

高抗カビ活性酵素の実用化に向けた技術開発

琉球大学農学部
亜熱帯生物資源科学科
教授 平良 東紀

問合せ先：琉球大学 農学部 亜熱帯生物資源科学
教授 平良東紀 (tokey@agr.u-ryukyu.ac.jp)

琉球大学 研究推進機構 研究企画室
主席URA 殿岡 裕樹 (tonooka@lab.u-ryukyu.ac.jp)

琉球大学 総合企画戦略部 研究推進課
産学連携推進係 (sangaku@acs.u-ryukyu.ac.jp)

概要

高抗カビ活性酵素の実用化に向けた技術開発

- ニーズ： 様々な領域で有効で安全な抗カビ剤が求められている。
- 課題： 現存の抗カビ剤の多くは毒性・副作用がある。
- 解決法： カビの細胞壁破壊をターゲットにすれば毒性・副作用は少ない。
- シーズ： カビ細胞壁を破壊・分解する **植物由来抗カビ酵素 キチナーゼ**

申請者らが発見した高抗カビ活性酵素 **キチナーゼ** を、抗カビ剤として世界に先駆け実用化するための技術開発を行う。

- 1) 更なる高活性化
- 2) 安定性の向上
- 3) 大量発現系の構築



抗カビ剤のニーズ

抗カビ剤のニーズは農業・医療・生活領域と極めて広い。

- 食料問題に直結する植物病原性カビの防除剤（植物病原菌の8割はカビ）
- 医療現場において免疫力の落ちた患者の深刻な真菌症に対する治療薬
- 多くの人を悩ませている皮膚真菌症（水虫）の治療薬
- 洗濯槽等の水回りおよび寝具・エアコン等のハウスダストアレルギーの主犯であるカビの除去剤



社会的な背景から、抗カビ剤のニーズは益々高まる！

- 世界的な人口増大による食料不足
カビが引き起こす植物病が作物に与える損失は毎年約8億人分の食料に相当
- 免疫力の落ちる高齢者の増大
高齢に伴う免疫力の低下による真菌症の発症が問題となっている。
- 増えるアレルギー患者
国民の2人に1人が何らかのアレルギーがあり、ハウスダストアレルギーの主要因はダニとカビ。



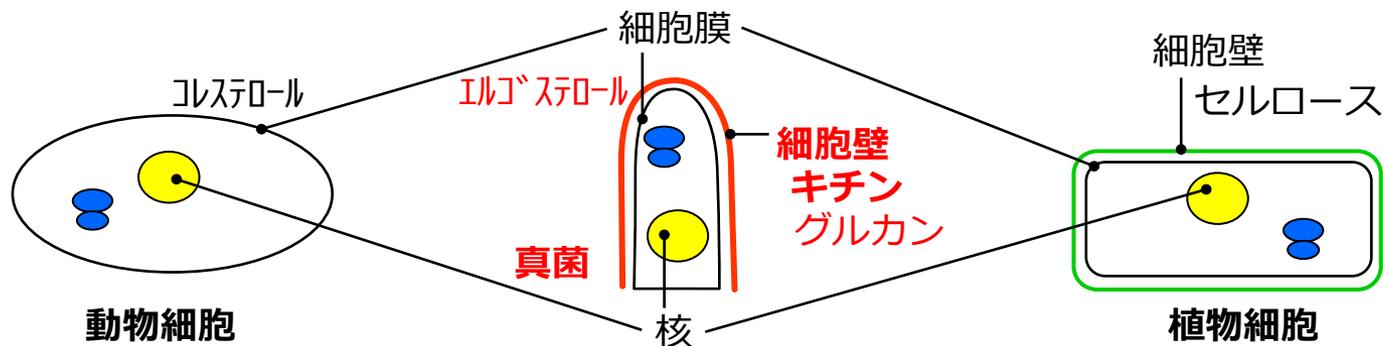
現存の抗カビ剤の問題点と解決策

問題点：現存の抗カビ剤は強毒性または副作用あり。

- 生活用洗剤等のカビ洗浄剤は、アルカリや塩素など**強毒性**で安全性に問題があり、食品使用環境等、広範囲での使用に向かない。
- カビと動植物は同じ真核生物に属するため、農薬・医薬における抗カビ剤の多くはヒトに対して**副作用**を示す。

解決策：真菌と動植物細胞の違いを利用する。

同じ真核生物で多くは共通している。細胞膜成分の一部と細胞壁成分の一部が異なる。



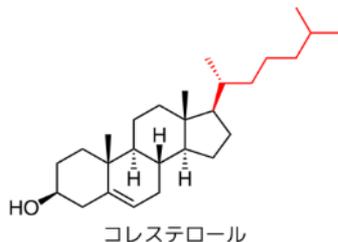
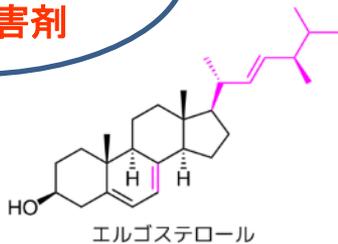
市販の抗カビ剤の作用点

アンフォテリシンB

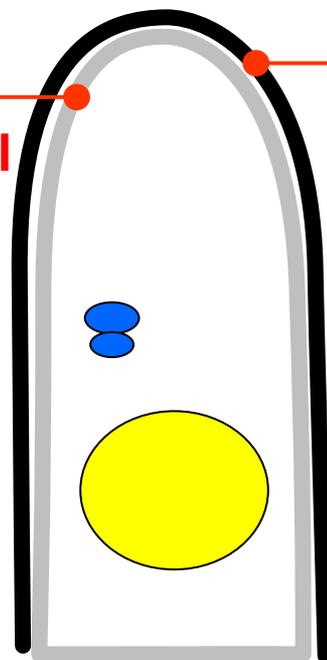
エルゴステロールに結合して細胞膜を破壊

アゾール系

エルゴステロール合成阻害剤



細胞膜
Ergosterol



細胞壁

Chitin
 β -1,3-glucan
 α -1,3-glucan

ポリオキシシン

キチン合成酵素阻害剤

ミファカンギン

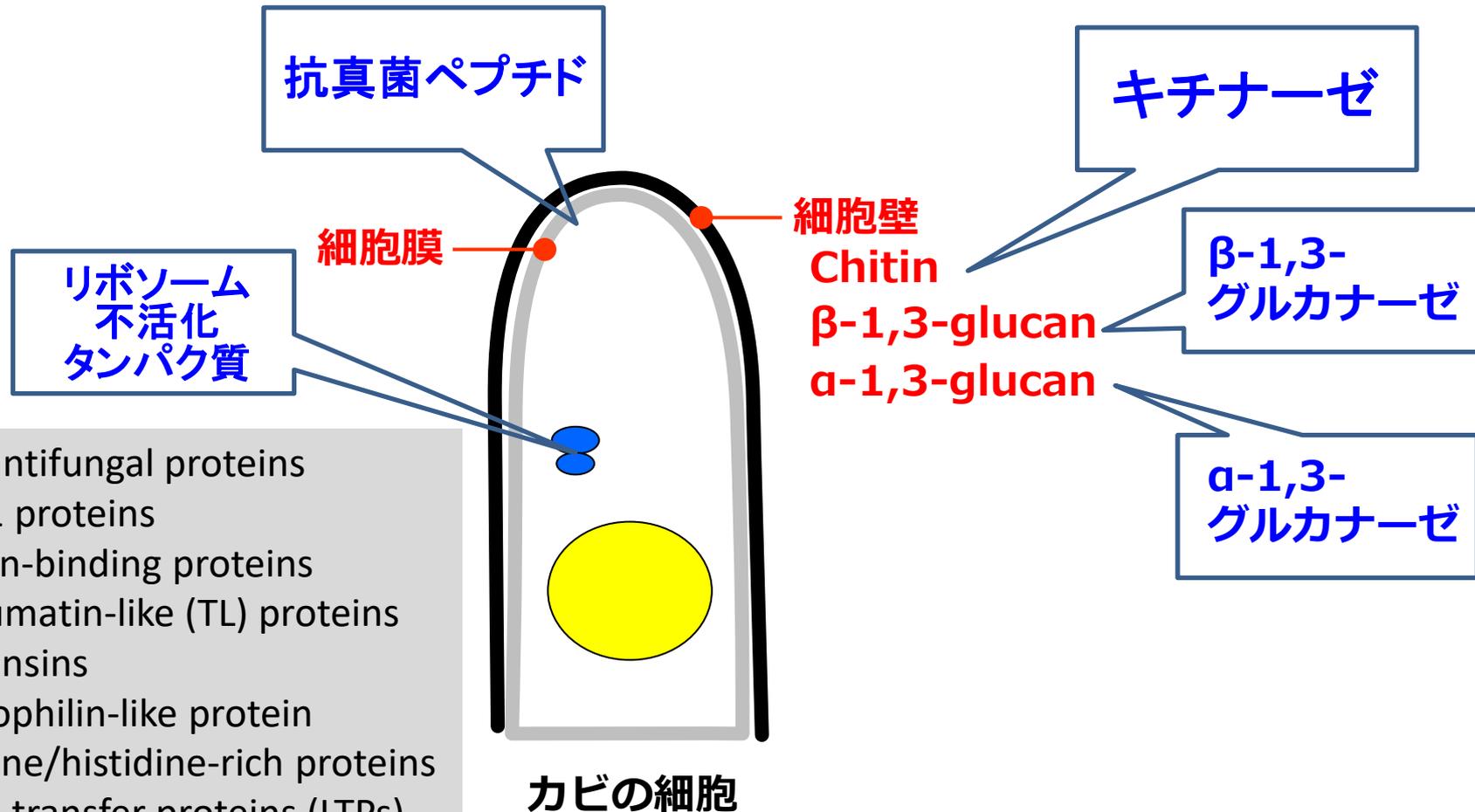
β -1,3-グルカン合成酵素阻害剤

市販抗カビ剤の主な副作用

アンフォテリシンB	腎障害, 胃腸障害, 血液障害
アゾール系	胃腸障害, 肝障害, 皮膚粘膜眼症候群
ミファカンギン	血液障害, 肝障害, 腎障害

※ポリオキシシンは農薬としての利用のみ

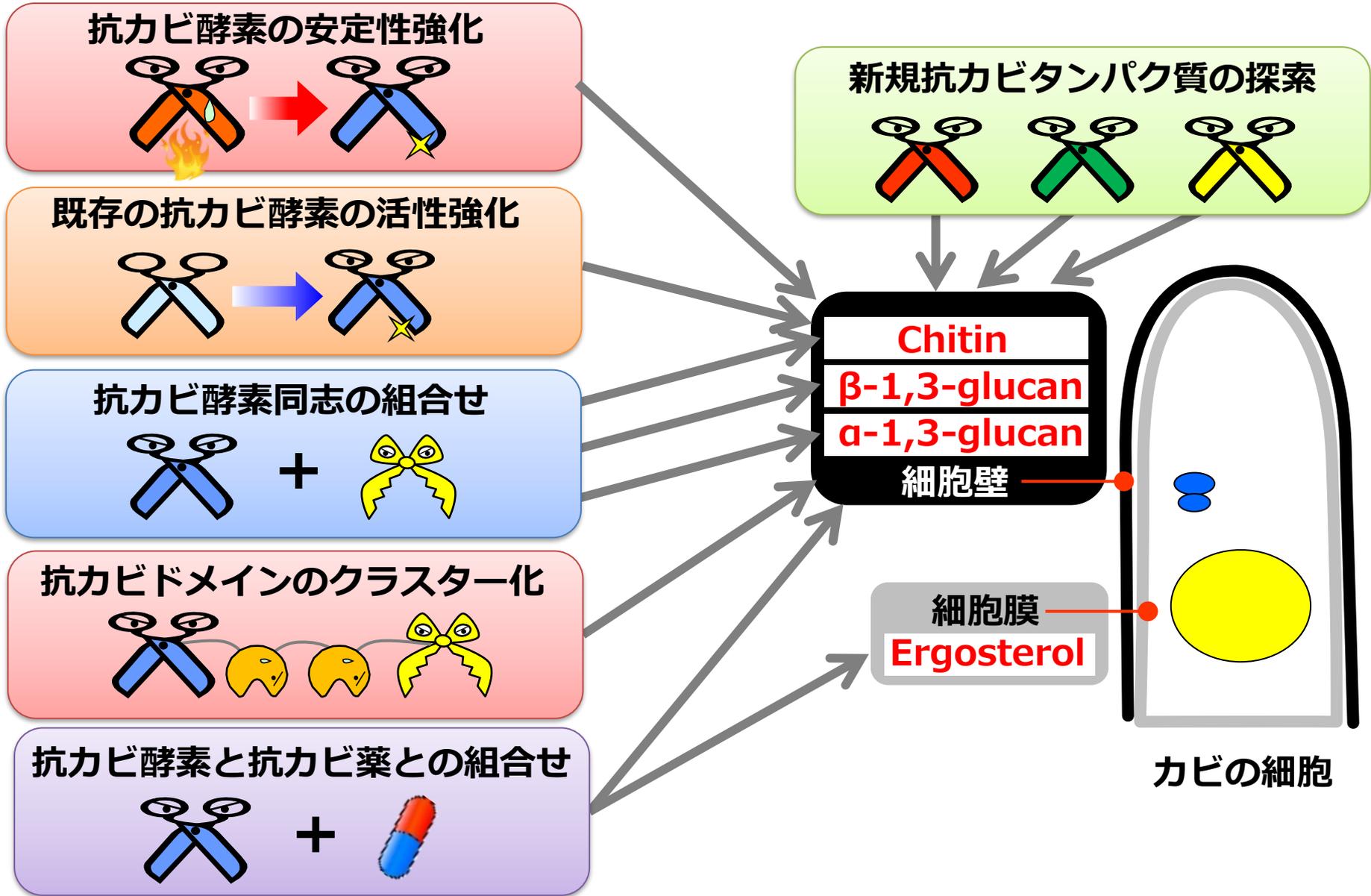
主な抗カビタンパク質とその作用点



Other antifungal proteins

- PR-1 proteins
- chitin-binding proteins
- thaumatin-like (TL) proteins
- defensins
- cyclophilin-like protein
- glycine/histidine-rich proteins
- lipid-transfer proteins (LTPs)
- killer proteins (killer toxins)
- protease inhibitors
- other proteins

高抗カビ酵素を基盤とした抗カビ活性強化のストラテジー



植物由来キチン分解酵素は抗真菌（カビ）活性を持つ

- ✓ 植物病原菌の約8割はカビ（糸状性真菌類）
- ✓ 植物はカビからの防御のため、種々の抗カビ活性物質を生産
- ✓ 植物のキチン分解酵素（キチナーゼ）は、カビの細胞壁の主成分であるキチンを直接分解し、抗カビ活性を発揮する。
- ✓ 植物由来キチナーゼは、微生物由来キチナーゼに比較して極めて強い抗カビ活性を示す。



ガジュマル乳液の抗カビ活性は強力

ガジュマルは、クワ科イチジク属に属する熱帯・亜熱帯に自生する樹木。幹を傷つけると乳液が出る。



ガジュマル



乳液

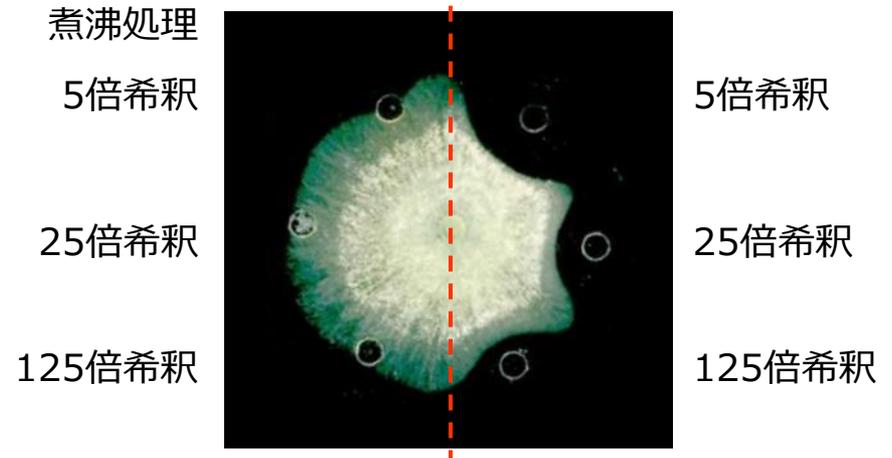


Fig. 1. ガジュマル乳液の抗カビ活性

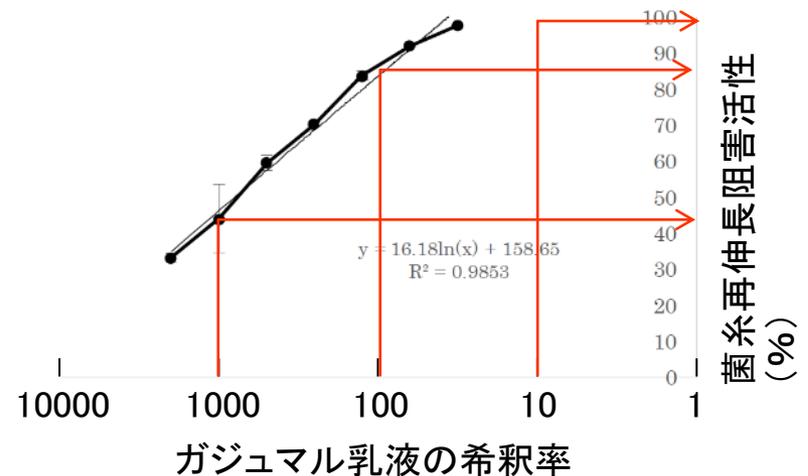
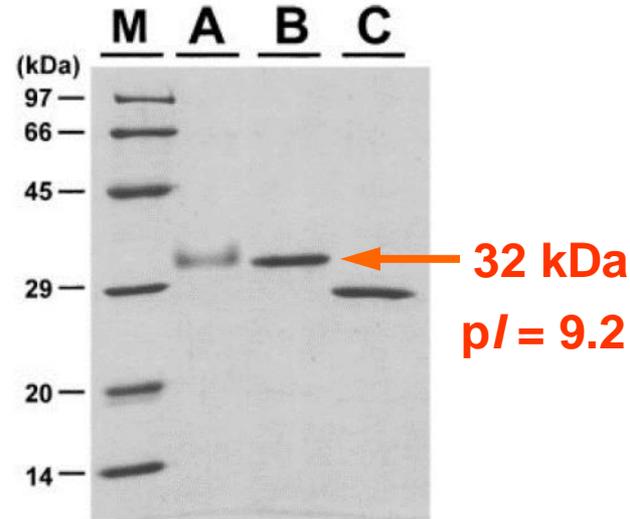
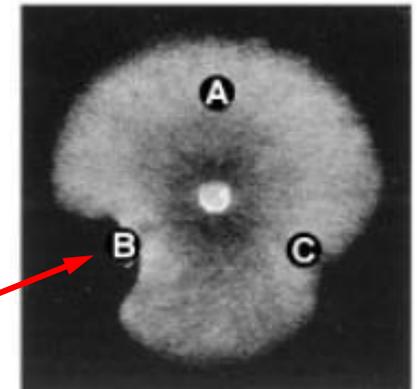


Fig. 2. ガジュマル乳液の抗カビ活性の定量

ガジュマル乳液由来キチナーゼ-B(GlxChiB)は強い抗カビ活性を有する。

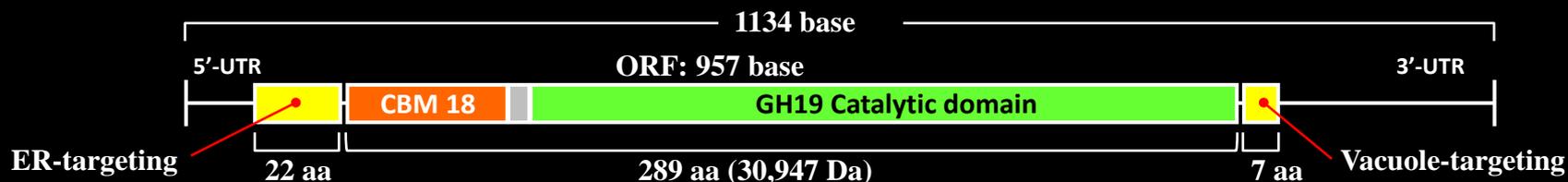


Strong antifungal activity



Taira et al. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005 69: 811-8.

GlxChiBの遺伝子クローニングによる全アミノ酸配列の決定



```

1 AAACATAACCAAAATCATAAAGAGATAAAGATGAAGTTTTGAAATTGACCATTTTCTCTCTGTTGTTGTCCACAATATTACAAGGAAGTTCAGCTGAGCAATGTGGAAGCCAAGCCGG 120
1 M K F W K L T I F S L L L S T I L Q G S S A E Q C G S Q A G 30

21 AGGTGCTCTCTGCCAGGTGGACTGTGCTGCAGCAAATATGGTTGGTGTGGTGACACAGCTGACTACTGCGGCGAGGGCTGCCAAAGTCAATGTGGCAGTAGCGCTGGAGACATCAGCAA 240
31 G A L C P G G L C C S K Y G W C G D T A D Y C G E G C Q S Q C G S S A G D I S K 70

241 ACTCATCTCAAGGGGCACCTTCGATCAGATGCTTAAGCATCGCAATGACGGCGCATGCCCGCCAAGGGCTTCTACACCTATGACGCTTTCATCGCAGCCGCCAAAGCCTTCCCTGGCTT 360
71 L I S R G T F D Q M L K H R N D G A C P A K G F Y T Y D A F I A A A K A F P G F 110

361 TGGCACCACCGGCGACGATGCCACAGCAAAGGGAGATTGCTGCTTTCTTAGGCCAAACTTCCCATGAAACTACGGGTGGATGGCAAGTGCACCTGATGGTCCGTA CTCTTGGGGATA 480
111 G T T G D D A T R K R E I A A F L G Q T S H E T T G G W A S A P D G P Y S W G Y 150

481 CTGCTTCTGAGAGAGAAAAACCCTTCATCTAGTTACTGCTCTCCAAGCCCACTTATCCTTGTGCCGCTGAAAGCAATATTATGGCCGTGGCCCCATCCAACCTTTCATGGA ACTACAA 600
151 C F L R E K N P S S S Y C S P S P T Y P C A A G K Q Y Y G R G P I Q L S W N Y N 190

601 CTACGGGCAGTGTGAAAAGCCATAGGGGTGGACCTGTTGAACAATCCGGACCTTGTAGCCACGGACCTGTGATTTCTTCAAGACGGC ACTCTGTTTCTGGATGACCCCGCAGTCAC C 720
191 Y G Q C G K A I G V D L L N N P D L V A T D P V I S F K T A L W F W M T P Q S P 230

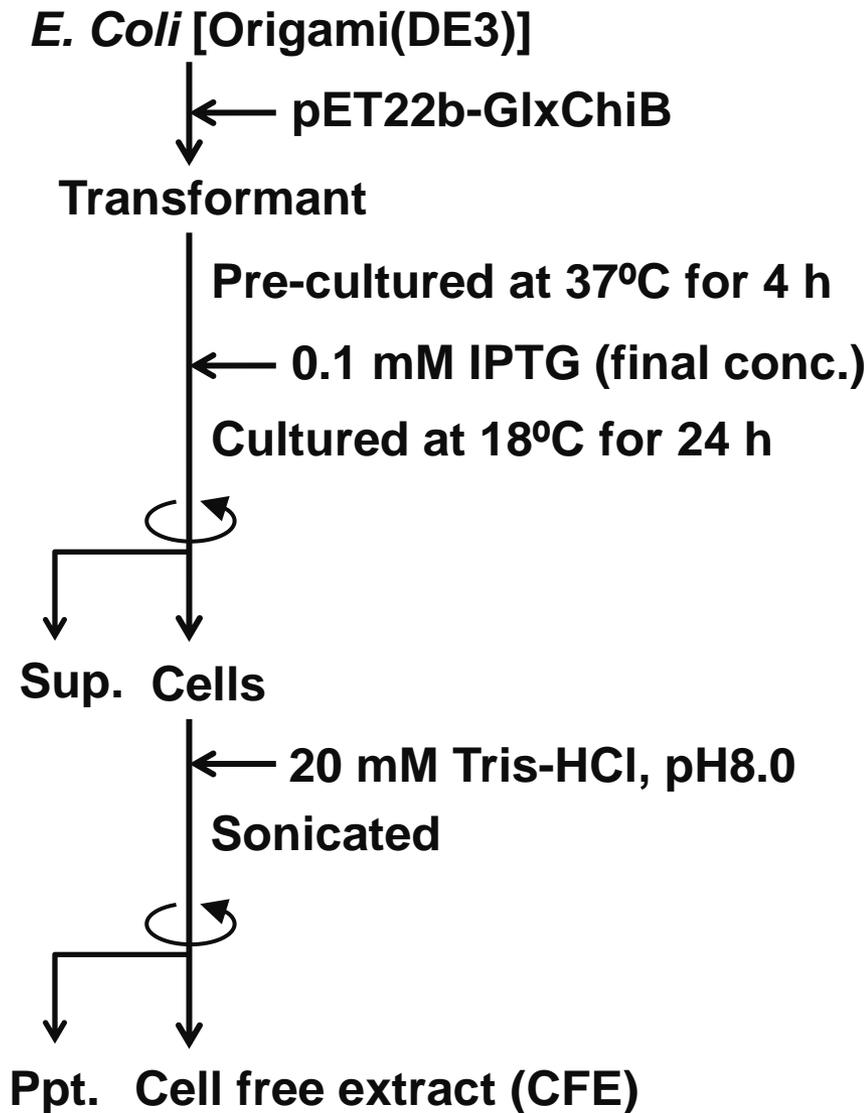
721 AAAGCGTCATGCCACAACGTCATACCGGCATATGGAAGCCGTCGGCAGCTGATCAGTCGGCCGGTTCGAGTTGCGGGATATGGT GCGACCACAAATATCATCAACGGAGGTCTTGAATG 840
231 K P S C H N V I T G I W K P S A A D Q S A G R V A G Y G A T T N I I N G G L E C 270

841 TGGCCAAGGTTGGAAGGCTCAGGTGGAGGACCGGATTGGGTTCTACAAGAGG TACTGTGATATATTTAAGGTTGGCTACGGGAACAACCTCGATTGCTACAACCAAAGGCCTTTTGGATC 960
271 G Q G W K A Q V E D R I G F Y K R Y C D I F K V G Y G N N L D C Y N Q R P F G S 310

961 TGGACTACTCCTCGTCCGACTCCATGTAATAGCTATAAGTTCCGATATATATATCTCTTTTGTGTGGGCTTCGTTTCTCATGTTGTCACGGATATGTTGACAATATGTTTATAATAATAT 1080
311 G L L L V D S M 318

1081 GGTTATAGAATAAAGCATGTATACGTTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1134
  
```

ガジュマル乳液由来キチナーゼ-B (GlxChiB) の大腸菌による高発現系を構築



CFE

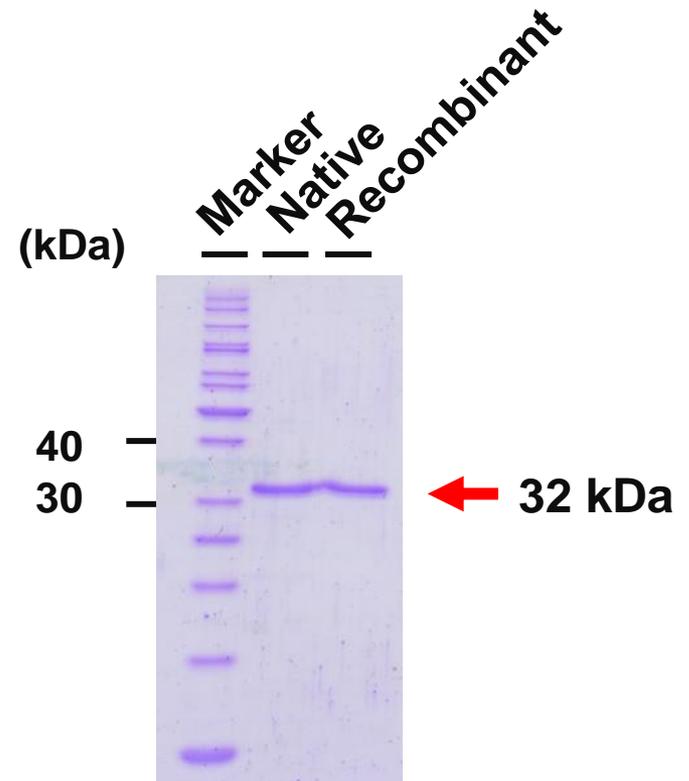
↓

Dialysis against PB, pH 7.0)

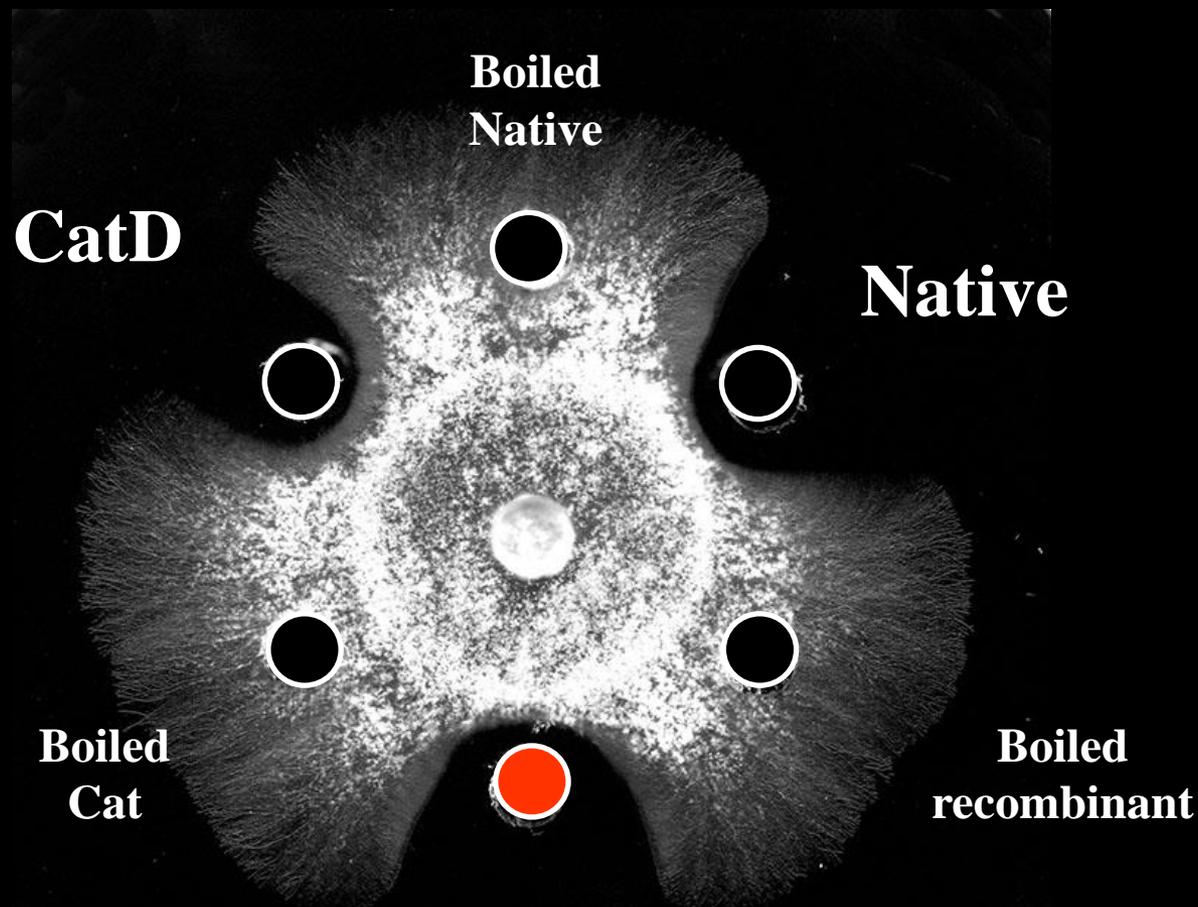
SP-sepharose HP column

↓

Purified recombinant GlxChiB



組換え型GlxChiBは強い抗カビ活性を示す。

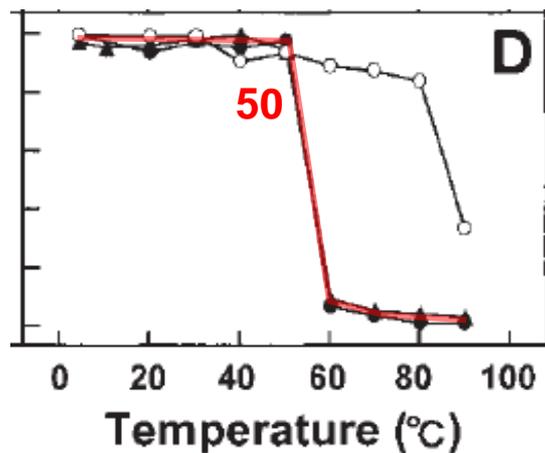


rGlxChiB

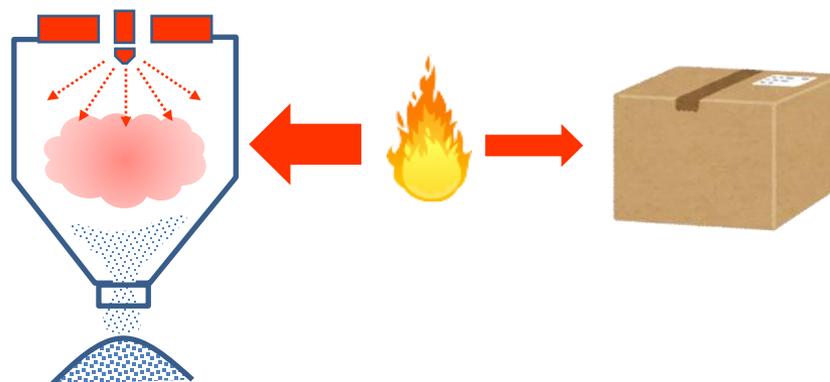
Takashima & Taira et al. *Planta*. 2021. 253.

抗カビ活性は強いが、実用化のためには安定性の向上が必要

現状では、安定性が足りない。



酵素剤として調製時（スプレードライ）、
保管・運搬時の安定性は必須条件

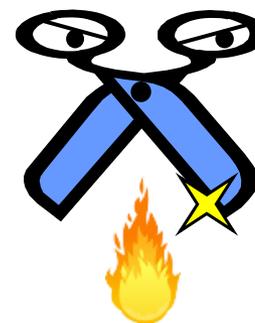


立体構造情報を基に耐熱化キッチンナーゼをデザイン



熱に不安定

タンパク質工学

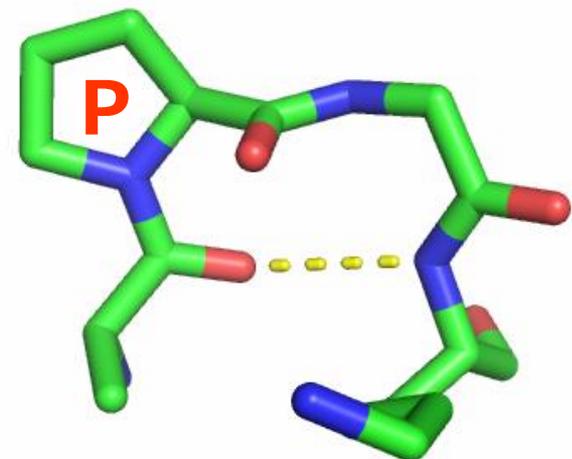
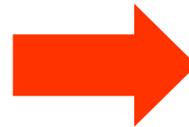
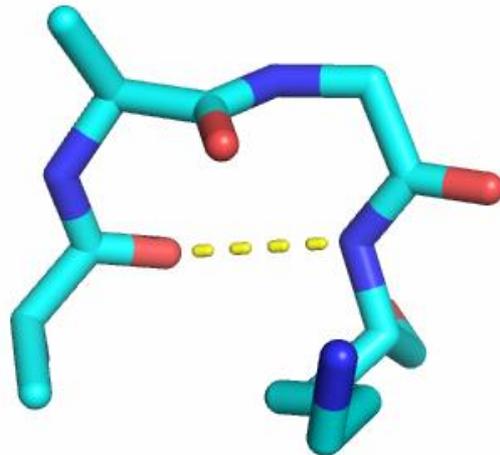
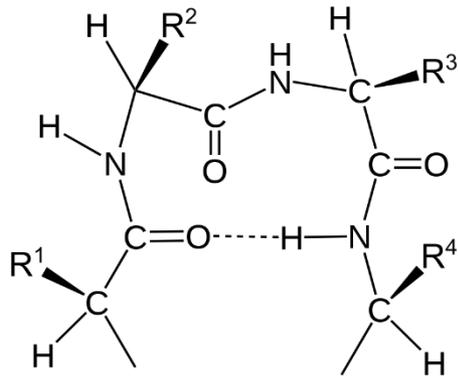


耐熱化

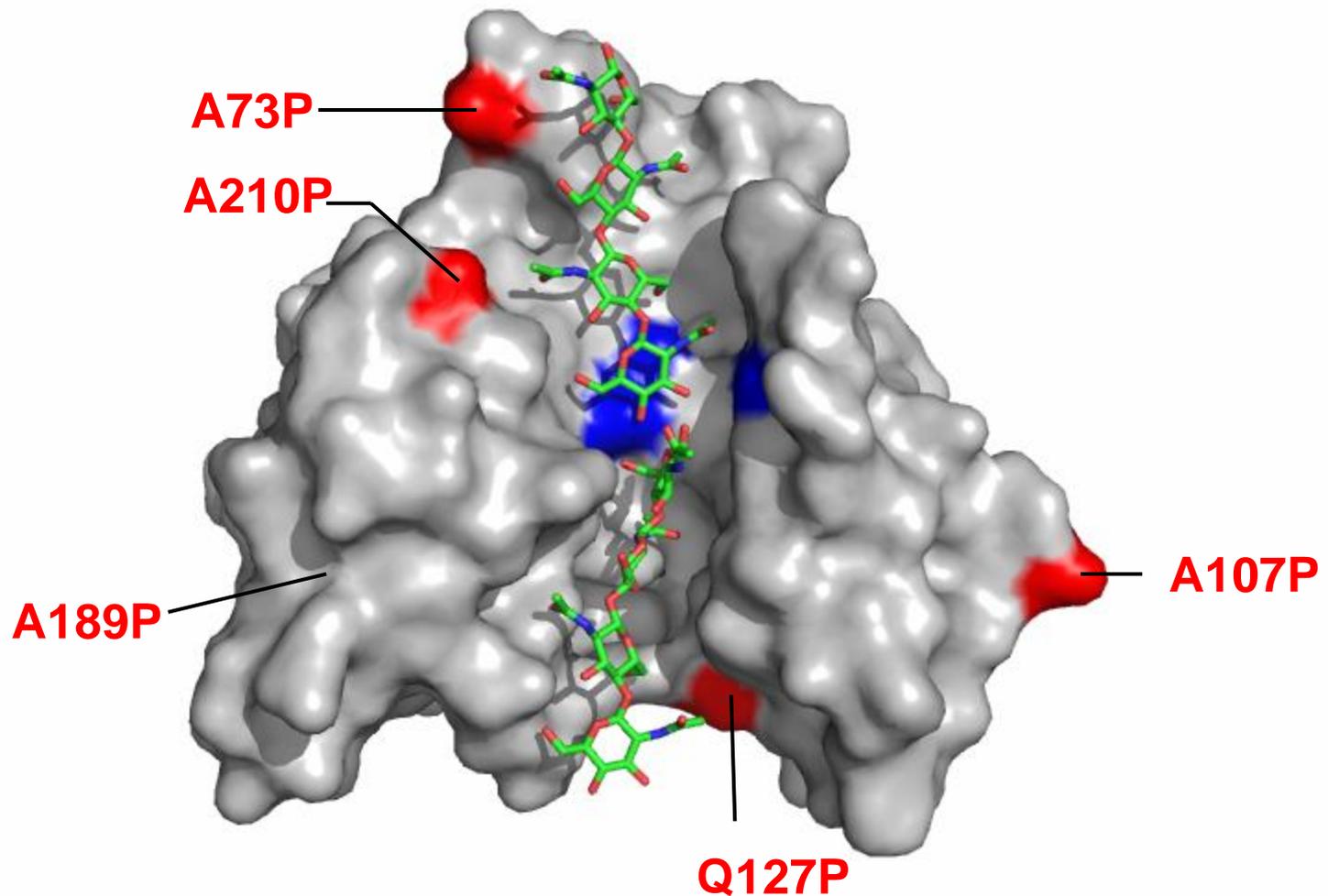
戦略1

プロリン導入

プロリン(P)はループ領域でβターンの形成を促す。
βターン中の水素結合によりループ領域が安定化



比活性を維持したまま耐熱性を上げるために活性中心から離れたループ領域中のアミノ酸残基を**プロリン(P)**に変える。



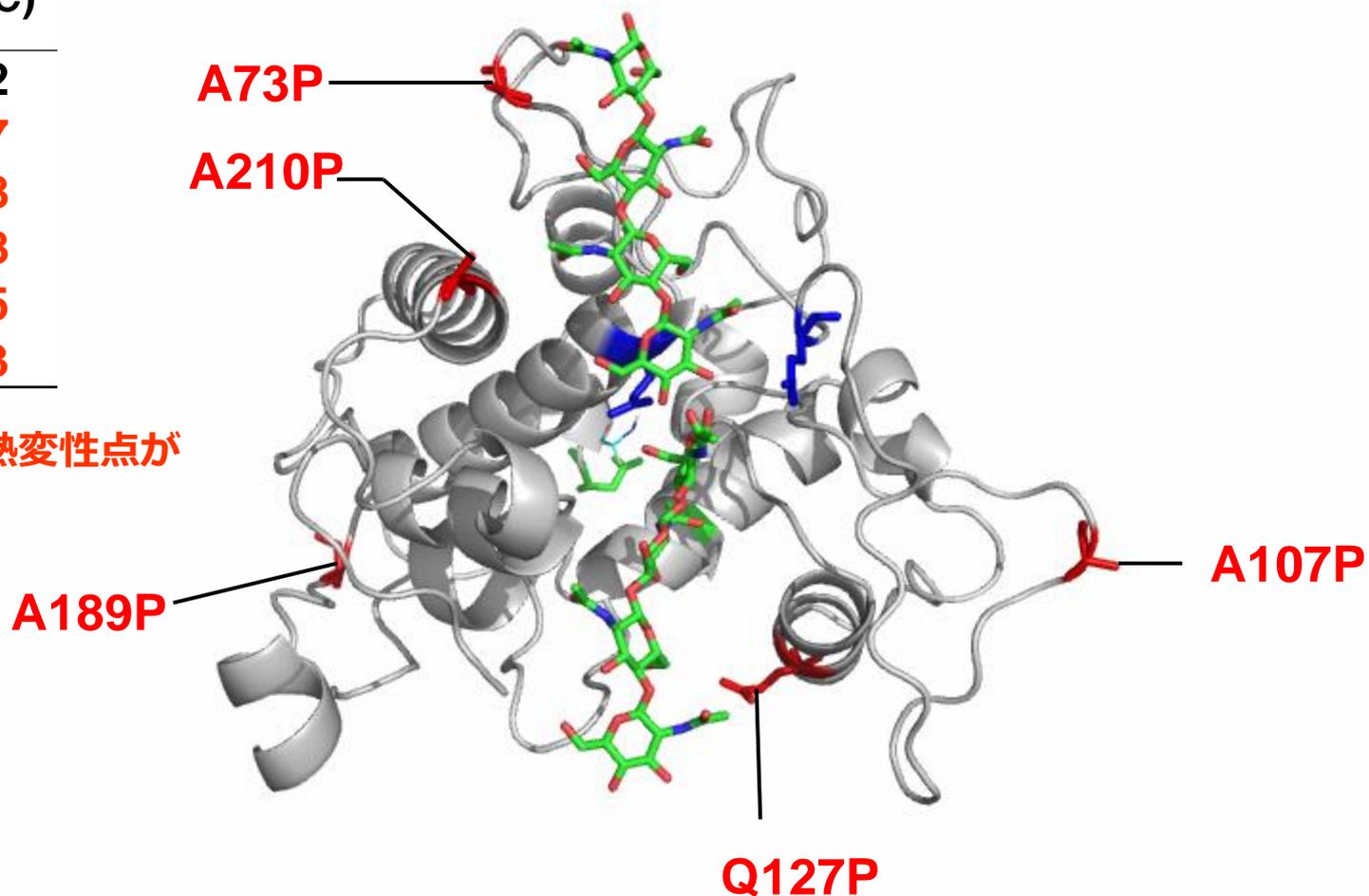
比活性を維持したまま耐熱性を上げるために活性中心から離れたループ領域中のアミノ酸残基を**プロリン(P)**に変える。

GlxChiB変異体の熱変性点

GlxChiB Tm (°C)

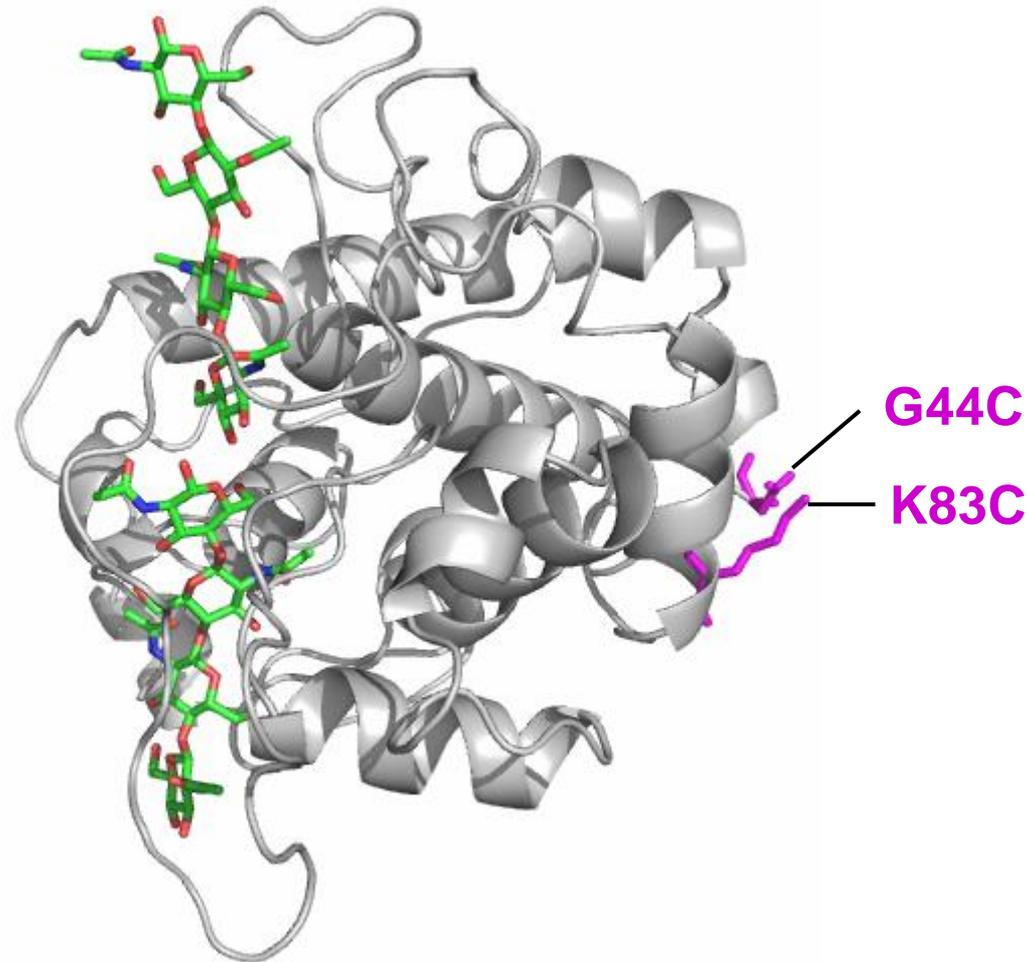
GlxChiB	Tm (°C)
WT	64.2
A73P	65.7
A107P	64.8
A189P	66.8
A210P	64.5
Q127P	65.3

全ての単変異体の熱変性点が上昇した。

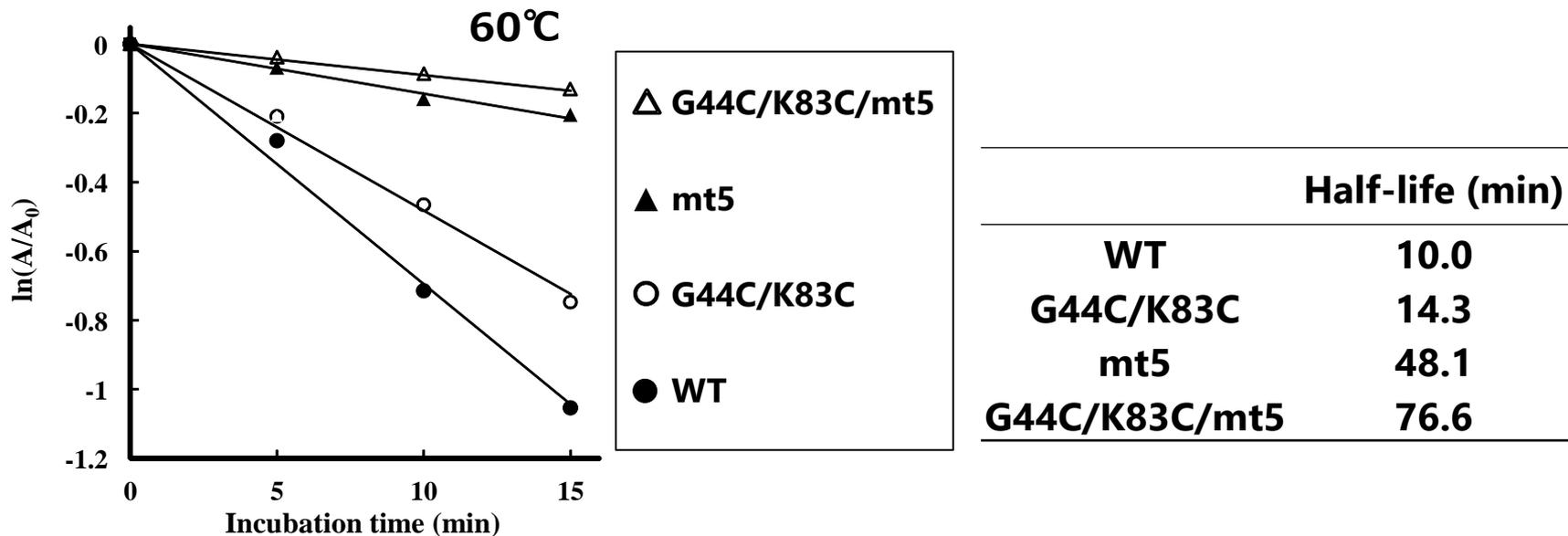


戦略2

比活性を維持したまま耐熱性を上げるために活性中心から離れた部分にジスルフィド結合を導入する。

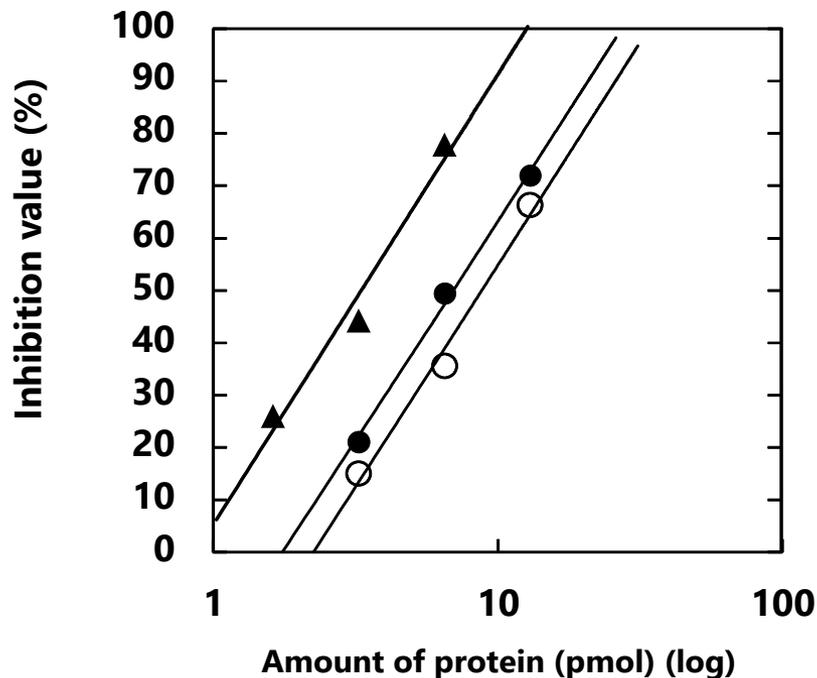


プロリン多重変異体およびジスルフィド結合導入変異体の耐熱性



- ✓ 野生型 (WT) と比較して、**プロリン5重変異体 (mt5)** の 60°Cにおけるハーフライフが、**4.8倍**に延長！
- ✓ **プロリン5重変異体 (mt5)** に**ジスルフィド結合**を導入すると、60°Cにおけるハーフライフが、**7.7倍**に延長！

多重変異体の抗カビ活性とキチン分解活性



▲ G44C/K83C/mt5
○ G44C/K83C
● WT

	Specific activity (U/mol)*	Antifungal activity IC ₅₀ (μM)
WT	5.40×10^9	1.39
G44C/K83C	6.06×10^9	1.75
G44C/K83C/mt5	5.88×10^9	0.66

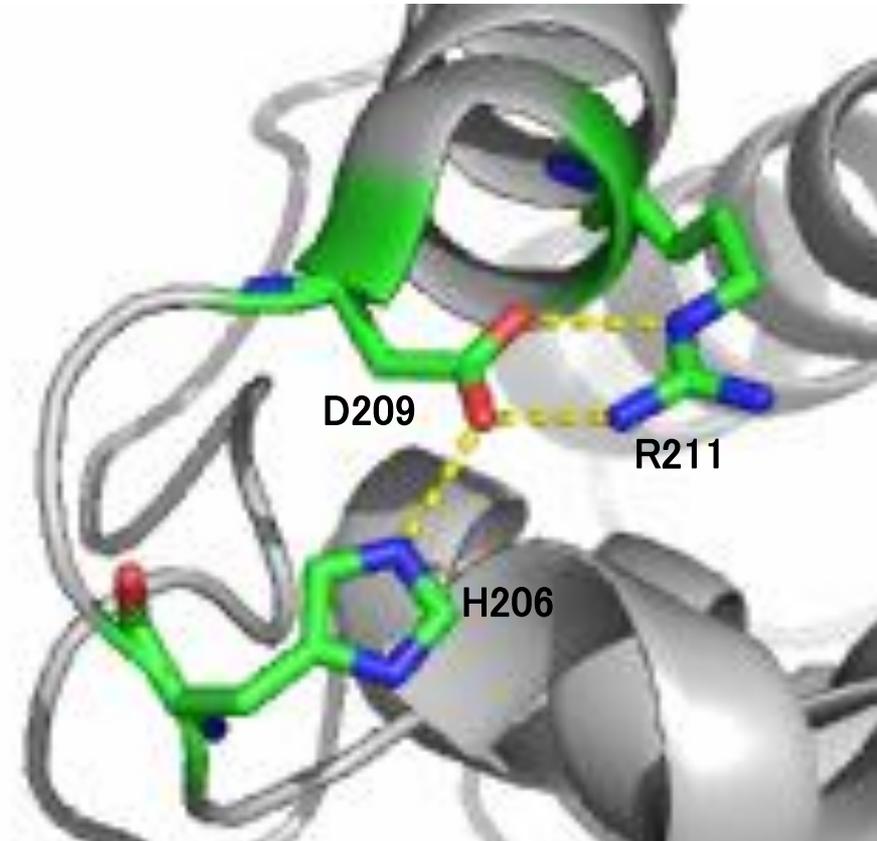
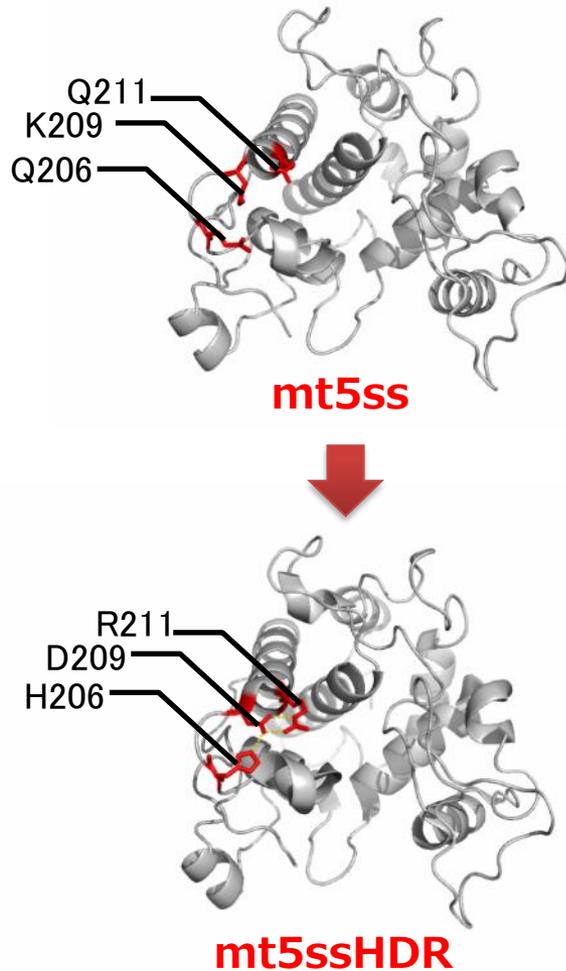
*Chitinase activities were measured with glycolchitin as a substrate. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that released 1 μmol of GlcNAc per min.

多重変異体のキチン分解活性は維持され、プロリン5重変異体 (mt5) にジスルフィド結合を導入すると、抗カビ活性は上昇した。

戦略3

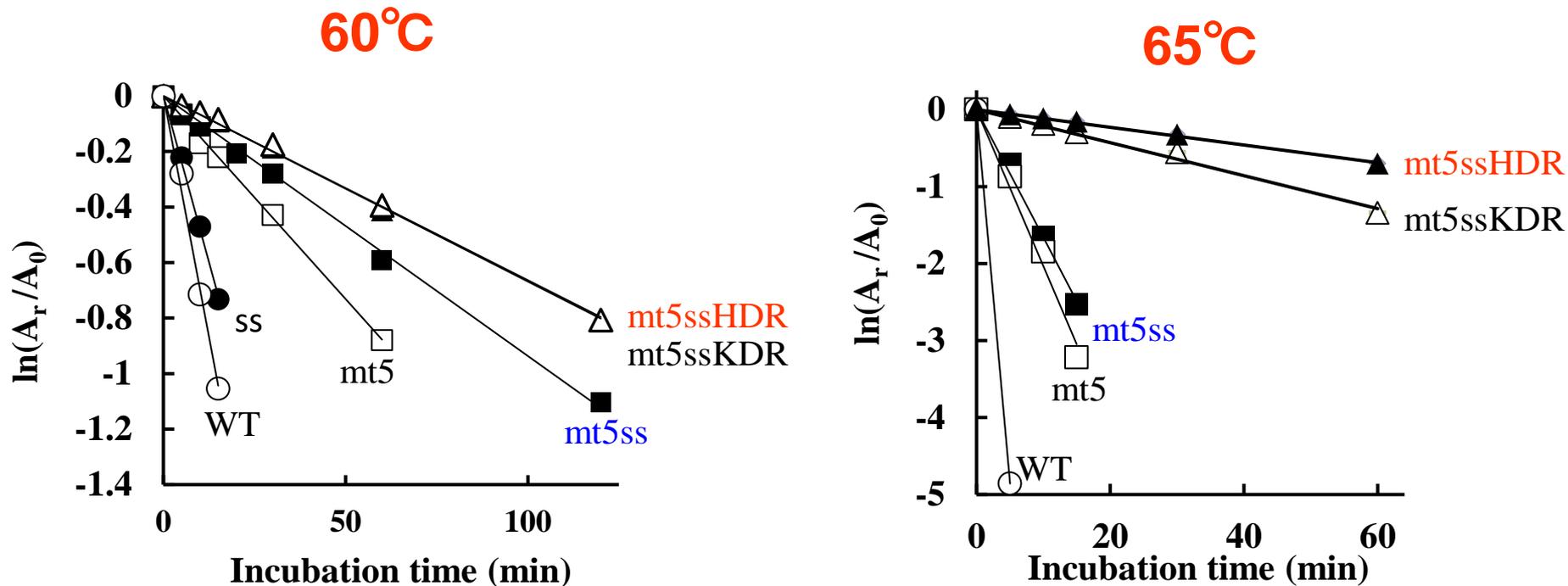
比活性を維持したまま耐熱性を上げるために活性中心から離れた部分に**塩橋**を導入する。

Q206/K209/Q211 → H206/D209/R211



塩橋導入変異体の耐熱性

mt5ssに塩橋を付加した, **mt5ssHDR**は60℃におけるHalf-lifeはWTよりも約**15**倍にまで延長していた。65℃では, **90**倍にまで延長された。



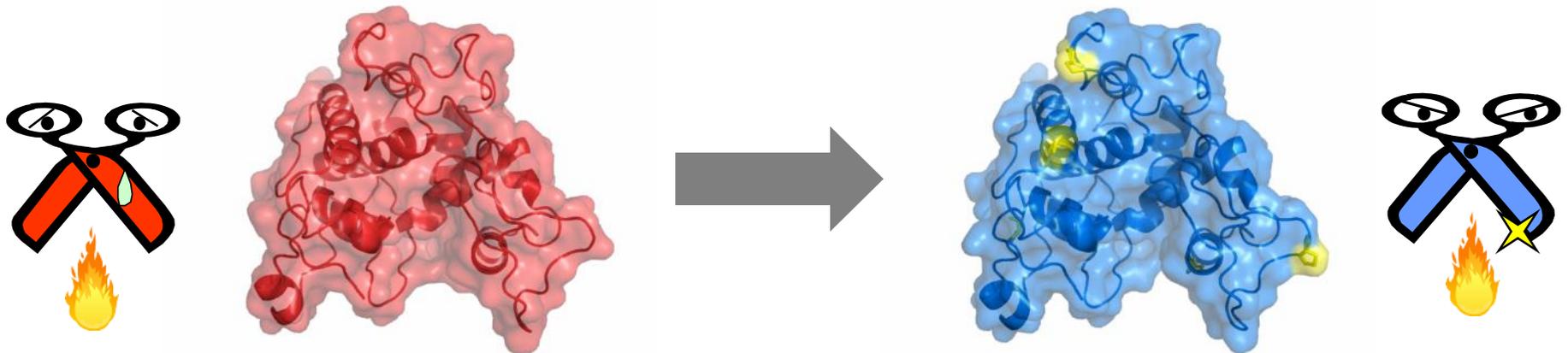
	Tm (°C)	Half-life (min)	
		60°C	65°C
WT	64.2	6.9	0.7
mt5ss	67.0 (+2.8)	73.8	3.9
mt5ssHDR	71.1 (+6.9)	103.9	63.3

各種変異体の耐熱性・キチン分解活性および抗真菌活性

	DSC*		Specific activity** (U/mol)	Antifungal activity (μ M)	Half-life (min)	
	T _m (°C)				60°C	65°C
WT	64.2		5.40×10^9	1.56 ± 0.562	6.9 ± 0.51	0.7 ± 0.08
G44C/K83C	64.2	(+ 0)	6.06×10^9	1.58 ± 0.200	14.5 ± 0.54	-
A117P	65.7	(+ 1.5)	4.40×10^9	1.54 ± 0.310	13.8 ± 0.32	-
A151P	64.8	(+ 0.6)	4.64×10^9	1.36 ± 0.064	9.9 ± 0.54	-
Q171P	65.3	(+ 1.1)	5.40×10^9	1.32 ± 0.018	15.1 ± 0.59	-
A233P	66.8	(+ 2.6)	5.56×10^9	1.40 ± 0.110	17.0 ± 0.46	-
A254P	64.5	(+ 0.3)	4.59×10^9	1.49 ± 0.027	14.7 ± 0.89	-
Q250K/K253D/Q255R	65.6	(+ 1.4)	7.38×10^9	1.21 ± 0.024	13.7 ± 1.20	-
Q250R/K253D/Q255R	65.8	(+ 1.6)	7.50×10^9	1.06 ± 0.094	10.8 ± 0.19	-
mt5	67.2	(+ 3.0)	4.74×10^9	0.69 ± 0.130	47.4 ± 1.39	3.3 ± 0.18
mt5ss	67	(+ 2.8)	5.88×10^9	0.69 ± 0.050	73.8 ± 2.49	3.9 ± 0.32
mt5ss/KDR	69.1	(+ 4.9)	4.31×10^9	1.58 ± 0.200	104.7 ± 7.21	33.2 ± 2.85
mt5ss/HDR	71.1	(+ 6.9)	5.13×10^9	1.94 ± 0.180	103.9 ± 3.34	63.3 ± 0.97

まとめ

多重変異体はWTと同程度の抗真菌活性を保持しつつ、
60℃におけるHalf-lifeはWTよりも、最大で約**15倍**
65℃では、**90倍**にまで延長された。



抗カビ酵素の活性を維持したまま、耐熱化に成功した！

名称 : 耐熱性を付与した抗真菌タンパク質, ならびにこれを有効成分とする薬剤とその使用
 出願人 : 国立大学法人琉球大学および国立研究開発法人産業技術総合研究所
 発明者 : 平良東紀, 石川一彦, 久保田智巳, 神初弾
 出願日 : 2019年11月5日
 出願番号 : 特願2019-200455

高抗カビ酵素の想定される用途

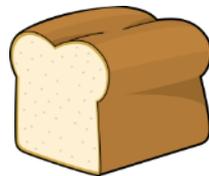
- 農作物における微生物防除（病原性のカビに対して）
- 洗濯洗剤（洗濯槽のカビに対して）
- 安全な生活洗剤（バス・トイレ・流しのカビに対して）
- バイオプリザベーション（食品の防カビ剤として）
- 実験試薬「真菌プロトプラスト作成用酵素剤」（真菌の形質転換に）
- 抗真菌薬（抗真菌剤との併用による効果増強。皮膚真菌症用軟膏等）
- ドラッグデリバリー（カビ細胞壁特異的キチン結合能の利用）
- 真菌症の早期診断（血清中のキチンオリゴ糖検出・患部の細胞壁キチン検出に）



病原抵抗性
作物の創出



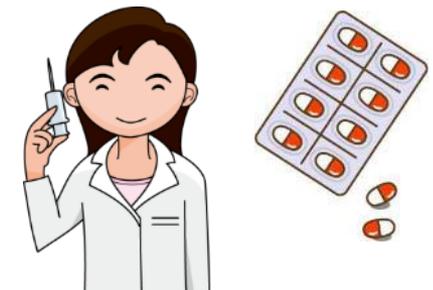
生活用洗剤



バイオプリザ
ベーション



真菌のプロトプラス化
酵素材



抗真菌薬・DDS・診断薬