

# 耐熱性 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼの開発

## プロジェクト責任者

伊藤 哲也 塩水港精糖株式会社 糖質研究所

## 著者

嶋根 康弘<sup>\*1</sup>、殿塚 隆史<sup>\*2</sup>、臼井 けい子<sup>\*1</sup>、伊藤 哲也<sup>\*3</sup>、岩沢 美佐子<sup>\*1</sup>、正木 久晴<sup>\*3</sup>、岸野 恵理子<sup>\*3</sup>、大田 ゆかり<sup>\*1</sup>、森 梢<sup>\*1</sup>、秦田 勇二<sup>\*1</sup>

\* 1 独立行政法人海洋研究開発機構

\* 2 国立大学法人東京農工大学 大学院農学研究院

\* 3 塩水港精糖株式会社 糖質研究所

利用施設：独立行政法人海洋研究開発機構 地球シミュレータ

利用期間：平成 24 年 4 月 1 日～平成 25 年 3 月 31 日

## アブストラクト

*Arthrobacter* sp. K-1 株由来の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼはラクトースとスクロースを原料として、整腸作用やミネラル吸収促進作用を有する機能性オリゴ糖ラクトスクロース（特定保健用食品）を合成する酵素であり、現在のところバッチ法による工業生産プロセスに利用されている。近年、二酸化炭素排出量抑制や廃棄物量の低減、エネルギー利用効率の向上等を背景として、製糖プロセスの効率化が求められており、耐熱性酵素を固定化したバイオリクターシステムによる連続反応への転換が望まれている。これまでの研究で、野生型酵素に 5 つのアミノ酸変異を導入した 24Y447P 変異体を取得して耐熱性の大幅な向上に成功している。これらに関しては昨年度の地球シミュレータ産業戦略利用プログラムにおいて、フラグメント分子軌道 (FMO) 法を用いたシミュレーションにより耐熱化機構の一部を明らかにした。今年度は 24Y447P をベースとして、計算科学的手法と分子進化的手法とを組み合わせて、更なる耐熱性の向上を目指した。

変異体 29-3 は分子内に 2 ヶ所のアミノ酸変異 K247D と D260P を持つ 24Y447P をベースとした二重アミノ酸置換体である。62℃における本酵素の寿命は 24Y447P の 1.5 倍に達している。分子動力学計算と FMO 計算を組み合わせた本酵素の動的構造解析では、C 末端側 524-577 番アミノ酸の領域が $\beta$ -FFase の耐熱性に関与する事が示唆された。組換え酵素を用いた実証試験では C 末端側の切除により実際に酵素が著しく熱に不安定になることが明らかになった。ランダム変異により高度に耐熱化された 24Y447P から、短期間の間に更に耐熱性を向上させる事が出来た事は、MD と FMO シミュレーションによる耐熱性酵素の設計が有力な手段になり得る事を示唆している。

キーワード：フラグメント分子軌道法、耐熱性酵素、耐熱化機構

## 1. 本プロジェクトの目的

近年、急速な高齢化社会への移行と健康への強い志向から健康の維持・増進、疾病の予防と回復などに関わる生体調節機能が食品に求められるようになってきている。糖質においても様々な生理機能を有することが解明され、なかでも難消化性のオリゴ糖はビフィズス菌選択的増殖因子の素材として消費者庁が許可する特定保健用食品などで利用されている。

現在、オリゴ糖の多くは微生物由来の酵素を用いて合成されており、整腸効果やミネラルの吸収促進効果を有するラクトスクロース（乳糖果糖オリゴ糖）も *Arthrobacter* sp. K-1<sup>1)</sup> が生産する  $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ ( $\beta$ -FFase, EC3.2.1.26)<sup>2)</sup> を作用させて製造している。ラクトスクロースをはじめとする有用なオリゴ糖を省エネルギーでかつ地球環境に優しい方法で工業生産させるためには、樹脂などの不溶性担体に酵素を固定化して連続反応させるバイオリクターシステムの構築が有効である。バイオリクターシステムでは反応中の微生物汚染や原料糖の析出を防止するために、50～65℃の高温域に温度を保つ必要があるが、既存の  $\beta$ -FFase は温度安定性が 45℃程度と低く、連続反応には適していなかった。

我々はこれまでの研究で、ランダム変異法を用いて *Arthrobacter* sp. K-1 株由来の  $\beta$ -FFase の温度安定性に寄与するアミノ酸を数残基特定し、さらに、該アミノ酸残基を所定のアミノ酸に置換することにより耐熱性を向上させた変異体酵素を取得している（発明の名称：新規な  $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ、その製造方法及びその利用、特開 2010-148419）。

本研究では分子シミュレーションを中心とした理論計算手法を用いて  $\beta$ -FFase の耐熱化の機構を解明し、より望ましい耐熱性酵素を理論設計するために、分子動力学法とフラグメント分子軌道 (FMO) 法<sup>3)</sup> とを組み合わせて耐熱性酵素の開発に取り組んだ。

## 2. 研究方法

本研究は、耐熱化酵素を理論計算によって設計し、実際に遺伝子組換えにより調製・機能解析して実証実験まで行う意欲的な取り組みである。実際には実証実験によるフィードバックが入るが本報では研究のパート毎に (1) 耐熱化に寄与するアミノ酸変異の予測、(2) 遺伝子組換え酵素の評価、(3) MD 計算、及び FMO 計算による耐熱化機構の詳細な解析、(4) オリゴ糖製造試験、として構成し明確化した。またシミュレーション以外に関する研究方法に関しては紙面の都合で詳細は割愛させて頂いた。

### 2.1. タンパク質座標データの作成

昨年度は野生型酵素の結晶構造 (Fig.1 左、解像度 1.97 Å、GLY39-PHE532)<sup>4)</sup> をテンプレートとして耐熱化変異体酵素をモデリングしていたが、今年度は野生型に T47S、S200T、F447P、F470Y、P500S の 5 変異を加えた耐熱化変異体 24Y447P の結晶構造 (Fig.1 右、解像度 2.27 Å、LEU40-GLY577) が新たに得られたため、これをテンプレートとして全ての構造をモデリングした。本構造

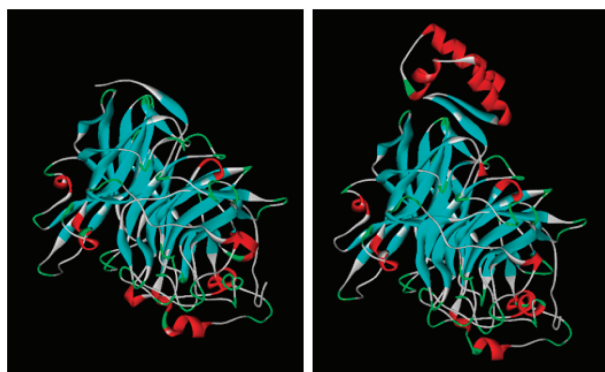


Fig.1.  $\beta$ -FFase の立体構造  
左：平成 23 年度の構造、右：今年度の構造

には、野生型の結晶構造に含まれていない C 末端の GLY533-GLY577 が含まれている。 $\beta$ -FFase の LYS524-GLY577 の領域は 2 本の  $\beta$  シートと、3 つの  $\alpha$  ヘリックスから成る小さなドメイン様の構造を形成しており、酵素の触媒ドメインとは無関係とも思えるこの領域がどのような役割を担っているのか興味深い。

水素原子を付加した  $\beta$ -FFase の構造を、Discovery Studio Ver. 2.5 (Accelrys K.K.) を用いて CHARM 力場中でエネルギー極小化して以後のシミュレーションに用いた。耐熱化変異体の構造は野生型をテンプレートとした点変異導入により構築し、CHARM 力場中で最適化した。エネルギー極小化方法は共役勾配法とし、RSM Gradient が  $0.001 \text{ kcal/mol} \times \text{\AA}$  以下になるまで行った。

## 2.2. 分子動力学計算

VMD Ver.1.9 (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>)<sup>5)</sup> を用いて、タンパク質の分子表面から 20 Å 以上の厚みになるように水分子をランダムに発生させて箱形の水和構造を構築した。カウンターイオンとして NaCl を 0.1M 加え、系の総電荷を 0 に調整した。計算規模は総粒子数約 10 万 3 千個である。得られた構造について、NVT アンサンブルの周期境界条件下で分子動力学計算を実施した。解析ソフトウェアには NAMD Ver.2.8<sup>6)</sup> を利用し、分子トポロジーとパラメータの定義には MacKerell が公開している生体高分子向けの CHARM パラメータを用いた (Mackerell Laboratory: [http://mackerell.umaryland.edu/MacKerell\\_Lab.html](http://mackerell.umaryland.edu/MacKerell_Lab.html))<sup>7)</sup>。初めに 150000 step のエネルギー極小化計算を行い次いで  $0.0005\text{K/step}$  で 280K まで昇温した後、20 ns の本計算を実施した。計算機には海洋研究開発機構が保有する JAMSTEC スーパーコンピュータシステム (分散メモリ型並列計算機 SGI ICE X) を利用した。

## 2.3. FMO 計算

本研究では、地球シミュレータ上で動作実績のある ABINIT-MP<sup>8)</sup> を利用した。ベクトルプロセッサ用にチューニングされたバイナリは昨年同様 NEC ソフトウェア株式会社から提供して頂いた。ABINIT-MP の自動フラグメンテーション機能を利用して入力構造を 1 アミノ酸毎にフラグメント分割し、基底関数 6-31G による FMO-MP2<sup>9)</sup> 計算を行った。代表的な実行情報を Table 1 に示す。

Table 1  $\beta$ -FFase の解析に関する実行情報

アミノ酸数	フラグメント数	原子数	電子数	基底関数の数
538	537	8107	31462	45500
ノード数	メモリサイズ	ベクトル化率	並列化率	計算時間
8 (64 CPUs)	14.5 GB	97.6%	99.9%	8340 s

### 3. 結果

#### 3.1. 変異体の構築

昨年度の解析結果や類似酵素のアミノ酸配列等を元に、耐熱化への寄与が予測される21ヶ所のアミノ酸を選択し、古典力場における自由エネルギー計算、分子動力学計算およびエネルギー極小構造のFMO計算を組み合わせて、シミュレーションによる酵素の安定性の予測と遺伝子組換え酵素の性質解析を繰り返し実施した。1次スクリーニングでは24Y447Pに対して1アミノ酸の変異を導入し、K180PとD260P置換体

で有望な結果が得られた。次いで、両変異体をベースに2次スクリーニングとして更に変異を設計して29-3 (D260P, K247D)を得た。24Y447Pと29-3の耐熱性をFig.2に示す。本酵素は熱により10-20%程度のアクティベーションを受けるほか、62°Cにおける29-3の半減期は約1.5倍に達していた。

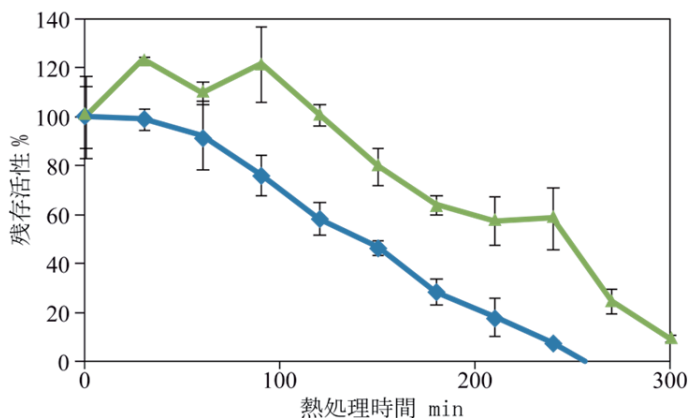


Fig.2. 変異体酵素の耐熱性  
▲29-3、◆24Y447P

#### 3.2. 分子動力学計算

野生型、24Y447P、29-3の各構造について20 nsの分子動力学計算を実施し、後半の10 nsについて、1000 fs毎に合計10,000フレームの動的構造をサンプリングした。VMDを用いて、各データセットからタンパク質の構造形成に関わる分子内水素結合数、アミノ酸毎の根平均二乗揺らぎ(RMSF: Root mean square fluctuation)、表面積(溶媒露出面積)、水素結合形成に関わるアミノ酸間に働く分子間相互作用(IFIE: Inter fragment interaction energy)をそれぞれ求めた(Fig.3)。

**水素結合:** 各フレームに含まれる水素結合を集計して1 ns毎に平均値を求めた。構造全体では29-3で比較的多く、24Y447Pと野生型では明確な差は無かった(Fig.3 a-1)。LYS524-GLY577の領域では、29-3、24Y447P、野生型の順で水素結合の形成頻度に差が見られ、各分子の耐熱性と一致した(Fig.3 a-2)。そこで以後の解析ではLYS524-GLY577に相当するサブユニット様構造に着目して、触媒ドメイン(LEU40-ASN523)と比較した。

**RMSF:** 24Y447Pと29-3について、野生型との差分を求めてそれぞれプロットした(Fig.3 b-1, b-2)。全体のトレンドは良く似ているが、両構造に共通して160番アミノ酸周辺のループ構造の振動が大きくなっていった。一方で、配列的に前後に位置する2枚のβシートは安定化していた。これらはLYS524-GLY577領域の近傍に位置している。また、24Y447Pの安定化に最も寄与する447番アミノ酸周辺(LEU438-ASN448)の揺らぎは抑制されており、昨年度予測した構造の剛直化による耐熱化機構を支持する結果が得られた。LYS524-GLY577領域では水素結合の増加分により29-3の揺らぎが減少すると予測していたが、むしろ24Y447Pや野生型よりも大きく振動している事が示唆された。

**表面積:** タンパク質分子は理想的には体積が極小となる球状構造で最も安定になるとされている。そこで次に分子の表面積から構造のcompactnessを推定した。LEU40-ASN523領

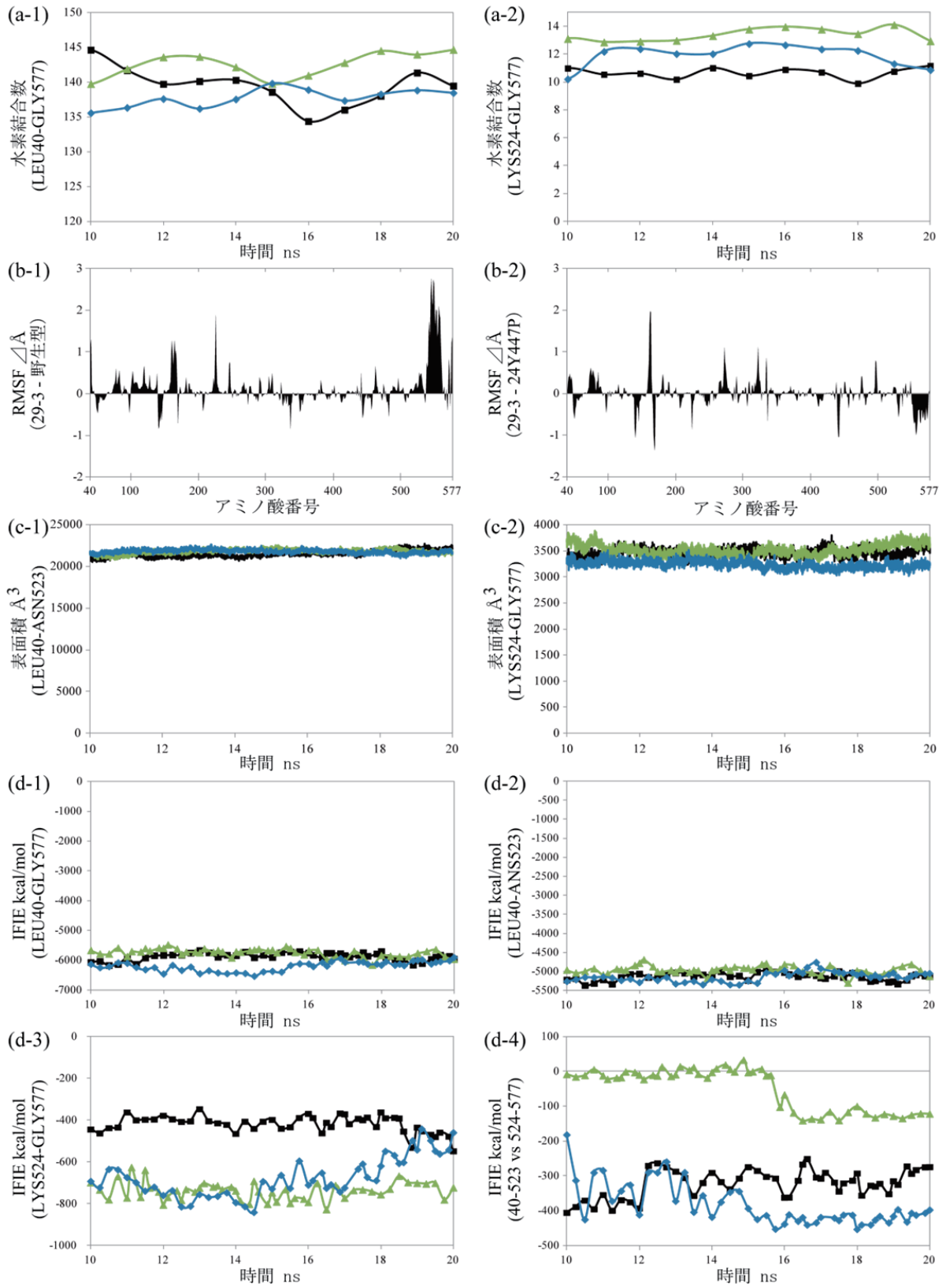


Fig.3. MD 及び FMO 計算結果

■ 野生型、▲ 29-3、◆ 24Y447P



域では3構造間に大きな差は見られなかった (Fig.3 c-1)。一方、LYS524-GLY577 領域では24Y447P が最もコンパクトに折りたたまれていた (Fig.3 c-2)。29-3 は野生型とほぼ同じ値を示しており、LYS524-GLY577 領域で RMSF 値が 2 Å 以上増加した結果を踏まえ、LYS524-GLY577 のサブユニットと触媒ドメイン間の密着性が落ちてサブユニットの自由度が高まっているながらも、サブユニットは強く折りたたまれている事が予想された。

**IFIE :** 以上の結果を踏まえ、MD でサンプリングした構造の一部について FMO 計算を実施した。水素結合形成に関わるアミノ酸間に働く力を網羅的に計算し、(1) 全体 (Fig.3 d-1)、(2) LEU40-ASN523 (d-2)、(3) LYS524-GLY577 (d-3)、(4) LEU40-ASN523 と LYS524-GLY577 間 (d-4) のそれぞれに働くエネルギーを比較した。まず、(1) と (2) では24Y447P でより低いエネルギーを持つ構造もあったが、エネルギーの揺らぎを考慮すると3構造間に明確な差は無いと判断した。(3) はサブユニット構造の折りたたみを強化するエネルギーの一部である。野生型構造では -350 ~ -500kcal/mol の安定化エネルギーしか持たないのに対して29-3 では1.5-2 倍もの値を示し、サブユニット構造の折りたたみが極めて安定化されている事が示唆された。24Y447P も10-15 ns のレンジで同様の傾向を示したが、15-20 ns では不安定化し野生型に近い値まで上昇した。(4) は29-3 の触媒ドメインとサブユニット間の結びつきが他に比べて著しく弱い事を示している。他の2構造がサブユニットの折りたたみと、触媒ドメイン-サブユニット間の安定化にバランスよくエネルギーを使っているのとは対照的に、29-3 は LYS524-GLY577 領域のフォールディングによって得られる安定化エネルギーのほとんどをサブユニット構造の強化に費やしている。(3) で各分子が示した安定化エネルギーの順序は、分子の耐熱性と一致していた。ではこのサブユニット構造を強固にする事は酵素の安定性にとって恩恵となるのだろうか？

### 3.3. C 末端領域が $\beta$ -FFase の耐熱性に与える影響

MD、FMO シミュレーションによって、LYS524-GLY577 領域の安定性が  $\beta$ -FFase の耐熱性と密接にかかわる事が示唆された。そこで、シミュレーション結果の妥当性を検証するために、この部分を切り離れたアミノ酸変異体を構築し、熱安定性を再評価することにした。切断による影響を低減するために、酵素の触媒ドメイン側に少しマージンを持たせて24Y447P の GLY533-GLY577 を切除したタンパク質を大腸菌により生産させた。60°C で30 分間加熱処理した後の残存活性は、未切断の場合でほぼ100% であるのに対し、C 末端側を切断した場合には40% 以下と耐熱性が著しく低下していた (Fig.4)。今後の分子設計の方針として、LYS524-GLY577 領域を安定化させる戦略は有効である。

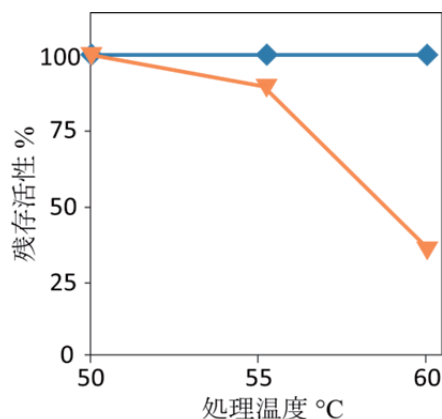


Fig.4. C 末端領域の影響  
◆ 24Y447P (LEU40-GLY577)  
▼ C末欠失体 (LEU40-PHE532)

### 3.4. 耐熱性とオリゴ糖生成試験

最後に 29-3 のオリゴ糖生成能を確認した。酵素にアミノ酸変異を加えると、反応性の変化により生産物の組成が変わってしまう事がある。そこで 50～75℃の範囲で酵素反応した後、ラクトスクロース (LS)、1-ケストース、フラクトシルラクトスクロース (LSF) の生成率を調べた (Fig.5)。比較対象には野生型酵素を用いた。

野生型における LS 生成率は 60℃において最大値 26.5% を示し、それ以上の温度では酵素の熱変性により生成

率が低下した。1-ケストース、LSF の生成率はそれぞれ 0.8%、0% だった。29-3 では LS 生成率が 28.8% に向上し、熱変性が始まる温度も 65℃に向上した。一方、1-ケストース、LSF 生成率はそれぞれ 1.8%、0.4% であり、副産物の生成率は野生型と同程度であった。

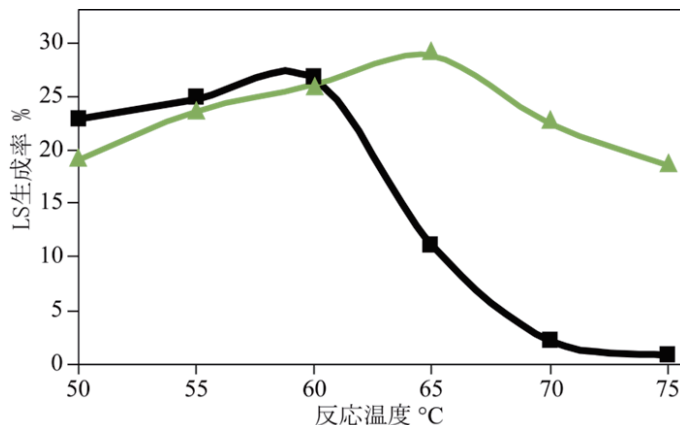


Fig.5. 酵素反応産物中の LS 含量  
■野生型、▲29-3

## 4. まとめ

本研究では、オリゴ糖製造に使用する  $\beta$ -FFase のシミュレーション設計に取り組み、耐熱化変異体 29-3 の開発に成功した。ランダム変異により野生型から高度に耐熱化された 24Y447P では改良の余地が少ないと予想していたが、僅かな期間で更に耐熱性を向上させる事に成功したことは、シミュレーションによる耐熱性酵素の設計が有力な手段になり得ることを示している。また、これまで殆ど考慮されてこなかった C 末端領域の重要性が明らかにできたことは、今後の改良戦略を決定する上で重要な情報となろう。今後も本プロジェクト中に設計した他の変異体酵素の性質解析を進め、環境負荷の少ない製糖プロセスの実現に向けて開発を進めていく。

## 謝辞

ABINIT-MP は文部科学省次世代 IT 基盤構築のための研究開発事業「イノベーション基盤シミュレーションソフトウェアの開発」の一環として東京大学生産技術研究所で開発されたものを使用させていただきました (RISS : <http://www.ciiss.iis.u-tokyo.ac.jp/riss/>)。プロジェクト代表者の加藤千幸博士 (東京大学生産技術研究所) を始めとした関係者の方々に感謝致します。

地球シミュレータでの実行にあたっては、NEC ソフト株式会社からベクトルプロセッサ用にチューニングされたバイナリを提供して頂きました。厚く御礼申し上げます。

NAMD を JAMSTEC スーパーコンピュータシステムに移植するにあたっては、甲斐恭様 (海洋研究開発機構) にご協力を頂きましたことを感謝いたします。また末筆ながら、地球シミュレータ、及び JAMSTEC スーパーコンピュータシステムの運用ならびにサポートを担当されている独立行政法人海洋研究開発機構地球シミュレータセンターの関係者各位に感謝いたします。

## 参考文献

- 1) Yukari Ohta, Tetsuya Ito, Kozue Mori, Shinro Nishi, Yasuhiro Shimane, Katsuhiko Mikuni, Yuji Hatada, “Microbacterium saccharophilum sp. nov., a novel species isolated from a sucrose refining factory in Japan” , *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, doi:10.1099/ijs.0.047258-0, January 2013 (in press).
- 2) Tetsuya Ito, Koki Fujita, Kozo Hara, Takashi Tonozuka, Yoshiyuki Sakano, “Cloning and Expression of  $\beta$ -Fructofuranosidase Gene from *Arthrobacter* sp. K-1” , *J. Appl. Glycosci.*, vol.49, no.3, pp.291-296, 2002.
- 3) Kazuo Kitaura, Eiji Ikeo, Toshio Asada, Tatsuya Nakano, Masami Uebayasi, “Fragment molecular orbital method: an approximate computational method for large molecules” , *Chem. Phys. Lett.*, vol.313, pp.701-706, 1999.
- 4) Takashi Tonozuka, Akiko Tamaki, Gaku Yokoi, Takatsugu Miyazaki, Megumi Ichikawa, Atsushi Nishikawa, Yukari Ohta, Yuko Hidaka, Kinya Katayama, Yuji Hatada, Tetsuya Ito, Koki Fujita, “Crystal structure of a lactosucrose-producing enzyme, *Arthrobacter* sp. K-1  $\beta$ -fructofuranosidase” , *Enzyme Microb. Technol.*, vol.51, no.6, pp.359-365, 2012.
- 5) William Humphrey, Andrew Dalke, Klaus Schulten, “VMD: Visual Molecular Dynamics” , *J. Molec. Graphics*, vol.14, pp.33-38, 1996.
- 6) James C. Phillips, Rosemary Braun, Wei Wang, James Gumbart, Emad Tajkhorshid, Elizabeth Villa, Christophe Chipot, Robert D. Skeel, Laxmikant Kalé, Klaus Schulten, “Scalable molecular dynamics with NAMD” , *J. Comput. Chem.*, vol.26, pp.1781-1802, 2005.
- 7) Alexander D. MacKerell Jr., “Atomistic Models and Force Fields” , in *Computational Biochemistry and Biophysics*, O.M. Becker, A.D. MacKerell, Jr., B. Roux and M.Watanabe, Eds., Marcel Dekker, Inc. New York, pp.7-38, 2001.
- 8) Tatsuya Nakano, Tsuguchika Kaminuma, Toshiyuki Sato, Kaori Fukuzawa, Yutaka Akiyama, Masami Uebayasi, Kazuo Kitaura, “Fragment molecular orbital method: use of approximate electrostatic potential” , *Chem. Phys. Lett.*, vol.351, pp.475-480, 2002.
- 9) Yuji Mochizuki, Katsumi Yamashita, Tadashi Murase, Tatsuya Nakano, Kaori Fukuzawa, Kazutomo Takematsu, Hirofumi Watanabe, Shigenori Tanaka, “Large scale FMO-MP2 calculations on a massively parallel-vector computer” , *Chem. Phys. Lett.*, vol.457, pp.396-403, 2008.