

# 微生物由来アミノ酸修飾酵素を利用した有用アミノ酸生産プロセスの開発

京都大学大学院 農学研究科 原 良太郎



## 【略歴】

2003年3月 早稲田大学 理工学部 応用化学科 卒業  
2005年3月 早稲田大学大学院 理工学研究科 応用化学専攻 修士課程 修了  
2009年3月 同上 博士後期課程 修了 博士(工学)  
2009年4月 早稲田大学 先進理工学部 応用化学科 助手  
2011年4月 早稲田大学 理工学術院総合研究所 次席研究員/研究院助教  
2013年4月 同上 次席研究員/研究院講師  
2018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) 特定准教授

我々は、化学合成では難しい、炭素原子に対し直接酸素を付加する水酸化反応に着目し、特にヒドロキシアミノ酸のバイオ生産プロセスの開発を目的に、酵素探索を実施してきた。先行研究において、自然界からの微生物スクリーニングによって取得されたプロリン水酸化酵素(ジオキシングナーゼ)が、*trans*-4-ヒドロキシプロリンの工業生産に利用された。当該ジオキシングナーゼが、一般に低活性とされていた従来型オキシングナーゼとは一線を画し、産業用酵素として有用である格好の事例となり、大きなインパクトを与えた。

天然には、単体のアミノ酸には無い生理活性を有する興味深いヒドロキシアミノ酸が多数存在する。例えば、5-ヒドロキシトリプトファンは憂鬱な気分を改善する効果があるため、サプリメントとして用いられている。また、4-ヒドロキシイソロイシンはインシュリン分泌活性促進する効果により、2型糖尿病の治療薬として期待されている。これらは植物体からの抽出によって得られるが、原料の供給や、抽出に伴う大量の廃棄物の生成が課題であった。従来法をジオキシングナーゼによるバイオプロセスに代替できれば、課題解決につながり、新規な機能開拓などへの高い波及効果が期待できる。

こうしたなか我々は、アミノ酸水酸化酵素(ジオキシングナーゼ)の探索にゲノム情報を積極的に活用し、工業的に有用なジオキシングナーゼを多数取得している。これまでの代表的な成果を以下に示す。

## プロリン水酸化酵素の探索とヒドロキシプロリンの製法開発

天然に存在するヒドロキシプロリンには、4種類の異性体が存在し、医薬原料やキラルビルディングブロックとして有用である。研究開始当初、*trans*-4-および*cis*-3-ヒドロキシプロリン(Fig. 1 左下、右上)を合成可能な水酸化酵素が工業生産に利用されていた。

一方、*cis*-4-および*trans*-3-ヒドロキシプロリンに対応する水酸化酵素は無く、自然環境中からのスクリーニングで見つかったのは主に *trans*-4-水酸化酵素のみであった。我々は、活性に基づく微生物スクリーニングだけでなく、ゲノム情報の利用が有効と考え、ゲノム解析株の機能未知タンパク質を対象とし、既知 *cis*-3-水酸化酵素の特徴的構造に着目した *in silico* スクリーニングを実施

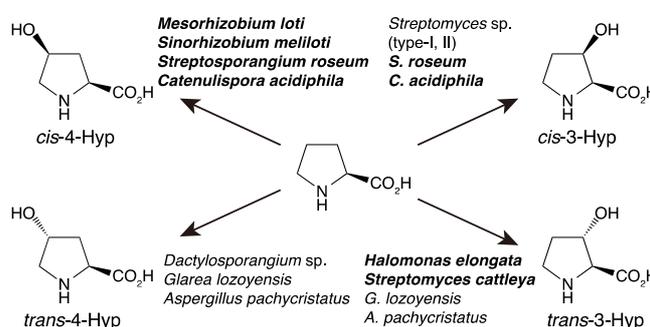


Fig. 1. プロリン水酸化酵素による位置・立体選択的ヒドロキシプロリン合成. 太字は、本研究で見出した微生物酵素の由来を示す。

した。その結果、根粒菌と放線菌において新規 *cis*-4-水酸化酵素を見出した (Fig. 1 左上)。当該酵素は、*trans*-4-ヒドロキシプロリンの工業生産を実施している企業に技術移転することにより、2011年から *cis*-4-ヒドロキシプロリンの実用生産に用いられている。基礎的にもユニークであり、最近になり酵素番号 EC 1.14.11.56 が付与され、立体構造解析も明らかにした (PDB: 4P7W, 4P7X)。

最後となる *trans*-3-水酸化酵素は、糸状菌由来の酵素が報告されていたが、位置選択性が低く、*trans*-4-ヒドロキシプロリンが主生成物であり、*trans*-3-ヒドロキシプロリンは副産物に過ぎなかった。真の *trans*-3-水酸化活性を有する酵素の取得を目指し、基質がプロリンと類似するエクトインの水酸化酵素に着目した。当該酵素の基質特異性は厳密で、従来はプロリン水酸化活性が無いとされていた。これに対し我々は、エクトイン水酸化酵素の中には、プロリンを水酸化するものがあると予測し、*in silico* スクリーニングを行った。その結果、期待通り *trans*-3-選択的水酸化活性を初めて見出した (Fig. 1 右下)。以上の酵素探索を通じて、ヒドロキシプロリン全異性体の酵素合成を達成した。

### リジン水酸化酵素の探索とヒドロキシリジンの製法開発

ヒドロキシリジンは、医薬原料として有用なヒドロキシピペコリン酸の前駆体となるため、工業的に重要な化合物であり、効率的な生産法が求められていた。研究開始当初、リジン水酸化酵素は知られていなかった。そこで我々は、clavaminate synthase に着目した。当該酵素はアルギニン類似体の水酸化酵素であったため、類縁タンパク質の中にはリジン水酸化酵素が存在すると予想し、*in silico* スクリーニングを実施した。期待通り、リジン 3-水酸化酵素と 4-水酸化酵素を取得した (Fig. 2)。さらに、アルギニン 4-水酸化酵素や、予想外のグルタミンとヒスチジンを水酸化するユニークな酵素も発見した。このうち、いくつかの化合物は加水分解酵素、環化酵素を用いることで、さらなる誘導体へと変換可能であった。

取得した水酸化酵素を応用し、生産プロセスの開発も実施している。例えば、リジン 3-水酸化酵素発現大腸菌を水酸化触媒として用いることで、600 mM の L-リジンから 531 mM (86 g/L) の (2*S*,3*S*)-3-ヒドロキシリジン生産に成功した。

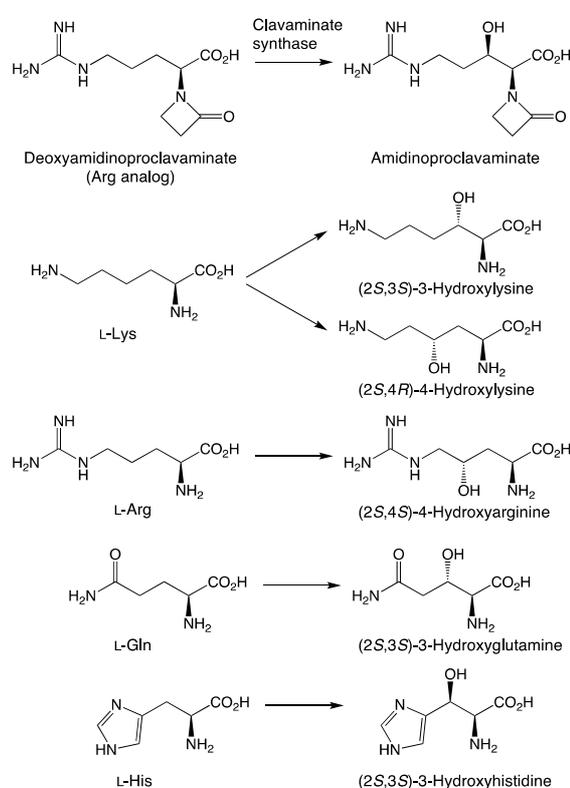


Fig. 2. リジン水酸化を中心とする多様なアミノ酸水酸化反応。反応は全てFe(II)/2-オキソグルタル酸依存的に進行する。

### 今後の展望

化学的に不活性な炭素に対し、直接酸素を導入する反応は容易ではない。オキシゲナーゼはこれを可能とするが、当該酵素の機能は水酸化に限定されない。今後は、多能なオキシゲナーゼを高度に活用し、分子種のさらなる多様化と応用展開に取り組みたい。

### 謝辞

本研究は早稲田大学、先進理工学部応用化学科応用生物化学研究室および理工学術院総合研究所において行われたものであり、木野邦器教授ならびに学生諸氏、共同研究者の皆様にも厚く御礼申し上げます。