

研究代表者	所属学系・職名 物質・エネルギー学系・教授 氏名 杉森 大助
研究課題	試験管内人工進化による酵素 (L-グルタミン酸オキシダーゼ) の耐熱性向上 Enhancement of thermostability of enzyme (L-glutamate oxidase) by artificial evolution in vitro.
成果の概要	<p>L-グルタミン酸オキシダーゼ (LGOX) は、体外臨床診断薬や食品中に含まれる L-グルタミン酸 (L-Glu) の定量において産業上有用な酵素である。近年、本酵素を用いたバイオセンサー、バイオチップの開発が注目されているが、既存 LGOX は耐熱性と比活性が低いという問題があった。そこで本研究では、これら技術的課題を解決することを目指し、本酵素の耐熱性向上に取り組んだ。</p> <p>放線菌 NT1 株由来 LGOX_{NT1} 遺伝子に対して、様々なアプローチにより試験管内人工進化を施した。まず、酵素分子を構成するアミノ酸のゆらぎ (温度因子、B-factor) に着目した。該遺伝子塩基配列にランダム変異導入を行い、耐熱性が向上した変異型酵素をスクリーニングにより取得した。そのうち変異体 No. 42 (E42) は 60℃、30 min 処理でも 100% 活性を保持した。この変異型酵素のアミノ酸置換部位を確認した結果、B-factor 値が低下することが確認できた。そこで、B-factor 値を低下させるアミノ酸置換点をスクリーニングし、耐熱化ホットスポットにあたるアミノ酸置換点を推定した。耐熱性向上を予測したアミノ酸置換変異体について耐熱性向上を確認した結果、変異前の野生型酵素 (WT) の耐熱性 (55℃) よりも 5℃ 高い 60℃ まで活性を維持し、さらに比活性が 3.93 から 4.18 U/mg-protein に向上する耐熱化酵素の創製に成功した。</p> <p>次に、人工タンパク質配列設計法の一つである完全コンセンサス法を用いた LGOX_{NT1} の耐熱化を試みた。本方法の原理はホモログ (アミノ酸配列および機能類似タンパク質) との配列比較から、高頻度で使用されているアミノ酸に置換するという変異導入法である。690 残基からなる LGOX_{NT1} のアミノ酸配列のうち、104 ヶ所に置換を導入した結果、WT の耐熱性 (55℃) よりも 10℃ 高い 65℃ まで活性を維持し、比活性も低下しない耐熱化酵素の創製に成功した。104 ヶ所のアミノ酸置換部位は、酵素分子の表面およびサブユニット 2 量体間の界面に集中しているという特徴があり、これまでの常識を覆す極めて興味深い知見が得られた。</p> <p>特記事項</p> <p>本研究成果をさらに進展させるために公益財団法人日本応用酵素協会の 2018 年度の酵素助成に研究代表者杉森が採択された。</p> <p>学会発表</p> <p>1) 進化工学的手法を用いた放線菌由来 L-グルタミン酸オキシダーゼの熱安定性の向上、○林 優花、中村誠彌、酒瀬川信一、杉森大助、2017 年酵素・補</p>

<p>成果の概要</p>	<p>酵素研究会、2017. 6. 23 (秋保温泉 秋保リゾートホテルクレセント、仙台市)</p> <p>2) 進化工学的手法を用いた放線菌由来 L-グルタミン酸オキシダーゼの熱安定性の向上、○林 優花、中村誠彌、酒瀬川信一、<u>杉森大助</u>、日本生物工学会 2017 年度大会、2017. 9. 14 (早稲田大学、東京)</p> <p>3) <i>Streptomyces</i> sp. NT1 株由来 L-グルタミン酸オキシダーゼの人工タンパク質設計による耐熱性の向上、○林 優花、中村誠彌、酒瀬川信一、中野祥吾、伊藤創平、浅野泰久、<u>杉森大助</u>、日本生物工学会 2017 年度北日本支部福島シンポジウム、2017. 12. 25 (コラッセふくしま、福島市) ポスター最高賞受賞</p> <p>4) <i>Streptomyces</i> sp. NT1 由来 L-グルタミン酸オキシダーゼの人工タンパク質設計による耐熱性向上、○林 優花、中村誠彌、酒瀬川信一、中野祥吾、伊藤創平、浅野泰久、<u>杉森大助</u>、日本農芸化学会 2017 年大会、2017. 3. 16 (名城大、名古屋)</p> <p>外部資金獲得 公益財団法人日本応用酵素協会2018年度酵素助成、「Wet&Dry実験を融合させた新しい酵素分子進化法による高比活性L-グルタミン酸オキシターゼの耐熱性向上」、研究代表者 <u>杉森大助</u> (50万円)</p>
--------------	--