

# 微生物酵素の新規有用機能と利用

木野 邦器

微生物の多様性を担っている代謝機能や酵素を利用して、これまでに革新的なバイオプロセスが数多く開発され、有用物質の工業生産がなされている。その中でも、究極的なバイオリクターともいべき微生物を用いた発酵生産は、アルコール・クエン酸などの食品を中心とした単純発酵から、アミノ酸や核酸、各種生理活性物質を対象とした代謝制御発酵へと、意図的に生産効率を高める革新的な技術にブラッシュアップされてきた。とくに有用遺伝子を発現させた微生物菌体をバイオリクターとする効率的な物質生産は、次世代型発酵生産技術として注目されている。

大腸菌、枯草菌、麹菌、酵母など伝統的発酵微生物に関しては、微生物学的あるいは酵素学的な観点から多くの研究が進められているが、それらを遺伝子や酵素の資源としてみた場合、工業的にも有用な機能を新たに見いだすことがある。本稿では、こうした背景を踏まえて展開している最近の筆者らの研究を中心に紹介する。

## ゲノム情報を利用した有用酵素の探索

ゲノム解析の進展に伴い、動物、植物のみならず、微生物でもすでに1500を超える株のゲノム配列が解読されている。データベース GOLD (<http://www.genomesonline.org/>)によると2011年4月現在で、真核生物で155株、細菌で1,434株、アーキアで104株のゲノム配列が解読されている。生命の設計図であるこれらゲノム配列は、ライフサイエンス分野において基礎から応用に至るまで広く研究に利用されている。多くの機能未知の酵素遺伝子を含むゲノム配列は、ものづくりの観点からすると有用酵素の探索源として魅力的である。従来の微生物探索を経て有用酵素を見いだす手法は依然として重要だが、偶発性に大きく左右され、多大な時間とコストを要するなどの課題がある。

一方、ゲノム情報を酵素遺伝子資源として有効活用することにより、有用酵素の分子レベルでの効率的な探索が可能になってきている。しかし現状では、ゲノム配列にコードされている酵素のアミノ酸配列情報からは酵素の基質や反応生成物を同定することは困難であり、そのためさまざまな工夫がなされている。探索手法は大きく2つに分けることができる。1つ目は機能既知の酵素との配列相同性に基づいて新規酵素を探索する手法で、既

知酵素と類似するが生物の多様性を反映して新規な性質（基質選択性、位置・立体選択性、耐熱性など）を有する酵素の取得が可能である。2つ目は、酵素遺伝子発現ライブラリーを構築してそのライブラリーから活性に基づいて新規酵素を探索する手法で、活性評価系に応じた新規な性質を有するオリジナリティーの高い酵素を取得することができる。実際、近年のゲノム解読と解析技術の進展によって *in silico* で容易に有用酵素を見いだすことができるようになってきた。とくに大腸菌や枯草菌など研究対象として馴染みの深い微生物の機能未知遺伝子から有用な遺伝子が発見されていることは、その手法の有用性を示すものと思われる。

筆者らは、ペプチド合成酵素（L-アミノ酸リガーゼ）と酸化酵素（モノオキシゲナーゼ、ジオキシゲナーゼ）の探索にゲノム情報を積極的に活用し、工業的にも有用な酵素の発見に成功している。

## ジペプチドからオリゴペプチド合成酵素の発見

ペプチドは血圧上昇抑制作用や循環器調節機能など生体内における生理機能を司る重要な化合物であるが、細胞膜透過性などユニークな特性や機能も明らかにされつつあり、最近では医薬品、化成品、健康食品、機能性素材など幅広い分野での利用可能性が期待されている。筆者らは、このような背景を踏まえ、遊離のアミノ酸を直接連結して多様なペプチドを合成可能なL-アミノ酸 $\alpha$ -リガーゼの探索とオリゴペプチド合成法の開発研究を行っている。

これまでに、協和発酵の田畑らはL-アミノ酸の $\alpha$ -結合反応を触媒してジペプチドを合成する酵素L-アミノ酸 $\alpha$ -リガーゼ（Lal）の取得に成功している<sup>1)</sup>。遊離のアミノ酸同士を $\alpha$ 位で結合してジペプチド生成反応を触媒する唯一の酵素D-Ala-D-Alaリガーゼ（EC 6.3.2.4）のATPを利用するジペプチド合成反応様式から目的の酵素の構造もこれに類似していると予想し、*in silico* スクリーニングを検討した。ATP-結合モチーフを有する酵素として選択した300以上のタンパク質から枯草菌 *Bacillus subtilis* 由来の機能未知タンパク質 YwfE を選択した。当該遺伝子 *ywfE* を組換え大腸菌で発現させた YwfE の性質を調べた結果、ATP 依存的に Ala と Gln から Ala-Gln を優先的に合成することが明らかとなり、1

段階の酵素反応で無保護のL-アミノ酸を特定の順序で結合してジペプチドを合成することに成功している。その後、筆者らは協和発酵との共同研究で*in silico*スクリーニングを推進し、多くのジペプチド合成酵素の探索に成功した<sup>2)</sup>。

YwfEが*B. subtilis*の生産する抗生物質Bacilycin (Ala-Anticapsin)の合成反応を触媒する酵素であったことから、筆者らは自然界に広く存在が知られているペプチド性抗生物質生産菌にLal活性が存在すると予測し、それら微生物培養物からの新たなLalの取得を検討した。L-アルギニンとタンパク質非構成アミノ酸であるL-2-amino-5-phosphono-3-*cis*-pentenoic acidからなる抗生物質Rhizocticinを生産する*B. subtilis* NBRC3134に着目し、当該微生物より活性画分を指標にRizAの取得に成功した。RizAはPro以外の19種類のアミノ酸からジペプチドを生成し、しかもArgをN末端側に配したヘテロジペプチド合成反応を触媒することが明らかとなった。ただし、RizAには当初予想したトリペプチド合成活性がなかったため、RizAをコードする遺伝子*rizA*の周辺領域を調べ、トリペプチドであるRhizocticin誘導体の合成酵素遺伝子*rizB*を見いだした。当該タンパク質RizBはそのホモログ酵素も含め、トリペプチドのみならず、ペンタ、ヘキサなどのオリゴペプチド合成活性を有するこれまでに報告のない新規酵素であることを明らかにしている<sup>3)</sup>。

このほかに、植物病原ペプチド合成細菌である*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (かさ枯病) や*P. syringae* NBRC14081 (タバコ野火病) の各推定生合成遺伝子クラスターからジペプチド合成酵素を見いだしている<sup>4)</sup>。とくにタバコ野火病原物質であるTabtoxin合成酵素と推定したTabSは、既報のL-アミノ酸リガーゼと比較して広範な基質特異性を有し、135種類に及ぶ組み合わせでジペプチドを合成可能であり、Gln-Thr合成では95%と高収率を達成した。また従来酵素では困難であったProやβ-Alaを含有するジペプチド (例: β-Ala-His)の合成も可能であるなど、新規な活性を示した(図1)。

### アミノ酸水酸化酵素の探索と休止菌体反応系による生産

不斉触媒反応の中でも、炭素鎖に直接水酸基を導入する水酸化反応は化学合成にはないユニークな反応で、モノオキシゲナーゼP450を活用した精密化学品の生産研究などが鋭意検討されている。筆者らも、P450に限定せずに水酸化反応を触媒する微生物酵素の探索を実施しており、ビルディング・ブロックの中間体や生理活性化合物として期待されるアミノ酸水酸化物の合成を可能とする酵素の取得に成功している。

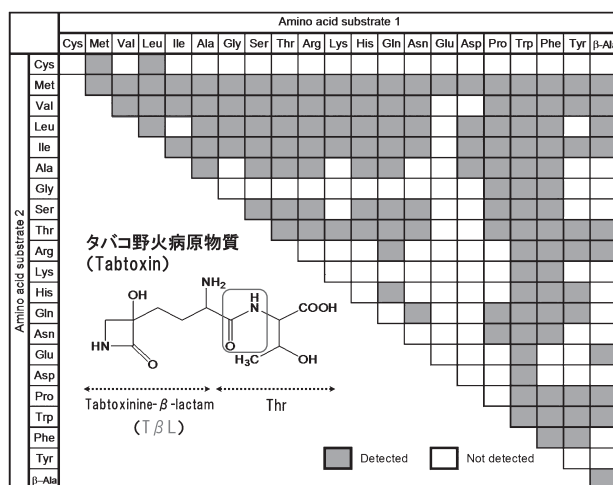


図1. ペプチド性抗生物質生産菌由来L-アミノ酸リガーゼのジペプチド合成における基質特異性

ヒドロキシプロリンは2つの光学活性中心を有する環状イミノ酸であり、非天然型のD-体を含めると合計8種類の異性体が存在する。そのうち*trans*-4-ヒドロキシ-L-プロリン (*trans*-4-Hyp)は動物のコラーゲンを形成する重要なアミノ酸であり、保湿剤として化粧品に用いられているほか、消炎剤、カルバペネム系抗生物質、血圧上昇抑制剤などさまざまな医薬品の合成原料としての用途がある。従来、その生産は牛や豚など動物組織の加水分解物からの抽出法に依存していたが、煩雑な精製ステップや大量に発生する廃液、ウイルス混入や狂牛病に起因する安全性や原料供給の問題がクローズアップされ、抽出法にかわる微生物酵素を用いる*trans*-4-Hypの画期的な工業生産プロセスが協和発酵によって開発された<sup>5)</sup>。異性体を区別してヒドロキシプロリンを分離・定量できる高感度分析系を構築して、ヒドロキシプロリン含有抗生物質生産菌やプロリンアナログ耐性菌などから活性の探索を行い、放線菌*Dactylosporangium* sp.および*Streptomyces* sp.からProの水酸化酵素と*cis*-3-水酸化酵素をそれぞれ見出すことに成功している。当該酵素はいずれもPro水酸化反応には2-オキソグルタル酸(2-OG)と二価鉄イオンを要求し、L-アスコルビン酸によって反応が促進する2-OG依存型ジオキシゲナーゼであった。

一方、*cis*-4-Hyp ((2*S*, 4*S*)-4-Hyp)は抗腫瘍細胞活性や抗肥満細胞活性があるため有用であるが、遊離のProから*cis*-4-Hypの選択的 direct 合成を可能とする*cis*-4-水酸化酵素はその存在が知られておらず、工業的な生産プロセスも構築されていない。そこで、筆者らはX線結晶解析によって構造が明らかになっている*cis*-3-水酸化酵

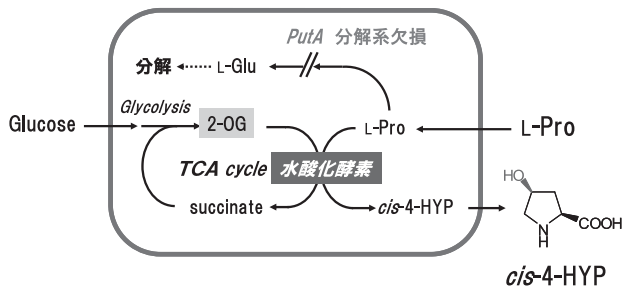


図2. 休止菌体反応系による *cis*-4-HYP 生産. 水酸化酵素: L-Proline *cis*-4-hydroxylase (2-オキソグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼ)

素のC末端にあるユニークなドメインに着目した. 当該ドメインを有するタンパク質はデータベース上ではわからなかったが, ゲノム塩基配列が公開されている根粒菌 *Mesorhizobium loti* および *Sinorhizobium meliloti* から *cis*-3-水酸化酵素と機能が予測されているタンパク質を候補として選抜した. これらの酵素遺伝子はいずれも 840 bp で 280 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしていたが, アミノ酸配列における相同性は 66% であった. 一方, *cis*-3-水酸化活性が確認されている *Streptomyces* sp. 由来 *cis*-3-水酸化酵素との相同性は 33% と低かったため, 酵素特性が異なることを期待して当該遺伝子を組換え大腸菌において His-tag 融合酵素として高発現させ, プロリン水酸化反応を検討した. その結果, 両タンパク質とも *cis*-4-水酸化活性を有していることが判明し<sup>6)</sup>, これらタンパク質は既知の水酸化酵素と同様に, 2-OG 依存型ジオキシゲナーゼであった. すでに工業化されている *trans*-4-Hyp や *cis*-3-Hyp の生産プロセスにおいて *trans*-4-水酸化遺伝子と *cis*-4-水酸化遺伝子を交換するだけで比較的容易に *cis*-4-Hyp の工業的生産が可能である. 実際に, 当該遺伝子を高発現させた組換え大腸菌の Pro 分解欠損株を休止菌体として, 2-OG 自己供給とした反応系では, 95% 以上の転換収率で *cis*-4-Hyp 合成が可能であった (図2).

このほかに, Lys や脂肪族アミノ酸である Ile, Leu, Val などを水酸化する酵素もゲノム情報を利用した方法で見いだしている<sup>7)</sup>. また, 放線菌 *S. coelicolor*A3 (2) 由来 L-アスパラギン水酸化酵素を利用した L-*threo*-3-ヒドロキシアスパラギン酸 (L-THA) の生産法も確立している. L-アスパラギン水酸化酵素遺伝子 (*asnO*) を高発現させた組換え大腸菌は L-アスパラギンを特異的に水酸化して L-*threo*-3-ヒドロキシアスパラギンを生成するが, 宿主大腸菌の有するアスパラギナーゼによってそれはさらに脱アミド化されて等量の L-THA に変換される効率的なプロセスとなっている.

### FT-ICR/MS を用いた酸化酵素の基質探索

ペプチド合成酵素のように基質をタンパク質性 20 種のアミノ酸に限定できる場合, 比較的活性評価はしやすいが, P450 のような酸化酵素のように基質に無限の可能性のある場合にはその同定がとくに困難となる. ゲノム配列にコードされている多数の機能未知酵素の機能を明らかにしていくためには, 個々の酵素反応や反応生成物に特異的な方法ではなく, 汎用的でハイスループットな酵素活性検出手法を開発することが重要である.

筆者らは, フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析装置 (FT-ICR/MS) に着目し, 本装置を利用した機能未知酵素の基質探索法を考案した<sup>8)</sup>. FT-ICR/MS を利用した機能未知酵素の基質探索法は, 酵素を化合物混合溶液と反応させて反応液を FT-ICR/MS にダイレクトインジェクションし, 一斉解析によって基質となる化合物を探索するというきわめてシンプルな方法である. 酵素反応に伴う質量変化を瞬時に捉えることができ, 精密質量数に基づいて高い精度で酵素の基質を同定できる. 筆者らが研究のターゲットとする酸化酵素反応の場合には, FT-ICR/MS により酸素の精密質量数分のピークシフトを捉えることで基質を見いだすことができる.

有用物質の生産において, 今後も微生物機能の多様性と可能性に期待するところは大きい. 本稿でもふれたように, ゲノム解析技術の向上や分析機器の開発, またそれらを活用した新たな革新的な技術に支えられて, 微生物の有用機能の探索と高度活用技術は精度とスピードの両面において著しい進歩を遂げている. そして現在では細胞システムの統合的理解から微生物の酵素や遺伝子をデザインし, 意図的に扱うことが可能になってきている. それは, 21 世紀の課題である持続的社会的実現のための革新的なバイオプロセスの開発に大きく貢献するものであり, 醸造や発酵技術のバイオニアである我が国の強みを生かした独創的研究として今後の発展に期待したい.

### 文 献

- 1) Tabata, K. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **187**, 5195 (2005).
- 2) 木野邦器: 酵素利用技術大系, p.144, エヌ・ティー・エス, 東京 (2010).
- 3) Kino, K. *et al.*: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **74**, 129 (2010).
- 4) Arai, T. *et al.*: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **72**, 3048 (2008).
- 5) Shibasaki, T. *et al.*: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64**, 746 (1994).
- 6) Hara, R. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **379**, 882 (2009).
- 7) 木野邦器: ファインケミカル, **38**, 56 (2009).
- 8) Furuya, T. *et al.*: *Chem. Biol.*, **15**, 563 (2008).