

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を利用した イネアントラニル酸合成酵素の機能改変

無細胞生命化学工学研究センター

菅野 拓也

1. はじめに

愛媛大学の遠藤教授により改良されたコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系は核酸やタンパク質の分解酵素の活性が低く、目的タンパク質を安定かつ多量に合成することができる¹⁾。また、コムギ胚芽は植物由来の翻訳系であることから、特に植物遺伝子由来のタンパク質の翻訳・機能解析に適する系である。さらには、PCR技術との組合せにより、多サンプルの合成と解析を効率的かつ迅速に行うことが可能である。本稿では、これらの技術を利用した産業上有用な機能改変酵素の創出について紹介する。

2. トリプトファン合成系とアントラニル酸合成酵素

植物では太陽光エネルギーを利用して合成する炭素化合物の約20%がシキミ酸経路に流れてくると言われており、この経路は解糖系から由来するホスホエノールピルビン酸、ペントースリン酸経路から由来するエリトロース-4-リン酸を出発物質として3種の芳香族アミノ酸トリプトファン、フェニルアラニン、チロシンを合成する。

その生合成経路はシキミ酸経路に由来するコリスミン酸がトリプトファン生合成系の前駆体であるアントラニル酸に変換されることでシキミ酸経路から分岐している。この分岐経路を触媒するのがアントラニル酸合成酵素(AS)であり、 α と β のサブユニットで構成されている。 α サブユニットはコリスミン酸を基質とした主反応を、 β サブユニットはグルタミンのアミノ基転移を触媒し、アントラニル酸を生成する。また、AS活性は最終産物トリプトファンによってフィードバック阻害され、細胞内Trp蓄積量は厳密に制御されている(図1)。

動物はトリプトファンを体内で合成できないため、食物から摂取しなければならない。イネ、トウモロコシ、コムギなどの穀物は、トリプトファンの含有量が非常に少ないため、通常穀物飼料には工業的に製造されたトリプトファンを添加する必要がある。

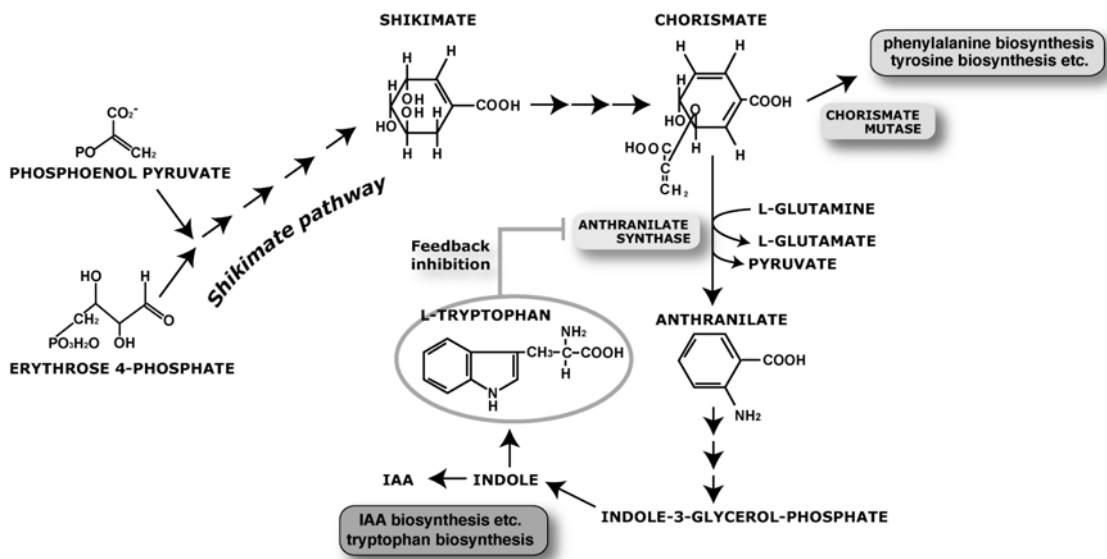


図1 トリプトファン生合成経路

イネにおいて AS α サブユニットは酵素機能的に性質が異なる2つのアイソザイム OASA1 と OASA2 が発現している²⁾。我々は既にフィードバック阻害非感受性に改変した OASA1 遺伝子を形質転換したイネにおいて顕著に Trp が蓄積することを見出している³⁾。一方、OASA1 と比べ高発現かつエリシター刺激に対する誘導性を示す主要アイソザイム OASA2 の酵素利用については進展が乏しかった。本研究では、新たに無細胞タンパク質合成系を導入し、OASA2 のフィードバック阻害と酵素活性が改善された改変型酵素の創出を試みた。

3. 結果・考察

従来のランダムに変異を導入するハイスループット変異導入スクリーニング技術を新たに開発し(図2)⁴⁾、このシステムを用いて OASA2 のトリプトファン結合領域のアミノ酸残基に対して網羅的にアミノ酸点変異を導入し解析を行った。この変異スクリーニングの結果、酵素触媒活性を亢進させる変異、活性を減ずる変異、フィードバック阻害に対し耐性を獲得または感受性を亢進させた変異など多様な新規変異酵素が高効率で得られた(図3左)。このうち、367番目のチロシン残基のアラニン置換(Y367A)により酵素活性が大きく減少するもののトリプトファンに対するフィードバック効果が解消されることを見出した。また、この変異体に酵素活性を向上させる L530D 変異(530番目のロイシン残基をアスパラギン酸残基に置換)を導入することでトリプトファンフィードバック非感受性かつ高活性型の新規改変型酵素(Y367A/L530D)を創出することができた(図3右)⁵⁾。この改変型酵素遺伝子を酵母の変異株に導入した結果、野生型 OASA2 に比べ細胞内の遊離 Trp 含量が約2.5倍に増加することを確認した(図5)。

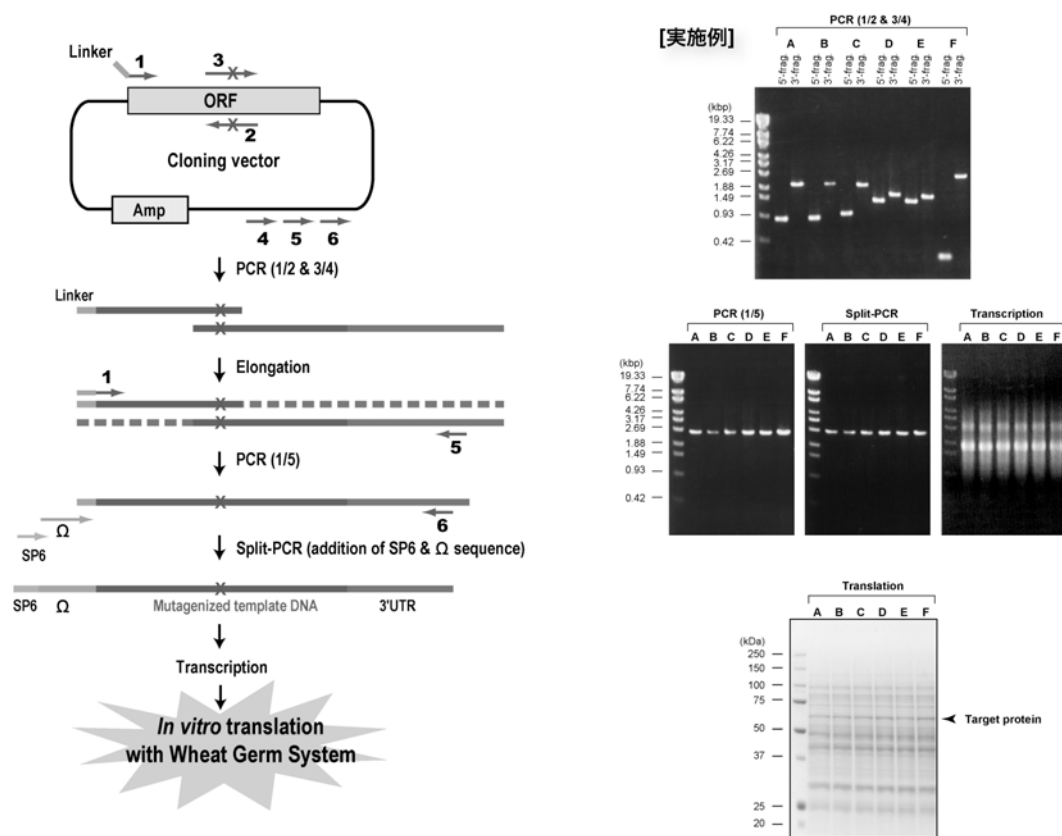
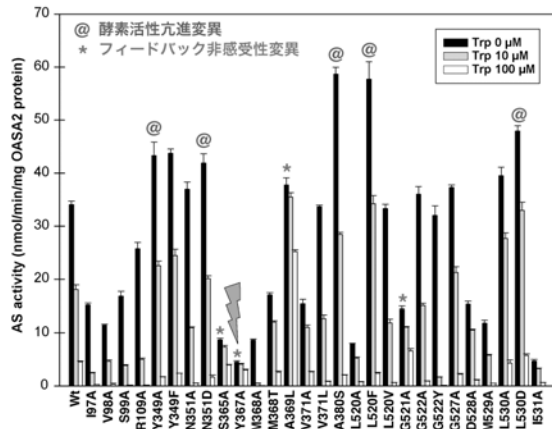


図2 ハイスループット試験管内変異導入解析法

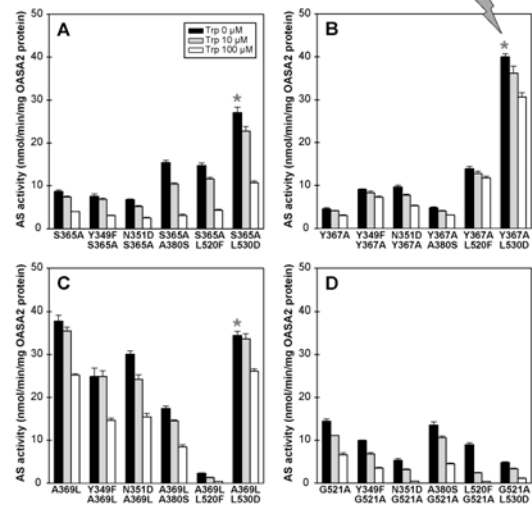
1st trial: AS activity of synthesized OASA2 mutant proteins



The first round of mutation analysis was done for 40 various mutations. An ammonium-dependent AS assay was performed with each single AS α -subunit enzyme with three different concentrations of Trp (0 μ M, 10 μ M and 100 μ M), independently. This mutation-scan revealed several mutation points that affected the enzymatic activity or the Trp-feedback inhibition of the enzyme.

Y367Aは野生型より活性は劣るがTrpフィードバック非感受性

2nd trial: Combination effects of mutations on the enzymatic functions

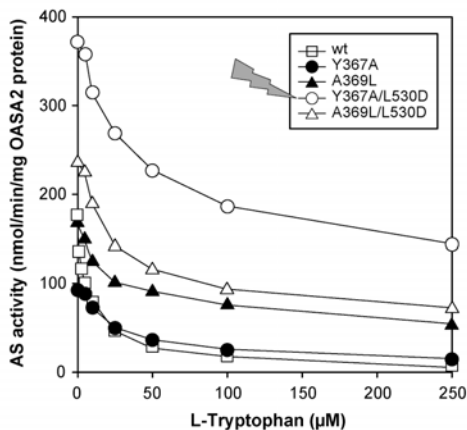


The single-mutation analysis identified four feedback-insensitive mutations. However, except for A369L, they reduced enzyme catalytic activities. Aiming to confer higher catalytic activity to those feedback-insensitive enzymes, we next attempted to add another mutation, which might improve the catalytic activity, to those mutant enzymes.

L530D変異を導入することでTrpフィードバック非感受性を維持しつつAS活性が向上した。

図3 コムギ無細胞系で合成した OASA2 変異体の試験管内活性測定
(左)OASA2 の Trp 結合領域のアミノ酸残基に対して網羅的にアミノ酸点変異を導入し解析した結果
(右)フィードバック非感受性変異体に酵素触媒活性を亢進させる変異を加算的に導入した結果

Analysis of the tryptophan feedback-inhibition of OASA2 derivatives



AS activities of the wild type and mutant OASA2 proteins were analyzed in the presence of several different concentrations of Trp.

Kinetic parameters of glutamine-dependent AS activity of the wild type and mutants of OASA2, reconstituted with OASB1.

OASA2 derivatives	K_m (μ M)	V_{max} ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	k_{cat} (min^{-1})	IC_{50} (μ M)
Wt	42.5 ± 3	215 ± 5	13.5	6.3
Y367A	75.8 ± 7	134 ± 5	8.5	31.6
A369L	43.2 ± 4	206 ± 7	13	74.9
Y367A/L530D	58.2 ± 7	467 ± 22	29.4	101
A369L/L530D	39.2 ± 4	385 ± 15	24.3	58.3

Parameters were determined for the OASA2DN49 wild type protein or its mutant derivatives reconstituted with OASB1 Δ N58, and are means from at least three independent experiments.

精製AS酵素を用いた酵素学的解析からA369L、A369L/L530D、Y367A/L530D変異体は野生型と比べ酵素活性およびTrpフィードバック阻害に対する感受性が改善されていることが確認された。

図4 OASA2 変異体の酵素反応速度

Concentration of the free tryptophan in transformed yeast cells expressing OASA derivatives

In order to confirm and characterize *in vivo* functions of the mutant OASA2 proteins, TRP2 deficient yeast strain was transformed with the GAL4 promoter-driven OASA2-derivative expressing vector plasmid (pYES2, Invitrogen), and analyzed the free tryptophan content in the cells.

Some of the mutant OASA2 transformants obviously accumulated higher level of tryptophan than that in the case of wild type OASA2 transformant. Y367A/L530D expressing yeast strain achieved highest accumulation of free tryptophan in the cell compared with other OASA1- or OASA2-derivatives.

The level of soluble tryptophan in the transformants shows consistent relations to the K_i values of each OASA2-derivatives and the K_i values of OASA1 and OASA1D, 39.7 μ M and 135 μ M, respectively²⁾.

酵素学的パラメーターが最も改善された変異体である Y367A/L530D を導入した酵母が最も遊離トリプトファンを蓄積していた(野生型の2.5倍量)。

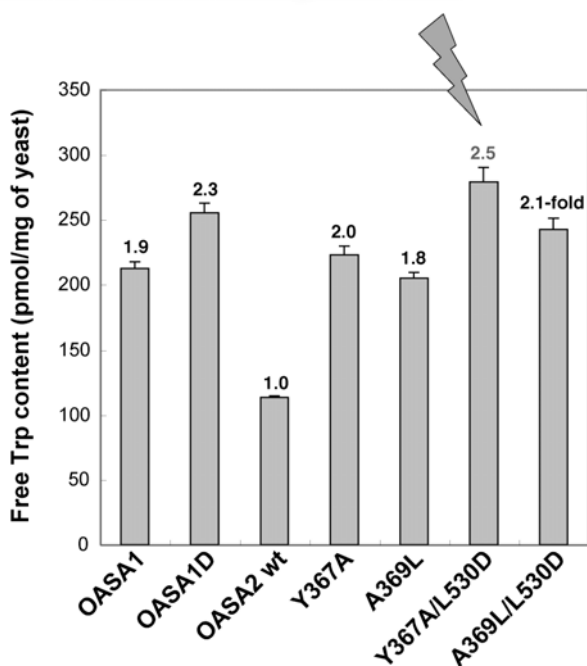


図5 変異型 OASA2 遺伝子を発現させた酵母 TRP2 遺伝子欠損変異株の遊離トリプトファン含量解析

4. まとめ

イネの OASA2 蛋白質を材料として高機能型酵素の創出を試みた結果、2つのパラメーター、すなわち酵素活性とフィードバック阻害感受性を各々独立に改変させた酵素を得、さらに両特徴を統合した複合変異酵素の創出に成功した。この技術は、あらゆる代謝酵素に対し、ハイスループットな機能改変技術として広く応用可能であると考えられる。

5. 参考文献

- 1) Madin K, Sawasaki T, Ogasawara T, Endo, Y (2000) A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: Plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. Proc Natl Acad Sci USA 97: 559-564
- 2) Kanno T, Kasai K, Ikejiri-Kanno Y, Wakasa K, Tozawa Y (2004) *In vitro* reconstitution of rice anthranilate synthase: distinct functional properties of the alpha subunits OASA1 and OASA2. Plant Mol Biol 54: 11-22
- 3) Tozawa Y, Hasegawa H, Terakawa T, Wakasa K (2001) Characterization of rice anthranilate synthase alpha-subunit genes *OASA1* and *OASA2*. Tryptophan accumulation in transgenic rice expressing a feedback-insensitive mutant of *OASA1*. Plant Physiol 126: 1493-1506
- 4) 戸澤讓、菅野拓也、若狭暁: 特許出願「変異タンパク質の機能改変スクリーニング方法およびその利用」平成16年3月4日
- 5) 戸澤讓、菅野拓也、若狭暁: 特許出願「イネのアントラニル酸合成酵素遺伝子 OASA2 の新規改変遺伝子およびその利用」平成17年2月28日