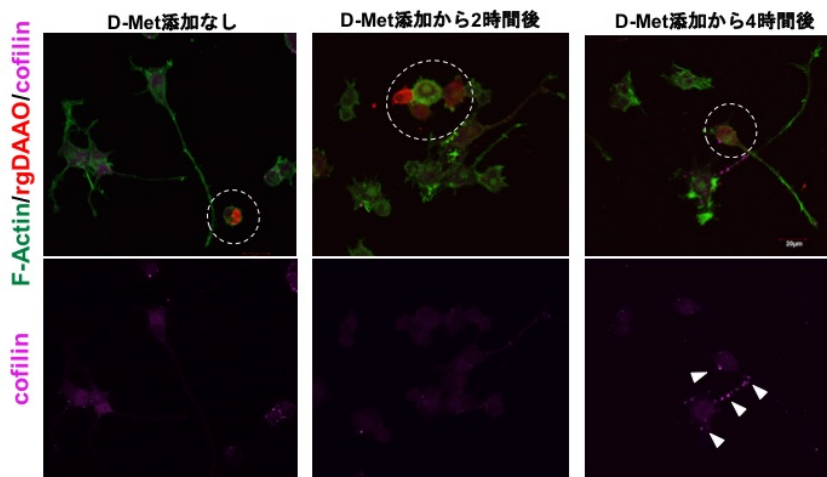


図 4 rgDAAO-M213V 変異体を発現した神経細胞 Neuro2a へ D-Met を添加し、2 時間後、4 時間後の cofilin の凝集を解析した。点線で示した細胞が rgDAAO-M213V-mCherry を導入した細胞であり、rgDAAO 導入細胞だけでなく、周りの細胞にも cofilin が凝集していることがわかった(矢頭)。

3. 研究評価及び今後の研究計画

本研究では、ROS の発生量や場所をコントロールすることができる新規 ROS 発生系を構築するために、赤色酵母 *Rhodotorula gracilis* 由来の D-amino acid oxidase (rgDAAO) の改変型と合成した非天然人工 D 型アミノ酸を用いて、細胞内 H_2O_2 発生系を構築することを目的とした。本研究において、A-2 グループでは改変型(変異型)rgDAAO を開発し、細胞内で安定的に発現させ H_2O_2 の発生を評価すること、また構築した H_2O_2 発生系を用いて ROS 発生による生体への影響を解析することとした。分子生物化学研究室(藤川ら)が作成した H_2O_2 発生系の改良のために、当研究室で以下のことを行った。

- ① rgDAAO 発現系の構築、および、安定的発現する細胞の探索
- ② 安定的発現し、内在性 D 型アミノ酸に影響を受けない rgDAAO 変異体の構築
- ③ H_2O_2 発生の検出および、 H_2O_2 暴露の表現型解析方法の確立
- ④ 神経細胞における H_2O_2 発生系の構築
- ⑤ 構築した過酸化水素発生系を用いた細胞への影響解析

以上の様に、rgDAAO を用いた新規な細胞内過酸化水素発生系を構築することができた。さらに、細胞内から過酸化水素が発生し、過酸化水素暴露の細胞への影響を解析することができた。この構築した新規な細胞内過酸化水素発生系では、アポトーシスやオートファジーなどの細胞死へと繋がる細胞ダメージは引き起こさず過酸化水素の影響を調べられることが明らかになった。当初の目標を 100% 達成した。

5. 研究成果の発表

国内学会発表

- 1) 齋藤 遼太, 梅村 真理子, 田籠 博太郎, 中野 春男, 高橋 滋, 高橋 勇二, ATF5 は神経細胞の樹状突起形成に重要である, BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回生化学会大会 合同大会), 2015 年 12 月, 神戸
- 2) 出口 侑希乃, 山田 基弘, 上坂 望, 勝俣 優利, 中野 春男, 梅村 真理子, 高橋 滋, 高橋 勇二, マウス腸管粘膜上皮の杯細胞の終末分化における ATF5 の関与, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月, 横浜
- 3) 山田 基弘, 出口 侑希乃, 上坂 望, 勝俣 優利, 中野 春男, 梅村 真理子, 高橋 滋, 高橋 勇二, マウス腸管の粘液産生細胞の分化におけるストレス応答因子 ATF5 の役割, 第 94 回日本生理学会大会, 2017 年 3 月, 浜松

A-2-4 ROS 検出・発生系の生体応用

森本 高子（東京薬科大学・生命科学部・分子神経科学研究室・准教授）

1. 当初の研究目標

活性酸素種(ROS)はレドックスシグナル分子として細胞増殖、細胞分化、細胞遊走、免疫応答など様々な生体の反応に関わっていると考えられ注目されている。他方、ROS は酸化ストレスとして働くことも考えられ、生体にとって有害な反応に関わって細胞死などを引き起こし、疾患発症と関わる事も知られている。このように、生体の機能に重要な働きを持っている ROS であるが、その機能や分子機構は不明な点が多い。これは内在的に ROS がどのように産生されているかその時空間的な情報が不足していること、また内在性の ROS シグナルとは独立して ROS を産生させる良い実験系が少ないことが原因の一つとして考えられる。従って、本研究では、ア) スマートタンパク質工学を用いて外来的な ROS の発生系を開発すること。イ) 開発した系を利用し細胞内および *in vivo* における ROS の役割やレドックス恒常性や疾患との関わりを明らかにすること。ウ) それらの情報と ROS 産生イメージングとを組み合わせることを目的とした。グループ内の4研究室が共同で取り組んだが、本研究室での当初の目標は、ROS 検出・発生系の生体応用であり、具体的には以下の四点である。

- 1) ショウジョウバエを用いて、ROS を内在性のものと区別して発生させることができる実験系を検討する。
- 2) 1) の実験系を用い、寿命や老化と ROS 発生量との関係を調べる。
- 3) ROS を特定の脳領域やグリア細胞などに発現させ、その時の感覚反応や学習・記憶等に対する影響を調べる。
- 4) ショウジョウバエにおいて ROS 産生イメージングを検討する。

これらの研究により、ショウジョウバエという個体内での、ROS のレドックスシグナル分子としての機能や、酸化ストレスの個体に対する影響、特に、老化と脳機能への関わりについて明らかにし、ROS の機能を明らかにする事により、健康で豊かな生活を可能にする研究を目標とする。(図 1 参照)

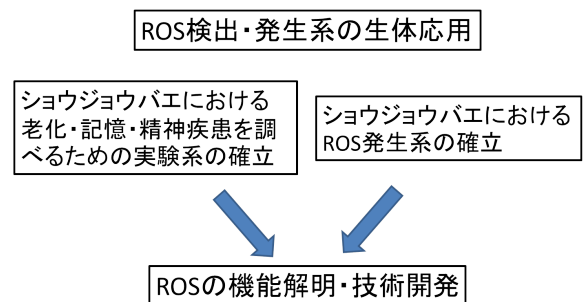


図 1. 研究の全体像

2. 研究成果の概要

1) ショウジョウバエに ROS を発現させるためのシステムの検討

ROS 発生系の生体応用のため、まず、ショウジョウバエに ROS を発現させるためのシステムの

検討を行った。

ショウジョウバエに外来の蛋白質を発現させるためのシステムとしては、Gal4-UAS システムとが広く使われている。このシステムは、酵母由来転写因子 GAL4 と GAL4 結合制御配列 UAS を組み合わせ用いる。このシステムでは、UAS 配列の下流に目的遺伝子を持つトランスジェニックハエ (UAS 系統) と、組織特異的に Gal4 を発現する系統を交配させるだけで、目的の部位に目的の蛋白質を発現させることができる。本研究では、発現させる蛋白質として、ROS の一種である H_2O_2 を産生させる酵素である赤色酵母由来の D-アミノ酸酸化酵素 (DAAO) を基本として、スマート蛋白質工学を用いて改変した DAAO を用いる。基質に人工的 D-アミノ酸を用いることにより、内在的な ROS 産生システムとは独立した ROS 産生系の生体内導入を目指した。この実現には、スマート蛋白質工学の手法が欠かせない。小林・藤川らが、酵素の改変と基質の合成を行う。本研究では、それらを生体に導入し、どのような組み合わせが、最も効率よく ROS を産生させることができるのか、評価する。そのための実験系としては、簡便に細胞死の定量ができるショウジョウバエ成虫の目の実験系を用いる。Gal4-UAS 法を用いて、光受容器細胞に DAAO およびその改変蛋白質を発現させる。基質は、えさに混ぜる方式で摂取させることができる。そして、光学顕微鏡観察をまず行うことで、簡便に目の細胞の変異を調べることができる。まず、UAS 系統の作成のためのコンストラクトプラスミド作りを行い、野生型 DAAO 発現用のプラスミドを作成した。

2) ショウジョウバエ ROS 発現系の効率の検討

次に、作成したプラスミドを用いて UAS 配列の下流に野生型 DAAO の遺伝子配列をもつトランスジェニックハエを作成した (外注)。次に、簡便に細胞死の定量ができるショウジョウバエ成虫の目の実験系を用い、ROS の発生確認を行った。GAL4-UAS 法を用いて光受容器細胞に DAAO を発現させ、餌に D-アミノ酸を添加した個体と添加しなかった個体とで比較した。目が小さくなる等のマクロなレベルでの変化は見られなかったが、神経細胞レベルで観察すると、D-アミノ酸の添加により、神経突起が細くなっている様子が観察された (図 2)。

さらに、筋肉細胞に DAAO を発現させたところ、幼虫の運動性や成虫の運動性に有意差は見られないものの、平均値の差異や動き方の違いなどが見られた。以上、組織特異的 ROS 産生トランスジェニックショウジョウバエの作製に成功した。

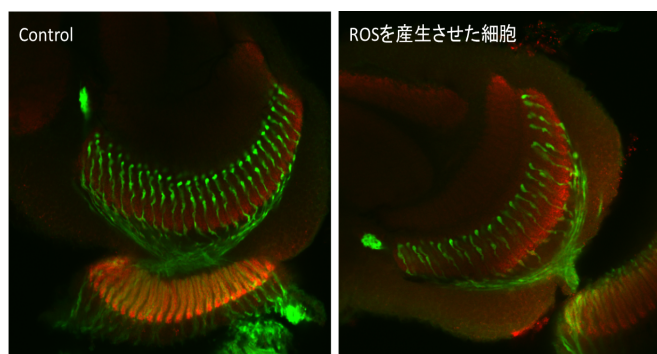


図2. 目の細胞に ROS を産生させた

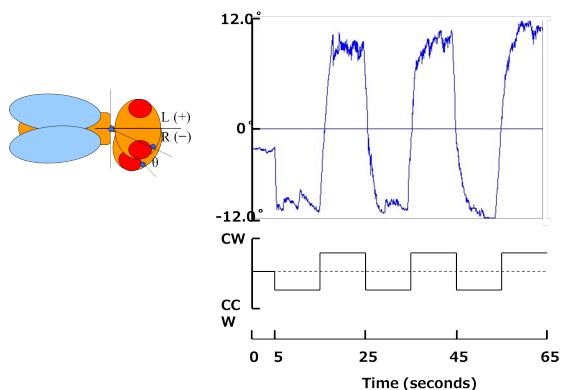


図3. 視運動反応

3) 老化と脳機能および脳疾患における ROS の機能解析:種々の行動実験系の確立

ROS は生体内において様々な機能に関わっていると考えられるが、本研究では、まず、老化と脳機能および脳疾患に注目して研究を行う。ROS による酸化ストレスは、細胞の老化を引き起こすと考えられているが、細胞の老化と脳機能の低下の関係はよくわからない点も多い。そこで、本研究はショウジョウバエの特定の脳部位に DAAO を発現させ、脳機能の変化について調べていくこととし、そのため種々の行動実験系を確立した。まず、調べる脳機能は、老化による感覚情報処理機能の変化を調べるため、視覚情報を元にした動く物体の方向を検知する反応である視運動反応と、老化による学習の変化を調べるため、報酬と色を組み合わせた連合学習に注目した。まず、視運動反応を定量化する実験系を確立し、原著論文 1 *において報告した(図 3)。ついで、異なる系統間で視運動反応を比較・検討する事ができるように方法を確立した。また、この視運動反応に関わる神経系の特性についても調べ、視野闘争を可能にする特性があることも報告した(*2)。更に、老化により失われる機能として注目される学習・記憶についても検討できる実験系を構築した。それは、報酬 (Sucrose) と色を組み合わせ、連合させる学習が成立するかどうかを判定するシステムである。また、ROS が様々な脳疾患、精神疾患と関与する可能性も考えられる。そこで、本研究では、さらに、統合失調症などの検査に用いられているプレパルスインヒビション (PPI) の実験系に注目して確立することにした。PPI は、パルス音などによる驚愕反応が直前に存在する弱いパルス音により抑制される現象である。この現象には感覚刺激に対するゲイン調節機構が関わっていると考えられている。これまで、ショウジョウバエで、PPI が起こる事が報告されていなかったが、我々は、幼虫の驚愕反応において PPI が起こることを見出した (*11、*16、および図 4)。さらに、幼虫の意思決定を調べる実験系も確立できた (*3)。

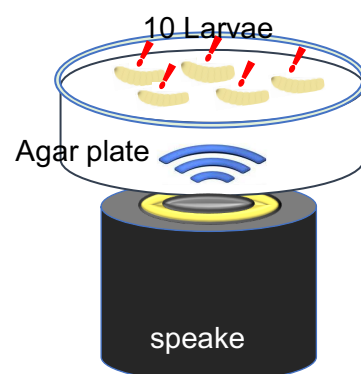


図4. 幼虫のPPI

4) 確立した行動実験系に対するROS産生の影響

まず、全ての神経細胞に野生型 DAAO を発現させ、D-アミノ酸を添加したエサで飼育したショウジョウバエ幼虫を用いて、PPI 現象について調べた。これまでのところ有意差は見られなかったが、神経細胞に野生型 DAAO を発現させ、D-アミノ酸を添加したエサで飼育したショウジョウバエ幼虫において、PPI の低下が見られた。また、筋肉細胞に DAAO を発現させた時と同様に、神経細胞に発現させた場合も、蠕動運動のパターンに少し変化が見られた。さらに、全細胞に DAAO を発現させ、D-アミノ酸を添加したエサで飼育したショウジョウバエの生育速度を調べたところ、生育の遅れが観察できた。

次に、我々が視運動反応に関わっている中枢脳領域として注目する中心複合体の部分に、野生型 DAAO を発現させ、D-アミノ酸を添加したエサで飼育したショウジョウバエ成虫の視運動反応

を測定した。しかし、これまでのところ、有意な変化は見られていない。詳細な解析は今後の課題であるが、局所的に ROS 発生させて行動に対する影響を実験するシステムが確立した。

3. 研究評価及び今後の研究計画

3年間で、以下の点が達成できたことが、特に評価できる。すなわち、

1. DAAO を生体内で発現する方法に使用できるトランスジェニックバエが作成できたこと。
2. 脳機能を測定できる行動実験を立ち上げることができたこと(*1, *3, *11, *16)である。また、大きな変化は見られなかったが、これらの行動実験系を用いて、DAAO を生体内で発現させ、ROS を発生させた影響を調べることができた。**従って、当初の目標は 100%達成できた。**

しかし、本研究において、DAAO 発現の個体への影響が弱いながら見られたものの、ROS 産生と個体機能への影響の明確な因果関係を明らかにすることは出来なかった。この問題に関しては、ROS 産生レベルを定量できる方法を適用し、生体内における ROS 産生量と機能の変化との対応関係を詳細に調べることで、克服していけるものと考えている。

今後は、以下のような定量的 ROS 検出法を用いて、生体内での ROS 産生の効率を定量化し、ROS 産生効率の条件を明確にし、その条件下で、生体の機能を見ていくことを目指す。

DAAO は基質として D-アミノ酸を要求する。野生型 DAAO の良い基質となるのは D-フェニルアラニン(Phe)である。ショウジョウバエでは、D-Phe を生体内で用いているという報告はないので、D-Phe を投与することで、DAAO を効率良く働かせ、ROS を産生することができると期待できる。まず、ショウジョウバエ幼虫および成虫の筋肉細胞に野生型 DAAO を発現させ、D-Phe を与えた時と与えないときとで、ROS の産生を定量する。まずは、筋肉細胞を露出させ急性に D-Phe を与えることで ROS を産生させ、ROS と反応すると蛍光変化が起こる試薬を用いて定量する。この方法により、ショウジョウバエの生体内で、ROS がどの程度産生されているのか、効率良い産生条件について検討する。スマート蛋白質工学を用いて、藤川・小林・梅村が見出したさらに効率の良い改変型 DAAO を発現させる事も検討する。このような研究を通し、以下のような事が期待できる。すなわち、ショウジョウバエという個体内での、ROS のレドックスシグナル分子としての機能や、酸化ストレスの個体に対する影響、老化と脳機能への関わりについて明らかにすることが期待できる。特に、高齢化社会において問題になっている痴呆、統合失調症などの精神疾患の原因に、ROS シグナルが関与しているかを分子レベルで明らかにすることが期待できる。また、ROS 産生による脳機能の変化が明らかになれば、その変化に対抗する薬物の検討などを通して、有効な薬物の同定に役立つ可能性が期待できる。

4. 研究成果の発表

雑誌論文

1. *Suzuki, Y., Ikeda, H., Miyamoto, T., Miyakawa, H., Seki, Y., Aonishi, T., Morimoto, T. Noise-robust recognition of wide-field motion direction and the underlying neural mechanisms in

Drosophila melanogaster. Sci Rep. 5:10253. doi: 10.1038/srep10253. (2015)

2. *中本竣, 鈴木力憲, 森本高子, 宮川博義, 青西亨, ショウジョウバエにおける視野闘争の理論研究 視覚系の安定構造解析, 電子情報通信学会技術研究報告, 信学技報, vol. 115, No. 111, pp. 41-46 (2015)
3. *Koseki, N., Mori, S., Suzuki, S., Tonooka, Y., Kosugi, S., Miyakawa, H., Morimoto, T. Individual differences in sensory responses influence decision making by *Drosophila melanogaster* larvae on exposure to contradictory cues. *J. Neurogenet.* 30:288-296. (2016)

総説・著書など

4. 鈴木力憲, 森本高子, ショウジョウバエにおけるノイズロバストな動き検知メカニズム: 実験と理論からのアプローチ, 生物物理, vol. 56, No. 2, pp. 102-105 (2016)

国際会議発表

5. Yoshinori Suzuki, Toru Aonishi, Yoichi Seki, Hiroyoshi Miyakawa and Takako Morimoto, Robust encoding the outside world in a tiny insect brain: neural basis of robust motion perception in *Drosophila*, Neuroethology: Behavior, Evolution & Neurobiology (Gordon Research Conference), Italy (2015,6-7)

国内学会発表

6. 中本竣, 鈴木力憲, 森本高子, 宮川博義, 青西亨, ショウジョウバエにおける視野闘争の理論研究 視覚系の安定構造解析, 電子情報通信学会ニューロコンピューティング研究会, 沖縄科学技術大学院大学 (2015,6)
7. 鈴木力憲, 池田英彬, 関洋一, 宮川博義, 青西亨, 森本高子. ショウジョウバエにおけるノイズ頑強な動き検知の神経基盤, 第25回日本神経回路学会, 電気通信大学 (2015,9)
8. 中本竣, 鈴木力憲, 森本高子, 宮川博義, 青西亨, ショウジョウバエにおける視野闘争の理論研究, 第25回日本神経回路学会, 電気通信大学 (2015,9)
9. Okuri, K., Sugimoto, K., Innami, K., Aonishi, T., Miyakawa, H., Morimoto, T. Development of Arduino-based device measuring optomotor response to elucidate neural mechanisms underlying complex visual perception in *Drosophila*. 第39回日本神経化学大会、2016/7, 横浜
10. Sugimoto, K., Suzuki, Y., Aonishi, T., Morimoto T. A study on Dopaminergic modulation in optomotor response of *Drosophila*. 第39回日本神経化学大会、2016/7, 横浜
11. *森本高子, 松本悠太郎, 鈴木未来, 清水彰, 宮川博義. ショウジョウバエを用いた精神疾患モデル開発とその応用 第59回神経化学会、2016/9、福岡
12. 森本高子, ショウジョウバエ *CenG1A* の機能解析: 精神疾患モデルは可能か. 第9回分子高次脳機能研究会、2016/8, 名古屋

13. Okuri, K., Sugimoto K., Yamazaki S., Yamauchi J., Morimoto T. Dose *Drosophila* Perceive Visual Illusions? -1. Subjective Contours –第 40 回 日本神経科学学会、 2017/7, 幕張
14. Sugimoto K., Kuraishi A., Okuri K., Aonishi T., Yamauchi J., Morimoto T. Does *Drosophila* Perceive Visual Illusions? - II. Waterfall Illusion -第 40 回 日本神経科学学会、 2017/7, 幕張
15. Shibuya T., Seki Y., Yamauchi J., Morimoto T. Elucidating the neural basis of behavior and emotion elicited by natural aromatic substances using *Drosophila* larvae.第 40 回 日本神経科学学会、 2017/7, 幕張
16. *Morimoto T., Matsumoto Y., Takei K., Shimizu K., Yamauchi J. Prepulse inhibition in *Drosophila* reveals possible candidate genes that have functions in sensory gating and relate to the psychiatric disorder. 第 60 回 日本神経化学会 2017/9, 仙台

A-3 免疫アジュバント開発

大野 尚仁(東京薬科大学・薬学部・免疫学教室・教授)

1. 当初の研究目標

A-3 では、高機能化酵素の応用の一つとして *Laccase* をもちいた免疫アジュバント開発を行う。

免疫システムの一つとして自然免疫システムがある。細菌内毒素(LPS)の受容体が *Toll-like receptor 4* であることが解明されたことに端を発し、様々な自然免疫活性化物質ならびにその受容体が見出されてきた。自然免疫活性化物質の由来は多様であり、細菌、ウイルス、真菌などの病原微生物はもとより、体内でストレス応答の結果として生じた物質も含まれている。薬用植物は古くから漢方処方として使用されるほか、機能性食品等としてもヒトの健康増進のために用いられてきた。中でも *Agaricus* は薬用茸として知られており、代替療法に利用され、ガン予防や、肝臓保護作用などの作用が報告されている。免疫調節作用を有する主な有効成分に β -glucan が報告されており、茸由来の代表的な β -glucan 製剤としてカワラタケのクレスチンやシイタケのレンチナン、スエヒロタケのジソフィランがある。一方で、茸には β -glucan 以外にも様々な有効成分があると考えられている。Polyphenol 類は植物由来の代表的な機能性分子であり多くの研究がなされてきた。高等植物の木部から見出される天然高分子である Lignin は、植物の生合成経路であるシキミ酸経路にて合成される Polyphenol の重合体であるが、複雑な構造であるために、構造の細部や機能解析は未だ不明な点が多い。また、天然中からリグニンを抽出、精製することは困難であるため、当教室では Polyphenol 酸化酵素の一種である horse-radish peroxidase (HRP)と過酸化水素を用いて単量体 Polyphenol を酸化重合し、Lignin 様の高分子 Polyphenol 重合体を合成し、Lignin の免疫系への影響を検討してきた。

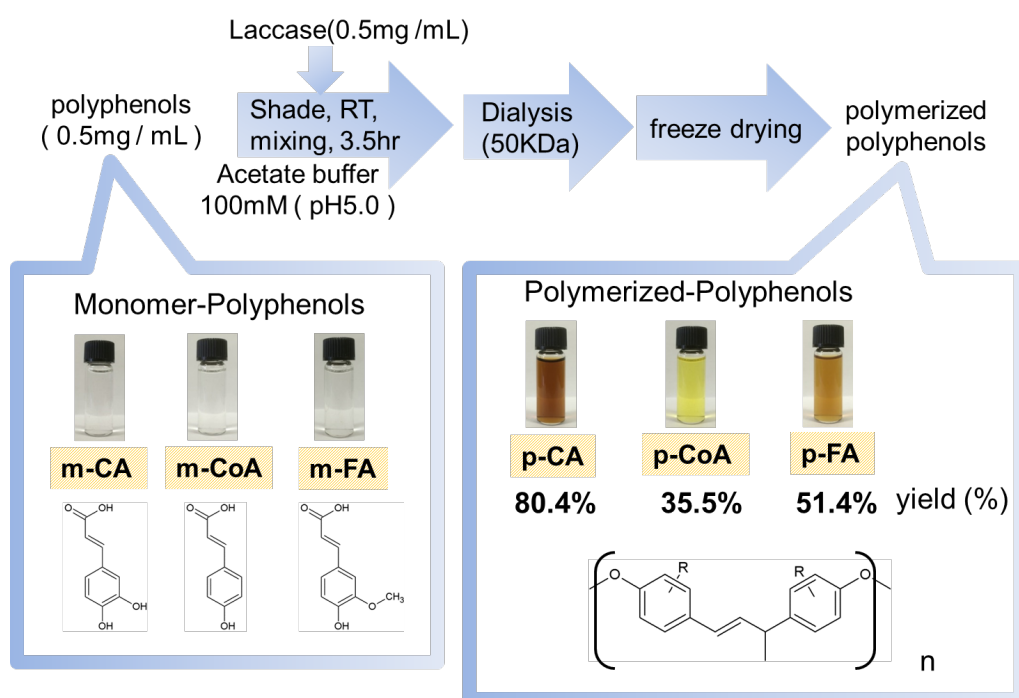
Phenol 酸化酵素は機能をもとに命名されており、酵素学的には複数のものを含んでいる。*Laccase* は銅を含有し、酸化反応を触媒する酵素である。細菌や真菌類、植物から昆虫に至るまで *Laccase* を有しており、病原性真菌である *C. neoformans* はメラニンを重合することでヒトの免疫系から回避している。*C. neoformans* の産生する重合メラニンはT細胞やマクロファージの機能を抑制すると考えられており、その機構として TNF- α の産生抑制に伴う、免疫系の制御不全が起きることが知られている。これらのことから、*Laccase* を用いて作成した酸化重合体は免疫系への影響を有していることが考えられる。また、真菌類における Lignin の合成には *Laccase* の寄与が大きいことから *Laccase* を用いて重合した高分子 Polyphenol の研究を行うことは、薬用茸の新規有効成分の追求や、免疫系の調節作用を有する新規医薬品の開発に有益であると考えられる。そこで本研究では、Phenylpropanoid 類の重合反応の触媒に *Laccase* を用い、高分子 Polyphenol を合成し、重合反応における *Laccase* の性質や、合成された重合体の生理活性作用とそのメカニズムを検討し、より安全性の高い新規免疫アジュバントの開発を行う。

2. 研究成果の概要

上記の観点から、Laccaseを用いて、種々の代表的な Phenylpropanoid である Caffeic Acid (CA), trans-Ferulic Acid (FA), trans-p-Coumaric Acid (CoA)を酸化重合し、Laccase 触媒高分子 Polyphenol を合成した (*4) . まず白色腐朽菌(*Trametes sp.*)由来の Laccase を使用して検討をおこなった。その成果の概要を以下に示す。

1) 白色腐朽菌(*Trametes sp.*)由来 Laccase を用いた Phenylpropanoid の重合反応

各々の Phenylpropanoid 4.5mg と白色腐朽菌(*Trametes sp.*)由来 Laccase 0.5mg を 100M 酢酸緩衝液 10mL (pH5.0)中で混和し、室温、遮光、開放系条件下で攪拌し、反応を進行させた。反応液は褐変し色調変化が見られたことから Laccase は CA, FA, CoA の重合反応を進行させることが明らかとなった。



2) Phenylpropanoid 重合反応における Laccase の性質

CA, FA, CoA の重合反応における Laccase の至適温度と至適 pH を求めた。

① 重合反応の至適 pH

Phenylpropanoid 類重合反応における白色腐朽菌(*Trametes sp.*)由来 Laccase の至適 pH を求めるために、pH3~5 の酢酸緩衝液に溶解した Laccase 0.5mg/mL (20 μ L)と各 Phenylpropanoid 0.5mg/mL (180 μ L) を室温、遮光、開放系条件下で混和、振とうし、重合反応を行った。反応開始から 20 分後の反応溶液の吸

光度値(405nm)を反応性の指標にした。

これにより CA, FA, CoA 重合反応における Laccase の至適 pH はいずれも 5.0 であることが明らかとなった。

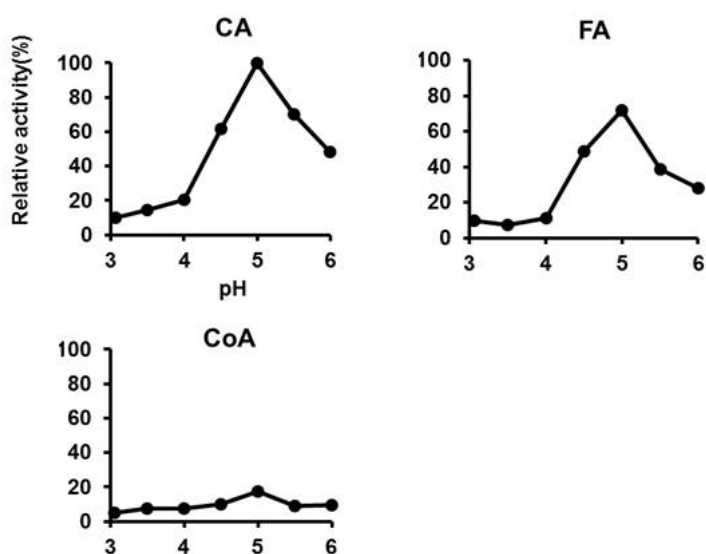


Fig. 1 Effect of pH on the polyphenol polymerization by laccase.

② 重合反応の至適温度

Phenylpropanoid 類重合反応における白色腐朽菌(*Trametes sp.*)由来 Laccase の至適温度を求めするために、pH5 の酢酸緩衝液に溶解した Laccase 0.5mg/mL (9mL) と各 Phenylpropanoid 0.5mg/mL (1mL) を遮光、開放系条件下で混和、振とうし、20°C ~ 90°C で 10°C ごとに加温した状態で重合反応を行った。反応開始から 20 分後の反応溶液の吸光度値(405nm)を測定した。その結果、30 ~ 60°C 付近で重合反応性が高かった。

これにより CA は 40°C, FA は 70°C, CoA は 50°C 付近において最も重合することが明らかとなった。

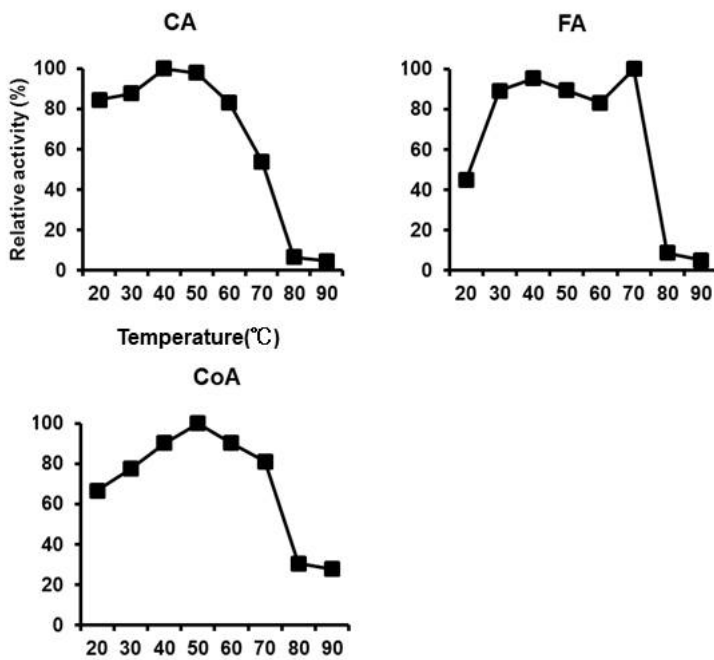


Fig. 2 Effect of reaction temperature on the polyphenol polymerization by laccase.

③ Laccase の基質特異性

pH5 に調整した酢酸緩衝液中に溶解したで白色腐朽菌(*Trametes sp.*)由来 Laccase 0.5mg/mL 20 μ L と各フェニルプロパノイド 0.5mg/mL 180 μ L を室温、遮光、開放系条件下で混和、攪拌し、重合反応を行った。反応開始から20分後の吸光度の値を測定したところ、吸光度はCAが最も高く、CoAが最も低かった。これらのことから、Laccase 触媒重合反応は CA が最も重合反応性が高く、CoA が最も重合反応性が低いことが明らかとなった。

3) 白色腐朽菌(*Trametes sp.*)由来 Laccase 触媒重合 Polyphenol の免疫系への作用

上記の反応で精製した白色腐朽菌(*Trametes sp.*)由来 Laccase 触媒高分子 Polyphenol の生理活性作用を検討するため、MTT assay を利用しマウス脾臓細胞に対するミトジェン活性を測定した。

① Laccase 触媒高分子 Polyphenol の合成

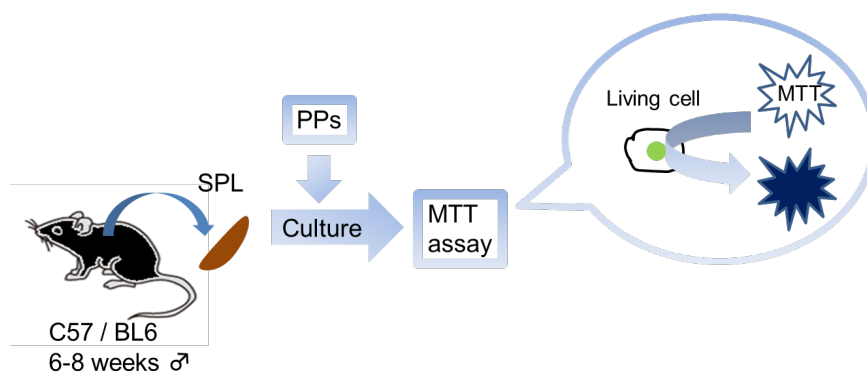
100mM 酢酸緩衝液に溶解させた各 Phenylpropanoid 類 0.5mg/mL (180mL)と白色腐朽菌(*Trametes sp.*)由来 Laccase 0.5mg/mL (20mL)を室温、遮光、開放系条件下で混和、攪拌し、重合反応を行った。3.5 時間後、煮沸し反応を停止させた。透析膜 (50kDa)を用いて、低分子画分を除去した。透析内液を凍結乾燥し、粉末状の Laccase 触媒高分子 Polyphenol を得た。重合前の Phenylpropanoid 類の重量と凍結乾燥後の試料の重量を比較し、収量を求めた。収量は CA が 80.4%、FA が 51.4%、CoA が 35.5%となった。凍結乾燥後の Laccase 触媒高分子 Polyphenol と、各前駆体である

Phenylpropanoid 類を DMSO 中に 20mg/mL に調製し, 生理食塩水を用いて 1mg/mL になるよう調整した. また, 作製した高分子 Polyphenol 中に残存する Laccase は認められなかった.

Table. 1 Elemental analysis data of polyphenols.

(%)	C(carbon)	H(hydrogen)	N(nitrogen)
m-CA	59.68	4.50	0.18
m-FA	61.67	5.10	0.15
m-CoA	65.64	4.85	0.15
p-CA	54.03	3.85	0.17
p-FA	60.10	4.69	0.17
p-CoA	64.41	4.57	0.19

④ MTT assay



オスマウス(6から8週齢 C57BL/6)から得た脾細胞と白色腐朽菌(*Trametes sp.*)由来 Laccase 触媒高分子 Polyphenol, または, 各原料を共培養し, 44 時間後 MTT 試薬を含む Medium に置換し 4 時間培養した後, DMSO で還元されたホルマザンを可溶化し, 吸光度を測定した. 生理食塩水と共培養した well の吸光度を 100%として細胞の増殖率を算出した. これらの結果から, 白色腐朽菌(*Trametes sp.*)由来 Laccase 触媒高分子 Polyphenol は脾細胞の増殖作用を有することが明らかとなった(*6).

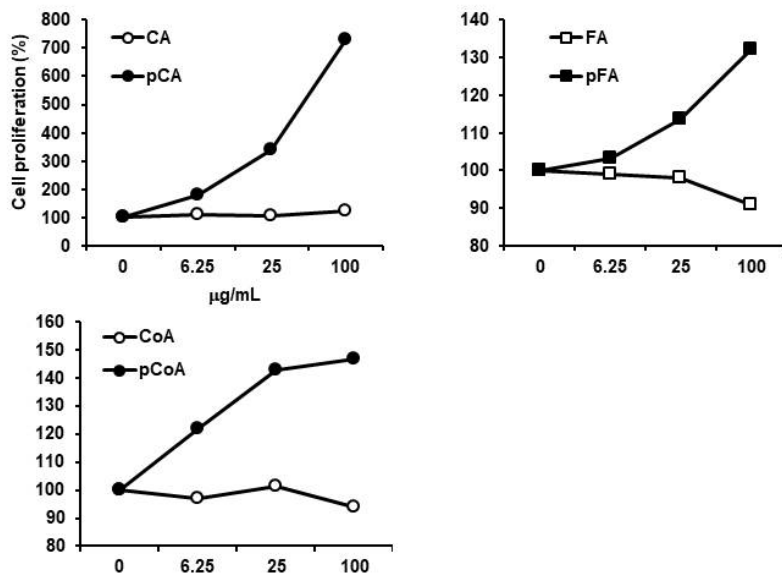


Fig. 3 Proliferation of splenocytes by laccase polymerized polyphenols.

4) Phenylpropanoid 重合反応における祖先型耐熱化手法で開発した mutant-Laccase の性質

A.brasiliensis polyphenol 重合体の免疫学的解析を詳細に行うため、単一の重合前駆体と酵素を用いることとし、*A. brasiliensis* の Laccase のリコンビナントタンパク質を開発することとした。*A.brasiliensis* の Laccase は異種発現系において安定性が低く *A.brasiliensis* laccase を得るために試行錯誤を繰り返した。そこで、山岸らによって見出されたコモノートと名付けた地球における全生物共通の祖先生物の進化系統解析をもとに共同研究者の赤沼らは遺伝子工学的手法を用いることによって復元した祖先タンパク質の一部の配列を *Agaricus brasiliensis* 由来ラッカーゼ Lac2a に導入し、祖先改変型を作製、ピキア酵母に異種発現することに成功した。そこで、この Laccase 祖先型改変体 mutLac2a を用いて重合ポリフェノールを創製した (*7)。祖先型改変体 mutLac2a を用いて Caffeic Acid (CA), trans-Ferulic Acid (FA), ならびに trans-Coumaric Acid(CoA)を酸化重合し、polyphenol 重合における Laccase 触媒反応の至適条件 (pH, 温度), 基質特異性を解析した。さらに、創製した Laccase 祖先型改変体 mutLac2a 触媒重合 polyphenol の免疫系に与える影響を解析した。その成果の概要を以下に示す。

① Laccase 祖先型改変体 mutLac2a 重合反応の至適 pH

重合反応の至適 pH を求めるために pH5.5~8.5 のリン酸緩衝液に溶解した Laccase 祖先型改変体 mutLac2aL 5µg/mL (25µL)と各 Phenylpropanoid 0.9mg/mL (100µL), CuSO₄1.2mM(25µL)を混和、振とうし、重合反応を行った。重合反応は反応開始から 20 分後の反応溶液の吸光度値(630nm)を指標にした。解析の結果、CA 重合では pH 7.5, FA では pH 8.0 が至適 pH であった。CoA 重合反応においてはいずれの pH でも十分な反応は得られず、CoA の重合反応は基質にならないことが明らかとなった。

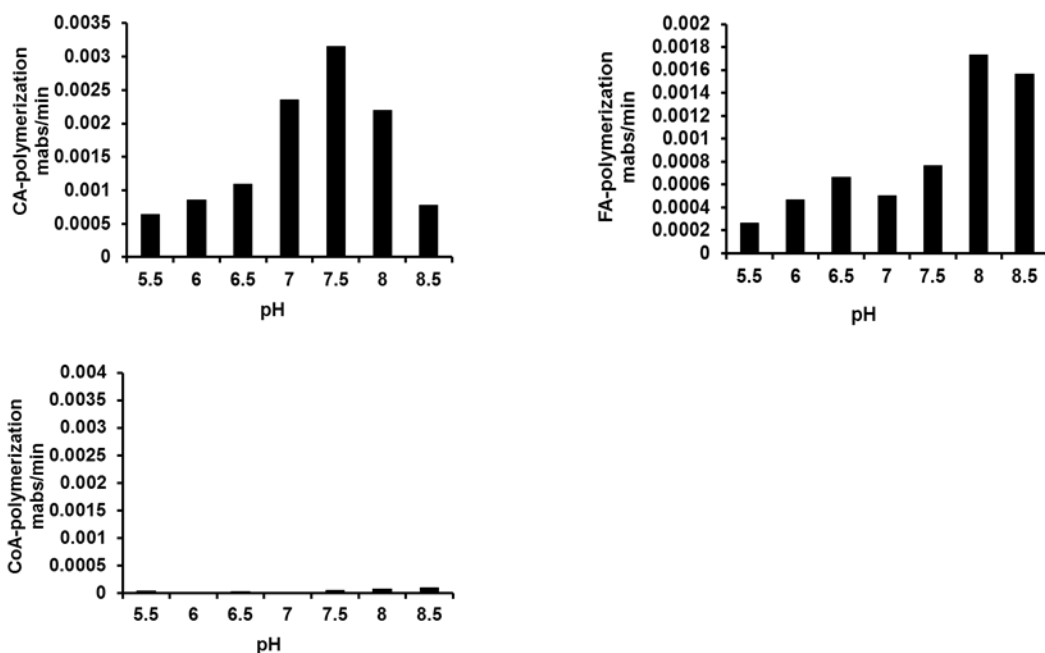


Fig. 1. optimal pH of mutLac2a catalyzed polymerization polyphenols.

② Laccase 祖先型改変体 mutLac2a の重合反応の至適温度

重合反応の至適温度を求めるために 0.15mM CuSO₄含有, pH7.5 または 8.0 のリン酸緩衝液に溶解した Laccase 祖先型改変体 mutLac2a 5μg/mL (1mL)と各 Phenylpropanoid 0.5mg/mL (9mL)を遮光, 開放系条件下で混和, 振とうし, 20°C~90°Cで 10°Cごとに加温した状態で重合反応を行った. 反応開始から 20分後の反応溶液の吸光度値(630nm)を測定した. 解析の結果, CA 重合では 80°C, FA では pH 90°Cが至適温度であった. 一般的に祖先型にすることによって熱安定性が増すことが想定されており, 天然の Laccase では 40~70°Cの温度域で重合反応が進行していた結果と比較すると mutLac2a は祖先型改変によって, 熱安定性が増したことが明らかとなった (*1). また, CoA 重合反応においてはいずれの温度でも十分な反応は得られず, CoA の重合反応は基質にならないことが明らかとなった.

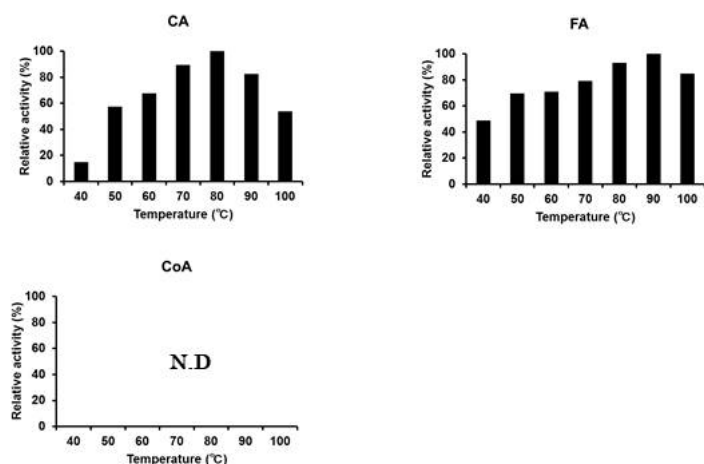


Fig. 2. optimal temperature of mutLac2a catalyzed polymerization polyphenols.

5) Laccase 祖先型改変体 mutLac2a 触媒重合 polyphenol の合成

上記の解析より得られた Laccase 祖先型改変体 mutLac2 の phenylpropanoid 類重合反応における性質のデータより, Laccase 祖先型改変体 mutLac2 触媒重合 polyphenol の試作ロットを調製した(Fig. 3).

各 Phenylpropanoid 67.5 mg と Laccase 祖先型改変体 mutLac2 62.5 μg を 0.15mM CuSO₄ 含有, 100M リン酸緩衝液 100 mL (pH 7.5~8.0) 中で混和し, 室温, 遮光, 開放系条件下で攪拌し, 反応を進行させた. 反応液は褐変し色調変化現象の有無から Laccase は CA, FA の重合反応を進行させるが, CoA の重合反応は触媒しないことが明らかとなった(Fig. 4). 反応液は未反応の低分子画分を除去するため, 2 日間透析 (50kDa) した. 透析内液を凍結乾燥し Laccase 祖先型改変体 mutLac2 触媒重合 polyphenol 粉末を得た.

また, 反応液の褐変化の指標として吸光度(630nm)を測定し, 凍結乾燥後粉末の収率と合わせて, mutant-Laccase の基質特異性の結果とした. Fig. 5 より反応性は CA, FA, CoA の順に高く, monophenol である CoA の反応はほとんど起こらないことが明らかとなった(*5). 天然型の Laccase では o-diphenol の酸化反応を触媒し, monophenol では重合反応を起こさないことが報告されており, Laccase 祖先型改変体 mutLac2 の基質特異性も天然型と同様であることが明らかとなった. 重合前の単量体と反応後の重合体の構造の変化を紫外可視吸光スペクトルを用いて解析した結果, 重合前後の吸収スペクトルを比較すると, 重合後に UV 領域に大きな吸収領域が現れた(Fig. 6). 重合ポリフェノールの一種であるメラニンやリグニンには UV 吸収作用があり, UV による DNA 損傷保護作用が報告されていることから, 合成した Laccase 祖先型改変体 mutLac2 触媒重合 polyphenol にも同様の作用があることが示唆された. また, 重合後, 可視部領域に吸収波長が現れ, 褐変化による可視化と一致していることも明らかとなった.

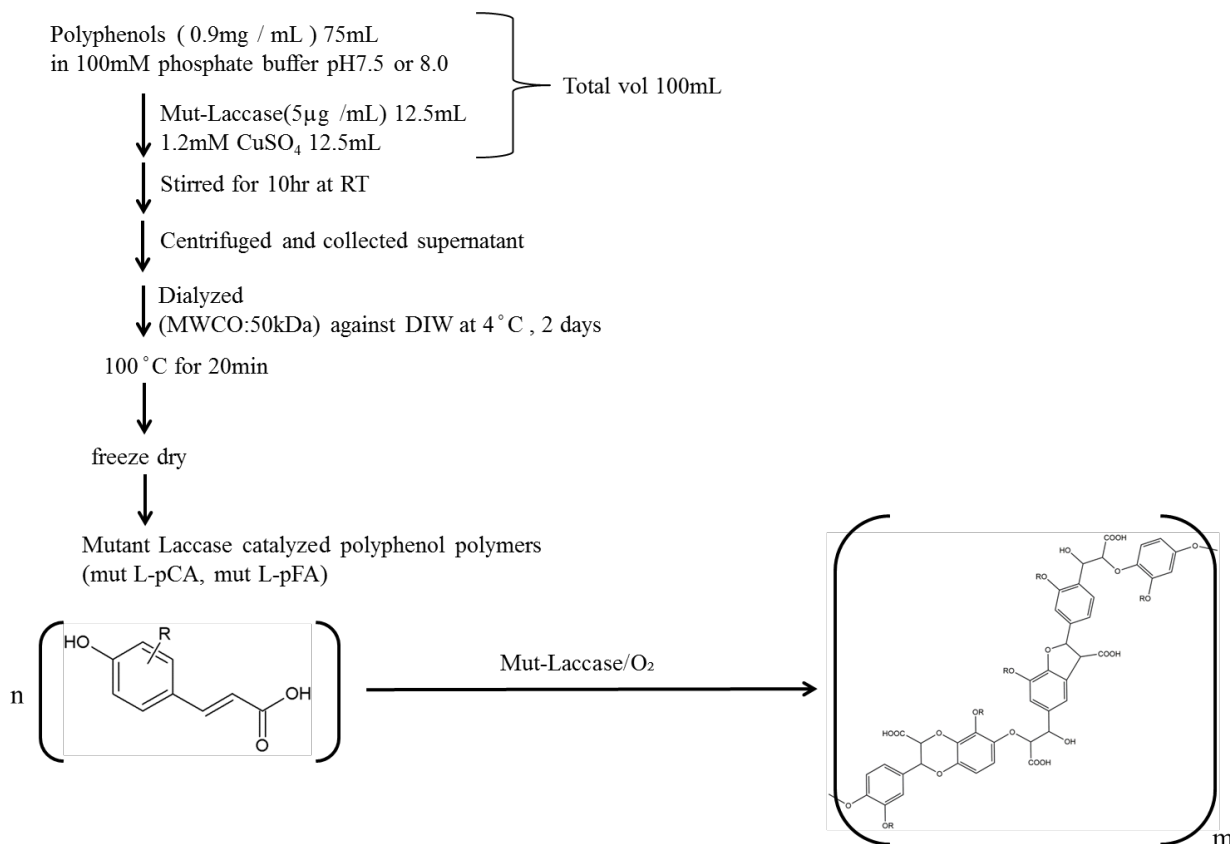


Fig.3. Preparation of mutant Laccase catalyzed polyphenol polymers.

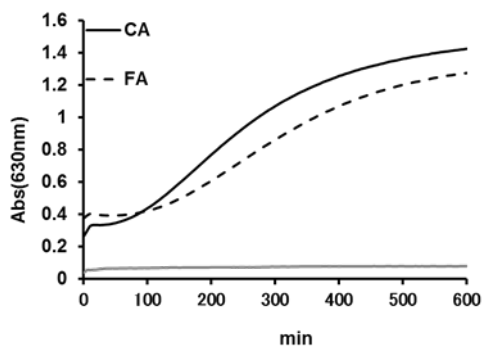


Fig. 4. Polymerization of phenolic compounds.

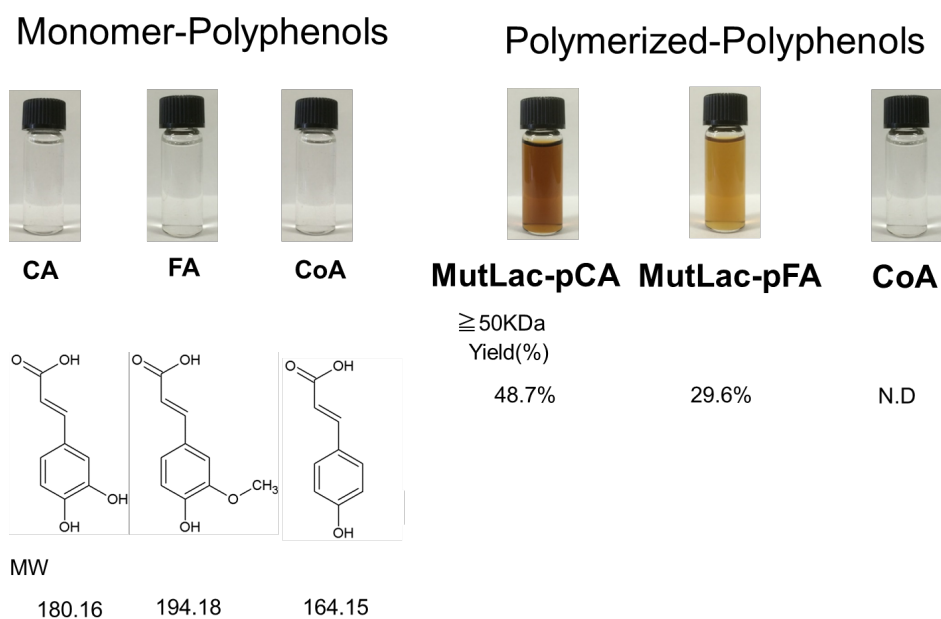


Fig. 5. Polymerization of a *o*-diphenol (CA), its analogue (FA) and a monophenol (CoA).

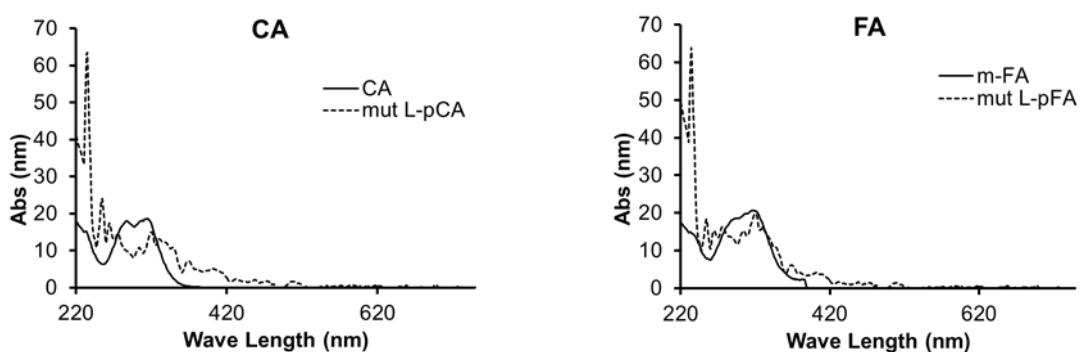


Fig. 6. Ultraviolet-visible absorption spectrum of polyphenol polymer and precursor.

6) Laccase 祖先型改变体 mutLac2 触媒重合 Polyphenol の免疫系への作用

上記で作成した Laccase 祖先型改変体 mutLac2 触媒高分子 Polyphenol の生理活性作用を検討するため、マウスの脾臓細胞系に添加し、培養上清に産生されるサイトカインを測定した。以下、CA を基質とした場合 mut-LpCA、FA を基質とした場合 mut-LpFA と呼ぶ。また、Horseradish peroxidase(H-)や天然型の Laccase(L-)を用いて作成した重合ポリフェノールとの構造上の相違点を明確化するために、ヒト IgG 画分製剤 (IVIG) を用いた競合 ELISA 法を用いて免疫化学的に解析した。

6~10 週齢の C57BL/6 オスマウスから得た脾臓細胞を $4 \times 10^6/\text{mL}$ に調整し、各濃度に調製した Laccase 祖先型改変体 mutLac2 触媒重合 Polyphenol を添加培養し、48 時間後、上清に産生されたサイトカインを ELISA 法によって測定した。その結果、mut-LpCA はマウス脾臓細胞の IL-6 と TNF- α (Fig. 7 AB, pCA100) の産生を誘導した、一方 mut-LpFA はマウス脾臓細胞の IL-6 産生を強く誘導し (Fig. 7 A, pFA100) だが TNF- α 産生に対しては有意な誘導作用を示さなかった (*8, Fig. 7 B, pCA100)。これらのことから、重合体の免疫系への影響は各前駆体となる polyphenol 類で異なることが示唆された。(なお、LPS はコントロールとして用いたリガ多糖を示す)。

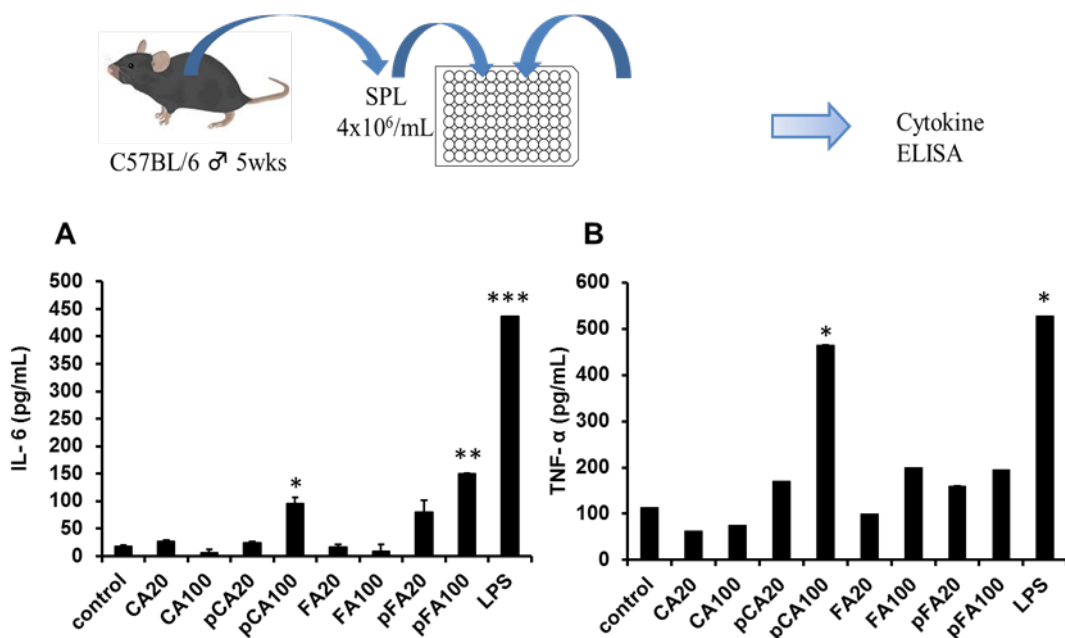


Fig. 7. Cytokine induction by polymerized polyphenols from C57BL/6 mice-derived splenocytes.Splenocytes.

重合ポリフェノールを免疫化学的に比較するために Horseradish peroxidase (H-pCA or -pFA), 天然型 Laccase (L-pCA or -pFA), ならびに非酵素条件(n-pCA or FA)で重合ポリフェノールを合成した. Laccase 祖先型改変体 mutLac2 触媒重合 Polyphenol (mut Lac-pCA, or -pFA)を固相化し、ヒト免疫グロブリン製剤である IVIG を添加し結合させた. IVIG と共に、可溶性抗原として各重合ポリフェノールを添加し、固相の mutLac-pCA, mutLac-pFA と IVIG の結合に対する競合反応性を競合 ELISA 法により解析した. 固相に結合した IVIG は anti-human IgG POX conjugated で検出した.

その結果、固相の mutLac-pCA と IVIG の結合は、mutLac-pCA が最も強く競合阻害し、他の条件で合成した重合 polyphenol (L-pCA, H-pCA, n-pCA) とは免疫化学的に異なる構造の重合体ができていることが示された (Fig. 8). 重合ポリフェノールは自然免疫系を介したサイトカイン産生だけでなく、獲得免疫における抗体産生を介した免疫においても重要な分子であることが強く示唆された. 一方で、固相の mutLac-

pFA に対する競合反応では、L-pFA, H-pFA, n-pFA, mutL-pFA の各条件で競合性に大きな差が見られなかった。また、IVIG の結合量(吸光度の最大値)も pCA と比較して非常に低いことから、pFA 免疫原性が低いものと考えられた。

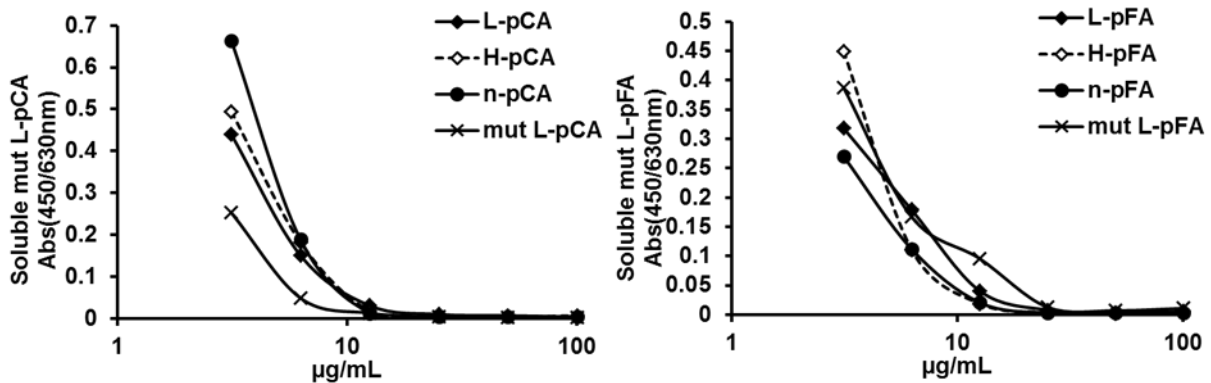


Fig. 8. Specificity and cross reactivity of antibody in polyglobin N to polymerized polyphenols.

これらの結果から、mutLac2a を用いて Caffeic Acid (CA) を酸化重合した mutLac2a 触媒高分子 Polyphenol、mL2a-pCA を用いて免疫系への影響を解析することが最適と示唆された。そこで mL2a-pCA のマクロファージへの影響を解析したので、その成果の概要を以下に示す。

② Laccase 祖先型改変体 mutLac2 触媒重合 Polyphenol mL2a-pCA のマクロファージ活性化作用

Laccase 祖先型改変体 mutLac2 触媒重合 Polyphenol mL2a-pCA の免疫調節活性を確認するために、マウス常在腹腔マクロファージを CA、mL2a-pCA、または LPS で刺激し、Operetta 高含有量分析システムにより形態学的変化を測定した。Fig. 1 に示すように、mL2a-pCA はマクロファージの形態変化を誘導した。

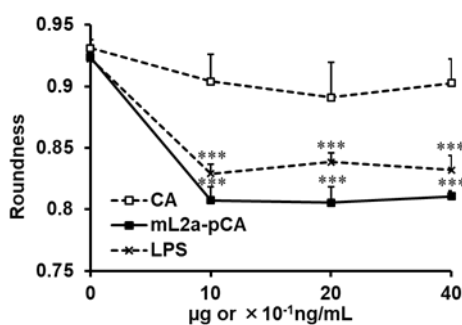


Fig. 1. mL2a-pCA induces morphological changes in macrophages.

さらに、マウス常在腹腔マクロファージによるサイトカインおよびケモカイン産生の誘導に対する mL2a-pCA の効果を解析した。Fig. 2 に示すように、IL-6 および MCP-1 産生の両方が mL2a-pCA によって有意に誘導された。MCP-1 誘導のための mL2a-pCA 濃度は、IL-6 誘導における濃度よりも低かった。

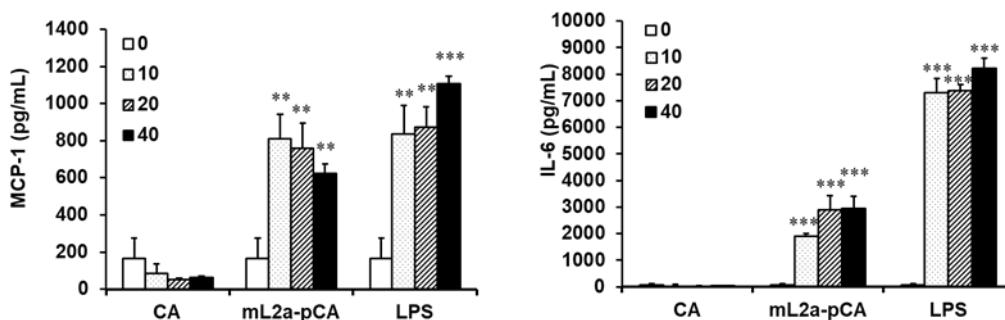


Fig. 2. mL2a-pCA modulates IL-6 and MCP-1 production.

③ Laccase 祖先型改変体 mutLac2 触媒重合 Polyphenol mL2a-PCA によるマクロファージの活性化に対する Rac1 阻害剤の効果

Rac1 は、マクロファージの形態学的変化に対する重要なシグナル伝達分子であり、Rac1 の役割を分析するために、マウス常在腹腔マクロファージを、Rac1 阻害剤の存在下または非存在下で mL2a-PCA で刺激した。マクロファージの形態変化を Operetta によって測定した。Fig. 3-A に示すように、mL2a-pCA または LPS によって誘導されたマクロファージの形態学的変化は、Rac1 阻害剤によって抑制された。次に、mL2a-PCA はマクロファージにおけるサイトカインおよびケモカイン産生を誘導したので、マクロファージ活性化分子である MCP-1 の産生における Rac1 の関与を分析した。Fig. 3-B に示すように、mL2a-pCA または LPS によって誘導された IL-6 および MCP-1 のマクロファージ産生は、Rac1 阻害剤によって抑制された。mL2a-pCA 群と比較して、LPS 誘発 MCP-1 産生は、Rac1 阻害剤によって弱く阻害された。これらの結果は、mL2a-pCA によるマクロファージの活性化が Rac1 リン酸化に依存することを示唆している。

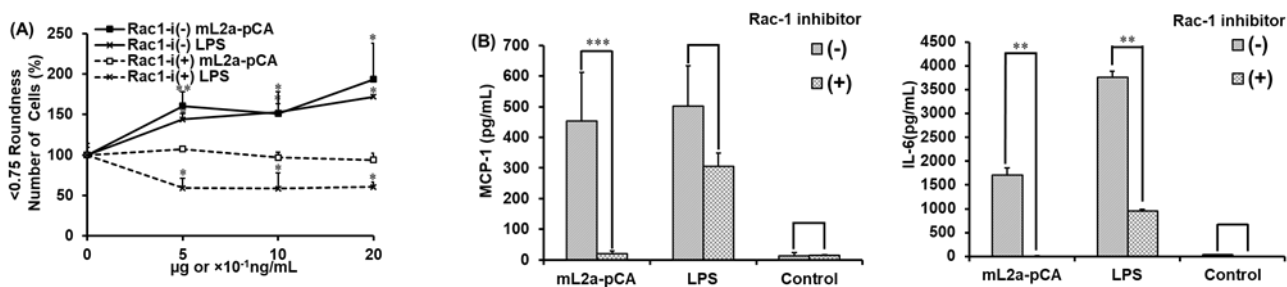


Fig. 3. Effect of Rac-1 inhibitor on mL2a-pCA-induced macrophage activation.

④ マクロファージにおける mL2a-pCA による Rac1 リン酸化活性

Rac1 活性化に対する mL2a-pCA の作用を解析した。マウス常在腹腔マクロファージを 10μg/mL の mL2a-pCA で刺激し、0~60 分後、SDS-buffer を加え反応を停止させた。試料を 5 分間沸騰し、Rac1 のリン酸化強度をウエスタンブロッティングによって検出した。Fig. 4 は、抗リン酸化 Rac1 抗体または抗 Rac1 抗体による免疫化学染色の結果を示す。これらの結果から、mL2a-pCA がマクロファージにおける Rac1 のリン酸化を誘導したことを明らかにした。(* 3)

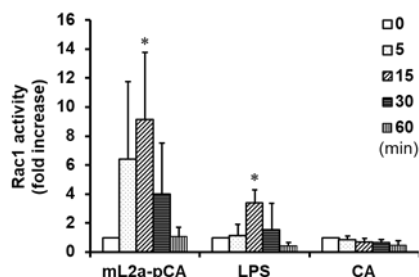


Fig. 4. mL2a-pCA-induced Rac1 activation in macrophages.

2. 研究評価及び今後の研究計画

初年度においては、まず Laccase の酵素学的な特徴を解析するために、白色腐朽菌(*Trametes sp.*)由来の Laccase を使用してポリフェノール重合反応における酵素学的解析方法を開発した。

これらの実験系により次年度にて、Laccase 祖先型改変体 mutLac2 を用いてポリフェノール重合反応における特徴を解析し、Laccase 祖先型改変体 mutLac2 を触媒とした重合カフェ酸である mL2a-pCA を安定的に人工合成することに成功した。合成した mL2a-pCA の免疫系への作用をスクリーニングし、特にマクロファージの活性化作用に特徴的な生理活性作用を見出した (*2).

最終年度はこれらで得た結果をもとに、mL2a-pCA の免疫賦活化作用を評価するとともに、マクロファージ活性化における詳細な分子メカニズムを明らかにすることに成功した。

これまで重合化ポリフェノールの免疫賦活化作用の研究は以前より行われてきたが、その詳細な分子メカニズムは全く明らかとされていなかった。これらのことから本研究は初めて重合化ポリフェノールの免疫賦活化作用の分子メカニズムを明らかにすることができた。

より安全性の高い免疫アジュバントの開発には、免疫活性化剤としての詳細な分子メカニズムを明らかにすることが重要であると考えられることから、上述の成果は実用的価値は非常に高いと考えている。

最終年度で明らかになった、mL2a-pCA が Rac1 を活性化し、抗原の取り込みに必要なマクロファージの貪食能力と抗体産生能を向上させる、IL-6 の産生と NKT 細胞の増殖を促進し、Th1 媒介免疫応答の樹立に寄与することで知られている MCP-1 の産生を誘導し、アジュバントの候補化合物になることを示した。ヒトの治療に重合ポリフェノールを適用するためには、期待される効果の予測および安全性の評価を可能にする、それらの詳細な作用メカニズムを解明することが重要であるが、この研究の結果は、これらのマクロファージ活性化作用において、Rac1 のリン酸化が重要であることを明らかにしており、免疫刺激アジュバントの候補化合物の開発に有益であると評価でき、**当初目標を 100% 達成することができた**と考えている。

長年の基礎研究の成果がワクチン開発の歴史を著しく進展させた事例でリポド A において、このワクチンは世界的に普及しているが、わが国では副作用事例が多く報告され、定期接種が一時中断されている。原因がウイルスの特性であるのか、アジュバントであるのか不明であるが、新規アジュバントが用いられていることから、さらに詳細な解析が必要とされている。ワクチン開発は天然痘ウイルスの撲滅につながる大きな貢献をしてきたが、予測できない副作用が起きる可能性については、常に意識しながら開発活動を行わなければならない。本研究においても、mL2a-pCA によって引き起こされる免疫反応を可能な限り広範かつ

詳細に解析し、ヒト応用における安全性の担保につなげたい。

5. 研究成果の発表

原著論文

1. Y. Hamuro, K. Tajima, A. Matsumoto-Akanuma, S. Sakamoto, R. Furukawa, A. Yamagishi, N. Ohno, S. Akanuma, Characterization of a thermostable mutant of *Agaricus brasiliensis* laccase created by phylogeny-based design, *J Biosci Bioeng*, 26 (2017).
2. K. Tajima, S. Akanuma, A. Matsumoto-Akanuma, D. Yamanaka, K.-i. Ishibashi, Y. Adachi, N. Ohno, Activation of macrophages by a laccase-polymerized polyphenol is dependent on phosphorylation of Rac1, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495 2209-2213 (2018).

国際学会発表

3. Katsuya Tajima, Satoshi Akanuma, Akiko Matsumoto-Akanuma, Daisuke Yamanaka, Ken-ichi Ishibashi, Yoshiyuki Adachi, Naohito Ohno., Characteristics of a modified laccase on polyphenol polymerization and immunomodulating effect of the polymerized polyphenols, The 16th International Symposium on Advanced Technology, 2017/11/1 Tokyo

国内学会発表

4. 田島克哉, 山中大輔, 赤沼哲史, 松本明子, 元井益郎, 元井章智, 石橋健一, 安達禎之, 大野尚仁. Laccase 触媒重合 Polyphenol の解析. 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月, 横浜
5. 田島克哉, 赤沼哲史, 松本明子, 山中大輔, 石橋健一, 安達禎之, 大野尚仁. 真菌 Laccase によって合成した Polyphenol 重合体:免疫修飾作用の検討. 日本医真菌学会総会学術総会第 60 回, 2016 年 10 月, 台東区
6. 赤沼哲史, 松本明子, 田島克哉, 大野尚仁. 真菌 Laccase によって合成した Polyphenol 重合体:安定化改変した真菌ラッカーゼの異種発現. 日本医真菌学会総会学術総会第 60 回, 2016 年 10 月, 台東区
7. 松本明子, 赤沼哲史, 元井益郎, 大野尚仁. 真菌 Laccase によって合成した Polyphenol 重合体: *Agaricus brasiliensis* 由来 laccase 遺伝子群のクローニング. 日本医真菌学会総会学術総会第 60 回, 2016 年 10 月, 台東区
8. 田島 克哉, 赤沼 哲史, 松本 明子, 山中 大輔, 石橋 健一, 安達 禎之, 大野 尚仁, Laccase polymerized polyphenols の特徴と生体防御系への影響. 第 28 回日本生体防御学会学術総会, 2017/6/29 相模原市
9. 松本 明子, *Agaricus brasiliensis* 新規 laccase 類のクローニング, 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会, 2017/12/6 神戸市

A-4 でんぷん改質酵素安定化

藤原 祥子(東京薬科大学・生命科学部・環境応答植物学研究室・准教授)
横堀 伸一(東京薬科大学・生命科学部・極限環境生物学研究室・講師)
山岸 明彦(東京薬科大学・生命科学部・極限環境生物学研究室・教授)
藤田 直子(秋田県立大学・教授)
中村 保典(秋田県立大学・名誉教授)

1. 当初の研究目標

本研究班ではデンプンのブランチング(枝作り)酵素高安定化設計を行う。

生物は、貯蔵多糖として様々なグルカンを合成し、細胞内に貯蔵する。その構造はグリコーゲン、デンプン等の α -グルカン、あるいは、ラミナラン、パラミロン等の β -グルカンと多様性に富む。なかでも、食品や工業原料としても注目される α -グルカンは、 α -1,4結合からなる直鎖と α -1,6結合の枝分かれからなる構造をもつが、その枝分かれの頻度・分布により、グリコーゲン、アミロペクチン、アミロース、と大きく物性の異なるグルカンとなる。この α -グルカンの構造は、伸長酵素、ブランチングエンザイム、デブランチングエンザイムにより形作られるが、なかでも枝分かれ構造を作るブランチングエンザイムにより、水への溶けやすさ等の物性を大きく変化させることができる。そして、その工業利用として、デンプンから高分子高分岐グルカンや高度分岐環状デキストリンといった水によく溶ける様々な物性の多糖類を製造できる点で注目されている。しかし、ブランチングエンザイムの耐熱性は概して低く、その工業利用には耐熱化が強く望まれている。そこで、本研究では、ビッグデータを用いた安定化設計方法の開発を応用し、イネ、原始紅藻、シアノバクテリアのブランチングエンザイムの系統解析手法による高安定化設計を行うことを目的とする。また、酵素の祖先化に伴い基質特性が変化することも予想されるため、ブランチング特性の評価も合わせて行う。本研究により、耐熱化獲得だけではなく新しい酵素特性を有するブランチングエンザイム創出の可能性も期待される。

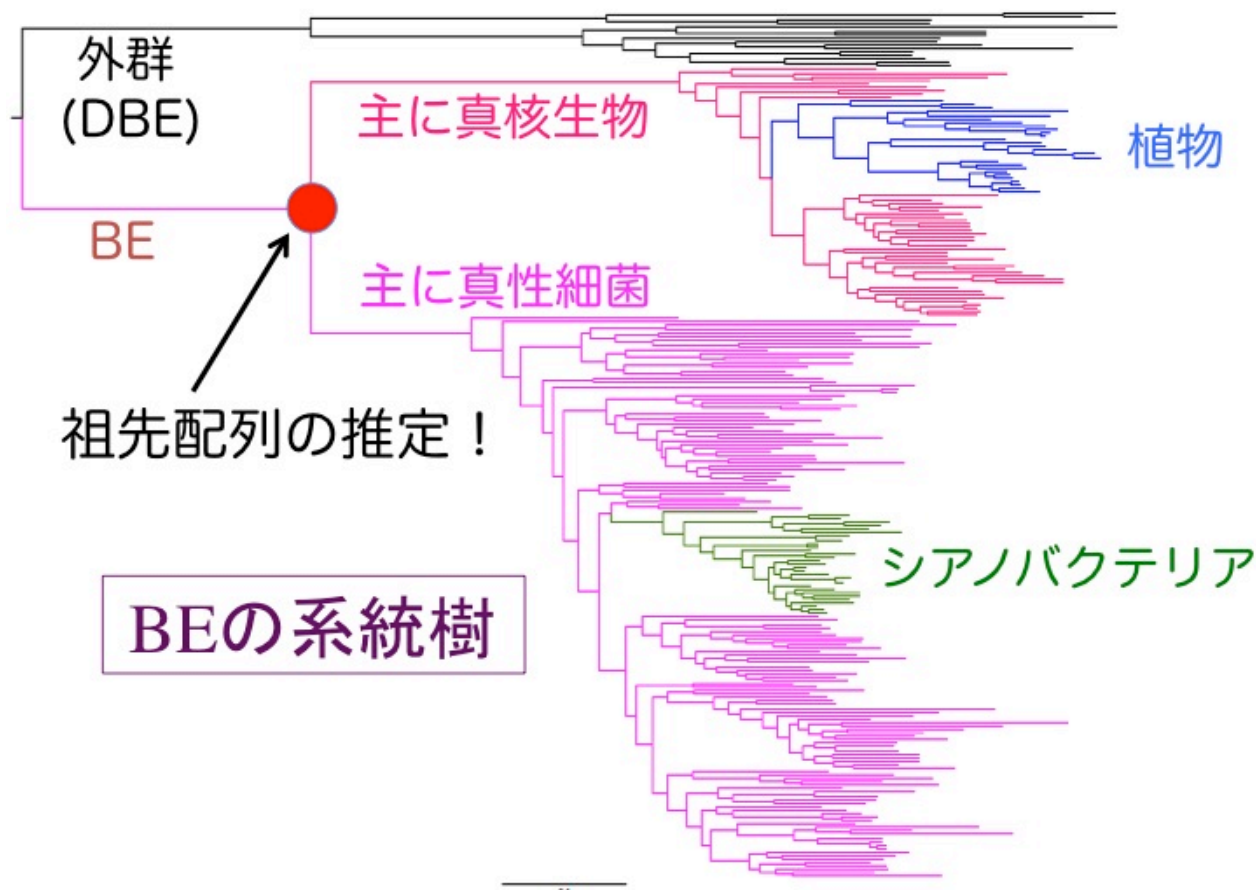
2. 研究成果の概要

上記の観点から、祖先型酵素の構造を推定し耐熱化ブランチングエンザイムを設計するため、ビッグデータを用いて酵素の系統樹を作成、祖先配列を推定し、シアノバクテリア、原始紅藻の酵素の改変を行った。

また、併行して、原始的植物のデンプン合成における酵素の機能を明らかにするため、原始紅藻のブランチングエンザイムおよびデブランチングエンザイムの遺伝子破壊株の作製、デンプン構造の分析も行った。具体的には、グリコーゲン、デンプン(セミアミロペクチン、セミアミロペクチン+アミロース)、と大きな多様性を示す原始紅藻のなかでも最も原始的と考えられているセミアミロペクチン型のシアニディオシゾン(通称シゾン)に注目し、その合成機構に及ぼす酵素の機能を明らかにすることを目的として、破壊株の作製、解析を行った。

(1) 耐熱化を目指したブランチングエンザイムの系統樹の作成

データベースより取得できた約 1300 種のグリコーゲン/デンプンブランチングエンザイムのなかから、各分類群から万遍なく約 250 種類のデータを選別した。外群としてデブランチングエンザイムであるイソアミラーゼとプルラーゼを用い、最尤法により系統樹を作成した。その結果、ブランチングエンザイムは、主に原核生物からなるクレードと主に真核生物からなるクレードからなることが確認された。次に、得られたアラ



インメントを基に、先ずインフォーマティブサイトが増加するようアラインメントの確認・改良を行い、ブランチングエンザイムの祖先型酵素配列の推定を行なった。そして、この配列を含むアラインメントを基に、シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 と原始紅藻シジムのブランチングエンザイムへの祖先型配列の導入を設計し、改変実験を開始した。先ず、発現用ベクターにクローニングされた *Synechococcus elongatus* PCC 7942 ブランチングエンザイム遺伝子に、PCR (PrimeSTAR Max DNA polymerase) にて G339N、A343P、S349T の3種類の変異を導入し、この方法にて迅速に正確な変異体が得られることを確認した。酵素活性の測定として、先ず簡便法であるヨウ素デンプン反応による比色法を用いたところ、3 種類の変異体の内、A343P 変異体は、50°Cでも高い活性を持つことが確認され、耐熱化が期待された。しかし、より正確に反応生成物の鎖長分析により枝分かれの増加を 30°C、40°C、50°C、60°C、70°C、80°Cで調べたところ、変異導入前の酵素でも A343P 変異体でも 60°Cで大きく活性が低下することがわかった。そこでさらに詳細に 50°C、53°C、56°Cでも比較してみたが、酵素活性の減少率は両者でほぼ同じであり、両者の高温耐性はほぼ同程度であると考えられた。しかし、データベースに基づく祖先型配列導入による耐熱化を試み、その結果は配列解析に還元した。

(2) 原始紅藻シゾンのブランチングエンザイム、デブランチングエンザイムの機能推定を目指した遺伝子破壊株の作製

デブランチングエンザイムについては、2種類あるイソアミラーゼホモログ (CMI294C と CMI294C) の発現パターンを明暗サイクルで調べたところ、どちらも明条件下で光合成によりデンプンが活発に合成されているときに発現していたことから、デンプン合成に関与している可能性が示唆された。そこで、それぞれの遺伝子の破壊株 (Δ CMI294C と Δ CMS197C) を作製し、先ず生育、貯蔵多糖量について比較したところ、どちらの破壊株もコントロール株と比べて生育には大きな違いはみられなかったが、 Δ CMI294C の貯蔵多糖量は、コントロール株や Δ CMI294C より低くなっていた。このときのデンプン顆粒の形態を調べたところ、 Δ CMI294C では顆粒が非常に小さくなっていることがわかった。また、 Δ CMS197C では顆粒がドーナツ型になっていた。デンプンの鎖長分布を調べたところ、 Δ CMI294C では中～長鎖が多くて短鎖が少ないのに対し、 Δ CMS197C では短鎖が多くて長鎖が少ないことが明らかとなった。このことから、これらの酵素は基質特異性が異なり、CMI294C は中～長鎖に CMS197C は短鎖に作用している可能性が示唆された。今後さらに再現性をとり酵素の機能を明らかにして行く予定である。また、double mutant ではもっとはっきりした違いがみられる可能性があるため、double mutant の作製を目指し、シゾン相同組換え用のプラスミドを構築中である。ブランチングエンザイム (CMH144C) の破壊株 (Δ CMH144C) についても、デンプンの鎖長分布を調べたところ、 Δ CMH144C ではコントロール株と比べてグルコースの重合度が 5～10 の短鎖が少なく、11 以上の中～長鎖が多い構造をしていることが分かった。このことから、CMH144C はアミロペクチンの短鎖形成に関与していることが示唆された。以上の結果から、アミロペクチンの合成には、ブランチングエンザイム CMH144C による枝の形成と、短いランダムな鎖を払うイソアミラーゼ CMI294C が重要であることが示唆された。なお、CMH144C 以外にも BE があることが示唆されたが、新規の BE が存在するかどうかについては今後再現性をみていく必要がある。

BE はデンプン分子の分岐鎖を形成する酵素で、分子微細構造の最終形を決めるうえでも、デンプン粒の形態を決めるうえでも重要な役割を果たしている。

我々は最近、デンプン合成の初期過程にも、BE がホスホリラーゼ (Pho1) と相互作用しながら、分岐グルカンの de novo 合成過程に関与していることをイネで見出した(*14)。この相互作用を緊密にするために、BE-Pho1 タンパク質複合体が形成されることも見出した。

(3) 貯蔵多糖量のコントロールを目指した代謝系の解明

貯蔵多糖の増産・制御を目指し、貯蔵多糖合成系と競合する代謝系の調節機構を明らかにした。原核生物であるシアノバクテリアでは、オルガネラを持たないため、光合成による貯蔵多糖の合成と解糖系が細胞の同じ区画内で働いている。その解糖系の調節系として、Hik8 カスケードが一連の解糖系酵素群の制御を行っていることを明らかにした(*1)。また、貯蔵多糖として β -グルカンを合成する円石藻については、トランスクリプトームデータベース Pleurochrysome を構築し(明治大学矢野健太郎博士らとの共同研究*8)、得られた β -グルカン合成酵素候補遺伝子について RNAi により β -グルカン合成に関与していることを示した。さらに、円石藻では、貯蔵多糖への炭素の流れは、円石中の炭酸カルシウム及び酸性多糖合成とも

競合するため、それらの合成量、形成メカニズム、役割についても検討した(*19)。これらの研究により、競合する過程の制御メカニズムが明らかになりつつある。

3. 研究評価及び今後の研究計画

成果をまとめると、ビッグデータを用いて祖先配列を推定し、祖先型に回帰するようなターゲット酵素への変異導入位置と導入アミノ酸の種類を設計し、シアノバクテリア *Synechocystis elongatus* sp. PCC 6803 のブランチングエンザイムについて、設計した部位への変異導入を行った。現在の到達点は、得られた組換え体タンパク質を精製し、熱耐性が獲得できたかどうかタンパク質の熱変性曲線を作製し、酵素活性についても検討している段階である。また、シゾンのデンプン関連酵素遺伝子破壊株については、イソアミラーゼは2種類の遺伝子の破壊株、ブランチングエンザイムは1種類の遺伝子の破壊株が得られ、そのデンプンの構造解析により酵素の機能を推定することができた。さらに、貯蔵多糖の増産・制御を目指し、貯蔵多糖合成系と競合する代謝系の調節機構を明らかにした。

特に特記すべき成果としては、分類群を網羅する 1300 種ものビッグデータの中から、代表種の選抜、アラインメントの作成を丹念に行い、ターゲット酵素を祖先型に回帰するような変異の導入を行うことができた。ターゲット酵素であるブランチングエンザイムは、工業的利用価値が高く、耐熱化により工業利用が容易になることによりさらにその価値が高まるものと期待される。また、デンプン合成機構の獲得は、植物生理学的にもまた応用面からも非常に興味深いテーマである。これまで行われてきたシアノバクテリアや緑色植物ではなく、グリコーゲンとアミロペクチンの中間型であるセミアミロペクチンをもつ原始紅藻を用いて、酵素の役割を調べたところに価値がある。そして本研究の結果、目標は 100%達成された。

実用化、特許申請への活用の見込みとしては、祖先型に回帰するような変異の導入により、BE に耐熱化もしくは新規の基質特異性が付与できた場合には、食品や飲料への実用化、特許申請への活用が期待される。特に 70℃以上で活性がみられた場合には、非常に高い実用的価値が見込まれる。これまでも新規イソアミラーゼで特許申請の実績があり、糖加工酵素の実用的価値は非常に高いと考えている。また、デンプン合成機構の研究においても、各酵素の役割を明らかにすることにより、in vivo もしくは in vitro で様々な構造と物性をもった多糖が合成できることが期待される。

今後は、シアノバクテリア *Synechocystis elongatus* sp. PCC 6803 の祖先型化ブランチングエンザイムについて、耐熱性や触媒活性・特異性を明らかにし、応用利用を目指す。また、シゾンのデンプン関連酵素遺伝子破壊株について、今後は、さらにイソアミラーゼの double mutant を解析することにより、原始紅藻のデンプン合成におけるこれらの酵素の機能を推定する。この原始紅藻の酵素の機能を調べる研究は、上述の酵素の祖先化の研究に有益な情報を与えるとともに、デンプン合成機構出現の謎を解明する糸口ともなると期待される。さらに、貯蔵多糖の増産・制御を目指し、貯蔵多糖合成系と競合する代謝系の調節機構を明らかにした。これらの結果を統合、発展することにより、期待される構造の貯蔵多糖を予測通りに生産することが可能になるものと期待される。

4. 研究成果の発表

雑誌論文

1. *Okada K, Horii E, Nagashima Y, Mitsui M, Matsuura H, Fujiwara S and Tsuzuki M (2015) Genes for a series of proteins that are involved in glucose catabolism are upregulated by the Hik8-cascade in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Planta*, **241**: 1453-1462.
2. Hayashi M, Kodama M, Nakamura Y and Fujita N (2015) Thermal and pasting properties, morphology of starch granules, and crystallinity of endosperm starch in the rice SSI and SSIIIa double-mutant. *J. Appl. Glycosci.*, **62**: 81-86.
3. Crofts N, Abe N, Oitome NF, Matsushima R, Hayashi M, Tetlow IJ, Emes MJ, Nakamura Y and Fujita N (2015) Amylopectin biosynthetic enzymes from developing rice seed form enzymatically active protein complexes. *J. Exp. Bot.*, **66**: 4469-4482.
4. Suzuki R, Koide K, Hayashi M, Suzuki T, Sawada T, Ohdan T, Takahashi H, Nakamura Y, Fujita N and Suzuki E (2015) Functional characterization of three (GH13) branching enzymes involved in cyanobacterial starch biosynthesis from *Cyanobacterium* sp. NBRC 102756. *Biochim. Biophys. Acta*, **1854**: 476-484.
5. Higuchi K, Kanai M, Tsuchiya M, Ishii H, Shibuya N, Fujita N, Nakamura Y, Suzui N, Fujimaki S and Miwa E (2015) Common reed accumulates starch in its stem by metabolic adaptation under Cd stress conditions. *Front. Plant Sci.*, **6**: 138.
6. Hieu HC, Li H, Miyauchi Y, Mizutani G, Fujita N and Nakamura Y (2015) Wetting effect on optical sum frequency generation (SFG) spectra of D-glucose, D-fructose, and sucrose. *Spectrochimica. Acta*, **138**: 834-839.
7. *Sakurai T, Aoki M, Ju X, Ueda T, Nakamura Y, Fujiwara S, Umemura T, Tsuzuki M and Minoda A (2016) Profiling of lipid and glycogen accumulations under different growth conditions in the sulfothermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Bioresour. Technol.*, **200**: 861-866.
8. *Yamamoto N, Kudo T, Fujiwara S, Takatsuka Y, Hirokawa Y, Tsuzuki M, Takano T, Kobayashi M, Suda K, Asamizu E, Yokoyama K, Shibata D, Tabata S and Yano K (2016) Pleurochrysome: a web database of *Pleurochrysis* transcripts and orthologs among heterogeneous algae. *Plant Cell Physiol.*, **57**: e6.
9. Miyashita S, Murota C, Kondo K, Fujiwara S and Tsuzuki M (2016) Arsenic metabolism in cyanobacteria. *Environ. Chem.*, **13**: 577-589.
10. Kadouche D, Ducatez M, Cenci U, Tirtiaux C, Suzuki E, Nakamura Y, Putaux JL, Terrasson AD, Diaz-Troya S, Florencio FJ, Arias MC, Striebeck A, Palcic M, Ball SG and Colleoni C (2016) Characterization of function of the ClgA2 glycogen/starch synthase in *Cyanobacterium* sp. Clg1 supports an ancient role in the synthesis of long chain glycogen and starch. *Plant Physiol.*, **171**: 1879-1892.
11. Kobayashi T, Sasaki S, Utsumi Y, Fujita N, Umeda K, Sawada T, Kubo A, Abe J, Colleoni C and Ball S (2016) Comparison of chain-length preferences and glucan specificities of isoamylase-type α -glucan

debranching enzymes from rice, cyanobacteria, and bacteria. *PLoS ONE*, **11**: e0157020.

12. Toyosawa Y, Kawagoe Y, Matsushima R, Crofts N, Ogawa M, Fukuda M, Kumamaru T, Okazaki Y, Kusano M, Toyooka K, Sato M, Oitome N, Itoh R, Ai Y, Jane JL, Nakamura Y and Fujita N (2016) Deficiency of starch synthase IIIa and IVb alters starch granule morphology from polyhedral to spherical in rice endosperm. *Plant Physiol.*, **170**: 1255-1270.
13. Matsumoto H, Fujiwara S, Miyagi H, Nakamura N, Shiga Y, Ohta T and Tsuzuki M (2017) Carbonic anhydrase inhibitors induce developmental toxicity during zebrafish embryogenesis, especially in the inner ear. *Mar. Biotechnol.*, **19**: 430-440.
14. *Nakamura Y, Ono M, Sawada T, Crofts N, Fujita N and Steup M (2017) Characterization of the functional interactions of plastidial starch phosphorylase and starch branching enzymes from rice endosperm during reserve starch biosynthesis. *Plant Sci.*, **264**: 83-95.
15. Crofts N, Sugimoto K, Oitome, NF, Nakamura Y and Fujita N (2017) Differences in specificity and compensatory functions among three starch synthases determine the structure of amylopectin in rice endosperm. *Plant Mol. Biol.*, **94**: 399-417.
16. Nakagami T, Yoshihara H, Nakamura T, Utsumi Y, Sawada T, Fujita N, Satoh H and Nakamura Y (2017) Biochemical analysis of new-type mutants of japonica rice that accumulate water-soluble α -glucans in the endosperm but retain full starch debranching enzyme activities. *Starch*, **69**: 1600159.
17. Crofts N, Nakamura Y and Fujita N (2017) Critical and speculative review of the roles of multi-protein complexes in starch biosynthesis in cereals. *Plant Science*, **262**: 1-8.
18. Nakamura Y (2018) Rice starch biotechnology: Rice endosperm as a model of cereal endosperms. *Starch*, **70**: 1600375.
19. *Sakurada S, Fujiwara S, Suzuki M, Kogure T, Uchida T, Umemura T and Tsuzuki M Involvement of acidic polysaccharide Ph-PS-2 and protein in initiation of coccolith mineralization, as demonstrated by in vitro calcification on the base plate. *Mar. Biotechnol.*, in press.
20. Murakami S, Fujita N, Nakamura Y, Inouchi N, Oitome N, Koda T and Nishioka A Effects of shear and heat milling treatment on the molecular structure of rice starch. *Starch*, in press.
21. Hirota T, Yoshida S, Sawada T, Nakamura Y Starch properties affecting maltose production ability in vegetable black soybean seeds (Edamame) with different maturation periods. *Horticulture Journal*, in press.

総説・著書等

22. Nakamura Y (2015) Biosynthesis of Reserve Starch. In: Nakamura Y. (ed.) *Starch: Metabolism and Structure*. Springer. pp. 161-209.
23. Nakamura Y (2015) Initiation Process of Starch Biosynthesis. In: Nakamura Y. (ed.) *Starch: Metabolism and Structure*. Springer. pp. 315-332.
24. 中村保典 (2017) 澱粉合成研究の材料としてのイネ. *生物工程*, **95**: 220-224.

国際学会発表

25. Murota, C., Matsumoto, H., Sato, N., Fujiwara S., Tsuzuki, M. Relationship between gene expression of phosphate transporter and arsenate resistance in *Chlamydomonas*. The 17th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*, June, 2016, Kyoto

国内学会発表

26. Murota C, Matsumoto H, Sato N, Fujiwara S and Tsuzuki M, Relationship between gene expression of phosphate transporter and arsenate resistance in *Chlamydomonas*. The 17th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*, June, 2016, Kyoto
27. Nakamura Y, Thirty years of rice starch biosynthesis. Starch Round Table 2017, October, 2017, San Diego
28. Asakawa K, Sakurada S, Fujiwara S, Endo H, Suzuki M, Kogure T, Kubo R, Amano K and Tsuzuki M, Analysis of the factors involved in coccolith formation in the coccolithophore *Pleurochrysis haptanemofera*. BiominXIV, 14th International Symposium on Biomineralization, October, 2017, Tsukuba
29. Harada K, Miyauchi H, Aota Y, Sato R, Okada K, Fujiwara S and Tsuzuki M, SSCC-type photobioreactor and possible application of wastewater to the algal culture and phosphorus retrieval. The 16th International Symposium on Advanced Technology (ISAT16th), 2017, Tokyo

国内学会発表

30. 櫻田舜人, 鈴木道生, 小暮敏博, 板山翔, 都筑幹夫, 藤原祥子, *Pleurochrysis* の円石形成 (in vitro 石灰化), 日本植物学会第 79 回大会, 2015 年 9 月, 新潟
31. 櫻田舜人, 浅川航輝, 遠藤博寿, 鈴木道生, 小暮敏博, 藤原祥子, 都筑幹夫, 円石藻 *Pleurochrysis* の円石形成 –ベースプレートの性質と関連遺伝子の探索–, 第 10 回バイオミネラリゼーションワークショップ, 2015 年 12 月, 東京
32. 松本寛子, 藤原祥子, 都筑幹夫, ゼブラフィッシュ初期胚の耳石形成における炭酸脱水酵素の関与, 第 10 回バイオミネラリゼーションワークショップ, 2015 年 12 月, 東京
33. 室田知里, 辻下真紀, 畑山遥, 山下貴矢, 松本寛子, 西弘貴, 佐藤典裕, 藤原祥子, 都筑幹夫, *Synechocystis* sp. PCC 6803 のリン酸輸送体変異株を用いたヒ素耐性機構の解明, 日本藻類学会第 40 回大会, 2016 年 3 月, 東京
34. クロフツ尚子, 杉本恭平, 追留那緒子, 中村保典, 藤田直子, Starch synthase (SS) IIa は SSIIIa の長鎖伸長機能を相補できない. 日本応用糖質科学会平成 28 年度大会, 2016 年 9 月, 福山
35. 藤田直子, 豊澤佳子, 川越靖, 松島良, クロフツ尚子, 小川雅弘, 福田真子, 中村保典, スターチシンターゼ SSIIIa と SSIVb が同時に欠損するとなぜ澱粉粒が球形に変化するのか? 日本応用糖質科学会平成 28 年度大会, 2016 年 9 月, 福山
36. 松本寛子, 藤原祥子, 都筑幹夫, 炭酸脱水酵素阻害剤エトキシゾルアミドによるゼブラフィッシュ胚への影響. 第 22 回日本環境毒性学会研究発表会, 2016 年 9 月, 松山

37. 櫻田舜人, 鈴木道生, 小暮敏博, 藤原祥子, 都筑幹夫, 円石藻 *Pleurochrysis* の円石形成. 第 11 回 バイオミネラリゼーションワークショップ, 2016 年 11 月, 柏
38. 浅川航輝, 藤原祥子, 遠藤博寿, 都筑幹夫, RNAi による円石藻 *Pleurochrysis* の円石形成関連遺伝子の探索. 第 11 回バイオミネラリゼーションワークショップ, 2016 年 11 月, 柏
39. 内海好規, 内海稚佳子, 田中真帆, 藤田直子, 中村保典, 関原明, キャッサバ (*Manihoto esculenta*) の澱粉枝作り酵素 (Starch Branching Enzyme, SBE) の機能解析. 日本応用糖質科学会平成 28 年度大会, 2016 年 9 月, 福山
40. 中村保典, 穀類澱粉の生合成を俯瞰する. 日本応用糖質科学会平成 29 年度大会, 2017 年 9 月, 日本大学湘南キャンパス
41. 宮内啓喜, 原田康平, 青田侑生, 岡田克彦, 藤原祥子, 都筑幹夫, 固相表面上のクロレラにおける光合成能力と排水中リン回収能力, 日本植物学会第 81 回大会, 2017 年 9 月, 野田
42. 大滝理恵, 林泰平, 平井一帆, 藤原祥子, 都筑幹夫, 佐藤典裕, クロレラにおけるトリアシルグリセロール蓄積気孔, 日本植物学会第 81 回大会, 2017 年 9 月, 野田

B. ビックデータを用いた好熱菌安定酵素の高活性化技術の確立

本研究課題では、配列情報をもとに好熱菌がもつ安定酵素を低温あるいは常温で高活性化する技術開発を行い。その技術を過酸化水素検出素子開発に応用する。

B-1 理論・実証：好熱菌酵素の汎用的な低温高活性化改変技術の確立

横堀伸一(東京薬科大学・極限環境生物学研究室・講師)

山岸明彦(東京薬科大学・極限環境生物学研究室・教授)

赤沼哲史(早稲田大学・准教授)

1. 当初の研究目標

本研究プロジェクトの当初の目的は、健康で豊かな生活を実現するための技術革新となる得るスマート(情報高度集約型)タンパク質工学、すなわちゲノムビッグデータの活用と計算機手法を進化工学と組み合わせることから、本来環境低負荷で高機能の酵素(タンパク質)の実用化のための基盤技術を開発することである。特に本研究項目では、タンパク質の触媒活性を高める方法の開発を目的とした。

生物が持つ天然のタンパク質性触媒である酵素は、化学工業で用いられる無機触媒と比較して優れた特性を持っている。すなわち、i) 鏡像異性体ですら 100%識別可能な高い基質特異性、ii) 副生成物をまったく生じさせない 100%の反応特異性、iii) 常温・常圧で化学反応を触媒するという低エネルギーコスト、iv) 環境中で容易にアミノ酸へと分解される環境低負荷、などが酵素の利点として挙げられる。これらの特性を生かし、現在までに 100 種を超える遺伝子操作用酵素、多種の洗剤用加水分解酵素、プラスチック素材(アクリルアミド)生産、バイオエタノール生産、医薬品(リゾチーム、抗体製剤)、血糖値センサー等で多くの酵素やタンパク質が利用されており、今後もさらに多くの酵素の産業利用が望まれている。しかし、タンパク質の産業利用においてしばしば問題となるのが、タンパク質の不安定性である。一方、タンパク質が持つ不安定性の問題をはじめから克服しているのが、70°Cを超える温度を至適生育温度とする好熱菌が持つ酵素である、好熱菌の酵素は、高温を含め様々な条件で安定であることが知られている。しかし、好熱菌酵素の産業利用においては、常温での活性の低さが利用の妨げとなる場合がある。好熱菌酵素の産業利用を推進するためには、高い安定性を維持したまま、低温活性を向上させる好熱菌酵素の改変法の確立が急務の課題である。

酵素の低温活性化の知見は乏しい。酵素の低温活性の大きさは、しばしば触媒に関わる部位の柔らかさと関連づけられる(Siddiqui & Cavicchioli, *Annu. Rev. Biochem.* 2006)。しかし、活性部位の柔らかさとアミノ酸配列との関係は十分には理解されていない。進化分子工学による好熱菌酵素の低温高活性化が報告されているが(Merz *et al.* *Biochemistry* 2000; Sriprapundh *et al.*, *Prot. Eng.* 2003; Sasaki *et al.* *Prot. Eng. Des. Sel.* 2008; Zhong *et al.* *Biotechnol. Bioeng.* 2009)、推定された高活性化の分子機構は様々で、低温高活性化設計の一般則は確立されていない。

我々はこれまでに、進化分子工学手法により多くの好熱菌由来イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素(以下 IPMDH)の低温高活性化変異体を獲得した。高活性化に寄与したアミノ酸置換は立体構造上に散在していたが、特に補酵素 NAD のアデニン環に近接する部位に多く見られた(Hayashi *et al. Biochemistry* 2011)。好熱菌由来の乳酸脱水素酵素とグルコース脱水素酵素も、補酵素結合残基の置換により 25°Cの比活性が向上した(Hayashi *et al. Biochemistry* 2011; Sugii *et al. J. Biosci. Bioeng.* 2014)。しかし、いずれの変異体も常温生物が持つ相同酵素の 25°Cの比活性の大きさの 10%にも達しなかった。複数のアミノ酸置換を導入した多重アミノ酸置換体も作製したが、低温活性の更なる改善は見られなかった。

一方で、我々は古代生物が有したと思われる遺伝子を復元し、その遺伝子から古代タンパク質を合成、その性質を調べた。その結果、祖先生物は超好熱菌であり、現存の常温生物、好冷生物は、地球の表面温度の低下に伴い、低い温度に適応した生物へと進化したことを連想させた (Akanuma *et al. Evolution* 2015; Akanuma *et al. PNAS* 2013)。したがって、好熱菌酵素に常温生物由来酵素並の低温活性を獲得させるには、天然の低温適応進化に倣うべきであると考えに至った。そこで、好熱菌酵素と常温菌相同酵素のアミノ酸配列の比較に基づき、好熱菌酵素の効率的な低温高活性化法を確立することを当初の目的とした。同時に、低温高活性型変異体の耐熱性を調べることによって、低温・常温活性の向上には耐熱性の劣化を伴うのか、それと、耐熱性とのトレードオフ無しに低温・常温活性の改善が可能か明らかにし、さらに、低温高活性型変異体の低反応温度での触媒反応の熱力学的な解析をおこなうことで、低温高活性化の熱力学的な機構を明らかにすることも当初の目標とした。

2. 研究成果の概要

本研究グループは、本研究期間開始前までに、配列比較に基づく部位特異的突然変異誘発法や進化分子工学的手法により、好熱菌安定酵素の低温活性化に成功していた(Sasaki *et al., Prot. Eng. Des. Sel.* 2008; Hayashi *et al., Biochemistry* 2011; Sugii *et al., J. Biosci. Bioeng.* 2014)。しかし、低温高活性化設計のさらに高度な理論化の為には、

多くの実証データを集める必要があった。そこで本研究では、好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH) の活性部位近傍のアミノ酸を網羅的に常温菌である大腸菌由来 IPMDH の同じ部位に見られるアミノ酸に置換した(図1)。その際、*T. thermophilus* IPMDH と大腸菌 IPMDH のアミノ酸配列アライメントにおいて、両配列で異なるアミノ酸の多くは進化の過程で活性とは無関係に蓄積したと予想し、「好熱菌と大腸菌酵素の比較において、活性部位に近いアミノ酸の相違は活性部位から離れた部位のアミノ酸の相違よりも活性の大きさの違いに関わる」という仮説を立てた。すなわち、活性中心から8Å以内の部位のみをアミノ酸置換の対象とし、検証した。

好熱菌 *T. thermophilus* IPMDH と大腸菌 IPMDH のアミノ酸配列を比較すると、176 部位でアミノ酸が保

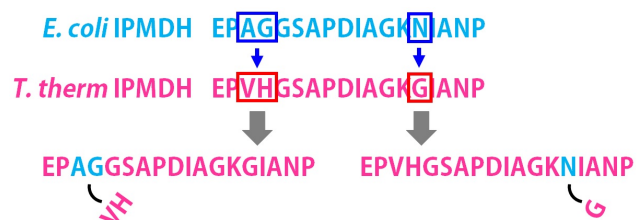


図1. 常温菌型のアミノ酸を好熱菌酵素に導入し、得られた変異体の触媒活性と耐熱性を解析した。

存され、169 部位で異なる。また、大腸菌 IPMDH には計 18 アミノ酸残基の挿入がある。異なる 169 アミノ酸と 18 挿入残基のうち低温活性化に関わるアミノ酸を探索するため、好熱菌 IPMDH に大腸菌型アミノ酸を置換(挿入)した。その際、以下のルールを適用した。

- (1) 活性部位および第2シェルのアミノ酸だけがアミノ酸置換の対象となるよう、活性部位から8Å以内のアミノ酸のみ置換した。
- (2) 立体構造上近接する部位の複数のアミノ酸置換は、一つの変異体にまとめて導入した。
- (3) 大腸菌 IPMDH にアミノ酸の挿入がある部位は、そのアミノ酸を好熱菌 IPMDH に挿入した。

上記3項目のルールに従って計 23 アミノ酸置換と2アミノ酸の挿入を網羅する 11 変異体をコードする遺伝子それぞれを、PCR 法を利用した部位特異的変異導入法により構築した。変異型遺伝子を用いて大腸菌 Rosetta2(DE3)株を形質転換し、得られた形質転換株を用いて変異型 IPMDH を大量発現した。大腸菌の抽出液から熱処理および疎水性相互作用カラムクロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィーにより変異型 IPMDH を SDS-PAGE で単一バンドになるまで精製した。精製 IPMDH を用いて触媒活性の解析をおこなった結果、11 変異体のうちの6変異体で 25°Cの比活性が向上し、最大で好熱菌野生型 IPMDH の 7.6 倍にまで高活性化したことを明らかにした。

さらに離れた部位のアミノ酸置換の効果を調べるため、活性部位から 8~12Å の部位を対象として、好熱菌 IPMDH 変異体を作製した。この範囲では好熱菌と大腸菌 IPMDH で 43 残基が異なる。8Å以内の場合と同様のルールを適用し、18 個の変異体を作製した。触媒活性の解析をおこなった結果、9変異体で 25°Cの比活性が向上し、最大で好熱菌野生型 IPMDH の 7.6 倍にまで高活性化したことを明らかにした。

次に、上述の研究結果から明らかになった低温活性の改善に寄与するアミノ酸置換を複数組み合わせることによって、好熱菌 IPMDH の低温活性をさらに向上させることを試みた。その結果、単独では好熱菌 IPMDH の低温活性を改善するアミノ酸置換を2つ組み合わせた変異体の多くは、単独のアミノ酸置換と比べてむしろ低温活性が低下するケースが多いことが明らかになった。それらの変異体の 25°Cでの反応速度論解析をおこなったところ、補酵素 NAD に対する K_m 値が大きく悪化していた。一方、補酵素 NAD に対する親和性が悪化する程度が比較的小さい変異体を持つアミノ酸置換を組み合わせた変異体のうちのいくつかは、単独のアミノ酸置換を持つ変異体よりも低温活性がさらに改善した。最も低温での活性が向上した変異体(mut9/21)は、好熱菌野生型 IPMDH と比べて 25°Cでの比活性が 14 倍向上した。

mut9/21 変異体の反応速度論解析の結果から、好熱菌野生型 IPMDH と比べて 25°Cでの K_m 値は 48 倍悪化した。次に、mut9/21 変異体が触媒する反応の自由エネルギー変化を解析した(図2)。変異体では好熱菌野生型 IPMDH と比べて遷移状態が 3.5 kJ/mol 不安定化していた。しかし、mut9/21 変異体では好熱菌野生型 IPMDH と比較して酵素・基質・補酵素(ミカエリス)複合体が 9.6 kJ/mol 不安定化した。ミカエリス複合体と遷移状態との間の自由エネルギー変化が小さい程触媒する反応

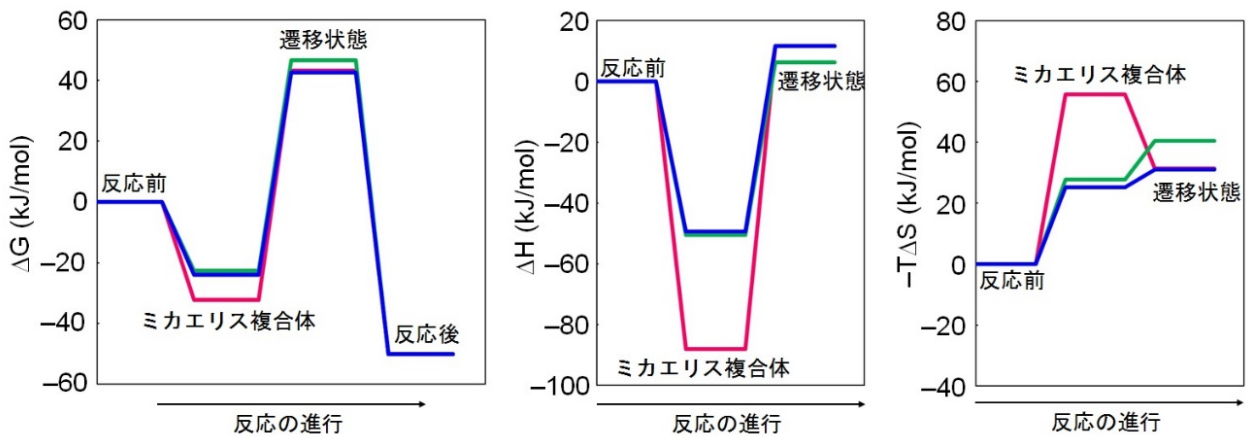


図2. IPMDHの触媒反応に伴う熱力学的パラメータ(25°C)。赤、*T. thermophilus* IPMDH; 緑、mut9/21 変異体; 青、大腸菌 IPMDH。

速度が速くなるため、変異体の低温高活性化は、低反応温度でのミカエリス複合体の不安定化が主要な要因であることが明らかになった。この特徴は、大腸菌 IPMDH と類似していた。また、ミカエリス複合体と遷移状態の熱力学的パラメータを算出したところ、mut9/21 変異体は好熱菌野生型 IPMDH よりも大腸菌 IPMDH の熱力学的パラメータに似た特性を示した(図2)。

最後に、mut9/21 変異体の熱変性温度を、円二色分散計を用いて 222 nm の楕円率の温度変化を測定することによって α ヘリックスの熱変性を観察し求めた。その結果、好熱菌野生型 IPMDH の熱変性温度が 87°Cであったのに対し、変異体の熱変性温度はわずかに2°Cだけ低い 85°Cであった。したがって、この変異体では天然酵素に見られる程は大きな耐熱性の犠牲を伴うことなく低温高活性化が達成されたことが明らかとなった。

作製した変異体のアミノ酸置換部位に相当する大腸菌 IPMDH、好熱菌 IPMDH および共通祖先配列のアミノ残基を比較したところ、アミノ酸置換部位の好熱菌野生型 IPMDH のアミノ酸が共通祖先配列のアミノ酸と一致する 11 変異体のうちの5変異体で、25°Cの比活性が2倍以上向上し、アミノ酸置換部位の好熱菌野生型 IPMDH のアミノ酸が共通祖先配列とは一致しない 14 変異体のうちの2変異体が 25°Cの比活性が2倍以上向上したことが分かった、すなわち、共通祖先配列のアミノ酸と好熱菌 IPMDH のアミノ酸とが一致する部位のアミノ酸置換によって、25°Cの比活性が2倍以上向上する確率が高いことが明らかになった。

3. 研究評価及び今後の研究計画

本研究の結果、作製した変異体の約半分が低温活性を改善しており、本方法が簡便で効率的な好熱菌酵素の低温高活性化設計法になり得ることを明らかにした。また、複数のアミノ酸置換を組み合わせることで、元の好熱菌野生型酵素と比べて 25°Cの比活性が 14 倍向上した変異体を得ることができた。すなわち、好熱菌酵素の効率的な低温高活性化法の確立を達成した。

低温高活性化した好熱菌 IPMDH 変異体の耐熱性を調べたところ、25℃での比活性が 14 倍に向上した変異体の熱変性温度は、野生型酵素と比べてわずかに2℃しか低下していなかったことを明らかにした。すなわち、耐熱性の低下を伴うことなく、好熱菌酵素の低温活性の大幅な向上を達成した。したがって、これまではっきりとした証拠無しに提唱されてきた「安定性と活性との間のトレードオフ」について、酵素の低温活性の向上には必ずしも耐熱性の低下を伴う必要がないことを示す実験証拠を得ることができた。

好熱菌野生型酵素、mut9/21 変異体、大腸菌野生型酵素の 25℃、40℃、55℃、70℃での反応速度論解析をおこなったことで、 K_m 値、 k_{cat} 値の温度依存性を決定した。このことにより、低温高活性化の熱力学的機構を明らかにすることも達成した。

本研究の特に特記すべき成果を以下に列挙する。

- (1) 好熱菌酵素の活性部位近傍 (~12Å) のアミノ酸を網羅的に常温菌由来相同酵素の同じ部位に見られるアミノ酸に置換する手法によって、効率的に多くの低温活性が改善した変異型酵素が得られることが分かった。すなわち、本研究で採用した好熱菌酵素と常温菌相同酵素のアミノ酸配列の比較に基づく変異型酵素設計法が、好熱菌酵素の効率的な低温高活性化に有効であることを実証した。
- (2) 当初立てた仮説の否定ではあるが、少なくとも活性部位から 12 Å 以内の範囲であれば、アミノ酸置換部位の活性部位からの距離と低温高活性化した変異体 that 得られる確率との間に相関がないことも明らかにした。
- (3) 補酵素に対する親和性がそれほど大きく悪化していないアミノ酸置換であれば、複数のアミノ酸置換を組み合わせることによって、単独のアミノ酸置換と比べてさらに低温活性が向上した変異体 that 得られることを明らかにした。
- (4) 触媒反応の熱力学的な解析からは、低温高活性化は酵素・基質・補酵素複合体の不安定化に起因すること、この機構は常温菌酵素が低反応温度で高い活性を示す機構と同じであることを明らかにした。
- (5) 本方法で作製した変異体は好熱菌野生型酵素と比べてほとんど耐熱性が低下しなかった。したがって、好熱菌酵素の 14 倍の低温高活性化にも必ずしも耐熱性の犠牲を伴う必要はないことを明らかにした。

以上の発見は、今後、常温菌由来相同タンパク質のアミノ酸配列との比較から、耐熱性の高い好熱菌酵素を低温高活性するための設計原理を理論化するための実証データとして有効である。したがって、低温酵素高活性化設計のための理論の確立と実証データを収集という研究プロジェクトにおける当初の目標も達成した。このように、当初の研究目的を 100% 達成することができた。

さらに、活性上昇した好熱菌 IPMDH の変異アミノ酸を共通祖先アミノ残基を比較したところ、好熱菌 IPMDH のアミノ酸が共通祖先配列のアミノ酸と一致する場合、25℃の比活性が2倍以上向上する確率が高いことが明らかとなった。以上、実証データを収集し、理論研究に反映し、目標を 130% 達成した。

最後に今後の研究計画および発展性について述べる。様々な条件で安定性が高く、多くの工業用途が期待される好熱菌酵素が発見され続けているが、低温活性の小ささが問題となり、まだ十分に利用されていない。好熱菌酵素の低温高活性化の手段として用いられてきた進化分子工学は、対象酵素ごとに膨大で煩雑な実験が必要であり、簡便性と汎用性が劣る点で実用化には必ずしも適しているとは言えない。本研究で開発した設計方法は、相同アミノ酸配列の比較のみに基づいて好熱菌酵素を低温高活性化するための簡便で汎用的な低温高活性化手法の提供できる。今後、本研究で開発した設計手法を多くの好熱菌酵素に適用することによって、好熱菌酵素の工業利用を全面的に推進すると期待できる。

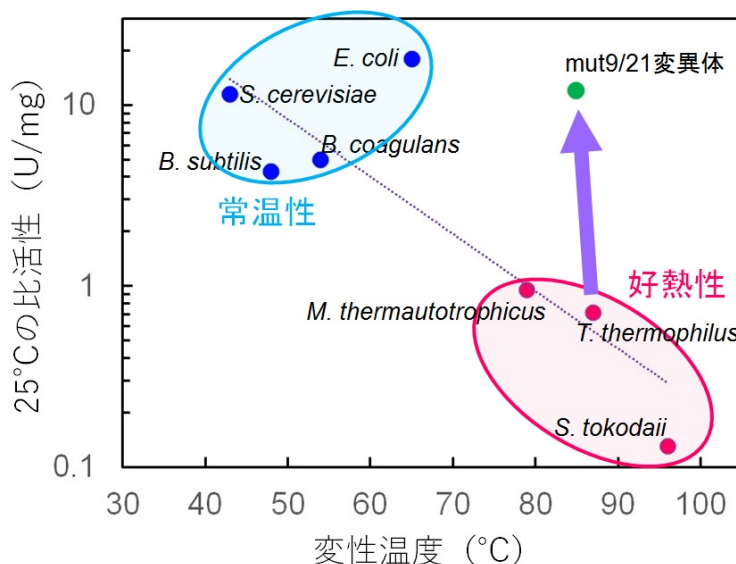


図3. 常温菌 IPMDH と好熱菌 IPMDH に見られる耐熱性と低温活性のトレードオフ。本研究で作製した mut9/21 変異体は耐熱性の犠牲なしに低温活性が向上した。

天然の好熱菌酵素は高い耐熱性を持つことが多い。しかしその反面、好熱菌酵素は低温活性が常温菌由来相同酵素と比べると著しく低いことが多い。反対に、常温生物の酵素は耐熱性が低いことが多いが、低温活性は好熱菌酵素と比べて著しく大きいことが一般的である(図3)。この天然酵素に見られる傾向から、耐熱性と低温活性の大きさの間にトレードオフがある、という考えが提唱されてきたが、実際はトレードオフの有無ははっきりしていなかった。本研究で、低温高活性化した好熱菌 IPMDH 変異体の耐熱性を調べたところ、25°Cでの比活性が 14 倍に向上した変異体の熱変性温度は、野生型酵素と比べてわずかに 2°Cしか低下していなかった。すなわち、耐熱性の低下を伴うことなく、好熱菌酵素の低温活性の大幅な向上を達成することができた(図3)。したがって、酵素の低温活性の向上には必ずしも耐熱性の低下を伴う必要がないことを実証した。このことにより、今後、天然酵素に見られる程の大きな耐熱性の犠牲無しに好熱菌酵素の低温高活性化が達成できれば、基礎研究、応用利用の両面で好熱菌酵素の利用をさらに推進できると期待できるものである。

4. 研究成果の発表

雑誌論文

1. 赤沼哲史、耐熱性酵素の創成と好熱菌酵素の低温高活性化、ファインケミカル2月号 (2017) シーエムシー出版

国際会議発表

2. Bessho M, Akanuma S, Kimura H, Yamagishi A, Improving the low-temperature activity of a thermophilic enzyme without loss of its thermostability by mutanome analysis, Extremophiles 2016, Sep. 2016, Kyoto, Japan

国内学会発表

3. 別所瑞萌、赤沼哲史、木村彦乃、山岸明彦、ミュータノーム解析による好熱菌由来 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の低温高活性化、第16回蛋白質科学会年会、2016年6月、福岡
4. 別所瑞萌、赤沼哲史、木村彦乃、山岸明彦、好熱菌イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素を用いた常温活性と耐熱性のトレードオフ仮説の検証:トレードオフ仮説は必ずしも成立しない、第39回日本分子生物学会年会、2016年11月、横浜
5. 別所瑞萌、赤沼哲史、木村彦乃、山岸明彦、相同アミノ酸配列に基づく好熱菌酵素の低温活性化、第67回生物工学会大会、2015/10、鹿児島

B-2 過酸化水素検出素子開発

太田 敏博(東京薬科大学・生命科学部・応用微生物学研究室・教授)

時下 進一(東京薬科大学・生命科学部・応用微生物学研究室・講師)

1. 当初の研究目標

過酸化水素は水と酸素に分解することから環境負荷が低い酸化剤として、パルプの漂白、排水処理、半導体の洗浄、飲料容器の殺菌剤として広く利用されている。そのため、カタラーゼ等により過酸化水素の分解を行い、その残存量をモニタリングが行われている。現在の過酸化水素センサーは主に電流検出型化学センサーであり、過酸化水素のバイオセンサーとしては大腸菌の過酸化水素センサー OxyR と 緑色蛍光タンパク質を用いた過酸化水素素子が開発され、主に細胞内のレドックス状態の感知に使用されている。

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* のタンパク質は高い耐熱性を有し、常温で高い安定性を示し、さらに有機溶剤や界面活性剤等にも高い耐性を示す。しかし、多くの場合、常温ではタンパク質の活性が高温に比べて低い。このことが工業的利用における欠点でもある。そこで本研究ではタンパク質の安定性が高く、有機溶剤や界面活性剤等にも高い耐性を示し、低温環境下でも高い活性を示す過酸化水素素子の開発を目的とした。高度好熱菌の OxyR が過酸化水素センサーとして機能しているかを明らかにする。OxyR が過酸化水素に応答して制御する遺伝子群を同定する。その制御領域を利用したレポーターアッセイ系を構築し、その活性を指標として OxyR の低温活性化に必要なアミノ酸置換を解析する。低温活性化に必要なアミノ酸置換を導入した OxyR の制御ドメインと GFP を用いたセンサーを大腸菌の OxyR と GFP のセンサーを参考にデザインし、その過酸化水素素子の耐熱性、有機溶剤や界面活性剤等に対する耐性を評価する。

2. 研究成果の概要

(1) 高度好熱菌 OxyR 遺伝子の同定

データベース検索を行なった結果、TTC1871 にコードされる遺伝子のアミノ酸配列が大腸菌 OxyR のアミノ酸配列と相同性を有していた。OxyR は LysR 転写因子ファミリーの1つであることから、他の LysR 転写因子ファミリーを含めた分子系統樹を作製し解析したところ、TTC1871 にコードされる遺伝子は OxyR のクレードに位置することが示された。OxyR 欠失変異株 (Δ oxyR 株) を作製し、その変異株の過酸化水素に対する感受性を 5mM 過酸化水素を含む培地での増殖により評価した結果、OxyR 野生型株と比較して著しい増殖の抑制が認められた(*1, 3)。以上の結果より TTC1871 は OxyR をコードしていると結論づけた。次に、OxyR 変異体の作製と機能解析を行った。大腸菌 OxyR では 199 番目と 208 番目のシステイン残基(C199 と C208)が過酸化水素の受容に重要である。高度好熱菌の OxyR は3つ

のシステイン残基を有しており、全てのシステイン残基をアラニンに置換した変異体 *oxyR* (*oxyR* C88A, *oxyR* C199A, *oxyR* C208A)を発現する変異株に対して過酸化水素に対する感受性を解析した。結果、*oxyR* C208A を発現する変異株のみが過酸化水素に対する感受性が上昇していた。このことから、高度好熱菌の OxyR は 208 番目のシステインが過酸化水素の受容に重要な働きを担っていることが明らかとなった(*1, 3)。さらに、OxyR 及び OxyR 制御ドメインの生産を、OxyR 及び OxyR 制御ドメイン (OxyR-RD) の生化学的性質を解析するために行った。OxyR 及び OxyR-RD のカルボキシル末端に 6×His タグと FLAG タグを導入した *oxyR* HF 及び *oxyR*-RD-HF 遺伝子を発現するプラスミド (pET*oxyR*-HF, pET*oxyR*-RD-HF)を構築した。この pET*oxyR*-HF もしくは pET*oxyR*-RD-HF を導入した大腸菌 BL21 を用いて、OxyR-HF と OxyR-RD-HF を生産させ、Ni-NTA カラムを用いて精製を行なった。OxyR-HF に関しては、一部可溶性画分に認められ、精製可能であった。一方、OxyR-RD-HF に関しては封入体としてのみ確認された。

(2) OxyR 標的遺伝子の探索

OxyR の低温活性化のために、標的遺伝子の制御領域を用いたレポーターアッセイ系の構築が必要である。そのため Chromosome Affinity Precipitation (CAP)法により OxyR の標的遺伝子の探索と同定を試みた。OxyR はその検出と精製を可能とするため His Tag と FLAG tag を C 末端に付加した OxyR を $\Delta oxyR$ 株にて発現させることとした。そこで、OxyR が結合する染色体上の制御領域の単離を試みた。 $\Delta oxyR$ 株では過酸化水素に対する感受性が高くなっていることさらに $\Delta oxyR$ 株は *oxyR* 野生型株と比較して過酸化水素分解能が著しく減少していたことから、抗酸化酵素遺伝子に着目した。大腸菌 OxyR が認識する配列 (ATAGN₃CTAT)に相同な配列を有する抗酸化酵素遺伝子を選び、その上流配列の PCR による増幅の有無を調べた(図1)。その結果、*oxyR* もしくは Mn カタラーゼと *bacterioferritin* (*bfr*) 遺伝子が OxyR の標的遺伝子候補としてあがった(*3, 4)。標的遺伝子候補を多数単離するために、OxyR の発現量を *bfr* 遺伝子のプロモーターを用いて増加させた(*5)。この条件で、CAP 法と PCR による解析からも同様な結果が得られた。

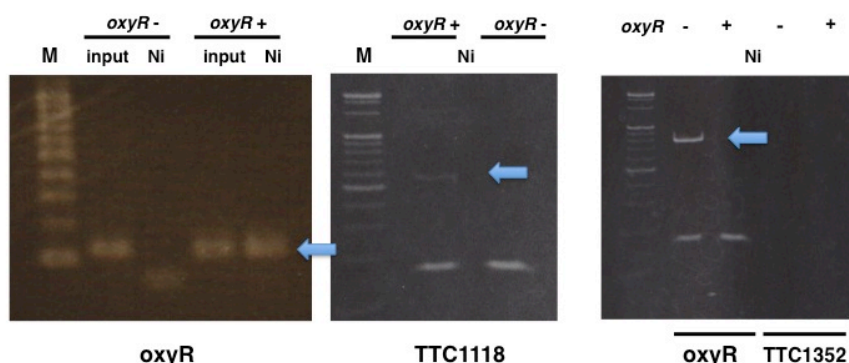


図1 高度好熱菌 OxyR の標的遺伝子. OxyR が認識する DNA 断片をアフィニティー精製後、PCR によりアッセイを行なった。矢印で示した PCR 断片が OxyR により認識される断片。oxyR 遺伝子と TTC1352 (*bacterioferritin*)遺伝子が検出された

$\Delta oxyR$ 株では過酸化水素に対する耐性が著しく減少していることから $oxyR$ 野生型株と $\Delta oxyR$ 株間で過酸化水素分解能を調べた結果、50% の分解活性の減少が認められた。一方、 $oxyR$ 野生型株野生型株において過酸化水素 (5mM) を曝露することにより 25% の過酸化水素分解活性の増加が認められた。この結果より、OxyR が制御する遺伝子群中に過酸化水素分解酵素もしくは分解に関わる低分子化合物の合成酵素遺伝子が含まれる。そこで、プロテオーム解析による OxyR 標的遺伝子の探索を行うため、両細胞抽出液を変性2次元ゲル電気泳動により解析した(図2)。 $oxyR$ 野生型株/ $\Delta oxyR$ 株 で2倍近くの増加を示す5スポット、一方、 $oxyR$ 野生型株/ $\Delta oxyR$ 株で2倍近くの減少を示す5スポット得られた(表1)。PMF 解析により Mn カタラーゼ、amidohydrolase、GAPDH、セリンメチルトランスフェラーゼが同定された。Mn カタラーゼの発現の減少は、 $\Delta oxyR$ 株の細胞抽出液の過酸化水素分解活性の減少の一つの要因である。amidohydrolase は機能未知のタンパク質、他の2つは解糖系酵素とアミノ酸合成に関わるタンパク質であった。*D. radiodurans* や大腸菌では同様な解析でカタラーゼなどの抗酸化酵素のみならず、解糖系やアミノ酸合成系の酵素遺伝子の発現が変動することが明らかとなっている。これらの結果は外因的な酸化ストレスがない状態でも内因性酸化ストレスにより OxyR が活性化していることを示唆する。当研究室のこれまでのレポーターアッセイによる Mn カタラーゼ遺伝子のプロモーター活性の解析では、 $\Delta oxyR$ 株ではプロモーター活性の減少が認められており、この結果と良く一致する結果であった(*2)。Mn カタラーゼ上流には大腸菌や *Pseudomonas* の OxyR における結合配列のコンセンサス配列に類似した配列が存在したが、その他のタンパク質をコードする遺伝子のプロモーター上流配列中には類似する配列は認められなかった。

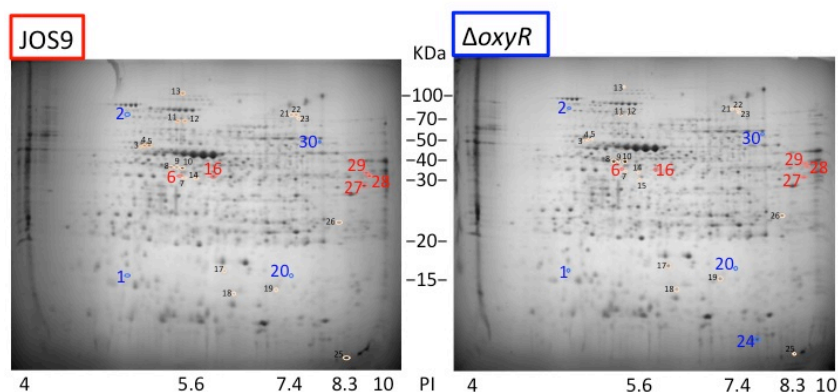


図2 $oxyR$ 野生型株と $\Delta oxyR$ 株におけるタンパク質発現パターンの2次元ゲル電気泳動

赤が $oxyR$ 野生型株(JOS9)と $\Delta oxyR$ 株間で減少するタンパク質を、青が $oxyR$ 野生型株 (JOS9) と $\Delta oxyR$ 株間で増加するタンパク質を表している。

1	16.1	4.9		3.4	
2	76.3	4.9		2.3	
6	35.1	5.3	2.7		ジペプチダーゼ
16	35.0	5.7	1.8		Mn-カタラーゼ
20	16.3	7.4		1.2	
24	10.4	7.8			$\Delta oxyR$ のみ発現
27	32.6	9.1	1.7		セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ
28	36.1	9.2	2.3		グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ
29	37.2	9.1	2.5		
30	55.2	7.9		9.2	

表1 OxyR により発現調節されるタンパク質の性質と PMF 解析による同定

(3) OxyR 標的遺伝子の機能解析

brf 遺伝子に関して、過酸化水素による酸化ストレスとの関連性を明らかにするため、欠失変異株を作製して過酸化水素に対する感受性を調べた。*brf* 遺伝子は OxyR の標的遺伝子候補になったもの以外にも少なくとももう一つ染色体上に存在する。そこで、2つの *brf* 遺伝子を欠失した変異株についても作製した。5mM の過酸化水素に対する感受性を *oxyR* 野生型株と比較した。その結果、それぞれの *brf* 遺伝子単独の欠失変異株及び両遺伝子の欠失変異株において、過酸化水素曝露による生育阻害が認められた。このことから、*brf* 遺伝子が、過酸化水素による酸化ストレス防御に関与していることが示された(*3)。過酸化水素による発現誘導が起こるのか、OxyR 依存性は認められるのかを明らかにするために、*brf* 遺伝子のプロモーター下に β -グルコシダーゼ遺伝子を挿入したレポーターアッセイ系を作製した。*oxyR* 野生型株と *oxyR* 欠失変異株について 5mM の過酸化水素曝露による発現誘導を解析した。その結果、*brf* 遺伝子の過酸化水素による発現誘導と OxyR 依存的な発現は認められなかった(*6, 7)。このことから、*brf* 遺伝子は過酸化水素による誘導は受けず、OxyR 非依存的に酸化ストレス耐性に重要な役割を担っていると考えられた。さらに *brf* 遺伝子是对数増殖期の後期から静止期に発現量が増加すること、また、栄養欠乏下で培養することでその発現量が約3倍増加することも明らかとなった。この誘導はプロモーター上流に位置する回文配列(CCCCGCCCCN_nGGGGCGGGG)による制御であることも示唆された(図3, *6, 7)。

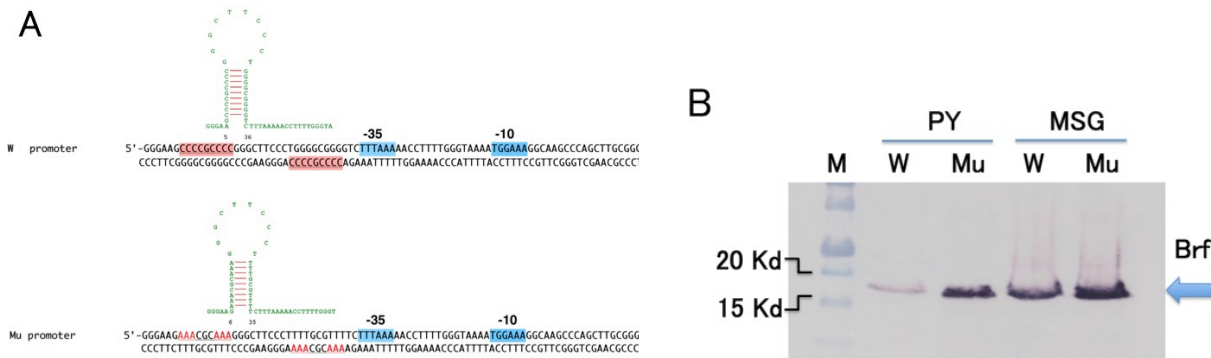


図3 A: pGLS-brf-FL (wild type)、pGLS- brf PMP-FL (mutant) のプロモーター上流配列。赤の編みかけは回文配列を示す。青の編みかけは -35, -10 を示す。赤の文字は塩基置換した塩基を示す。B: 抗 FLAG 抗体を用いた Brf タンパク質の発現解析。W: pGLS- brf P-FL /HB27, Mu: pGLS- brf PMP-FL /HB27, PY:栄養培地、MSG:最少培地

プロテオーム解析の結果、 $\Delta oxyR$ 株における過酸化水素分解活性の減少の一因は Mn カタラーゼの発現量低下によるものと考えられる。そこで *T. thermophilus* 内で Mn カタラーゼを発現させ、精製し、生化学的性質を調べることにした。His タグを C 末端側に融合した Mn カタラーゼを発現させるプラスミドを保持する菌株を作製した。Ni NTA カラムを用いて Mn カタラーゼを精製し、精製 Mn カタラーゼの酵素活性を解析した。55°C~95°Cまで温度を変化させ過酸化水素の分解活性を測定した結果、温度の上昇

とともに活性が上昇し 90°C で最も高い活性を示した。また、95°C においても十分な活性を有していた。次に pH を酸性からアルカリ性へと変化させたところ、pH 7 よりも pH 9 付近でより高い活性を示した。

3. 研究評価及び今後の研究計画

高度好熱菌の *oxyR* 遺伝子の欠損変異株や C199, C208 のアミノ酸置換変異体の解析から、過酸化水素受容に C208 が重要であることを示し、高度好熱菌の OxyR もまた過酸化水素素子として働きうることを示した(*2, 3, 4)。CAP 法と PR により OxyR の標的遺伝子が Mn カタラーゼと *bfr* 遺伝子であることを明らかにした(*2, 3, 4)。これによりレポーターアッセイ系の構築のため、OxyR の標的遺伝子を同定する目的は達成することができた。*bfr* 遺伝子欠損株が過酸化水素感受性を示したことから、*bfr* 遺伝子が酸化ストレス耐性には関与していることを明らかにすることができた(*2)。*bfr* 遺伝子が栄養欠乏下で誘導されることも明らかとなった(*5, 6)。 $\Delta oxyR$ 株では過酸化水素の分解活性が減少していることから、過酸化水素非曝露でも発現に OxyR を必要とする遺伝子が存在する可能性を新たに示す結果が得られた。*oxyR* 野生型株と $\Delta oxyR$ 株のプロテオーム解析により OxyR により発現制御をうけるタンパク質が少なくとも 10 個あることを見出した。このことは、高度好熱菌では外因的な酸化ストレスがない状態でも内因性酸化ストレスにより OxyR が活性化していることを示唆する。その中に、Mn カタラーゼが含まれ、その発現が低下することで過酸化水素分解能が低下することと相関性のある結果を得られた。これらの結果は以前の *in vivo* で OxyR が結合する DNA 中に OxyR と Mn カタラーゼ遺伝子の遺伝子間配列が存在することと良く一致する結果であった。しかしながら、当初の目的である OxyR の低温活性化に必要なアミノ酸置換を解析し、GFP との融合センサーを構築するには至らなかった。今後は、より多くの OxyR 標的遺伝子を単離し、低温活性化実験を可能にするレポーターアッセイ系の構築が必須となる。

oxyR の過酸化水素耐性への機能を解析し、その機能に高度に保存されたシステイン残基の1つ C208 が重要であることを明らかにした。これにより高度好熱菌の OxyR も過酸化水素のセンサーとして利用できることを明らかにする目的は達成された。次に、OxyR が *in vivo* で標的としている遺伝子 *bfr* 遺伝子と Mn カタラーゼ遺伝子を同定した。この点で、OxyR 標的遺伝子の同定は 100 % 達成することができた。高度好熱菌では内因性酸化ストレスにより OxyR が活性化を示唆する結果が得られた点は特に評価できる点と言える。しかしながら、OxyR の低温活性化に必要なアミノ酸置換を解析するためのレポーターアッセイ系とアミノ酸置換を施した OxyR 制御ドメインと GFP との融合センサーを構築するには至らなかった。

(問題点と克服方法)

$\Delta oxyR$ 株の過酸化水素分解能の減少をもとにプロテオーム解析を行なったが、タンパク質同定に必要なタンパク質量と分子量に満たないスポットがありタンパク質の同定解析の数が少なかった。この点は今回、同定された Mn カタラーゼ遺伝子の発現をもとにトランスクリプトーム解析を行なうことでより多くの標的遺伝子を見出すことができる。CAP 法と PCR の組み合わせによる *in vivo* での OxyR 結合の検出系が機能することも明らかとなったので、今後の多くの標的遺伝子を得ることとそこから OxyR の低温活性化に必要なアミノ酸置換を解析するためのレポーターアッセイ系に適した遺伝子の絞り込みが可能である。

(今後の研究方針)

(1)トランスクリプトーム解析による標的遺伝子探索

$\Delta oxyR$ 株と野生株間もしくは野生株での過酸化水素の曝露と非曝露による遺伝子発現の変化を RNA-seq により解析する。発現量に変化が認められる遺伝子に関して CAP 法と PCR の組み合わせによる *in vivo* での OxyR 結合を解析して低温活性化のためのレポーターアッセイ系を構築する。エラープローン PCR により、OxyR 内に突然変異を導入し、変異 OxyR を発現するプラスミドを欠損した高度好熱菌内に導入し 55°C で、過酸化水素を曝露条件下で培養し、レポーターアッセイを行なう。

(2)OxyR の制御ドメインの酸化による構造と機能の変化を解析する。

精製した OxyR 及び OxyR-RD の酸化及び還元状態での多量体の変化と DNA 結合能力の変化を非変性ゲル電気泳動やゲルシフトアッセイなどにより解析する。

(3)新たな過酸化水素センサーの探索を行なう。

高度好熱菌のカタラーゼは高濃度の過酸化水素による誘導を受けることが明らかとなっている。この誘導は、OxyR に依存しないことも明らかとなっており、新たな過酸化水素センサーによるものであることが想定される。そこで、ビオチン化したカタラーゼプロモーター DNA を用いて、この DNA に結合する転写因子を単離した。LC-MS/MS によりタンパク質をコードする遺伝子の同定を行なう。

(今後期待される研究成果)

トランスクリプトーム解析により、好気性高度好熱菌の酸化防御機構の全体像が明らかにされる可能性が高い。他の細菌よりも高い過酸化水素濃度に対して耐性を示すことから、抗酸化に関わる有用な酵素を見出すことができる。好熱菌の OxyR の常温での活性化が可能になれば、大腸菌の OxyR を使用した過酸化水素センサーを参考にすることで容易に熱安定性の高い過酸化水素センサータンパク質を得ることができる。また、OxyR 以外の新たなセンサーが見出されれば、そのタンパク質が検知できる過酸化水素の範囲は OxyR よりも高く、センサータンパク質自体の過酸化水素耐性も高いと考えられ、応用範囲が広がるものと考えられる。

4. 研究成果の発表

国際学会発表

1. Koike, H., Tokishita, S., and Ohta, T., Isolation and Analysis of the OxyR-Controlled Genes in Response to Oxidative Stress in *Thermus thermophilus* HB27. Extremophiles 2016 11th international congress extremophiles, 2016/11, Kyoto, Japan

国内学会発表

2. *橋詰信, 時下進一, 太田敏博. 好気性高度好熱菌 *Thermus thermophilus* におけるカタラーゼ遺

伝子制御因子の探索. 極限環境生物学会 2015 年度(第 16 回)年会, 2015 年 11 月, 東京

3. *小池榛菜, 比留間友宏, 時下進一, 太田敏博. 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 における OxyR 標的遺伝子の探索と機能解析. 極限環境生物学会 2015 年度(第 16 回)年会, 2015 年 11 月, 東京
4. *Koike, H., Hashizume, M., Tokishita, S., and Ohta, T. Screening and analysis of OxyR regulated genes in *Thermus thermophilus* HB27. 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015 年 12 月, 神戸
5. *大塚梨恵子, 土屋彰伸, 時下進一, 太田敏博. セルビオースによる *ccpA* 遺伝子の発現制御. 極限環境生物学会 2016 年度(第 17 回)年会, 2016 年 11 月, 神奈川
6. *小林幸平, 小池榛菜, 時下進一, 太田敏博. 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 におけるフェリチン様タンパク質遺伝子の発現制御. 極限環境生物学会 2016 年度(第 17 回)年会, 2016 年 11 月, 神奈川
7. 小林幸平, 小池榛菜, 時下進一, 太田敏博. 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 の ferritin-like protein 遺伝子の発現解析. 環境微生物系学会合同大会 2017, 2017 年 8 月, 仙台

C. 金属(金、白金等)と特異的に結合するタンパク質設計技術の開発

本研究課題では、金属に特異的に結合するタンパク質の設計技術の開発を行う。実験研究では、フェージディスプレイを用いてランダム化した配列の中から、金属結合配列の選択をおこない、その特徴を抽出する。理論研究では、金属(金、白金等)と特異的に結合するタンパク質設計技術開発をおこなう。具体的には、実験により明らかになった白金電極に野生型に比べ強く結合する LARFH タンパク質を分子動力学法に基づき解析し、白金に強く結合する機構を解明する。

C-1 金属(金、白金等)と特異的に結合するタンパク質設計技術の開発(理論)

宮川 毅(東京薬科大学・情報教育研究センター・生命物理科学研究室・助教)

森河良太(東京薬科大学・生命科学部・生命物理研究室・講師)

高須昌子(東京薬科大学・生命科学部・生命物理研究室・教授)、

内田達也(東京薬科大学・生命科学部・生命分析化学研究室・准教授)、

山岸明彦(東京薬科大学・生命科学部・極限環境生物化学研究室・教授)

1. 当初の研究目標

これまでの実験研究によって、LARFH タンパク質と呼ばれるタンパク質のループ部分にランダム配列を導入したライブラリーが作製された。そのライブラリーから白金に強く結合する配列が選択された。その配列はアミノ酸の1文字表示で YKRGYK という配列を持っていた。野生型 LARFH と白金結合同型 LARFH との白金への総結合量の差から野生型は白金表面に対し横倒しに、白金結合同型 LARFH は垂直方向を向いて YKRGYK ループ部分で白金と結合することが推定されていた。極限環境生物化学研究室、生命分析化学研究室により、白金結合同型 LARFH のループ部だけを抜き出した白金結合同型ペプチド(YKRGYK)に対してアラニンスキャンの手法をもちいて白金結合に重要なアミノ酸の評価が行われた。その結果、いずれのアミノ酸も白金結合に寄与していることが分かった。その中でも LARFH では Y1(YKRGYK の内の一番目の Y、以下同様)、Y5、K6 の関与がより強く、ペプチドでは R3、K6 の関与がより強いことが分かった。

実験から得られたペプチドと白金の結合解離定数から結合自由エネルギーを見積もると、白金結合同型と白金結合同型の結合エネルギーの差は水素結合(生体分子における水素結合)未満であると推定された。

そこで、本研究課題では金属(金、白金等)と特異的に結合するタンパク質設計技術開発をおこなう。具体的には、極限環境生物化学研究室及び生命分析化学研究室の実験により明らかになった、野生型に比べ白金電極に優位に結合する LARFH タンパク質の変異型を分子動力学法で解析し、白金に優位に結合する機構を解明する。

2. 研究成果の概要

1) 実験結果から

実験結果から得られた野生型と変位型の白金への総結合量の差から野生型は白金表面に対し横倒しに、変異型は垂直方向へ結合することがすでに推定されていた。極限環境生物学研究室、生命分析化学研究室により、さらに白金結合同型 LARFH タンパク質とその変異を導入したループ部だけを抜き出した白金結合同型に対してアラニンスキャンによる重要アミノ酸の評価が行われいずれのアミノ酸も重要であることが分かった。その中でも LARFH に関しては Y1, Y5, K6 の関与がより強く、ペプチドに関しては R3, K6 の関与がより強いことが分かった。

実験から得られた結合の解離定数の差から野生型と変異型の結合自由エネルギーの差を見積もった。これにより白金結合同型 LARFH でも白金結合同型ペプチドでも白金との結合の強さのアラニンスキャンによる差は水素結合 (生体分子におけるいわゆる弱い水素結合) 程度未満であると確認された。

2) 分子動力学シミュレーション

分子動力学シミュレーションの計算結果を以下に示す。計算結果のうち、2-1①は生命物理科学研究所の野本美咲(2016 年度4年生)が担当した。それ以外は、生命物理科学研究所の渡部真央(修士1年)が担当した。

2)-1. 一分子 LARFH および一分子ペプチドの水溶液中でのシミュレーション

白金結合同型 LARFH およびアラニン置換型 LARFH のモデル構造を Lac Repressor 4 量対の 4 ヘリックスバンドル部の結晶構造をもとにして作成し、分子動力学シミュレーションの初期構造とした。白金結合同型ペプチドとアラニン置換型ペプチドに対しては直鎖状のモデル構造を作成し、分子動力学シミュレーションの初期構造とした。300 K, 1bar の下で 100 ns 分子動力学シミュレーションを実行し軌道を保存した。初期構造を基準とする根二乗平均変位と慣性半径の時間経過を計算することにより LARFH タンパク質の全体構造の安定性を解析した。シミュレーション中の平均構造からの平均の揺らぎをペプチドおよび LARFH のループ部の各残基の C α 原子について計算し、主鎖構造のうち、どの残基が揺らいでいるかを解析した。

これにより次の点が確認された。

① アラニン置換型 LARFH のうち Y1A, Y5A, K6A の結合力が実験で低いと評価されたことと水溶液中のシミュレーションでの解析結果との関連性が次のように見られた。Y1A の結合力が弱いのはループの平均構造が白金結合同型および他のアラニン置換型と大きく異なり、ループのゆらぎが白金結合同型および他のアラニン置換にくらべ大きいことに起因している。ループにおける RMSF を図 1 に示す。

Loop部位のRMSFによる解析(C α)

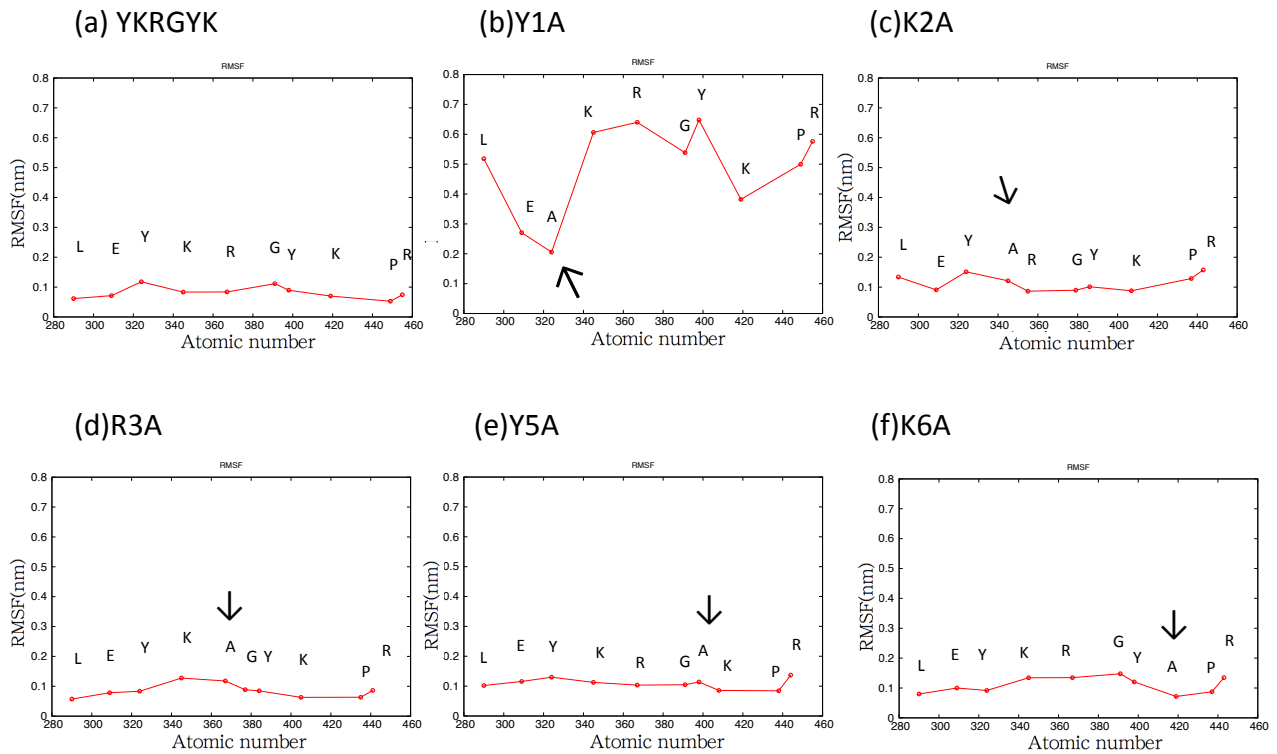


図 1. LARFH のループに含まれるに C α についての RMSF の解析結果。Y1A のループ構造に変化の表れた 10-100ns 範囲で解析を行った。

Y5A, K6A の結合力が弱いのはループの C 末端の主鎖の向きが白金結合型および他のアラニン置換型とは異なり、ループ部の側鎖が隣のループの側鎖に拘束される時間が長くなることに起因している。例として Y5A のループの様子を図 2 に示す。

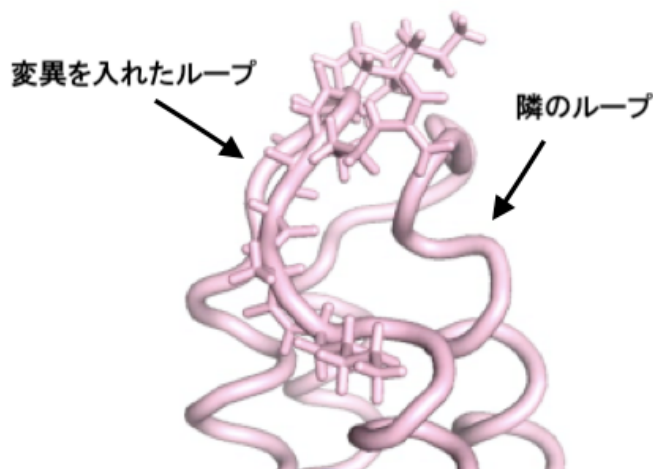


図 2. Y5A のループ部の側鎖が隣のループの側鎖に拘束された時のスナップショット。

② アラニン置換型ペプチドのうち R3A, K6A の結合力が実験で低いと評価されたことと水溶液中のシミュレーションでの解析結果との関連性が次のように見られた。R3A の結合力が弱いのは非置換のグリシンだけが折れ曲がるのが決まってお他の部分の構造はランダムであることに起因する。K6A の結合力が弱いのは全体の構造がランダムコイルである時間が長いことに起因する。DSSP による二次構造予測の結果を図 3 に示す。

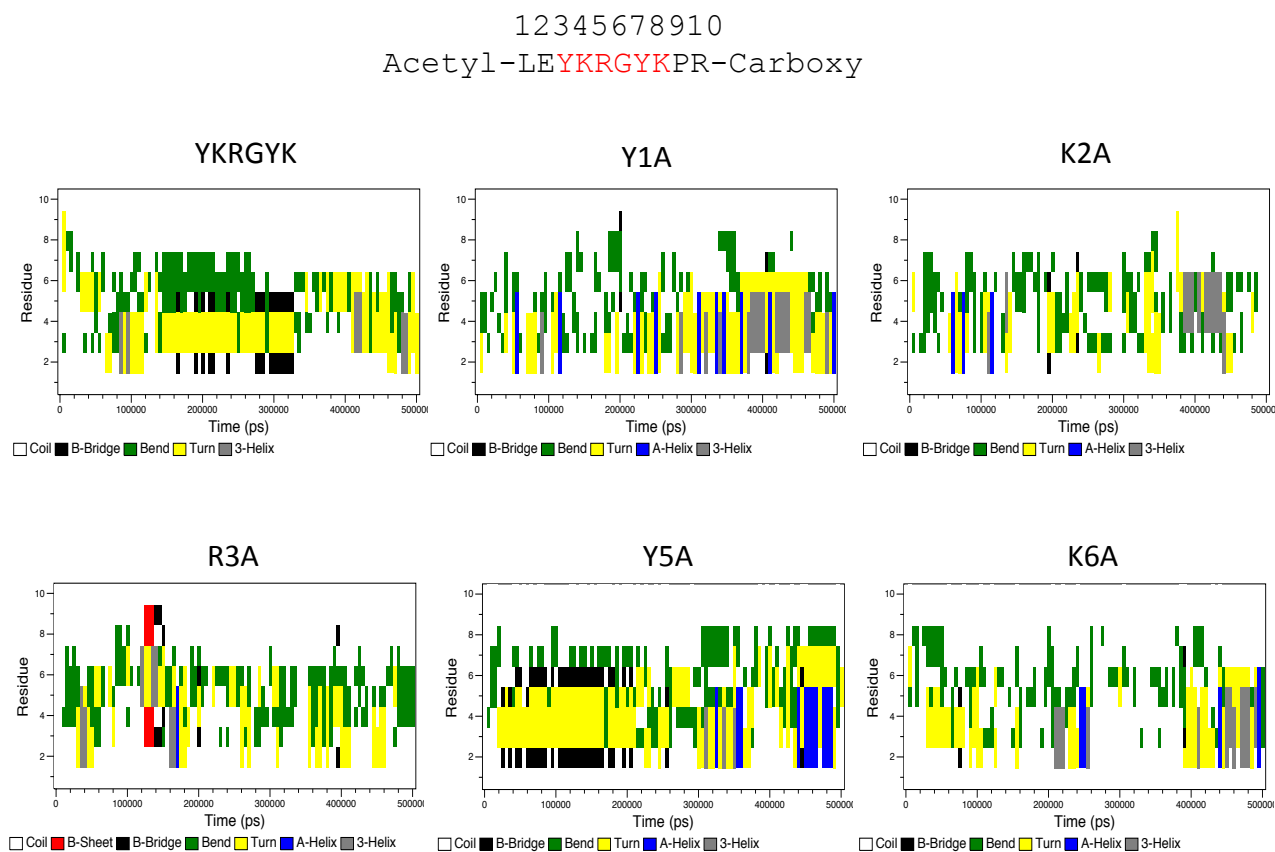


図 3. DSSP による二次構造予測の結果。

2)-2. 一分子ペプチドの水-金界面への接着のシミュレーション

次に白金結合型ペプチドとアラニンスキャンペプチドに対して、金表面とアミノ酸、炭化水素などの相互作用を表す力場 GolP を導入することにより、金表面、水、ペプチドからなる系での分子動力学シミュレーションを実施し、金表面とペプチドの接着の様子を金表面と原子の距離の時系列をもとに解析した。

さらに、アンブレラサンプリング法を用いて白金結合型ペプチドと金表面、アラニン置換型 Y5A ペプチドと金表面の結合自由エネルギーをそれぞれ計算し、白金結合型ペプチドでは 30.54 kcal/mol、Y5A ペプチドでは 45.60 kcal/mol という値を得た。この結果から、水溶液中では Y5A ペプチドの方が白金結合型ペプチドよりも強く金表面と結合するといえる。実験とは異なる結果となったが、シミュレーションにおいては尿素を加えていないことが原因として考えられる。

2)-3. 一分子 LARFH の水-金界面への接着のシミュレーション

白金結合型 LARFH とアラニン置換型 Y5A LARFH に対しても、金表面とアミノ酸、炭化水素などの相互作用を表す力場 GoIP を導入することにより、金表面、水、ペプチドからなる系での分子動力学シミュレーションを実施し、金表面と LARFH の接着の様子を金表面と原子の距離の時系列をもとに解析した。

これにより次の点を確認された。白金結合型 LARFH はループで金表面に対して垂直方向に接着したが、アラニン置換型 Y5A LARFH はループおよびヘリックスの側面で金表面に対して横倒しに接着した。いずれかの金原子と LARFH に含まれるアミノ酸残機ごとの最近接距離に関する解析結果を図 4 に示す。白金結合型 LARFH は残基番号 18-27 および 68-77 のループ部で金表面と結合していた。Y5A LARFH はループ部で結合せず、ヘリックス部で結合していることが確認された。金表面に結合した白金結合型 LARFH および Y5A LARFH の様子を図 5 に示す。

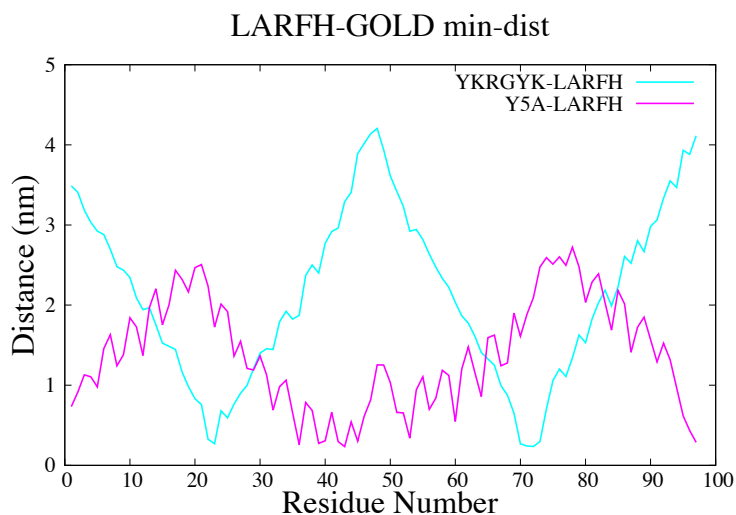


図 4. いずれかの金原子と LARFH に含まれるアミノ酸残機ごとの最近接距離に関する解析結果。

(a) 白金結合型 LARFH

(b) Y5A LARFH

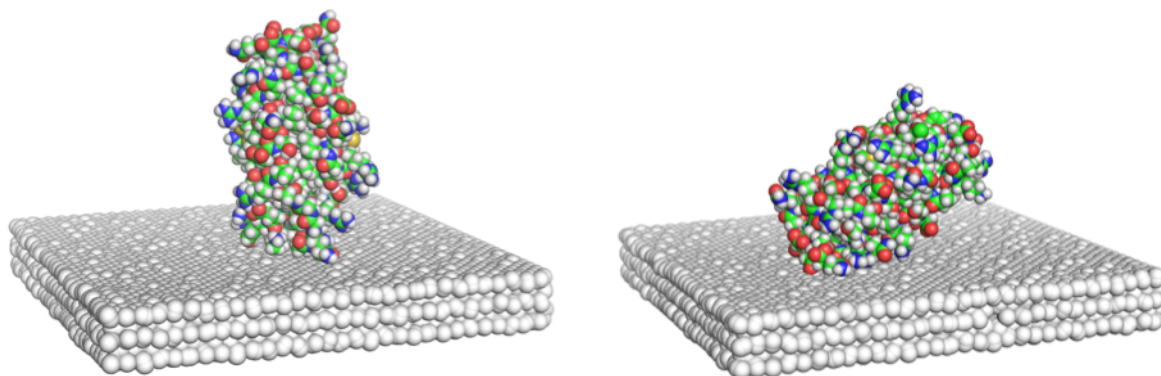


図 5. 金表面に結合した、(a) 白金結合型 LARFH および (b) Y5A LARFH の様子。下部に敷き詰められているのが金で、水分子は表示していない。

さらに、アンブレラサンプリング法を用いて白金結合型 LARFH と金表面、アラニン置換型 Y5A LARFH と金表面の結合自由エネルギーをそれぞれ計算し、白金結合型 LARFH では 13.52 kcal/mol、Y5A LARFH は 36.15 kcal/mol という値を得た。この結果から、水溶液中において Y5A LARFH は白金結合型 LARFH に比べて接着面積が大きいため、より強く金表面と結合するといえる。実験とは異なる結果となったが、シミュレーションにおいては尿素を加えていないことが原因として考えられる。

3. 研究評価及び今後の研究計画

金属（金、白金等）と特異的に結合するタンパク質設計技術開発について、タンパクの結合面が異なる可能性を示唆できた。このことにより将来、実証データを含めた金属結合タンパク質設計技術を巧緻化することが十分期待できるものとなった。実験と結合の強さが逆になったのは実験では尿素溶液中での接着の剥がれやすさを測定しているためだと予測される。尿素を導入したシミュレーション、結合自由エネルギーの計算は実行中であり、近い将来に結果が得られる予定である。

4. 研究成果の発表

雑誌論文

1. M. Watabe, H. Yamada, T. Miyakawa, R. Morikawa, M. Takasu, T. Uchida, A. Yamagishi, Structural Analysis of Metal-Binding Peptides Using Molecular Dynamics, accepted for publication in *8th International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics Proceedings* (2018).

国際シンポジウム講演

2. M. Watabe, H. Yamada, T. Miyakawa, R. Morikawa, M. Takasu, T. Uchida, A. Yamagishi, Structural Analysis of Metal-Binding Peptides Using Molecular Dynamics, *8th International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 2018/1 明治大学, 口頭発表

国内学会発表

3. 渡部真央, 山田寛尚, 宮川毅, 森河良太, 高須昌子, 内田達也, 山岸明彦「水溶液中および金表面上における金属結合ペプチド構造の分子動力学法を用いた研究」日本物理学会第年会, 2017 年 3 月, 大阪
4. 渡部真央, 山田寛尚, 宮川毅, 森河良太, 高須昌子, 内田達也, 山岸明彦「水溶液中および金表面上における金属結合ペプチド構造の分子動力学法を用いた研究」日本物理学会第年会, 2017 年 9 月, 岩手
5. 渡部真央, 山田寛尚, 宮川毅, 森河良太, 高須昌子, 内田達也, 山岸明彦「水溶液中および金表面上における金属結合型タンパク質の分子動力学法を用いた研究」日本物理学会第年会, 2018 年 3 月, 東京

C-2 実証(梅村知、宮川): 白金と結合する多種の配列の取得と解析

山岸明彦 (東京薬科大学・生命科学部・極限環境生物学研究室・教授)

内田達也 (東京薬科大学・生命科学部・分析化学研究室・准教授)

梅村知也 (東京薬科大学・生命科学部・分析化学研究室・教授)

赤沼哲史 (早稲田大学・極限環境生命科学研究室・准教授)

八木創太 (東京薬科大学・生命科学部・極限環境生物学研究室・研究員)

1. 当初の研究目標

酵素やタンパク質は、高い特異性を持つ分子間相互作用、環境の変化やリガンドとの結合による柔軟な構造変化など、堅い無機材料にはない性質が備わっており、機能性材料やセンサーの素子として優れた潜在的な能力を有する。しかし、タンパク質や酵素のバイオセンサーやバイオデバイスにおける機能素子としての用途拡大には、タンパク質を他の分子(金属材料や他のタンパク質)と相互作用させる必要がある。

高機能バイオセンサーを開発するための課題は、センシングタンパク質の電極への安定的結合手法の開発である。従来のセンシングタンパク質の電極への結合方法として、ポリアクリルアミドを接着剤として用いる方法や、タンパク質の末端にタグを付ける方法がしばしば採用されてきた。しかし、タンパク質の末端は、タンパク質の活性部位から離れた場所にあることも多い。したがって、これらの方法では、常に望む方向でタンパク質を電極に結合できるわけではない。高機能なバイオセンサーを構築するためには、タンパク質の活性部位近傍で、直接電極と結合させることが望ましい。本研究では、タンパク質表面の任意の領域に、電極の成分である白金との結合部位を創出するための設計手法を開発することを目的とする。この目的を達成するため、たくさんの異なった子孫の中から最適者を選択するという進化の原理を利用する。すなわち、ランダムなアミノ酸配列の中から、センシングタンパク質の活性部位近傍のループ領域に埋め込むことができ、電極の成分である白金と結合する配列を探索する。このような手法を用いて白金と結合する多数の配列を取得し、その解析から理論設計のデータを作ることを当初の目的とした。

3. 研究成果の概要

1. 白金結合型タンパク質の創出

我々はこれまでに、人工 four-helix bundle タンパク質 LARFH(Akanuma *et al.*, *J. Biochem.* 2010)のループの一つに白金結合部位を創出した、白金結合型 LARFH を開発した。LARFH を構成する4本の α ヘリックスを連結する3つのループのうちの最も N 末端側のループに含まれる Ser-Gly-Gln-Gly-Gly-Ser (SGQGG)配列をランダム配列に置換したライブラリーを作製し、T7 フェージディスプレイ法を用いて白金結合能を有する LARFH 変異体を選択した。選択したクローンを 97 種ランダムに DNA 配列確認を行なったところ、Tyr-Lys-Arg-Gly-Tyr-Lys (YKRGYK) 配列をループ上に持つ LARFH 変異体が 50 クローン確認

できた(*1-7)。

2. LARFH 改変体と白金との相互作用解析

そこで、YKRGYK 配列を持つ LARFH 改変体を精製し白金との結合をフロー型水晶振動子マイクロバランス(F-QCM)測定によって解析した。その結果、野生型 LARFH も白金と解離定数 31 nM で結合するが、白金結合型 LARFH 改変体は野生型 LARFH と比べて白金との親和性が 3 倍向上しており、解離定数は 10 nM であった。また、金との相互作用を F-QCM を用いて解析したところ、野生型 LARFH と白金結合型 LARFH 改変体は同様に金との結合が観察された(*1-7)。

F-QCM 解析により、野生型 LARFH1分子あたり 11 nm²、白金結合型 LARFH1分子あたり 7.9 nm²の面積で白金と結合していることが分かった。この結果から、野生型 LARFH は four-helix bundle 中の α ヘリックス構造で白金と結合し、白金結合型 LARFH はループ構造で白金と結合していることが推定できた。また、金基板上に結合した構造を原子間力顕微鏡で観察を行ったところ、野生型 LARFH は平均高さが 3.4 nm、白金結合型 LARFH は平均高さが 4.8 nm であった。この結果からも、野生型 LARFH は α ヘリックス構造で、白金結合型 LARFH はループ構造で金属基板へと結合していることが示唆された(*1-8: 図1)。

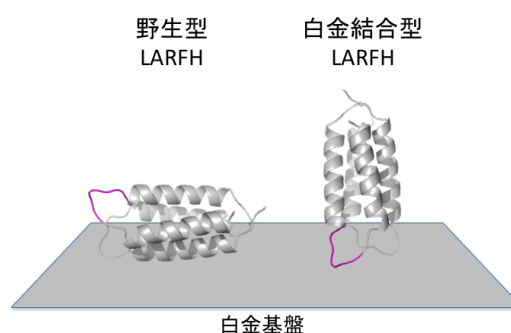


図 1. 野生型 LARFH と白金結合型 LARFH の白金基板上への結合形態モデル

3. 白金結合型ペプチドの解析

白金結合アミノ酸配列 YKRGYK と野生型 LARFH のループ配列 SGQGGS 配列を含む 10 アミノ酸ペプチドの白金との結合を F-QCM によって測定した。野生型ループ配列である SGQGGS を含む 10 残基ペプチドの F-QCM 測定では、白金との結合を示す周波数変化が見られなかった。一方、YKRGYK 配列を含む 10 残基ペプチドの F-QCM 測定では周波数変化が見られ、解離定数は 5.9 μ M であった。すなわち、YKRGYK 配列は LARFH のループ中に存在する場合に限らず、前後2残基を加えた 10 アミノ酸残基ペプチドとして合成した場合でも、白金結合特性を持つことを明らかにした(*1-7)。さらに、YKRGYK 配列中の白金結合に寄与するアミノ酸残基を同定するため、YKRGYK 配列中の一つのアミノ酸をアラニンに置換し、その白金結合特性を解析するアラニンスキヤニング解析をおこなった。その結果、5つのアラニン置換型ペプチドの白金に対する解離定数は、YKRGYK 配列を持つ 10 残基ペプチドの白金に対する解離定数よりも悪化していた。したがって、YKRGYK 配列と白金との結合には、少数のアミノ酸が決定的に寄与しているのではなく、むしろ、YKRGYK 配列中のグリシンを除く複数あるいはすべてのアミノ酸残基が白金との結合に関わっていることを明らかにした。

また、6番目の Lys、3番目の Arg、2番目の Lys、1番目の Tyr、5番目の Tyr の順番に白金結合に重要であることが分かった。つまり、Lys や Arg 等の正電荷アミノ酸の存在が白金との相互作用に重要であることが示された(*1-7)。白金基板は洗浄時に硫酸を含むピランハ溶液で洗浄する必要がある。硫酸イオンは白金表面と相互作用しやすいことが知られているため、ピランハ溶液で洗浄した白金基板も硫酸イオンが沈着している可能性がある。そのため、正電荷アミノ酸が、負に帯電した硫酸イオンと相互作用し、その結果、白金表面との強い結合を生じたと推定できる(図2)。

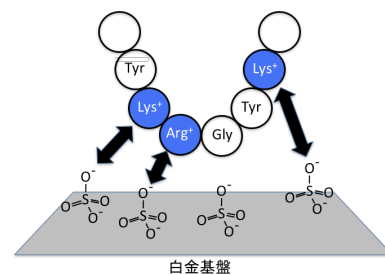


図 2. YKRGYK 配列の白金への結合様式モデル

3. 研究評価及び今後の研究計画

白金と強く結合する LARFH タンパク質改変体を同定した。この改変体はループ上に YKRGYK 配列を持っており、ループ構造を介して白金と結合することが推定された。

YKRGYK を含む 10 残基ペプチドも白金と結合した。したがって、LARFH 中に存在する場合に限らず、10 アミノ酸残基ペプチドとして合成した場合でも、白金結合能を持つことを明らかにした。

アラニンスキャニングを行なった結果、YKRGYK 配列の中でも特に正電荷アミノ酸が白金との結合に大きく寄与していることを見出した。

バイオセンサーで用いられる酵素を部位特異的に電極基板状に固定化することで、より高感度なセンサーの開発が期待できる。また、本手法はタンパク質分子表面に普遍的に存在するループ構造を結合面の土台とするため、他のタンパク質への適用が期待できる。つまり、他の有用な酸化還元酵素に対して結合面を移植することで、幅広いバイオセンサーの開発が期待できる。

4. 研究成果の発表

原著論文

1. *Yagi S., Akanuma S., Kaji A., Niuro H., Akiyama H., Uchida T., Yamagishi A., Selection of a platinum-binding sequence in a loop of a four-helix bundle protein, *J. Biosci. Bioeng.* 125(2): pp 192-198 (2018)

国際学会発表

2. *Kaji A., Niuro, H., Akanuma, S., Uchida, T., Yamagishi, A., Designing of a novel platinum-binding amino acid sequence on a protein surface, The 29th Annual Symposium of Protein Society, 2015/7/22-25, Barcelona

国内学会・シンポジウム発表

3. *梶亜純、新納寛也、赤沼哲史、内田達也、山岸明彦、タンパク質上の白金結合ヘリックス間ループ

配列の選択と解析、第 67 回生物工学会大会、2015/10、鹿児島

4. *梶亜純、新納寛也、赤沼哲史、内田達也、山岸明彦、フロー型水晶振動子マイクロバランスを用いた白金結合アミノ酸配列の解析、**BMB2015**、2015/12、神戸八木創太、梶亜純、赤沼哲史、内田達也、山岸明彦、バイオナノテクノロジー：タンパク質-タンパク質結合とタンパク質-金属結合の創成、第 5 回医薬工 3 大学包括連携推進シンポジウム、2016/6、東京
5. *八木創太、梶亜純、赤沼哲史、内田達也、山岸明彦、バイオナノテクノロジー：タンパク質-タンパク質結合とタンパク質-金属結合の創成、第 5 回医薬工 3 大学包括連携推進シンポジウム、2016/6、東京
6. *八木創太、梶亜純、新納寛也、内田達也、赤沼哲史、山岸明彦、白金結合アミノ酸配列の創出と解析、第89回生化学会大会、宮城、2016/9
7. *八木創太、梶亜純、新納寛也、内田達也、赤沼哲史、山岸明彦、4ヘリックスバンドルタンパク質上への金属およびタンパク質間結合面の設計、第39回分子生物学会年会、横浜、2016/12

C-3 応用:導電性タンパク質を利用した新規バイオプロセスの開発

渡邊 一哉(生命エネルギー工学研究室・教授)

高妻 篤史(生命エネルギー工学研究室・助教)

1. 当初の研究目標

近年、電極との電子授受(電流)を介してエネルギーを獲得し、増殖する微生物(electrochemically active bacteria; EAB)が相次いで発見されている。EABには *Shewanella* 属の金属還元菌や *Acidithiobacillus* 属の鉄酸化細菌等が含まれ、これらの微生物はシトクロム c 等の導電性タンパク質から構成される電子伝達経路(細胞外電子伝達経路)を介して電極と電子の授受を行い、電極を電子供与体、もしくは電子受容体として呼吸を行うことによって増殖に必要なエネルギーを獲得する(図1)。EABはその特異な代謝形態から学術的にも興味深い研究対象であるとともに、微生物による電力生産(微生物燃料電池)や、微生物への電子注入による物質生産(微生物電気合成)、バイオ電気化学センサー、導電性ナノ繊維等、様々な有用技術への応用可能性を秘めており、新たなバイオプロセス開発のブレイクスルーとなると期待されている。我々のグループでは、EABの有する導電性タンパク質を利用し、さらにタンパク質工学の技術を活用することによって新たな有用ナノバイオエレクトロニクスプロセスを構築することを最終目標とした。具体的には、i) バイオエレクトロニクスに利用可能な電子伝達タンパク質(導電性タンパク質および酸化還元酵素)を同定し、これらのタンパク質と金属(電極)との電気的な相互作用を促進するための手法を開発すること、および ii) 電子伝達タンパク質の電子伝達特性を評価し、有用プロセスを構築することを目指した。

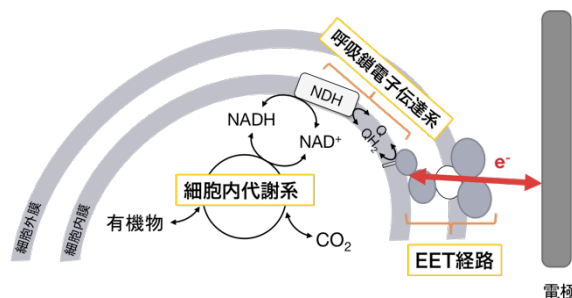


図1. 細胞外電子伝達(EET)経路の模式図

2. 研究成果の概要

2.1. *Shewanella* 属細菌の電子伝達タンパク質が触媒可能な電気化学プロセスの探索

EABが持つ電子伝達タンパク質(基質酸化還元酵素や外膜シトクロム)を利用すれば、高性能なバイオエレクトロニクス(バイオ電気化学センサーや物質変換システム)を創出できると考えられた。しかし、EABにおいてどのタンパク質がこれらのプロセスへの利用に適しているのか、またどのような基質を感知・変換可能なのかについては知見が不足していた。そこでまずEABにおいてバイオエレクトロニクスに利用可能なタンパク質の探索と同定を行った。具体的にはEABとして *Shewanella oneidensis* MR-1 株と *S. loihica* PV-4 株の2株を選定し、これらの株が持つ酵素が触媒できる電気化学反応を探索した。

S. oneidensis MR-1 株はEABのモデル菌株として最もよく研究されており、細胞外膜シトクロムの結晶

立体構造が明らかにされるなど(図 2)、センサー開発の基盤となる知見がある程度蓄積している。また *S. loihica* PV-4 株は MR-1 の近縁株であるが、MR-1 株とは外膜シトクロムやペリプラズム中の酸化還元酵素の構成が異なり、優れた電流生産能力を有している。*Shewanella* 属細菌は外膜と内膜間のペリプラズム空間に可溶性の酸化還元酵素とシトクロムを高密度に含むことが知られており、これらのタンパク質を介して様々な酸化還元反応を触媒し、電流を生成することが可能であると考えられる。しかし、*Shewanella* が有機物を分解して電流を生成する性質については非常に詳しく調べられているが、それ以外の化合物(無機イオン化合物等)の酸化・還元に伴って電流が生じるのかについては不明であった。そこで *Shewanella* のタンパク質を利用したバイオエレクトロニクスの開発に向け、上記の 2 株が無機イオンの存在下で電流を生成する能力を持つのかについて検証した。

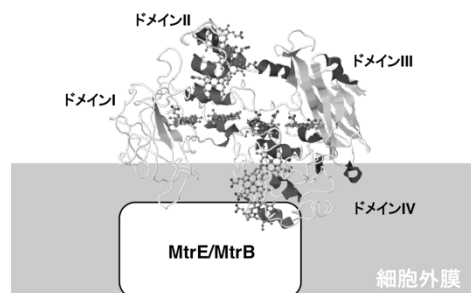
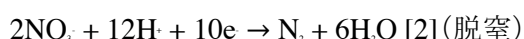


図 2 細胞外膜シトクロム(MtrF)の立体構造

無機イオンのなかでも、アンモニウムイオンや硝酸イオン等の無機窒素化合物は水質検査の調査項目であるため、これらの物質をバイオセンサーの対象化合物として需要が高い。そこでこれらの無機窒素化合物を添加した際の電流生成量を測定した。

2.1.1. 硝酸イオン添加時の電流生成

S. oneidensis MR-1 株と *S. loihica* PV-4 株は共に硝酸還元能力を持ち、有機物の酸化に伴って硝酸イオンを還元し、呼吸(硝酸呼吸)を行うことが知られている。硝酸還元酵素の種類は 2 株の間で異なり、MR-1 株は硝酸からアンモニウムイオンを生成する反応(反応式[1]; 呼吸的アンモニア生成)を触媒する酵素、PV-4 株は呼吸的アンモニア生成酵素に加えて脱窒(反応式[2])を行う酵素を持つ。



これらの反応を触媒する酵素は細胞内膜やペリプラズムに局在するが、EET 経路とは内膜呼吸鎖やペリプラズムの可溶性シトクロムを介して電気化学的につながっている(図 3)。したがって硝酸還元に必要な電子を電極から供給することが可能であると予想し、これを 3 電極式の電気化学セルを用いて検証した。

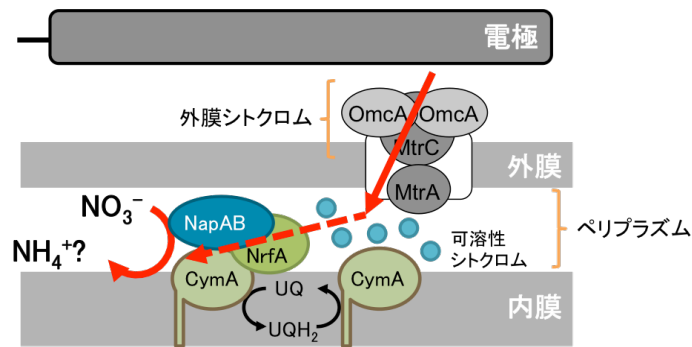


図3 予想される硝酸還元経路

作用極電位を -0.6 V (vs. Ag/AgCl) に設定し、無機電解質培地に MR-1 株または PV-4 株の細胞と 10 mM NaNO_3 を添加したところ、 NaNO_3 の添加直後から負の電流(カソード電流)が生じた。この結果は、電極から *Shewanella* 細胞を介して硝酸イオンへと電子が移動したことを示している。MR-1 株と PV-4 株を比較すると、MR-1 株よりも PV-4 株のほうが多くのカソード電流を生じた。この理由は不明だが、上述した細胞外膜シトクロムや硝酸還元酵素の構成の違いが関係していると思われる。

2.1.2. アンモニウムイオン添加時の電流生成

3 電極式の電気化学セルを用いて作用極電位を $+0.4\text{ V}$ (vs. Ag/AgCl) に設定し、セル内の無機電解質培地に MR-1 株または PV-4 株の細胞と $10\text{ mM NH}_4\text{Cl}$ を添加したところ、MR-1 株を加えた場合のみ、 NH_4Cl 添加直後に微弱な電流が流れた。この結果から、アンモニアが MR-1 株によって酸化され、生じた電子が電極に伝達されたことが示された。

MR-1 株は呼吸的アンモニア生成に関与する酵素を持つが、本株のゲノムからは硝化細菌やアナモックス細菌が持つようなアンモニア酸化酵素をコードする遺伝子は見つかっていない。したがって本株によるアンモニア酸化には未知の機構が関与している可能性が考えられた。

上記の結果から、*Shewanella* 細胞が電極への電子伝達、または電極からの電子供給を伴って無機窒素化合物を酸化、あるいは還元できることが示され、当初の目標を達成した。これにより、*Shewanella* の持つタンパク質を利用すれば窒素化合物を測定可能な酵素センサーを構築できる可能性が示された。MR-1 株と PV-4 株を比較した場合、PV-4 株のほうが多くのカソード電流を生じ、効率的に硝酸を還元することが明らかとなった。したがって、硝酸還元に関しては PV-4 株の酵素を用いたほうが高感度のセンサーを構築できる可能性がある。

Shewanella はペリプラズムに多数の酸化還元酵素とシトクロムを含み、外膜シトクロムとつながる多様な電子伝達ネットワークを形成していることが知られている。したがって *Shewanella* は窒素化合物以外にも様々な物質を電極を用いて酸化・還元する能力を備えていると思われる。この電子伝達ネットワークを模し、タンパク質工学の技術によって酵素センサーをデザインすれば、様々な基質に応用可能な高性能のバイオ電気化学センサーが構築できると期待される。

2.2. EAB の電子伝達タンパク質を利用した有用電気化学プロセス構築のための基盤研究

前項の研究において、我々は *Shewanella* 属細菌が持つ電子伝達タンパク質のバイオ電気化学センサーへの応用可能性を検証した。その結果、*S. loihica* PV-4 株は硝酸イオン存在下で電流(カソード電流)を生じることが明らかになり、本株は電極からの電子を受容して硝酸を還元する能力を持つことが示された。硝酸還元後の生成物は不明であったが、PV-4 株は硝酸を窒素ガスまで還元する酵素群(脱窒系)を持つため、これらの酵素により窒素ガスに変換されている可能性が考えられた。硝酸イオン等の無機窒素化合物は水質検査の調査項目であり、本成果はこれらの物質を低コストかつ簡便に検出できる手法の開発につながると期待される。一方、硝酸を電気化学的に還元し、窒素ガスまで変換することが可能であれば、下水等から富栄養化の原因となる窒素分を除去するシステムにも応用できると考えられた。

一方、同じく EAB として知られている *Acidithiobacillus* 属細菌(*A. ferrooxidans* ATCC23270 株)の行う電気化学反応については未検証であった。*A. ferrooxidans* のゲノム解析の結果、本株は電極からの電子を受容し、大気中の窒素ガスをアンモニウムイオン(NH_4^+)まで還元する能力を持つことが予想された。窒素ガスからのアンモニア生産は化学肥料を合成し食糧を生産するために必須であり、現在ハーバー・ボッシュ法により工業的に行われている。しかしハーバー・ボッシュ法は高温・高圧の反応条件を必要とし、莫大なエネルギー(化石燃料)が投入されている点が課題となっている。*A. ferrooxidans* を用いて電気化学的なアンモニア生産が実現すれば、ハーバー・ボッシュ法を代替し、循環型社会の構築に大きく貢献できると期待された。

そこで本項では EAB (*S. loihica* PV-4 株と *A. ferrooxidans* ATCC23270 株)の有する有用タンパク質の機能を解明するため、これらの微生物が触媒する電気化学反応についてさらに詳細な解析を行った。本年度は導電性タンパク質からの電子伝達による窒素変換反応に焦点を当て、EAB の有する窒素変換酵素の機能同定と活性制御のメカニズム解明を目指して研究を行った。具体的には、1) *S. loihica* PV-4 株の硝酸還元生成物の同定と硝酸還元最適電極電位の探索、および 2) *A. ferrooxidans* ATCC23270 株の窒素固定制御系の解明を行い、電極と導電性タンパク質を利用した窒素変換プロセスの実現に必要な基礎的知見を得た。

2.2.1. *S. loihica* PV-4 株を用いた電気化学的硝酸還元

現在、下水処理施設において、微生物を利用した窒素除去法(A2O 法等)が広く利用されている。しかし、これらの手法は処理効率が高いものの、下水の循環や曝気に多くの電力を消費することが課題となっている。一方、脱窒反応($2\text{NO}_3^- + 10\text{e}^- + 12\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$)に必要な電子を電極から微生物に供給することによって、少量の電力供給で効率的に脱窒を行う手法(微生物電気化学的脱窒法)が注目されている。しかし脱窒細菌の電子受容メカニズムや脱窒に最適な電極電位が未解明である等、本手法の基盤となる知見には不十分な点が多い。前年度までの研究によって *S. loihica* PV-4 株が電極からの電子を受容し硝酸還元を行うことが示されたが、その生成物は同定されておらず、本株が電極を用いて脱窒を行うことができるのかは不明であった。そこで本研究では硝酸還元の生成物を同定し、PV-4 株による電気化学的脱窒を立証するとともに、より効率的な脱窒が可能な電極電位の探索を行った。

PV-4 株が電極から電子を受容し脱窒を行うことができるかを調べるため、PV-4 株を 2 槽型の 3 電極系電気化学セルに植菌し、2 mM の NaNO_3 を加え、電極電位を -0.4 V または -0.6 V (vs. Ag/AgCl) に設定して培養した。この際、電気化学セルの気層を Ar ガスで置換後、10%のアセチレンガス(亜酸化窒素還元酵素の阻害剤)を封入し、脱窒反応によって還元される硝酸イオンが亜酸化窒素として検出されるようにした。電気化学セル内の培地と気層は定期的にサンプリングし、硝酸態窒素、亜硝酸態窒素、亜酸化窒素、アンモニア態窒素の濃度を市販キット(TNT plus Reagent) およびガスクロマトグラフィーによって測定した。

その結果、 -0.4 V と -0.6 V の両条件とも、硝酸添加によって負の電流が流れ、硝酸態窒素 ($\text{NO}_3\text{-N}$) の濃度が減少するとともに亜硝酸態窒素 ($\text{NO}_2\text{-N}$) および亜酸化窒素 (N_2O) の濃度が上昇した(図 4)。この結果から、PV-4 株が電極から電子を受取り、脱窒反応を行うことが示された。PV-4 株の細胞外電子伝達経路と脱窒経路は細胞内膜のキノンを経由して繋がっているため、PV-4 株は細胞外電子伝達経路を介して電極から電子を受容し、その電子が内膜キノンを経由して脱窒反応に利用されると考えられた(図 5)。一方、 -0.4 V と -0.6 V の結果を比較した場合、 -0.6 V ではより多くの電流が流れ、亜硝酸態窒素の生成量も多かったが、亜酸化窒素の生成量は減少した。これは -0.6 V の条件では菌体がより多くの電子を受容するが、細胞毒性を示す中間体である亜硝酸の濃度が急激に上昇してしまい、これ以降の脱窒反応が阻害されてしまうためであると考えられた。以上の結果から、微生物電気化学的脱窒法では亜硝酸の蓄積量を制御することが重要であり、低すぎる電極電位は脱窒反応を阻害することが示唆された。

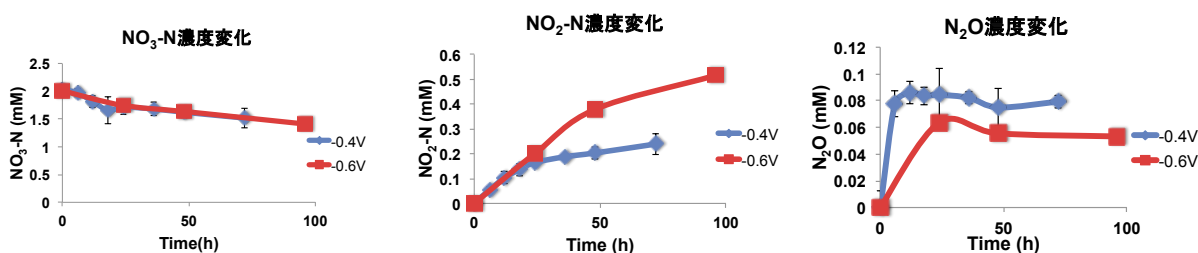


図 4. 電気化学リアクター内の無機窒素化合物の経時変化

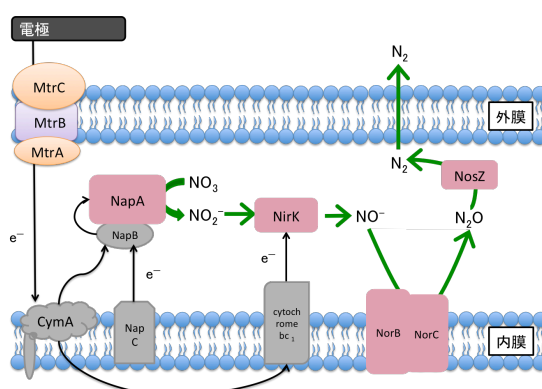


図 5. 予想された *S. loihica* PV-4 株の電気化学的脱窒経路

2.2.2. *A. ferrooxidans* の窒素固定制御系の解明

近年の人口増加に伴う食糧不足を補うには、化学肥料となるアンモニアの生産が不可欠である。しかし現在のハーバー・ボッシュ法によるアンモニア合成は高温高压の反応条件を必要とし、そのために大量の化石燃料が投入されている。一方、窒素固定が可能な微生物を用いれば、温和な条件下でのアンモニア合成が可能となる。*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC23270 株は独立栄養的に増殖可能な鉄酸化細菌であり、大気中の窒素をアンモニアへと変換する酵素(ニトロゲナーゼ)を持つ。ATCC23270 株は電気培養(電極を電子源として用いる培養法)により良好に増殖するため、本株を用いれば空気と電気エネルギーから安価にアンモニアを生産するプロセスを構築できると期待される(図 6)。

しかし、一般にニトロゲナーゼの活性は窒素源(NH_4^+ 等)の有無によって厳密なフィードバック抑制を受けるため、アンモニア生産にはその抑制の解除が必要となる。検討の結果、グルタミン生合成阻害剤である methionine sulfoximine (MSX) を添加して *A. ferrooxidans* の電気化学培養を行うことにより、培養液中にアンモニアを分泌させることに成功した(図 7)。グルタミンは細胞内の窒素レベルを感知するためのシグナル物質として働くため、MSX の添加によって細胞内のグルタミン濃度が低下した結果、ニトロゲナーゼのフィードバック抑制が解除され、アンモニアが生産されたと考えられる。

しかし MSX の添加はコストが高く、また細胞の増殖を阻害してしまうためアンモニア生産を持続させることが難しい。したがって今後実用化を目指すには、MSX 等の化学物質の添加に依らず、ニトロゲナーゼを恒常的に活性化させる必要があると考えられた。しかし *A. ferrooxidans* のニトロゲナーゼ制御系の分子機構は未解明であり、タンパク質工学的に *A. ferrooxidans* の窒素固定系を改変するには基盤となる知見が不足しているのが現状であった。そこでニトロゲナーゼを恒常的に活性化させる手法の開発に向け、*A. ferrooxidans* の窒素固定制御系の分子機構の解明を行った。

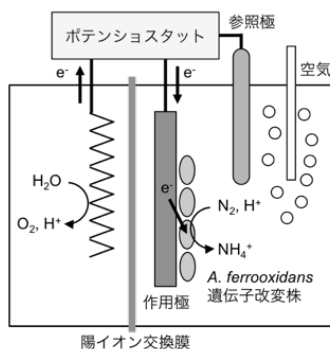


図 6. 電気培養装置の模式図

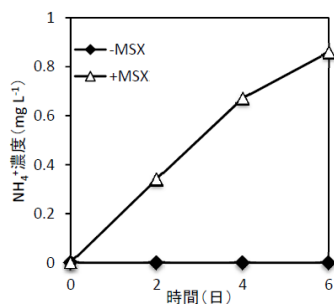


図 7. 電気培養槽内のアンモニア濃度変化

A. ferrooxidans ATCC23270 株において、窒素源(NH_4^+)の有無が遺伝子発現に与える影響を DNA マイクロアレイにより解析した結果、 NH_4^+ 非添加時にニトロゲナーゼ遺伝子(*nifHDK*)の発現量が上昇することが示され、本株の窒素固定系は NH_4^+ の有無に依存して制御されることが明らかとなった(表 1)。しかし、*nifH* の近傍に位置する *nifA* の発現量は NH_4^+ の有無に関わらず変動しなかった。*NifA* タンパク質は多くの窒素固定細菌に保存されており、ニトロゲナーゼ遺伝子の転写活性化因子として知られている。これらのこ

とから、NifA が窒素源の有無を感知するセンサーとして機能する可能性が考えられた。NifA の窒素固定系への関与を調べるため、*nifA* の過剰発現株を作製した結果、NH₄⁺非添加時におけるニトロゲナーゼ活性が増加した。また *nifA* 過剰発現株の遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより解析した結果、NH₄⁺非添加時においてニトロゲナーゼ遺伝子を含む多くの窒素固定系遺伝子の発現量が野生株よりも増加することが示された(表 2)。以上の結果から、NifA が ATCC23270 株の窒素固定系遺伝子の転写制御において中心的な役割を果たすことが明らかとなった。また *nifA* 過剰発現株は NH₄⁺非添加時において野生株よりも高い増殖速度を示し(図 8)、窒素源が不足する環境下ではニトロゲナーゼ活性が生育を律速する要因となることが示された。これらの知見は *A. ferrooxidans* の有する窒素固定関連タンパク質をアンモニア生産へ応用する上で重要であると考えられた。

表 1. NH₄⁺非存在下で発現上昇した窒素固定関連遺伝子 (fold-change > 2)

Gene Name	Gene Product	Fold-change
<i>fixA</i>	electron transfer flavoprotein subunit beta	9.7
AFE_1509	iron-sulfur cluster assembly accessory protein	3.9
AFE_1519	ferredoxin	3.0
<i>nifK</i>	nitrogenase molybdenum-iron protein subunitbeta	4.8
<i>nifD</i>	nitrogenase molybdenum-iron protein subunitalpha	7.5
<i>nifH</i>	nitrogenase reductase	16.1
<i>draT</i>	NAD(+)-dinitrogen-reductase ADP-D-ribosyltransferase	2.9
<i>nifB</i>	nitrogenase cofactor biosynthesis protein NifB	2.7
<i>amt-2</i>	ammonium transporter	94.1
<i>glnK-1</i>	nitrogen regulatory protein P-II 2	253.1
<i>amt-1</i>	ammonium transporter	162.0

表 2. *nifA* 過剰発現株において発現上昇した窒素固定関連遺伝子 (fold-change > 2)

Gene name	Gene product	Fold-change
AFE_1508	nitrogen fixation protein nifU	17.4
AFE_1509	iron-sulfur cluster assembly accessory protein	18.9
<i>nifE</i>	nitrogenase molybdenum-cofactor biosynthesis protein NifE	18.4
<i>nifK</i>	nitrogenase molybdenum-iron protein subunitbeta	33.7
<i>nifD</i>	nitrogenase molybdenum-iron protein subunitalpha	35.7
<i>nifH</i>	nitrogenase reductase	60.1
AFE_1523	response regulator	4.9
<i>draT</i>	NAD(+)-dinitrogen-reductase ADP-D-ribosyltransferase	3.8
<i>nifA</i>	Nif-specific regulatory protein	7.4
<i>nifB</i>	nitrogenase cofactor biosynthesis protein NifB	18.6
AFE_1530	ferredoxin	21.1
<i>fixA</i>	electron transfer flavoprotein subunit beta	5.1
<i>cbbS-2</i>	ribulose bisphosphate carboxylase, small subunit	2.6
<i>atpB</i>	ATP synthase F subunit A	2.1
<i>omp40</i>	major outer membrane protein 40	35.3

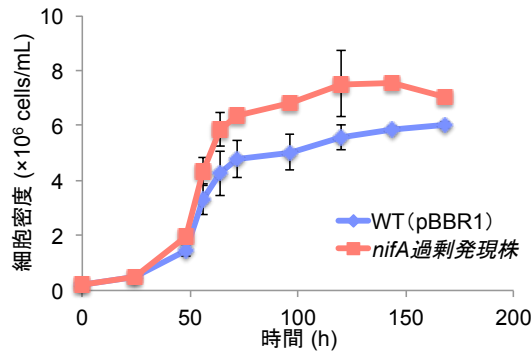


図 8. NH_4^+ 非存在下における *nifA* 過剰発現株の増殖曲線

上記の結果より、EAB (*Shewanella* および *Acidithiobacillus*) の導電性タンパク質と酸化還元酵素を利用した窒素変換プロセスの開発に必要な基礎的知見を得ることができ、当初目標を達成した。*S. loihica* PV-4 株を用いた実験では、本株が電極から電子を受容して硝酸を還元し、脱窒を行うことができることを立証するとともに、脱窒反応に最適な電極電位が存在することを示した。これらの成果は廃水からの省エネルギー型窒素除去システム(“微生物電気化学脱窒システム”)の開発につながる重要な知見であると思われる。また *A. ferrooxidans* ATCC23270 株を対象とした研究では、本株の窒素固定制御系のメカニズムを解析し、NifA 転写因子が本株のニトロゲナーゼの活性制御において中心的な役割を果たすことを明らかにした。NifA は窒素源の有無を感知するためのセンサーとして機能していると考えられるため、今後 NifA をタンパク質工学的に改変することで、ニトロゲナーゼの高活性化が可能になると期待される。また、*A. ferrooxidans* の細胞外電子伝達系を改変し、電子受容効率を向上させることができれば、プロセスのさらなる高効率化が可能になると考えられた。

2.3. *A. ferrooxidans* による電気化学的窒素固定プロセスの開発

前項の基盤研究において得られた知見を元に、*Acidithiobacillus* の酵素機能と電極を用いた大気窒素からのアンモニア合成プロセスの構築を目指した。これまでの結果から、ニトロゲナーゼの発現は窒素源 (NH_4^+ 等)の有無によって厳密なフィードバック抑制を受けるため、アンモニア生産にはその抑制の解除が必要であると考えられた。実際、グルタミン合成阻害剤である MSX を添加すれば、窒素固定抑制系の解除とともにアンモニアの分泌が促される(図 7)。しかし、実用化を視野に入れた場合、MSX のような化合物を添加することはコスト面で現実的ではない。そこで本項では MSX の添加に依らずアンモニアを合成可能なプロセスの構築を目指した。前項の結果から、*Acidithiobacillus* では NifA 転写因子がニトロゲナーゼ遺伝子を含む多くの窒素固定関連遺伝子の転写活性化因子として機能し、*nifA* を過剰発現させると窒素固定関連遺伝子が一括して高発現することが明らかになった。そこで本項では *nifA* 過剰発現株 (*nifA*-OE 株)のニトロゲナーゼ活性を評価するとともに、*nifA*-OE 株の電気培養によるアンモニア製造(図 9)を試みた。

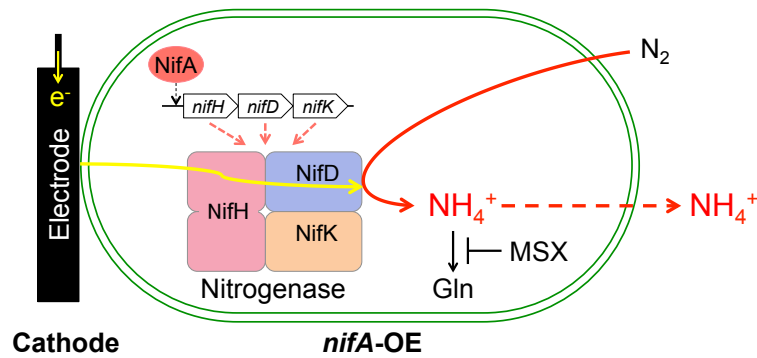


図 9. *nifA*-OE 株によるアンモニア電気合成

3. 1. *nifA*-OE 株のニトロゲナーゼ活性の評価

nifA-OE 株を窒素源 (NH_4^+) 添加条件 (N-rich 条件) または非添加条件 (N-free 条件) で培養し、*nifA* の過剰発現がニトロゲナーゼ活性に与える影響を調べた。まず *nifA* の過剰発現によってニトロゲナーゼ遺伝子の転写量が増加することを確認するため、ATCC23270 の野生株と *nifA*-OE 株における *nifH* 遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR 法によって比較した (図 10)。その結果、N-free 時では *nifA*-OE 株において *nifH* の発現量が野生株の約 50 倍に増加していた。一方、N-rich 条件下では *nifA*-OE 株の発現量は野生株よりも増加していたものの、その差はわずかであった。この結果から、NifA が何らかのシグナルを介して窒素源の有無を感知し、これによりニトロゲナーゼ遺伝子の発現が調節されることが示唆された。

次に、*nifA*-OE 株のニトロゲナーゼ活性をアセチレン還元法によって評価した (表 3)。その結果、N-rich 時には野生株、*nifA*-OE 株ともニトロゲナーゼ活性を示さなかったが、N-free 時には *nifA*-OE 株が野生株よりも約 3 倍高いニトロゲナーゼ活性を示した。この結果から、窒素源の存在による抑制は受けるものの、*nifA* の過剰発現によってニトロゲナーゼ活性が増加することが示された。

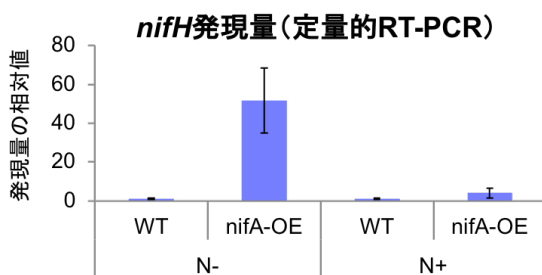


図 10. 野生株 (WT) と *nifA*-OE 株の *nifH* 発現量比較

N-: N-free 条件; N+: N-rich 条件

表 3. 野生株 (WT) と *nifA*-OE 株のニトロゲナーゼ活性

	培養条件	エチレン生成量 (fmol/cell)
WT	N-rich	not detected
	N-free	0.15±0.03
<i>nifA</i> -OE	N-rich	not detected
	N-free	0.47±0.21

3. 2. *nifA*-OE 株の電気培養によるアンモニア生産

図 11 に示した電気化学リアクターを用いて野生株と *nifA*-OE 株を電気培養し、培養液中に分泌されるアンモニア量を測定した。その結果、*nifA*-OE 株でのみ、培養中にアンモニアが有意に増加した(図 12)。分泌されるアンモニア量は MSX 添加時(後述)よりも少なかったものの、この結果から *nifA*-OE 株は MSX を添加しなくともアンモニアを生産可能なことが示された。

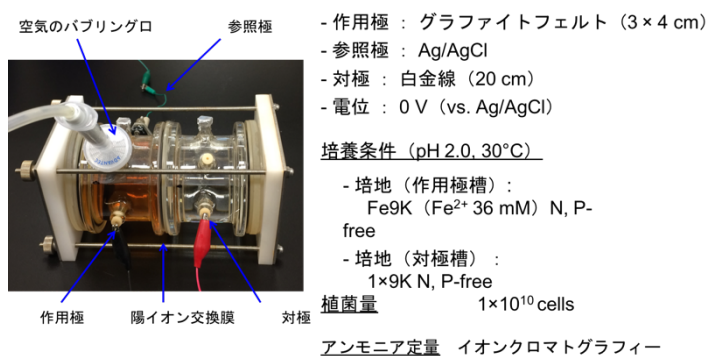


図 11. 電気化学リアクターの構造と運転条件

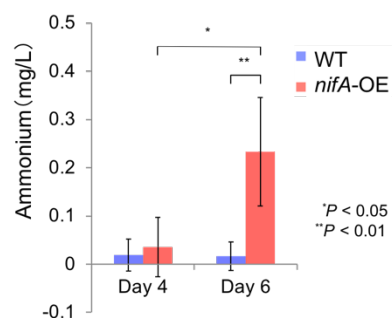


図 12. 野生株と *nifA*-OE 株のアンモニア蓄積量

また MSX(図 13)を添加した際のアンモニア生産量を調べた結果、MSX の添加によって *nifA*-OE 株、野生株ともにアンモニア生産量が顕著に増加した(図 14)。また *nifA*-OE 株では野生株よりも約 1.5 倍の速度でアンモニアを分泌することが示された。また電極に電位を印加しない非通電条件下でも同様の測定を行った結果、非通電時には通電を行った場合よりもアンモニア生産速度が低下し、野生株と *nifA*-OE 株の差が見られなかった。以上の結果から、*nifA* の過剰発現によってニトロゲナーゼ活性が向上し、アンモニアの合成が促されること、またその合成は電気エネルギーに依存することが示された。

グルタミン合成酵素阻害試薬 methionine sulfoximine (MSX)

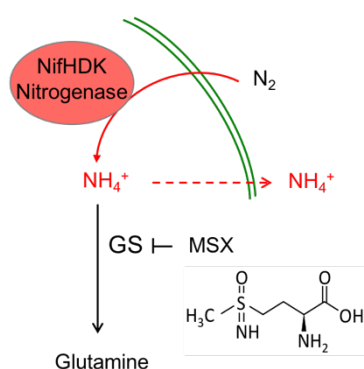


図 13. MSX の構造と作用

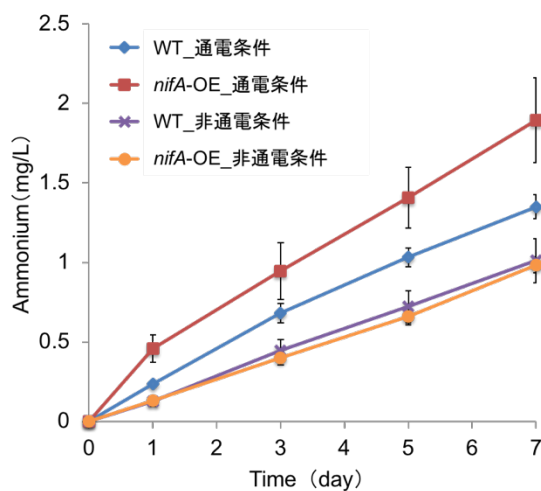


図 14. MSX 添加時のアンモニア生産量

3. 研究評価及び今後の研究計画

【研究評価】

本研究では EAB がもつ導電性タンパク質と酸化還元酵素を利用し、新たなバイオエレクトロニクスプロセスを開発することを目的とした。具体的には、電気活性微生物として知られる *Shewanella* と *Acidithiobacillus* 属細菌の導電性タンパク質と窒素変換酵素に着目し、これらの酵素機能と電極を用いた窒素変換プロセスの構築を行った。これまでの成果は主に下記の 2 点に集約される。

(1) *Shewanella* を用いた電気化学的窒素プロセスの構築

Shewanella 属細菌が電極からの電子授受と共役可能な窒素変換酵素を持つことを示した。具体的には *S. oneidensis* MR-1 株がアンモニアを酸化し、電流を産生する酵素を持つこと、また *S. loihica* PV-4 株が電極からの電子受容により硝酸を窒素ガスへと変換する酵素を持つことを実証した。

(2) *Acidithiobacillus* を用いた電気化学的窒素固定プロセスの構築

A. ferrooxidans において窒素固定酵素(ニトロゲナーゼ)を高発現させ、電極から電子を与えることにより、窒素ガスからアンモニアへの変換反応が生じることを実証した(*1,2,3)。またアンモニアの同化反応の阻害剤を添加することにより、アンモニアの合成量を顕著に増加させることに成功した(*1,3)。

以上の成果によって、研究の当初目標である i) バイオエレクトロニクスに利用可能な電子伝達タンパク質(導電性タンパク質および酸化還元酵素)の同定および電氣的相互作用を促進するための手法開発、および ii) 電子伝達タンパク質の電子伝達特性の評価と有用プロセス構築、を達成した。特に上記(2)の成果は微生物触媒と電気エネルギーによる窒素ガスからのアンモニア合成に成功した世界初の事例であり、成果を学会(*1,2)で報告するとともに、将来的な産業利用も期待されることから特許出願(*3)を行った。

【今後の研究計画】

ハーバー・ボッシュ法に替わる低コスト・省エネルギーの窒素固定法の開発は、化石燃料に依存しない食糧生産法を確立する上で最も重要な課題の一つであり、現在、高効率化学触媒の研究開発が進められている。これらの化学触媒の多くはニトロゲナーゼの活性中心を参考にして設計されたものであるが、構造が複雑であり、低コストでの合成が難しいという課題がある。一方、本研究で開発した微生物プロセスでは、アンモニア合成に必要なニトロゲナーゼが増殖に伴って自律的に生産されるため、アンモニア合成に必要なコストを大幅に削減することができる。また、*Acidithiobacillus* は電極から還元力を得るための導電性タンパク質も有しているため、細胞自体がよく電極と相互作用し、高活性なアンモニア合成触媒として機能し得る。これらのことから、低コストでのアンモニア生産を目指すには細胞自体を触媒に用いるほうが有利であると判断し、今後は細胞内のニトロゲナーゼ活性のさらなる増強を目指して研究を行っていく。

ニトロゲナーゼ活性を増強し、アンモニアを効率的に生産させるには、タンパク質工学の技術を活用し、酵素活性とその制御に関与するアミノ酸残基を改変することが効果的だと考えられる。具体的には、ニトロ

ゲナーゼは ADP リボース化による翻訳後修飾によって窒素源存在下で活性が抑制されることが知られているため、その修飾に関与するアミノ酸残基を改変し、抑制を受けないように改良する。その改変タンパク質を恒常的な転写プロモーターによって *Acidithiobacillus* の細胞内で発現させれば、生成物のアンモニアの量に依らずに常にニトロゲナーゼの活性が維持されるようになり、アンモニア生産効率の増加につながると思われる。また、電極から細胞への電子伝達がプロセスを律速することも考えられるため、電極からの電子受容に関与する導電性タンパク質(細胞外膜シトクロム)を改変し、電極との相互作用を促進させることも重要だと思われる。具体的には C-1、C-2 で開発された金属結合配列を細胞外膜シトクロムに導入し、金属電極との親和性を向上させること等を検討する。現時点ではまだ合成速度が十分ではないものの、上記のような変異型酵素の開発と導入により、アンモニアの生産速度を大幅に高めることが可能であると期待される。

また、本研究により、*Shewanella* と *Acidithiobacillus* が持つ窒素変換酵素とセンサータンパク質の機能が解明され、窒素化合物を感知するバイオ電気化学センサーを構築する上で必要となる知見が得られた。*Acidithiobacillus* を対象とした研究では、本細菌がアンモニアの有無を感知する能力を持ち、その感知に NifA タンパク質が関与していることが示された。したがって、NifA のシグナル認識ドメインを利用すれば、アンモニアを検出するバイオセンサーを構築できる可能性がある。また、*Shewanella* (*S. oneidensis* MR-1 株および *S. loihica* PV-4 株) を対象とした研究では、これらの株が電極からの電子授受と共役可能な硝酸還元酵素とアンモニア酸化酵素を有していることが明らかとなり、これらの酵素を利用した硝酸またはアンモニアセンサーの開発が期待される。研究期間内にこれらの酵素を利用したセンサーの開発には至らなかったが、本研究の実施により将来的なバイオセンサーの構築に有用なタンパク質を複数同定することができた。上述のアンモニア合成系の開発を含め、これらの成果はバイオ電気化学プロセスの有用性と応用可能性を明確に示すものであり、今後の実用化研究における重要な知的基盤になると考えられる。

4. 研究成果の発表

学会発表

1. *山田祥平、高妻篤史、渡邊一哉、「ニトロゲナーゼを高発現する鉄酸化細菌を用いた微生物電気化学的アンモニア生産」、日本農芸化学会(名古屋)、2018年3月
2. *山田祥平、高妻篤史、渡邊一哉、「*Acidithiobacillus ferrooxidans* における窒素固定制御転写因子 NifA の機能解析」、日本農芸化学会(京都)、2017年3月

特許出願

3. *微生物を利用したアンモニアの製造法(特願 2017-33404)、渡邊一哉、高妻篤史、滝沢宏次、山田祥平

D. タンパク質-タンパク質接合面設計法の開発

バイオナノテクノロジーではタンパク質の自己組織化能力を、ナノマシンやナノエレクトロニクス作製に応用しようというのが大きな目標である。その最大の基本技術は任意のタンパク質と任意のタンパク質間に新たに接合面を設計するという技術である。本研究計画では、タンパク質-タンパク質接合面の設計法を理論と進化工学の両面から開発する。

D-1 理論:タンパク質-タンパク質接合面設計法の開発

高須昌子(生命科学部・生命物理科学研究室・教授)

宮川 毅(情報教育研究センター・生命物理科学研究室・助教)

山岸明彦(生命科学部・極限環境生物学研究室・教授)

八木創太(生命科学部・極限環境生物学研究室・研究員)

赤沼哲史(早稲田大学・人間科学学術院・准教授)

1. 当初の研究目標

酵素やタンパク質は、高い特異性を持つ分子間相互作用、環境の変化やリガンドとの結合による柔軟な構造変化など、無機材料にはない性質が備わっており、機能性材料やセンサーの素子として優れた潜在的な能力を有している。タンパク質や酵素をバイオセンサーやバイオデバイスなどの機能素子として利用するには、タンパク質を他の分子(金属材料や他のタンパク質)と相互作用させる必要がある。

自然界には多くのタンパク質線維が存在するが、このような天然のタンパク質線維は、数 nm のタンパク質ユニットが自己組織化し形成されるボトムアップ方式で形作られる。自然界にある有用な機能を持つタンパク質の表面加工によって、自己組織化を誘発し、新しいタンパク質線維を開発出来れば、幅広い産業分野への応用展開が期待できる。山岸のグループではこれまで汎用的なタンパク質-タンパク質接合面設計方法を開発し、2つのタンパク質が交互に接合したタンパク質線維を構築することに成功した。本研究課題ではタンパク質-タンパク質接合の分子動力学計算を行い、その解析から、接合に関与する因子を特定する。本研究では、実験研究者と理論研究者との連携により、大きな成果が期待できる。

2. 研究成果の概要

1) スレリスリン変異体 I および LARFH 変異体の MD シミュレーション

八木らはタンパク質分子スレリスリンおよび LARFH に相互作用面を設計し、両者を結合させることに成

疎水性アミノ酸 ロイシン	負電荷アミノ酸 アスパラギン酸
P101L	T97D
K105L	G102D
R108L	P113D
E117L	T121D
E120L	K127D
R124L	S128D

表1 八木氏らによるスレリスリンの
変異導入箇所(スレリスリン変異体 I)

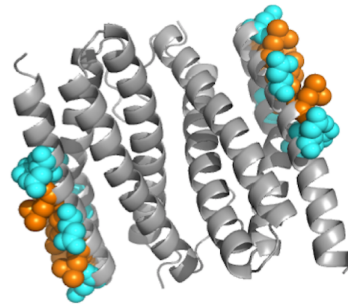


図1 シミュレーションにおけるスレリスリン
の変異導入部位(スレリスリン変異体 I)

疎水性アミノ酸 ロイシン	正電荷アミノ酸 アルギニン
D369L	S370R
Q373L	M372R
R376L	Q377R
D419L	S420R
Q423L	M422R
R426L	Q427R

表2 八木氏らによる LARFH の
変異導入箇所

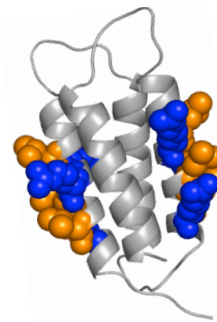


図2 シミュレーションにおける LARFH 変
異体の変異導入部位

功した。スレリスリンは大腸菌由来の酸性タンパク質であり、LARFH は人工的に作られる塩基性タンパク質である。両方とも高い熱安定性を持つため、人工タンパク質繊維を作ることによって、ナノテクノロジー分野に役立つことが期待される。八木らは、表1、2および図1、2のように、疎水性アミノ酸ロイシンをスレリスリンの 101, 105, 108, 117, 120, 124 番目の残基および LARFH の 369, 373, 376, 419, 423, 426 番目の残基に導入した。また、負電荷アミノ酸アスパラギン酸をスレリスリンの 97, 102, 113, 121, 127, 128 番目の残基に導入し、正電荷アミノ酸アルギニンを LARFH の 370, 372, 377, 420, 422, 427 番目の残基に導入した。こうして、疎水性相互作用および静電的相互作用によって両タンパク質間の特異的結合を実現した。分子動力学シミュレーションではこの二つの変異型タンパク質分子を対象とした。

我々のグループの小澤は、上記の表1および2のタンパク質に関して、粗視化モデルを用いて、分子動力学シミュレーションの計算を行った(*2,4,5,6)。計算ソフトとしては、GROMACSver5.1 を用いた。力場は、粗視化モデルの一つである MARTINI 力場を用いた。MARTINI 力場は、S. Marrink ら(J. Phys. Chem. B. 111 (2007) 7812)によって導入された力場であり、荷電粒子、極性粒子、無極性粒子、非極性粒子の4種類の粗視化粒子を使っている。さらにそれぞれの subtype を設定している。非極性相互作用は、Lennard-Jones ポテンシャルを用いたが、半径およびエネルギーのパラメータは粗視化粒子の種類によって異なった値が設定されている。荷電粒子に関しては、さらにクーロンポテンシャルを適用した。結合性相互作用は、結合ポテンシャル、角度ポテンシャル、二面角のポテンシャルを考慮した。各アミノ酸は、これらの粗視化粒子の組み合わせで表現されている。

スレリスリンは大腸菌由来の酸性タンパク質であり、LARFH は人工的に作られる塩基性タンパク質である。両方とも高い熱安定性を持つため、人工タンパク質繊維を作ることによって、ナノテクノロジー分野に役

立つことが期待される。変異に関しては、八木氏らの実験の変異(表1, 2)のように疎水性アミノ酸であるロイシンの他、負電荷を持つアスパラギン酸をスレリスリンに、正電荷を持つアルギニンが LARFH に導入した。静電相互作用と疎水性相互作用の両方を使って結合を安定化することを目指している。

2つの分子の最近接距離の時間変化の例を図3に示す。この距離が 1nm 未満で安定した場合を結合したと判断している。さらに結合した分子に対し、最近接粒子対 10 ペアの中に設計箇所が含まれているかで結合箇所を判断している。

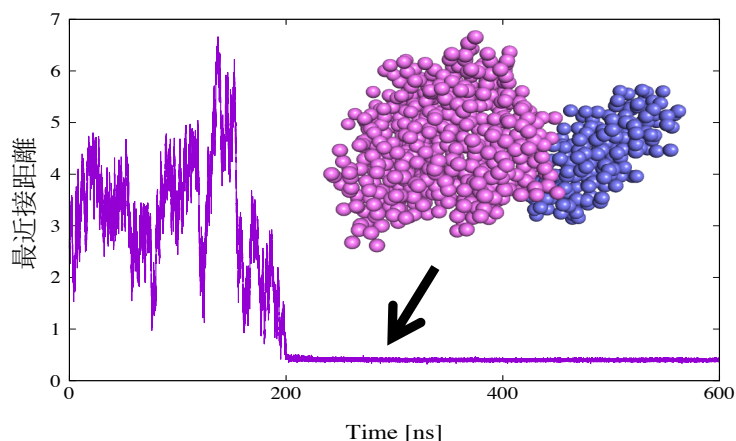


図3 スレリスリン変異体 I と LARFH 変異体の MD シミュレーションにおける距離の変化

結果を表3, 4に示す。表3のスレリスリン変異体 I と LARFH の場合、スレリスリンのターン部分と LARFH の設計箇所との結合が多く見られ、特にスレリスリンの持つグルタミン酸が結合に多く寄与していた。これは、LARFH 変異部分の正電荷がスレリスリンのターン部分のグルタミン酸と相互作用し引き合うためであると考えられる。

また表4のスレリスリン変異体 I 分子2個の場合は、設計箇所同士での結合はなく、両タンパク質がターン部分で結合している場合が多いことがわかった。これは実験で三叉状の繊維が見られる原因の1つの可能性がある。

以上の理由により、スレリスリンのターン部分のグルタミン酸に着目し、次に述べるスレリスリンの変異体 II でシミュレーションを行うことにした。

	設計箇所同士	スレリスリンのみ設計箇所	LARFHのみ設計箇所
sim・1			○
sim・2			○
sim・3			○
sim・4	○		
sim・5			○
sim・6	○		
sim・7			○
sim・8		○	
sim・9	○		
sim・10			○

表 3 スレリスリン変異体 I と LARFH 変異体各1個のシミュレーション結果

	設計箇所同士	一方だけ設計箇所	いずれも設計箇所以外
sim1		○	
sim2			○
sim3			○
sim4			○
sim5			○
sim6		○	
sim7			○
sim8			○
sim9			○
sim10			○

表 4 スレリスリン変異体 I 分子2個のシミュレーション結果

(1) スレリスリン変異体 II および LARFH の変異体の MD シミュレーション

前述のシミュレーションにより、LARFH の設計部位がスレリスリンの持つグルタミン酸とよく接合していることが判明した。表5および図4に示すような、グルタミン酸を無電荷のグルタミンに置換したスレリスリン変異体 II を用いてシミュレーションを行った。

無電荷アミノ酸 グルタミン
E36Q
E37Q
E41Q
E82Q
E86Q

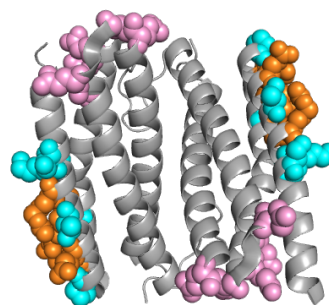


表 5 八木氏らによるスレリスリンの変異導入箇所(スレリスリン変異体 II)

図 4 シミュレーションにおけるスレリスリンの変異導入箇所(スレリスリン変異体 II)

結果を表6および7に示す。いずれの場合も、スレリスリン変異体 I を用いた場合と比べて、スレリスリン変異体が設計箇所と結合する頻度が増加しており、より効率的な線維化が可能な変異体がシミュレーションで確認できた。これらの結果は、D-2 の実証実験に反映させた。

	設計箇所同士	スレリスリンのみ設計箇所	LARFHのみ設計箇所
sim 1	○		
sim 2		○	
sim 3			○
sim 4	○		
sim 5	○		
sim 6			○
sim 7		○	
sim 8	○		
sim 9			○
sim 10			○

表 6 スレリスリン変異体 II と LARTH 変異体各1個のシミュレーション結果

	設計箇所同士	一方だけ設計箇所	いずれも設計箇所以外
sim 1			○
sim 2	○		
sim 3		○	
sim 4			○
sim 5		○	
sim 6		○	
sim 7			○
sim 8			○
sim 9		○	
sim 10			○

表 7 スレリスリン変異体 II 分子2個のシミュレーション結果

3. 研究評価及び今後の研究計画

以上の様に、スレリスリンと LARFH 分子の粗子化モデルを用いた動力学計算により、両タンパク質の結合がシミュレートできた。両タンパク質が結合する際、特にスレリスリンのターン部分のグルタミン酸が、設計部分の結合を阻害する要因の1つとなっていたことが判明した。以上のように今年度の目標を達成した。

今後は実験グループの新しい実験を基に、さらに計算を進めることにより、タンパク質-タンパク質結合面設計法を開発する。特に初期条件が異なる場合に関して計算を行う。上記の結果で、スレリスリンのグルタミン酸が、設計箇所以外の結合として顕著であったので、他の箇所のグルタミン酸(スレリスリンの(109, 110 114 番残基)を別のアミノ酸に置換した場合に関しても、分子動力学シミュレーションを行なうことにより、非特異的結合の起こりにくい変異酵素設計提案をおこなう。さらに、溶媒が異なる場合の計算を進める。タンパク質の結合力を計算するため、アンブレラサンプリングを用いた計算を行う。こうした理論研究結果を引き続き実証研究に反映させる。

4. 研究成果の発表

雑誌論文

1. T. Ishioka, H. Yamada, T. Miyakawa, R. Morikawa, S. Akanuma, A. Yamagishi, M. Takasu, Mutual Positional Preference of IPMDH Proteins for Binding Studied by Coarse-grained Molecular Dynamics Simulation, AIP Conf. Proc. 1790 (2016) 020023.
2. *T. Ozawa, H. Yamada, T. Miyakawa, R. Morikawa, S. Yagi, S. Akanuma, A. Yamagishi, M. Takasu, Coarse-grained molecular dynamics simulation of sulerythrin and LARFH for production of protein nanofibers, accepted for publication in *8th International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics Proceedings* (2018).

国際シンポジウム発表

3. T. Ishioka, H. Yamada, T. Miyakawa, R. Morikawa, S. Akanuma, A. Yamagishi, and M. Takasu, Mutual Positional Preference of IPMDH Proteins for Binding Studied by Coarse-grained Molecular Dynamics Simulation (招待講演), *Computational Chemistry Symposium in 12th International Conference of Computational Methods in Sciences and Engineering 2016*, 2016/3, Athens, Greece.
4. *T. Ozawa, H. Yamada, T. Miyakawa, R. Morikawa, S. Yagi, S. Akanuma, A. Yamagishi, M. Takasu, Coarse-grained molecular dynamics simulation of sulerythrin and LARFH for production of protein nanofibers, *International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 2018/1, 明治大学, 口頭発表

国内学会発表

5. *小澤尚史, 山田寛尚, 宮川毅, 森河良太, 八木創太, 赤沼哲史, 山岸明彦, 高須昌子, 粗視化モデルを用いた線維タンパク質の結合過程の分子動力学シミュレーション, 日本物理学会第 72 回年次大会, 2017 年 3 月, 大阪大学, ポスター発表
6. *小澤尚史, 山田寛尚, 宮川毅, 森河良太, 八木創太, 赤沼哲史, 山岸明彦, 高須昌子, 粗視化モデルを用いたスレリスリンと LARFH の線維化シミュレーション, 日本物理学会 2017 年秋季大会, 2017 年 9 月, 岩手大学, ポスター発表

D-2 実証:タンパク質-タンパク質結合法の開発

山岸明彦（東京薬科大学・極限環境生物学研究室・教授）

内田達也（東京薬科大学・分析化学研究室・准教授）

梅村知也（東京薬科大学・分析化学研究室・教授）

赤沼哲史（早稲田大学・極限環境生命科学研究室・准教授）

八木創太（東京薬科大学・極限環境生物学研究室・研究員）

1. 当初の研究目標

酵素やタンパク質は、高い特異性を持つ分子間相互作用、環境の変化やリガンドとの結合による柔軟な構造変化など、堅い無機材料にはない性質が備わっており、機能性材料やセンサーの素子として優れた潜在的な能力を有する。しかし、タンパク質や酵素のバイオセンサーやバイオデバイスにおける機能素子としての用途拡大のためには、タンパク質を他の分子（金属材料や他のタンパク質）と相互作用させる必要がある。

自然界には多くのタンパク質線維が存在するが、このような天然のタンパク質線維は、数 nm のタンパク質ユニットが自己組織化し形成されるボトムアップ方式で形作られる。自然界にある有用な機能を持つタンパク質の表面改変によって、自己組織化を誘発し、新しいタンパク質線維を開発出来れば、幅広い産業分野への応用展開が期待できる。本課題担当者はこれまで汎用的なタンパク質-タンパク質結合法を開発し、2つのタンパク質が交互に結合したタンパク質線維を構築することに成功した。さらに開発されたタンパク質-タンパク質間結合法の最適化を行った。

2. 研究成果の概要

1) タンパク質間結合法の開発

これまでに、分子間にまたがるヘリックス間相互作用の最適化により、非常に強固で安定なタンパク質間相互作用が構築できることが示されている。この方法を *sulerythrin* タンパク質と *LARFH* タンパク質に適用することによって、*sulerythrin* タンパク質と *LARFH* タンパク質間に特異的結合を創出することを試みた。*Sulerythrin* の結合法は、2本の平行した α ヘリックスを足場にロイシン残基を6つ導入し、その近傍に負電荷アミノ酸を導入することで設計した(6L型結合法; *3) *。*LARFH* には、1本の α ヘリックスを足場にロイシン残基を 3 つ導入し、その近傍に正電荷アミノ酸を導入することで結合法を設計した(3L型結合法)。2種のタンパク質を別々に調製することにより、単一分子種のみが含まれる溶液中では、静電的反発により結合は生じないが、両者を混合

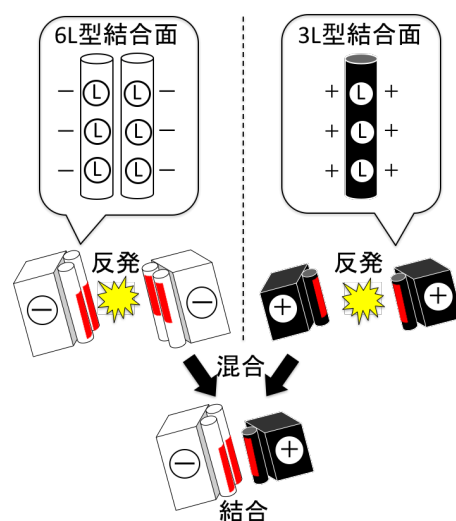


図1. 開発したタンパク質間相互作用の概略図

することで、2種のタンパク質間で静電相互作用と疎水性相互作用を駆動力とした結合を生じさせる(図1)。実際、sulerythrin 改変体と LARFH 改変体を混合したところ、特異的なタンパク質間相互作用が確認できた。

さらに、この sulerythrin タンパク質改変体と LARFH タンパク質改変体同士の結合定数の測定を行った。LARFH タンパク質の結合面付近に蛍光色素を結合させた。その後 LARFH と sulerythrin タンパク質を混合して、280 nm の光で sulerythrin のトリプトファンを励起し、蛍光移動によって蛍光色素からの 480 nm における蛍光強度を測定した。この方法は FRET と呼ばれる。FRET の測定結果から LARFH と sulerythrin タンパク質の解離定数は $0.42 \mu\text{M}$ であった。この結合力は、従来のコンピュータ計算により設計されるタンパク質タンパク質結合と同程度の強さである。つまり、複雑なコンピュータ計算をすることなく、本技術は十分強い結合力を持つタンパク質-タンパク質結合を創りだせることが分かった(*2,4-6.12-20)。

2) タンパク質繊維の構築

タンパク質の繊維を作るためには、構成単位とするタンパク質の分子両端に2つの結合面が必要である。そこで、上記で開発した結合面を分子両端に導入した sulerythrin 改変体と LARFH 改変体を作成した。両者を 1:1 の比率で混合し、原子間力顕微鏡で観察を行ったところ、両者が共重合したタンパク質繊維を観察することができた(図2)。繊維の長さを測定したところ、最長は $1.1 \mu\text{m}$ であり、タンパク質が 150 分子程結合した長さに相当した。つまり、本結合面設計技術を利用することで、自己組織化型の繊維構造も構築できることが分かった(*2,4-6.12-20)。

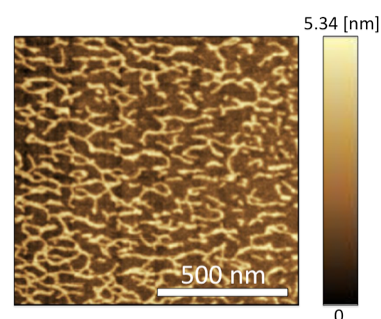


図2. Sulerythrin 改変体と LARFH 改変体が重合したタンパク質繊維の原子間力顕微鏡観察像

3) 非特異的な分子間相互作用の排除

2で構築したタンパク質繊維は繊維構造と同時に枝分かれ構造や凝集体も多かった。すなわち、改変したタンパク質分子間で期待した結合面以外の領域でも非特異的に結合が生じている可能性があった。そのため、繊維の枝分かれや凝集体形成の原因となるタンパク質分子間の非特異的な相互作用の抑制に取り組んだ。

繊維の枝分かれの原因として、①LARFH 改変体-LARFH 改変体、②sulerythrin 改変体-sulerythrin 改変体、③sulerythrin 改変体-LARFH 改変体間の非特異的相互作用の3つの可能性が挙げられる。ゲル濾過クロマトグラフィー解析により、LARFH 改変体間相互作用はなかったが、sulerythrin 改変体間には相互作用が生じていることが分かった。さらに、静的光散乱法、動的光散乱法によっても sulerythrin 改変体同士は相互作用し、野生型 sulerythrin よりも大きな分子サイズを持つことが明らかになった。pH や塩濃度の変化によって分子サイズは変動するため、この非特異的相互作用は分子間の静電的相互作用に起因することが分かった。

スレリスリン改変体同士の静電相互作用は、導入した負電荷アミノ酸と sulerythrin 表面のイオンペアを

形成していない正電荷アミノ酸間で生じていると推定できる。そこで、sulerythrin 分子表面の正電荷アミノ酸を1つずつ中性のアミノ酸もしくは負電荷アミノ酸へと置換した sulerythrin 改変体を計 19 個作製した。これらの sulerythrin 改変体をゲル濾過クロマトグラフィーで解析を行ったところ、6 個の改変体 (K2E、K5E、K5N、K8E、K32Q、K132E) は非特異的な相互作用が若干改善されていた。つまり、sulerythrin における 2、5、8、32、132 番目の Lys 残基が非特異的な結合に関与することを見出した(*9)。

また、D-1 で実施した sulerythrin 改変体同士の動力学 (MD) シミュレーションでも sulerythrin 改変体同士の結合は観察されており、どの残基が非特異的な結合に寄与するかを見出している。これらの残基は我々が見出したアミノ酸と共通性が見られ、特に、5、8、132 番目の Lys 残基は共通している。

さらに sulerythrin 改変体同士の非特異的な結合を抑制するため、上記で見出した変異を組み合わせた改変体を作成した。MD シミュレーションと実験の結果で共通して見られた、非特異的な結合に関与する残基、5、8、132 番目の残基を組み合わせて変異させ、計 7 個の改変体を作成した。同様にゲル濾過クロマトグラフィーで解析を行ったところ、2 つの sulerythrin 改変体 (K5E/K8E、K5E/K132E) は、sulerythrin 分子間の非特異的な相互作用はほぼ抑制できていることが確認できた。

K5E/K8E-、K5E/K132E-sulerythrin 改変体を、結合面を分子両端にもつ LARFH 改変体と混合し、AFM で観察を行った。両タンパク質共に、凝集体のサイズは明らかに低下しており、K5E/K8E-sulerythrin 改変体は枝分かれ構造の頻度も明確に低下していた (図 3)。つまり、結合面を持つ sulerythrin 改変体の非特異的相互作用を抑制することで、枝分かれが少ない繊維を作ることに成功した。ただし、繊維長は短くなっているように観察された。

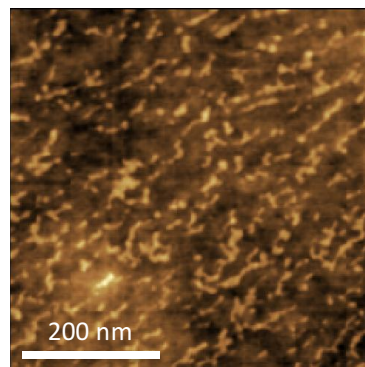


図 3. K5E/K8E-sulerythrin 改変体と LARFH 改変体が重合したタンパク質繊維の原子間力顕微鏡観察像

4) タンパク質間結合面の最適化

繊維長を長くするためには、タンパク質分子間の結合力を高める必要がある。そこで、設計したタンパク質間結合面の最適化に取り組んだ。Sulerythrin と LARFH の結合面を最適化する為には、結合面に導入した残基の形状的相補性を改善する必要がある。Sulerythrin に導入した6つの疎水性アミノ酸の Leu を1つずつ同じ疎水性アミノ酸である Val に置換した変異体を作製した。これら 6 つの sulerythrin 改変体の LARFH に対する結合力はいずれも低下しており、結合面の疎水性残基は Val よりも Leu の方が適していることが分かった。また、sulerythrin に導入した負電荷アミノ酸も Glu よりも Asp の方が適していることが分かった(*8)。

また、LARFH に結合面として導入した 3L 型結合面の最適

		2 番目の残基					
		L	I	V	M	F	
1 番目の残基	L	119.0	326.2	157.4	163.7	162.3	L
		164.9	228.9	167.7	30.9	541.4	I
		0.0	166.2	208.0	471.0	92.6	V
		249.7	129.0	0.0	0.0	0.0	M
		367.4	146.4	199.8	175.2	204.3	F
		102.5	163.6	113.3	88.1	113.9	L
	I	105.2	0.0	0.0	137.9	77.7	I
		31.8	0.0	0.0	93.4	114.4	V
		68.6	109.0	2.1	125.0	93.4	M
		101.5	90.9	91.3	177.6	1.6	F
		117.1	89.1	52.1	103.0	29.2	L
		100.0	109.0	24.3	106.7	0.2	I
V	89.6	113.2	61.7	78.5	0.1	V	
	111.9	123.5	109.8	96.0	0.0	M	
	115.4	109.1	0.0	86.0	14.7	F	
	54.4	143.1	163.6	49.9	85.0	L	
	77.3	168.9	73.2	44.4	90.2	I	
	58.8	172.0	112.2	157.0	70.1	V	
M	58.1	141.3	101.9	71.2	94.5	M	
	212.6	119.4	58.3	47.0	85.5	F	
	18.4	10.0	107.9	34.5	0.0	L	
	11.4	9.1	95.5	33.7	0.0	I	
	19.3	32.7	61.8	5.9	0.0	V	
	7.6	58.6	36.4	21.4	0.0	M	
F	0.0	54.1	20.7	4.1	0.0	F	

図 4. 125 種の LARFH 改変体の sulerythrin 改変体に対する結合力(濃いピンクであるほど高い結合力)。

化にも取り組んだ。始めに、3つの Leu 残基を疎水性アミノ酸である Leu、Ile、Met、Phe、Val へとランダムに置換し、LARFH 遺伝子ライブラリーを作製した。このライブラリーでは、 $5 \times 5 \times 5 = 125$ 通りのアミノ酸配列の組み合わせが生じる。また、プルダウンアッセイ法を用いて LARFH 改変体の sulerythrin 改変体に対する相互作用を簡易的且つ定量的に評価できる検出系を開発した(*7)。さらに、この検出系を利用して、125種の LARFH 改変体を解析した。図 4 は各変異体の結合力を示している。この結果から、3L 型結合面 (Leu-Leu-Leu) を持つ LARFH よりも強く sulerythrin 改変体と結合する改変体を複数種得ることができた。これらの改変体は疎水性結合面の形状的相補性が改善されたと推定できる。特に、Leu-Phe-Ile、Leu-Met-Val、Leu-Leu-Phe の結合面を持つ LARFH 改変体は、3L 型結合面を持つ LARFH 改変体と比較して、5.4 倍、4.7 倍、3.6 倍の結合力を示した。

5) 結合面の移植可能性の検証

タンパク質の多くはその分子表面に α ヘリックス構造を持つ。そして、sulerythrin と LARFH を基に開発してきた結合面はタンパク質分子表面の α ヘリックス上に設計した。従って、この結合面は他の α ヘリックス構造を持つタンパク質へと移植できると期待した。そこで、LARFH に設計した3つの Leu からなる 3L 型結合面を好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の 3-インプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH) と 2C-メチル-D-エリスリトール-2,4-シクロニリン酸キナーゼ (MECDPS) の2つのタンパク質の分子表面の α ヘリックス上に移植した。IPMDH と MECDPS はそれぞれ分子表面に多数の α ヘリックス構造を持つため、それぞれのヘリックスに個別に結合面を移植し、複数の改変体を作成した。また、sulerythrin に設計した 6 つの Leu からなる 6L 型結合面も IPMDH へと移植し、IPMDH 改変体を作製した(図 5)。

3L 型結合面を移植した IPMDH 改変体と MECDPS 改変体の sulerythrin 改変体との相互作用をプルダウンアッセイ法で解析した。また、6L 型結合面を移植した IPMDH 改変体と LARFH 改変体の相互作用を同様にプルダウンアッセイ法で解析した。3L 型結合面を導入した IPMDH 改変体計 12 個中 6 つは可溶性を示し、内 2 つは sulerythrin 改変体と相互作用した(*10,11)。また、3L 型結合面を導入した MECDPS 改変体計 5 個中 3 つは可溶性を示し、3 つとも sulerythrin 改変体と相互作用した。さらに、6L 型結合面を導入した IPMDH 改変体 1 種も LARFH 改変体と相互作用することが確認できた。したがって、本プロジェクトで開発したタンパク質間結合面は他のタンパク質にも移植可能であり、高い汎用性を有することが分かった。

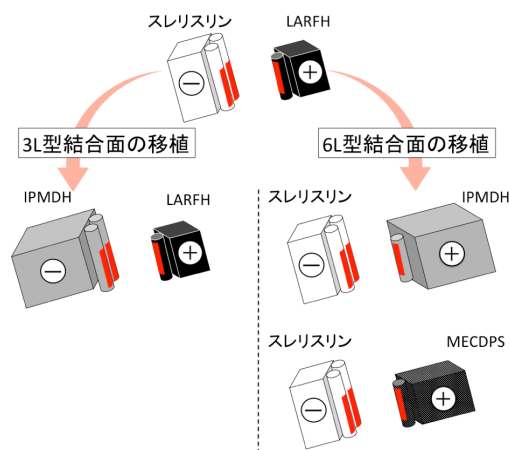


図 5. Sulerythrin と LARFH に設計した結合面の移植の概略図

2. 研究評価及び今後の研究計画

本研究により sulerythrin タンパク質と LARFH タンパク質の相互作用を人工的に創ることに成功

した。また開発した結合面を利用することで、自己組織化型のタンパク質繊維を構築できた。当初目標とした課題を達成した。さらに、結合面を導入して *sulerythrin* 改変体同士の非特異的な分子間相互作用を抑制することで凝集を抑制することに成功した。また、LARFH に導入した結合面を最適化することで、より強く *sulerythrin* 改変体と結合する改変体を見いだすことができた。さらに、*sulerythrin* と LARFH に設計した結合面は他のタンパク質へも移植可能であり、本タンパク質間結合面設計法は高い汎用性を有することが分かった。以上、当初目標とした課題を越えて 150%の成果を上げた。

今後、本プロジェクトで開発したタンパク質間結合面設計法を用いて、新たな繊維構造や、より複雑なタンパク質超分子構造の構築が期待できる。例えば、3量体や4量体タンパク質に結合面を移植することで、任意の枝分かれ構造を有する繊維の創出、シート状の超分子構造体の創出が期待できる。また、構造変化するタンパク質分子に本結合面を移植し、繊維とすることで、運動性を持った繊維構造の創出も期待できる。本研究で開発された移植可能なタンパク質-タンパク質接合面は今後バイオナノテクノロジーにおける基盤技術に発展していくことが期待される。

4. 研究成果の発表

雑誌論文

1. Yagi S., Akanuma S., Yamagishi M., Uchida T., Yamagishi A., Creation of artificial protein-protein interactions using α -helices as interfaces. *Biophys. Rev.* (2017) in press. (doi: 10.1007/s12551-017-0352-9)
2. *Yagi S., Akanuma S., Yamagishi M., Uchida T., Yamagishi A., De novo design of protein-protein interactions through modification of inter-molecular helix-helix interface residues, *Biochim. Biophys. Acta* **1864**(3): pp 479-487 (2016)
3. *Yagi S., Akanuma S., Yamagishi A., Addition of negatively charged residues can reverse the decrease in the solubility of an acidic protein caused by an artificially introduced non-polar surface patch, *Biochim. Biophys. Acta* **1844**(3): pp 553-560 (2014)

国際学会発表

4. *Sota Yagi, Satoshi Akanuma, Tatsuya Uchida, Akihiko Yamagishi, Creation of an artificial protein fiber by an easy-to-use designing of a protein-protein interaction, The 30th Annual Symposium of Protein Society, 2016/7, Batimore
5. *Sota Yagi, Satoshi Akanuma, Tatsuya Uchida, Akihiko Yamagishi, Construction of a Co-assembled Protein Fiber Composed of the Protein Derived from *Sulfolobus tokodaii* and the Artificial Thermostable Protein, Extremophiles2016, 2016/9, Kyoto
6. *Yagi,S., Akanuma, S., Yamagishi,A., De novo design of protein-protein interaction using hydrophobic and electrostatic interactions, The 29th Annual Symposium of Protein Society, 2015/7, Barcelona

国内学会・シンポジウム発表

7. *原田啓生、八木創太、山岸明彦、新規人工タンパク質複合体結合面における疎水性残基の組み合わせの検証、生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、2017/12、神戸
8. *大場創太、八木創太、吉原大貴、山岸明彦、人工タンパク質タンパク質相互作用に影響を与える結合面アミノ酸残基の最適化、生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、2017/12、神戸
9. *内山智尋、八木創太、山岸明彦、RFH と sulerythrin の共重合により形成される人工タンパク質線維の分岐の抑制、生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、2017/12、神戸
- 10.*八木創太、赤沼哲史、山岸明彦、Testing the universality of an artificial protein-protein interface designed on an α -helix, 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 2017/12、神戸
- 11.*八木創太、赤沼哲史、内田達也、山岸明彦、人工設計タンパク質間結合面の移植による新規タンパク質間相互作用の創出、第55回日本生物物理学会年会、2017/9、熊本
- 12.*八木創太、大場創太、吉原大貴、内山智尋、原田啓生、赤沼哲史、内田達也、梅村知也、山岸明彦、スマートナノバイオテクノロジー、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業平成 28 年度 年度末研究報告会、2017/3、東京
- 13.*八木創太、梶亜純、新納寛也、内田達也、赤沼哲史、山岸明彦、4ヘリックスバンドルタンパク質上への金属およびタンパク質間結合面の設計、第39回分子生物学会年会、横浜、2016/12
- 14.*Yagi S., Creation of an artificial protein fiber by an easy-to-use design method of protein-protein interaction, International Mini-symposium Smart Protein Engineering, 2016/11, Tokyo
- 15.*八木創太、赤沼哲史、山岸明彦、新規タンパク質分子間結合面の創成と人工タンパク質繊維の作成、第 54 回日本生物物理学会年会、2016 年 11 月、つくば
- 16.*八木創太、梶亜純、赤沼哲史、内田達也、山岸明彦、バイオナノテクノロジー：タンパク質-タンパク質結合とタンパク質-金属結合の創成、第 5 回医薬工 3 大学包括連携推進シンポジウム、2016/6、東京
- 17.*八木創太、赤沼哲史、山岸明彦、簡便なタンパク質間相互作用設計法を利用した非アミロイド型タンパク質線維の構築、第16回日本蛋白質科学会年会、福岡、2016/6
- 18.*八木創太、山岸愛美、赤沼哲史、内田達也、山岸明彦、疎水性相互作用とイオンペアのみを考慮した新規タンパク質間相互作用の設計、第 67 回生物工学会大会、2015/10、鹿児島
- 19.八木創太、山岸愛美、赤沼哲史、内田達也、山岸明彦、新規タンパク質間相互作用の設計とその繊維状構造体構築への応用、BMB2015、2015/12、神戸
- 20.八木創太、新規運動性タンパク質線維の創出、第10回「わかしゃち奨励賞」優秀提案発表会、2016/1、名古屋