

耐熱性 β -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^{*1}、伊藤 哲也^{*2}、岩沢 美佐子^{*1}、西 真郎^{*1}、大田 ゆかり^{*1}、
田所 宏基^{*2}、岸野 恵理子^{*2}、殿塚 隆史^{*3}、秦田 勇二^{*1}

* 1 独立行政法人海洋研究開発機構

* 2 塩水港精糖株式会社 糖質研究所

* 3 国立大学法人東京農工大学 大学院農学研究院

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 23 年 4 月 1 日～平成 24 年 3 月 31 日

アブストラクト

Arthrobacter sp. K-1 株由来の β -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移行が望まれている。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が、オリゴ糖を効率的に生産するためには更なる耐熱化が不可欠であり、地球シミュレータを用いた大規模シミュレーションによってこれまでに取得した耐熱化変異体の機構解析や耐熱化に有効なアミノ酸変異を予測する事を目的としている。本研究では、フラグメント分子軌道法を用いて野生型 β -フルクトフラノシダーゼとその耐熱化変異体 24Y447P とを解析して分子内相互作用を比較し、安定化機構の解析を行った。

フラグメント分子軌道法は北浦らによって考案された非経験的分子軌道法であり、従来法では莫大な計算が必要とされるため不可能とされてきた生体高分子の分子軌道計算を、分子をフラグメント分割することで高速に見積もる事を可能にしたもので、中野らによって解析ソフトウェア ABINIT-MP として実装された。我々は 1 アミノ酸を 1 フラグメントとして分割して解析を実施し、 β -フルクトフラノシダーゼの耐熱化に最も寄与する 447 番アミノ酸の変異によって、24Y447P の構造が水素結合 2 本分に相当する約 -7.4 kcal/mol 安定化されている事を明らかにした。

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. 背景

1.1 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 株の生産する β -フルクトフラノシダーゼ（ β -FFase、EC3.2.1.26）¹⁾ 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 β -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 β -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 β -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 β -FFase の耐熱化機構を解明し、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法とを組み合わせて酵素の安定性の評価を試みた。

1.2 *Arthrobacter* sp. K-1 株が生産する β -FFase の性質

β -FFase は別名インベルターゼとも呼ばれ、スクロースを加水分解してグルコースとフルクトースを生成する酵素であるが、中には糖転移反応によるオリゴ糖生成能を有している酵素がある。特に *Arthrobacter* sp. K-1 株が生産する β -FFase は、スクロースとラクトースの混合物を作用させるとラクトースの還元末端側にフルクトースを結合した 3 糖を生成させる糖転移反応を触媒する（図 1）。ラクトスクロースはスクロースとラクトースの構造を併せ持ち、難消化性で高いビフィズス菌増殖能を有する機能性オリゴ糖である。

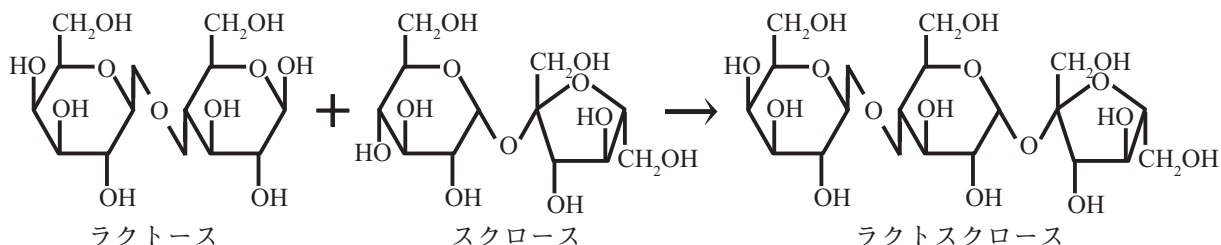


図 1 *Arthrobacter* sp. K-1 株由来 β -FFase が触媒する糖転移反応

野生型の β -FFaseは60℃で約0.8日の半減期を持つのに対し、我々が開発した耐熱化変異体24Y447Pは約15.9日、また53℃では約116.5日と熱安定性が大幅に向上している(図2、表1)。

24Y447Pのアミノ酸配列には、5つのアミノ酸変異が導入されており、このうち耐熱化に最も寄与するのは447番のアミノ酸置換PHE447PROである。

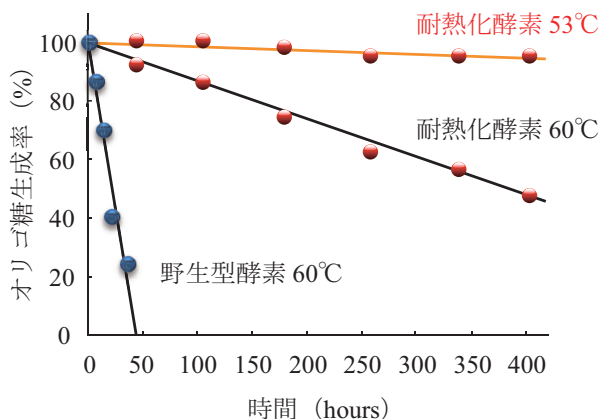


表1 固定化 β -FFaseの各温度に対する半減期

	野生型酵素	耐熱化酵素
60℃	0.8日	15.9日
53℃	-	116.5日

図2 野生型と耐熱化変異体の耐熱性比較

1.3 フラグメント分子軌道法の概要

フラグメント分子軌道法(FMO法)は1999年に北浦ら²⁾によって提案された分子軌道の計算方式で、巨大な分子を小さなフラグメントに分割し、フラグメントモノマーとフラグメントダイマー(フラグメントペア)の計算のみから分子軌道を求める計算手法である。モノマーおよびダイマーの各計算が完全に独立しており、PCクラスターを利用した大規模計算においても高い並列化効率が期待できる。

FMO法では各フラグメント間に働くエネルギーをフラグメント間相互作用(Inter-Fragment Interaction Energy: IFIE)として求めることができる。例えばタンパク質分子をアミノ酸単位でフラグメンテーションすれば、薬剤とその標的タンパク質間の結合に関与するアミノ酸残基の特定や結合エネルギーの正確な評価が可能である^{3) 4)}。

我々はFMO法を用いて、 β -FFaseの耐熱化に重要な447番アミノ酸のプロリン残基が野生型のフェニルアラニン残基と比べて分子内相互作用にどのような影響を及ぼしているのか見積もり、FMO法による酵素の耐熱性評価の可能性を模索した。

2. 計算方法

2.1 タンパク質座標データの作成

X線結晶構造解析により野生型 β -FFase(GenBank ID: BAB72022)のGLY39-PHE532に相当する領域の立体構造を解像度2.0Åで決定した。Discovery Studio Ver. 2.5(Accelrys K.K.)を用いて水等の不要な分子を削除して水素原子を付加した β -FFaseの構造を、CHARM力場中でエネルギー極小化して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力場中で最適化を行った。両構造の座標データはPDB形式で出力した。

2.2 水和構造の構築

VMD Ver. 1.9 (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>)⁵⁾ を用いて、 β -FFase の分子表面から最低 10 Å の厚みになるように箱形に水分子を発生させてタンパク質を水和し、NAMD Ver. 2.8 (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>)⁶⁾ を用いて周期境界条件下で 1 ns の構造最適化計算を実施した。分子トポロジーとパラメータの定義には MacKerell らが公開している生体高分子向けの CHARM 力場を用いた (Mackerell Laboratory: http://mackerell.umaryland.edu/MacKerell_Lab.html)⁷⁾。得られた最安定構造から水分子を除去して FMO 計算に用いた。

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-MP⁸⁾ 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 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 を用いた FMO-MP2⁹⁾ 計算を行った。代表的な実行情報を表 2 に示す。

表 2 野生型 β -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
493	493	7424	28910	41782

ノード数	メモリサイズ	ベクトル化率	並列化率	計算時間
16 (128 CPUs)	10698 GB	97.9%	99.9%	2240 s

3. FMO 計算の結果

水和極小エネルギー構造の FMO 計算から求めた 447 番アミノ酸と近隣アミノ酸間のフラグメント間相互作用解析では、1 kcal/mol 以上のエネルギーを持つ相互作用の総和が野生型で -16.22 kcal/mol だったのに対し、耐熱化変異体では -23.58 kcal/mol に改善していた。相互作用の変化には 2 つの特徴が見られた (図 3)。

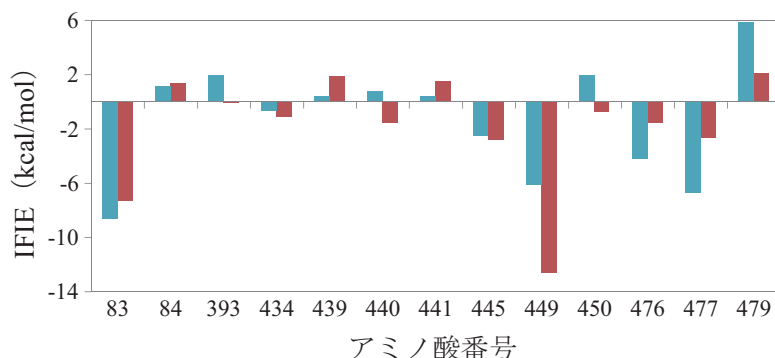


図 3 447 番アミノ酸と周辺アミノ酸間に働くフラグメント間相互作用エネルギー (IFIE) カットオフ値を 1 kcal/mol として抽出した。■野生型、■24Y447P。

(1) 476-479 番のループ構造との相互作用が減少

447 番アミノ酸は分子表面に露出した 438-449 番アミノ酸で形成されるループ構造の付け根に位置している (図 4)。野生型の PHE は耐熱化変異体の PRO に比べて体積が 1.8 倍と嵩高く、疎水性指数が 2.8 (PRO: -1.6) の疎水的なアミノ酸であり、水層に突きだした PHE の六員環構造は不安定なため、近接する 476-479 番のループ構造と疎水性的な相互作用が起こると考えられる。一方、PRO 置換体では、側鎖が小さく、また親水性であるため相互作用が減少したと考えられる。

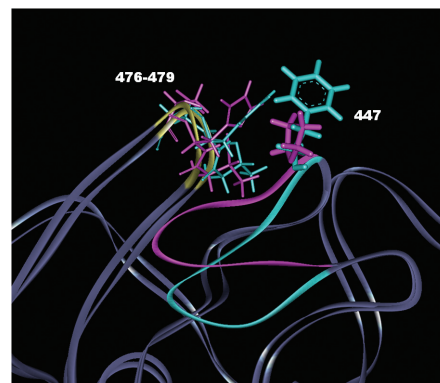


図 4 447 番アミノ酸の周辺構造

■野生型、■24Y447P。

(2) 449 番アミノ酸との安定性が 6.5 kcal/mol 向上

ループ構造中には元々 2 つのプロリン残基 (PRO442、PRO445) が存在しており、耐熱化変異体では 447 番が PHE から PRO に変異したことで、僅か 12 残基の範囲に 3 つの PRO が含まれている。PRO は C_{α} から出た側鎖が、主鎖の窒素に結合して環状構造を形成する特殊なアミノ酸であり、立体構造の自由度を規定する ψ - ϕ 角を著しく制限して主鎖に剛性を与える。このようなアミノ酸変異は周辺構造に歪みを生じさせるが、本酵素では対向鎖にある GLY439-GLY440 の柔軟なモチーフが吸収したと考えられる (図 5. a-b)。ラマチャンドラランプロットを比較すると 2 つの GLY 残基の ψ - ϕ 角は野生型と耐熱化変異体で大きく異なっていたが、いずれも許容範囲に収まっていた。またループのトポロジーが大きく変化したことで、GLY439 と ASP446 間に新たな水素結合が形成されたほか、野生型の LEU438 に生じていた歪みが解消していた (図 5. c-d)。447 番と 449 番アミノ酸間には水素結合等の直接的な相互作用が見られないことから、これら複合的な作用が安定性向上に寄与していると考えられる。

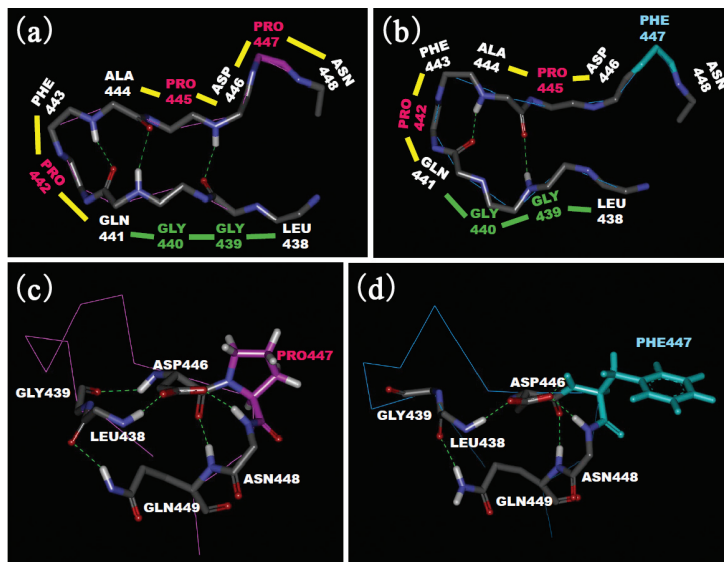


図 5 447 番アミノ酸が属するループ構造

(a)野生型 - 上面図、(b)耐熱化変異体 - 上面図、(c)野生型 - 側面図、(d)耐熱化変異体 - 側面図。上面図は主鎖と水素結合に関与する原子を示した。側面図は主鎖のワイヤモデルと 447 番アミノ酸近傍の水素結合に関与するアミノ酸の一部を示した。—プロリン残基により ψ - ϕ 角の自由度が制限される領域、—グリシン残基により柔軟性が高い領域、--- 水素結合。

4. まとめ

本研究では、野生型 β -FFase と耐熱化変異体酵素とを FMO 法によって解析し、IFIE エネルギーとして見積もられる分子内相互作用エネルギーを比較して、FMO 法による酵素の耐熱化機構解析を試

みた。その結果、耐熱化変異体 24Y447P に導入された 447 番アミノ酸の変異 PHE447PRO によって、周辺構造に水素結合 2 本分に相当する約 -7.4 kcal/mol のエネルギー安定化が確認できた。

今後の課題としては、(1) 溶媒やイオンを導入したより現実に近い条件での検討、(2) 分極関数を加えたより正確なエネルギーの見積もり、(3) 分子動力学計算を組合わせた動的構造解析による立体構造上の弱点の発見と、アミノ酸置換による耐熱化効果の推定、(5) 変異体酵素の作成と性質解析等を行い、より一層耐熱性を強化した β -FFase の開発を目指す。

5. ES 利用の有意性

タンパク質の耐熱化の分子機構としては、水素結合 (0.48-4.8 kcal/mol) や塩橋 (2.9-4.1 kcal/mol)、ファンデルワールス力 (0.1-1 kcal/mol) 等の静電的相互作用の形成、疎水性相互作用 (0.7-2.4 kcal/mol)、S-S 結合 (40 kcal/mol) などがある。タンパク質の立体構造は、これら複雑多岐にわたる作用が相互に影響し合って成立しているが、酵素の機能型と変性型の自由エネルギー変化 ΔG は水素結合数本分に相当する 4.8-14.3 kcal/mol に過ぎない。従って、タンパク質を理論設計するためには、古典力場を用いた方法では精度的に不十分であり、分子軌道法によってより正確なエネルギーを見積もる必要がある。

アミノ酸置換の影響を網羅的に調べるためには、変異場所やアミノ酸の種類を様々組合せて膨大な計算を行うことになり、高速で多量の演算処理を行える大規模計算機が不可欠である。本研究で行った性能評価では、CPU 数が同規模の Linux クラスタと比較しても、地球シミュレータを利用することで演算効率、演算速度ともに 20 倍に加速できる事がわかっている (16 ノード、128CPU 使用時)。今後も我が国の産業技術を支える先端計算機として、地球シミュレータのような大規模計算環境が維持されていく事が望まれる。

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「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」プロジェクト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.ciss.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)、開発者の中野達也博士 (国立医薬品食品衛生研究所) 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 (SGI Altix 4700、海洋研究開発機構) 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) Ito, T., Fujita, K., Hara, K., Tonozuka, T. and Sakano, Y., "Cloning and Expression of β -Fructofuranosidase Gene from *Arthrobacter* sp. K-1", J. Appl. Glycosci., 2002, vol. 49:3, pp. 291-296.
- 2) Kitaura, K., Ikeo, E., Asada, T., Nakano, T., and Uebayasi, M., "Fragment molecular orbital method: an approximate computational method for large molecules", Chem. Phys. Lett., 313, 1999, pp. 701-706.
- 3) 小沢 知永, 小澤 基裕, 半田 千影, 神原 実季恵, 辻 英一, 岡崎 浩輔, 新宮 哲, 数納 広哉, 上原 均, "フラグメント分子軌道 (FMO) 法の創薬における分子シミュレーションへの応用", 平成 21 年度先端研究施設共用促進事業「地球シミュレータ産業戦略利用プログラム」利用成果報告書, キッセイ薬品工業株式会社, pp. 77-86.
- 4) 小沢 知永, 小澤 基裕, 半田 千影, 神原 実季恵, 辻 英一, 岡崎 浩輔, 上原 均, 新宮 哲, 数納 広哉, "フラグメント分子軌道 (FMO) 法の創薬における分子シミュレーションへの応用", 平成 20 年度先端研究施設共用イノベーション創出事業「地球シミュレータ産業戦略利用プログラム」利用成果報告書, キッセイ薬品工業株式会社, pp. 103-111.
- 5) Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics", J. Molec. Graphics, 1996, vol. 14, pp. 33-38.
- 6) Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R.D., Kale, L., and Schulten, K., "Scalable molecular dynamics with NAMD", J. Comput. Chem., 2005, vol. 26, pp. 1781-1802.
- 7) MacKerell, A.D., 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, 2001, pp. 7-38.
- 8) Nakano, T., Kaminuma, T., Sato, T., Fukuzawa, K., Akiyama, Y., Uebayasi, M., Kitaura, K., "Fragment molecular orbital method: use of approximate electrostatic potential", Chem. Phys. Lett. 351, 2002, pp. 475-480.
- 9) Mochizuki, Y., Yamashita, K., Murase, T., Nakano, T., Fukuzawa, K., Takematsu, K., Watanabe, H., Tanaka, S. "Large scale FMO-MP2 calculations on a massively parallel-vector computer" Chem. Phys. Lett., 457, 2008, pp. 396-403.