

好熱菌由来の極限酵素の機能開発



九州大学大学院農学研究院遺伝子資源工学専攻 教授 大島 敏久

酵素は、高い触媒能と特異性からバイオテクノロジーにおける反応素子として極めて優れた性質をもっている。一方で、低い生産性と変性失活を起こしやすい短所をもっている。多くの酵素の産業への有効利用には、これらの短所を克服し、優れた機能を生かすことが長年にわたる最重要課題の一つであった。しかしながら、高温環境に生育する好熱菌由来の極限酵素、特に高度耐熱性アミノ酸脱水素酵素やアルドラーゼを対象に生化学、遺伝子工学的手法による機能の解明、X線結晶解析などによる構造の解明、および応用研究への展開を通して、酵素の二つの弱点を克服する解決法を見いだした。また耐熱性の極限酵素の高度安定性の分子機構の解明やその特徴を利用する新たな応用面の開発を進めてきた。本講演では、それらについて、概要を述べる。

1. 中等度好熱菌由来の NAD 依存性アミノ酸脱水素酵素の機能開発

1980年ごろ未開拓であった好熱菌由来の酵素の機能開発に取り組み、好熱性 *Bacillus* 属菌（現 *Geobacillus* 属菌）に安定性の高い NAD 依存性のロイシン脱水素酵素 (LeuDH) とアラニン脱水素酵素 (AlaDH) を発見した。好熱菌の酵素遺伝子の組換え法をいち早く取り入れ、好熱菌の LeuDH 遺伝子を常温菌の大腸菌で大量発現させ、酵素の耐熱性の差を利用して迅速、かつ簡便に精製する好熱菌酵素の精製・生産法を世界で最初に確立した。この方法は、現在では耐熱性酵素の迅速、かつ簡便な精製と調製法として、世界的に広く利用されており、その後の好熱菌酵素の機能と構造解析などの基礎研究だけでなく、産業への実用的な利用において極めて大きな貢献をしており、好熱菌酵素の初期の研究における講演者らの最大の功績の一つと言える。さらにわれわれは、安定性に優れている耐熱性アミノ酸脱水素酵素の利用面の開発として、アミノ酸の食品分析や臨床分析法の開発や光学活性アミノ酸とアミノ酸誘導体（L-フッ素アラニンなど）を工業生産する補酵素再生型バイオリアクターの開発に成功し、最初の耐熱性酵素の工業的利用を達成した（図1）。次いで、新規耐熱性フェニルアラニン脱水素酵素、リジン脱水素酵素などを発見し、機能と構造解析にも成功した。これらの酵素は市販され、アミノ酸誘導体の生産や食品、臨床分析などに利用されている。

2. 超好熱菌の高度耐熱性酵素の機能開発

2.1 超好熱菌の NAD 依存性アミノ酸脱水素酵素の構造と機能解析

1980年に入り、海底火山の熱水噴出物などの高温の極限環境から、水の沸点の100°C付近で生育できる超好熱菌が分離された。また、それら培養法が進歩し、第3の生物群であるアーキアに属することなどの分類学的な面や進化面などに関する解説も進められた。講演者は、超好熱菌の極限酵素の研究は、酵素の基礎と応用研究において新たな可能性を開くものとして高

い潜在性を有することを認識し、1980年代の終わり頃から100°C付近で生育する超好熱菌の極限酵素としてグルタミン酸脱水素酵素 (GluDH) を対象とした超好熱菌の酵素の機能と構造解析、および応用研究を我が国で最初に行った。まず、嫌気性超好熱菌 *Pyrococcus* 属菌から100°Cでも変性しない高度耐熱性 NADP 依存性 GluDH を発見し、特有の解糖系（われわれが明らかにした変形 EM 経路）との関係における機能を見いだした。また、内陸性の超好熱菌 *Pyrobaculum islandicum* に補

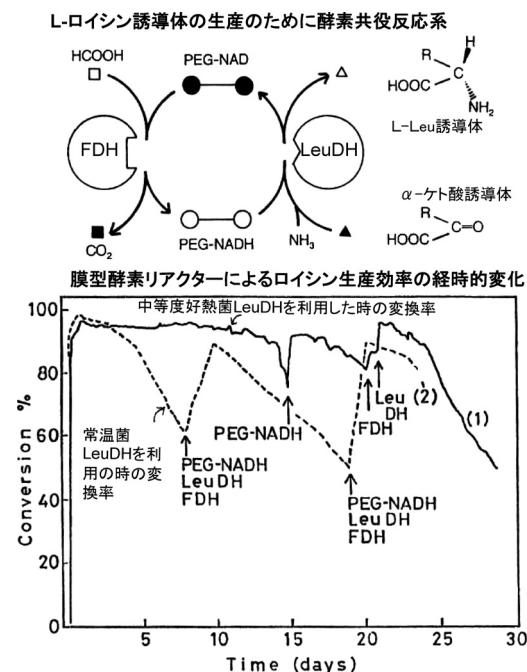


図1 ロイシン脱水素酵素 (LeuDH) と酵母ギ酸脱水素酵素 (FDH) の共役反応を利用する光学活性分岐鎖アミノ酸とその誘導体の生産のための補酵素再生系バイオリアクター。2種の脱水素酵素と分子量20,000のPEGで高分子化された補酵素NADが限外ろ過膜(分画分子量:5,000)で仕切られたリアクター内で、化学合成可能なケト酸とギ酸アンモニウムを原料として、光学活性なL-ロイシン(誘導体)と炭酸ガスに変換される。抗生物質の原料やキラルプロッキング剤などとして有用なL-tert-Leu, NMRなどによるタンパク質の構造解析、代謝解析などに有用な光学活性¹⁵N, ¹³C標識L-Leuの生産に実用化されている。好熱菌由来のLeuDHの利用(実線)は常温菌由来の酵素の利用(破線)よりも、リアクターの効率を大幅に高める。下図は、LeuDHとFDH共役反応系からなる連続的L-Leu生産用膜型酵素リアクターの変換率を示す。矢印は、酵素や補酵素のリアクターへの補給したことを表す。これは、好熱菌由来のNADアミノ酸脱水素酵素が物質生産に有效地に利用された最初の例である。1) T. Ohshima, and K. Soda (2000): "Stereoselective Biocatalysis" (R. N. Patel ed.), Stereoselective Biocatalysis: Amino Acid Dehydrogenases and Their Applications. Marcel Dekker Inc. (New York), 877–902.

酵素特異性の異なる NAD 依存性 GluDH を発見して、この極限酵素の X 線結晶構造解析に成功した(図2)。その結果、本酵素はサブユニット間の疎水性相互作用の強化によって高い耐熱性を示す、という従来の海洋性超好熱菌由来の酵素とは異なる新規な耐熱化機構を明らかにした。また、この酵素が遺伝子組換え大腸菌では不活性型で生産され、熱や尿素処理によって活性型へ成熟すること、X 線小角散乱法などの解析により成熟化に伴って酵素の表面部分がコンパクトに折りたたまれるという興味ある分子活性化現象を見いだし、謎であったサブユニット形成機構に新しい概念を打ち出した(図2)。さらに、酵素の立体構造からの基質認識機能に関する知見と部位特異的変異法を用いた超好熱菌の耐熱性 GluDH から、天然を超える高度耐熱性 LeuDH を作成し、耐熱性酵素の新しい創製法を明らかにした。

一方、河原林らが1998年、わが国において最初のゲノム解読を超好熱菌 *P. horikoshii* で完了した。そのポストゲノム研究として、耐熱性酵素のゲノム情報と酵素活性情報からの機能と構造生物学的解析を、河原林氏との共同研究の形でいち早く開始した。これにより多くの関連する酵素の機能と構造解析、応用開発研究を加速させ、この分野の研究の展開において先導的役割を果たした。その中で超好熱菌から高度耐熱性 L-アスパラギン酸脱水素酵素、L-トレオニン脱水素酵素、L-リジン脱水素酵素などを発見、機能と構造解析を行って、酵素の耐熱化の分子機構に新たな知見を見いだした。このようなポストゲノム研究としてのゲノム情報と酵素活性により酵素の機能と構造解析、および応用開発を進める手法は、酵素の機能開発法の一つとして一般に広く用いられており、われわれはこの面においても先導的役割を果たし、極限酵素の基礎と応用研究の進展に大きく貢献している。

2.2 超好熱菌のフラビン含有アミノ酸脱水素酵素の構造と機能解析、および応用

一方、NAD(P)ではなく、フラビンを含有する色素依存性アミノ酸脱水素酵素の機能開発を進め、新しい局面を開拓した。この一群の酵素は、膜結合性や複合体を形成しているものが多く

く、非常に不安定なため、研究が遅れていた。講演者は、高い安定性が期待できる超好熱菌由来の酵素であれば機能開発が可能であると予想し、スクリーニングを行った。その結果、超好熱菌に安定性の高い2種類のL-プロリン脱水素酵素(PDH)、およびD-プロリン脱水素酵素を見いだした。まず、超好熱菌 *Thermococcus profundus* に $\alpha\beta\gamma\delta$ の4種のサブユニット(4量体構造)からなるFADと鉄硫黄を含む新規PDH複合体を見いだし、機能の解明に成功した。また、超好熱菌 *P. horikoshii* に、 $\alpha_4\beta_4$ 構造をとるPDHを発見し、機能解析から補酵素としてFADのほかにFMN、Fe、ATPを有する全く新規な複合体酵素であることを明らかにしたうえで、X線結晶構造解析にも成功した(図3)。さらに別の超好熱菌からFAD含有のD-プロリン脱水素酵素複合体を発見し、膜結合性のアミノ酸脱水素酵素としては、初めて大腸菌での大量生産に成功した。さらにこれ

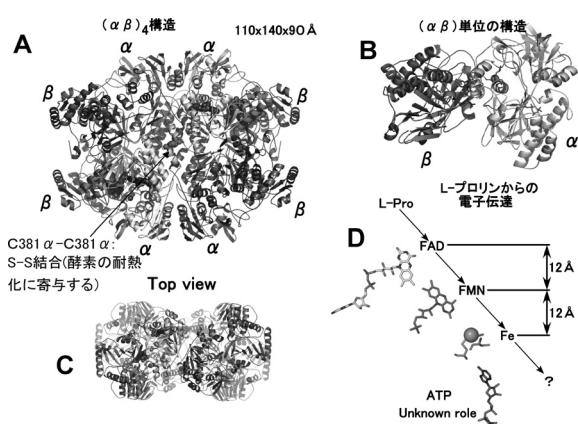


図3 *P. horikoshii* のフラビン含有プロリン脱水素酵素 L-ProDH (8量体酵素) 複合体の立体構造と新規電子伝達系。A: $\alpha_4\beta_4$ 構造。B: $\alpha\beta$ 単位構造。C: A図の上から見た図。D: 補欠分子族の相対的な位置。FAD(α)、FMN (α/β 間)、鉄(β)、ATP (β)の分子間距離は、それぞれ約 12 Å である。1) H. Tsuge et al. (2005): *J. Biol. Chem.*, 280, 31045–31049. 2) 津下英明、川上竜巳、櫻庭春彦、安芸謙嗣、勝沼信彦、大島敏久 (2006): 生化学, 78, 41–45.

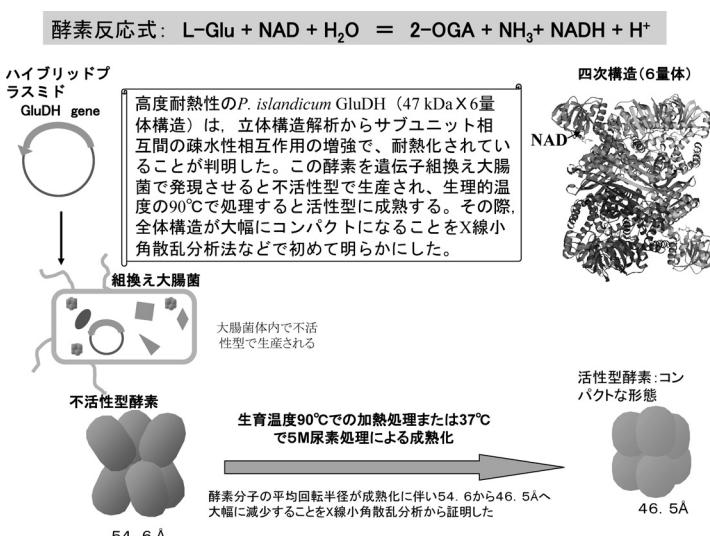


図2 超好熱アーキア *Pyrobaculum islandicum* 由来のグルタミン酸脱水素酵素の立体構造(6量体)と、その遺伝子組換え大腸菌で生産される不活性型酵素の熱や尿素処理による活性化機構。1) S. Goda (2005): *Biochemistry*, 44, 15304–15313. 2) 郷田秀一郎、櫻庭春彦、柊弓絃、大島敏久 (2008): ビタミン, 82, 337–343. 3) 櫻庭春彦、郷田秀一郎、川上竜巳、大島敏久、津下英明、勝沼信彦 (2006): 化学と生物, 44, 305–312.

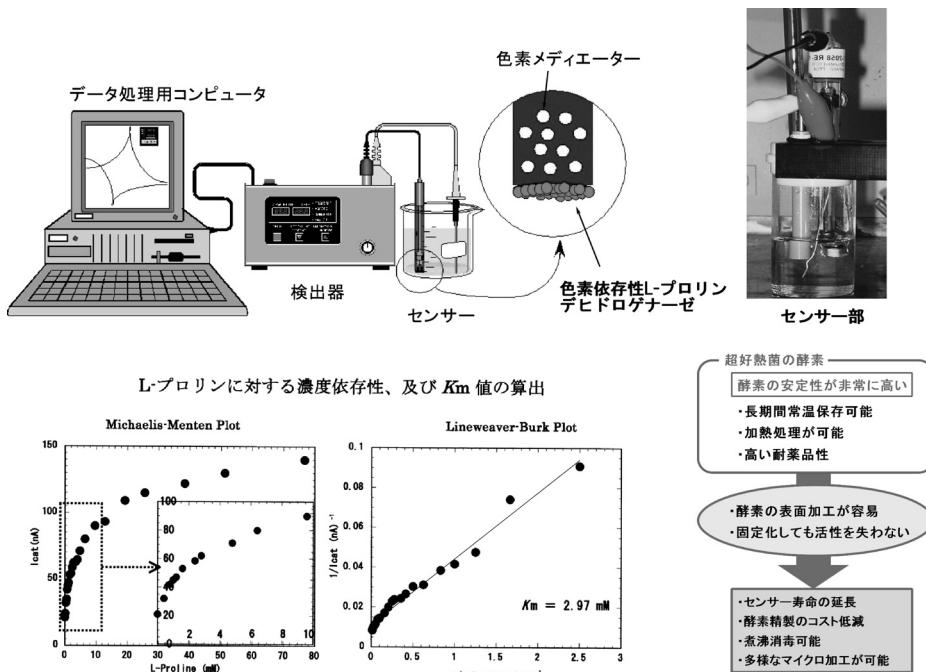


図4 超好熱菌由来のラバイン含有プロリン脱水素酵素を素子とする酵素電極型バイオセンサーの開発。L-Pro濃度（横軸）と電気量（ μA ）（縦軸）間に典型的なミハエリス-メンテン型キネチックスが認められ、本センサーによって電気化学的なL-Proの測定が可能になった。 K_m 値も分光的測定から得られた値とほぼ同一である。1) H. Zheng *et al.* (2006): *Science and Technology of Advanced Materials*, **7**, 243–248. 2) Y. Tani *et al.* (2008): *Anal. Chim. Acta*, **619**, 215–220. 3) Y. Tani *et al.* (2009): *Anal. Sci.*, **25**, 919–924. 4) 大島敏久, 櫻庭春彦, 津下英明 (2007): バイオセンサー素子としてのアミノ酸脱水素酵素の構造と機能, 「構造生物学」, 倉光, 杉山編, 共立出版, 184–191。

らの新規複合体酵素を用いる電極型バイオセンサーを創製した(図4)。また、これらの極限酵素複合体の応用面として、病原菌であるレジオネラ菌のDNA量を電気化学的検出に簡便・迅速に測定できる新規酵素センサーやアミノ酸酵素電池の開発など、新たな展開を行い、高度耐熱性の極限酵素の応用において新局面を開拓した。

2.3 ゲノム情報に基づく超好熱菌の有用酵素の機能開発

有用性の高い極限酵素として炭素-炭素結合形成反応を触媒するアルドラーゼに注目し、まず、超好熱アーキア由来の2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ(DERA)の機能と構造、ならびに応用開発を進めた。DERAは2分子以上のアセトアルデヒドなどのアルデヒドを基質として、抗ウイルス剤などの原料となる光学活性な糖類関連化合物を生成する。超好熱性 *Aeropyrum* や *Pyrubaculum* 属菌で高度耐熱性のDERAを見出し、機能と立体構造解析に成功した。また、常温菌である大腸菌の酵素との比較から耐熱化や有機溶媒耐性化の分子機構について解明した。さらに、超好熱菌由來のDERAが高いアセトアルデヒド(有機溶媒)耐性をもつために、その3分子縮合反応による有用物質の生産が可能であることを示した。これは極限酵素の新たな有用性を示すもので、今後の展開が期待されている。その他、超好熱アーキアのゲノム情報に基づく構造生物

学的研究として、補酵素NAD(P)の生合成系を構成するすべての酵素(酸化酵素、脱水素酵素、転移酵素、キナーゼなど)の機能と構造解析を行い、それらの特徴を明らかにするとともに、応用面への新たな有効利用を示した。

本研究は、京都教育大学教育学部理学科、徳島大学工学部生物工学科、九州大学大学院農学研究院遺伝子資源工学専攻の研究室で主として行ったものであります。共同研究者として多大なご協力をいただいた櫻庭春彦(現香川大・教授)、郷田秀一郎(長崎大・准教授)、里村武範(米子高専・助教)、川上竜巳(現佐賀大・助教)、米田(東海大・講師)、土居克実(九大院・講師)、および多くの大学院生や研究室構成員の方々に深く感謝いたします。また、左右田健次(京大・名誉教授)、C. Wandrey(独・ユーリッヒ研究センター・教授)、倉光成紀(大阪大院・教授)、柊弓弦(関西医大)、末信一郎(福井大院・准教授)、津下英明(徳島文理大・教授)、勝沼信彦(徳島文理大・前学長)、藪谷智規(徳島大院・准教授)、本仲純子(徳島大・教授)、河原林裕(NEDO・主任研究員)の諸先生方には、共同研究を通して、多大なご協力とご指導をいただきましたことに、厚く御礼申し上げます。