

浅野酵素活性分子プロジェクト

Asano Active Enzyme Molecule Project

vol.2



プロジェクト概要

酵素は、生物が生産する化学反応を触媒する能力を持ったタンパク質です。酵素が触媒する反応は、極めて温和な条件下で起こります。このため、酵素を利用する物質生産は、環境に優しく省エネルギーな化学工業技術の1つとして注目されています。

当プロジェクトでは、微生物、植物や動物など由来する優れた酵素が触媒する反応を探究し、化学工業や医療などに資する技術の基盤創出へと展開することを目標としています。

有用物質生産の研究では、微生物・植物・動物から見いだされる新たな酵素を活用し、組換え微生物による発酵法や酵素法によるニトリルやアミノ酸などの有用化合物の合成に取り組むことで、これまでの有機合成化学や酵素工学では実現不可能であった技術の基盤を創出し、物質生産プロセスの開発に新たな展開を推進することを目指します。健康診断法開発の研究においては、酵素を用いる新しいアミノ酸定量法の基盤技術の創出に取り組むことで、血液中のアミノ酸単体の定量に利用することなどを目指します。

このように自然から学びながら、新規酵素反応を探索することで、環境にやさしい工業技術の確立や新たな診断方法の開発に貢献します。



浅野 泰久 Yasuhisa Asano

Profile 略 歴

1975.3	京都大学農学部農芸化学科卒
1980.3	京都大学大学院農学研究科 農芸化学専攻博士課程修了
1982.4~84.3	アメリカバテュー大学薬学部および オハイオ州立大学理学部博士研究員
1984.4~90.3	相模中央化学研究所研究員、副主任研究員
1990.4~95.3	富山県立大学工学部助教授
1995.4~	富山県立大学工学部教授
2006.4~10.3	富山県立大学生物工学研究センター所長
2011	富山県立大学附属図書館長
2011~	ERATO 浅野酵素活性分子プロジェクト研究総括

Award 受賞歴

1990	有機合成化学奨励賞
1991	農芸化学奨励賞
1993	とやま賞
2004	日本化学会化学技術賞
2008	日本農芸化学会賞 バイオインダストリー協会賞
2009	日本農芸化学会論文賞
2011	紫綬褒章
2013	富山新聞文化賞

研究総括に聞く

酵素研究の魅力とは？

酵素は、生命活動の維持のために必要なほぼすべての生化学反応に関与しているタンパク質です。生体から酵素を取り出して実験すると、あたかも生きているように「活性」を示す点が、まるで自分に返事をしてくれているようで大変魅力的です。酵素分子は、生命がある限り地球上のどんな場所にも存在していますが、何十億年もの生命の進化の歴史を秘めている驚異のタンパク質でもあります。それらは、人類が考えたどんな機械よりも優れた機能を持ち、宝石以上の美しさを秘めた構造をしています。私たちは、何十億年もの時を地球の片隅でひっそりとしていた酵素を、人類に役立たせるための大舞台に引っ張り出す仕事をしています。

酵素活性分子プロジェクトを進めながら感じている事は？

酵素の生物内での存在様式や、それらの活性と分子構造について研究すればするほど、日々新しい知見が得られ、自然の奥深さに感動しています。応用につなげるにはさらに基礎研究が必要ですが、ERATO研究がなければやり過ぎていたかもしれない人知をはるかに超えた新しい機能を持つ酵素の存在、活性、分子構造などがわかってきています。研究を推進してくれているERATOスタッフの素晴らしい能力と努力にも尊敬と感謝の念で一杯です。

今後の展望は？

Think globally, act locallyでこれまでやってきました。研究は常に客観的に行うのが当然ですが、研究の原動力は感情に動かされています。すなわち、人間が行っている研究は客観的であろうとしても、必ずしもそうならないのが常です。そこに研究の面白さがあると思います。ぜひ、富山の地からスタートして、世界を驚かせるような研究を展開したいと思います。

5年間のプロジェクトの折り返し地点が近付いてくるので、研究テーマの見直しと再出発が必要になります。

研究者に求められる能力は？

- 面白くないことを面白くする。
- 何も遊ぶものがなくても、遊びを見つける。
- 学修の最大の応用問題は、学んだ概念を別の場で、別の方法で実現すること。無地のキャンパスに新しい絵を描くこと。
- 未知の課題について解決法を思考し、仮説を立て、実行できるようにする。思考時間を限りなく長くする。
- 沢山やる(高い速度が要求される)→どれかがヒットする→自信がつく→仕事が自然とクリエートされてくる→時代が後からついてくる。

信条、モットーとしている事は？

夏山を登る時、登山口からすぐの森林地帯では自分がどこにいるかわからず汗をかいて登りも苦しい。続けて登ってゆくと樹木が低くなり、ハイマツ帯になってゆく、知らず知らずのうちに眺めの良い場所に到達してくる。汗もひけて涼風が吹いてくる。それから山頂を目指す、たとえ遠い昔に誰かがすでに登った山であっても、愛して登った山ならば、他人が見えなかったことにきっと気づくはずである。

グループ紹介

酵素工学グループ

高性能の酵素の開発を目的とし、自然界からの取得、タンパク質工学による改良・開発、これら酵素の性質検討を行います。さらに実用化を目指し物質生産やアミノ酸定量を行うための基礎研究、応用研究を進めています。

生物有機化学グループ

構造解析やバイオインフォマティクスの技術を利用し、酵素機能の理解を深めるとともに、酵素の分子設計やデータベースの構築を行います。さらにこれらの成果を利用して酵素を用いた有機化合物合成の新手法の開発を行います。

化学生態学グループ

有機化学、天然物化学的な手法を駆使して、これまで酵素探索の対象として注目されていなかった植物や動物から有用な酵素反応の探索を進めています。



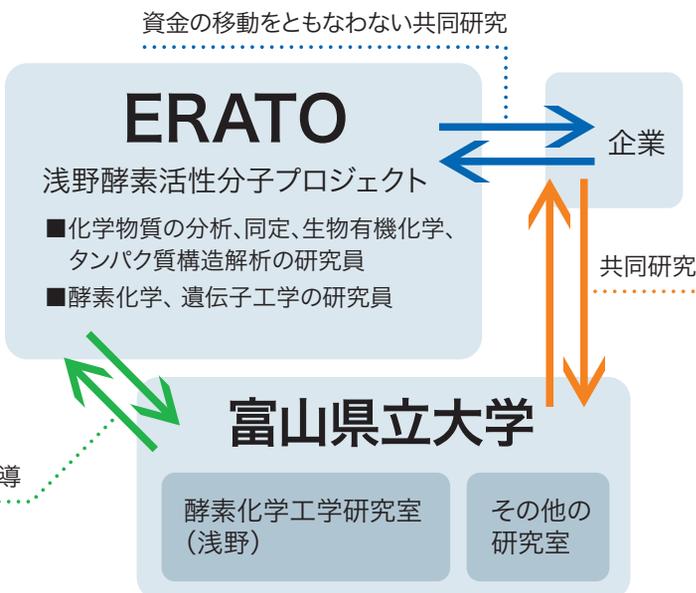
共同研究

当プロジェクトは、積極的に民間企業との共同研究を進めています。民間企業との共同研究は、当プロジェクトを含む富山県立大学と企業の間で共同研究契約を結びます。研究にはプロジェクトの研究員の他、県立大学の教員、学生も参加しています。プロジェクトの成果がいち早く実用化されることを目指し、今後も共同研究を精力的に、進めていく予定です。

共同研究内容

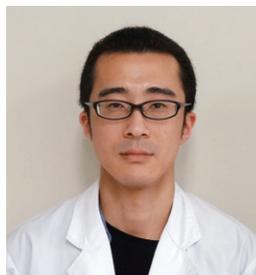
- 微生物、動植物からの酵素探索
- 酵素の改変と機能評価
- 有用物質合成法の開発
- 臨床用酵素の開発、健康診断
- その他

企業との共同研究



スタッフメッセージ

酵素反応を利用した 有用物質生産



研究員(博士)
生物有機化学グループ
山本 和範

専門 / 有機合成化学

私は、酵素的結晶変換法という、水中で懸濁された状態の基質が、同じく懸濁された状態の生成物へと収率良く変換される手法を利用して、有用物質の生産を行うことを目指しています。

有機化学を酵素工学に積極的に取り入れ、有機溶媒中でしかできないと考えられている反応、有機合成では厳しい条件や多段階の工程が必要な反応などを酵素反応で解決していきたいと考えています。

新たな生物相からの 有用酵素の発掘を目指して



研究員(博士)
酵素工学グループ
石田 裕幸

専門 / 昆虫生理生化学・分子昆虫学

多くの有用酵素が微生物から単離され、低環境負荷型、省力型の工業分野への応用、医療分野に適用されてきました。一方、植物や私の専門の節足動物は、微生物とは異なる生活環をもち、それぞれの土地でユニークな生物として進化してきました。彼らの体内には私たちが未だ気づかない応用可能な酵素が眠っているはずです。私は、これらの生物群を新たな資源とみなし、有用酵素の探索をしています。

組換えタンパク質の可溶化



研究員(博士)
酵素工学グループ
伊奈 隆年

専門 / 天然物化学・細胞工学

近年、難化学合成物の生産性向上や低環境負荷等の観点より、酵素反応を利用して生産された製品が数多く出されるようになりました。しかしながら、酵素を産業利用する場合、固定化がしやすい、活性が強い等、多くの制約があります。中でも、組換えタンパク質の可溶性を向上させることは大きな課題の一つです。現在、組換えタンパク質の可溶性向上を目的とし、多面的な観点から研究を進めています。可溶性を掌る鍵を見つけ、酵素のさらなる産業利用に貢献したいです。

ESRA制度で 最高レベルの研究を学ぶ



ESRA
酵素工学グループ
川原 寛弘

専門 / 酵素工学・応用微生物学

私は、ESRA制度により博士後期課程の学生でありながら、当プロジェクトの一員として研究しています。私以外のほとんどが博士研究員であり、研究のプロが多くいる場で実験に集中できる環境は非常に刺激的であり、毎日充実しています。また当プロジェクトの研究テーマは幅広く、多くの知識や実験手法を学べます。私の担当テーマはタンパク質を改変し機能を変化させることで、より有用な酵素を作成することです。最高の設備と研究者たちに囲まれて、博士号取得を目指し、世の人のためになるような研究をしたいです。

技術員として



技術員
上田 量子

私は、研究員の補助として、実験を行い、その実験データをまとめ、次の実験につなげていくことをしています。失敗すると次に進めないため、緊張の連続です。

うまくいかないこともあります。自分も研究の一翼を担う責任感をもって取り組んでいます。指示されたことだけでなく求められた以上の成果を出せるよう努力する日々です。

研究員たちのお役に立てるよう、これからも精進していきます。

裏方でプロジェクトを支える



研究推進主任(研究担当)
松田 元規

私は、リサーチアドミニストレーターという職種として活動しています。担当業務は、研究以外で専門的知識が必要な業務全般です。具体的には、年度計画の立案、年度報告書の作成、知財管理、共同研究の調整、研究関連物品の購入手続きなど研究に付帯する業務です。浅野研究総括がノーベル賞を取る日を夢見て、業務に励んでおります。

特認研究助手 (ESRA) の募集

お問い合わせ先
ERATO浅野酵素活性分子プロジェクト
研究推進主任(研究担当) 松田元規
TEL:0766-88-2280 FAX:0766-88-2422
E-mail: m-matsuda@pu-toyama.ac.jp

プロジェクトを推進する多様な人材の確保と優秀な研究者の育成を目的としてESRA (ERATO Special Research Assistant) 制度を設置しています。

対象者 / 富山県立大学大学院博士後期課程に在学し、当プロジェクトの研究に従事できる方。
(次年度に同課程への入学を目指す方でも応募可能)

待遇 / 博士後期課程の大学院生としてプロジェクトに従事する研究テーマで学位取得を目指すとともに、プロジェクトの研究に従事した賃金として月あたり最大で17万円程度が支払われます。

●応募を希望される方は、必要書類をお知らせしますので、左記までご連絡ください。

研究内容紹介

研究内容紹介

アルドキシム-ニトリル経路とニトリル生産

ニトリル化合物は医薬品などの原料となる工業的に有用な化合物です。我々は、人為的に改変した大腸菌を用いることでニトリル化合物を安価に、安全に、少ない環境負荷で生産することを目指しています。これを実現するためには、①有用な酵素を探し出し、②様々な酵素を大腸菌内で発現させ、人工的なニトリル化合物合成経路を創りだす必要があります。

① 酵素の探索

ニトリル化合物は動植物、微生物の代謝経路上に存在し、その経路はアルドキシム-ニトリル経路と呼ばれています。図1に示したように植物、微生物においてその経路はわずかに異なっています。これら代謝経路上の酵素は未だ報告数が少なく、また動物のアルドキシム-ニトリル経路関連酵素は未知の酵素です。動植物、微生物から新規の酵素を得ることができれば、それぞれ特徴が異なると考えられ、ニトリル合成経路の創出に幅が広がります。また、酵素、代謝経路の比較から、アルドキシム-ニトリル経路の存在意義や進化について議論が可能となります。

② ニトリル化合物合成経路の創出

大腸菌は安価に培養でき、増殖速度も早いことから様々な物質生産での利用が期待されています。また、遺伝子組換え技術が発達しており、様々な外来タンパク質を発現させることが可能です。大腸菌に植物由来の酵素と、微生物由来の酵素を発現させることで、自然界には存在しないアミノ酸からニトリルを生産する経路を創出することができます。当プロジェクトでは既にこの代謝経路を用いてフェニルアセトニトリルの生産に成功しています(図2)。人工的なニトリル合成経路の創出だけでなくニトリル化合物の生産効率をさらによくするために、遺伝子工学的な方法を用いた酵素の改変も行っています。

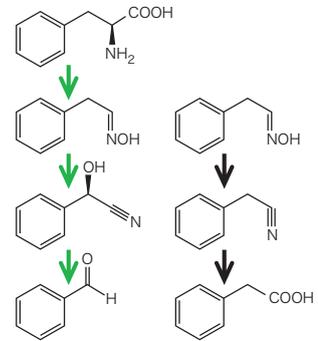


図1. 植物(左)と微生物(右)のアルドキシム-ニトリル経路

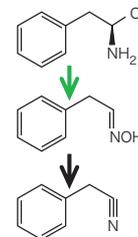


図2. 人工的に創出したアルドキシム-ニトリル経路

↓ 植物由来酵素
↓ 微生物由来酵素

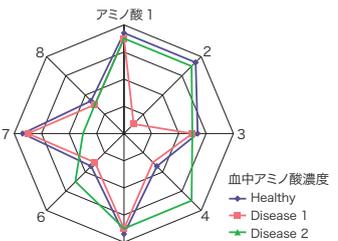
2

研究内容紹介

アミノ酸定量

食品や医薬品、そして我々の体の中にも含まれるアミノ酸は、たくさんの種類が存在し、その多くが重要な生体分子として知られています。各種アミノ酸の量を測定する分析法は、食品産業や基礎研究などで重要な技術とされてきました。さらに近年は、体内の各アミノ酸濃度を測定することで様々な病気の診断が可能であることもわかりつつあります。このような背景から、酵素や微生物の力を利用することによって、産業や医療など幅広い分野で利用可能なアミノ酸定量法の開発を進めています。

これまでに、トリプトファンやリシン、アルギニン、メチオニン、シトルリンなどのアミノ酸について、定量用酵素の開発に成功しました。また酵素の利用だけでなく、微生物をセンサのように用いることでアミノ酸を定量する技術についても開発を進めています。これらの手法を用いることにより、従来の分析法のような高価な測定機器や熟練した技術が必要とはせず、短時間で簡単に各アミノ酸を定量できるようになりました。これらの技術の実用化についても今後取り組んでいきます。さらにリシン定量用の酵素については、タンパク質の構造解析によって、学術的にも興味深い新規な性質が見つかってきています。アミノ酸定量という応用的な研究から、基礎学問としても新しい発見へつなげるという、チャレンジングな姿勢で研究を進めています。



血中アミノ酸濃度は各種疾患に特有のパターンで変化する。これを利用して、アミノ酸濃度を測ることにより病気の診断が可能となる。

成果紹介

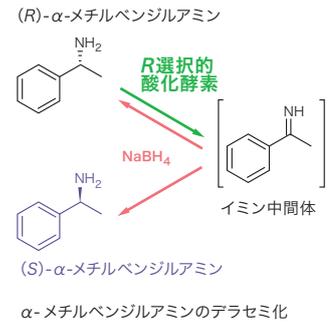
成果紹介

R選択的 α -メチルベンジルアミン酸化酵素の開発と デラセミ化による(S)- α -メチルベンジルアミンの生産

酵素反応では1種類の立体異性体のみを選択的に得ることができるのも大きな特徴です。当プロジェクトでは、塩基性光学分割剤、光学活性医薬品、農業などの合成原料として有用な α -メチルベンジルアミンについて酵素を用い立体選択的にS体のみを得るデラセミ化法の開発に成功しました。

デラセミ化法は、反応系内でラセミ体化合物の一方の立体を反転させることにより、もう一方の鏡像体を理論収率100%で得る無駄の無い効率の良い合成法の一つです。現在までに α -メチルベンジルアミンのS選択的なアミン酸化酵素は報告されていましたが、R選択的なアミン酸化酵素は報告されておらず、デラセミ化法によるS体アミンの合成は不可能でした。そこで、我々は、ブタ腎臓由来D-アミノ酸化酵素に着目し、立体構造を基に酵素をファインチューニングすることでわずか2点の変異で本来の基質であるR-アミノ酸に対する活性を失いR体アミンに対する活性を示す変異型酵素の取得に成功しました。変異型酵素を用いてラセミ体アミン化合物よりS体アミンを効率よく変換することに成功しました。

(安川 和志)



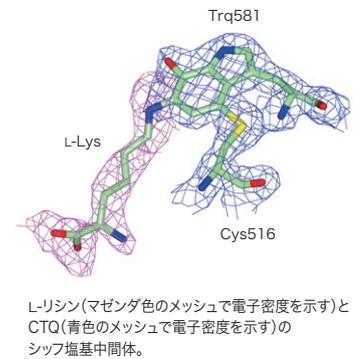
2

成果紹介

トリプトフィルキノ含有酸化酵素の構造解析

*Marinomonas mediterranea*という海洋性細菌が生産するL-リシン ϵ -酸化酵素についてX線結晶構造解析を行い、この酵素のnative構造を明らかにしました。その結果、活性中心にシステイントリプトフィルキノ(CTQ)という、タンパク質中のシステインとトリプトファンから直接形成されているビルトイン型補酵素が存在することが明らかになりました。また本酵素の基質であるL-リシンとの複合体の構造解析より、L-リシンの ϵ 位のアミノ基とCTQのカルボニル基のC6原子が基質あるいは生成物とのシッフ塩基中間体を形成していることが示唆され、CTQが実際に補酵素として機能していることが明らかになりました。本研究により、CTQを補酵素として用いる酸化酵素の存在が初めて明らかとなりました。本研究成果によって、CTQを補酵素として用いる酸化酵素の反応機能の解明や、本酵素の産業応用を目指した基質特異性の合理的改変などの、基礎と応用の両面の研究に有用な知見が提供されることが期待されます。

(岡崎 誠司)



研究成果一覧

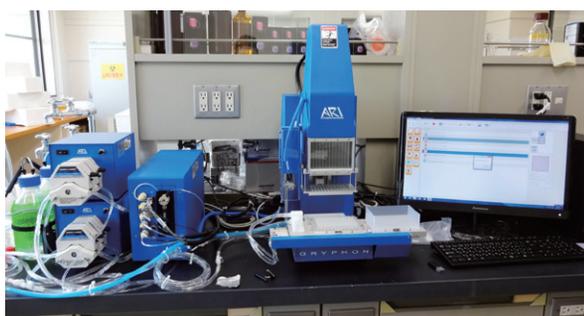
論文	掲載年月	タイトル	著者	掲載誌名、号数
	2013.7	Selective tryptophan determination by using tryptophan oxidases involved in bis-indole antibiotic biosynthesis	亀谷将史、尾仲宏康、浅野泰久	Analytical. Biochemistry 438(2): 124-132, 2013
	2013.8	X-Ray crystallographic evidence for the presence of the cysteine tryptophylquinone cofactor in L-lysine ϵ -oxidase from <i>Marinomonas mediterranea</i>	岡崎誠司、中野祥吾、松井大亮、赤地周作、稲垣賢二、浅野泰久	The Journal of Biochemistry 154(3): 233-236, 2013
会議	発表年月	タイトル	発表者	会議名
	2012.7	Use of enzymes from microbial and plant "Aldoxime-Nitrile Pathway" for organic synthesis	浅野泰久	Gordon Research Conference 2012 Biocatalysis, RI, USA
	2013.5	Molecular dynamics of <i>Manihot esculenta</i> hydroxynitrile lyase	○岡崎誠司、中野祥吾、浅野泰久	第4回折構造生物国際シンポジウム(ISDSB)2013, 名古屋
	2013.6	Biopolyamid Platform	浅野泰久	10th World Congress on Industrial Biotechnology, Montreal, Canada
	2013.7	Potential white-biotechnology for production of nitrile compounds utilizing 'the aldoxime-nitrile pathway'	○三木佑太、浅野泰久	BioTrans2013, Manchester, UK
	2013.7	Application of an L-amino acid oxidase/oxygenase to amino acid assay: Interconversion between oxidase and oxygenase activities	○松井大亮、磯部公安、浅野泰久	BioTrans2013, Manchester, UK
ほか多数				
書籍・総説	掲載年月	タイトル	著者	掲載誌名
	In press	バイオ触媒工学・基礎知識	浅野泰久	化学便覧 応用化学編 第7版
知財	種別	名称	出願No.	
	特許	新規L-トリプトファン脱水素酵素、L-トリプトファンの測定方法、キットおよび酵素センサ	特願2013-033706	
	特許	変異アミノ酸オキシダーゼおよびアミン化合物のラセミ体のデラセミ化方法	特願2013-033707	
	特許	新規L-アルギニン酸化酵素、L-アルギニンの測定方法、L-アルギニン測定用キットおよびL-アルギニン測定用の酵素センサ	特願2013-032588	

設備機器

生物学研究センター



タンパク質結晶X線立体構造解析システム



微量タンパク質分注システム

[その他機器]

タンパク質MD(分子動力的)計算用クラスターシステム

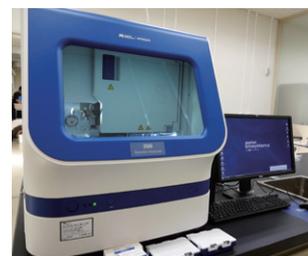
拠点研究室



HPLC(高速液体クロマトグラフ分析システム)



培養器



DNAシーケンサー

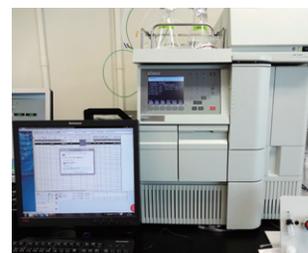
[その他機器]

多機能マイクロプレートリーダー/高速冷却遠心機/マルチビーズショッカー/サーマルサイクラー/温度調節機能付紫外可視分光光度計

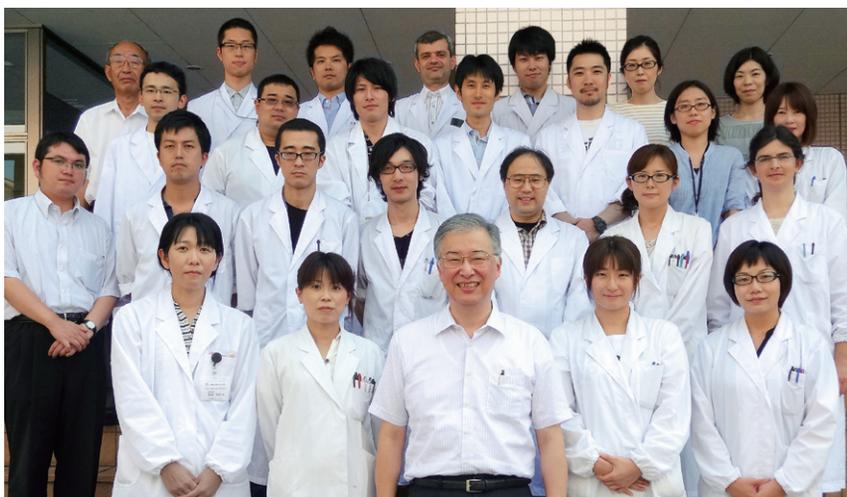
京都分室



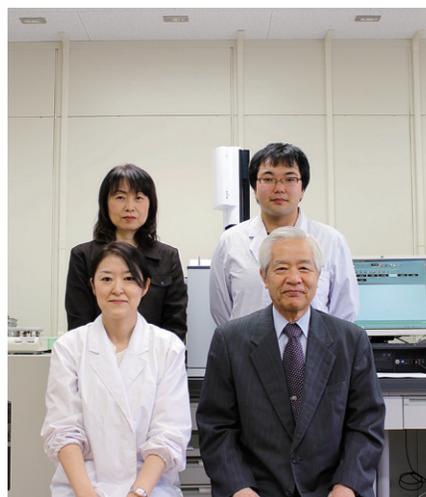
ガスクロマトグラフ質量分析計



HPLC(高速液体クロマトグラフ分析システム)



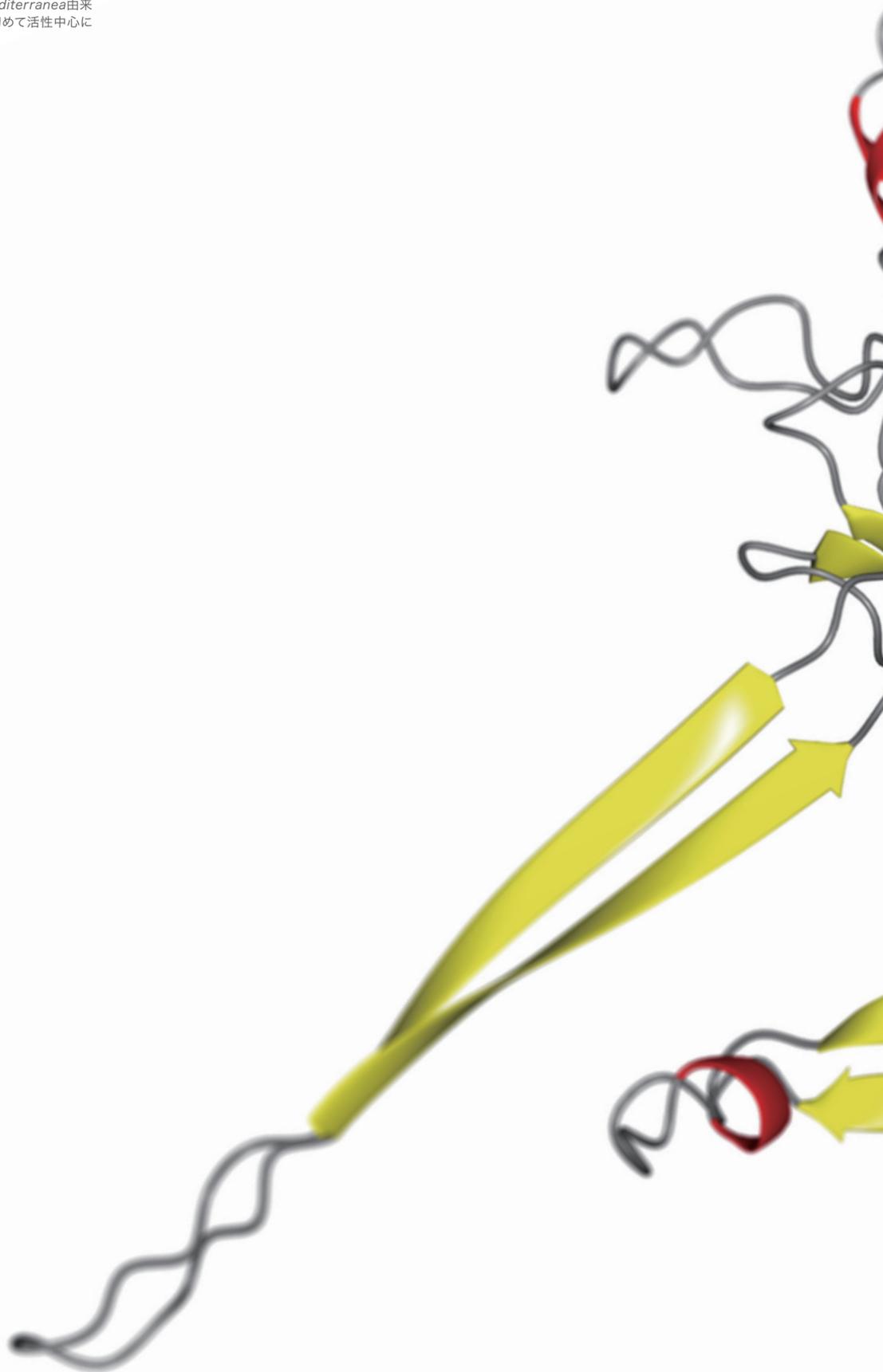
拠点研究室



京都分室

表紙結晶構造について

当プロジェクトにおいて解明された*Marinomonas mediterranea*由来 L-リシン ε-酸化酵素の結晶構造。酸化酵素としては初めて活性中心にシステイントリプトフィルキノンが確認された。



ERATO 浅野酵素活性分子プロジェクト (富山県立大学)

〒939-0398 富山県射水市黒河5180 富山県立大学生物工学研究センター 1F K113号室 TEL(0766)88-2280 FAX(0766)88-2422
研究推進主任(研究担当) 松田元規 m-matsuda@pu-toyama.ac.jp

京都分室

〒602-0841 京都府京都市上京区河原町通今出川下る梶井町448番5 クリエイション・コア京都御車313、314号室 TEL(075)744-1805 FAX(075)744-1805

<http://www.jst.go.jp/erato/asano/index.html>