

# 変異導入による酵素の可溶性発現技術

松井 大亮<sup>1</sup>・浅野 泰久<sup>2\*</sup>

異種発現系で酵素遺伝子を発現させた場合、封入体の形成などで活性を示さないことが多く、異種宿主による酵素の大量発現における大きな問題点となっている。これは、タンパク質のフォールディングに関する基礎的研究に、多くの未解明課題が存在することに起因している。この問題に対し、これまでにさまざまな解決法が報告されてきた。たとえば、大腸菌で異種タンパク質を発現させる手法として、①培養条件の検討<sup>1)</sup>、②正しい立体構造を形成させるシャペロンとの共発現<sup>2)</sup>、③シグナルペプチドや溶解度を向上させるタグとの融合<sup>3,4)</sup>、④封入体を形成したタンパク質を変性剤で解きほぐした後、正しい高次構造に巻き戻すリフォールディング<sup>5,6)</sup>がある。また、大腸菌以外では、⑤酵母や昆虫、あるいは動物の培養細胞で発現させる方法がある。さらに、⑥遺伝子の転写から翻訳までのすべてを試験管内で行う無細胞翻訳系を用いる方法<sup>7)</sup>の可能性も提案されている。しかし、これらの方法は、操作が煩雑な点や高額であるなどの問題点もあり、各方法における適応タンパク質範囲の検討も深く行われていなかった。

Asanoらは、キャッサバから見いだされたヒドロキシニトリルリアーゼ (*MeHNL*, EC4.1.2.37) が、大腸菌では活性を示さない不溶性酵素として発現するが、His103を疎水性残基 (Leu, Val, およびIle) に変異すること、あるいはLys176, Lys199, Lys224をProに変異することにより、大腸菌で可溶性タンパク質として大量に発現できることを発見した<sup>8)</sup>。そこで、*MeHNL*以外の酵素においても変異導入による可溶性発現ができるのかを検討し、さらに得られた変異型酵素における構造上の共通性を調査した。すなわち上記の方法以外に、⑦分子進化学や合理的設計に基づく変異導入による可溶性発現法の可能性を示した。

## 異種酵素の大腸菌における発現調査

大腸菌で不溶性タンパク質として発現する酵素を選抜するために、アミノ酸代謝に関連する酵素遺伝子として、酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) から8種類、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) から11種類、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) から23種類 (合計42種類) の遺伝子をpET11aに挿入し、大腸菌BL21 (DE3) での発現を検討した。その結果、16種の酵素 (酵母2種類、シロイヌナズナ2種類、キイ

ロショウジョウバエ12種類) が、不溶性タンパク質として発現することを見いだした。また、ヤンバルトサカヤスデ由来マンデロニトリル酸化酵素 (*ChuaMOX*, EC1.1.3.49)<sup>9)</sup> など、これまでに不溶性タンパク質として発現した酵素も含めて本研究の対象にした。

## ランダム変異導入法と選別法の改良

これらの不溶性タンパク質をコードする遺伝子にランダム変異を導入し、それぞれの酵素活性を指標として、活性を持つ酵素として発現する変異型酵素を探索した。従来のMn<sup>2+</sup>の添加やdNTP濃度の不均衡により変異を導入するerror-prone PCR法を用いるランダム変異には、約3時間で変異導入できるメリットがある。しかし、この方法では、変異導入率が0.1–0.2% (1,000 bpに対して1–2か所の変異) と低く、またライゲーションなどの後処理が必要であり、サンプルによってライブラリー作製にばらつきが生じる問題点がある。一方、遺伝子修復能を欠損した大腸菌XL-1Redを用いるランダム変異導入法は、形質転換後約2日間の培養を必要とするが、培養時間に応じて0.5–1.0% (1,000 bpに対して5–10か所の変異) の変異導入が可能であり、手間のかかる遺伝子操作が少ないので、多くのサンプルを同時に処理することが可能である。よって、本研究では大腸菌XL-1Red株を用いたランダム変異導入法を用いた。

また、プレート上のコロニーを96穴ディープウェルに移植するための機器QPix420 Bench-top Colony Picker (Molecular Devices, CA, USA) を導入して、30分で約1,200コロニーを植菌することを可能にし、植菌速度を向上させた。さらに、可溶性変異型酵素を迅速に探索するために、酵素活性を指標として活性を比色法で測定すること、メンブレンに転写したコロニーを直接呈色させるコロニーダイレクトアッセイ法を用いること、あるいは96穴マイクロプレートリーダーを用いることなどの工夫を行った。

## 活性を示す変異型酵素の変異部位の解析

**L-アルギニン脱炭酸酵素活性を有する変異型酵素のスクリーニング** シロイヌナズナ由来のL-アルギニン脱炭酸酵素 (*AtADC*, EC4.1.1.19) は大腸菌で不溶性画分に発現したので、*AtADC* 遺伝子をpET22bに導入し、大腸菌XL-1Redを用いて変異ライブラリーを構築した。

著者紹介 <sup>1</sup>富山県立大学工学部生物工学科 (助教)

<sup>2</sup>富山県立大学工学部生物工学科 (教授) E-mail: asano@pu-toyama.ac.jp  
生物学 第96巻 第10号 (2018)

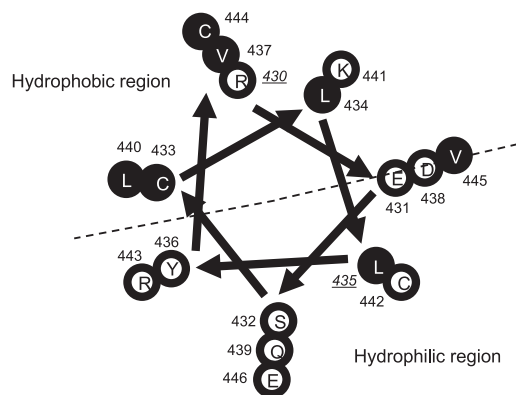


図1. *AtADC*の変異部位が含まれる $\alpha$ ヘリックス構造のヘリカルホイール図. ○は親水性アミノ酸, ●は疎水性アミノ酸を示す.

そして, L-Argの脱炭酸反応で生成するアグマチンをアミン酸化酵素で酸化し, 生成する過酸化水素を比色測定する方法で活性型酵素をスクリーニングした. その結果, Arg430がLeuに置換された変異型酵素およびLeu435がAsnに置換された変異型酵素が活性を示した.

本酵素のアミノ酸配列を二次構造予測プログラムPSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)で解析した結果, 本酵素は20個の $\alpha$ ヘリックス構造を有すると推定され, 変異箇所はN末端から13番目の $\alpha$ ヘリックス構造 (RESCLLYVDQLKQRCVE)に含まれることが明らかとなった. さまざまな解析による試行錯誤を重ねたすえ, ヘリカルホイールの図を描いた結果, Arg430は「疎水性領域に存在する親水性アミノ酸」, Leu435は「親水性領域に存在する疎水性アミノ酸」であることが明らかとなった(図1). そこで, 両アミノ酸残基を他のアミノ酸に置換した結果, 活性型変異酵素では, Arg430がハイドロパシーインデックス値の高い(疎水度が高い)アミノ酸に変異され, Leu435がハイドロパシーインデックス値の低い(親水度が高い)アミノ酸に変異されていることが明らかとなった(図2). また, それらを重複した変異導入体では, 活性の増加が見られたことから, 複数の変異導入により活性型変異酵素の生産量の増加が可能であると考えられた.

なお, ヘリカルホイールは,  $\alpha$ ヘリックス構造を模式的に描いたものであり, 軸上の視点から $\alpha$ ヘリックス構造上のアミノ酸を重ねて見た状態を描いたものである. 実際の $\alpha$ ヘリックス構造は1周で3.6個のアミノ酸が存在するので, ずれを補正し, 2周7個のアミノ酸として描いている.

#### MOX活性を有する変異型酵素のスクリーニング

大腸菌発現ベクターで不溶性として発現する*ChuaMOX*遺伝子の変異型酵素ライブラリーを構築し, (R/S)-マン

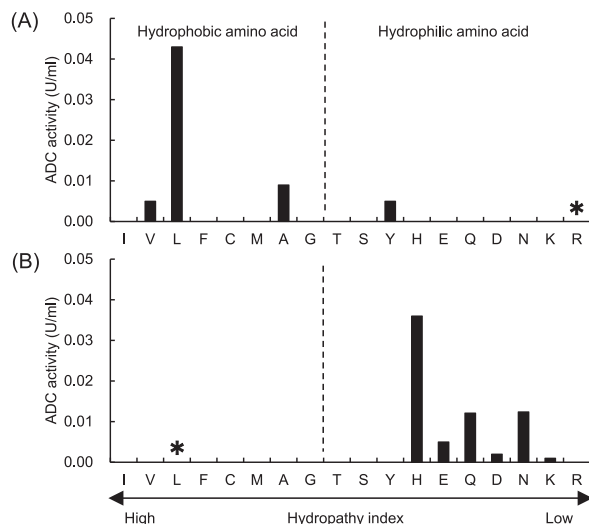


図2. *AtADC*のArg430とLeu435の変異導入実験. (A) Arg430への変異導入による活性の比較. (B) Leu435への変異導入による活性の比較. アスタリスクは元のアミノ酸残基を示す.

表1. *ChuaMOX*の野生型と変異型酵素の活性比較

|  | Wild type | V444H <sup>a</sup> | V455Q <sup>a</sup> |
|--|-----------|--------------------|--------------------|
| Total activity (U/ml <sup>b</sup> )    | ND        | 0.061              | 0.063              |
| Soluble protein (mg/ml <sup>c</sup> )  | 0.04      | 0.11               | 0.15               |
| Specific activity (U/mg <sup>c</sup> ) | ND        | 11.5               | 13.1               |

(a) 高い活性を示した変異体. (b) LB液体培地1 mlから得られた粗酵素液の酵素活性を比色定量法<sup>10)</sup>で測定した. NDは検出限界以下を示す. (c) 精製酵素のタンパク量 (mg/ml)とタンパク質1 mgあたりの酵素活性を示す. *ChuaMOX*活性は比色定量法で測定<sup>9)</sup>.

デロニトリルを基質として酸化活性を比色法で測定して, Val455がAlaに置換された変異型酵素が活性を示すことを見いだした(表1).

そこで, Val455を他のアミノ酸に飽和変異した結果, Valよりもハイドロパシーインデックス値が低い(親水度が高い)アミノ酸に置換した変異体で酵素活性が高く, 特に, 親水性アミノ酸 (Glu, Gln, Asp, Asn, Lys, Arg)に置換した酵素は, 高い酸化活性を示した(図3). 次に, *ChuaMOX*のアミノ酸配列から, 二次構造予測プログラムPSIPREDを用いて本酵素の二次構造を推定した. その結果, 変異箇所のVal455は,  $\alpha$ ヘリックス構造のアミノ酸配列 (RVDIDTMVRGVHVALNFG)中に存在することが明らかになった. また, ヘリカルホイールを描いた結果, Val455は, 親水性領域に存在する疎水性アミノ酸であった(図3). したがって, Val455のAlaへの置換は,  $\alpha$ ヘリックス構造内への変異の導入であり, さらに, 親水性領域に存在するハイドロパシー

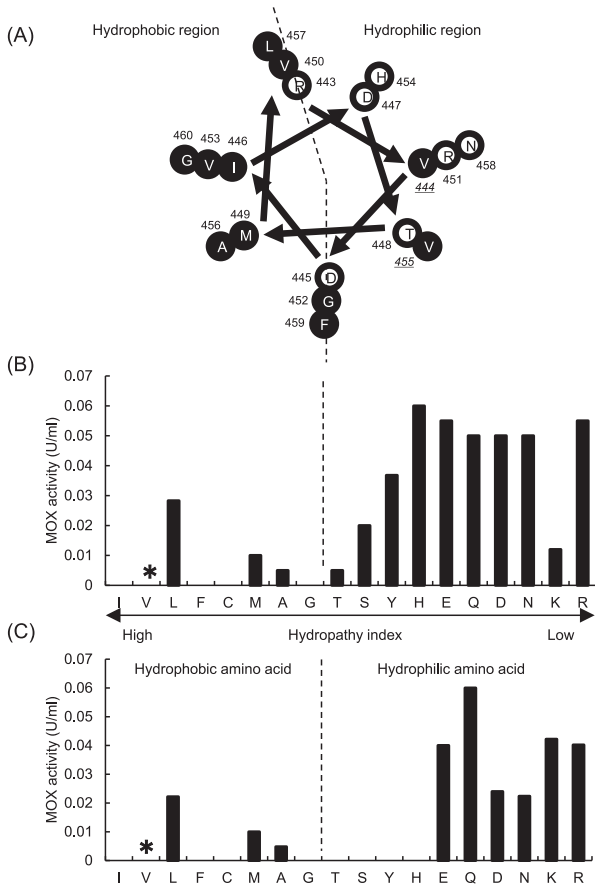


図3. *ChuaMOX*のVal444とVal455への変異実験。(A)ヘリカルホイール図, ○は親水性アミノ酸, ●は疎水性アミノ酸を示す。(B)Val444への変異導入によるその他の変異体の活性比較, アスタリスクは元のアミノ酸残基を示す。(C)Val455への変異導入によるその他の変異体の活性比較. LB液体培地1 mlから得られた粗酵素液の酵素活性を比色定量法<sup>10)</sup>で測定した。

インデックス値の低い(親水度が高い)アミノ酸への変異であることが明らかとなった。

また, Val455と同じ $\alpha$ ヘリックス構造内にあるVal444も「親水性領域に存在する疎水性アミノ酸」であるので, 本アミノ酸を他の19種類のアミノ酸に置換した. その結果, Val444でも同様にヒドロパシーインデックス値の低いアミノ酸への変異により活性型酵素として発現することが明らかになった(図3)。

**$\alpha$ ヘリックス構造に着目した方法の利用** 前述の結果を踏まえて, 他の不溶性発現酵素の二次構造を予測し,  $\alpha$ ヘリックス構造の部分抽出し, ヘリカルホイール図を描いた. その図から「親水性領域に存在する疎水性アミノ酸」もしくは, 「疎水性領域に存在する親水性アミノ酸」を特定し, それらの残基に対して飽和変異プライマーでライブラリーを構築し, 活性型酵素を探索した. その結果, キイロショウジョウバエ由来L-オルニチン脱炭酸酵素 (*DmODC*, EC4.1.1.17), L-グルタミン酸

表2.  $\alpha$ ヘリックス構造に着目した変異導入法による可溶性発現

| Enzyme       | Position | Wild type |                 | Mutant  |                 |
|--------------|----------|-----------|-----------------|---------|-----------------|
|              |          | Residue   | Activity (U/ml) | Residue | Activity (U/ml) |
| <i>DmODC</i> | 117      | Lys       | ND              | Leu     | 0.45            |
|              | 176      | Leu       | ND              | Glu     | 0.04            |
| <i>DmGDH</i> | 174      | Val       | ND              | Asp     | 0.14            |
|              | 257      | Lys       | ND              | Tyr     | 0.91            |
|              | 261      | Leu       | ND              | Glu     | 0.05            |

LB液体培地1 mlから得られた粗酵素液の酵素活性を, *DmODC*活性は比色定量法<sup>10)</sup>, *DmGDH*活性は340 nmで $\beta$ -NADHの生産量で測定<sup>11)</sup>した. NDは検出限界以下を示す。

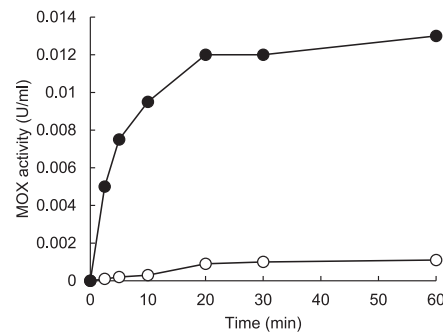


図4. 変性*ChuaMOX*のフォールディング実験. ○が野生型酵素, ●が変異型酵素V455Eを示す. LB液体培地500 mlから得られた不溶性画分を8 Mグアニジン溶液10 mlで溶解し, その内10 mg分を還元剤DTTと補酵素FADを含む20 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)に滴下し, その溶液を比色定量法で測定した<sup>9)</sup>。

脱水素酵素 (*DmGDH*, EC1.4.1.2) を活性型酵素として発現することができた(表2)。

**MOXでの解析** 野生型酵素と変異型酵素V455Eの封入体(両者ともに10 mg)を8 Mグアニジン溶液で可溶化した後に, 還元剤DTTと補酵素FADを含む緩衝液に滴下し, 経時的に活性を測定して, リフォールディングの速度を比較した. その結果, 野生型酵素よりも変異型酵素の方が, リフォールディング効率が良く(図4), ニッケルアフィニティーカラムを用いた精製においても, 変異型酵素の方が多く得られた. MOXにおいて,  $\alpha$ ヘリックス構造上に存在するアミノ酸残基が, フォールディングに影響していることが明らかとなった。

以上の結果から, これらの酵素において, 「 $\alpha$ ヘリックス構造部分の親水性領域に存在する疎水性アミノ酸, または同部分の疎水性領域に存在する親水性アミノ酸」に変異を導入することにより活性を持つ可溶性酵素として発現できることが明らかとなった(「 $\alpha$ ヘリックス法」)<sup>12)</sup>。

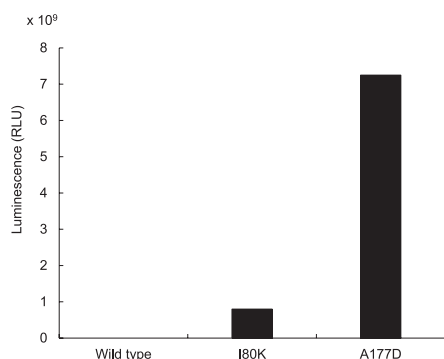


図5. *MpLUC*のI80KとA177Dの活性(発光)比較. LB液体培地1 mlから得られた粗酵素液のLuminescenceを発光スペクトルで測定した<sup>13)</sup>.

### 一次配列解析ソフトINTMSAlignの利用

上記の検討結果より、 $\alpha$ ヘリックス構造中のアミノ酸のヒドロパシーインデックス値が、可溶性発現に大きく影響を与えていることが明らかになった。そこでERATO浅野酵素活性分子プロジェクトの中野研究員が中心となって開発した一次配列解析ソフトINTMSAlign<sup>14)</sup>に追加された機能であるHiSol値(INTMSAlignによりコンセンサス残基を同定し、アミノ酸のヒドロパシーインデックス値から、疎水性度が大きく異なる残基を抽出するための値)と上記の「 $\alpha$ ヘリックス法」を組み合わせた手法を開発した<sup>9)</sup>。たとえば、大腸菌で活性(発光)を検出できなかった海洋性プランクトン由来ルシフェラーゼ(*MpLUC*)の可溶性発現では、 $\alpha$ ヘリックス構造上の疎水性領域中の親水性残基、および親水性領域中の疎水性残基のHiSol値を求め、HiSol値が高い候補残基として、Ile80とAla177を見だし、前者ではLys、後者ではAspが、他のルシフェラーゼにおいて高い比率で保存されていることを明らかにした。次に、I80KとA177Dの変異型酵素を作製し、両変異型酵素で発光活性が増加することを確認した(図5)。続いて、アフィニティカラムを用いて、変異導入酵素を単一に精製し、活性型変異酵素であることを確認した。

### まとめと今後の展望

本研究では、変異導入による可溶性発現の一般性を検討するにあたり、不溶性発現するさまざまなタンパク質の取得および変異導入法と活性検出法の改良を行い、迅速化したスクリーニング法を構築した。次に、ランダム変異法で得られた活性型変異酵素の変異点について調べ、二次構造予測法で推定される $\alpha$ ヘリックス構造とアミノ酸の疎水性度に共通性があることを見いだした。

また、この $\alpha$ ヘリックス法を一次配列解析ソフトINTMSAlignとその追加機能のHiSol値の絶対値が高い残基を抽出する方法と組み合わせると、置換するアミノ酸残基の位置だけでなく、置換に用いる候補アミノ酸も予測することが可能になる。これらの方法を用いた23例の結果では、およそ50%の酵素を活性型酵素として得ることができた。現在の可溶性発現量はまだ低く、高い発現量を得るためには複数の変異の組合せなどのさらなる検討が必要である。本研究で開発した変異による可溶性発現法はこれまで報告されている方法①~⑥に比べて、酵素の構造との関連性に着目して、従来の難問に切り込んだ初めての手法であり、かつ操作の簡便性などにおいて優れている。ただ、酵素の可溶性発現を効率的に行うには、さらに多くのファクターがあることも今回の研究から知ることができ、今後も、種々の手法、たとえば活性を指標としたスクリーニングをさらに継続することで、より有効な手段の発見につながると考えている。

これらの分子進化学や合理的設計に基づく変異導入による可溶性発現法は、今後、それらの特徴を考慮して使用することにより、可溶性発現の研究の更なる発展、および酵素の結晶構造解析や物質変換などへの利用に関する研究の発展に寄与し、将来、植物や動物由来の酵素を産業界で広く利用するために貢献できると考えている。

### 謝 辞

本研究は、独立行政法人科学技術振興機構(JST)の戦略的創造研究推進事業(ERATO)を受けて行われたものです。一次配列解析ソフトINTMSAlignを利用した可溶性発現法においては、ERATO浅野酵素活性分子プロジェクトの中野祥吾研究員(現静岡県立大学助教)のご協力によるものです。心より御礼申し上げます。また本研究にご協力いただいた多くの共同研究者の方々に感謝申し上げます。

### 文 献

- 1) 久寿米木幸寛ら：特開2012-44888.
- 2) 西原和代ら：特開平11-9274.
- 3) 廣瀬修一ら：特開2012-116816.
- 4) 井上等敏：特開2012-179062.
- 5) 嶋本伸雄：特開平11-335392.
- 6) 角田達朗ら：特開2011-46686.
- 7) 木川隆則ら：特開2004-105070.
- 8) Asano, Y. *et al.*: *Protein Eng. Des. Sel.*, **24**, 607 (2011).
- 9) Ishida, Y. *et al.*: *Sci. Rep.*, **6**, 26998 (2016).
- 10) Sugawara, A. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **118**, 496 (2014).
- 11) Asano, Y. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **262**, 10346 (1987).
- 12) Matsui, D. *et al.*: *Sci. Rep.*, **7**, 9558 (2017).
- 13) Takenaka, Y. *et al.*: *Gene*, **425**, 28 (2008).
- 14) Nakano, S. *et al.*: *Sci. Rep.*, **5**, 8193 (2015).