微生物由来アミノ酸修飾酵素の探索と物質生産への応用

研究代表者　原　良太郎
（理工学研究所　次席研究員）

１．研究課題

現代社会における環境，食糧，エネルギーなどの問題解決に向け，バイオテクノロジーへ寄せられる期待は大きい。化学工業においても，従来型の化石資源に依存したプロセスからの脱却の必要性が求められる中，生物が有する高度な機能を産業に利用する動きが活発化してきている。本研究では，触媒機能を有するタンパク質（酵素）に着目し，医薬品やその合成原料，化成品として求められているアミノ酸誘導体，特にヒドロキシアミノ酸の生産に有用な酵素の探索と解析を行うとともに，ヒドロキシアミノ酸の効率的合成プロセスへの応用を検討した。

２．主な研究成果

ヒドロキシリジンは，ヒドロキシプロリンと同様にコラーゲン中に見られるアミノ酸であり，タンパク質のリジン残基が lysyl hydroxylase により水酸化されることにより生成する。ヒドロキシリジンは医薬品合成における重要な中間体として工業的な製法が求められているが，遊離の状態では天然にはほとんど存在せず，合成経路も明らかにされていない。そこで本研究では，リジンから一段階の水酸化でヒドロキシリジンを合成可能な新規酵素を探索するとともに，当該酵素を利用した実用的なヒドロキシリジン生産プロセスの開発を実施した。

２．１．ゲノム情報を利用したリジン水酸化酵素の探索

研究開始当初，リジン水酸化酵素は知られていなかったため，酵素探索に向けてリジンと構造が類似するアルギニンを水酸化する酵素（VioC）に着目した（Fig 1A)。当該酵素のアミノ酸配列情報をクエリーとした相同性検索を行い，該当する 93 種類のタンパク質を系統樹に基づき分類した。このうち，36 種類をリジン水酸化酵素の候補タンパク質として選択し，大腸菌において発現させ，菌体反応系で活性を評価した。その結果，6 種類の機能未知タンパク質においてリジン水酸化活性を見出した（Fig. 1B)。生成物の構造解析を実施した結果，2 種類の酵素反応において(2*S*,3*S*)-3-ヒドロキシリジン，4 種類の酵素反応において(2*S*,4*R*)-4 ヒドロキシリジンの合成を確認した。また，VioC による反応においても微弱ながら(2*S*,3*S*)-3-ヒドロキシリジンの合成活性が見られた。精製酵素系において酵素特性を検討した結果，いずれの反応も 2-オキソグルタル酸依存的に反応が進行した。これは，既に工業生産に利用されているプロリン水酸化酵素と共通する性質であり，比較的高活性であったため，生産への応用が期待できるものであった。

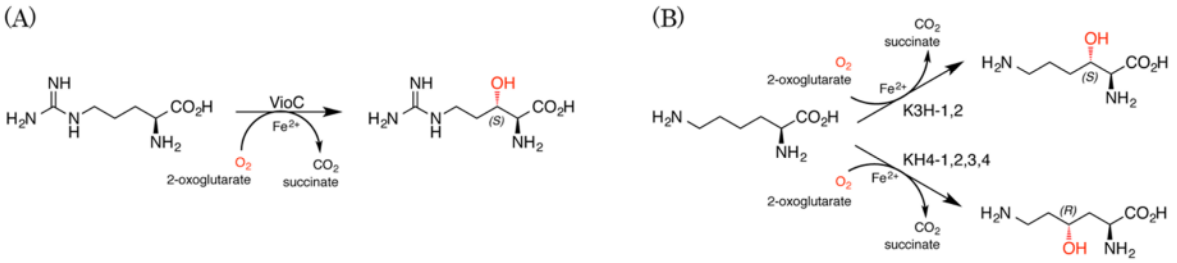

Fig. 1 (A) VioC によるアルギニン水酸化反応と (B) 本研究で見出した酵素によるリジン水酸化反応

２．２．菌体触媒を利用したヒドロキシリジン生産プロセスの開発

取得した 2 種類のリジン 3*S*-水酸化酵素（K3H-1, 2）と，4 種類のリジン 4*R*-水酸化酵素（K4H-1, 2, 3, 4）の中から，それぞれ生産に適した酵素を評価した。(2*S*, 3*S*)-3-ヒドロキシリジン生産においては *Kineococcus radiotolerans* 由来 K3H-1，(2*S*, 4*R*)-4-ヒドロキシリジン生産においては *Chryseobacterium gleum* 由来 K4H-4 が最も高活性であったため，以後の検討に用いることとした。

続いて，反応における最適条件を検討し，組換え大腸菌を菌体触媒とした反応系においてヒドロキシリジンの生産を実施した。その結果，600 mM の L-リジンから 531 mM の (2*S*, 3*S*)-3-ヒドロキシリジンを反応 52 時間で生産し，300 mM の L-リジンから 265 mM の (2*S*, 4*R*)-4-ヒドロキシリジンを反応 24 時間で生産することに成功した。以上により，きわめて効率的なヒドロキシリジン生産を達成した。

３．　共同研究者

木野　邦器（先進理工学部・応用化学科・教授）

４．　研究業績

4.1 学術論文

S. Watanabe, K. Tajima, S. Fujii, F. Fukumori, R. Hara, R. Fukuda, M. Miyazaki, K. Kino, Y. Watanabe “Functional characterization of aconitase X as a *cis*-3-hydroxy-L-proline dehydratase”, Sci. Rep., **6**, 38720 (2016).

4.2 総説・著書

4.3 招待講演

4.4 受賞・表彰

4.5 学会および社会的活動

原良太郎，北辻早希，山縣海，木野邦器“酵素法によるアルギニンからの 3-ヒドロキシオルニチンおよび *trans*-3-ヒドロキシプロリンの合成”第 68 回日本生物工学会大会，講演番号 1P-1p020，富山国際会議場（富山）2016 年 9 月

中島悠太，原良太郎，木野邦器“ヒスチジン水酸化酵素の特性解析と組換え大腸菌による 3-ヒドロキシヒスチジン生産”第 68 回日本生物工学会大会，講演番号 1P-1p021，富山国際会議場（富山）2016 年 9 月
木内愛海，原良太郎，山縣海，三宅良磨，川端潤，木野邦器“リジン水酸化酵素発現大腸菌を利用したヒドロキシリジン生産プロセスの開発”第 68 回日本生物工学会大会，講演番号 1P-1p022，富山国際会議場（富山）2016 年 9 月
鈴木伸，原良太郎，木野邦器“アミノアシルプロリン合成におけるピロフォスファターゼの効果と菌体反応系での生産”第 68 回日本生物工学会大会，講演番号 2P-1p005，富山国際会議場（富山）2016 年 9 月
平井健吾，原良太郎，木野邦器“Fatty acyl-AMP リガーゼを利用した脂肪酸アミド合成法の開発”第 68 回日本生物工学会大会，講演番号 2P-1p006，富山国際会議場（富山）2016 年 10 月
平井健吾，鈴木伸，原良太郎，木野邦器“酵素反応と化学反応の融合による新規アミノ酸アミド合成法の開発”酵素工学研究会大 76 回講演会，講演番号 B-14，東京大学山上会館（東京）2016 年 10 月
鈴木伸，原良太郎，木野邦器“新規ポリリン酸キナーゼによる AMP からの ATP 再生を利用したアミノアシルプロリン生産”第 6 回 CSJ 化学フェスタ 2016，タワーホール船堀（東京）2016 年 11 月
木内愛海，原良太郎，山縣海，北辻早希，三宅良磨，川端潤，木野邦器“リジン水酸化酵素を利用したヒドロキシリジン生産プロセスの構築とヒドロキシピペコリン酸生産への展開”
第 6 回 CSJ 化学フェスタ 2016，タワーホール船堀（東京）2016 年 11 月

５． 研究活動の課題と展望

本年度はヒドロキシリジンの効率的な生産を目的とし，プロセス開発を実施した。ヒドロキシリジン生産において鍵となる新規酵素の探索過程において，リジン水酸化酵素のみならず，ヒスチジンやグルタミンを水酸化する酵素や, VioC とは位置選択性が異なるアルギニン水酸化酵素の取得にも成功している。次年度は，今年度の知見と成果を踏まえ，ヒドロキシヒスチジンやヒドロキシグルタミンの効率的な生産プロセスの開発を目指す。