

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

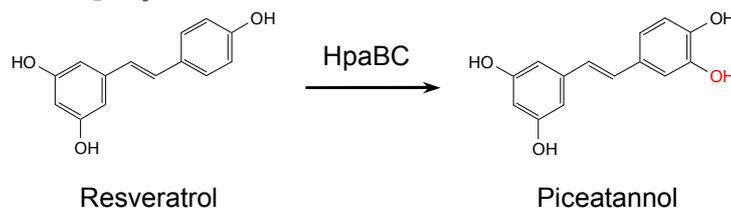
微生物や酵素による反応は、常温常圧において進行可能であり、高い立体選択性や位置選択性が発揮されることが期待される。本研究課題では、微生物や酵素の機能を高度に利用することで、有用性の高い水酸化化合物やペプチド、さらには、バイオマスを原料とした汎用化成品の合成プロセスを開発することを目的としている。本稿では、水酸化芳香族化合物の合成法の開発ならびにペプチド合成酵素の開発研究について報告する。

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は、近年、抗酸化活性や抗癌活性等の多様な生理活性を示すことが明らかにされている注目すべき天然化合物であり、一部ではレスベラトロールよりも優れたアンチエイジング素材として食品や化粧品への応用に關心が寄せられている。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 がレスベラトロールをピセアタンノールに変換できることを見出し、HpaBC 発現大腸菌を触媒として 30 mM のレスベラトロールから 23 mM (5.2 g/L) のピセアタンノール生産を達成している (Tetrahedron Lett., 55, 2853 (2014))。しかしながら、生成物阻害により、基質がまだ残存しているにも関わらず反応が停止してしまうことも判明した。

そこで、芳香族化合物を包接する作用が知られているシクロデキストリンの添加効果について検討した。その結果、 β -および γ -シクロデキストリンを添加したときに生成物阻害の緩和が観察された。 β -シクロデキストリンの方が γ -シクロデキストリンよりも添加効果が顕著に現れたため、 β -シクロデキストリン存在下にて、フラスコスケールでのピセアタンノール生産について経時的に検討した (Fig.1)。まず、シクロデキストリンを添加しない場合には、50 mM のレスベラトロールから 4 時間で 20 mM のピセアタンノールを生成したが、それ以降反応が停止してしまった。一方、 β -シクロデキストリンを 50 mM 添加した場合には、4 時間以降も反応が停止することなく効率的に進行することが明らかとなった。最終的には、24 時間で 49 mM (12 g/L) のピセアタンノール生産を達成した。以上のように、シクロデキストリンを添加することによりピセアタンノール生産量を大幅に向上させることができた。



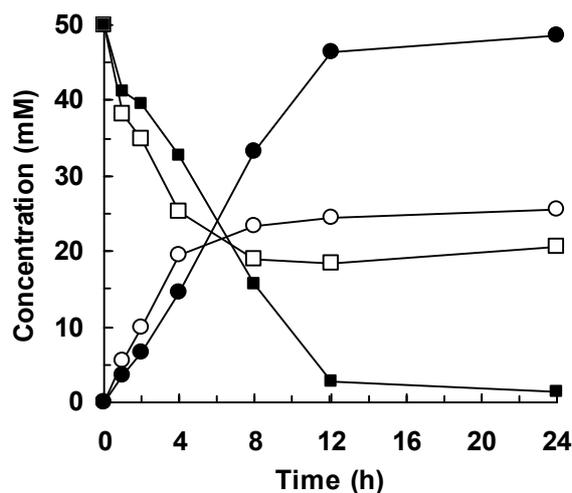


Fig. 1 HpaBC 発現大腸菌によるシクロデキストリン存在下でのレスベラトロールからのピセアタンノール生産
β-シクロデキストリン非存在下 (□、○)、もしくは 50 mM の β-シクロデキストリン存在下 (■、●) で反応させた。□、■、レスベラトロール; ○、●、ピセアタンノール

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

アミノアシルプロリン(Xaa-Pro)には血圧降下作用や抗糖尿病作用を示すものがあり、医薬品や機能性食品の原料として有用である。我々は非リボソーム型ペプチド合成酵素(NRPS)のアデニル化ドメインを利用することで、これまで困難であった Xaa-Pro の酵素的合成に成功している(R. Hara, *et al.*, *Anal. Biochem.*, **477**, 89-91, (2015))。しかし、ATP を必要とする本反応では多量の ATP 添加は高コストとなるため、反応で生じる AMP からの ATP 再生システムの導入を考え、経済的な Xaa-Pro の生産プロセスの開発を検討した。

AMP からの ATP 再生については報告例が少ない。既報では AMP から ADP を経由して ATP を合成する二段階の反応にそれぞれ異なる酵素が必要であり、反応系が煩雑になることが課題であった。一方で、単独でこれら両反応を触媒可能なポリリン酸キナーゼ(class III PPK2)が近年報告された。本酵素を用いると、AMP は ADP を経由して ATP を合成できるため、よりシンプルな反応プロセスの構築を期待して、ATP 消費反応プロセスにおける ATP 再生系への適用を考えた (Fig. 2)。

ペプチド性抗菌物質である Tyrocidine は NRPS によって生合成されるが、そのアデニル化ドメイン(TycA-A)を用いると、L-トリプトファンと L-プロリンを基質とすると ATP 存在下で L-Trp-L-Pro が合成される。この反応系に class III PPK2 に属するポリリン酸キナーゼによる ATP 再生系を共役させてみた。まず、*Deinococcus radiodurans* R1 由来 DR_0132 のアミノ酸配列情報をもとに、配列上の類似性と class III PPK2 の保存残基の存在を指標としてホモログタンパク質の探索を行い、*D. proteolyticus* MRP 由来 Deipr_1912 を見出すことに成功した。L-Trp-L-Pro の合成には ATP が必要であり、AMP では本来反応は進行しないが、class III PPK2 に属するポリリン酸キナーゼである Deipr_1912 を導入することで、AMP を初発基質とした場合にも L-Trp-L-Pro の合成を観察することができた。さらに、添加 ATP 量を上回る合成量を達成することができた。

本結果から、class III PPK2 による AMP からの ATP 再生系が有効に機能しており、ATP 添加量を低減させた Xaa-Pro 生産が可能であることを明らかにした。

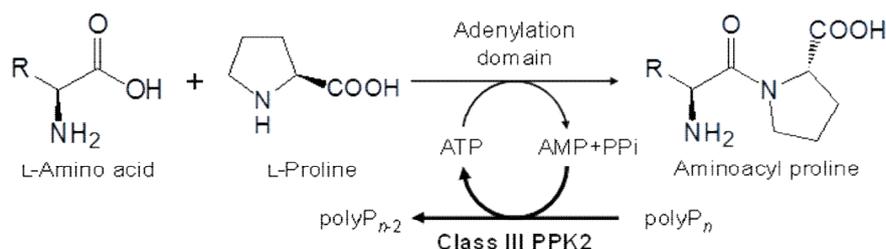


Fig. 2 Aminoacyl proline synthesis with the ATP regeneration using class III PPK2.

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

ジペプチドの有する多様な機能性の中から我々は呈味、とくに「塩味増強」に着目し、無保護のアミノ酸同士を連結することが可能な L-アミノ酸リガーゼ (Lal) を用いてジペプチドライブラリーを構築し、新規な塩味増強ジペプチドとして Met-Gly を見出した。また、Lal の立体構造情報に基づく機能改変を実施し、Met-Gly を選択的に合成する改変型酵素の取得にも成功している。今年度も本スクリーニングを継続し、新規な塩味増強ジペプチドとして Pro-Gly を見出した。Pro-Gly の合成量増加を目的に Met-Gly の知見を基に *Pseudomonas* 属由来の Lal である TabS の部位特異的変異導入による改変を行ったところ、2 種類の改変型酵素で野生型酵素よりも Pro-Gly の合成量が増加し、それらを掛け合わせた二重変異型酵素では野生型 TabS 対比で 1.6 倍の収量向上を達成した (Fig. 3)。

また、抗酸化作用のあるイミダゾールジペプチドとして健康食品素材として広く販売されているカルノシン (β -Ala-L-His) の効率的生産を可能とする Lal の取得にも成功した。結晶構造情報の明らかになっている YwfE は β -Ala を N 末端基質として認識するが、基質である β -Ala や L-His の親和性が高まるような酵素をデザインし活性を評価した結果、野生型酵素に比べ著しく活性が向上し、二重変異導入酵素では約 5 倍の収量向上を達成した。また、変異酵素の速度論的解析によってもこの成果を裏付けた。

また、今年度も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 において新規形状結晶の取得に成功し、分解能 2.34 Å で立体構造が決定され、基質の有無による構造上の変化を観察することができた。

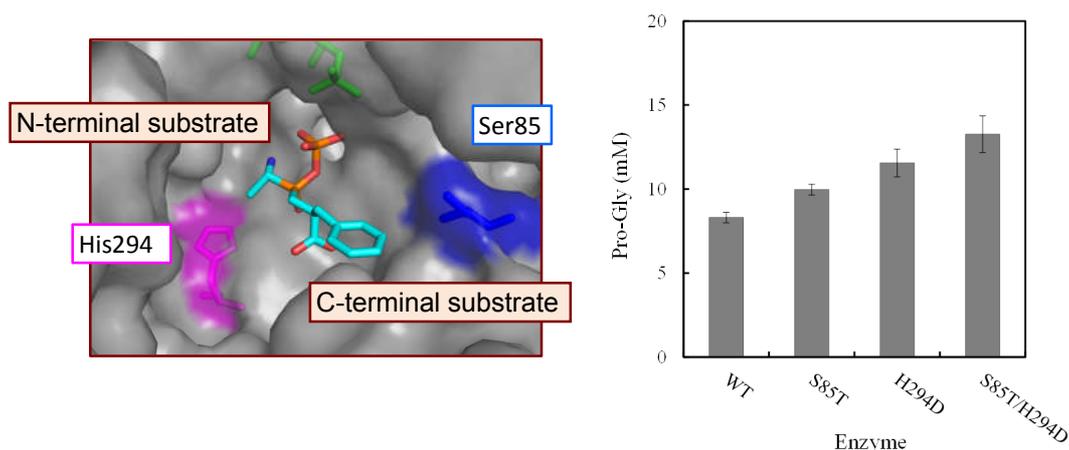


Fig. 3 Synthesis of Pro-Gly by the wild-type TabS and the mutants.

Reaction mixture contained 20 mM Pro and 20 mM Gly, 20 mM ATP, 20 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and 0.5 mg/mL purified enzyme in 50 mM NaHCO_3 - Na_2CO_3 buffer (pH 9.0). The reaction was performed at 30°C for 20 h.

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. 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, **62**(6), 274-281, (2015).
2. T.Furuya, Misa Miura, Mari Kuroiwa, and K.Kino, “High-yield production of vanillin from ferulic acid by a coenzyme-independent decarboxylase/oxygenase two-stage process”, *New Biotechnology*, **32**(3), 335-339, (2015).
3. H.Kino and K. Kino, “Alteration of the substrate specificity of L-amino acid ligase and selective synthesis of Met-Gly as a salt taste enhancer”, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **79**(11), 1827-1832 (2015).
4. W. Kagawa, T. Arai, S. Ishikura, K. Kino, and H. Kurumizaka, “Structure of RizA, an L-amino acid ligase from *Bacillus subtilis*”, *Acta Crystallographica Section F*, **71**, 1125-1130, (2015).
5. M. Sato, N. Sakurai, H. Suzuki, D. Shibata, and K. Kino, “Enzymatic carboxylation of hydroxystilbenes by the γ -resorcylic acid decarboxylase from *Rhizobium radiobacter* WU-0108 under reverse reaction conditions”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **122**, 348-352 (2015).
6. T. Furuya, T. Nakao, and K. Kino, “Catalytic function of the mycobacterial binuclear iron monooxygenase in acetone metabolism”, *FEMS Microbiology Letters*, **362**(12), fnv136, 2015.
7. R. Hara, S. Kitatsuji, K. Yamagata, and 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**(1), 243-253 (2016).
8. T. Furuya, M. Sai, and K. Kino, “Biocatalytic synthesis of 3,4,5,3',5'-pentahydroxy-trans-stilbene from piceatannol by two-component flavin-dependent monooxygenase HpaBC”, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **80**(1),193-198 (2016).
9. H. Kino, S. Nakajima, T. Arai and K. Kino, “Effective production of Pro-Gly by mutagenesis of L-amino acid ligase”, *J. Biosci. Bioeng.*, *in press*.

4.2 総説・著書

1. 木野邦器, 木野はるか, 解説 (査読有) “解説 L-アミノ酸リガーゼを利用したジペプチドドラ

イブラリーの構築と塩味増強効果を有するジペプチドの探索”, 日本醸造協会誌, 11(2), 79-85 (2016).

4.3 (招待)講演

4.4 受賞・表彰

1. 鈴木伸, 原良太郎, 木野邦器, 日本生物工学会 2015 年度大会トピックス選定, “単一酵素による AMP からの ATP 再生系の構築とアミノアシルプロリン合成への利用”
2. 木野邦器, 2015 年度文部科学大臣表彰科学技術賞 (研究部門)

4.5 学会および社会的活動

1. H. Kino, K. Kino, “Alteration of the substrate specificity of L-amino acid ligase and selective synthesis of functional dipeptide”, PO264, BioTrans2015, Vienna/Austria, 2015.7.26-7/30.
2. T. Furuya, K. Kino, “Synthesis of vanillin from ferulic acid by a coenzyme-independent oxygenase/decarboxylase cascade”, PS14, BioTrans2015, Vienna/Austria, 2015.7.26-7/30.
3. 古屋俊樹, 齋政彦, 木野邦器, “酸化酵素を利用したレスベラトロールからのピセアタンノール生産” 日本食品科学工学会 2015 年度大会、講演要旨集 p.139, 3Cp16、京都大学 (京都) 2015.8.29.
4. 原良太郎, 中島悠太, 北辻早希, 山縣海, 椛沢 遼, 木野邦器, “微生物由来 2-オキシグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼを利用した多様なヒドロキシアミノ酸合成”, 日本生物工学会 2015 年度大会, 講演要旨集 1P-058、城山観光ホテル (鹿児島)
5. 鈴木伸一, 原良太郎, 木野邦器, “単一酵素による AMP からの ATP 再生系の構築とアミノアシルプロリン合成への利用”, 日本生物工学会 2015 年度大会, 1P-059 講演要旨集 p.103、城山観光ホテル (鹿児島) 2015 年 10 月 26 日
6. 木野はるか, 木野邦器, “L-アミノ酸リガーゼへの変異導入による塩味増強ジペプチド Pro-Gly の効率的合成法の開発”, 日本生物工学会 2015 年度大会, 3P-039 講演要旨集 p.280、城山観光ホテル (鹿児島) 2015 年 10 月 28 日
7. 梅澤覚, 角谷政尚, 服部宏一, 東條博昭, 駒井強, 斉藤司, 木野はるか, 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”, 日本生物工学会 2015 年度大会, 3P-040 講演要旨集 p.280、城山観光ホテル (鹿児島) 2015 年 10 月 28 日
8. 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), P3-073 講演要旨集, 2015 年 10 月 13 日.
9. 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”, 第 74 回酵素工学研究会, B-4 講演要旨集 p61, 東大山上会館 (東京), 2015 年 10 月 16 日
10. 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”, 第 74 回酵素工学研究会 B-7, 講演要旨集 p64, 東大山上会館 (東京), 2015 年 10 月 16 日

11. 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”, 第 74 回酵素工学研究会, B-6 講演要旨集 p63, 東大山上会館 (東京), 2015 年 10 月 16 日
12. 古屋俊樹, 齋政彦, 木野邦器, “酸化酵素を利用したレスベラトロールからのピセアタンノールの効率的合成”, 第 74 回酵素工学研究会, B-5 講演要旨集 p62, 東大山上会館 (東京), 2015 年 10 月 16 日

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見出し、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。シクロデキストリンの添加により生成物阻害を大幅に緩和することができた。一方、レスベラトロールからピセアタンノールへの変換活性を有する野生株を自然界から見出し、非組換え株によるピセアタンノール生産の実用化に向けて詳細検討中。

Lal によるペプチド合成や NRPS 由来の A ドメインを用いるアミド合成のように ATP を必要とする反応プロセスは、ATP 供給が実用化における課題となる。菌体反応による生体内の ATP 再生システムの利用も考えられるが、ペプチドやアミド化合物は菌由来のペプチダーゼやプロテアーゼによって分解されてしまう。また、ADP からの ATP 再生は実績があるが、NRPS 由来の A ドメインを用いる反応のように AMP からの ATP 再生はこれまでに報告がない。そこで単一酵素で AMP→ADP→ATP を可能とする新規ポリリン酸キナーゼ(class III PPK2)に着目して検討を行ったところ、その有効性が確認できた。本プロセスは、ADP をはじめ AMP からの ATP 再生も可能とする適用範囲の広い技術であり、その有用性や独自性が評価され日本生物工学会の年次大会でもトピックスとして選定された。この他に、新たなアミド化合物合成法の開発研究を進めていく予定である。

ペプチド合成酵素の開発研究では、ペプチド合成酵素に関するこれまでに得られた立体構造情報や機能と構造に関する知見を踏まえて酵素の機能改変を行い、機能性ジペプチドの二種類に対して、実現性の高い効率的合成法の開発に成功した。塩味増強ジペプチドとして新たに Pro-Gly を発見し、Pro-Gly の選択的合成を可能とする TabS に対して計画的な変異導入を行い、野生型対比で 1.6 倍の収量向上を達成した。塩味増強ジペプチドに関するこれら一連の成果は、JBA 発行のバイオサイエンスとバイオインダストリーの記事 (学会見聞記) や化学工業日報の一面 (2015 年 8 月 4 日全国版一面記事) にも取り上げられ、Lal を活用する研究戦略の妥当性を示すことが出来た。さらに、同様な酵素改変戦略によって、抗酸化作用を有する健康食品素材としてイミダゾールジペプチドの名で広く販売されているカルノシン(β -Ala-L-His)に対しても、その効率的生産を可能とする Lal の取得に成功した。今後も、機能性短鎖ペプチドの創製やオリゴペプチドへの展開、またジケトピペラジンの合成法と機能評価に関する研究に取り組む予定である。

酵素の立体構造解析では、RimK の新規形状結晶の取得に成功し、分解能 2.34 Å で立体構造が決定された。その結果、基質の有無による構造上の変化を観察することができた。今後、Lal の反応機構に関わる多くの知見を蓄積し、基質特異性や鎖長制御など効率的な機能改変酵素の創出を実現することが課題である。