

## 論文審査報告書

氏名	ニューイラート エム (Nuylert Aem)
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	博生第25号
学位授与日	令和2年9月29日
論文題目	Occurrence and enzymology of hydroxynitrile lyases of cyanogenic plants and millipedes (シアン生成能を有する植物およびヤスデにおけるヒドロキシニトリルリアーゼの産生並びにそれらの酵素化学)
論文審査委員	(主査) 富山県立大学 教授 浅野 泰久 教授 五十嵐 康弘 教授 米田 英伸 福井県立大学 教授 日弃 隆雄 富山県立大学 准教授 日比 慎

### 内容の要旨

ヒドロキシニトリルリアーゼ (HNL、EC 4.1.2.10、4.1.2.11、4.1.2.46、および4.1.2.47) は、疎水性アミノ酸からシアノヒドリンを経て、アルデヒドとシアン化水素を生合成する経路の最終段階において機能する酵素である。シアンを生成する植物では、グリコシル化されたシアノヒドリンが貯蔵されており、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの作用により遊離するシアノヒドリンに、HNL が作用してアルデヒドとシアン化水素が生成することにより、微生物や動物からの攻撃からの防御の役割を果たすと考えられている。富山県立大学酵素化学工学研究室では、節足動物(ヤスデ)が、防御用の化学物質 (*R*-マンデロニトリル (*R*-MAN) を生合成し、直ちに HNL の触媒作用によりベンズアルデヒドおよびシアン化水素を生合成することを発見した。これらの HNL は MAN に対して可逆的に作用するので、それらの逆反応を利用して、医薬品合成中間体などとして重要な光学活性シアノヒドリンの合成に利用することができる。

本論文は、動植物由来の HNL を発見し、それらの酵素化学的研究を行い、異種宿主による遺伝子発現、動植物特有の酵素のグリコシル化や X-線結晶構造の解析、タンパク質工学による合理的な酵素改変、並びに医薬品中間体の合成への利用について記述したものである。さらに、研究途上タイ王国産のヤスデに新奇なエーテル化合物を発見した結果についても記述している。

以下に本論文の構成を示す。

第一章では、黄色パッションフルーツ *Passiflora edulis* forma *flavicarpa* の HNL (*PeHNL-Ny*) の HNL に対するグリコシル化の影響を、天然型酵素と組換え酵素の酵素化学的諸性質を比較することによって考察している。まず、完全長の *PeHNL* cDNA をクローニングし、その配列が、26 アミノ酸シグナルペプチドを含む 147 アミノ酸をコードする 444 塩基対の遺伝子から構成されることを明らかにし、一次構造上の特徴から、105 番目のアスパラギン残基に *N*-グリコシル化部位を有することを推定している。*Escherichia coli* BL21 (DE3) および酵母 *Pichia pastoris* GS115 細胞に *PeHNL* 遺伝子を発現させ、これらの微生物宿主における *PeHNL* の生産性の向上、酵素の安定性と触媒特性に対する *N*-グリコシル化の影響などを検討した。天然の *PeHNL* (*PeHNL-Ny*) および酵母 *P. pastoris* で遺伝子発現させた HNL (*PeHNL-P*) はグリコシル化されているが、大腸菌で発現した酵素 (*PeHNL-E*) はグリコシル化されていない。*PeHNL-Ny* および *PeHNL-P* は、*PeHNL-E* および *P. pastoris* の脱グリコシル化変異体 N105Q (*PeHNL-P-N105Q*) よりもはるかに優れた熱安定性、pH 安定性、および有機溶媒耐性を示した。グリコシル化された *PeHNL-P* は、2-イソプロピルエーテルを含む 2 相系で (*R*) -マンデロニトリル (98% *e. e.*) を効率的に合成できることを示した。これらの結果から、HNL の安定性が *N*-グリコシル化に起因することを論じている。

第二章では、2 種類のパッションフルーツ、*P. edulis* Sims (紫色パッションフルーツ) および *P. edulis* forma *flavicarpa* (黄色パッションフルーツ) 由来の HNL (それぞれ *PeHNL-Np* および *PeHNL-Ny*) の構造、並びに *in vitro* でシアノヒドリンの合成における安定化について考察している。まず、両酵素をパッションフルーツの葉から精製し、酵素化学的諸性質を明らかにした。次に紫色パッションフルーツ由来の *PeHNL-Np* 遺伝子をクローニングし、酵母および大腸菌で発現させた。遺伝子情報から、*PeHNL-Np* および *PeHNL-Ny* が世界で最小の HNL (121 個のアミノ酸を含む) であることを見出した。また、得られた酵素の酵素化学的諸性質を天然型と比較し、*PeHNL* のシアノヒドリン合成条件における酵素の安定化機構を酵素の構造を踏まえて議論している。両方の酵素のアミノ酸配列には 1 つのアミノ酸の違いがあった。*PeHNL-Np* は 107 番目の位置に Ala 残基があり、Asn105 においてグリコシル化されない。黄色パッションフルーツ由来の天然型 *PeHNL-Ny* および酵母でグリコシル化された *PeHNL-P* の両方が、紫色パッションフルーツ由来のグリコシル化されていない *PeHNL-Np* より優れた熱安定性、pH 安定性、および有機耐性を示すことを確認した。一方、*PeHNL-E* の X-線結晶構造解析の結果から C 末端領域の温度因子が高いことが不安定化の要因であると予測し、C 末端から 15 アミノ酸を切断した *PeHNL*  $\Delta_{107}$  の安定性を検討した。その結果、*PeHNL*  $\Delta_{107}$  は、大腸菌で合成した全長を有する非グリコシル化酵素 *PeHNL-E* に比べて、熱安定性や溶媒耐性において著しく優れていた。大腸菌で本酵素を生産する際には、グリコシル化部位を切断した *PeHNL*  $\Delta_{107}$  の方が実用性に優れている例を示し、酵素機能とグリコシル化との関係について論じている。

第三章、第 1 節では、ヤンバルトサカヤスデ、*Chamberlinius hualienensis* (ChuaHNL) 由来 HNL を酵母において高収量で生産した結果について論じている。また、第 2 節では、トヤマキシヤスデ *Parafontaria laminata* に HNL (*PlamHNL*) を発見し、X-線結晶構造解析を行い、タンパク質工学の手法を用いて立体選択性の向上を行い、さらに医薬品中間体合成に適用した結果について論じている。

ChuaHNL は、HNL として極めて高い比活性 (7, 420 U / mg) と高いエナンチオ選択性を示すため、(R)-MAN など様々なシアノヒドリンの合成に利用できることが示されてきた。しかし、ChuaHNL を容易に調製し、基礎および応用研究に用いるには、遺伝子組換え技術を用いて高収率で酵素生産が可能なシステムを構築することが必要である。そこで、酵母 *P. pastoris* を宿主として使用し、本酵素の生産に必要な条件を精査している。まず、His-ChuaHNL 生産に対する ChuaHNL のコドン最適化、並びにタンパク質のジスルフィド結合の酸化還元を触媒するジスルフィドイソメラーゼ (PDI) (*P. pastoris* (PpPDI) または *C. hualienensis* (ChuaPDI1、ChuaPDI2) 由来) の共存の影響を検討している。His-ChuaHNL の生産性は、コドン最適化された ChuaHNL と PpPDI の共発現により、単位培養あたり約 140 倍に増加した。次に、ChuaHNL の N-グリコシル化が *P. pastoris* の ChuaHNL の安定性、酵素分泌、および触媒特性に大きな影響を与えることを論じている。これらの検討により、ChuaHNL を *P. pastoris* を宿主として生産すれば、グリコシル化により酵素の安定性が向上し、経済的かつ効率的に生産することが可能であることを論じている。

医薬品中間体 (R)-2-クロロマンデロニトリルの効率的な合成に利用するため、新しくトヤマキシャヤスデ *Parafontaria laminata* を採捕し、その HNL (P1amHNL) を均一に精製し、部分構造から P1amHNL をコードする完全長 cDNA をクローニングしている。HNL 遺伝子は、20 アミノ酸長のシグナルペプチドを含む 183 アミノ酸をコードする 552 塩基対で構成されていた。P1amHNL は、ChuaHNL とは異なり、大腸菌 SHuffle T7 株で一部可溶性に生産された。また、*P. pastoris* で遺伝子発現させ、グリコシル化された組換え P1amHNL の酵素化学的諸性質についても検討している。野生型 P1amHNL は、種々のシアノヒドリンの合成において、他のヤスデ由来 HNL より広い基質特異性を示し、抗血栓薬クロピドグレルの重要中間体 (R)-2-クロロマンデロニトリルの合成 (76% *e. e.*) を触媒することを明らかにしている。そこで、P1amHNL をタンパク質工学により (R)-2-クロロマンデロニトリル生産に適するように改変するために、X-線結晶構造解析を行っている。*C. hualienensis* の HNL の構造 (PDB ID 6JHC) をテンプレートとして使用した分子置換法により、1.95Å の解像度で P1amHNL の立体構造を決定している。P1amHNL の結晶は P2<sub>1</sub> に属し、一つのポリペプチドは、2つの  $\alpha$  ヘリックスと 8つの  $\beta$  シートで構成されており、3個の分子内ジスルフィド結合が存在していた。さらに、分子間に 2個のジスルフィド結合が存在し、ホモダイマーとしてサブユニットが結合されており、ChuaHNL と類似していた。MOE ソフトウェアを使って P1amHNL の活性部位での (R)-2-クロロマンデロニトリルとのドッキングシミュレーションを行い、さらに最適化することにより、変異型酵素 N85Y を得た。N85Y ではエナンチオ選択性が改善され、高い変換率 (91%) により (R)-2-クロロマンデロニトリル合成 (98.2% *e. e.*) が可能になった。このように、酵素探索から開始し、酵素分子の同定、性質解明を行うとともに、目的に応じて酵素を合理的に改変し、医薬品中間体の合成に適用した例について論じている。

第四章では、HNL の探索過程で、タイ王国など東南アジアに生息するヤスデ *Orthomorpha communis* の体成分から、ワックス様成分としての飽和および不飽和 1-メトキシアルカン類を発見した結果について論じている。ある種の節足動物は、捕食者に対する防御、抗菌および抗真菌活性、水分からの保護、フェロモンなどの種内情報などのさまざまな機能を果たす外分泌液を生成する。*O. communis* が、20種類の飽和および不飽和 1-メトキシアルカンを生産し、それらはヘキサン抽出物の約 45.4%の重量を占めることを発見している。動物界では、ヤスデのいくつかの種やダニ類において、脂肪酸エステル類がワッ

クス状成分として分布している。一方、わずかにクモ *Nephila clavipes* が産生する糸において、分岐したメトキシアルカンの存在が報告されているのを除いて、ヤスデのみならず、その他の動物が、1-メトキシアルカン（メチルアルキルエーテル）を生合成することは報告されていなかった。本研究で発見した、1-メトキシアルカン（メチルアルキルエーテルの合計 20 の化合物）は、水分浸透を防ぎ、乾燥を防ぐために利用されていると考えられ、熱帯雨林に適応して生存する動物種の化学進化の証拠を示すものであることを論じている。

以上、本論文では、植物由来の酵素 HNL の酵素化学的諸性質に対するグリコシル化の影響を、天然型と組換え酵素を比較することによって明らかにし、その知見を得て変異型酵素を誘導し有機溶媒中でも安定に有用物質合成を行った結果について論じている。また、HNL を節足動物トヤマキシヤスデに発見し、X-線結晶構造解析を行い、合理的なタンパク質工学の手法を用いて立体選択性の改良を行い、医薬品中間体合成に効率的に利用している。さらにタイ王国に生息するヤスデが、ワックス様成分としてエステルではなくエーテル化合物を生産することを動物界において 2 例目として発見している。本論文は、動植物酵素の探索、糖鎖修飾および X-線結晶構造解析、並びに合理的変異を行い、酵素の有用物質合成への利用分野を著しく拡大させており、将来の酵素工学の発展に十分寄与すると考えられる。

## 審査の結果の要旨

本論文は、植物 *Passiflora edulis* 由来、および節足動物であるトヤマキシヤヤスデ *Parafontaria laminata* のヒドロキシニトリルリアーゼ (HNL) を探索し、それらの遺伝子クローニング、異種宿主での遺伝子発現、酵素化学的諸性質の解明、酵素活性に対するグリコシル化の影響、酵素の X-線構造および基質認識機構の解析、並びにタンパク質工学による改変を行い、それらの結果を医薬品中間体合成に利用した結果を著したものである。さらに、タイ王国で産生されるヤスデ *Orthomorpha communis* のワックス様成分に、新奇な飽和および不飽和メチルエーテルを同定している。

本論文は、全四章で構成されている。主な内容は以下の通りである。

1. 黄色パッションフルーツ *Passiflora edulis* 由来の野生型 *PeHNL-Ny* および酵母 *Pichia pastoris* で遺伝子発現したグリコシル化 *PeHNL-P* は、大腸菌で発現させた非グリコシル化 *PeHNL-E* およびグリコシル化部位を欠いた N105Q 変異体よりも、はるかに優れた熱安定性、pH 安定性、および有機溶媒耐性を示した。柔軟性の高い C 末端領域にある 1 つのグリコシル化部位に存在するグリカンは、*PeHNL* の構造の柔軟性を低下させることによって構造を安定させていると予測した。そこで、C 末端から 15 アミノ酸を欠損させグリコシル化部位を欠く酵素 *PeHNL*  $\Delta_{107}$  を大腸菌を用いて調製した。C 末端短縮型の *PeHNL*  $\Delta_{107}$  変異体は、天然型 *PeHNL-Ny* には及ばないが、*P. pastoris* で遺伝子発現したグリコシル化 *PeHNL-P* に近い安定性を示す結果について論じている。
2. 黄色パッションフルーツの天然型 *PeHNL-Ny* および酵母 *P. pastoris* を宿主として調製した *PeHNL-P* は、紫色パッションフルーツの *PeHNL-Np* よりもはるかに高い熱安定性、pH 安定性、および有機溶媒への耐性を示した。一方で、結晶構造において、柔軟性の高い C 末端領域にある 1 つのグリコシル化部位に存在するグリカンは、*PeHNL* の構造の柔軟性を低下させることによって構造を安定化していると予測し、C 末端から 15 アミノ酸残基の除去によりグリコシル化部位を失った短縮型 *PeHNL*  $\Delta_{107}$  を大腸菌で調製した。この *PeHNL*  $\Delta_{107}$  は、繰り返し使用時でも、*P. pastoris* でグリコシル化された *PeHNL-P* に近い安定性を示した。このように、立体構造に着目して、大腸菌を宿主として、グリコシル化されていなくても安定な酵素を製造できる実験例を示し、酵素の安定性へグリコシル化の影響について論じている。
3. His タグ付きの ChuaHNL (His-ChuaHNL) を高レベルで生産するために、コドン最適化された ChuaHNL 遺伝子とジスルフィドイソメラーゼ (PpPDI) 遺伝子を酵母 *P. pastoris* において共発現させた。この発現システムを使用して、His-ChuaHNL の生産性を 22.6U / L から約 140 倍の 3,170U / L に増加させており、PpPDI および糖鎖付加の影響により、His-ChuaHNL の高レベル生産が可能となったことを論じている。ChuaHNL 遺伝子のコドン最適化、PpPDI 遺伝子の共発現、および酵母 *P. pastoris* におけるグリコシル化により、ChuaHNL の正しいフォールディングが可能となり、目的通り ChuaHNL を効率良く製造できることを示し、ChuaHNL の機能研究と産業応用への貢献について論じている。

トヤマキシヤヤスデ由来 HNL (PlamHNL) は、芳香族アルデヒドに対して幅広い基質特異性と高いエナンチオ選択性を示し、既知のヤスデ HNL とは異なる性質を示した。PlamHNL の cDNA をクローニングし、大腸菌 SHuff1eT7 株でも遺伝子発現が可能であり、活性の高い HNL を製造できることを発見している。また、酵母 *P. pastoris* を宿主として用い、グリコシル化による翻訳後修飾を受けて調

製したPlamHNLは、大腸菌で調製したPlamHNLよりもはるかに優れた熱安定性とpH安定性を示した。PlamHNLは、その立体構造から、輸送タンパク質であるリポカリンファミリーに属し、ChuaHNLに類似していた。触媒機構に関与するアミノ酸残基はChuaHNLと同一と考えられたが、基質が結合する空洞の形状は異なり、基質特異性に影響を与えていると考察している。さらに、PlamHNLの立体構造に基づき合理的な改変を行うことによって、医薬品中間体 (*R*)-2-クロロマンデロニトリル合成に最適化したことを論じている。

4. タイ王国など東南アジアに生息するヤスデ *Orthomorpha communis* の体成分から、ワックス様成分としての飽和および不飽和1-メトキシアルカン類（メチルアルキルエーテルの合計20の化合物）を発見した結果について論じている。ヤスデが1-メトキシアルカン（メチルアルキルエーテル）を生合成することを、動物界において2番目の例として明らかにし、熱帯雨林に適応して生存する動物種の化学進化の証拠を示した。

本研究は、動植物由来の新しいヒドロキシニトリルリアーゼ(HNL)を探索し、それらの酵素化学的諸性質を解明し、動植物タンパク質研究において避けて通れないグリコシル化の影響を立体構造に基づいて理解・制御して、人為条件で医農薬などの原料として有用な光学活性シアノヒドリンの合成に利用するために有効な改変を行っている。未知な部分が極めて多い動植物酵素について本研究が開拓した領域は広く、産業上にも寄与するところが大きい。論文の内容について、令和2年8月27日に博士論文の審査および最終試験を実施し、申請者は当該分野および周辺分野に関して博士としての十分な全般的知識を持ち、学術研究にふさわしい討論ができ、独立して研究を遂行する能力を有するものと判定し、博士（工学）の学位論文として合格であると認められた。