



浅野酵素活性分子プロジェクト

Asano Active Enzyme Molecule Project

vol.3



プロジェクト概要

酵素は、生物が産生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。また、酵素は、他の触媒に比べて、反応特異性・基質特異性・光学特異性などで優れた性質を持っています。このため、酵素は、エネルギー節約型の環境に優しい物質生産技術の1つとして注目され、生体成分の特異的な測定法への利用も注目されています。

本プロジェクトでは、微生物や植物、動物に由来する酵素が触媒する優れた反応を探究し、有用物質の生産や生体成分の特異的な測定などに資する基盤技術を創出して、社会に貢献することを目標にしています。

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規な酵素を活用し、組換え微生物を用いて発酵法や酵素法でニトリルやアミノ酸などの有用化合物の合成に取り組み、これまでの有機合成化学や酵素工学の技術では実現不可能であった物質生産プロセスに、新しい技術を提供することを目指します。生体成分測定法の研究では、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み、血液中の各種アミノ酸の定量を健康診断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な酵素を探索して、環境調和型の新しい工業技術の確立や新たな診断方法の開発を通して、次世代で活用可能な基盤技術の創出に努めています。



研究総括

浅野 泰久 Yasuhisa Asano

ERATO事業は、5年間の期間のちょうど折り返し地点に達しています。この間、研究員のたゆまぬ努力により、多数の成果が出てまいりました。それらの一部は、すでに各種一流学術雑誌を飾っております。本研究では、自然界から新しい酵素や反応を開発しつつ、それらの新利用法を開拓する過程をたどります。言わば、自然に恵まれた富山で新しい食材を見出し、さらに京料理のように見た目も美しく整えるような「未知の酵素を表舞台に引っ張り出す」仕事をしています。それには、短期間で通常の何倍もの密度の仕事が必要になりますが、そのおかげで予想外の発見がいくつもございました。今後は、自分たちが見出した特異な酵素、現象、応用技術を集中的に自分たちのものにして行き、さらに新しい発見、新しい分野形成に向かって邁進してまいります。

Profile 略 歴

1975.3 京都大学農学部農芸化学科卒業
1980.3 京都大学大学院農学研究科
農芸化学専攻博士課程単位取得(農学博士(1982))
1981.4~82.3 京都大学JSPS特別研究員
1982.4~84.3 アメリカババニ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
2011.4~ 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
The 2013 Enzyme Engineering Award
2014 Biotac Award-Science 2014

研究総括補佐 兼 酵素工学グループリーダー

磯部 公安 Kimiyasu Isobe



本プロジェクトでは、微生物だけでなく植物や動物由来の酵素も研究対象としており、微生物酵素を研究してきた私にはとても新鮮です。そして、本プロジェクトでは、浅野研究総括が目指す目標に向かって、若い研究者が新しい視点で酵素について広い範囲の研究を行っています。既に独創的な研究成果が得られていますが、さらにスピードと活力が増した研究者集団になり、社会で広く利用できる革新的でレベルの高い研究成果が得られるように、企業および大学での長い研究経験を生かして貢献しようと思っています。

Profile 略 歴

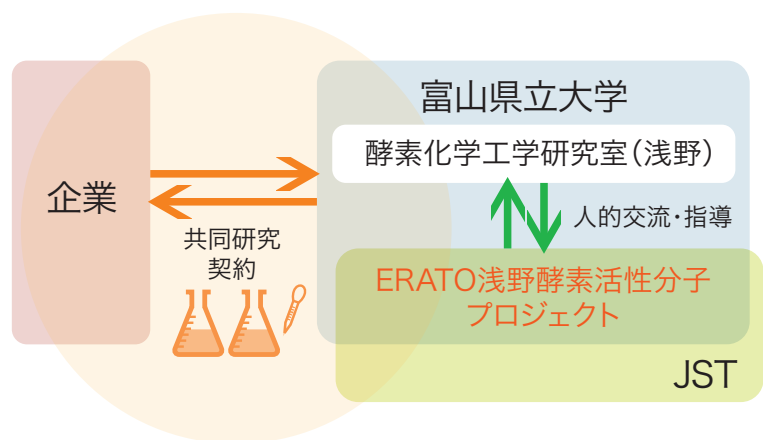
1972.3 岩手大学農学部農芸化学科卒業
1974.3 岩手大学大学院農学研究科修士課程修了
1974.4 天野製薬株式会社(現天野エンザイム)入社
1983.3 京都大学農学部博士号取得
1988.11~92.2 ドイツ国立バイオテクノロジー研究所派遣研究員
1997.12 天野製薬株式会社 退職
1998.1~2006.5 岩手大学農学部 助教授
2006.6~14.3 岩手大学農学部 岩手大学大学院連合農学研究科 教授
2014.4~ ERATO 浅野酵素活性分子プロジェクト研究総括補佐

体制



共同研究

本プロジェクトでは、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、本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、実施します。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。



特認研究助手 (ESRA) の募集

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籍し、本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賞金として月あたり最大で17万円程度が支払われます。

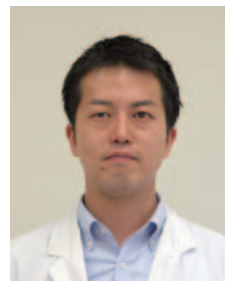
●応募を希望される方は、必要書類をお知らせしますのでヘッドクォーターまでご連絡ください。

グループ紹介

酵素工学グループ

産業利用可能な有用酵素の探索と高機能化

本グループでは、有用酵素の探索とタンパク質工学による酵素の改良により、産業利用できる酵素の開発を行っています。血中アミノ酸は各種疾患の診断において重要な検査項目です。酵素によるアミノ酸の定量は、高額な分析機器を必要としない簡便で安価な手法として実用化が期待されています。本グループでは、アミノ酸定量に利用可能な酵素を探索し、性質を改良して、それら酵素を利用した新しい定量法を開発しています。また近年、地球温暖化や化石資源の枯渇が世界的に危惧されており、温和な条件で効率良く機能する微生物や酵素を用いた「ものづくり」が注目されています。本グループでは、様々な生物由来の酵素や微生物を利用して、環境にやさしい有用物質生産プロセスを開発しています。さらに、酵素を産業利用する場合、遺伝子組換え大腸菌を用いた大量生産系の構築は有用な手段ですが、不活性な不溶性タンパク質として生成されることがしばしば問題になります。この問題点を解決するために本グループでは、組換え大腸菌を用いてタンパク質の可溶性発現の向上に関する基盤的研究を進めています。



サブグループリーダー
松井 大亮

生物有機化学グループ

酵素を利用した有用物質の生産に向けた基盤技術の創出

本グループでは、酵素工学に、有機合成化学、構造生物学、生物情報学および計算化学などの他分野の技術を融合し、有用物質の生産に展開する研究を行っています。酵素を用いて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物質生産プロセスの開発に向けた基盤技術の創出を目指しています。具体的には、構造解析の技術や生物情報学を利用し、酵素機能に対する理解を深め、計算化学による酵素の分子設計やデータベースの構築を行っています。さらにこれらの情報を基に、工業生産での実用化を志向した酵素や基質の設計へと展開し、従来報告のない新しい物質変換用酵素の構築を行っています。また、水や有機溶媒に対する溶解性が低く、化学反応が起こりにくい結晶性化合物に対して、「酵素的結晶変換」という基盤技術を確立する研究を進めています。

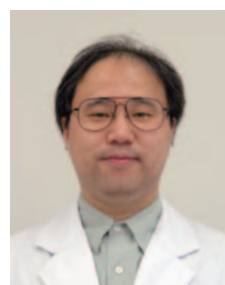


グループリーダー
米田 英伸

生物資源探索グループ

新規酵素遺伝子資源の利用

本グループでは、微生物とは異なる生活環を営む植物や動物を新たな酵素の遺伝子資源として、微生物では報告されていない新規な有用触媒活性を持つ酵素の発見と物質生産への応用を目的に研究を行っています。産業用酵素は、これまで大量生産が容易な微生物由来の酵素を中心に探索が進められてきました。しかし、遺伝子組換え技術や遺伝子解析手法の著しい発展により、植物や動物由来の酵素でも産業に利用することが可能になってきました。そこで本グループでは、ニトリル化合物の生合成および分解に関与する酵素を中心に、上述の新しい遺伝子資源から産業上有用な優れた酵素を探索しています。具体的には、これまで微生物の酵素を発見してきたスクリーニング手法に加え、酵素工学を基軸に化学生態学、解剖学、形態学、トランスクリプトーム解析を含む分子生物学などの手法を組み合わせる研究を推進しています。



グループリーダー
石田 裕幸

ヘッドクォーター

連絡先

〒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(ERATO事務室)
TEL(0766)88-2280 FAX(0766)88-2422
研究推進主任(研究担当) 松田元規
E-mail: m-matsuda@pu-toyama.ac.jp

ERATOでは、プロジェクトごとに研究総括をサポートして研究支援を行うヘッドクォーターを設置しております。本プロジェクトでは、現在、研究総括補佐、研究推進主任、研究推進員の3名で構成しています。具体的な業務としては、研究総括および各研究グループの事務面からの支援、研究計画立案の補佐および進捗管理、共同研究の調整や契約手続き、特許等知的財産の管理、シンポジウム等の開催事務や展示会などアウトリーチ活動を担当しています。本プロジェクトに御用の方は、ヘッドクォーターにご連絡ください。

成果紹介

成果紹介

自然界に存在しない新しい酸化酵素の開発 ～有用化合物の生産に応用～

有機化合物の中には、構造が全く同じであるものの右手と左手の様に鏡写しの関係にある鏡像異性体を持つものがあります(それぞれをS体あるいはR体などと表します)。鏡像異性体は、化学的な性質は同じですが、生物体内では異なる作用を示すことから、どちらか一方のみを純粋に生産することが必要です。酵素は、この鏡像異性体のうち一方だけに作用し、精密な化学合成に利用できることが知られています。

本研究では、これまで自然界では見つかっていないR体の α -メチルベンジルアミンを酸化する酵素の開発に成功しました。この酵素は、ブタ腎臓由来のD-アミノ酸酸化酵素を単離精製した後、遺伝子工学的手法とコンピューターによる分子設計で見出した2か所のアミノ酸残基を変えることにより劇的に基質特異性を改変したものです。また、X線結晶構造解析を行い、立体構造を明らかにしました(表紙図参照)。

さらに、この酵素を用いて純粋なS体の α -メチルベンジルアミンを得ることに成功しました。 α -メチルベンジルアミンは、塩基性光学分割剤(鏡像体を分割するための試薬)、医薬品・農薬の合成原料として有用です。これらの用途には、S体あるいはR体の一方のみの α -メチルベンジルアミンが必要です。本研究では、上記酵素を用いたテラセミ化反応を行いました。テラセミ化反応とは、反応系内でラセミ体(鏡像異性体が半分ずつ存在する状態)の片方の鏡像異性体に酵素を作用させ、別の化学反応と組み合わせることにより、他方の鏡像体を理論収率100%で得る反応です。このように、我々はラセミ体の α -メチルベンジルアミンから高純度のS体を得ることに成功しました。

これらの成果は、ドイツの権威ある化学誌Angewante Chemi International Editionに掲載され、大きな反響が得られました。

(安川 和志*)

* 現富山県衛生研究所化学部研究員

2

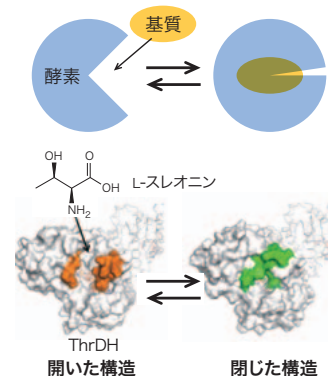
成果紹介

酵素の動きを捉える ～L-スレオニン脱水素酵素の動的構造解析～

酵素は様々な反応を触媒しますが、その際、構造(形)を柔軟に変化させ、動くことで反応を行っていると言われています。しかし酵素は非常に小さく(数ナノメートル)、その動きを目で見ることはできません。酵素の動きを見るための手法として、計算化学によるコンピューターシミュレーションがあります。

本研究ではL-スレオニン脱水素酵素(ThrDH)について、反応の際に起こる構造変化と動きを初めて明らかにしました。ThrDHは基質(L-スレオニン)が結合していない時は“開いた構造”を持ち、基質が結合すると“閉じた構造”に変化します。この開閉構造により、ThrDHはL-スレオニンと効率よく反応する構造であることを裏付けました。これはX線結晶構造解析と、従来酵素の分野ではほとんど導入されていなかった計算化学を融合して得られた成果です。また、構造と動きを明らかにしたことで、この酵素の遺伝子に変異を加え、機能改良することが容易になりました。弊害となる性質をなくし、必要な機能のみを残すといった分子設計を行い、産業等で実用化しやすい酵素を提供できるよう、さらに研究を進めています。

(中野 祥吾)



論文一覧

タイトル	著者	掲載誌名、号数
Selective tryptophan determination by using tryptophan oxidases involved in bis-indole antibiotic biosynthesis	Masafumi Kameya, Hiroyasu Onaka, Yasuhisa Asano	Anal. Biochem., 438(2) : 124-132, 2013
X-Ray crystallographic evidence for the presence of the cysteine tryptophylquinone cofactor in L-lysine ϵ -oxidase from <i>Marinomonas mediterranea</i>	Seiji Okazaki, Shogo Nakano, Daisuke Matsui, Shusaku Akaji, Kenji Inagaki, Yasuhisa Asano	J. Biochem., 154(3) : 233-236, 2013
Rapid and selective enzymatic assay for L-methionine based on a pyrophosphate detection system	Masafumi Kameya, Mariko Himi, Yasuhisa Asano	Anal. Biochem., 447 : 33-38, 2014
Selective enzymatic assays for L-citrulline and L-arginine based on the platform of pyrophosphate detection	Masafumi Kameya, Yasuhisa Asano	Enzyme Microb. Technol., 57 : 36-41, 2014
Tailoring D-amino acid oxidase from pig kidney to R-stereoselective amine oxidase and its use in deracemization of α -methylbenzylamine	Kazuyuki Yasukawa, Shogo Nakano, Yasuhisa Asano	Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 126(17) : 4517-4520, 2014
Mutational and crystallographic analysis of L-amino acid oxidase/ monooxygenase from <i>Pseudomonas</i> sp. AIU 813: Interconversion between oxidase and monooxygenase activities	Daisuke Matsui, Do-Hyun Im, Asami Sugawara, Yasuhisa Fukuta, Shinya Fushinobu, Kimiyasu Isobe, Yasuhisa Asano	FEBS Open Bio, 4 : 220-228, 2014
Binding of NAD ⁺ and L-threonine induces stepwise structural and flexibility changes in <i>Cupriavidus necator</i> L-threonine dehydrogenase	Shogo Nakano, Seiji Okazaki, Hiroaki Tokiwa, Yasuhisa Asano	J Biol Chem., 289(15) : 10445-54, 2014
(2-Nitroethyl)benzene: a major flower scent from the Japanese Loquat <i>Eriobotrya japonica</i> [Rosales: Rosaceae]	Yasumasa Kuwahara, Yayoi Ichiki, Masashi Morita, Yasuhisa Asano	Biosci. Biotechnol. Biochem., in press
Characterization of a pyridoxal-5'-phosphate-dependent L-lysine decarboxylase/oxidase from <i>Burkholderia</i> sp. AIU 395	Asami Sugawara, Daisuke Matsui, Narumi Takahashi, Miwa Yamada, Yasuhisa Asano, Kimiyasu Isobe	J Biosci Bioeng., in press
Identification and characterization of CYP79D16 and CYP71AN24 catalyzing the first and second steps in L-phenylalanine-derived cyanogenic glycoside biosynthesis in the Japanese apricot, <i>Prunus mume</i> Sieb. et Zucc.	Takuya Yamaguchi, Kazunori Yamamoto, Yasuhisa Asano	Plant Mol. Biol., in press

新規アミノ酸定量用酵素の開発

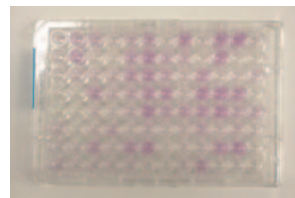
血液などの生体試料に含まれる各種アミノ酸量は、疾病検出の有用な指標になります。アミノ酸を酵素法で定量できれば、簡便でかつ迅速に測定できる利点があります。しかし、アミノ酸定量用酵素は、特定のアミノ酸に対してのみ高い特異性を示すこと、安定性が優れていることなどの条件を満たさなければ、実用化には至りません。そこで、自然界からの探索や、タンパク質工学を用いた特性の改良で、以下に示すアミノ酸定量用酵素の開発を行ってきました。

アルギニン定量用酵素 自然界からの微生物の探索により、アルギニンに特異的で、熱安定性に優れたアルギニン酸化酵素を発見しました。

リシン定量用酵素 自然界から見出したアミノ酸酸化／酸素添加酵素(酸化的脱アミノ反応と酵素添加反応の2つの反応を触媒する酵素)のX線結晶構造を解析し、変異を導入して二機能性の反応に関与するアミノ酸残基を特定し、定量用酵素への機能改変に成功しました。また、リシンε酸化酵素の異種発現に成功しました。

トリプトファン定量用酵素 変異導入によるトリプトファン脱水素酵素の安定性の向上に成功しました。

(松井 大亮)



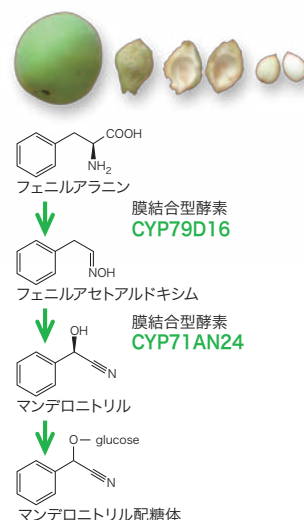
変異株から活性を有する株のスクリーニング。赤色に呈色しているものが活性を有しています。

ウメ由来マンデロニトリル生合成酵素の発見

マンデロニトリルは医薬品などの原料となる有用物質です。ウメは仁などにマンデロニトリルの配糖体を多く蓄積しており、本物質が分解されると毒物であるシアン化水素が発生します。このことは「ウメは食べても実食うな、中に天神寝てござる」と諺があるように、古くから知られていました。それに関わらず、ウメのマンデロニトリル配糖体の生合成に関わる酵素については、これまで明らかにされていませんでした。

そこで、ウメのマンデロニトリル生合成酵素を用いて有用物質であるマンデロニトリルを生産できると考え、これらの酵素を探索しました。その結果、2つの膜結合型酵素(CYP79D16およびCYP71AN24)によって、フェニルアラニンがフェニルアセトアルドキシムを経由しマンデロニトリルに変換されることを解明しました(右図参照)。両酵素を用いることで、安価なフェニルアラニンからマンデロニトリルを生産することが可能になります。さらに微生物等に由来するニトリル代謝酵素を組み合わせると多様な有用化合物を酵素的に生産することが可能になるので医薬品や工業製品の安価でクリーンな生産技術への応用が期待されます。

(山口 拓也)



特許出願一覧

出願番号	発明の名称	発明者
2013-032588	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	浅野泰久、松井大亮
2013-033706	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	浅野泰久、松井大亮
2013-033707	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	浅野泰久、安川和志
2013-209828	変異型L-リジンε-酸化酵素および変異型L-リジンε-酸化酵素遺伝子	浅野泰久、松井大亮
2014-041841	L-リジン脱炭酸／酸化酵素およびその応用	磯部公安、浅野泰久、松井大亮
2014-041850	核酸、シトクロムP450、およびマンデロニトリル誘導体の製造方法	浅野泰久、山口拓也
2014-042180	変異型ヒドロキシニトリルリアーゼおよびその製造方法	浅野泰久、川原寛弘
2014-042181	新規(R)-ヒドロキシニトリルリアーゼ	浅野泰久、モハンマド ダダシブール ラクメサリ、石田裕幸
2014-042182	マンデロニトリル酸化酵素	浅野泰久、桑原保正、市来弥生、石田裕幸、山口拓也
PCT/JP2014/053989	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	浅野泰久、松井大亮
PCT/JP2014/053965	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	浅野泰久、松井大亮
PCT/JP2014/054016	変異型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	浅野泰久
PCT/JP2014/054017	α-アミノニトリル化合物の製造方法	浅野泰久、安川和志

主な設備機器

HPLC(高速液体クロマトグラフ)
DNAシーケンサー
大型振盪培養器
多機能マイクロプレートリーダー
高速冷却遠心機
マルチピーズショッカー®
サーマルサイクラー
温度調整機能付紫外可視分光光度計
ガスクロマトグラフ質量分析計
微量タンパク質分注システム
タンパク質計算化学用クラスターシステム
コロニーピッキングシステム など



タンパク質結晶X線立体構造解析システム



四重極飛行時間型質量分析計

第22回酵素工学国際会議(Enzyme Engineering XXII)開催報告

2013年9月22日(日)～26日(木)に富山国際会議場にて第22回酵素工学国際会議(Enzyme Engineering XXII)が、開催されました。酵素工学国際会議は、Engineering Conferences International(ECI)が主催する国際会議の中でも歴史が古く、世界中から多くの酵素工学関連研究者が参加する権威ある会議の1つです。今回の大会には、26か国から283名(日本137名、海外146名)の参加があり、口頭発表が87件、ポスター発表が133件と大盛会となりました。

本会議で浅野研究総括はThe 2013 Enzyme Engineering Awardを受賞しました。この賞は、酵素工学分野において特に優れた成果を上げた研究者に対して、2年ごとに開催される本会議において与えられるものです。さらに安川和志研究員がPoster Competition Honorable Mentionに選ばれました。

ERATO浅野酵素活性分子プロジェクトでは、浅野研究総括が大会長を務めたほか、国際的に著名な多数の研究者を講演者として招聘しました。世界の研究者と最先端の成果を報告・共有・議論することを目的として、ERATO Asano Active Enzyme Molecule Project Special Sessionを設けて14題の講演を行いました。また、ERATO Asano Active Enzyme Molecule Project invited speakerとして11名の講演者を招聘しました。セッション中は、多彩な講演、積極的な質疑応答、熱のこもった議論が展開され、近い将来の酵素による技術革新を予感させる会議となりました。



左:安川研究員、右:浅野研究総括



Active Enzyme Molecule 2014 開催のお知らせ

2014年酵素活性分子シンポジウム

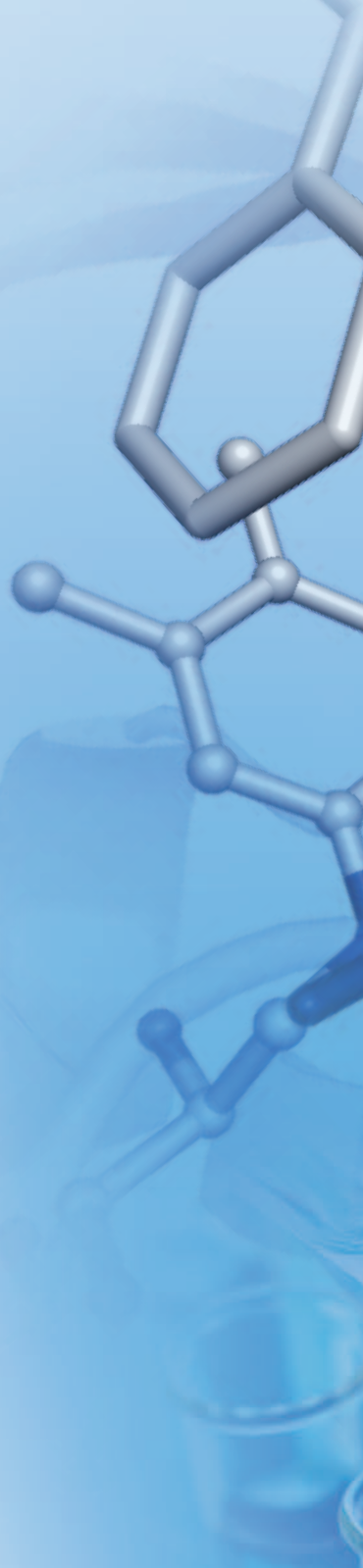
開催期日 2014年12月17日(水)～12月19日(金)
開催場所 富山国際会議場(富山県富山市大手町1-2)

本シンポジウムは、酵化学、および酵素工学の更なる発展を目指し、ERATO浅野酵素活性分子プロジェクト、酵素工学研究会、生体触媒化学研究会が共同で開催する国際会議です。本シンポジウムでは、国内外の研究者が結集し、既存の学術分野だけでなく、異分野の融合により生まれた新しい技術分野、新概念の導入により発展した新しい学術分野などの研究を通して酵素活性分子研究の創出に向けた議論を行います。

基調講演／Nicholas Turner (The University of Manchester, UK)
招待講演／Uwe Bornscheuer (University of Greifswald, Germany)
Harald Gröger (University of Bielefeld, Germany)
Wolfgang Kroutil (University of Graz, Austria)
Stefan Lutz (Emory University, USA)
John Wong (Pfizer, Inc., USA)
Huimin YU (Tsinghua University, China) 他

プログラム／招待講演、成果発表会、口頭発表、ポスター発表など
主催／Active Enzyme Molecule 2014 組織委員会
共催／ERATO浅野酵素活性分子プロジェクト、酵素工学研究会、生体触媒化学研究会

詳細はホームページをご覧ください。 URL: <http://aem2014.org/>



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

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

2014年7月31日発行