

微生物代謝および酵素の分子機構と機能開発



筑波大学大学院 生命環境科学研究科 小林 達彦

筆者は大学に入学してほどなく、セルマン・ワックスマン博士の自叙伝を読み、微生物研究の奥深さを感じ、応用微生物学・醗酵生理学に興味をもった。その後、旅した印度の片田舎で「自分は大学生であるが、ここでその肩書きを取ったら自分は何であるのか？ 何ができるのか？ 生きるすべはあるのか？」と自問し、「自分は何もできないのでは、何かで身を立てるべく、今、なすべきことをしっかりやらないと…」と痛感した。

微生物・動物・植物・食品・生物有機化学等を対象とする農芸化学において、アミノ酸醗酵等の有用物質生産に寄与してきた応用微生物学が自分にとって最も分かりやすく興味深かったことから、この学問に志した。大学院生時には山田秀明先生の研究室で、放線菌 *Rhodococcus rhodochrous* J1株を対象に Nitrilase (ニトリル加水分解酵素) 活性を高めるべく金属の添加効果を検討していた過程で、コバルトを培地に添加することで、新たに Nitrile hydratase (ニトリル水和酵素) 活性が出現することを偶然、認め、隠れた機能が生命にはあるものだと実感した。これまで多くの共同研究者と、微生物の新機能の探索・代謝生理の研究を通じて、その潜在能力を引き出すとともに、種々の新規な微生物・酵素を見出し、さらにそれらの新規かつユニークな機能を利用した物質生産技術開発の基盤となる成果を挙げる事ができた。以下に、主な概要を記載させて頂く。

① 翻訳後修飾機構の新概念の提唱と新規シャペロンの発見

生体内で合成されるタンパク質の多くは種々の翻訳後修飾を受けることで初めて機能を発揮する。即ち、遺伝子の塩基配列に基づき翻訳過程によって合成されるタンパク質はそのままでは機能をもたず、翻訳後修飾を受けることで成熟化するが、これまで知られている翻訳後修飾は全て、翻訳によって生成した元々のタンパク質に修飾がなされる。それに対し、筆者らは、「アミノ酸配列が完全に同じタンパク質コンポーネント同士が互いに入れ替わることで初めて(修飾コンポーネントが供給され)成熟化タンパク質が生成する現象」を発見 (Self-subunit swapping と命名) した。即ち、*Rhodococcus rhodochrous* J1株 (以下、J1株と略) の2つのサブユニットから構成される Nitrile hydratase の片方のサブユニット (α サブユニット) が他のタンパク質複合体 ($\alpha\epsilon_2$) 中の同一サブユニットと置き換わる (スワッピングする) ことで成熟化酵素が生成する現象を発見した (図1, 式1)。これは、全く予想だにできなかったタンパク質翻訳後修飾機構のブレークスルーとなる概念である。

一方、様々なシャペロンの機能が知られているが、一つのタンパク質分子が異なるタイプのシャペロン機能を複数もちあわせているという報告はこれまで無く、また、他のタンパク質が正しく折りたたまれ機能を獲得するのを助けるために「ATPのエネルギーを要する (ATPを加水分解する) シャペロン」や「キナーゼ活性を示すシャペロン」の存在はこれまで報告され

ているものの、それ以外の他の反応をシャペロンが触媒する酵素機能の概念は無かった。筆者らは、Self-subunit swapping シャペロン (図1, 式1) タンパク質 (e タンパク質) が2つ目のシャペロン (金属 [Co] シャペロン) 機能を有するのみならず (図1, 式2), Cys の酸化反応に関わることを発見した (図1, 式3)。このように多様な機能をもつシャペロンは前例が無い。

② 新規な代謝および酵素の発見

(i) イソニトリル代謝: ニトリル [R-C≡N] の異性体であるイソニトリル [R-N≡C] は自然界にも存在するが一般的に毒性を有する化合物で、その代謝はタンパク質・遺伝子レベルで未解明であった中、イソニトリルを分解する生物 (細菌 *Pseudomonas putida*) を発見するとともに、イソニトリルが N-置換ホルムアミド [R-NH-C(=O)H] に水和される代謝経路を同定した。Isonitrile hydratase と命名した本代謝酵素 (InhA) には国際生化学・分子生物学連合 (NC-IUBMB) から新しい酵素 EC番号 4.2.1.103 が付与され新規酵素と認定された。さらに、上記とは異なるタイプの新規 Isonitrile hydratase (InhB) が関わる経路も *Arthrobacter pascens* から発見するとともに、本細菌において、本酵素反応によって生成する N-置換ホルムアミドがさらにアミンとギ酸に代謝される経路も同定した。N-Substituted formamide deformylase と命名した本代謝酵素に対しても、新しい EC番号 3.5.1.91 が付与され新規酵素として認定された。

(ii) ニトリル代謝: ニトリルの Nitrile hydratase によるアミドへの分解系と、Aldoxime dehydratase によるニトリル合成系が遺伝子/代謝上リンクすることを発見した。また、両酵素と Amidase による酸生合成系と、アシル CoA 合成酵素による酸変換系が遺伝子/代謝上リンクしていることを発見し、ニトリル代謝経路の全貌を解明した。本 Aldoxime dehydratase に対しても新しい EC番号 4.99.15 が付与され新規酵素と認定された。

(iii) その他の代謝: クルクミンはカレーの主要スパイスであるターメリック (ウコン) の黄色の色素成分で、種々の生理

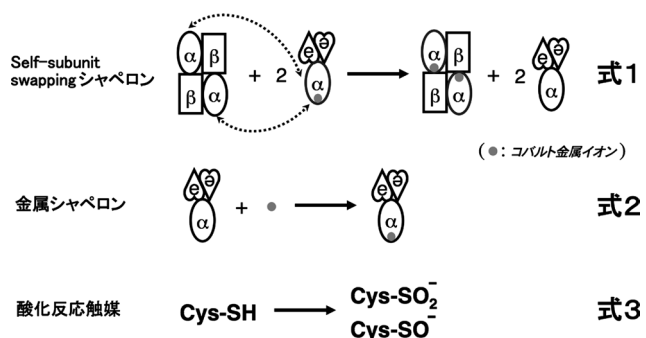


図1 e タンパク質のユニークな多機能

活性作用を示す。(ヒト腸内での代謝を含め)その代謝はタンパク質・遺伝子レベルで未解明であった中、クルクミンがヒト腸内細菌によって、ジヒドロクルクミン、続いて、テトラヒドロクルクミンに変換されることを発見した。また、本代謝に関わる酵素と遺伝子を単離するとともに、本酵素の諸性質を解明した。以上の成果は、微生物とヒトが関わる応用微生物学の新展開を示したものである。さらに、毒性を示すアジドの分解微生物を発見し、代謝経路の一部を解明した。

③ 酵素の触媒機構および進化的関連性の解明

ニトリル合成酵素の Aldoxime dehydratase の活性中心ヘムの軸配位子としての His 残基や、Distal 側リガンドとしての His 残基を同定するなど、ヘム周辺環境を解明した。また、ヘム鉄を有する2種の新規反応中間体(OS-I, OS-IIと命名)の存在を同定した(OS-IIにおいて4価の高酸化ヘム鉄の存在が示唆された)。本酵素の立体構造を解明後、Arg, His, Serの活性アミノ酸残基と、Hisの酸塩基触媒としての機能を同定し、水存在下にも関わらず脱水反応を触媒し、C-N三重結合を形成する酵素反応の詳細な触媒機構を解明した。一方、*Pseudomonas putida* の Isonitrile hydratase (InhA) の N-C三重結合切断酵素と(ペプチド結合の)C-N単結合切断酵素との進化的関連性を発見した。また、*Arthrobacter* の InhA とは配列の相同性がない Isonitrile hydratase (InhB) の N-C三重結合切断酵素と(シアノ基の)C-N三重結合切断酵素との進化的関連性を見出した。さらに、InhA, InhBともにCysが活性アミノ酸残基と同定するとともに、反応機構を解明した。N-Substituted formamide deformylase に関しても、亜鉛酵素で、また、配列の一部が(アミド結合の)C-N単結合切断酵素と進化的関連性を示すことを見出した。さらに、Nitrilase や Amidase の活性アミノ酸残基も同定したが、このように各酵素で同定した活性中心や提唱した反応機構は、触媒能開発上、有益な情報になり得る。一方、糸状菌 *Fusarium* から、ラクトン環開裂酵素 Lactonohydrolase の C-O結合切断酵素と、P-O結合切断酵素、C-N結合合成酵素の進化的関連性を発見した。

④ 遺伝子高度発現系の開発

グラム陽性菌 *Rhodococcus* とグラム陰性菌 *Pseudomonas* によるニトリル分解代謝では、Nitrilase は培地へのイソバレロニトリル添加によって、また、Nitrile hydratase はアミド類の添加によって、それぞれ菌体内に著量の酵素が生成するが、各発現調節機構を分子レベルで解明し、両酵素の機構のみならず、Nitrile hydratase の発現機構においてもグラム陽性・陰性菌間で互いに異なることを明らかにした。

また特に、J1株の Nitrilase 遺伝子プロモーターが(本属と同じ放線菌に属する) *Streptomyces* 属でも機能することを明らかにした。即ち、*Rhodococcus* 属由来の遺伝子プロモーターが *Streptomyces* 属でも実際に働くことが判明した。次に、本遺伝子プロモーターと発現調節機構を利用して、*Streptomyces* 属での誘導型遺伝子高発現システム(pSH19)を開発した。本システムは、培地への誘導剤の添加の有無で、遺伝子の発現制御の On/Off が利く系である。一方、コバルト存在下で J1株の培地への尿素添加により H型 Nitrile hydratase が菌体内全可溶性タンパク質の50%以上、大量に生成されるが、解明した本発現調節機構と本遺伝子プロモーターを基にした *Streptomyces* 属で機能する遺伝子高発現システム(pHSA81)を開発した。

いずれの発現システムも、マルチクローニング部位に導入した目的タンパク質遺伝子に由来するタンパク質(酵素)を菌体内に大量に生産し得る基盤技術で、国内外で利用されている。さらに、上記 Nitrilase 遺伝子プロモーターを利用した *Rhodococcus* 属での遺伝子発現系(pREIT19)も開発した。

⑤ 酵素の新機能の開拓

アシル CoA 合成酵素はチオエステル [C(=O)-S] 結合形成反応を触媒し、酸と CoA からアシル CoA を合成する酵素であるが、CoA の代わりに L-Cys を基質とした場合、チオエステル結合ではなくアミド(ペプチド) [C(=O)-NH] 結合を形成する反応を触媒することを発見した。本酵素が属する Adenylate 形成酵素 superfamily の他の酵素(ルシフェラーゼ等)も同様の活性を示すことを発見し、これらの酵素群による新規アミド/ペプチド合成の基盤技術を確立した。また、N-置換ホルムアミドからアミンへの変換を触媒する N-Substituted formamide deformylase が逆反応を触媒することを発見し、それを用いた N-ベンジルカルボサミド類の合成法を確立した。

隠れた現象や未知なる機能に気付かなかつたり、気付いても見逃したままにしておいたりすると、それらはずっと埋もれたまま日の目を見ない恐れが多々ある。それらを気にかけて注意深く調べることで、新たな展開につながることもあるものだと、一連の研究で実感した。研究室のストックカルチャーとして保存されていた J1株にしても、コバルトの添加効果を詳細に調べなかったら、本株によるアクリルアミドやニコチンアミドの工業生産は行われなかったであろうし、また、新規な翻訳後修飾機構や多機能シャペロンの発見を始めとする本要旨に記載した成果だけでなく、コバルトトランスポーターの発見を含む Cobalt Biochemistry の新しい展開も成し遂げることはできなかったであろう。新規な酵素や代謝系の発見はもとより、これまで知られていない生命現象や機能を思いもよらず発見することは、まさにサイエンスの醍醐味である。応用微生物学・応用生物化学の原点である“モノとり”、探索研究を柱に、化学的および分子生物学的アプローチ等を駆使しながら、今後も新しい世界にチャレンジしたいと思う。

本研究は主に筑波大学大学院生命環境科学研究科微生物育種工学研究室で行ったものである。いずれの成果も世界に先駆けられたもので、多大なご協力を頂き日夜苦勞をともした橋本義輝准教授、そして熊野匠人助教、同研究室の皆様へ深く感謝致したく、ともに受賞の喜びを分かち合いたいと思います。ニトリル研究に関しては、京都大学農学部在籍時に開始したもので、醗酵生理学・応用酵素学のご指導、多大なご援助を賜りました京都大学名誉教授山田秀明先生、清水昌先生をはじめ、共同研究者の方々に心より御礼申しあげます。また、研究者としての基礎を直接ご指導下さりご激励を頂きました岐阜大学名誉教授長澤透先生、岡山大学教授神崎浩先生に厚く御礼申しあげます。さらに、分子生物学・応用微生物学の基礎をご指導下さり、終始懇切なご助言と励ましの言葉を賜りました東京大学名誉教授別府輝彦先生、故堀之内末治先生をはじめ、多くの研究機関の共同研究者の皆様へ厚く御礼申しあげます。

尚、B&I誌 Vol. 71, No. 2 より一部の文章と図の引用・転載許可を頂き、感謝致します。