

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 理工研が募集する次席研究員)

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実施した。

2. 主な研究成果

ヒドロキシプロリン(Hyp)は細胞外マトリックスであるコラーゲンの構成成分として知られるイミノ酸であり、天然には非常に多く存在する。そのほとんどは *trans*-4-Hyp であり、わずかながら *trans*-3-Hyp も存在している。これらの Hyp はタンパク質中のプロリン残基が水酸化酵素による翻訳後修飾を受け、生合成される。

Hyp は消炎剤、カルバペネム系抗生物質などの医薬原料として工業的に重要であるほか、近年の研究においてコラーゲン合成を活性化するなどの報告もあり、注目されている。既に多くの Hyp 合成においては化学合成法や酵素法が報告されており、特に酵素法による水酸化反応は Hyp の工業生産にも利用されている。しかし、Hyp 異性体のうち、*trans*-3-Hyp のみ効率的な合成が困難である。その要因として、天然における *trans*-3-Hyp の存在量が極めて低く、動物試料などからの抽出が困難であることや、化学合成法では多段階反応が必要となり、副生物が生じることなどがある。本研究では、温和な条件下で過剰な副生物を生じず、効率的に *trans*-3-Hyp を合成可能な 2 つの酵素反応プロセスを開発した。

2. 1. 3 段階反応による *trans*-3-Hyp の合成

既に構築している 3 種類の酵素を利用したアルギニンから *trans*-3-Hyp への合成結果 (ASTE Vol.21, 2013) を踏まえ、今年度は各種酵素の特性解析および *trans*-3-Hyp 合成収率の向上を目的とした反応条件の最適化を図った。

Mesorhizobium loti 由来アルギナーゼ、オルニチンシクロデアミナーゼをそれぞれ単独で大腸菌において発現させ、酵素精製を行い、各酵素の反応速度論的解析を実施した (Table 1)。その結果、アルギナーゼに対する親和性はアルギニンよりもヒドロキシアルギニンのほうが低く、活性も低いものであった。また、オルニチンシクロデアミナーゼに対する親和性は、オルニチンとヒドロキシオルニチンでほとんど差が無かったものの、ヒドロキシオルニチンに対する活性は極めて低かった。

Table 1 アルギナーゼおよびオルニチンシクロデアミナーゼの反応速度論的解析

酵素	基質	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat} / K_m ($s^{-1} mM^{-1}$)
アルギナーゼ	L-Arg	4.58 ± 1.32	30.1 ± 1.67	6.58
	3-hArg	32.7 ± 7.37	1.51 ± 0.16	4.60×10^{-2}
オルニチンシクロ	L-Orn	5.79 ± 0.49	20.5 ± 0.53	3.54
デアミナーゼ	3-hOrn	6.25 ± 0.40	$7.36 \times 10^{-4} \pm$ 1.65×10^{-5}	1.18×10^{-4}

続いて、酵素系において反応条件の最適化を行い、*trans*-3-Hyp の合成を実施した。その結果、アルギニン水酸化反応、アルギナーゼ反応は収率がほぼ 100%で進行したが、オルニチンシクロデアミナーゼ反応は収率が約 50%であった (Fig. 1)。この結果から、オルニチンシクロデアミナーゼ反応が *trans*-3-Hyp 合成における律速段階であることがわかった。

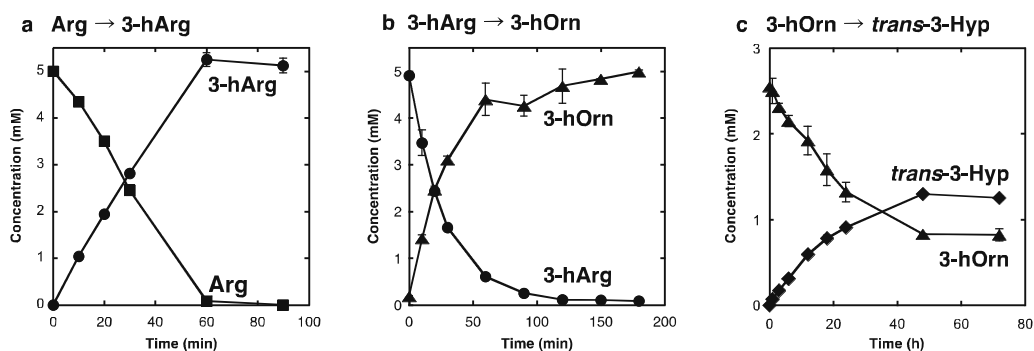


Fig. 1 各酵素反応における経時変化. a, アルギニン水酸化酵素; b, アルギナーゼ; c, オルニチンシクロデアミナーゼ.

2. 2. 水酸化反応による *trans*-3-Hyp の合成

trans-3-Hyp 以外の Hyp は水酸化酵素の一種である 2-オキシグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼにより、遊離プロリンから合成できる。また、コラーゲン合成においてプロリン残基を水酸化するプロリル水酸化酵素も同様のジオキシゲナーゼである。したがって、プロリンから *trans*-3-Hyp を合成可能な水酸化酵素も同じタイプの酵素であると推察した。

既知 2-オキシグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼのうち、酵素基質がプロリンと構造が類似するものをデータベースから検索した。このうち、エクトインを水酸化すると予想される 5 種の酵素を大腸菌において発現させ、酵素精製の後にプロリン水酸化活性を検討したところ、エクトインのみならずプロリンも水酸化することが判明し、このうち好塩菌と放線菌の酵素が特に高活性であることが明らかになった (Fig. 2)。当該酵素の速度論的解析の結果、生理的な基質であるエクトインとプロリンの親和性比較では、エクトインの方が親和性は高く、プロリンに対しては低かった。また、酵素活性はプロリンよりもエクトインに対するもののほうが約 20 倍高いものであった。

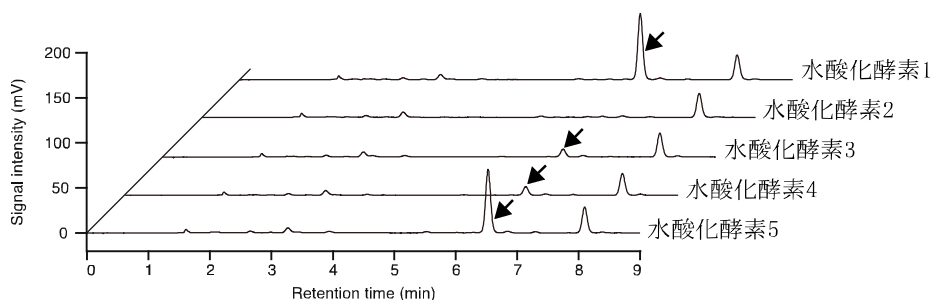


Fig. 2 酵素反応後のHPLC分析結果. 矢印が *trans*-3-Hypを示す.

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

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).

R. Hara, S. Kitatsuji, K. Yamagata, K. Kino, “Development of a multi-enzymatic cascade reaction for the synthesis of *trans*-3-hydroxy-L-proline from L-arginine” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 243–253 (2016).

4.2 総説・著書

4.3 招待講演

原良太郎 “微生物酵素の開発と産業への応用” 日本学術振興会「先端ナノデバイス・材料テクノロジー第 151 委員会」平成 27 年度 第 4 回研究会, 早稲田大学 (東京) 2015 年 12 月

4.4 受賞・表彰

4.5 学会および社会的活動

北辻早希, 原良太郎, 木野邦器 “選択的 *trans*-3-ヒドロキシプロリン合成経路の構築と多様なヒドロキシイミノ酸合成への展開” 第 5 回 CSJ 化学フェスタ 2015, タワーホール船堀 (東京) 2015 年 10 月

原良太郎, 中野雅至, 北辻早希, 山縣海, 木野邦器 “アミノ酸水酸化酵素と加水分解酵素の組み合わせによるヒドロキシアミノ酸の合成” 酵素工学会第 74 回講演会, 講演番号 B-4, 講演要旨集 p61, 東京大学山上会館 (東京) 2015 年 10 月

西川健幸, 原良太郎, 木野邦器 “エクトイン水酸化酵素発現大腸菌によるヒドロキシプロリン類縁化合物の生産” 酵素工学会第 74 回講演会, 講演番号 B-6, 講演要旨集 p63, 東京大学山上会館 (東京) 2015 年 10 月

鈴木伸, 原良太郎, 木野邦器 “*pepQ* および *putA* 欠損大腸菌の休止菌体を利用したアミノアシルプロリン生産” 酵素工学会第 74 回講演会, 講演番号 B-7, 講演要旨集 p64, 東京大

学山上会館（東京）2015 年 10 月

5. 研究活動の課題と展望

3 段階反応による *trans*-3-Hyp 合成において、オルニチンシクロデアミナーゼの反応が律速段階であることが課題となったため、*trans*-3-Hyp の効率的合成を達成するには、より高活性な酵素に改変することや、別途スクリーニングを継続していく必要があると考えている。また、水酸化反応における *trans*-3-Hyp の合成の課題として、精製酵素系においては既知 *trans*-4 水酸化酵素、*cis*-4-水酸化酵素と比較してプロリンに対する水酸化活性が 10 倍以上低かったため、現状では *trans*-3-Hyp の効率的合成は困難である。今後は工業生産に利用されている菌体反応系を検討し、*trans*-3-Hyp の効率的合成を図っていく。