

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
(理工学術院総合研究所 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

2. 1. *trans*-3-ヒドロキシプロリン生産プロセスの検討

これまでに，エクトイン水酸化酵素がプロリン水酸化活性を有していることを報告している（2015 年度年次報告書）。本年度は，当該酵素発現大腸菌を菌体触媒として利用した *trans*-3-ヒドロキシプロリン（*trans*-3-Hyp）の生産プロセス開発を実施した。いくつかの反応系を検討した結果，ジャーファーメンターを利用したプロセスにおいて最も効率が良い *trans*-3-Hyp の生産が可能であった。酵素特性の解析結果を踏まえ，pH，温度，攪拌条件，基質濃度，菌体量などの条件を最適化し，*trans*-3-Hyp の生産を実施したところ，30 mM の L-プロリンから 27 mM の *trans*-3-Hyp を合成した（Fig.1）。

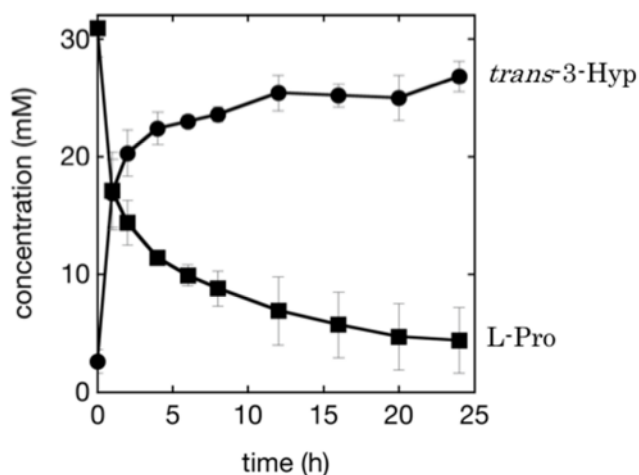


Fig. 1. 菌体反応系によるL-プロリンからの*trans*-3-Hyp生産.

2. 2. 新規アミノ酸水酸化酵素の開発

前年度，ゲノム情報を利用して構築した 37 種類のタンパク質から成るクラバミニン酸合成酵素ライブラリーにおいて，6 種類のリジン水酸化酵素を見出した（2016 年度年次報告書）。しかし，残りのタンパク質の機能は未解明なままであった。本年度は，リジン以外のアミノ酸を水酸化する酵素を探索すべく，機能未知タンパク質を用いて多様なアミノ酸水酸化能を

評価した。その結果、ヒスチジンを水酸化する酵素を取得した。当該酵素の反応特性を解析したところ、ヒスチジンのみならず、グルタミンも水酸化する活性も有していた (Fig. 2)。一般的に、酵素は構造が類似する化合物を認識することは知られているが、本酵素のようにヒスチジンとグルタミンのような明らかに構造が異なる化合物を基質とし、しかも同程度の親和性と活性を示すことは稀であり、生化学的にはきわめて興味深い。さらに、異なるタンパク質においてアルギニン水酸化活性を見出した。アルギニン水酸化酵素は既知であるが、取得した酵素により合成されたヒドロキシアルギニンは、既知化合物である(2*S*,3*S*)-3-ヒドロキシアルギニンとは明らかに異なる性質を示した。構造解析の結果、(2*S*,4*S*)-4-ヒドロキシアルギニンが生成していることが判明した。

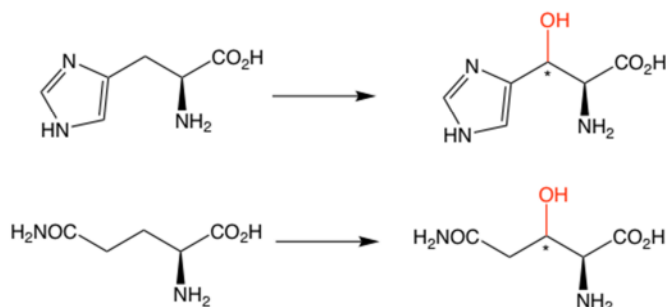


Fig. 2. 酵素によるヒスチジンとグルタミンの位置・立体的水酸化反応.

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

Ryotaro Hara, Kai Yamagata, Ryoma Miyake, Hiroshi Kawabata and Kuniki Kino, “Discovery of lysine hydroxylases in the clavaminic acid synthase-like superfamily for efficient hydroxylysine bioproduction”, *Appl. Environ. Microbiol.*, **83**(17), e00693-17, (2017).
 Ryotaro Hara, Kengo Hirai, Shin Suzuki, and Kuniki Kino, “A chemoenzymatic process for amide bond formation by an adenylating enzyme-mediated mechanism”, *Sci. Rep.*, **8**(1), 2950 (2018).

Shin Suzuki, Ryotaro Hara, and Kuniki Kino, “Production of aminoacyl prolines using the adenylation domain of nonribosomal peptide synthetase with class III polyphosphate kinase 2-mediated ATP regeneration”, *J. Biosci. Bioeng.*, in press.

4.2 総説・著書

なし

4.3 招待講演

なし

4.4 受賞・表彰

なし

4.5 学会および社会的活動

Ryotaro Hara, Kai Yamagata, Ryoma Miyake, Hiroshi Kawabata, and Kuniki Kino, “Discovery of Lysine Hydroxylases in the Clavaminate Acid Synthase-like Superfamily for Efficient Hydroxylysine Bioproduction”, BioTrans2017 (13th International Symposium in Biocatalysis and Biotransformations), 9-13 July 2017, Budapest, Hungary.

Shin Suzuki, Ryotaro Hara, and Kuniki Kino, “Aminoacyl Proline Production Coupled with ATP Regeneration System from AMP”, BioTrans2017 (13th International Symposium in Biocatalysis and Biotransformations), 9-13 July 2017, Budapest, Hungary.

村瀬諒大, 原良太郎, 梶沢 遼, 広川安孝, 木野邦器, “*Arthrobacter* sp. K8 由来オルセリン酸脱炭酸酵素の特性解析と当該酵素を利用した有用芳香族ヒドロキシカルボン酸合成”, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2A10p19, 名城大学(名古屋)

原良太郎, 梶沢遼, 広川安孝, 木野邦器, “芳香族ヒドロキシカルボン酸生産に有用な脱炭酸酵素の探索”, 日本生物工学会 2017 年度大会, 2P-G052, 要旨集 p.127, 早稲田大学(東京)

5. 研究活動の課題と展望

本年度は *trans*-3-Hyp の効率的生産プロセスの検討と、新規アミノ酸水酸化酵素の開発を実施した。*trans*-3-Hyp の生産において、90%以上のモル収率で *trans*-3-Hyp が合成可能となったが、実用化のためには基質濃度を高める必要がある。しかし、基質 L-プロリン濃度を高めると生産性が低下することが判明している。今後、人工的に酵素を改変し、活性を高めるなどの改良をすることで実用生産につなげていけると考えている。また、新たに見出したヒスチジン/グルタミン酸水酸化酵素は既知酵素とは基質特異性が明らかに異なるため、新規化合物の生産への応用展開が期待できるのみならず、基質認識メカニズムの解明に向けた X 線結晶構造解析などをおこない、生物におけるアミノ酸水酸化酵素の意義を分子レベルで解き明かしていきたい。