

研究ノート

ダイズ種子エポキシド加水分解酵素変異体の作出及びその性質検討

荒平 正緒美, Benjamin Sailas, Sam-Pin Lee,
Ngoc Minh Nghiem, Van Chi Phan, 深澤 親房

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

Characterization of soybean epoxide hydrolase mutant

Masaomi Arahira, Benjamin Sailas, Sam-Pin Lee,
Ngoc Minh Nghiem, Van Chi Phan, and Chikafusa Fukazawa

National Food Research Institute, NARO, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, Japan, 305-8642

Abstract

Epoxide hydrolases (EH) catalyze hydrolysis of epoxides to the corresponding vicinal diols. By site-directed mutagenesis, a total of 22 mutants were constructed, followed by analyzing their kinetics. Through these experiments, mutation of G32, S39, and D58, located at a highly conserved region of EHs known to date, led to a 2-fold higher specific activity than that of wild-type.

Keywords : epoxide hydrolase, mutant

緒 言

植物種子の登熟の間に、種子は菌類、細菌、ウイルスなど病原体による攻撃を含む様々な生物学的あるいは非生物的环境ストレスにさらされることとなる。植物組織全体の防衛の場合と同様、種子においても環境ストレスに対する防御反応として、種子内に数種の防御タンパク質を合成することが知られている^{1),2)}。種子

中で、貯蔵タンパク質よりも多量に発現誘導される場合があるレクチン及びプロテアーゼ阻害タンパク質など、生化学的または分子生物学に比較的良好に性質が解明された種子防御関連タンパク質があるが³⁾⁻⁴⁾、これらとは関連のない防御関連タンパク質が、登熟時の様々な環境刺激に反応して生じることが報告されており、一方、これらの発現調節メカニズムの多くが未知のままである。

真菌に対する種子の防御のため、天然の殺菌剤と考

1	MCEHLVLSLCYIWVRTQRIVEFNEME	QIKHRTVEVNGIKMHVAEKGEGPVV-LFLHGFP	59
1	M-SH-----G-YVTVK-PR-V--R-L-HF----	VEL-G---W-----PAVCLC-HGFP	31
	* *	** * * *	
60	ELWYSWRHQILSL-SSLGYRAVA-PDLRGYGDTEAPPSISSYNCFHIV-GDLVALIDSLG		116
32	ESWYSWRYPAL-AQAGYR-VLAMDMKGYGESSAPPEIEEY-CMEVLCKEMVTFLDKLG		88
	* * * * * * * * * * * *		
117	VQQVFLVAHDWGAIIGWYLCMFRPDKVKAYVCLSVPLLRDPNIRTVDGMRALYGDDYYV		176
89	LSQAVFIGHDWGGMLVWYMALFYPERVRAVASLNTFPFIPANPNMSPLESIKANPVFDYQL		148
	* * * * * * * *		
177	CRFQKPGEMEAQMAE-VGTEYVLKNILTRNPGPPILPKGRF-Q----F-NPEMPNTLPS		229
149	Y-FQEPGVAEAELEQNLRTF--KS-LFRASDESVLSMHKVCEAGGLFVNSPEEP-SL-S		206
	** * *	* * * *	
230	WL-TEEDLAYVYSKFEKTGFTGPLNYRNFNLNWELTAPWTGGQIKVPVKYITGELDMVY		288
207	RMVTEEEIQFYVQQFKKSGFRGPLNWYRNMERNW--K--W-ACK-SLGRKILIPAL-MV-		257
	*** ** *	* *	* *
289	NSLNLKEY--I-HGGGFKQD-VPNLEQVIVQK-GV-A--HFNNQEAEEIDNYI-YD---		336
258	TA-E-KDFVLVPQMSQHMEDWIPHLKRGHIEDC-----GHWTQMDKPTEVNQI-LIKWLD		305
	*	*	
337	--FINKF		341
306	SDARNPPVVSKM		318

図1. ダイズ（上段）とヒト（下段）のアミノ酸相同性の比較

□で囲んだメチオニンが第2メチオニン

えられている物質の中には、様々なエポキシ脂肪酸及びそれらの誘導体が含まれる⁵⁾⁻⁷⁾。これらの構成要素となるエポキシドについてはその生合成経路やその分解経路が報告されて来っており、これらの経路を構成する酵素群の1つがエポキシド水解酵素(EH)である。この酵素はエポキシドに水分子を付加することで、それぞれの分子をジオールに変換する触媒機能を有しており⁸⁾、ハウレンソウ⁹⁾、リング¹⁰⁾、及びソラマメ⁷⁾から報告されて来た。エポキシド水解酵素活性が最初に見つかったのはソラマメの種子抽出物であるが、その詳細は不明である。一方、ダイズは主要農産物の1つであり、その性質検討は農業にも貢献し得るとの見地から、我々はダイズ種子のエポキシド水解酵素に着目し、既に同酵素の精製、性質検討及び遺伝子のクローニングにも成功し報告をしている¹¹⁻¹⁵⁾。エポキシド水解酵素の相同遺伝子はヒトでも得られており、同遺伝子が種子の環境ストレスだけでなく、多様な機能を有することも示唆されている。

そこで、我々は、ダイズ種子エポキシド水解酵素 cDNA を大腸菌で発現し、得られた酵素の性質を検討

した。さらに、活性のより高い酵素の作出を目的として、ダイズと他の植物やヒトの遺伝子がそれぞれコードするアミノ酸配列の相同性に基づき 9ヶ所、22種類の部位特異的変異を導入し、各種変異酵素の作出を試みた。その結果、6 種の変異酵素の獲得に成功し、それぞれの酵素活性及び円二色性スペクトルによる構造情報を比較した。ここでは、その結果を報告する。

実験方法

発現プラスミドの構築

大腸菌を用いてエポキシド水解酵素を生産するために、推定した成熟した酵素のN末端（図1に示される第2のメチオニン）に基づく2つのプライマーを合成した。1.（センス側）：*Nde*I サイト（アンダーラインによって示される）を含む上流側を含んでエポキシド水解酵素の26から33アミノ酸残基のコドンと一致するように造られた5'-ATATACATATGGAGCAAATAAAGCACAGAACA-3, 2.（アンチセンス側）：*Eco*RI サイト（アンダーライン）を含む停止コドンと3'非翻訳

領域と一致する5'-GGTTGAATTCGT TTTTGGACAAG ATCAGAACTTC-3'. テンプレートとしてエポキシド水解酵素組み換えプラスミド DNA (pSEH 221) から *KpnI* で切り出されるフラグメントを精製して用い、PCR 法によって増幅した¹⁴⁾. *EcoRI* と *NdeI* で PCR 産物を切断し、フラグメントを精製した後、発現ベクター pRSET (インビトロジェン, オランダ) にサブクローニングした. この発現プラスミド (pRSEH 310とする) を *E.coli* BL21 (DE3) に形質転換し、発現実験の親株として用いた¹⁴⁾. 発現プラスミド PRSEH310は、変異を導入するための親プラスミドとして用い、変異体の作製実験を行った.

エポキシド水解酵素の部位特異的変異法

His31を Phe (H31F) もしくは Lys (H31K) に, Gly 32を Ala (G32A), もしくは Cys (G32C), Glu (G32E), Leu (G32L), Asn (G32N), Gln (G32Q), Ser (G32S), Thr (G32T) や, Tyr (G32Y) それぞれに, Phe 33を Trp (F33W) に, Phe33Pro34を Pro33Phe34 (F33P34 / P33F34) に Glu35を Asp (E35D) もしくは Gln (E35Q) に, Ser39を Ala (S39A) もしくは Leu (S39L), Asn (S39N) や, Thr (S39T) それぞれに, Trp40 Arg41を Arg40Trp41 (W40R41 / R40W41) に, Asp58を Glu (D58E) もしくは Asn (D58N) にそれぞれ変換するために部位特異的変異を表 1 で示したオリゴヌクレオチドを用いて PCR 法で行った. 最初の PCR サンプルは, 以下の条件で増幅: 95℃ (48秒) の変性, 56℃ (48秒) のアニーリング, 72℃ (1分) の伸長反応を 30サイクル, 最後に 72℃ (8分) 伸長反応. 得られた PCR 産物をそれぞれ電気泳動を用いて単離し, カルボキシル端側の 2 回目の PCR 反応を上記と同じ条件で行った. 2 回目の PCR 産物を同様に単離し, pCR2.1 ベクター (インビトロジェン, オランダ) にサブクローニングの後, 全塩基配列をシーケンサーを用いて確認した. 作製したプラスミドは, 上記方法で発現ベクター PRSET にサブクローニングし, *E-coil* (DE3) に形質転換後, 発現実験に用いた.

エポキシド水解酵素活性の測定法

エポキシド水解酵素活性としてエポキシド-ジオール変換活性をスチレンオキシドを基質とし, 反応後, 生成物のスチレングリコールの量を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定し解析した¹⁴⁾.

円二色性 (CD) スペクトルの測定

表 1 変異体作成用プライマー

Mutation	Sequence
H31F	5'-GAGTACCAGAGCTCAGGGAAGCCTTGAGG-3'
H31K	5'-GAGTACCAGAGCTCAGGGAAGCCAAAGAGG-3'
G32A	5'-GAGTACCAGAGCTCAGGGAAGCGTGGAGG-3'
G32C	5'-GAGTACCAGAGCTCAGGGAAGCAGTGGAGG-3'
G32E	5'-GAGTACCAGAGCTCAGGGAAGCTCGTGGAGG-3'
G32L	5'-GAGTACCAGAGCTCAGGGAAGAGTGGAGG-3'
G32N	5'-GAGTACCAGAGCTCAGGGAAGTTGTGGAGG-3'
G32Q	5'-GAGTACCAGAGCTCAGGGAATTGTGGAGG-3'
G32S	5'-GAGTACCAGAGCTCAGGGAAGCTGTGGAGG-3'
G32T	5'-GAGTACCAGAGCTCAGGGAAGTGTGGAGG-3'
G32Y	5'-GAGTACCAGAGCTCAGGGAAGTAGTGGAGG-3'
F33W	5'-GAGTACCAGAGCTCAGGCCAGCCGTGGAGG-3'
F33P34/P33F34	5'-GAGTACCAGAGCTCGAAAGGGCCGTGGAGG-3'
E35D	5'-GAGTACCAGAGATCAGGGAAGCCGTGGAGG-3'
E35Q	5'-GAGTACCAGAGTTGAGGGAAGCCGTGGAGG-3'
S39A	5'-CTGATGGCGCCAGGCGTACCAGAGCTCAGG-3'
S39L	5'-CTGATGGCGCCAGAGGTACCAGAGCTCAGG-3'
S39N	5'-CTGATGGCGCCAATTGTACCAGAGCTCAGG-3'
S39T	5'-CTGATGGCGCCATGTGTACCAGAGCTCAGG-3'
W40R41/R40W41	5'-CTGATGCCAGCGTGAGTACCAGAGCTCAGG-3'
D58E	5'-AGCCACGAGCTCGGGAGCGACGGCGCGG-3'
D58N	5'-AGCCACGAGGTTGGGAGCGACGGCGCGG-3'

表 2. 野生型エポキシド水解酵素と 3 種の変異体の比活性の比較

EHS	Kinetic values	Specific activity (μmol/min/mg)	% of control
Wild Type		3.86	100.0
G32S		8.53	221.0
S39A		6.69	173.3
D58E		8.00	207.3

大腸菌で発現させた酵素タンパク質の構造情報を得るため, Jasco J-800を用いて発現タンパク質の CD スペクトルを測定した. 測定条件は, タンパク質濃度 0.1 mg/ml, 石英セル長 0.01cm, スキャン範囲 200-250nm バンド幅 1 nm, レスポンズ 0.5sec で実施した.

結果および考察

大腸菌で発現したエポキシド水解酵素タンパク質

クローニングの結果から推定されたエポキシド水解酵素タンパク質 (図 1) 配列の内, 26 残基目から 341 残基目にわたっているアミノ酸部分をカバーするよう構築したエポキシド水解酵素発現プラスミド (pRSEH 310) を使用することにより, 我々は組換え型酵素を生産し, エポキシド-ジオール変換活性を確かめた.

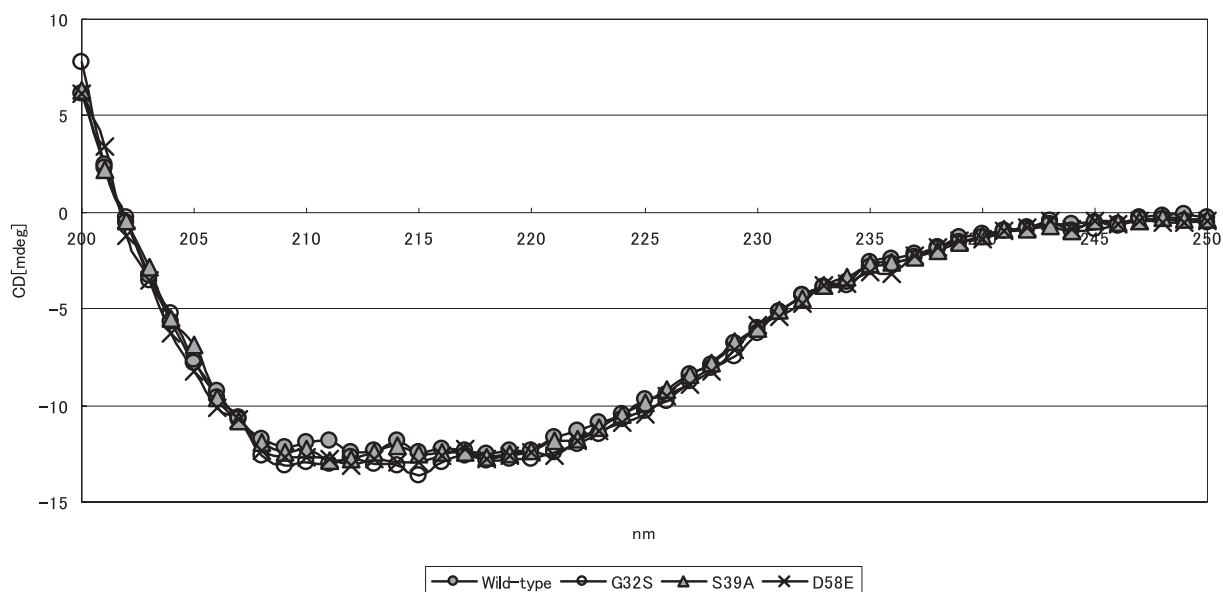


図 2. 野生型と 3 種の変異体の CD スペクトル

条件は実験方法による。(●) 野生型；(○) G32S；(▲) S39A；(×) D58E.

野生型エポキシド水解酵素を大腸菌で発現し、菌体破碎後、55℃10分間加熱処理を行い、タンパク質画分を45%硫酸沈殿で濃縮後、Sephacryl S-200 HR（直径2.6cm×100cm）で分離¹⁴⁾、得られた活性画分を再度同カラムで分離精製するという3ステップの精製過程により、SDS-PAGE およびウエスタンブロットによって単一になるまで精製した（データ非掲載）。SDS-PAGE およびウエスタンブロットは文献14の方法に従った。酵素活性は菌体内に検出され、培養液1 Lから約10mgの精製組換え型エポキシド水解酵素が得られた。この酵素は、超遠心平衡分析によって36,000の分子量を示し、塩基配列から予想される分子量が35,986.14であることから、単量体酵素が活性単位であることが明らかとなった。

また酵素活性については、文献14の方法に従い、基質としスチレンオキシドを添加、反応後、生成したスチレングリコールの量を測定した。その結果、組換えダイズエポキシド水解酵素の比活性、 k_{cat} と K_m 値はそれぞれ、 $3.86 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 、 4.34sec^{-1} 、 2.56mM であった。これは文献14記載の比活性の2.8倍であった。ゲル濾過の過程をもう1つ加えることにより、精製が更に進んだものと考えられた。

エポキシド水解酵素変異体の酵素活性

活性の高いエポキシド水解酵素変異体の作出を目的

として、文献14に記述してある植物由来酵素との比較および、図1に示すヒト由来のエポキシド水解酵素との間の比較で相同性の高い部分に、変異させるアミノ酸残基の性質を塩基性に変えたものなどの変異を有する22種の変異体の作製を試みた。その結果、H31変異では可溶性酵素は得られず、G32変異でも、G32Sを除いて、可溶性酵素は得られなかった。更にS39LとD58Nの変異でも同様の結果が得られた。一方、変異体G32S、E35D、S39A、S39N、S39TとD58Eでは可溶性酵素が得られた。これらの酵素についてエポキシド水解酵素活性を測定したところ、いずれも野生型より高い比活性を示した。この中で、野生型よりも顕著に活性の高い変異体はゲノム上極めて高度に保存されている領域に変異を有し、野生株の2倍程度までの活性が検出された（表2）。これら残基は酵素の立体構造において、推定される活性残基の近傍にあり、上記変位によって構造が安定することによって活性が上がるのではないかと考えた。また、他の変位の場合は構造が変わり、不溶化するのではないかと考えられた¹⁷⁾。

CD スペクトルの比較結果

エポキシド水解酵素の変異が酵素分子のコンフォメーション変化にどのような影響を与えるかを検討するために、野生型と変異型のCDスペクトルの比較を行った（図2）。その結果、200-250nmの範囲でのC

Dスペクトルにおいて、野生型と3種の変異体の間で有意な差は見られなかった。また、DSC（示差走査熱量測定）の分析においても有意な差は認められなかった（データ非掲載）。

以上の結果から、変異によるエポキシド水解酵素活性の上昇は、分子の大きな構造変化によるものではなく、アミノ酸変異による微細な変化が反映するものと推定された。基質との相互作用への影響等、活性変化の原因の解明は今後の課題である。

要 約

エポキシド水解酵素は、エポキシドを加水分解し、ジオールに変換する触媒作用を示す。ダイズエポキシド水解酵素の22種の部位特異的変異体の作出を試み、6種の可溶性変異酵素が得られた。得られた変異酵素の内、ゲノム上極めて高度に保存されている領域に変異を有する3種の酵素については、野生型酵素の2倍近い酵素活性が得られた。野生型酵素及び変異酵素のCDスペクトルを測定した結果、顕著な差異は見られなかった。変異による酵素活性の上昇はアミノ酸変異による微少な変化を反映しているものと予想された。

参考文献

- 1) Ryan, C.A. & Jagendorf, A. (1995) Self defense by plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 4075-4075.
- 2) Bowles, D.J. (1990) Defense-related proteins in higher plants, *Ann. Rev. Biochem.* **59**, 873-907.
- 3) Peumans, W.J. & Van Damme, E.J. (1995) Lectins as plant defense proteins, *Plant Physiol.* **109**, 347-352.
- 4) Birk, Y. (1996) Protease inhibitors in legume seeds-overview, *Arch. Latinoam. Nutr.* **44**, 26S-30S.
- 5) Badami, R.C. & Patil, K.B. (1981) Structure and occurrence of unusual fatty acids in minor seed oils, *Prog. Lipid Res.* **19**, 119-153.
- 6) Ohta, H., Shida, K., Peng, Y.-L., Furusawa, I., Shishiyama, J., Aibara, S. & Morita, Y. (1990) The occurrence of lipid hydroperoxide-decomposing activities in rice and the relationship of such activities to the formation of antifungal substances, *Plant Cell Physiol.* **31**, 1117-1122.
- 7) Hamberg, M. & Fahlstadius, P. (1992) On the specificity of a fatty acid epoxygenase in broad bean. *Plant Physiol.* **99**, 987-995.
- 8) Beetham, J.K., Grant, D., Arand, M., Garbarino, J.E., Kiyosue, T., Pinot, F., Oesch, F., Belknap, W.R., Shinozaki, K. & Hammock, B.D. (1995) Gene evolution of epoxide hydrolyzes and recommended nomenclature. *DNA, Cell. Biol.* **14**, 61-71.
- 9) Croteau, R. & Kolattukudy, P.E. (1975) Biosynthesis of hydroxyfatty acids polymers. Enzymatic epoxidation of 18-hydroxyoleic acid to 18-hydroxy-cis -9, 10-epoxystearic acid by a particulate preparation from spinach (*Spinacia oleracea*), *Arch. Biochem. Biophys.* **170**, 61-72.
- 10) Croteau, R. & Kolattukudy, P.E. (1975) Biosynthesis of hydroxyfatty acids polymers. Enzymatic hydration of 18-hydroxy-cis-9, 10-epoxystearic acid to threo-9,10,18-trihydroxystearic acid by a particulate preparation from apple (*Malus pumila*), *Arch. Biochem. Biophys.* **170**, 73-81.
- 11) Blee, E. & Schubert, F. (1992) Occurrence of fatty acid epoxide hydrolases in soybean (*Glycine max*), *Biochem. J.* **282**, 711-714.
- 12) Blee, E. & Schubert, F. (1992) Regio- and enantioselectivity of soybean fatty acid epoxide hydrolase. *J. Biol. Chem.* **267**, 11881-11887.
- 13) Blee, E. & Schubert, F. (1995) Stereocontrolled hydrolysis of the linolenic acid monoepoxide regioisomers catalyzed by soybean epoxide hydrolase, *Eur. J. Biochem.* **230**, 229-234.
- 14) Arahira, M., Nong, V.H., Udaka, K., and Fukazawa, C. (2000) Purification, molecular cloning and ethylene-inducible expression of a soluble-type epoxide hydrolase from soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) *Eur. J. Biochem.* **267**, 2649-2657
- 15) Fukazawa C., Arahira M., and Lee S-P. (2000) Molecular characterization of a soluble-type epoxide hydrolase from soybean. Abstract of 92nd AOCS Annual Meeting
- 16) Pinot, F., Grant, D.F., Beetham, J.K., Parker, A.G., Borhan, B., Landt, S., Jones, A.D., & Hammock, B.D. (1995) Molecular and biochemical evidence for the involvement of the Asp333-His523 pair in catalytic mechanism of soluble epoxide hydrolase, *J. Biol. Chem.* **270**, 7968 - 7974.
- 17) Verschuere KH, Franken SM, Rozeboom HJ, Kalk KH, & Dijkstra BW. (1993) Refined X-ray structures of haloalkane dehalogenase at pH 6.2 and pH 8.2 and im-

plications for the reaction mechanism, J Mol Biol. **232**, 856-872.