



## 巻頭言

### 環境とバイオテクノロジー

去る3月11日に発生した東日本大震災は東北地方を中心に我が国にかつてない甚大な被害をもたらした。現在の厳しい状況を乗り越えるためには我が国の総力をあげて立ち向かわなければならないことはいうまでもない。直面している問題は社会基盤の復興とともに医療・環境・食糧・エネルギーなどと多岐の分野にわたるが、いずれに対してもバイオテクノロジーが果たすべき役割は大きい。特に急務として挙げられている環境浄化や再生可能エネルギー技術の開発は古くからバイオテクノロジーの大きな研究課題でもあった。

環境浄化に関しては例えば各地の重油汚染に対して油酸化分解能の高い微生物の散布（バイオオーグメンテーション）や土着微生物の活性化（バイオステイミュレーション）による浄化が期待される。重金属汚染や放射能汚染に対しては原子レベルの汚染であるので回収することが必要となるが、閉じた浄化系では微生物や生体分子による取り込みや吸着、開放系なら植物による吸収と刈り入れ（ファイトレメディエーション）が有効と考えられる。各地の下水処理場では放射能に汚染された汚泥が大量にたまっているが、これは自然界から1次回収・濃縮されたものにとらえるとその処理法の開発は今後非常に重要と考えられる。全体に対する割合は小さくても継続的に放射能汚染を回収する方法の手掛かりとなり得る。

エネルギー分野では微生物による水素やメタンの生産能力や脂溶性化合物燃料の合成能力の探索と培養工学的・代謝工学的増強に関する研究が精力的に進められ、大きな成果が得られている。生産能のさらなる向上とともにこれらの合成系へ原料（未利用・非食性バイオマスや光等）の供給をいかに効率よくタイアップできるかが鍵となっており様々なアプローチから研究が進められている。

筆者はこれまでも環境やエネルギー問題などを出発点として研究を進めているが、恥ずかしながら危機感がいままで十分でなかったことを認めざるを得ない。研究の設計にあたり、解決すべき問題の把握とその研究から期待される貢献の「定量的」な意識が不足していたことをいま直面している諸問題のスケールの大きさに強く実感している。必ずしもより即効性のある研究領域に移るわけではないが、少なくとも今後の研究において、特に環境やエネルギー関連の研究においては、出口のスケールの大きさに対する意識を強く持つことにより、いままで自分になかった視点や発想が生まれることを願うばかりである。

# 未培養系統群アーキアゲノムから見出された真核生物型蛋白質修飾系

布浦 拓郎

## (海洋研究開発機構・深海・地殻内生物圏研究プログラム)

ユビキチン (Ub)、活性化酵素 (E1)、結合酵素 (E2)、リガーゼ (E3) からなる翻訳後蛋白質修飾系 (ユビキチンシステム) は真核生物特有の仕組みであり、原核生物 (アーキア及びバクテリア) には存在しないとされてきた。一方で、ユビキチンシステムを構成する個々の蛋白質、あるいはユビキチンシステムと連携して選択的な蛋白質分解を行うプロテアソームの起源は、恐らく生命の共通祖先の時代まで遡る。プロテアソームは、全てのアーキア及び *Actinomycetes* に属するバクテリアに分布しており、原核生物型ユビキチン様蛋白質、E1 様及び E2 様蛋白質は、プロテアソームの有無に関係なく原核生物に広く存在する。そして、それらの多くについては、未だ機能不明であるが、モリブデン・タングステン補酵素合成系やチアミン合成系において、原核生物型 Ub 様及び E1 様蛋白質が機能することが知られている。更に近年、*Mycobacterium* では Pup、好塩性アーキア *Haloferax* では SAMP というユビキチン様蛋白質による蛋白質修飾が発見され、その被修飾蛋白質がプロテアソームにおいて選択的に分解されることも明らかにされた (1, 2) (図 1)。特に、*Haloferax* では、原核生物型 E1 様蛋白質が SAMP による蛋白質修飾に働くことも示されている。但し、これらの原核生物で見られる蛋白質修飾系には真核生物型との明確な違い、即ち、①ユビキチン様蛋白質が真核生物型とは明確に区別できる、②E2 様蛋白質の関わりが確認されない、③E3 様蛋白質に至ってはゲノム上に類似配列すら見いだされていないが存在する。

一方、筆者らのグループは、地下鉱山の坑道に湧く 70 度の熱水中で繁茂する微生物群集のメタゲノム解析を行い、従来、*Crenarchaeota* に属す未培養系統群と考えられていた Hot Water Crenarchaeotic Group I (HWCGI) に属するアーキア *Candidatus' Caldiarchaeum subterraneum'* の全ゲノム再構築に成功した (3)。そして、このゲノム情報を詳細に検討したところ、*C. subterraneum* は、超好熱 *Crenarchaeota* とは勿論、*Crenarchaeota* から独立した新門として提唱されている *Thaumarchaeota* (海洋から 70 度程度の高温環境まで多様な環境に生息するアンモニア酸化アーキア) とも異なる特徴を有することが明らかになった。そこで、筆者らは *C. subterraneum* を含む HWCGI は新しい門に相当する可能性が高いと判断し、Candidate division '*Aigarchaeota*' を提唱した (図 2)。このユニークな *C. subterraneum* ゲノムにおいて、中でも特筆すべき特徴は、真核生物型ユビキチンシステムをコードするオペロン様遺伝子構造の存在である。この発見は、真核生物型ユビキチンシステムの誕生が真核生物の誕生以前に遡ることを強く示している。

*C. subterraneum* ゲノム中のユビキチンシステム遺伝子クラスターには、ユビキチン様、E2 様、E1 様、RING finger domain 蛋白質をコードする各遺伝子が含まれ、その隣接した逆鎖には、真核生物のプロテアソームに付随する脱ユビキチン化酵素 RPN11 のホモログが存在する (図 3)。そして、個々の遺伝子は勿論、遺伝子構造もが進化に関する重要な情報をもたらしてくれる。オペロン様という遺伝子構造自体が原核生物ゲノムの特徴であるが、Ub-E2-E1 という並びもまた、この遺伝子群が真核生物からの水平伝播によってもたらされた可能性を強く否定する。なぜなら、原核生物型 Ub 様、E1 様、E2 様蛋白質遺伝子は、(いずれかを欠くこともあるが、) しばしばオペロン様クラスターあるいは融合蛋白質として検出され、Ub-E2-E1 という順に非常に高い保存性が存在する (4)。更に、我々の知る限り、原始的な単細胞真核生物においても、ユビキチンシステム関連遺伝子はゲノム上に散在しているのである。このように、真核生物の異なる領域にコードされた遺伝子が個別にアーキアに伝播し、

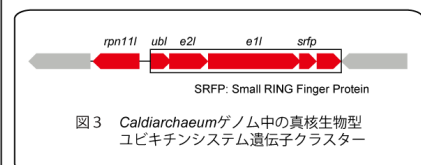
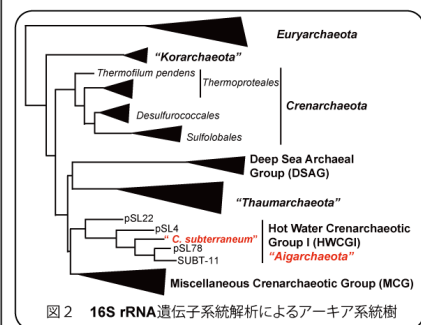
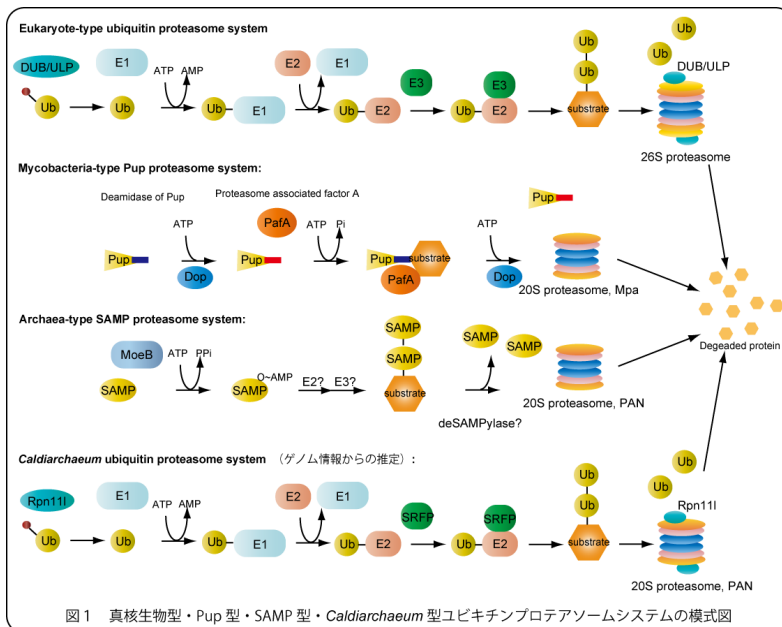
それらがオペロンに、しかも定まった順に再編されるということは非常に考え難いことである。

逆に、*C. subterraneum* のユビキチンシステム、そして個々の遺伝子配列は、以下のように既知の原核生物型システムとは異なる、明確な真核生物型システムの特徴を有す。①RING 型 E3 の活性中心である RING finger domain を有する蛋白質 (Small RING Finger Protein; SRFP) が含まれる (これまで E3 の候補となる遺伝子すら原核生物からは報告されていない)。②RPN11 様蛋白質の C 末端には、RPN11 と同様、プロテアソームとの結合に必要なシート構造が存在する (RPN11 は原核生物にも広く分布する JAB family プロテアーゼに属すが、原核生物の JAB プロテアーゼには C 末端にシート構造が存在しない)。③Ub 様蛋白質の C 末端は、Gly-Gly の後にもアミノ酸残基が続き、真核生物と同様の脱ユビキチン化酵素による成熟過程の存在が示唆される。また、このことは RPN11 様蛋白質の存在と合致する (*Haloflex* SAMP の C 末端は成熟過程の必要のない Gly-Gly である。*Mycobacterium* Pup では C 末端が Gly-Gly-Gln であり、Gln の脱アミド化後に被修飾蛋白質と結合するという、真核生物及びアーキアとは異なる反応系が存在する)。④E1 様蛋白質には、真核生物型ユビキチンシステムに関わる E1 (様) 蛋白質にのみ観察されるシート構造が存在する。

上述のように、*C. subterraneum* から、原核生物型遺伝子構造にコードされた真核生物型ユビキチンシステムが見出された。この発見は、真核生物型ユビキチン-プロテアソームシステムの原型が、アーキアと真核生物の分岐以前に存在していたことを示す。一方で、*C. subterraneum* には、①真核生物には複数存在するユビキチンシステムが一つしか存在しない、②真核生物の RING 型 E3 に比べ SRFP が非常に小さい、という真核生物との違いも存在する。これらの違いは、真核生物型ユビキチンシステムの多様化、分業化が、真核生物において生じたことを示すが、逆に、*C. subterraneum* には真核生物が誕生した当時のシステム、機能が保存されている可能性を示唆するものでもある。現在、真核生物型ユビキチンシステムの原型へ迫るべく、生化学的機能解析が進行中である。

#### 参考文献

1. Darwin, KH (2009) Nature Rev Microbiol 7, 485 -491
2. Hambard, MA et al. (2010) Nature 463, 54 -60
3. Nunoura, T et al. (2011) Nucleic Acid Res in press , doi:10.1093/nar/gkq1228
4. Burroughs, AM et al. (2009) Proteins 75, 895 -910



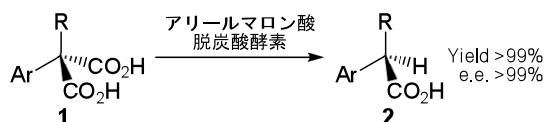
# 自然界に存在しない酵素をデザインする

宮本憲二 (慶應義塾大学理工学部・生命情報学科)

## 1. はじめに

近年、進化分子工学的手法による酵素の機能改変が盛んに行われている。そして、構造情報を参考にして合理的に設計を行う「Rational Design」により、ある程度の精度で酵素機能の改変を行えるようになってきた。この方法では、変異導入する部位を特定するために、詳細な立体構造や基質との結合情報が必要不可欠となる。変異導入部位は活性部位付近に限定されるので、主に立体選択性や基質特異性の改変に利用されている。

本稿で取り上げる酵素は我々が独自に見いだしたもので、天然に存在しない化合物であるアリールマロン酸(1)に作用し、光学的に純粋なアリール酢酸誘導体(2)へと変換する脱炭酸活性を持つため、物質生産の観点からも注目されている。



著者らは、配列や構造情報に基づいて本酵素に最小限の変異を導入することにより、従来 Rational Design では困難であった全く新しい酵素への改変や酵素活性の向上に成功したので紹介したい。

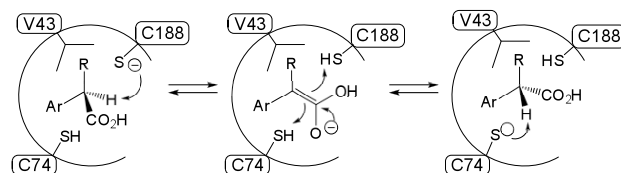
## 2. アリールマロン酸脱炭酸酵素の反応機構とラセマーゼ創出

土壌中からフェニルマロン酸を炭素源として生育する微生物をスクリーニングし、脱炭酸酵素活性を持つ *Alcaligenes bronchisepticus* を分離した。本酵素を均一に精製したところ、活性の発現には補酵素を必要としない全く新しいタイプの脱炭酸酵素であることがわかった。二置換より一置換のアリールマロン酸に対して高い反応性を示したことから、「アリールマロン酸脱炭酸酵素 (以下 AMDase)」と命名した。また、阻害実験からシステインが

活性に重要な残基であることがわかった。更に、 $^{13}\text{C}$  でラベルした基質を合成し反応を試みたところ、脱炭酸反応は完全に立体反転により進行していた。これらの結果から、プロキラルな中間体に対してエナンチオ面選択的にプロトンが付加する反応機構が推定された。

最近、我々のグループと他のグループは独立に AMDase の X 線結晶構造解析に成功した。そして、代表的な基質である  $\alpha$ -フェニル- $\alpha$ -メチルマロン酸を用いて結合モデルを作成し、反応機構を考察した。その結果、疎水性ポケットに入り込んだ pro-R 側のカルボキシル基が不安定化されて脱炭酸反応が始まり、生成したエノール型中間体に対して C188 がプロトン供与を行い、光学活性カルボン酸が生成するという反応メカニズムを推定した。

ホモロジー検索の結果、AMDase はアミノ酸ラセマーゼと低いながらも相同性を示した。アミノ酸ラセマーゼの反応は、活性中心に存在する二つのシステインが共同してプロトンの引き抜きと供与を行う二塩基機構が提唱されている。AMDase とアミノ酸ラセマーゼの配列を比較すると、AMDase の活性中心にはシステインが一つ(C188)しか存在しない。そこで、AMDase 活性部位の基質を挟んだ反対側に存在する G74 にシステインを導入すれば、ラセマーゼに改変できるのではないかと考えた。



そこで、設計に基づいて G74C 変異体を作成しところ、今まで全く報告例のない  $\alpha$ -アリールプロピオン酸に対するラセマーゼ活性を確認した (表 1)。また、G74C 変異体の AMDase 活性は野生型の 2.2%に低下していた。基質特異性を確認したところ、脱炭酸反応 (AMDase) において良い基質は、ラセミ化反応 (G74C) でも良い基質であった。この

事実は、脱炭酸とラセミ化が同じ活性部位で起こっていることを示唆している。

次に、ラセマーゼ活性の向上を目的として基質と酵素のドッキングシミュレーションを行い、疎水性ポケットを改変した G74C/V43A 変異体をデザインした。この二重変異体は、 $\alpha$ -フェニルプロピオン酸に対するラセマーゼ活性が G74C の約 1.8 倍に向上し、 $\alpha$ -フェニル- $\alpha$ -メチルマロン酸に対する AMDase 活性は野生型の 0.17%に低下していた。また、G74C/V43A 変異体のナプロキセンに対するラセミ化活性は G74C の 2.7 倍 (表 2, Run2)、ケトプロフェンに対する活性は実に 33 倍に向上していた (表 2, Run3)。従来、変異導入による酵素活性の向上は最も困難なことであり、この様に合理的な設計により活性が劇的に向上した例は希である。以上の結果から、Rational Design により AMDase 活性がほぼ完全に消失し、自然界に存在しない化合物に作

用するラセマーゼを創出することに成功した (K. Miyamoto *et al*, *Chem. Eur. J.*, (2011), 17(2), 557-563)。

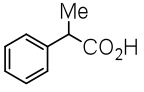
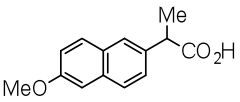
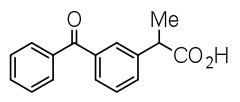
### 3. おわりに

我々は、AMDase の反応機構と立体構造を明らかとし、その情報をもとに効率よく新酵素を作り出し酵素機能を改変することに成功した。 $\alpha$ -アールプロピオン酸に作用するラセマーゼは天然には存在しないものであり、プロフェン類の光学分割の際に有用な触媒になると期待している。また、これらの知見は、酵素機能を積極的にデザインしていく時に、新たな情報を提供できると考えている。現在は、明らかとなった立体構造をもとに、酵素活性の向上や基質特異性の拡大を検討中である。その中には、約 920 倍の酵素活性の向上に成功した例もあり、またの機会にご紹介したい。

表 1 各種酵素の活性比較

酵素	AMDase活性			ラセマーゼ活性		
	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	相対活性 (%)	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	相対活性 (%)
野生型	13.9	353	97700	no reaction		0
G74C	10.4	0.27	100	30.2	0.60	100
G74C/V43A	11.4	0.022	0.17	29.7	1.10	186

表 2 ラセマーゼの基質特異性と反応速度

Run	基質	相対活性(%)		活性向上率 (%)
		G74C	G74C/V43A	
1		100	186	1.8
2		770	2100	2.7
3		1.5	50	33

今後の人口増加および開発途上国の生活水準の上昇に伴い、近い将来食料不足が深刻な問題となることが予測されている。食糧問題の解決策の一つとして、農作物生産の向上が望まれている。そこで、我々は農作物生産性の向上に寄与すべく、その基幹技術の開発を行っている。まずは、植物ウイルスによる被害を抑えるべく、植物にウイルス感染耐性を付与する新手法を開発した。すなわち、ウイルスゲノムの複製の開始に必要な、ウイルス複製タンパク質のウイルスゲノム上の複製起点への結合を阻害できる人工 DNA 結合タンパク質を開発し、その遺伝子を組み込んだ植物でウイルス感染耐性を示すことに成功した。

## 1. はじめに

現在世界の人口は 65 億人であるが、今後開発途上国を中心に増加し、2050 年には 1.4 倍の 90 億人を越すと予測されている。さらに、開発途上国における所得向上による食生活の多様化等により、世界の農作物需要は 2050 年までに倍増するとも指摘されている。しかしながら、耕地面積の拡大には限界があり、増加する農作物需要を満たすには単位面積あたりの収穫量を大幅に向上させる必要がある。そのためには、従来の技術の改良ではなく、全く新しい作用原理に基づく技術の開発が必要と考えられる。

そこで我々は、工学的なアプローチにより食糧問題を解決すべく、農作物生産性の向上のための基幹技術の開発に取り組んでいる。まず我々が標的にしたのは、ウイルス感染である。植物に感染するウイルスは多くの種類が報告され、さらに現在も新種のウイルスが出現し続けている。植物ウイルスは、様々な種類の農作物に感染し、その収穫量を大幅に減らしており、その感染の予防および拡大を防ぐことは食糧問題の上でも非常に重要な問題である。

## 2. DNA ウイルス

DNA ウイルスは、ゲノムとして DNA を保持し、その中でもっとも大きなファミリーをジェミニウイルスが占めている。ジェミニウイルス粒子は直径約 20 nm の正二十面体構造が二つつながった構造から成り、2.5 ~ 3 kbp の 1 本鎖 DNA ゲノムを内包している。このウイルスは植物に侵入後、最終的に核に到達した後、1 本鎖ゲノム DNA が宿主植物の内在性の酵素群により 2 本鎖 DNA に変換される。それから、この 2 本鎖 DNA からウイルス複製タンパク質が転写・翻訳される (図 1)。このウイルス複製タンパク質は DNA 結合能と酵素活性を有しており、ウイルスゲノム上の複製起点に結合することにより、ウイルスゲノム DNA の複

製を開始させる。最終的にウイルスが増殖することにより、ウイルスが感染した植物は発病してしまうので、もしこのウイルス複製タンパク質のウイルスゲノム上の複製起点への結合を何らかの方法で阻害することができれば、たとえウイルスが植物内に侵入しても、ウイルスは複製できず増殖できないため、植物のウイルス感染を防ぐことが可能になると考えられる。

## 3. 人工 DNA 結合タンパク質

我々は、真核生物の転写因子の DNA 結合部位に見出される亜鉛フィンガーという DNA 結合タンパク質を基にして、生体内でゲノム上の望みの DNA 配列を認識できる、人工 DNA 結合タンパク質 (図 1) のデザインおよび創出法を開発した<sup>1)</sup>。我々は、この人工 DNA 結合タンパク質あるいはその誘導体を用いて、植物体内およびヒト培養細胞内の標的遺伝子の発現制御や位置特異的な DNA 切断等に成功している<sup>2,3)</sup>。

この人工 DNA 結合タンパク質は、4 塩基対を認識する亜鉛フィンガー・ドメインを複数個連結したものである。開発した「認識コード表」を用いて、特定の 4 塩基対の認識に必要な 4 個のアミノ酸を選ぶだけで、標的 DNA 配列の認識に必要な亜鉛フィンガー・ドメインを設計できるようにした。この手法により pM オーダーの高い親和性および選択性を有する人工 DNA 結合タンパク質を迅速に創出することが可能である。

## 4. ウイルス耐性植物の創出

そこで、この人工 DNA 結合タンパク質を用いて、ウイルス複製タンパク質の、ウイルスゲノム上の複製起点への結合を阻害することによりウイルスの増殖を防ぎ、ウイルスが侵入してきても感染しない植物の創出を試みた<sup>4)</sup>。この場合、植物として、実験室でよく用いられているシロイヌナズナを選び、DNA ウイルスとして、シロイヌナズナをはじめ様々な植物に強く感染し枯死させることが知られている beet severe curly



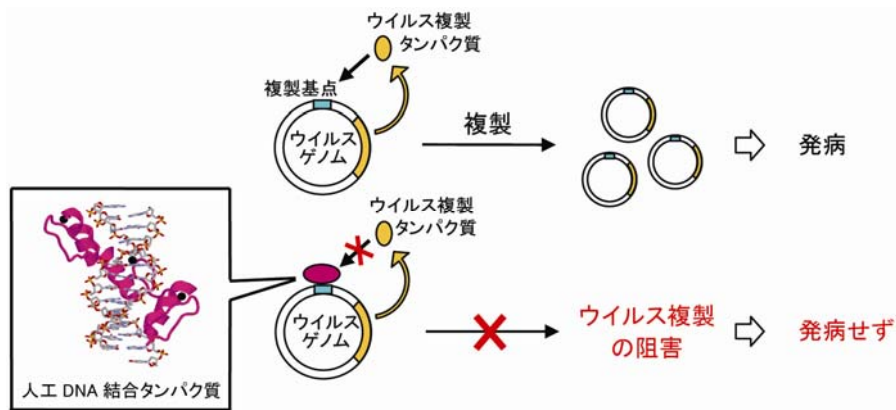


図1. 人工 DNA 結合タンパク質による DNA ウイルス複製の阻害

top virus (BSCTV) を用いた。この研究では、BSCTV のウイルス複製タンパク質よりも千倍以上強い DNA 結合能を有する人工 DNA 結合タンパク質を開発した。この人工 DNA 結合タンパク質は、ウイルス複製タンパク質の BSCTV 複製起点への結合をたった千分の1の量で効果的に阻害することを試験管内で確認した。次に、この人工 DNA 結合タンパク質遺伝子を、植物に侵入できる菌であるアグロバクテリアを用いてシロイヌナズナの生殖細胞に組み込み、最終的に人工 DNA 結合タンパク質を発現する組換え植物を作製した。この組換え植物および野生型植物に BSCTV を曝したところ、図2の植物2で示されているように、野生型のシロイヌナズナは感染し、報告どおり茎の成長が停止

し、最終的には枯死した。これに対し、人工 DNA 結合タンパク質遺伝子を発現するシロイヌナズナ (図2の植物3および植物4) では、感染させていない健康な野生型植物 (図2の植物1) と全く同じ外観で感染症状は見られなかった。さらに、これら組換え植物では、ウイルスは侵入しているにもかかわらず、ウイルス DNA は検出されなかった。このように、DNA ウイルスに対する免疫性を植物に付与することに初めて成功した。また、本手法が、世界的に重要な野菜であるトマトにおいても有効であることを確認している (現在、投稿準備中)。

## 5. おわりに

私の研究室では、現在このアプローチの有用性をさらに高めるため、1種類の人工 DNA 結合タンパク質でより多種多様なウイルスの感染を防ぐことを試みている。これらの研究により最終的に、たったひとつの人工 DNA 結合タンパク質を組み込むことにより、すべての農作物において、全種類の DNA ウイルスに対する耐性を付与することが可能になるかもしれない。これら新技術を基にした、「ウイルスに感染しない農作物」が世界中の農場で栽培され、健康に育ち、食糧問題の解決に少しでも貢献できる日を夢見ながら、学生達と日々研究に励んでいるところである。

## 参考文献

- 1) Sera, T. et al. (2002) *Biochemistry*, 41, 7074–7081.
- 2) Tachikawa, K. et al. (2004) *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 15225–15230.
- 3) Mori, T. et al. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 390, 694–697.
- 4) Sera, T. (2005) *J. Virol.*, 79, 2614–2619.



図2. 人工DNA結合タンパク質によるウイルス感染耐性。野生型植物に BSCTV を感染させると枯死した (植物2)。これに対し、人工DNA結合タンパク質を発現する植物は、BSCTV感染に対して完全な耐性を示した (植物3および4)。植物1は、ウイルスを感染させていない、健康な野生型の植物を示す。



## 編集後記

今回のニュースレターでは、慶應義塾大学の宮本憲二先生、岡山大学の世良貴史先生、海洋研究開発機構の布浦拓郎先生にそれぞれ研究紹介をお願いしました。宮本先生は天然には存在しない活性を示す有用酵素の設計に関する研究、世良先生は、ウィルスの複製開始を阻害する人工 DNA 結合タンパク質の設計・合成と植物個体への利用に関する研究、布浦先生には現段階では培養することができない微生物を対象としたメタゲノム研究についてご紹介頂きました。いずれも斬新なアプローチが取られたそれぞれの分野で先駆的な研究であります。

最後に今回のニュースレターが私の度重なる対応の遅さにより発刊が大きく遅れました。今回ご執筆頂きました先生方、部会員の皆様に深くお詫び申し上げます。

(担当：跡見晴幸)

NEWS LETTER Vol.15, No.1 2011年09月15日発行

事務局：〒101-8307 東京都千代田区神田駿河台1-5, 日本化学会バイオテクノロジー部会

Office of Secretary: The Chemical Society of Japan, 1-5, Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8307, Japan