

ヤスデに発見した高性能な産業用酵素 ～一寸の虫にも有用な酵素～



浅野 泰久

(富山県立大学 生物工学研究センター 教授)

JST 戦略的創造研究推進事業 ERATO

「ERATO浅野酵素活性分子プロジェクト」(研究総括:浅野泰久)

ヤスデの酵素研究を紹介していただいた 報道機関など



Chemical & Engineering News
Chemistry & Industry

日本経済新聞

朝日新聞

毎日新聞

産経新聞

日経バイオテクONLINE

日経産業新聞

日刊工業新聞

科学新聞

goo ニュース

ニコニコニュース

Infoseekニュース

エキサイトニュース

NHK富山県

チューリップテレビ

北日本放送

TBSラジオ森本毅郎・スタンバイ!

北海道新聞

東京新聞

中日新聞

大阪日日新聞

茨城新聞

神奈川新聞

富山新聞

北陸中日新聞

北國新聞

福井新聞

中国新聞

四国新聞

西日本新聞

佐賀新聞

長崎新聞

沖縄タイムス

化学工業日報

共同通信

Home > Volume 93 Issue 32 > Science & Technology Concentrates > Millipede Harbors Speedy Catalyst

Volume 93 Issue 32 | p. 49 | Concentrates
 Issue Date: August 17, 2015

Millipede Harbors Speedy Catalyst

Biocatalysis: A millipede enzyme makes valuable chiral building blocks for pharmaceuticals faster than its industrial counterparts

By Sarah Everts

Department: [Science & Technology](#) | Collection: [Critter Chemistry](#)
 News Channels: [Biological SCENE](#), [Organic SCENE](#)
 Keywords: [millipede](#), [hydroxynitrile lyase](#), [nitrile](#)

0 0
 f t
 Email Print

MOST POPULAR

Viewed Commented Shared

[Happy Accident Leads To Faster Synthesis](#)

[After Two Decades Of Trying, Scientists Report First Crystal Structure Of A DNzyme](#)

[A Rechargeable Calcium-Ion Battery](#)

[Periodic Graphics: The Chemistry Of Lip Balms](#)

[Seventh Row Of The Periodic Table Is Now Complete With Addition Of Four Elements](#)

Science & Technology Concentrates

[Two Amino Acids Are Enough For Making Active Proteins](#)

[Cutting Down On The Ruthenium In ROMP](#)

[Decoding *H. Pylori*'s Gut-Wrenching Grip](#)

[Quickie Method For High-Quality Graphene](#)

[Hydrogel Targets Inflammatory Bowel Disease](#)

[Millipede Harbors Speedy Catalyst](#)

[Organic Reducing Agent Sets New Record](#)

[Lipophilic Drugs Delivered To The Brain Via Dendrimers](#)

[Enterobacterial Antigen Analogs Synthesized](#)

[Electron-Transfer Boost For Solar Cells](#)

[Iron-Binding Protein Transports Actinides Into Cells](#)

[Buckyballs Induce Magnetism In Copper And Manganese](#)

[All Concentrates](#)

Stinky millipedes that swarm into houses at night in Japan may hold the key to speedy synthesis of chiral molecules useful for making pharmaceuticals, agrochemicals, and other chemical products. A team of researchers led by **Yasuhisa Asano** of Toyama Prefectural University found that *Chamberlinius hualienensis*, a millipede originally from Taiwan that invaded Japan in the 1980s, produces an enzyme called hydroxynitrile lyase that's much faster at producing enantiomerically pure

[+]Enlarge



This invasive millipede has an enzyme that could be used to produce fine chemicals and pharmaceuticals.

Credit: Courtesy of Yasuhisa Asano

(*R*)-mandelonitrile than versions of the catalytic protein used in industry (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2015, DOI: [10.1073/pnas.1508311112](#)). In millipedes, the enzyme produces smelly hydrogen cyanide from cyanohydrins to serve as a chemical weapon. But, Asano says, industrial chemists run the enzymatic reaction in reverse to make cyanohydrins to produce bulk chemicals, such as acrylamide, as well as drugs, such as clopidogrel, a platelet aggregation inhibitor. Researchers have studied hydroxynitrile lyases for about a century, typically sourcing them from bacteria and plants. The millipede enzyme is "by far the fastest" hydroxynitrile lyase reported to date, comments **Anton Glieder**, a researcher at Graz University of Technology, in Austria. Additionally, the highly specific production of (*R*)-mandelonitrile—with 99% enantiomeric excess—is "really astonishing," he says. Industrial researchers will certainly want to consider the

millipede enzyme. Glieder adds,

酵素とは？

- 酵素はたんぱく質である

20種類のアミノ酸がつながったものが折りたたまれた構造

- 生きている細胞が作る機能を持つ

生体内外各所に存在

- 全ての生物の生命活動に必須

例えば、消化酵素は肉や油などの食物を体内で分解し、吸収できる大きさの単位にする

- 酵素は触媒である

化学反応の速度を速くする効果がある

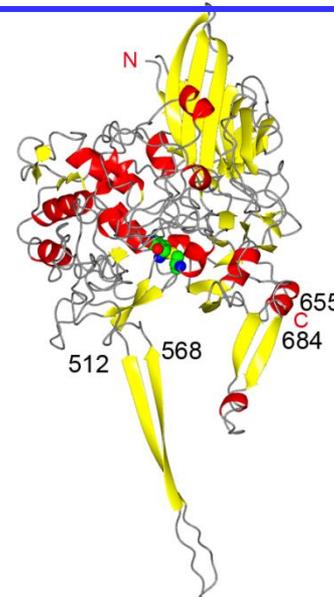
酵素の産業利用



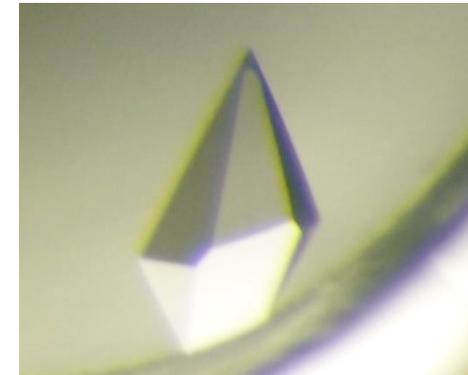
イノシン酸(うまみ成分)生産
(タイ味の素のパンフレットより抜粋)



フェニルケトン尿症
検査用酵素キット



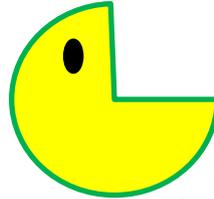
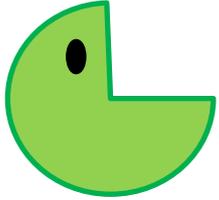
酵素の立体構造
(リシンε酸化酵素)



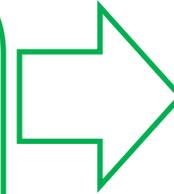
酵素の結晶

酵素の物質生産への利用

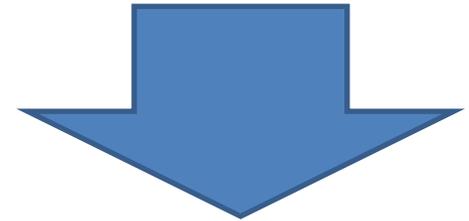
自然界に存在する酵素



遺伝子工学で改良した酵素



産業へ利用



環境にやさしい生産方法

優れた特徴

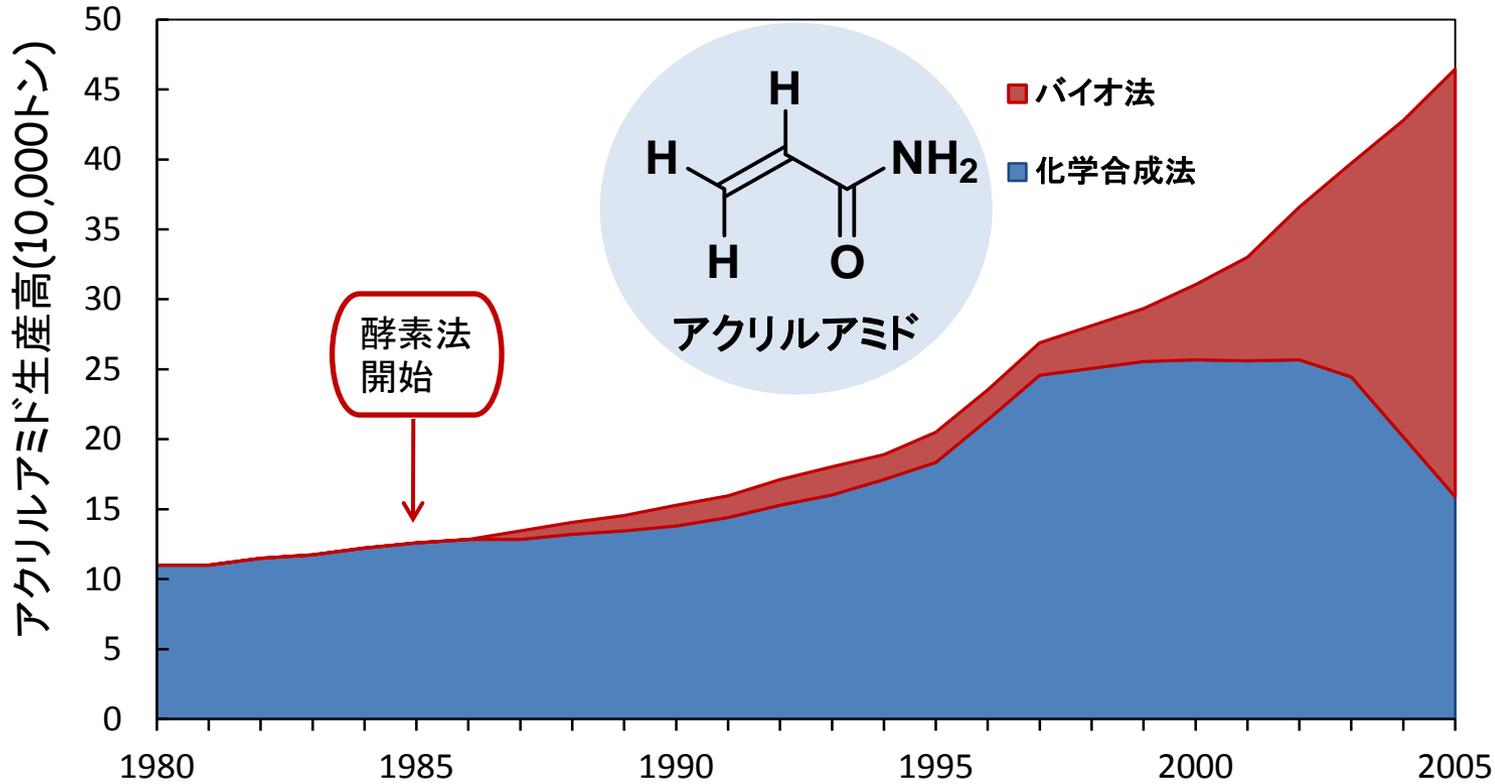
- ・穏やかな環境(温度、pH等)で反応を触媒
- ・目的外の反応が起こりにくい
- ・有害物質の排出が少ない

いくつかの化学物質の生産で実用化されているがまだ数は少ない



実用性が高い高性能な酵素を開発することにより、産業に貢献する

酵素を用いるアクリルアミド合成



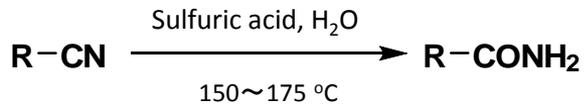
~600kt
2015年

化学触媒法

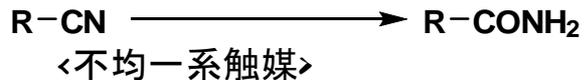
年

酵素法

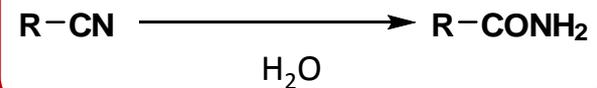
<硫酸法>



<触媒法>



ニトリルヒドラーターゼ



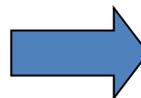
尾高ら、現在化学, **458 (5)**, 51 (2009)



生誕



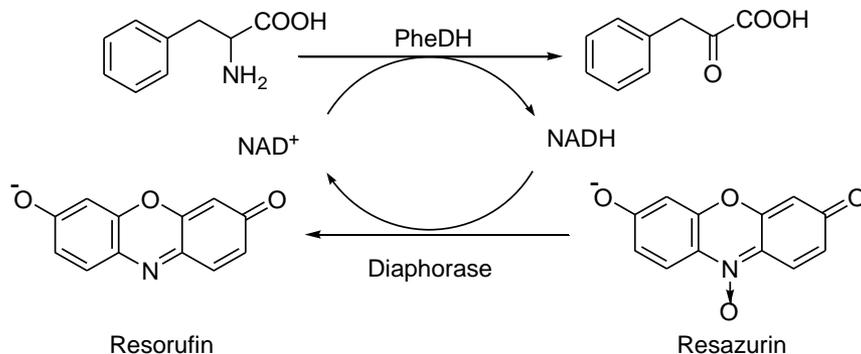
4～7日の新生児より血液を採取し、乾燥血液ろ紙とする。



都道府県の試験研究機関に送付



フェニルアラニン脱水素酵素を素子とするPKU検出キット



蛍光色素を用いるL-Pheの検出

- 浅野らが開発した、*Bacillus badius* 由来のフェニルアラニン脱水素酵素を用いるフェニルケトン尿症(PKU)の検出キットは、1992年に厚生労働省に認可を受け、札幌IDL社により実用化された。
- 現在までに、約5百万人(新生児の30%)がこの方法で検査を受け、約80名のフェニルケトン尿症児が検出された。



浅野酵素活性分子プロジェクト (2011.10～2017.03)

酵素による物質生産およびアミノ酸定量の実用化

ヤスデからの酵素

組換えたんぱく質
可溶性発現技術

酵素工学
グループ

酵素活性分子

新規酵素遺伝子
資源探索

生物
資源探索
グループ

酵素による物質生産
酵素的結晶変換

生物
有機化学
グループ

地球上の生物種数

植物界 5%
50万種

全生物種数1200万種



- 動物界
 - 植物界
 - クロミスタ
 - 真菌
 - 原生生物
 - 真正細菌
 - 古細菌
- 94%

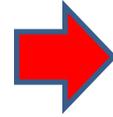
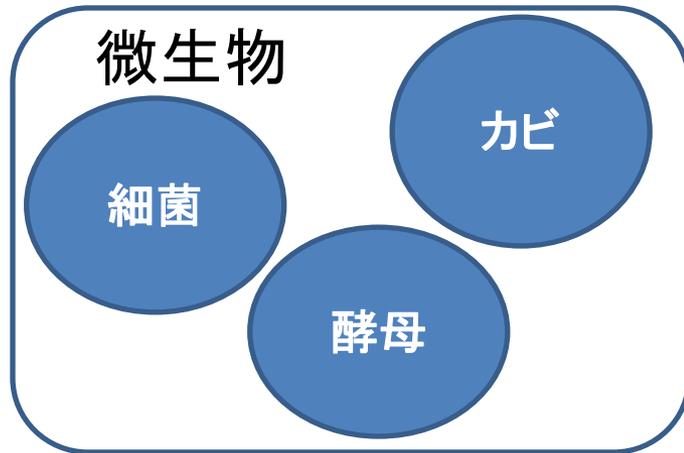
C. Mora, *et al.*, *PLoS Biol.*, 9, e1001127 (2011).

植物と動物は、地球上で多様な種が存在する。

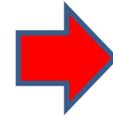
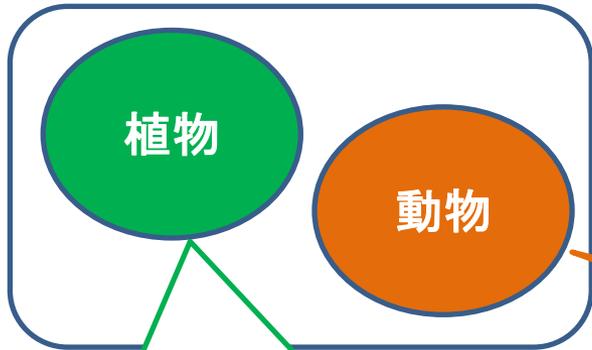


産業用酵素の探索対象として膨大な遺伝子資源

産業用酵素の探索



- 主な探索対象。
- 培養による生産や遺伝子組換えが比較的容易。
- 実用例も多い。



- 器官、臓器から抽出。
- 大量生産が難しい。
- 遺伝子組換えによる酵素生産は比較的困難。

ヒドロキシニトリルリアーゼなどの探索で、我々が世界を先導している。

探索対象になっていない。

遺伝子組換え技術の向上により植物や動物由来酵素も大量生産が可能に→動・植物を探索対象とする時!

(昭和の!?!山) 周辺の植物

- 松、杉、桐、柿、梨、棗、竹、笹、五月、紅葉、椿、ウメ、かりん、びわ、ざくろ、グミ、くるみ、モクレン、百日紅、ナンテン、紫陽花、山椒、つる
- ねぎ、サトイモ、なすび、きゅうり、大根、ホウレンソウ、ジャガイモ、サツマイモ、トウモロコシ、紫蘇、イネ、みょうが、スイカ、ウリ、カボチャ、枝豆、チューリップ、ヒヤシンス、サボテン、菖蒲、サクラ、サクラambo、いちじく、あけび、ほおずき、
- ひょうたん、へちま、藤、シロツメクサ(4葉のクローバー)、福寿草、水仙、連翹、菱、つくし、鳳仙花、リュウノヒゲ、オオバコ、ドクダミ、カラスウリ、シダ、ススキ、杉苔、ホコリタケ

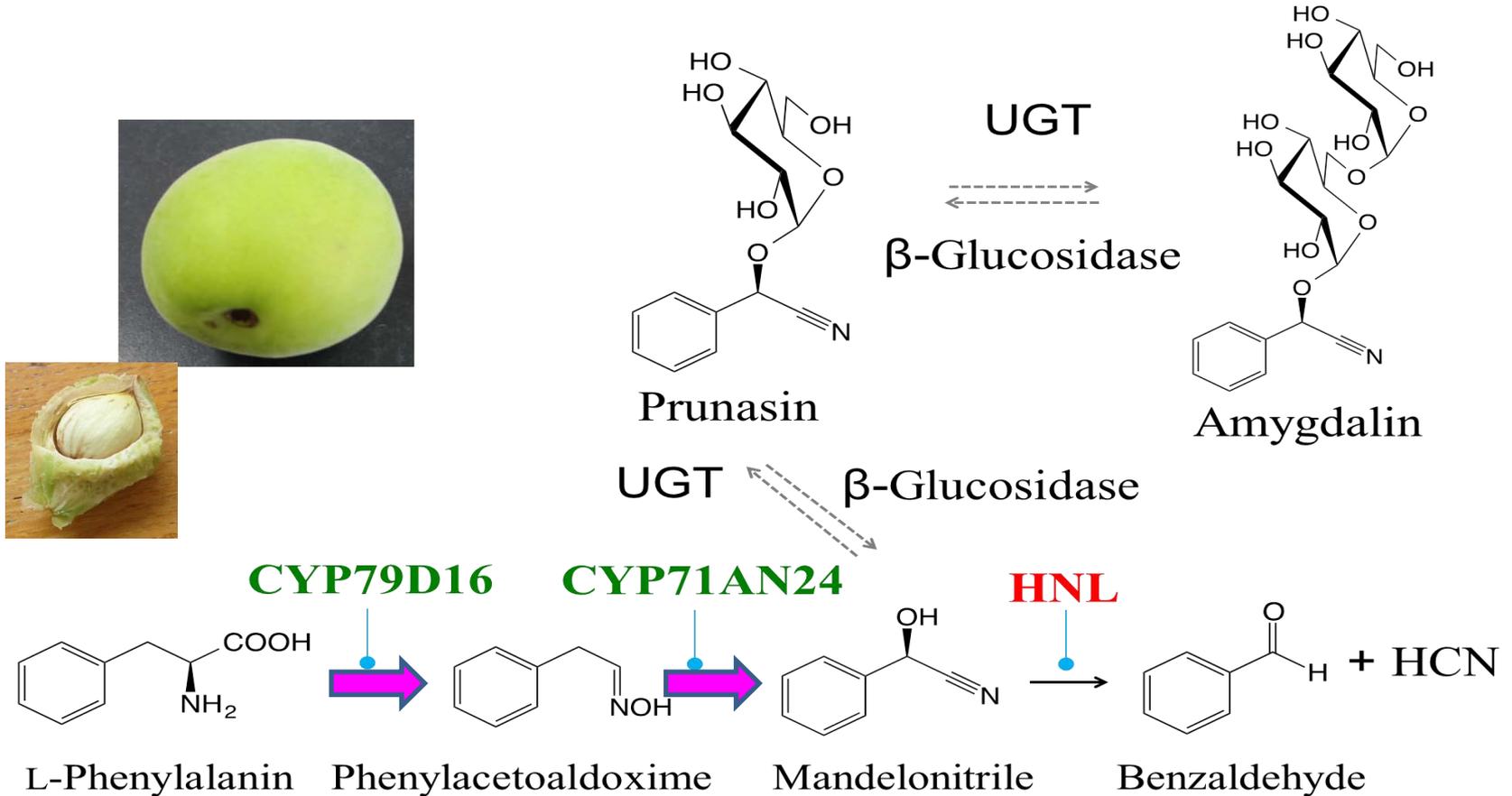
(昭和の!?!山) 周辺の動物

- 犬、犬の埋葬、猫、うさぎ、やぎ、にわとり、にわたりの卵、アヒル、伝書鳩、郭公、百舌鳥、雀、カラス、鷺、
- カラス貝、タニシ、鯉、なまず、フナ、メダカ、金魚、ザリガニ、オタマジャクシ、ウシガエル、
- ウミウシ、磯きんちゃく、ウニ、フジツボ、ハマグリ、ベラ(魚)、ほたるいか、
- ネズミ、青ガエル、マムシ、青大将、蛇の皮、カメ、蜘蛛、女郎蜘蛛、ムカデ、ヤスデ、尺取虫、ヒル、ヤモリ、イモリ、
- ボウフラ、蚊、ウジ、蠅、ノミ、蚊トンボ、アブ、あしなが蜂、ミツバチ、蜂の巣、蜂の子(さなぎ)、アブラゼミ、ツクツクボウシ、ヒグラシ、モンシロ蝶、アゲハ蝶、蛾、ツバメ蛾、カミキリ、カマキリ、オサムシ、アリ、アリ地獄、ミミズ、ダンゴ虫、青虫、シナンタロウ、カナブン、クワガタ、カブトムシ、蛍、蜻蛉、フンコロガシ、黄金虫、テントウムシ、赤トンボ、ギンヤンマ、オニヤンマ、ゲンゴロウ、ミズスマシ



パッションフルーツ（食用、シアン産生植物）
（タイ、ロイヤルプロジェクト農園、チェンマイ近郊、
2015年8月27日）

ウメのニトリルおよびその配糖体の生成に関する酵素

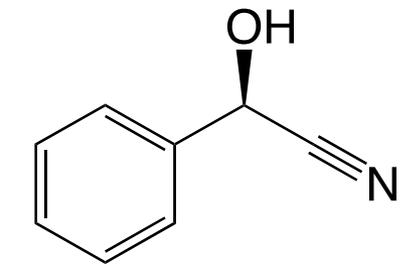


Plant Molecular Biology: 86(1):215-223,2014
 特願2014-041850

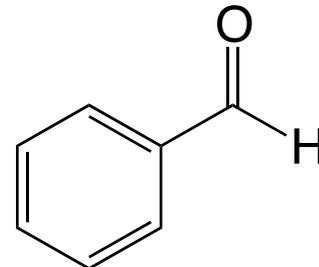
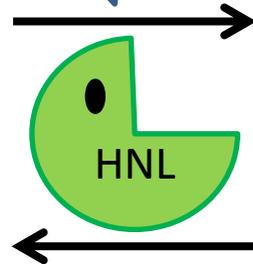
ヒドロキシニトリルリナーゼ

自然界でヒドロキシニトリルリナーゼが触媒する脱離反応

- ・主に植物に発見して来た。
- ・シアノヒドリンを分解して青酸を作る反応を触媒する。
- ・反応条件により逆反応も触媒するため、シアノヒドリン化合物の合成に利用される。



シアノヒドリン化合物
(マンデロニトリル)



アルデヒド化合物
(ベンズアルデヒド)



青酸

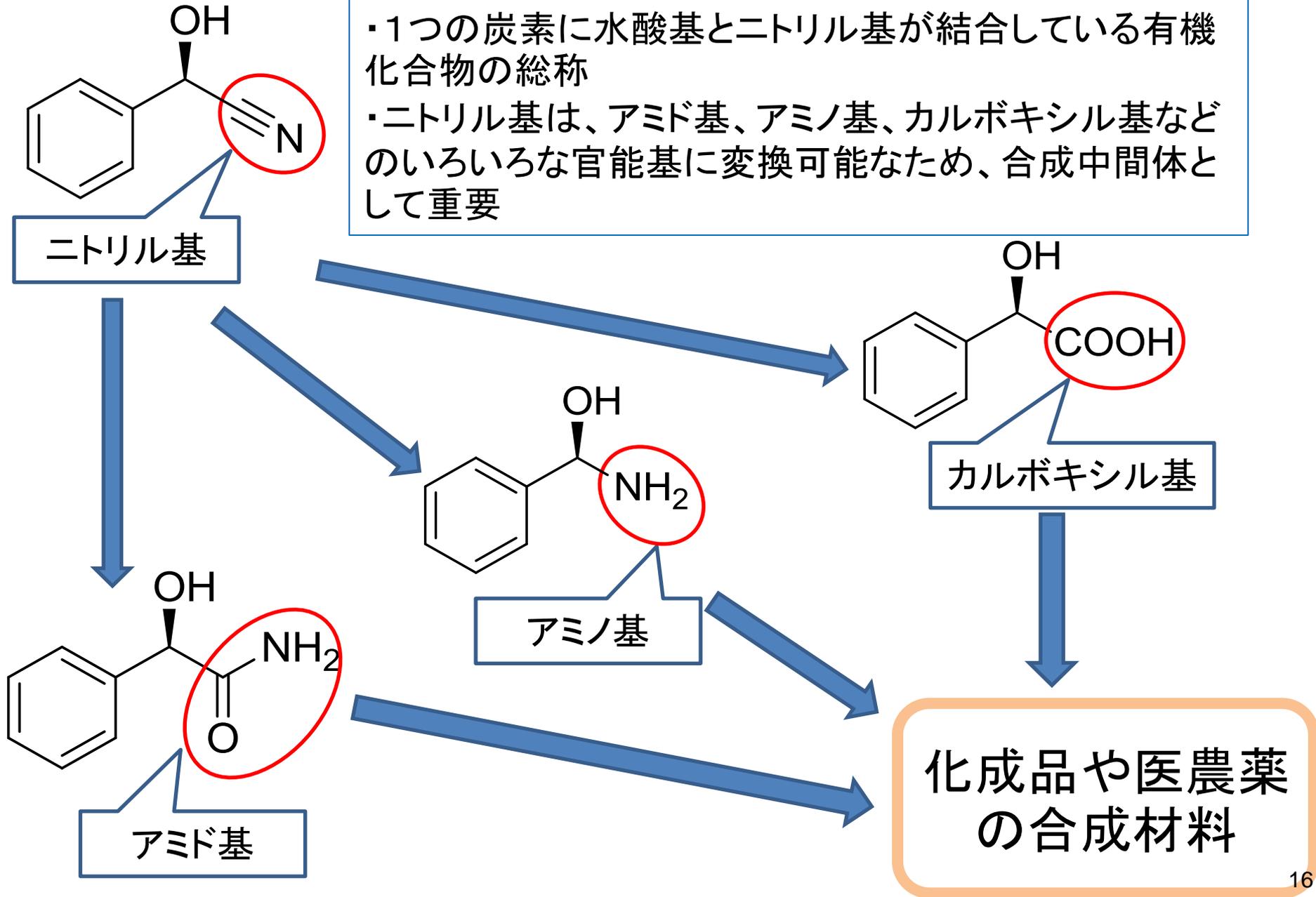
強い毒性で外敵から身を守る。

さまざまな医農薬の原料、合成中間体として需要がある。

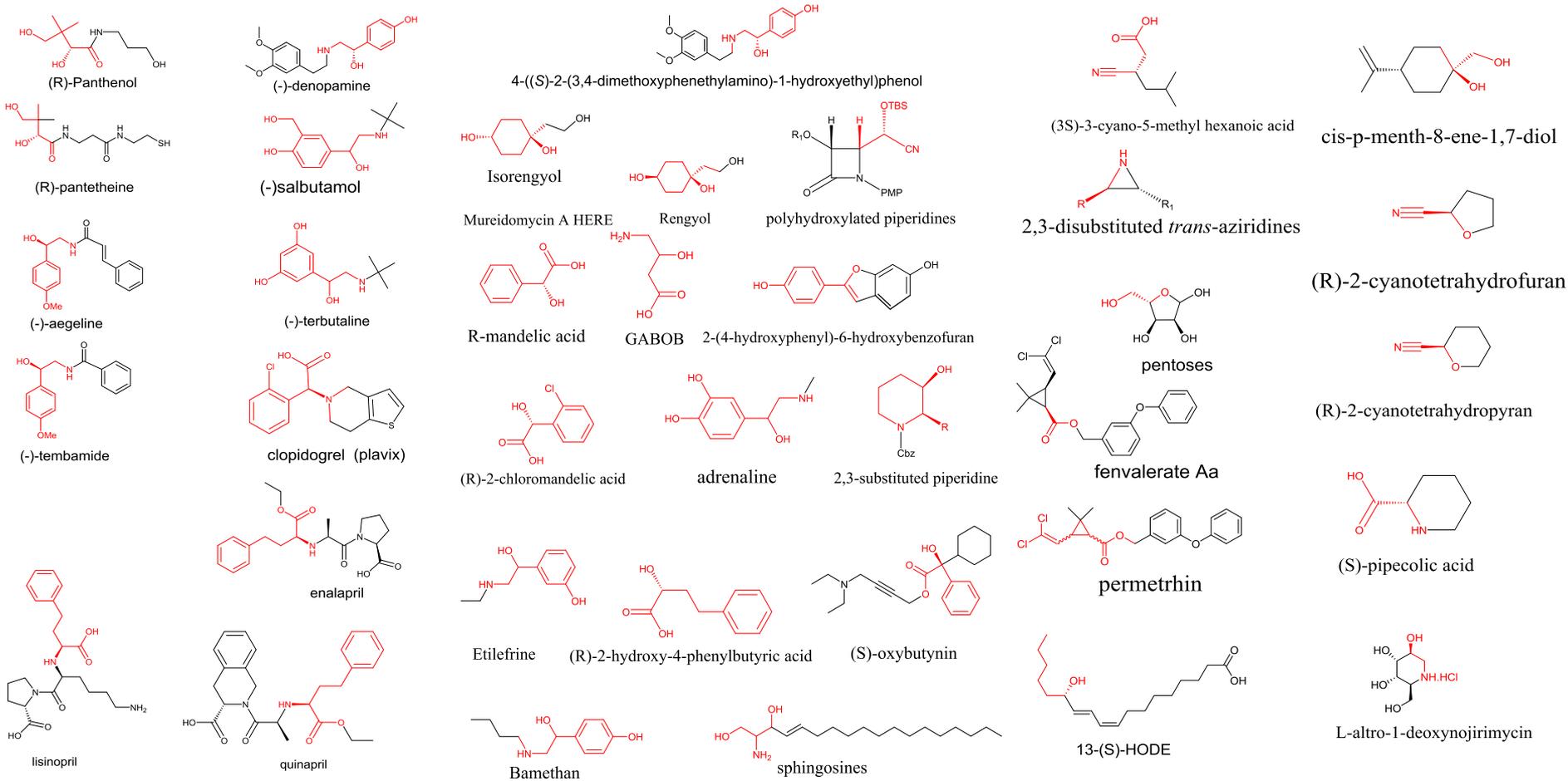
産業的に有用な化合物を生産する付加反応

シアノヒドリン化合物

- ・1つの炭素に水酸基とニトリル基が結合している有機化合物の総称
- ・ニトリル基は、アミド基、アミノ基、カルボキシル基などのいろいろな官能基に変換可能なため、合成中間体として重要



ヒドロキシニトリルリアーゼを用いて合成される医薬・化学品



赤で示した部分構造がシアノヒドリン由来

ヤンバルトサカヤスデ



ヤンバルトサカヤスデは、近年、台湾から渡り、急速に生息地を広げつつある外来種。2015年には静岡でも大発生

ヤスデとは？

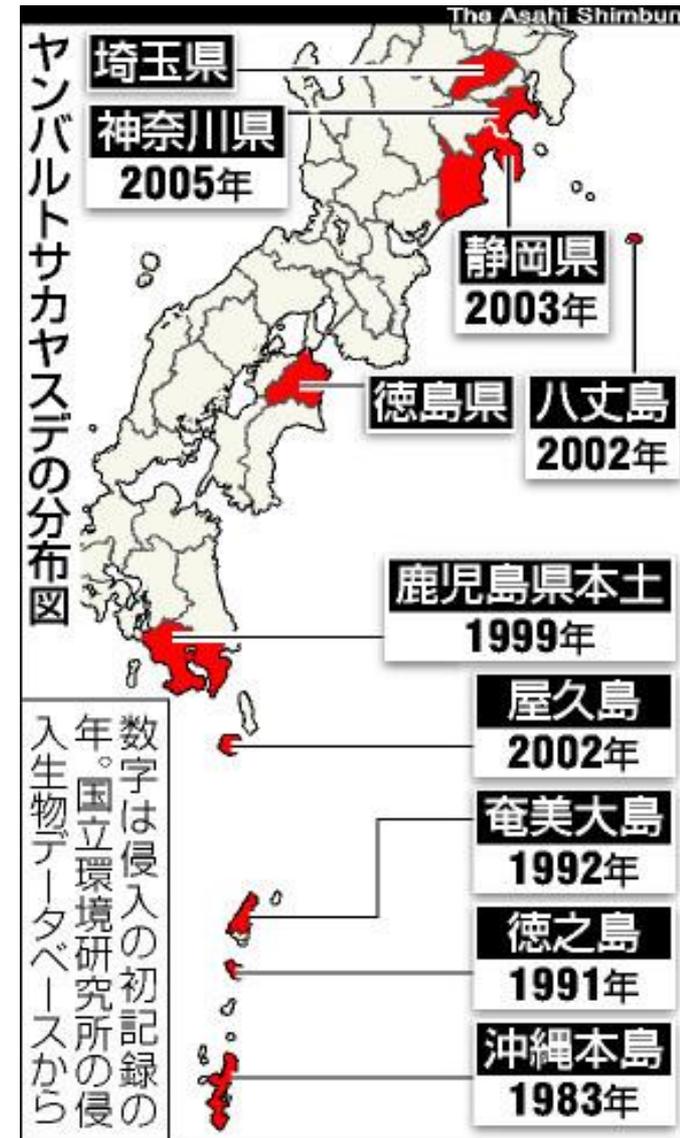
- ・ムカデと同じ節足動物の多足類。
- ・世界中で12,000種が存在すると言われている。
- ・もともと起源が古い陸生動物。
- ・4億2千年前の地層から化石が発見されているが、太古の姿は謎に包まれている。
- ・**青酸ガス**などに由来する悪臭を発する。
- ・自然界では、枯れ葉などを分解する役割を担う。
- ・大量発生地では、道路や線路を埋め尽くすようにヤスデが移動し、体液が原因で車輪が滑り電車が止まることもある。

台湾原産ヤスデ (*Chamberlinius hualienensis*) の侵入



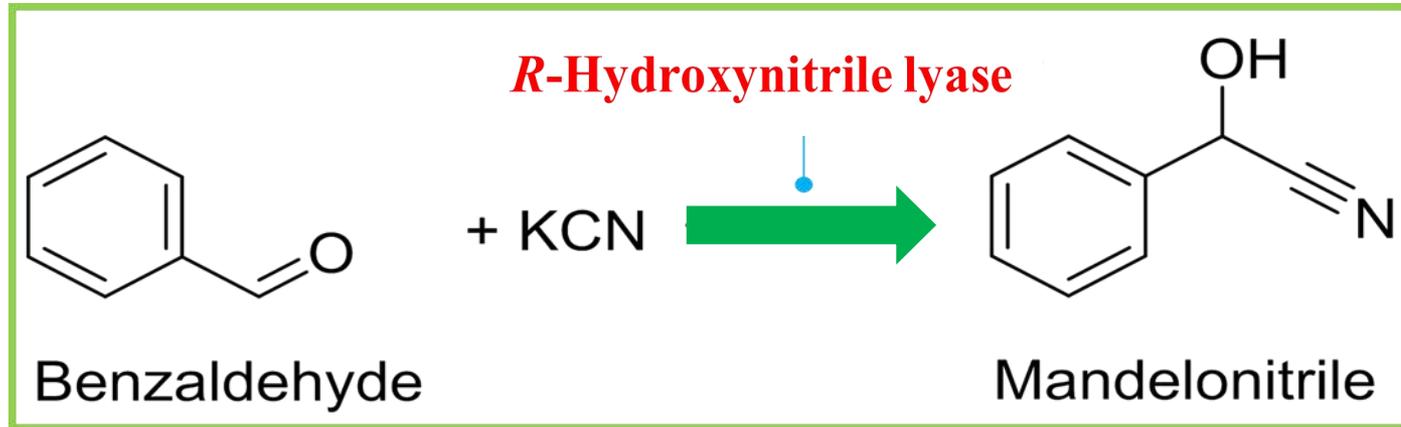
ヤンバルトサカヤスデ
C. hualienensis

The millipede invaded Japan
from Taiwan in 1983





節足動物からの新奇酵素の発見



シアノヒドリン化合物の合成に用いられるヒドロキシニトリルリアーゼは、植物と細菌から発見されていたが動物からは報告されていなかった。

本プロジェクトでは、ヤンバルトサカヤスデにヒドロキシニトリルリアーゼ活性を持つ酵素が存在することを見出し、酵素を単一に精製し、遺伝子構造も解明した。その結果、本酵素が現在まで報告されていない新奇酵素であることを明らかにした。本酵素は、タンパク質量あたりの比活性が非常に高く産業的に有用であると考えられる。

特願2014-042181

ヤンバルトサカヤスデ採取



ヤスデが多いトンネルを毎日通っている女性(南九州2011)

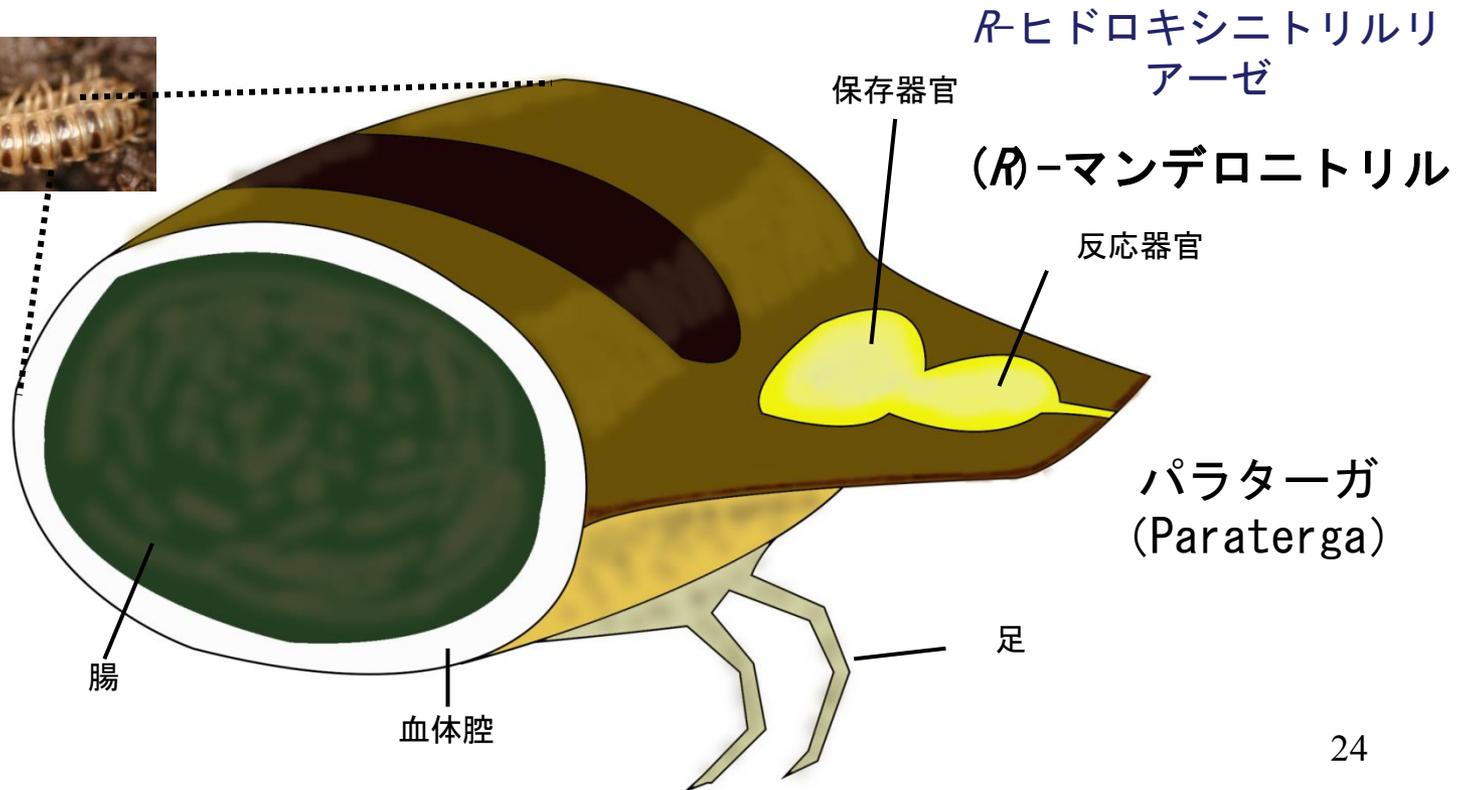
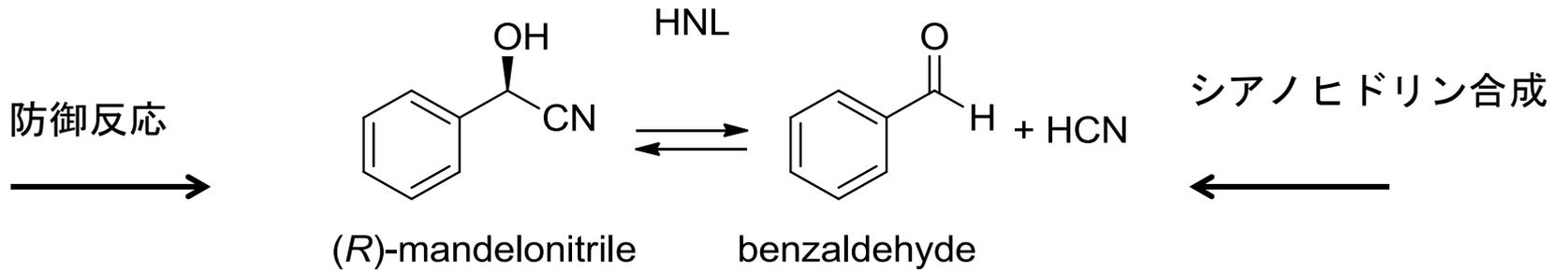


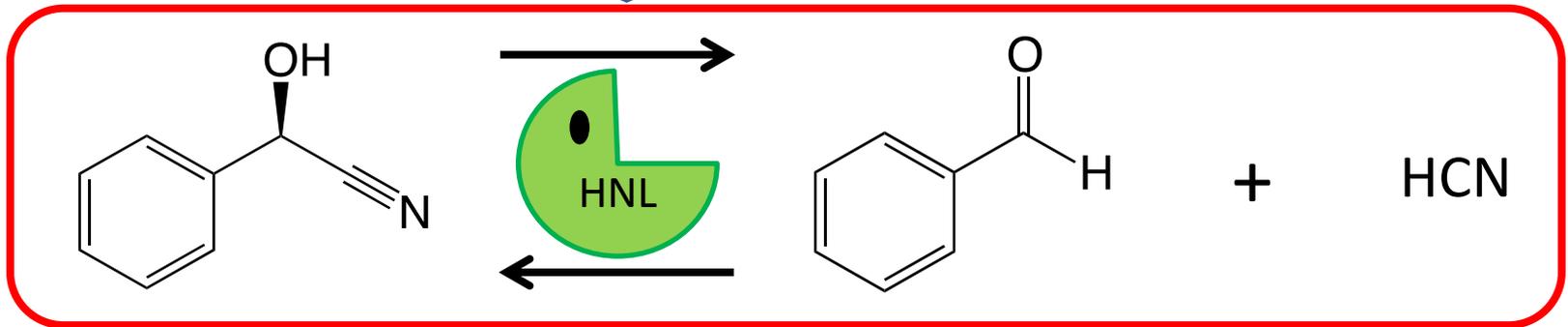
静岡県での大発生(2015)

ヤンバルトサカヤスデの山



ヤンバルトサカヤスデ由来の新しいヒドロキシニトリルリアーゼ

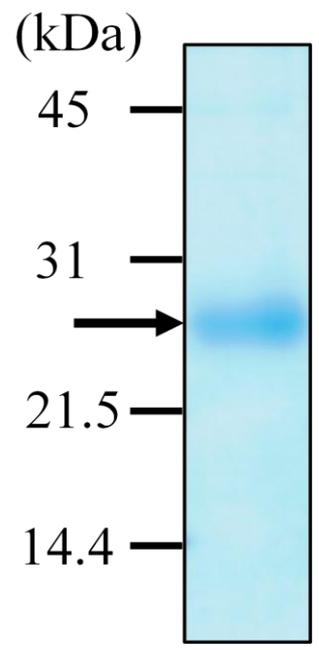
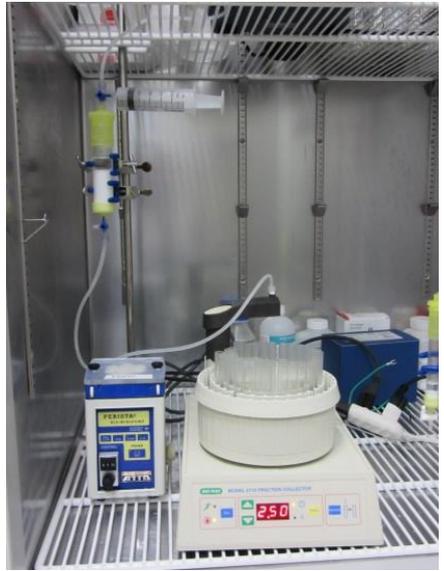
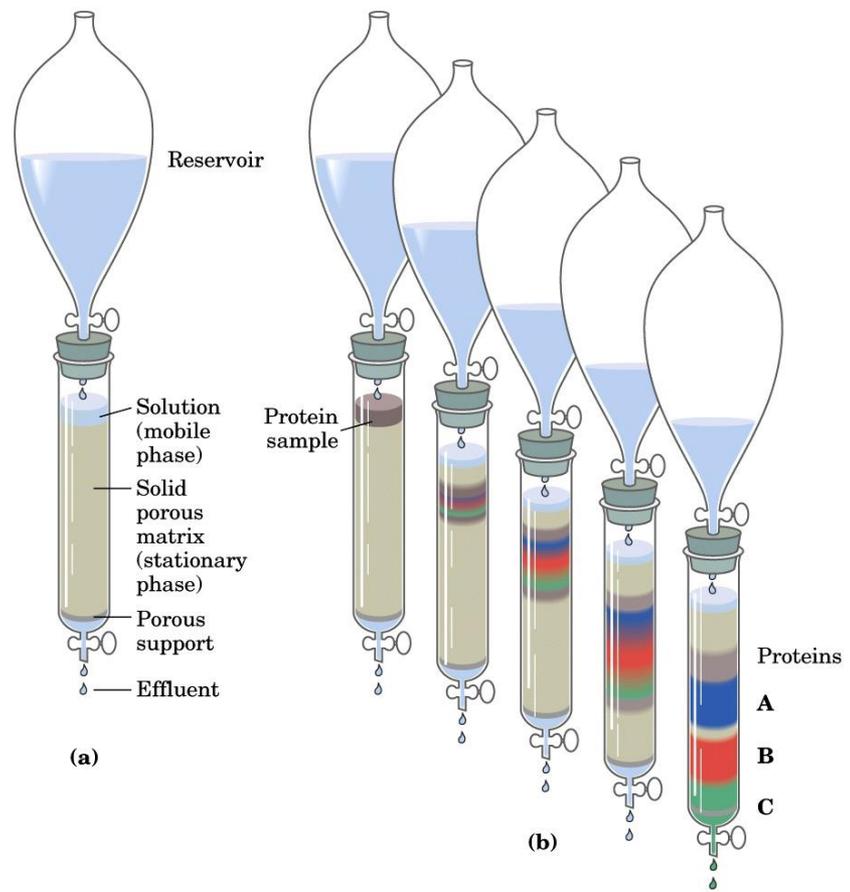




ヤンバルトサカヤスデの抽出液にヒドロキシニトリルリアーゼ活性を確認

酵素の精製

数種類のカラムクロマトグラフィーを用いて純粋な酵素を取り出す。



合計5回の
カラムクロマトグラフィー
によりHNLを精製



1キログラムのヤンバルトサカヤステから0.12ミリグラムの純粋なHNLを取り出すことに成功

引用元: Lehninger Principles of Biochemistry

ヤンバルトサカヤスデと植物由来のヒドロキシニトリルリアーゼの比較

<i>R</i> -selective HNL	<i>Ch</i> HNL	<i>Pa</i> HNL	<i>Pm</i> HNL	<i>Ej</i> HNL
由来生物	ヤンバルトサカヤスデ	アーモンド	ウメ	ビワ
分子量(サブユニット)	47.3 (25) 二量体	72 単量体	62-97; 単量体	72 単量体
最適pH pH安定性	5.8 2.5-10	25-6; 3-11	4.5 3-9	5.5 3-9
最適温度 温度安定性 (°C)	35 65 (1h >90%) 70 (1h >60%) 75 (1h ≈ 20%)	25 65(1h>80%) 75 (0.5h=0)	25-35; 0-60で安定	40 0-60で安定
K_m 値 (mM) *ミカエリス定数(値が小さいほど酵素と基質の親和性が高い)	3.2 Benz. 5.5 Rac-Man	0.15 Benz. 0.3, 0.6 Man	5.3 Benz.	0.16 Man
活性(比活性、U/mg) *マンデロニトリル合成	8180	1450	220	31.5

既存の植物由来HNLと比べて活性が高く、高温でも安定

ヤンバルトサカヤスデ由来HNL

既存の植物由来HNLと比べて活性が高く、高温でも安定



- ・少ない酵素量で反応を行える。
- ・酵素が安定である(壊れにくい)ため、繰り返し使用できる。
- ・同じ酵素量を用いた場合、反応速度が速い。
- ・高い光学純度のシアノヒドリンが得られる。*



低コストで高品質のシアノヒドリン化合物を生産できる

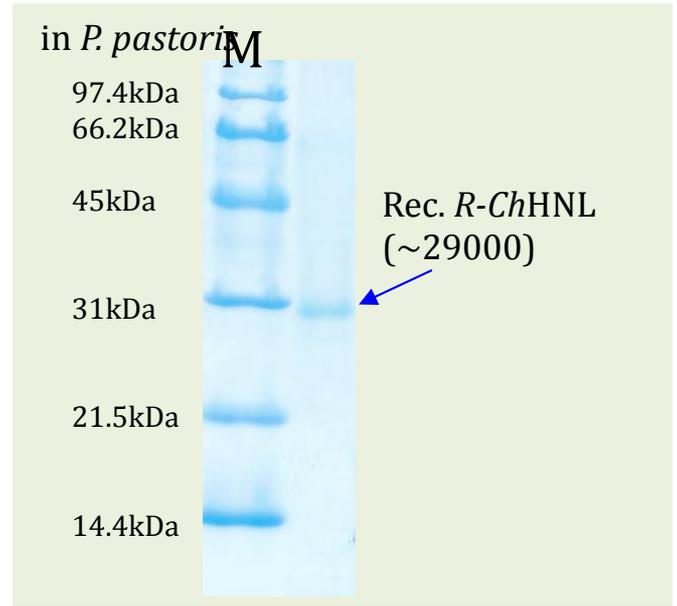
* 光学純度:シアノヒドリン化合物の中には、鏡写しの2つの構造(鏡像異性体)を持つ化合物がある。今回発見したHNLは、このうち、一方(R体)のみを合成することができる。

ヤンバルトサカヤスデ由来HNLのアミノ酸配列と遺伝子配列

CATCAGTTGA	TACCAACACA	TCAAACCTTAC	CAAGCTTAGT	TTACGATTTT	AATCATGTTG	6
					M L	2
AGTTCAGTAG	TAGTAACAGT	AATATGGTCG	CTTTTCTGCA	ATTCTCTTGT	TGATAGTCTG	66
<u>S S L V V T V I W S L F C N S L V D S L</u>						22
ACTTGTGATC	AACTTCCCAA	AGCTGCTATT	AATCCCATTC	AGGAATTTAT	TGATTCAAAT	126
<u>T C D Q L P K A A I N P I Q E F I D S N</u>						42
CCTTTGGAAT	TCGAGTACGT	TCTGACTGAA	ACCTTCGAAT	GCACCACTCG	AATTTATGTG	186
P L E F E Y V L T E T F E C T T R I Y V						62
CAACCTGCTC	GCTGGTCCAC	TACCAAAGCC	CCAACTGCAT	TGGACATTAA	AGGAACTCAA	246
Q P A R W S T T K A P T A L D I K G T Q						82
ATTATGGCTT	ACGATTTTCGT	CGGTGGTCCT	GAAACTCAG	CTCACCTCAA	CGAATGCCAT	306
I M A Y D F V G G P E N S A H L N E C H						102
ACAGGAGATA	AACAAGTTTG	GTA CTTTCAA	TATACCAATC	TGTTAACAGA	CAATGGAAGT	366
T G D K Q V W Y F Q Y T N L L T D N G S						122
TCCTATGCG	CTTACAGATG	CAACGGCACC	GAAATAATTG	AGTACAAATG	CGCTTCAAAC	426
S Y C A Y R C N G T E I I E Y K C A S N						142
AATAACGGAA	CTGATCCACT	CCAACACCAA	GCGATGGAAG	TAGCAAAAAC	AGTTCCAAAC	486
N N G T D P L Q H Q A M E V A K T V P N						162
GGCGACAAGA	TTCATTATGC	CAAATCAAAT	TGCCCCGAAA	CCCACGGTTG	CTTTGCTTTT	546
G D K I H Y A K <u>S N C P E T H G C F A F</u>						182
TACTAAATTT	AAATATTCAT	ATAACAAGAA	ATTTGCTTTA	CTAAAACAAA	AAACCTTGTT	606
Y *						183
AACACATACT	TATTAAGAAA	TAATGTATAC	ATTATATTTA	CTAATTGCAC	CTGAACTTTA	666
AAGGGATTAT	TAAAGTTTGA	CCTGCAAAAAG	CAAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	726
AAA						729

これまで知られている
どのアミノ酸配列とも
似ていない！

遺伝子組換え酵母による発現
も成功



ヤンバルトサカヤスデ
(*Chamberlinius
hualienensis*)
ChuaHNL

LTCDQLPKAA INPIQEFIDS NPLEFEYVLT ETFECTTRIY VQPARWSTTK APTALDIKGT 60
 QIMAYDFVGG PENSAHLNEC HTGDKQVWYF QYTNLLTDNG SSYCAYRCNG TEIIEYKCAS 120
 NNGTDPLOH QAMEVAKTVP NGDKIHYAKS NCPETHGCFA FY 162

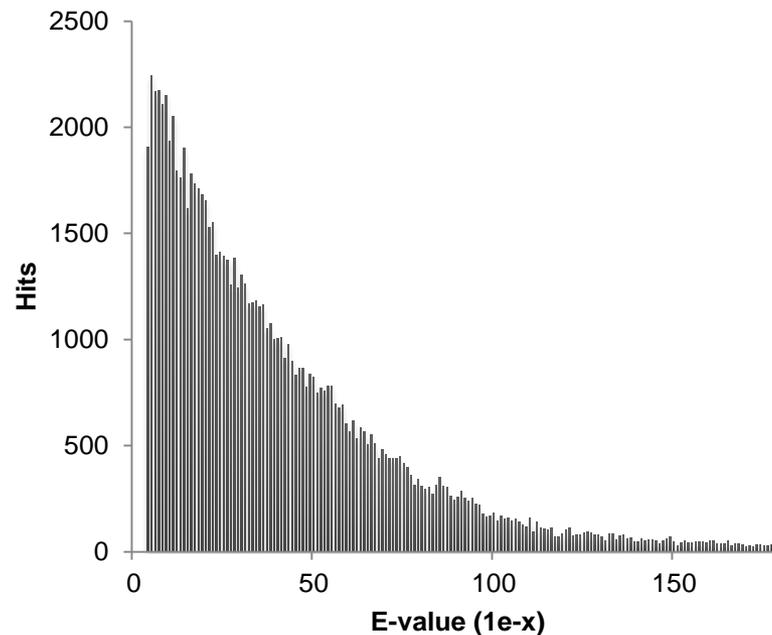
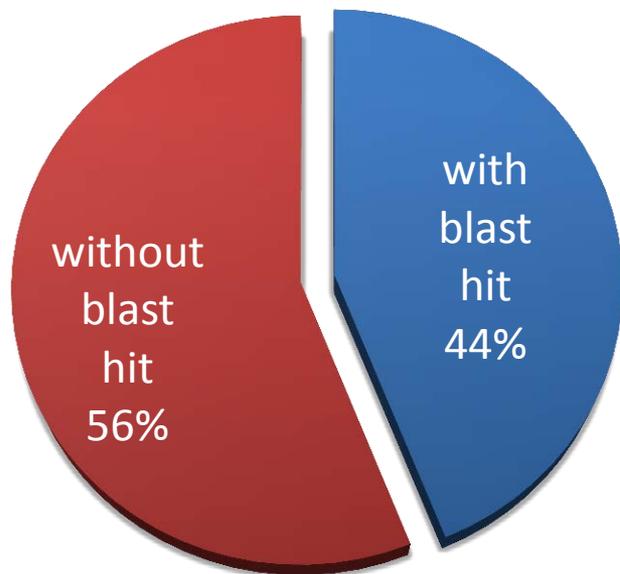
アーモンド
(*Prunus amygdalus*)
(FAD-dependent
oxidoreductase type)

LATTSDHDFS YLSFAYDATD LELEGSYDYV IVGGGTSGCP LAATLSEKYK VLVLERGSLP 60
 TAYPNVLTAD GFVYNLQQED DGKTPVERFV SEDGIDNVRG RVLGGTISIIN AGVYARANTS 120
 IYSASGVDWD MDLVNQTYEW VEDTIVYKPN SQSWQSVTKT AFLEAGVHPN HGFSLDHEEG 180
 TRITGSTFDN KGTRHAADEL LNKGNSSNNLR VGVHASVEKI IFSNAPGLTA TGVIYRDSNG 240
 TPHQAFVRSK GEVIVSAGTI GTPQLLLLSG VGPESYLSSL NIPVVLSPHY VQQLFDNPR 300
 NFINILPPNP IEPTIVTVLG ISNDFYQCSF SSLPFTTPPF GFFPSASYPL PNSTFAHFAS 360
 KVAGPLSYGS LTLKSSSNVR VSPNVKFNYY SNLTDLSHCV SGMKKIGELL STDALKPYKV 420
 EDLPGVEGFN ILGIPLPKDQ TDDAAFETFC RESVASWYH HGGCLVGKVL DGDFRVTGIN 480
 ALRVVDGSTF PYTPASHPQG FYLMLGRYVG IKILQERSAS DLKILDSLKS AASLVL 536

キャッサバ
(*Manihot esculenta*)
(α/β -hydrolase type)

MVTAHFVLIH TICHGAWIWH KLKPALERAG HKVTALDMAA SGIDPRQIEQ INSFDEYSEP 60
 LLTFLEKLPQ GEKVIIVGES CAGLNIAIAA DRYVDKIAAG VFHNSLLPDT VHSPSYTVEK 120
 LLESLPDWRD TEYFTFTNIT GETITTMKLG FVLLRENLF T KCTDGEYELA KMVMRKGS LF 180
 QNVLAQRPKF TEKGYGSIKK VYIWTQDKV FLPDFQRWQI ANYKPKAYQ VQGGDHKLQL 240
 TKTEEV AHIL QEVA DAYA 258

トランスクリプトーム解析における ヤンバルトサカヤスデ由来遺伝子の特殊性



データベースから類似した配列を探すプログラム(blast)で検索しても半数以上の配列がヒットしない

低 ← 相同性 → 高

blastでヒットしてきた配列もその相同性は低い

次世代シーケンサーで明らかにされた遺伝子配列において半数以上がデータベース上で検索されない**未発見の遺伝子**であり、相同性が見られて遺伝子についても非常に低い値を示していた。

ヤンバルトサカヤスデは未発見酵素の宝庫！！

今後の課題、展開

【課題】酵素の大量生産

- すでに遺伝子組換え酵母などでの生産に成功
- 生産性の向上が必要→実用化が可能に

【今後の展開】詳細な構造と反応機構の解明

- 立体構造は解析済、今後発表する予定
- より多くのヤステの探索
- 変異による基質特異性の改変

この研究が及ぼす影響

- 動物を産業用酵素の探索対象とするきっかけとなる。
- 近年の酵素研究は、微生物由来の遺伝子データベースの情報が出発点となっていることが極めて多い。



- データベースに載っていない酵素や遺伝子解析されていない非モデル生物が研究対象から外れている。
- 研究者が節足動物の酵素について想像したことがあまり無い。



- 将来の生物利用の新しい可能性を示した。
- 探索、抽出、精製する手法が新発見のカギとなる！！