

微生物の多様性に学ぶ酵素探索と利用

木野 邦器

はじめに

「微生物に求めて裏切られたことはない」は、微生物研究の世界的権威で坂口フラスコの生みの親でもある東京大学応用微生物研究所初代所長であった坂口謹一郎先生の有名な言葉である。これは微生物に秘められた無限の可能性のあることを端的に言い表した名言であり、有用微生物の探索とその工業的利用を検討している我々の心の拠り所ともなっている。昨年のノーベル生理学・医学賞を受賞された大村智先生（北里大学特別荣誉教授）も同じ思いでエバームメクチン生産菌を自然界から探索されたものと推察する。この抗寄生虫薬エバームメクチンの発見からイベルメクチンの実用化に至る業績に対してノーベル賞が授与されたことは、目的活性を有する微生物や酵素の探索を日夜続けている研究者にとって、大きな喜びであり、さらに大きな励みになったと思う。

フレミング（Sir Alexander Fleming）による意図的ではなかったペニシンの発見（serendipity）は各種抗生物質や医薬品のリード化合物の探索につながり、木下、鶴高らの巧みな探索手法によるグルタミン酸生産菌の発見は、代謝制御発酵や微生物機能利用産業の発展につながった。微生物の生存戦略に基づく機能多様性とその産業利用への可能性は誰もが疑う余地のないものである。自然界からの探索に掛ける時間と労力と経費は多大であり、非効率的だとして医薬品開発企業の多くは一時期撤退をしたが、微生物の作り出す化合物の構造多様性を求めて、現在は再び自然界へ回帰する方向にある。

また、DNAが生命の設計図としてタンパク質の機能そのものを規定することがわかると、ゲノム解読が進み、遺伝子組換え技術、PCRによる遺伝子増幅、またそのゲノム情報を利用したさまざまな遺伝子探索法や解析ツール、ゲノム編集のような革新的な技術などがいくつも開発され、ドライ系の研究が先行するようになってきた。一方で、ビッグデータを処理可能な高速計算機や各種分析・解析装置類などの支援技術の進展もあって、有用酵素の探索や機能改変戦略も大きく変化し、合成生物学的アプローチによる微生物機能の向上が図られるようになってきた。2010年にはベンター（J. Craig Venter）らによる人工的に合成した遺伝子情報だけで生きている微生物を創出したという衝撃的な発表もあった¹⁾。これは、理屈の上では遺伝子をデザインすれば元とは異なる

新たな生命体の創出にもつながることを示唆するものである。自然を越える高機能発現によるモノづくり技術への貢献や生命の起源の解明にもつながる画期的な技術の創出も可能である反面、恐ろしい感じもする。

本稿では、筆者らが取り組んできた産業利用を目的とした微生物酵素の探索研究と応用例について概説し、微生物機能の多様性と無限の可能性について考察したい。

微生物多様性に基づく比較ゲノムと酵素の基質特異性

ゲノム解析技術の進展によって、多くの生物において生命の設計図であるDNAのゲノムが解読されており、微生物ではすでに8000株以上の全ゲノム配列が決定されている（GOLD_ <https://gold.jgi.doe.gov/>）。微生物の多様性の本質はそのゲノム配列にあり、類似の機能を有する酵素は配列上も類似性が高く、部分的によく似たアミノ酸配列のパターンや領域を有することが多い。そのため、それを手掛かりにホモログの探索も可能になる。筆者らは、多くの微生物に存在する α -アミノ酸アミノ基転移酵素（AAT）やシトクロムP450モノオキシゲナーゼ（P450酸化酵素）を多数の微生物から取得し、目的活性を有する酵素の探索を実施した。単にホモログ遺伝子から見いだした酵素では、その起源である微生物の温度やpHなどの生育特性を反映した違いが期待される程度であるが、少し工夫をするだけで迅速かつ多種多様な酵素の探索に成功することがある。

たとえば、基質特異性の異なるAATの探索に関しては、呈色反応を指標とした基質探索評価系と組み合わせることで、デザインしたケト酸から目的的非天然型アミノ酸をほぼ100%の変換率で合成する酵素を選び出すことができる。具体的には、安定性が期待できる高度好熱菌や超好熱始原菌のゲノム解析株15株からゲノム情報に基づいてAATを取得し、その104種類のAAT遺伝子を大腸菌で高発現させて基質特異性評価用にライブラリーを構築した²⁾。目的とするD-アミノ酸を含む非天然型アミノ酸に対応するケト酸を原料とし、それに作用するAATを上記ライブラリーから図1に示す呈色反応を指標とする評価系で簡単に見いだすことができた。このスクリーニング系は、 α -AATが目的的非天然型アミノ酸に対して活性を有すると、NAD(P)Hが反応の副産物として生成し、最終的にはテトラゾリウム塩を還元して呈色性のあるホルマゼンを生じることを利用したもので

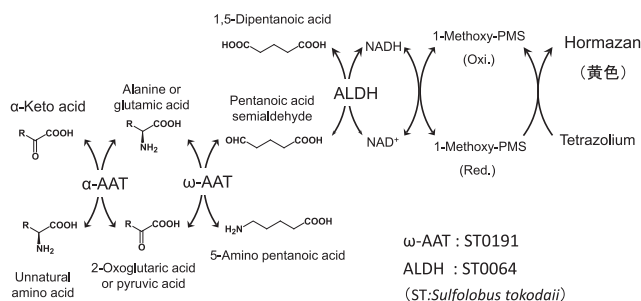


図1. 呈色反応を指標とする活性型AATのスクリーニングと基質解析 (木野邦器: 生物学, 87, 186 (2009)の図1を改変).

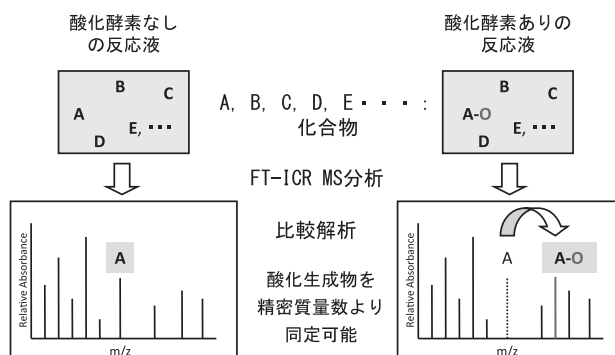


図2. FT-ICR MSを利用した酸化酵素の基質特異性解析 (木野邦器: 生物学, 87, 186 (2009)の図5を転載).

ある. この酵素ライブラリーとスクリーニング系を用いて, フェニルグリシン誘導体である非天然型アミノ酸の合成に有用な酵素を探索したところ, 96穴プレートによる高速かつ簡便な方法で目的のAATを探索することが可能であった³⁾.

また, 工業的に有用な酸化酵素であるP450酸化酵素(モノオキシゲナーゼ)もゲノム解析株からはその配列情報に基づいて容易に探索が可能であり, ライブラリー化することができる⁴⁾. 配列相同性から探索すると一般的に酵素特性も類似していることが多いが, P450酸化酵素のように生物に広く存在する場合は基質特異性も多様である. しかしながら, その詳細を特定することはできない. 筆者らは, P450酸化酵素の作用を受けた化合物は一酸素原子が付加されることに着目し, 酸化反応の前後の精密質量分析を実施した時に酸素の質量数だけシフトする化合物があれば, それがP450酸化酵素の基質であると考えた(図2). 高分解能と高精度の質量分析が可能なFT-ICR MSでは, 精密質量数に基づいて既知成分の同定や未知成分の組成式を決定することもできる. そこでテルペノイドを中心とする30化合物の混合溶液に対し, *Bacillus subtilis*由来のゲノム解析でその存在が明らかになっている8種類のP450酸化酵素を作用させて, 反応前後の精密質量比較解析を行ったところ, コンパクチン水酸化活性を有するCYP109B1がコンパクチン以外にテストステロンを含む7種類のトリテルペンにも活性を有することや, 基質特異性が未知であったCYP107J1やCYP134A1に対してもいくつかの化合物を基質として見いだすことができた⁵⁾. このような質量分析器を用いる方法は, ゲノム情報やメタゲノムによって取得したあるカテゴリーの酵素がどのような化合物に作用するのかを迅速に調べる基質の探索や, その逆に, ある特定の化合物に特定の官能基を導入可能な酵素の探索などに広く利用することができる.

酵素反応特性を踏まえたゲノム解析株からの探索

ゲノム情報からの酵素探索は, 実際には酵素が発現していなくても, またきわめて微弱な活性であっても, 強制的に酵素タンパク質発現させるため, 眠っている酵素や機能未知タンパク質の発掘にもつながる. たとえば, 高脂血症治療薬として世界的にも需要のあるプラバスタチンは, カビが生産するコンパクチンを放線菌で位置特異的に水酸化して合成する生産法が知られていたが, 当該水酸化反応を触媒する酵素がP450酸化酵素であることとゲノムが解読されていた*B. subtilis* ATCC6051に微弱な活性があることを手掛かりに, *B. subtilis*の機能未知遺伝子に着目して活性を調べてみることでコンパクチンの水酸化反応を触媒する細菌由来の新規酵素遺伝子*yjiB*を見いだすことに成功している⁶⁾.

P450酸化酵素と同じように炭素鎖に直接水酸基を導入することができる酵素として2-オキシグルタル酸(2-OG)依存型ジオキシゲナーゼがある. この酵素は, 反応に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される. L-プロリン(L-Pro)を直接水酸化して*trans*-4-ヒドロキシ-L-プロリン(*trans*-4-Hyp)を製造する工業プロセスにも利用されており, P450酸化酵素のように複雑な電子伝達系を必要とせず補基質である2-OGを糖の代謝系(TCA回路)によって供給できるなど工業的にも使いやすい有用な酵素として注目されている⁷⁾. *trans*-4-Hypは動物のコラーゲンを形成する重要な生体アミノ酸であり, 保湿剤として化粧品に多く使われているほか, 消炎剤, カルバペネム系抗生物質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, *trans*-4-Hypの生産は動物組織など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などがクローズアップされ, 抽出法に代わる微生物酵素を用いる工業的生産プロセスが開

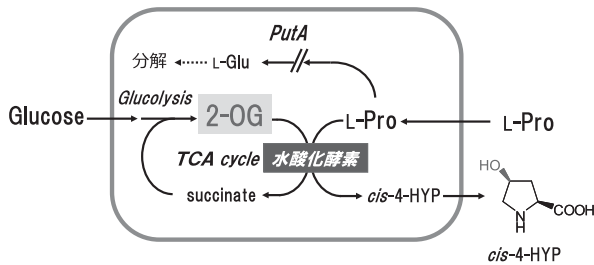


図3. 菌体反応系による *cis*-4-Hyp 生産. 水酸化酵素: L-Proline *cis*-4-hydroxylase. 2-OG: 2-オキソグルタル酸 (木野邦器: 生物工学, 89, 329 (2011)の図2を改変).

発された⁸⁾. 同時に *cis*-3-Hyp 合成酵素も発見されていたが, その他のプロリン水酸化酵素, とくに医薬品原料として需要のある *cis*-4-Hyp や *trans*-3-Hyp を L-Pro から直接合成する水酸化酵素の存在は知られていなかった. そこで筆者らは, *cis*-4-Hyp に対しては X 線結晶解析によって構造が明らかになっていた *cis*-3-Hyp 合成酵素の情報から, Hyp の C 末端に共通に存在するユニークなドメインを見だし, *in silico* 探索によって 2 種類の根粒菌 *Mesorhizobium loti* および *Sinorhizobium meliloti* から *cis*-4-Hyp 合成活性を有する 2-OG 依存型ジオキシゲナーゼを見出すことに成功した⁹⁾. *cis*-4-Hyp の生産は, すでに工業化されている *trans*-4-Hyp 生産プロセスを利用することで容易に実施できる. L-Pro 分解欠損性大腸菌を宿主として *cis*-4-Hyp 合成酵素を高発現させた組換え株を用いた菌体反応系において, グルコースと L-Pro から 95% 以上の変換率で *cis*-4-Hyp を合成することができた (図3). 一方, *trans*-3-Hyp 合成に関しては, Hyp と構造が類似するヒドロキシエクトインに着目し, 既知である好塩菌 *Halomonas elongata* 由来の水酸化酵素 EctD とその類似タンパク質の基質特異性を評価した. 予想通り, EctD はじめいくつかの類似タンパク質は L-Pro を水酸化し, *trans*-3-Hyp を合成することができた. *Streptomyces cattleya* 由来の推定 EctD の高活性も確認した¹⁰⁾.

この他に, アルギニン水酸化酵素 (VioC) やクラバミン酸合成酵素 (CAS) に着目し, ゲノム情報を駆使して同じカテゴリーの酵素探索 (BLAST 検索, モチーフ検索, 系統樹解析) を行い, アルギニンのみならずリジン, ヒスチジン, アスパラギン, グルタミンなど多くのアミノ酸を水酸化する新規酵素を見出すことにも成功している¹¹⁾.

微生物の特性に学ぶ酵素の探索

筆者らは, ATP 依存的に無保護のアミノ酸同士を α 位で結合してジペプチドを生成するアミノ酸リガーゼ (Lal) の探索と応用研究を推進している. ATP-結合モ

チーフを有する遺伝子群から取得した Lal は, アミノ酸配列からするとその相同性は 20% 程度であるにもかかわらず, 類似の基質特異性を有している場合が多い¹²⁾. 最初の Lal は協和発酵工業 (現 協和発酵バイオ) の田畑らによって見いだされた YwfE¹³⁾ であるが, この酵素は *B. subtilis* ATCC 15245 の生産するペプチド性抗生物質 bacilycin (Ala-anticapsin) の合成酵素であることが判明していたので, 筆者らは, すでに報告されている微生物の生産するペプチド性抗生物質に着目し, その構造から Lal の存在を予測して基質特異性の異なる Lal の取得に成功している. たとえば, タバコ野火病原因物質である tabtoxin 産生菌の *Pseudomonas syringae* NBRC14081 からは, 推定生合成遺伝子クラスターからジペプチド合成酵素 TabS を見いだした. TabS はきわめて広範な基質特異性を有し, 135 種類にもおよぶ組合せでジペプチドの合成が可能であった¹⁴⁾. 筆者らは, この特性を活用してジペプチドライブラリーを構築し, スクリーニング系と組み合わせることで, ジペプチドに血管拡張による血圧降下作用や塩味増強作用など新たな機能性を見出すことに成功している^{15,16)}.

B. subtilis NBRC3134 はジペプチドおよびトリペプチドからなる抗生物質 rizocticin を生産する. しかしながら, この株はゲノム解読がなされておらず, rizocticin 生合成遺伝子クラスターの情報もまったくなかった. しかも, ジペプチドタイプの rizocticin は N 末端にアルギニンのような塩基性アミノ酸を配置するため, 従来にはない基質特異性を有する Lal を得るチャンスでもあった. そこで, タンパク質の活性画分を精製して N 末端アミノ酸の配列情報から目的遺伝子を取得した. この遺伝子でコードされる RizA は予想通り, N 末端にアルギニンを配置し, C 末端には Pro 以外の 19 種類のアミノ酸を配置するジペプチドを合成することが明らかになった¹⁷⁾. しかし, RizA にトリペプチドの合成活性は確認できなかった. そこで, RizA をコードする遺伝子 *rizA* の周辺領域を調べたところ, 9 kb 上流にトリペプチドである rizocticin 誘導体を合成する遺伝子 *rizB* を見出すことに成功した. RizB はトリペプチドのみならずテトラ, ペンタ, ヘキサなどオリゴペプチド合成活性を有する初めての Lal となった¹⁸⁾. しかも, rizocticin 生合成遺伝子クラスターは 14 種類の ORF を有する約 12 kb の DNA 断片で, rizocticin 非生産性の *B. subtilis* 168 の染色体にすっぽりと全領域が挿入された状態になっていることもわかった. また, この 14 種類の ORF からおよそその生合成経路も予測していたが, それを検証する前に米国の研究チームに先を越されてしまったことは悔しい思い出として残っている¹⁹⁾. いずれにしても微生物の特性を踏まえて見いだしたものは, オリジナリティ性が高いだけ

でなくきわめてユニークな機能をそこに見いだすことが多いと実感している。

おわりに

生命の誕生から約38億年が経過し、その間、分子進化もしながら生物はその多様性を増してきたが、生物の有するタンパク質はその機能を発現する最適なものとして、どれだけスキャンされてきたのだろうか？タンパク質を構成するアミノ酸の数と組合せや順番を考えるとそれは無限であり、十分に検証はされていないと考えても良いはずである。したがって、変異操作や進化分子工学、さらにはゲノム編集によって機能性の向上や変化が起こるのは当然で、未完成であるがゆえのことと思われる。我々は自然界に生息する微生物の1%も分離・培養ができていないといわれている。生物が進化に掛けた時間は少ないため、想像以上の多様性の存在を許しているかどうかはわからないが、未培養微生物の詳細を少なくともあと数パーセント明らかにできれば、新しい発見があると期待しても良いように思う。そのような研究によって生物の営みの本質に迫ることができれば、その機能を最大限に引き出すこともできるような気がする。また、純粋培養下で観察される微生物の機能だけでなく、コミュニティを形成している複合系での挙動や機能発現をうまく操作することができれば、微生物の可能性はさらに現実のものとして拡がると思う。

先頃、囲碁の名人が人工知能に負けたというニュースが流れた。対局の状況を踏まえて、何通りもの可能性を高速で計算し、検証しつつ、次の一手を打ってくる。ちょっとしたミスが命取りになる。一定のルールの下で論理的に思考して競争する以上、人間が負けるのは当たり前のような気がする。莫大な情報量を的確に処理し、ビックデータから必要とされる解を見つけ出すことは最近のトレンドのように思う。先日、お台場にある産業総合研究所を見学した時に、7つの関節を持つヒト型ロボット「まほろ君」と「あずみちゃん」の仕事ぶりを見た。ピペッティング操作、プレーティング操作など、熟練したテクニシャンよりもはるかに正確で文句も言わず24時間働く。人工知能とそれを正確に実行するロボットがあれば、きわめて効率よく最短の時間で信頼性の高い結果を出してくれる。

有機合成化学での話だが、実際に企業で生産されているある化合物に対して、オーガニックネットワーク(NOC: the network of organic chemistry: 現在までに報告されている数百万もの有機化合物の情報と反応に関するデータベースを構築し、それらのネットワークを解析するシステム)が最適な反応経路を導き出したという内

容の論文が2012年の *Angewandte Chemie*²⁰⁾に掲載されている。バイオプロセスにも同じことはいえると思う。生体成分や化合物、多様な生物の代謝経路などのあらゆる情報を駆使すれば、原料情報を入力するだけで人工知能が最適な合成経路や酵素を提案し、高精度の自動合成ロボットがその目的化合物を合成したり、探索すべき酵素や代謝経路を提案したりしてくれる、そんな世の中がもう間近に追ってきていると思う。

一方、持続的社会的実現に向けて、世界は新しいバイオテクノロジーの展開を予想し、情報処理技術との融合がそれをさらに加速するといわれている。OECDは幅広い分野においてバイオテクノロジーが新しい市場(バイオ経済: Bioeconomy)を形成すると予測している。

今、まさに微生物の無限の可能性に期待して、新しい機能の発見や革新的なバイオプロセスの開発にチャレンジする大きな夢とロマンを持ちたいと思う。

文 献

- 1) Gibson, D. G. *et al.*: *Science*, **329**, 52 (2010).
- 2) Koma, D. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73**, 172 (2006).
- 3) Sawai, T. *et al.*: *J. Microbiol. Methods*, **71**, 32 (2007).
- 4) Furuya, T. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **86**, 991 (2010).
- 5) Furuya, T. *et al.*: *Chem. Biol.*, **15**, 563 (2008).
- 6) Endo, H. *et al.*: WO/2000/044886 (2000).
- 7) 木野邦器: *ファインケミカル*, **38**, 56 (2008).
- 8) Shibasaki, T. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 746 (1994).
- 9) Hara, R. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **379**, 882 (2009).
- 10) 原良太郎ら: 日本生物工学会2014年度大会, 1P-103 (2014).
- 11) 原良太郎ら: 日本生物工学会2015年度大会, 1P-058 (2015).
- 12) Arai, T. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1572 (2010).
- 13) Tabata, K. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **187**, 5195 (2005).
- 14) Arai, T. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 5023 (2013).
- 15) Kagebayashi, T. *et al.*: *Mol. Nutr. Food Res.*, **56**, 1456 (2012).
- 16) Kino, H. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **79**, 1827 (2015).
- 17) Kino, K. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 901 (2009).
- 18) Kino, K. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 129 (2010).
- 19) Borisova, S. A. *et al.*: *Chem. Biol.*, **17**, 28 (2010).
- 20) Kowalik, M. *et al.*: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 7928 (2012).