



新しい酵素機能の開拓と産業利用に関する研究

富山県立大学・工学部・生物工学科 教授 浅野 泰久

本研究では、微生物や植物由来の新しい酵素を見だし、進化分子工学的手法により巧みに改変して、従来には記録されていない新しい反応および用途を開発した。それらは、化学工業および医療に有効に利用されている。

1. 新規酵素フェニルアラニン脱水素酵素類の開発と先天性代謝異常症診断への利用

新規酵素フェニルアラニン脱水素酵素 (EC 1.4.1.20) を細菌 *Sporosarcina ureae* や *Bacillus sphaericus* などに見だし、初めて酵素化学的諸性質を明らかにするとともに、L-フェニルアラニン誘導体の合成、および先天性代謝異常症であるフェニルケトン尿症の診断に適用した。 *Bacillus badius* 由来の本酵素を用いるフェニルケトン尿症の新しい診断法は、1994年に厚生労働省に認可を受け、札幌イムノダイアグノスティックラボラトリー(株)によって実用化された。現在まで数十年にわたって、各地方自治体の公的機関で新生児の先天的代謝異常のマススクリーニング試験の一環として利用されている。我が国の新生児の約30% (500万人以上) がこの方法により診断され、約70名のフェニルケトン尿症新生児を検出する実績を上げている (図1)。

さらに、自然界には存在が確認されていないメチオニンに良好に作用する変異型アミノ酸脱水素酵素 (メチオニン脱水素酵

素と呼ぶ) を、 *Bacillus sphaericus* 由来のフェニルアラニン脱水素酵素を出発酵素とする進化分子工学的手法により創製した。本酵素を同じく先天性代謝異常症であるホモシスチン尿症の診断に適用した。L-メチオニンの酵素分解によって発生するアンモニアを検出する従来の方法では、擬陽性が出やすい問題点があったが、メチオニン脱水素酵素を分岐鎖アミノ酸トランスアミナーゼとともに用いると血中のメチオニンの定量が可能であり、新生児のホモシスチン尿症の検出に使うことができる。

2. 「アルドキシム-ニトリル経路」の発見と代謝酵素の有用物質生産への利用

微生物および植物のニトリル代謝酵素であるアルドキシム脱水素酵素、ニトリルヒドラターゼ、アミダーゼ、ヒドロキシニトリルリアーゼなどに関する研究を行い、それらの生理学的側面、存在意義および有効利用について検討した (図2)。細菌 *Bacillus* sp. や *Rhodococcus globerulus* などにアルドキシムの脱水反応によりニトリルを与える新規酵素アルドキシム脱水素酵素 (EC 4.99.1.5, 4.99.1.6) を見だし、ニトリルヒドラターゼの代謝の上流にあることを明らかにするとともに、ニトリルの酵素的合成に初めて成功した。さらに、ニトリルヒドラターゼ、ニトリラーゼ、アミダーゼなどのニトリル分解酵素の遺伝子クラスターを解読し、それらの遺伝子がアルドキシム脱水素遺伝子と連関して微生物界に広く存在していることを解明した。このようなアルドキシム脱水素酵素とニトリル分解酵素との相関関係を検討して、「アルドキシム-ニトリル経路」を明らかにした (図2)。

光学活性アミノ酸にはそのアミノ基あるいはカルボキシル基が保護された、都合4種類の誘導体が存在する。それらに作用する加水酵素のうち、従来報告が皆無であった新規酵素D-アミノペプチダーゼ (EC 3.4.11.19)、D-アミノ酸アミダーゼなどのD-アミノ酸アミド加水分解酵素群を細菌 *Ochrobactrum an-*

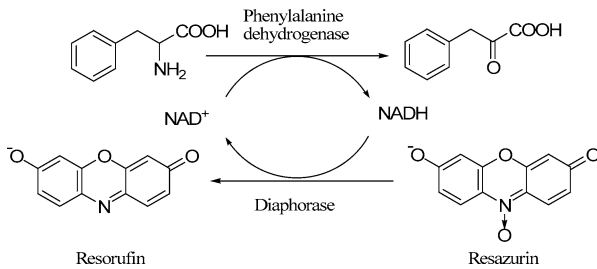


図1 フェニルアラニン脱水素酵素およびジアフォラーゼを用いるL-フェニルアラニンの蛍光定量法

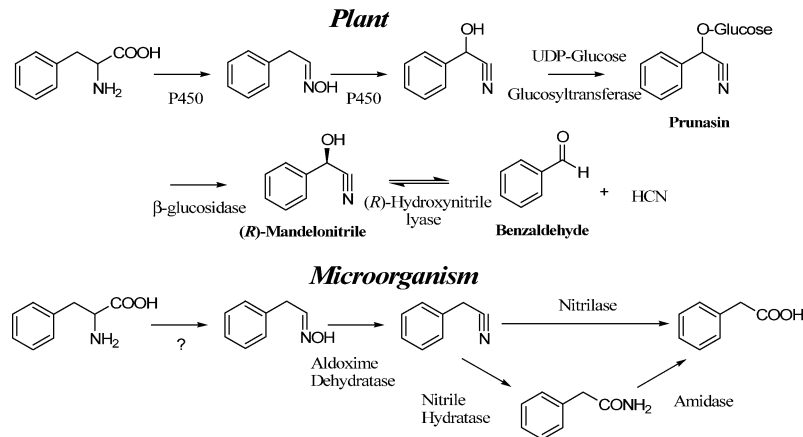


図2 植物と微生物の「アルドキシム-ニトリル経路」の比較

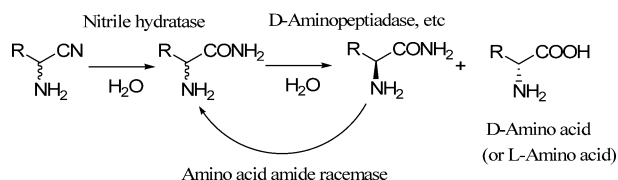


図 3 アミノニトリルあるいはアミノ酸アミドを基質とするダイナミックな光学分割反応

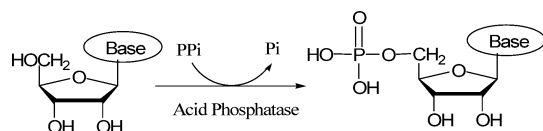


図 4 ピロリン酸を用いるイノシンの酵素的リン酸化反応

throps などに発見し、酵素化学的諸性質や立体構造を明らかにするとともに、それらを用いるアミノ酸アミド類の新しい光学分割法を開発した。アミノ酸アミド加水分解酵素を用いると、ストレッカー合成により簡便に調製できるアミノ酸アミドを基質として、短工程で光学活性アミノ酸に至ることができ、その工業利用が検討されている。さらに、*Achromobacter obae* 由来の α -アミノ- ϵ -カプロラクタム (ACL) ラセマーゼ (EC 5.1.1.15) に直鎖状アミノ酸アミドに作用する新規なラセマーゼ活性を発見した。アミノ酸アミド加水分解酵素類と ACL ラセマーゼを組合せて用いることにより、アミノ酸アミドを原料とする、光学活性なアミノ酸の定量的な合成 (アミノ酸アミドのダイナミックな光学分割) を初めて可能にした。また、非選択的なニトリルヒドラーゼを組合せると、アミノニトリルのダイナミックな光学分割による光学活性アミノ酸の合成も可能である (図 3)。

我が国ではほとんど研究例がなかった、植物由来のヒドロキシニトリルリアーゼ (HNL) を求めて、富山県中央植物園と共同で多数の植物体をスクリーニングし、7 種類の新しい HNL を発見した (世界の既知種の約 30%)。新しく見いだした *Paspiflora edulis* (パッションフルーツ) 果皮、*Eriobotrya japonica* (びわ) や *Prunus mume* (梅) の種子等由来の (R)-HNL (EC 4.1.2.10)、ならびに *Baliospermum montanum* 由来の (S)-HNL を用いて、各種シアノヒドリンの酵素的製造法を開発した。また、*Prunus mume* 種子に見いだした (R)-HNL を用いて多数の脂肪族および芳香族のアルデヒドやケトン約 100 種類が基質となることを認め、数十種類の (S)-シアノヒドリンを合成した。(S)-マンデロニトリルの合成のために、*Manihot esculenta* (キャッサバ) 由来 (S)-HNL (MeHNL) (EC 4.1.2.39) 遺伝子の大腸菌内での発現を検討した。大腸菌内では MeHNL がほとんど封入体として発現されるので、ランダム変異によって 1~数カ所に変異を与え、大腸菌で容易に発現される変異型酵素を得た。変異型 MeHNL は 37°C でも活性型として発現され、培養液当りの活性は野生型の十数倍に上昇した。このような変異は従来ほとんど報告がない。調製が困難であった *Manihot esculenta*

由来酵素 (S)-MeHNL を大量に得ることが可能になり、医薬など原料のキラル中間体であるシアノヒドリンの大量製造のための検討がなされている。

3. イノシンの酵素的リン酸化反応の開発

ピロリン酸を用いるイノシンの酵素的リン酸化反応を開発し、進化分子工学を用いる酵素の改変により収率を劇的に向上させた (図 4)。この酵素法によるイノシン酸およびグアニル酸の製造が現在、味の素(株)によって工業的に行われている。イノシン酸は鯉節の、グアニル酸は干し椎茸の旨み成分として知られる有用な核酸化合物 (ヌクレオチド) である。従来までの核酸製造には、RNA の酵素的分解法、イノシン酸の直接発酵法、キサンチル酸を酵素的にアミノ化してグアニル酸にする方法、イノシンを酵素的にリン酸化してイノシン酸にする方法、イノシン・グアノシンを発酵法で製造し、それを化学的にリン酸化する方法などが知られていた。

味の素(株)と食品添加物として使用されているピロリン酸をリン酸供与体とする酵素的リン酸化法の確立を目指して研究を開始し、*Morganella morganii* などの腸内細菌群に存在する酸性ホスファターゼ (EC 3.1.3.2) が、イノシンの 5'位を選択的にリン酸化する反応を見いだした。しかし、本酵素は生成したイノシン酸を強く加水分解する活性もっており、実用に適さないことが判明した。そこで本酵素のリン酸基転移反応の効率を上げ、脱リン酸反応を抑えることが必須と考え、進化分子工学的手法による酵素改変を行った。2 個のアミノ酸の置換による変異型酵素を大腸菌で大量発現させて菌体反応を行ったところ、生成したイノシン酸の脱リン酸化反応を劇的に抑えることが可能となり、実用的レベルでイノシン酸を蓄積させることができた。富山県立大学での共同研究をもとに、味の素(株)によって非組換え型実用菌が構築され、リン酸化酵素を用いる核酸系うま味調味料 (イノシン酸およびグアニル酸) の生産技術が 2003 年に工業化された。現在、年間 6,600 トンのスケールで工業生産が行われている。

以上のように、本研究では種々の新しい酵素および酵素反応を斬新な視点で開発し、それらは化学工業および医療産業に有効に利用されている。

本研究は、主として(財)相模中央化学研究所および富山県立大学生物工学研究センター酵素化学工学研究室で行われたものである。多大なご協力をいただいた、加藤康夫准教授、米田英伸講師、(財)富山県新世紀産業機構派遣等博士研究員、大学院生、研究室構成員の皆様へ感謝申し上げます。また、ご指導ご鞭撻を賜りました京都大学および富山県立大学名誉教授の山田秀明先生、京都大学の清水 昌先生をはじめとする先生方、(財)相模中央化学研究所長、近藤 聖博士、味の素(株)発酵研究所、宇多川 隆博士、同 三原 康博博士、名古屋大学の山根 隆教授、Sheffield 大学の David Rice 教授、Cornell 大学の Arthur Cooper 教授に感謝申し上げます。その他多数の諸先輩、同僚、企業などの共同研究者の皆様へ感謝申し上げます。