

不斉変換触媒として有用なアミノ酸酸素原子添加酵素の開発

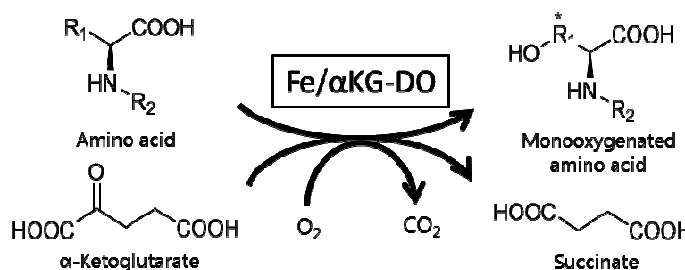
京都大学大学院農学研究科 日比 慎



【略歴】

2002年9月 北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻博士後期課程単位取得退学
2003年3月 博士号(理学)取得
2003年4月～2006年3月 財団法人バイオインダストリー協会 協和発酵分室 博士研究員
2006年4月～ 京都大学大学院農学研究科産業微生物学講座(寄附講座)・特定助教

微生物の中にはユニークなアミノ酸の代謝を行うものが数多く存在しており、その代謝産物や代謝中間体として様々な形の修飾を受けたアミノ酸が見出されている。これら修飾アミノ酸は遊離アミノ酸、もしくはペプチドやタンパク質の構成要素として多彩な生理活性を發揮するものが多く、多方面における産業利用展開が期待されている。本シンポジウムでは、アミノ酸修飾酵素の一例としてアミノ酸酸素原子添加酵素の一種であるFe(II)/ α -ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ (Fe/ α KG-DO、右図) を取り上げ、その産業用酵素触媒としての応用への試みについて紹介する。



Fe/ α KG-DO によるアミノ酸酸素原子添加反応の例

イソロイシン水酸化酵素

土壌分離菌 *Bacillus thuringiensis* 2e2 株より、Fe/ α KG-DO の一種である L-イソロイシン水酸化酵素 (IDO) を取得している^[1]。IDO は L-イソロイシンの 4 位炭素に対して高度に立体選択的な水酸基導入反応を触媒し、(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシイソロイシン (HIL) を生成する酵素である。HIL は経口摂取で血糖値依存的なインシュリン放出作用を持つことが知られており、糖尿病改善物質としての利用が期待されている。IDO に関して基質特異性と反応生成物の詳細解析を実施した結果、L-イソロイシンの他にも、L-ロイシン、L-ノルバリン、L-ノルロイシンなどの疎水性脂肪族 L 体アミノ酸に対して、立体選択的な 4 位炭素の水酸化反応を触媒することを明らかにした。反応産物である (S)-4-ヒドロキシ-L-ノルバリンは HIL と同様に抗糖尿病活性を持つことが知られており、また 4-ヒドロキシ-L-ロイシンはある種の生理活性ペプチドの構成要素としてしばしば見出されている。さらに面白いことに IDO は含硫アミノ酸の立体選択的なスルフォキシド化を触媒して、L-メチオニン-(S)-スルフォキシド、S-メチル-L-システイン-(S)-スルフォキシド (メチン)、S-アリル-L-システイン-(S)-スルフォキシド (アリイン) などを生成することを見出した。メチンやアリインはアブラナ科の植物体内に蓄積する天然アミノ酸であり、抗酸化作用や抗炎症作用などの多彩な生理活性を示すことが知られる物質である。

微生物界における水酸化アミノ酸代謝の広がり

ゲノムデータベースからの *in silico* スクリーニングの結果、アミノ酸酸素原子添加酵素であると考えられる Fe/ α KG-DO を多数の微生物が保持していることが明らかになった。*Nostoc punctiforme* PCC73102 株由来の L-ロイシン水酸化酵素 (LdoA) はこの細菌の産出する環状ペプチドの生合成経路の一部を担っており、L-ロイシンの 5 位炭素を立体選択的に水酸化して (4S)-5-ヒドロキシ-L-ロイシンを生成することを明らかにした^[2]。本菌において (4S)-5-ヒドロキシ-L-ロイシンはさらに代謝され、最終的に (S)-4-メチル-L-プロリンへと変換される。また LdoA は L-ノルロイシンとも反応し、光学活性な 5-ヒドロキシ-L-ノルロイシンを生成する。5-ヒドロキシ-L-ノルロイシンはマメ科植物の種子に高度に蓄積する遊離アミノ酸であることが知られており、その生理学的な機能性の解明に期待が膨らむ。次に *Burkholderia ambifaria* AMMD 由来の N 置換アミノ酸水

酸化酵素 (SadA) がアミノ基に置換を持った疎水性 L 体アミノ酸類の 3 位炭素への立体選択的な水酸化反応を触媒することを見出した^[3]。SadA は L-イソロイシン、L-ロイシン、L-バリン、(S)-2-アミノ酪酸、L-フェニルアラニンの N-スクシニル体を、それぞれ L-3-ヒドロキシイソロイシン、L-threo-3-ヒドロキシロイシン、L-3-ヒドロキシバリン、L-スレオニン、L-threo-3-フェニルセリンの N-スクシニル体へ変換する。3 位に水酸基を持つアミノ酸はペプチドなどの天然物構造に最も多く含まれる種類の水酸化アミノ酸であり、またキラル医薬品の原料としても用いられる重要な化合物である。また本菌はアミノ酸スクシニラーゼ (LasA) も保持していることから、SadA と LasA を含むユニークな N-スクシニル水酸化アミノ酸代謝経路の存在が示唆される。

Fe/ α KG-DO の立体構造情報を基にした機能改変

新規に取得できた Fe/ α KG-DO 類に対して X 線結晶構造解析を実施し、基質結合部位および触媒部位の構造解明を行った。SadA に関して基質結合部位に存在する α -ヘリックスが基質の側鎖認識に重要な壁構造を形成していることを明らかにした^[4]。この構造情報を基にして α -ヘリックスと周辺残基に部位特異的変異を導入した変異体酵素類を作成したところ、幾つかの変異体においてよりかさ高い側鎖を持つアミノ酸に対する比活性の向上が確認できた。この結果は、既存の Fe/ α KG-DO 類への変異導入が産業用に有用な酵素触媒の新規創出を実現できることを実証するものであった。

Fe/ α KG-DO 触媒利用のためのプラットフォーム開発

この様にして得られた有用な Fe/ α KG-DO 類を、産業レベルで酵素触媒として利用するためのプラットフォーム作りを進めた。第一のプラットフォームとして、 α -ケトグルタル酸を細胞内に著量蓄積する大腸菌変異株 *E. coli* ($\Delta aceAK$, $\Delta sucBC$) を利用した発酵生産系を構築した^[5]。IDO を高発現させた本菌株を L-イソロイシン含有培地で培養することにより、23 kg/2 kL の HIL を収率 85%、光学純度 99% 以上で生産することができた。第二のプラットフォームとして、Fe/ α KG-DO を高発現する大腸菌の菌体を触媒として使用する反応系を構築した。SadA および LasA 高発現大腸菌を利用することで、N-スクシニル-L-ロイシンを非修飾の L-threo-3-ヒドロキシロイシンへと収率 80%、99% 以上の光学純度で変換することができた。これらのプラットフォームは他の酵素と基質の組み合わせにも適用可能であり、多種多様な水酸化アミノ酸、アミノ酸スルフォキシドを高光学純度で取得できる非常に優れた産業的生産法が開発できたといえる

以上で紹介した様に Fe/ α KG-DO 類が触媒する反応は有機合成的な手法では再現困難なものも多く、産業用触媒として高いポテンシャルを秘めた酵素である。今後触媒のバリエティを増やしていくことで、さらに産業界での利用範囲を広げることを目指している。

参考文献

- [1] Hibi, M., T. Kawashima, T. Kodera, S.V. Smirnov, P.M. Sokolov, M. Sugiyama, S. Shimizu, K. Yokozeki, J. Ogawa. Characterization of *Bacillus thuringiensis* L-isoleucine dioxygenase toward the production of useful amino acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 6926-6930 (2011).
- [2] Hibi, M., T. Kawashima, P.M. Sokolov, S.V. Smirnov, T. Kodera, M. Sugiyama, S. Shimizu, K. Yokozeki, J. Ogawa. L-Leucine 5-hydroxylase of *Nostoc punctiforme* is a novel type of Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenase that is useful as a biocatalyst. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 2467-2472 (2012).
- [3] Hibi, M., T. Kawashima, T. Kasahara, P.M. Sokolov, S.V. Smirnov, T. Kodera, M. Sugiyama, S. Shimizu, K. Yokozeki, J. Ogawa. A novel Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenase from *Burkholderia ambifaria* has β -hydroxylating activity of N-succinyl L-leucine. *Lett. Appl. Microbiol.*, **55**, 414-419 (2012).
- [4] Qin, H.M., T. Miyakawa, A. Nakamura, Y.L. Xue, T. Kawashima, T. Kasahara, M. Hibi, J. Ogawa, M. Tanokura. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of a novel N-substituted branched-chain L-amino-acid dioxygenase from *Burkholderia ambifaria* AMMD. *Acta Cryst. F*, **68**, 1067-1069 (2012).
- [5] Smirnov, S.V., T. Kodera, N.N. Samsonova, V.A. Kotlyarova, N.Y. Rushkevich, A.D. Kivero, P. M. Sokolov, M. Hibi, J. Ogawa, S. Shimizu. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce (2S, 3R, 4S)-4-hydroxyisoleucine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **88**, 719-726 (2010).