助成番号　210636	５－２

研 究 成 果 報 告 書

研究テーマ（和文）	ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素の構造に基づく機能改変		
研究テーマ（英文）	Structure-based engineering of polyhydroxyalkanoate synthase		
研究期間	2021年 ～ 2022年	研究機関名　北海道大学・大阪大学	
研究代表者	氏名（漢字）	冨田　宏矢	
	氏名（カタカナ）	トミタ　ヒロヤ	
	氏名（英文）	Hiroya Tomita	
	所属機関・職名	大阪大学　生物工学国際交流センター・准教授	
共同研究者 ＊２名をこえる場合は、【別紙追加用紙】(P3)に３人目以降を追記してください。	氏名（漢字）		
	氏名（カタカナ）		
	氏名（英文）		
	所属機関・職名		
	氏名（漢字）		
	氏名（カタカナ）		
	氏名（英文）		
	所属機関・職名		

概要 （600 字～800 字程度にまとめてください。）

3HHx の導入効率が上昇した $PhaC_{AR}$ 変異体を得るため、基質ドッキングシミュレーションを試みた。しかしながら、結果が安定せず、有効な変異点の候補を見出すことは困難であった。そこで実験ベースで変異体を作製することとした。Error-prone PCR 法によってランダム変異を導入した *phaC*$_{AR}$ 変異遺伝子ライブラリーを作製し、これらを導入した大腸菌を 3HHx を含む培地で培養した。PHA の合成量に応じて蛍光を発する蛍光色素ナイルレッドが含まれる培地で培養したところ、いくつかの変異体は親である PhaCAR よりも高い蛍光強度を示した。これらの変異体の変異点を同定した結果、N149D, F314L 変異が見出され、これらの変異が 3HHx の導入効率を高めていることが明らかとなった。

これらの変異点のうち、F314 は過去に知られていない新しい変異点である。そこで、F314 に対して 20 種類全てのアミノ酸で一つずつ置き換えた飽和変異遺伝子ライブラリーを構築し、それぞれのポリマー合成量、3HHx 導入率を調べた。その結果、F314H はいずれも高い結果を示した。さらに $PhaC_{AR}$ F314H 変異体の組換えタンパク質を調製し、その酵素活性を調べたところ、3HHx-CoA に対して親酵素よりも高い酵素活性を示すことが明らかとなった。

N149, F314 を $PhaC_{AR}$ のコンピュータ上での予想立体構造情報に当てはめたところ、F314 はポリマー合成に直接関与する活性中心残基 C315 に隣接していた。そのため、F314 への変異導入は基質選択に重要な役割を果たすことが示唆された。N149 は活性中心からは離れたところに位置していたが、酵素活性に重要と思われるループ領域上の N396 と相互作用していることが示唆された。この相互作用の変化が酵素の立体構造に影響を与え、その結果として基質特異性にも影響を与えた可能性がある。

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）

雑誌	論文課題	Directed evolution of sequence-regulating polyhydroxyalkanoate synthase to synthesize a medium-chain-length-short-chain-length (MCL-SCL) block copolymer				
	著者名	HT Phan, Y Hosoe, M Guex, M Tomoi, H Tomita, M Zinn, and K Matsumoto	雑誌名	Biomacromolecules		
	ページ	1221～1231	発行年	2022	巻号	23(3)
雑誌	論文課題	Versatile aliphatic polyester biosynthesis system for producing random and block copolymers composed of 2-, 3-, 4-, 5-, and 6-hydroxyalkanoates using the sequence-regulating polyhydroxyalkanoate synthase $PhaC_{AR}$				
	著者名	K Satoh, T Kawakami, N Isobe, L Pasquier, H Tomita, M Zonn, and K Matsumoto	雑誌名	Microbial Cell Factories		
	ページ	84	発行年	2022	巻号	21(1)
雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
図書	書名					
	著者名					
	出版社		発行年		総ページ	

英文抄録（100 語～200 語程度にまとめてください。）

In order to obtain $PhaC_{AR}$ mutants with increased 3HHx incorporation efficiency, substrate docking simulations were conducted. However, the results were not stable, and it was difficult to find effective mutation candidates. Therefore, experimental methods were carried out. A *phaC*$_{AR}$ mutant gene library with random mutations were generated, and the *E. coli* cells with the library were cultured in a medium containing 3HHx. Some of the mutants exhibited higher fluorescence intensity than the parental $PhaC_{AR}$. The N149D and F314L mutations were identified in these mutants.

Next, a saturation mutant gene library of F314 was constructed, and polymer production and 3HHx incorporation capacities were analyzed. As a result, F314H showed higher results. Furthermore, the recombinant $PhaC_{AR}$ F314H protein exhibited higher activity with 3HHx-CoA than the parent enzyme.

When N149 and F314 were fitted to the predicted structural information of $PhaC_{AR}$, F314 was adjacent to the active center residue C315. This suggests that the mutation of F314 is effective for substrate selectivity. N149 was located far from the active center, but it interacts with N396 on the important loop region. The changes of the interaction might affect the conformation of the enzyme, which in turn affected substrate specificity.