



微生物由来の産業用酵素の探索、
構造機能解析とバイオテクノロジーへの応用

岡山大学大学院環境生命科学研究科 稲垣 賢二

はじめに

酸性環境や高熱環境など極限環境に生育する微生物や土壌中に生育する放線菌は、その生育環境に適応したユニークな性質を有しており、それら微生物が産生する酵素も同様に多様で多彩な機能を持つものが多い。人類は有史以前から身の回りに存在する種々の微生物の特性を、お酒や発酵食品をはじめ様々な発酵や酵素の生産に活用してきた。1970年代の「遺伝子操作技術」の確立には、制限酵素、DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼをはじめ多くの微生物酵素の発見、利用が不可欠であった。また、その後の生命科学研究の飛躍的な発展をもたらした1988年の「PCR (polymerase chain reaction) 法によるDNA増幅技術」の確立は、極限環境微生物である好熱性細菌由来の耐熱性DNAポリメラーゼの発見に基づくものである。さらに昨年2020年のノーベル化学賞を受賞した「ゲノム編集技術」の確立にも、微生物の持つユニークなCRISPER/Cas (CRISPER-associated proteins) 酵素の発見、利用が不可欠であった。このように微生物由来の新規酵素の発見が、近年の画期的な革新的技術の開発の基となっている。

筆者は1986年岡山大学赴任直後から極限環境微生物や放線菌など種々の微生物の産生する産業用酵素を探索、精製し、精密な立体構造解析や機能等の性質検討を行い、それら微生物酵素の持つユニークな特性を明らかにしてきた。さらに遺伝子工学及びタンパク質工学的手法を駆使し、異種発現系による大量生産、精製系の確立を行い、産業応用化の道を切り拓くと共に、基質特異性や反応速度論的性質を改変して創出した新しい触媒機能をバイオセンサーや臨床診断薬の開発等バイオテクノロジーに幅広く応用してきた。これらの成果は基礎研究だけでなく産業の発展に貢献できたと自負している。以下に主要な研究業績の概要を述べる。

1. 好酸性細菌の産生する有用酵素の探索と活用

1-1. *Acidiphilium* 属好酸性細菌の産生する制限酵素、メチラーゼ

制限酵素は、遺伝子組換え技術の中核とする現代バイオテクノロジーの必須のツールである。好酸性細菌の重金属耐性機構を検討する過程で、分離株が強い制限酵素活性を示すことを見だし、スクリーニングを開始した。最終的に分離菌株173株中68株に活性が検出され、14種もの異なる認識配列を有する制限酵素の存在が明らかとなった(表1)。*Acidiphilium* 属好酸性細菌は多種多様な制限酵素を生産し、生産性が高い一方非特異的ヌクレアーゼの生産が少なく精製が容易で、制限酵素の生産に最適であった。筆者らが発見した制限酵素の内3種 *AfaI*, *Aor13HI*, *Aor51HI* は、遺伝子工学用試薬として市販され現在でも国内外で幅広く使用されている。

1-2. 新属・新種 *Acidocella capsulatum* の発見・単離と産生する糖質関連酵素

好酸性細菌の新属・新種 *Acidocella capsulatum* を酸性環境

表1. II型制限酵素(4~6塩基認識)の分類表

下線を付したものがスクリーニングで発見した好酸性細菌由来の制限酵素

	4 Base			5 Base			6 Base		
	T	**A**	*C*	**N**	A*	C****G	G****C	T****A	
AATT	<u>TspEI</u>				<u>FsiI</u>	<u>MunI</u>	<u>EcoRI</u>		
ACGT	<u>MaeII</u>				<u>AclI</u>	<u>PmaCI</u>	<u>AatII</u>	<u>SnaBI</u>	
AGCT	<u>AluI</u>				<u>Asp3HI</u>	<u>PvuII</u>	<u>SacI</u>		
ATAT					<u>SspI</u>	<u>NdeI</u>	<u>EcoRV</u>		
CATG	<u>NlaIII</u>				<u>BspI</u>	<u>LllI</u>	<u>NcoI</u>	<u>Asp5HI</u> <u>BspHI</u>	
CCGG	<u>MspI</u>	<u>Asp2HI</u>	<u>BcnI</u>	<u>ScrFI</u>	<u>Cfr10I</u>	<u>SmaI</u>	<u>Afa24RI</u>	<u>Aor13HI</u>	
CGCG	<u>AccII</u>				<u>MluI</u>	<u>Asp32HI</u>	<u>BsePI</u>	<u>NruI</u>	
CTAG	<u>MaeI</u>			<u>DdeI</u>	<u>SpeI</u>	<u>EcoT14I</u>	<u>NheI</u>	<u>XbaI</u>	
GATC	<u>Sau3AI</u>	<u>TfiI</u>		<u>HinfI</u>	<u>Asp1HI</u>	<u>Afa16RI</u>	<u>Asp1HI</u>	<u>BclI</u>	
GCGC	<u>HaeI</u>			<u>Fnu4HI</u>	<u>Aor51HI</u>		<u>HaeII</u>	<u>FspI</u>	
GGCC	<u>HaeIII</u>	<u>AvaII</u>		<u>Cfr13I</u>	<u>HaeI</u>	<u>Eco52I</u>	<u>ApaI</u>	<u>BalI</u>	
GTAC	<u>AfaI</u>		<u>Tsp45I</u>	<u>MaeIII</u>	<u>ScaI</u>	<u>SplI</u>	<u>KpnI</u>	<u>BspI407I</u>	
TATA						<u>SfeI</u>	<u>AccI</u>		
TCGA	<u>TthHB8I</u>				<u>ClaI</u>	<u>Asp15I</u>	<u>SalI</u>	<u>AcpI</u>	
TGCA	<u>CviRI</u>				<u>EcoT22I</u>	<u>PstI</u>	<u>ApaLI</u>		
TTAA	<u>MseI</u>				<u>FshBI</u>	<u>AflII</u>	<u>HincII</u>	<u>DraI</u>	

から新たに単離し、命名した。本菌は *Acidiphilium* 属等他の好酸性従属栄養細菌に比べて糖類の資化性が広く、セロビオースやラクトース等の二糖類さらにはデンプンや配糖体を炭素源として利用できる。筆者らは最適pHが酸性側にあるユニークな一連の酸性グリコシダーゼを本菌が産生していることを見だし、この内α-グルコシダーゼ、β-グルコシダーゼ、β-ガラクトシダーゼの他トレハラーゼ、キシラナーゼを単離・精製し、性質を明らかにした。これらの多くはペリプラズムに存在し、その最適pHは3.0付近、酸性領域で安定な好酸性細菌の特性を反映した酵素群であることを明らかにした。

2. 抗腫瘍性酵素L-メチオニンγ-リアーゼとL-メチオニンデカルボキシラーゼに関する研究

土壌細菌 *Pseudomonas putida* 由来L-メチオニンγ-リアーゼ(MGL)は、ピリドキサルリン酸(PLP)依存性酵素であり、L-Metをα-ケト酪酸、メチルメルカプタンとアンモニアに分解する。無秩序に増殖し続けるがん細胞はL-Met要求性が高いので、血中に本酵素を投与すると、がん細胞はL-Met飢餓状態となり、アポトーシスにより死滅する。正常細胞に対する細胞毒性は極めて低く、次世代抗腫瘍性酵素としての製剤化に期待が寄せられていた。そこで筆者らは遺伝子クローニングを行い、組換え酵素の発現・精製法を構築すると共に、本酵素の立体構造を世界に先駆けて明らかにした(図1)。さらに本酵素の活性中心残基の機能解析を行い、Tyr114残基が一般酸塩基触媒として必須の残基であること、活性中心に特徴的な水素結合ネットワーク(図1右図)を構成するCys116, Lys240, Asp241残基が、基質L-Metの認識及び基質特異性に関与していることを明らかにした。特にCys116に注目し、C116H変異MGLがL-Met分解活性を失ったにも関わらず、L-ホモシステイン(L-Hcy)分

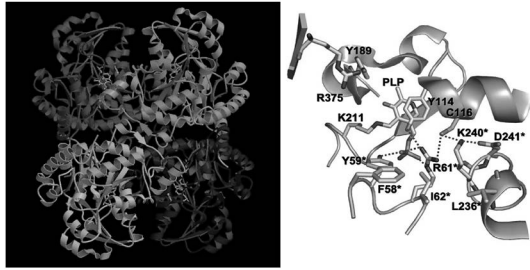


図1. L-メチオニン γ -リアーゼのX線結晶構造と活性中心

解活性を保持することや、野生型酵素が持たないL-Cysに対する強力な脱離活性を示すという極めて興味深い基質特異性を発見した。更に最近基質複合体のX線結晶構造に基づく解析からその理由を明らかにした。こうした基質特異性改変酵素の開発を基に、各種疾病のリスクファクターとして最近注目されている血中L-Hcyの定量キットの開発に成功し、まもなく市販予定である。一方、本酵素を抗がん剤として血中投与した場合に想定されるアナフィラキシーを防止する方法として、高純度ポリエチレングリコールで修飾する方法を確立し、血中半減期の延長、抗原性の低下、アナフィラキシーの抑制を可能にし、また抗がん剤として実用化するための結晶化工程を含む工業生産法の確立に成功した。一方MGLと同様に抗腫瘍活性を有する放線菌由来L-メチオニンデカルボキシラーゼ (MetDC) についても、産業利用に向けて大腸菌発現精製系を構築し、新規なL-Met定量法を確立した。更に血中L-MetをMetDCで分解した後に、L-HcyをMGLで定量する方法も確立し、報告した。

3. 高基質特異性L-アミノ酸オキシダーゼの構造機能解析と応用に関する研究

蛇毒由来酵素を代表とする一般的なL-アミノ酸オキシダーゼは基質特異性が低く、多くのアミノ酸に作用する。それに対して放線菌由来のL-グルタミン酸オキシダーゼ (LGOX) と糸状菌由来のL-リシンオキシダーゼ (LysOX) は、極めて高い基質特異性を持つ非常にユニークなL-アミノ酸酸化酵素の一群である。筆者はこれら両酵素に着目し、遺伝子操作技術を駆使して困難な課題を解決し、大腸菌を用いた大量発現、大量精製系を確立した。従来の酵素生産はフスマ培養という固体培養法によって行われており、大量の均一精製が極めて困難であったが、組換え酵素生産系の確立により、大変容易に大量生産できるようになり、医薬分野への応用研究が可能となった。筆者らは、放線菌由来LGOXの遺伝子クローニング、大量発現・精製系を確立し、成熟体のX線結晶構造解析に成功した。この際本酵素が、二量体構造の前駆体蛋白質として発現した後に、自身の生産するプロテアーゼで切断され、活性化すると共に、構造安定化するという他に例のない極めてユニークな性質を有することも明らかにした。本酵素の特性に着目し常温菌由来にも関わらず安定性に優れ、バイオセンサー用にふさわしい酵素である事を明らかにし、開発研究を行った。本酵素を過酸化水素電極に固定化し、食品の旨味成分であると同時に興奮性の神経伝達物質でもある生体内のL-Gluを特異的かつ、微量定量できる分析法を開発した。さらにこの方法が臨床検査において、肝機能の指標であるGOTやGPTの迅速、高感度測定に活用できることを示した。現在本酵素を用いた家庭用小型肝機能センサーの開発に取り組んでいる。また活性中心のArg305が基質

L-Glu認識の必須残基であることを明らかにし、Arg305一残基のアミノ酸置換により基質特異性の完全な変換が行えることを実証した。この方法でL-Gluに反応せず、塩基性アミノ酸のL-ArgやL-HisまたL-TyrやL-DOPAに反応する酵素の作成に成功した。これらは微量定量用のバイオセンサーとして利用可能である。一方糸状菌由来LysOXは長年L-Lys定量用の酵素として国内外で使用されてきた。加えて血中のL-Lysレベルを減少させることによる腫瘍細胞の増殖抑制効果と、酵素反応により生成する過酸化水素による殺細胞効果が認められており、優れた抗腫瘍性酵素として医療分野における応用が期待されていたことから筆者らは糸状菌 *Trichoderma viride* 由来の本酵素遺伝子の完全長cDNAの取得を行い、放線菌を用いた異種発現系の構築に初めて成功した。さらに本酵素と基質L-Lys複合体のX線結晶構造解析にも成功し(図2)、最近大腸菌発現系も構築でき、厳格な基質特異性の要因や成熟化の機構を明らかにした。

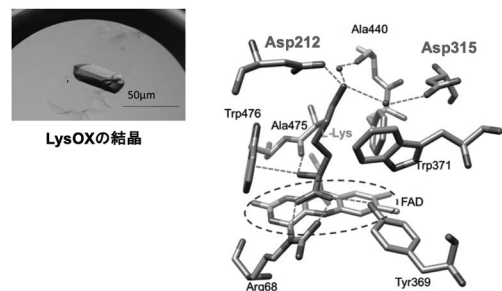


図2. L-リシンオキシダーゼの結晶と基質複合体構造

おわりに

以上筆者は、微生物の産生する有用酵素(表2)の持つ優れた特性を遺伝子工学、タンパク質工学を駆使することにより明らかにするとともに、その特性を産業に応用する研究を展開し、成果を上げ、農芸化学分野の発展に貢献した。

表2. 研究対象とした産業用酵素群

<ul style="list-style-type: none"> ・アミノ酸代謝関連酵素 FAD依存性酵素 <ul style="list-style-type: none"> L-グルタミン酸オキシダーゼ, L-リシンオキシダーゼ, L-アミノ酸オキシダーゼ PLP依存性酵素 <ul style="list-style-type: none"> L-メチオニンγ-リアーゼ, L-シスタチオンγ-シンターゼ L-メチオニン脱炭酸酵素, アラニンセマーゼ NAD⁺依存性酵素 <ul style="list-style-type: none"> イソクエン酸脱水素酵素, 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 キノン(CTQ)含有酵素 <ul style="list-style-type: none"> L-リシンϵ-オキシダーゼ, グリシンオキシダーゼ ・糖質関連酵素 <ul style="list-style-type: none"> トレハラーゼ, キシラーゼ, グリセロールキナーゼ α-グルコシダーゼ, β-グルコシダーゼ, イノミラーゼ ・核酸関連酵素 <ul style="list-style-type: none"> 制限酵素 Afa I, AorH13HI, Aor51HI, TthHB8I, メチラーゼ ・その他 <ul style="list-style-type: none"> アコニターゼ, カタラーゼ, アミダーゼ, エステラーゼ 2-ニトロプロバンジオキシゲナーゼ 他 	
---	--



謝辞 本研究は、岡山大学大学院環境生命科学研究所微生物遺伝子化学研究室において行われたものです。研究を共に遂行して頂きました研究室の皆様へ感謝いたします。また京都工芸繊維大学原田繁春名誉教授、大阪大学今田勝巳教授並びに沢山の企業や大学の共同研究者の皆様へ厚くお礼申し上げます。学生時代から今日に至るまで長年ご指導頂きました京都大学左右田健次名誉教授に心より感謝いたします。最後になりましたが、本賞にご推薦頂きました中四国支部長櫻谷英治徳島大学教授及び授賞選考委員の皆様へ厚くお礼申し上げます。