

微生物機能高度活用プロジェクト

研究代表者 木野 邦器
(先進理工学部 応用化学科 教授)

1. 研究課題

微生物や酵素による反応は、常温常圧において進行可能であり、高い立体選択性や位置選択性が発揮されることが期待される。本研究課題では、微生物や酵素の機能を高度に利用することで、有用性の高い水酸化化合物やペプチド、さらには、バイオマスを原料とした汎用化成品の合成プロセスを開発することを目的としている。本稿では、水酸化芳香族化合物の合成法の開発ならびにペプチド合成酵素の開発研究について報告する。

2. 主な研究成果

2.1 二成分型フラビン依存性モノオキシゲナーゼ HpaBC のピセアタンノール合成への応用

レスベラトロールの 3' 位が水酸化された構造を有するピセアタンノール (Fig. 1) は、近年、レスベラトロールより優れた生理活性を示すことが明らかにされつつあり、アンチエイジング素材として食品や化粧品への応用に関心が寄せられている。例えば、コラーゲン産生の促進やメラニン合成の抑制においてピセアタンノールの方が効果的であり、さらに体内吸収性（ラット）はレスベラトロールの約 2 倍であることが明らかにされている。ピセアタンノールは現在、パッションフルーツ種子からの抽出法等により生産されているが、予想される今後の需要増加に備えて新たな生産法を開発することは、その安定供給に向けて重要である。我々はこれまでに、*Pseudomonas aeruginosa* 由来の二成分型フラビン依存性モノオキシゲナーゼ HpaBC が *p*-クマル酸を水酸化してカフェ酸に変換できることを報告しているが (Furuya T, et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 98, 1145 (2014))、*p*-クマル酸とレスベラトロールの部分構造の類似性から HpaBC がレスベラトロールに対しても水酸化活性を示すのではないかと予想した。そこで本年度は、HpaBC のレスベラトロールに対する水酸化活性を評価してピセアタンノール合成への応用を試みた。

hpaBC 遺伝子を発現させた大腸菌をレスベラトロールと反応させたところ、HPLC 分析においてレスベラトロール変換産物と予想されるピークが検出された。本変換産物を NMR 分析に供したところ、レスベラトロールの 3' が水酸化されたピセアタンノールと同定された (Fig. 1)。そこで、HpaBC 発現大腸菌細胞を触媒としたピセアタンノール合成について検討した。本大腸菌細胞を 30 mM のレスベラトロールと反応させたところ、12 時間で 13 mM のピセアタンノールを生成した。さらに、界面活性剤の添加効果について検討したところ、反応液に Tween 80 を 1% (v/v) 添加することにより生成量は大幅に増加し、12 時間で 23 mM (5.2 g/L) のピセアタンノール合成を達成した。これまでに放線菌 *Streptomyces avermitilis* が 78 μ M のピセアタンノールを合成することが報告されているが、本研究では従来の約 300 倍の力価に値する効率的な合成手法を確立することができた。

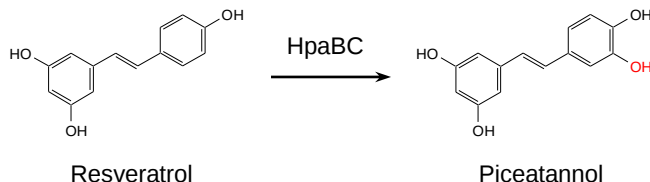


Fig. 1. Regioselective hydroxylation of resveratrol to piceatannol by HpaBC.

2.2 非リボソーム型ペプチド合成酵素におけるアデニル化領域タンパク質の基質特性評価

アミド結合は医薬品、機能性分子、化成品などの有機化合物や生体におけるタンパク質中に幅広く存在し、アミド結合形成反応は極めて重要である。一般に、アミド結合はカルボン酸とアミンの縮合によって形成されるが、カルボキシ基の反応性を高める活性化剤（縮合剤）が理論上等モル必要となるなどの課題がある。当研究室では、生物学的なカルボキシ基活性化に基づく非リボソーム型ペプチド合成酵素におけるアデニル化ドメインに着目し、カルボキシ基活性化と、それに続くアミンの非酵素的な求核攻撃によるアミド結合形成を見出している。

本研究では、アデニル化ドメインの簡便な基質特異性評価法の構築を試みた。通常、アデニル化ドメインの基質特異性の評価では、一度基質をアデニル化させた後、可逆性を利用し、過剰量の放射性同位体 ^{32}PPi を添加することで生じた放射性ラベル化 ATP を検出する。本手法は、放射性同位体を利用するため高感度ではあるが、煩雑な操作や特殊な装置を必要とするなど課題も多い。そこで、より簡便にアデニル化ドメインの基質特異性を評価できる可能性のあるヒドロキシルアミン比色分析に着目した。アデニル化ドメインによりアデニル化したアミノ酸に対して、求核剤であるヒドロキシルアミンを作用させることでアミド結合が形成され、ヒドロキサム酸が生成する。このとき、酸性条件、 Fe^{3+} の存在下で錯体を形成する ($\lambda_{\text{max}}=490$)。古典的な方法ではあるが、アデニル化ドメインに適用した例はほとんどない。そこで代表的なアデニル化タンパク質であるチロシジン合成酵素のアデニル化ドメイン (TycA-A) とタンパク質構成性アミノ酸 20 種類をアデニル化の基質として用い、反応後に比色分析を実施したところ、TycA-A は本来の基質であるフェニルアラニンのみならず、従来知られていないトリプトファンやチロシンなどの芳香族アミノ酸、メチオニン、バリン、ロイシンなどの脂肪族アミノ酸に対してもアデニル化活性を有していた (Fig. 2)。一方、ヒドロキシルアミンの代わりにプロリンを求核剤として作用させると、アミノアシルプロリンが生成するはずである。そこで、比色分析において活性が見られたアミノ酸とプロリンを用いたアミド結合形成を検討したところ、予想通りそれぞれに対応したアミノアシルプロリンの生成を確認した。さらに、基質特異性の異なるアデニル化ドメイン (SrfB2-A および BacB1-A) を利用することでアスパルチルプロリン、リジルプロリンも合成可能となった。

以上の結果から、今回検討した比色分析がアデニル化ドメインの簡便な基質特異性のみならず、アミノアシルプロリン合成能の簡便な評価法に適用可能であることを明らかにした。

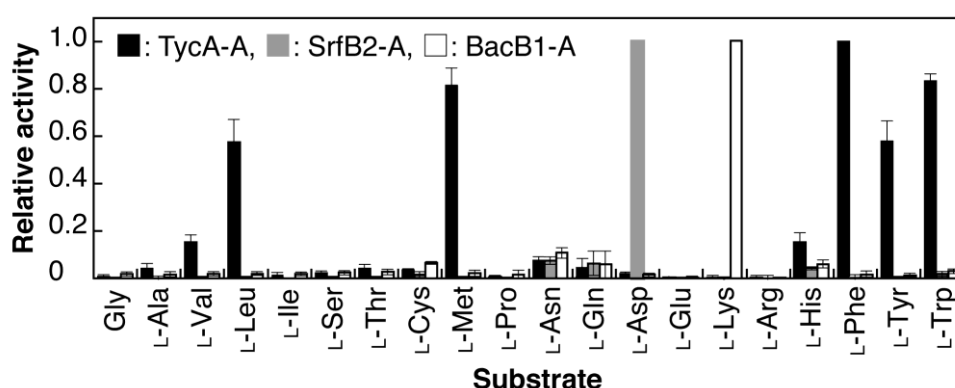


Fig. 2. Substrate specificities of the adenylation domains of tyrocidine synthetase (TycA-A), surfactin synthetase (SrfB2-A), and bacitracin synthetase (BacB1-A).

2.3 L-アミノ酸リガーゼ (Lal) の立体構造情報に基づく機能改変とポリアミノ酸合成酵素の結晶化

ジペプチドには血圧降下作用や抗うつ作用などの様々な機能が知られているが、我々は呈味、とくに「塩味増強」に着目し、Lal を用いて構築したジペプチドライブラリーから Met-Gly にその効果があることを見出した (木野ら、食品科学工学会誌、in press)。また、Met-Gly は Lal の一種である *Bacillus* 属由来の BL00235 を用いると効率よく合成可能であるが、副生成物として Met-Met も生じる。そこで、BL00235 の立体構造情報に基づいて C 末端基質認識に関わる推定部位に対して変異導入を検討したところ、Met-Gly のみを選択的に合成する改変型酵素の取得に成功した (Fig. 3)。Lal の部位特異的な変異導入による目的ジペプチドの選択的合成に成功した初めての例となる。

また、胡桃坂研究室の協力を得て、大腸菌由来ポリ- α -グルタミン合成酵素 RimK など 2 種類のリガーゼ酵素の結晶化と解析を検討した。RimK については単結晶の取得に成功し、得られた X 線回折像から分子置換法による解析によって立体構造の決定に至り、RimK の反応特異的な情報と基質認識部位の特定、及び RimK 改変戦略の方向性を得ることができた。

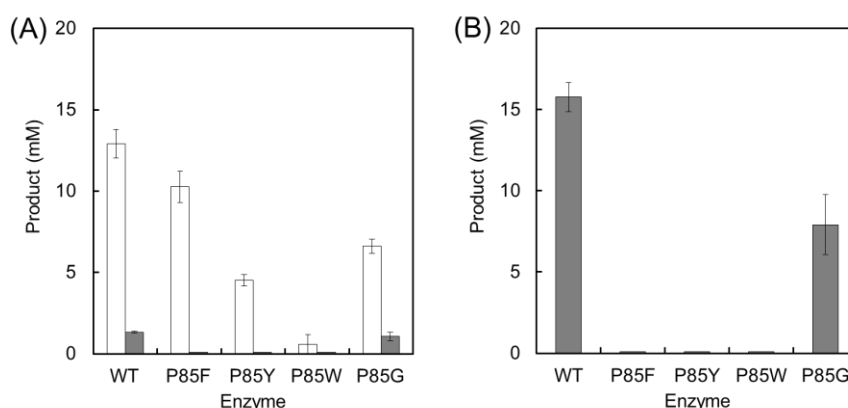


Fig. 3. Synthesis of Met-Gly or Met-Met by wild-type BL00235 or mutants. Reaction mixtures contained 20 mM Met and Gly (A) or 40 mM Met (B). Bars: white, Met-Gly; gray, Met-Met.

3. 共同研究者

胡桃坂 仁志(先進理工学部・電気・情報生命学科・教授)

古屋 俊樹(先進理工学部・応用化学科・助教)

原 良太郎(理工学術院・理工学研究所・次席研究員)

4. 研究業績

4.1 学術論文

1. R. Hara, N. Uchiumi, N. Okamoto, K. Kino, “Regio- and Stereoselective Oxygenation of Proline Derivatives by Using Microbial 2-Oxoglutarate-Dependent Dioxygenases”, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **78**(8), 1384-1388, (2014).
2. T. Furuya, M. Miura, K. Kino, “A Coenzyme-Independent Decarboxylase/Oxygenase Cascade for the Efficient Synthesis of Vanillin”, *ChemBioChem.*, **15**, 2248-2254, (2014).
3. T. Furuya, Y. Shitashima, K. Kino, “Alteration of the Substrate Specificity of Cytochrome P450 CYP199A2 by Site-Directed Mutagenesis”, *J. Biosci. Bioeng.*, **119**(1), 47-51, (2015).
4. K. Koketsu, Y. Shomura, K. Moriwaki, M. Hayashi, S. Mitsuhashi, R. Hara, K. Kino, Y. Higuchi, “Refined Regio- and Stereoselective Hydroxylation of L-Pipecolic Acid by Protein Engineering of L-Proline *cis*-4-Hydroxylase Based on the X-ray Crystal Structure”, *ACS Synth. Biol.*, **4**(4), 383-392, (2015).
5. R. Hara, R. Sizuki, K. Kino, “Hydroxamate-based Colorimetric Assay to Assess Amide Bond Formation by Adenylation Domain of Nonribosomal Peptide Synthetases”, *Anal. Biochem.*, **477**, 89-91, (2015).
6. T. Furuya, M. Misa, K. Mari, K. Kino, “High-Yield Production of Vanillin from Ferulic Acid by a Coenzyme-Independent Decarboxylase/Oxygenase Two-Stage Process”, *N. Biotechnol.*, **32**(3), 335-339, (2015).
7. R. Hara, M. Nakano, K. Kino, “One-Pot Production of L-threo-3-Hydroxyaspartic Acid Using Asparaginase-Deficient *Escherichia coli* Expressing Asparagine Hydroxylase of *Streptomyces coelicolor* A3(2)”, *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**(11), 3648-3654, (2015).
8. 木野はるか, 角谷政尚, 服部宏一, 東條博明, 駒井強, 南木昂, 木野邦器, “L-アミノ酸リガーゼを利用した塩味増強効果を有するジペプチドの探索” (Screening of Salt Enhancing Dipeptide Based on a New Strategy with L-Amino Acid Ligase), 食品科学工学会誌, in press.

4.2 総説・著書

1. 古屋俊樹, 木野邦器, “解説 二核鉄型酸化酵素の異種発現と高選択酸化プロセスへの応用”—Heterologous Expression of Binuclear Iron Monooxygenases and Their Application to Selective Oxidation Processes—, バイオサイエンスとインダストリー, **72**(3), 213-217 (2014).

4.3 (招待)講演

4.4 受賞・表彰

1. 木野はるか, 木野邦器, 日本農芸化学会 2015 年度大会トピックス賞受賞, “立体構造解析に基づく L-アミノ酸リガーゼの改変と塩味増強効果を有する Met-Gly の選択的合成法の開発”

4.5 学会および社会的活動

1. 木野はるか, 角谷政尚, 服部宏一, 東條博昭, 駒井強, 南木昂, 木野邦器, “L-アミノ酸リガーゼを利用した塩味増強効果を有するジペプチドの探索”, 第 68 回日本栄養・食糧学会大会 (北海道), 講演要旨集 p.308, 3O-13p, 2014.6.1
2. T. Furuya, K. Kino, “Regioselective Hydroxylation of Aromatic Carboxylic Acids by Cytochrome P450 CYP199A2 and Its Mutants”, 16th ECB (16th European Congress on Biotechnology, Edinburgh, UK (July 13-16, 2014).
3. 古屋俊樹, 齋政彦, 木野邦器, “*Pseudomonas aeruginosa* 由来二成分型フラビンモノオキシゲナーゼを利用したジヒドロキシ芳香族化合物の位置選択的合成”, 日本生物工学会 2014 年度大会 (北海道), 講演要旨集 p.35, 1P-072, 2014.9.9.
4. 古賀美千代, 古屋俊樹, 林未華, 木野邦器, “*Mycobacterium* 属細菌由来二核鉄型酸化酵素複合体の大腸菌における発現”, 日本生物工学会 2014 年度大会 (北海道), 講演要旨集 p.35, 1P-071, 2014.9.9.
5. 木野はるか, 角谷政尚, 服部宏一, 東條博昭, 駒井強, 南木昂, 木野邦器, “L-アミノ酸リガーゼを利用した塩味増強効果を有するジペプチドの探索と効率的な生産法の開発”, 日本生物工学会 2014 年度大会 (北海道), 講演要旨集 p.34, 1P-067 2014.9.9.
6. 橋田紋佳, 中島翔太, 新井利信, 木野邦器, “結晶構造情報に基づく L-アミノ酸リガーゼ TabS の基質特異性の改変”, 日本生物工学会 2014 年度大会 (北海道), 講演要旨集 p.391, 1P-088, 2014.9.9.
7. 原良太郎, 額田健人, 木野邦器, “2-オキソグルタル酸依存型水酸化酵素を利用したプロリンから *trans*-3-ヒドロキシプロリンへの直接水酸化”, 日本生物工学会 2014 年度大会 (北海道), 講演要旨集 p.35, 1P-103, 2014.9.9.
8. 原良太郎, 山縣海, 三宅良磨, 川端潤, 木野邦器, “微生物由来新規リジン水酸化酵素の発見”, 日本生物工学会 2014 年度大会 (北海道), 講演要旨集 p.35, 1P-104, 2014.9.9.
9. 北辻早希, 原良太郎, 木野 邦器, “オルニチンシクロデアミナーゼの酵素化学的性質解析と有用ヒドロキシイミノ酸の合成”, 日本生物工学会 2014 年度大会 (北海道), 講演要旨集 p.35, 1P-105, 2014.9.9.
10. 黒岩麻里, 三浦美沙, 古屋俊樹, 木野邦器, “補酵素非依存型脱炭酸酵素と酸化酵素を利用したバニリンの効率的合成”, 第 4 回 CSJ 化学フェスタ 2014 (東京), 講演要旨集 p.37, P6-063, 2014.10.5.
11. 古屋俊樹, 齋政彦, 木野邦器, “フラビン依存性酸化酵素を利用したレスベラトロールの位置選択的酸化によるピセアタンノールの合成”, 日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山), 講演要旨集 3A34a06, 2015.3.28.
12. 原良太郎, 山縣海, 三宅良磨, 川端潤, 木野邦器, “ヒドロキシリジン合成に有用な位置・立体選択的水酸化酵素の開発”, 日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山), 講演要旨集 3A34a07, 2015.3.28.
13. 北辻早希, 山縣海, 原良太郎, 木野邦器, “オルニチンシクロデアミナーゼを利用した有用ヒドロキシイミノ酸合成プロセスの開発”, 日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山), 講演要旨集

3A34a08, 2015.3.28.

14. 原良太郎, 西川健幸, 額額健人, 木野邦器, “エクトイン水酸化酵素の特性解析とヒドロキシプロリン類縁化合物合成への応用”, 日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山), 講演要旨集 3A34a09, 2015.3.28.
15. 木野はるか, 木野邦器, “立体構造解析に基づく L-アミノ酸リガーゼの改変と塩味増強効果を有する Met-Gly の選択的合成法の開発”, 日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山), 講演要旨集 3A34a10, 2015.3.28.

5. 研究活動の課題と展望

水酸化芳香族化合物の合成研究では、*P. aeruginosa* 由来の二成分型フラビン依存性モノオキシゲナーゼ HpaBC がレスベラトロールを水酸化してピセアタンノールに変換できることを新たに見だし、有用な天然生理活性物質であるピセアタンノールの効率的合成手法を確立した。現在、ピセアタンノールのさらなる高生産に向けて検討中である。また最近、HpaBC のスチルベン類に対する新規な水酸化活性を見いだしており、本水酸化産物の構造決定や高生産についても検討する予定である。

アミド結合形成では、従来よりも簡便な比色法によるアデニル化ドメインの基質特異性評価法を構築した。今後、アミド化合物の汎用的合成法を開発するために、非リボソーム型ペプチド合成酵素のアデニル化ドメインに限定せず、アシル-CoA リガーゼ、ルシフェラーゼなどのカルボキシ基活性化酵素も検討することが重要と考えている。今回構築した手法を用いることで、多様なカルボキシ基活性化酵素の基質特異性を効率的かつ簡便に評価できると期待している。

ペプチド合成酵素の開発研究では、結晶構造情報に基づいた部位特異手的変異導入により目的のジペプチドの選択的合成が可能な改変型酵素の取得に成功した。Lal の研究は、これまでは基質特異性の異なる新規 Lal の探索が中心であったが、今年度の成果として報告したように、塩味増強効果を有するジペプチドの探索ならびに Lal の基質特異性改変による目的ジペプチドの選択的合成など利用法の提案と具体的な生産プロセス開発研究へと移りつつある。今後も保有する Lal の中から目的にあった Lal を選択し、それを利用した目的ジペプチドの合成検討や Lal の機能改変を行う予定である。

また、酵素の立体構造解析については、RimK の単結晶の立体構造情報を得ることはできたが、酵素機能の任意改変などの実現には、基質と複合体を形成した RimK の立体構造情報が必須である。今後は、ADP などの補因子や基質との複合体の結晶化ならびに立体構造解析を行う予定である。