



L-アミノ酸代謝関連酵素の産業利用技術に関する研究

立命館大学・生命科学部・生物工学科 松井大亮

はじめに

微生物由来の新しい酵素を見出し、進化分子工学の手法により巧みに改変して、L-アミノ酸定量用酵素を開発した。さらに、異種発現系で発現させた場合、封入体の形成などで活性を示さない酵素遺伝子に対し、変異を導入し、可溶性発現に関する新しい技術を開発した。

1. 酸化還元酵素による選択的定量法の開発

新規酵素L-アルギニン酸化酵素(2017年EC 1.4.3.25として新規登録)を自然界から単離した *Pseudomonas* sp. TPU 7192 から見出し、初めて酵素化学的諸性質を明らかにするとともに、L-アルギニンの定量に適用した。また、L-リシン酸化活性を示す *Burkholderia* sp. AIU 395 から、ピリドキサル-5'-リン酸含有酵素で、酸化酵素反応と脱炭酸反応を示す二機能性のL-リシン脱炭酸/酸化酵素を見出し、プトレシン酸化酵素(FC 1.4.3.10)との共役反応で、L-リシンを選択的に定量する方法を開発した。さらに、L-ヒスチジンに特異的な酸化酵素活性を示す *Achromobacter* sp. TPU 5009 を単離し、L-ヒスチジアンモニアリアーゼ(EC 4.3.1.3)とウロカニン酸ヒドラーゼ(EC 4.2.1.49)の反応で、比色法で検出可能な過酸化水素が生成することを明らかにした。いずれも特定のアミノ酸に特異的に作用する酵素であり、各種疾病診断のマーカーの血中アミノ酸の高選択的な濃度測定に使うことができる。

2. 分子進化学による分析用酵素の創製

集積培養により土壌から単離した *Pseudomonas* sp. AIU 813 が産生するL-リシン酸化酵素は、酸化活性よりも5倍程度高いモノオキシゲナーゼ活性を示す二機能性の酵素であった。まず、システイン修飾剤である *p*-塩化水銀安息香酸を添加すると、この二機能性の活性が反転することを明らかにした。システイン残基の修飾により活性が大きく変化することから、システインをよりかさ高い残基で置換すればL-リシンに対して高い酸化酵素活性を示す、望みの変異型酵素が得られると考え、保存されている5つのシステイン残基に飽和変異を導入し、変異型酵素遺伝子ライブラリーを調製した。変異ライブラリーで形質転換した大腸菌のおよそ4,800コロニーから、高い酸化酵素活性を示し、*p*-塩化水銀安息香酸を添加しても酸化活性が影響されない酵素のスクリーニングを行った。その結果、予想した通り、Cys254をイソロイシンに置換した変異型酵素は、モノオキシゲナーゼ活性が低下し、酸化活性が上昇した酵素であり、*p*-塩化水銀安息香酸の添加でも酸化活性は変化しなかった。この酵素のX-線結晶構造解析やストップフロー法により、精密な機能解析を実施した。

シアノバクテリア *Nostoc punctiforme* ATCC 29133由来L-トリプトファン脱水素酵素(EC 1.4.1.19)は、L-トリプトファンに対して高い基質特異性を示すことを明らかにしたが、安定性は

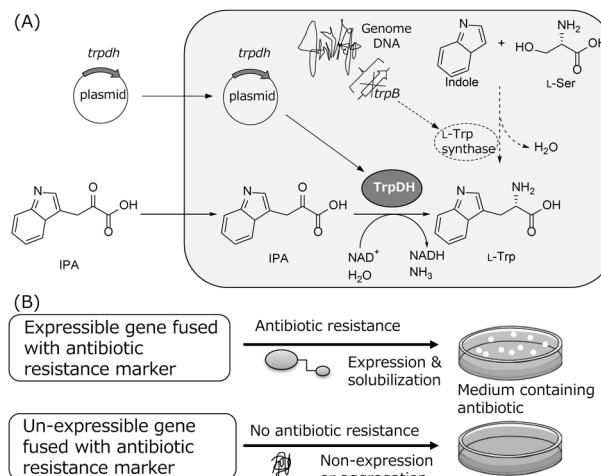


図1. 分子進化学による分析用酵素の創製 (A) L-トリプトファン要求株を用いた安定性が高い変異型酵素の取得法 (B) 抗生物質耐性遺伝子を用いたL-リシンε-酸化酵素の可溶性発現する変異型遺伝子の取得法

非常に低かった。そこで、変異導入による本酵素の安定化を目的として、脱水素酵素が触媒するインドールビルビン酸からL-トリプトファンへの還元アミノ化反応を利用したスクリーニング系を構築した。すなわち、ランダム変異を導入したL-トリプトファン脱水素酵素遺伝子をL-トリプトファン要求株に形質転換し、生育速度の速い菌株を選別することで、L-トリプトファン脱水素酵素活性が高い酵素をスクリーニングした。本方法を用いて、脱水素酵素活性および安定性が高い変異型酵素の取得に成功した。変異型酵素は、安定化剤のない条件でも長期間活性を維持でき、血漿サンプル中のL-トリプトファン定量用酵素として用いることが可能となった(図1A)。

海洋性微生物 *Marinomonas mediterranea* NBRC 103028由来L-リシンε-酸化酵素(EC 1.4.3.20)はL-リシンに高い基質特異性を有しているが、大腸菌で活性型として可溶性発現できない問題点があった。そこで、可溶性発現を目的として、変異導入による変異型酵素のスクリーニングを行った。ランダム変異導入後、活性測定を指標とするスクリーニングだけでは活性型酵素の取得に至らなかったことから、ランダム変異した酵素遺伝子の3'末端側に抗生物質耐性遺伝子を融合し、その形質転換体を抗生物質含有培地で選別した(図1B)。この方法では、抗生物質耐性遺伝子も変異型酵素に融合した形で共発現し、そのプラスミドベクターを有する株が抗生物質耐性を示すようになる。この方法を用いて、6点のサイレント変異と1点のミスセンス変異を含む活性型酵素の取得に成功した。

3. 可溶性発現技術の開発

異種発現系で酵素遺伝子を発現させた場合、封入体の形成な

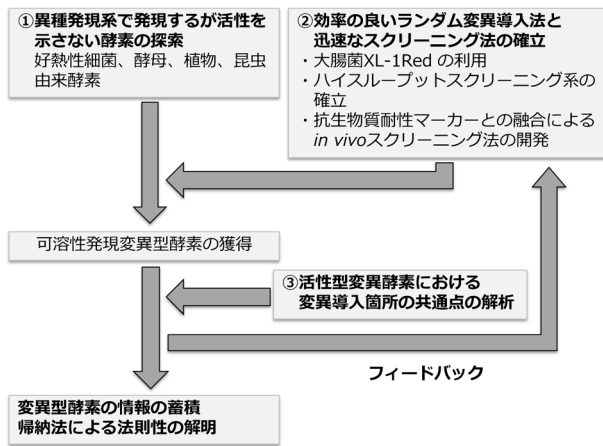


図2. 可溶性発現技術の開発

どで活性を示さないことが多く、このことは、異種宿主による酵素の大量発現における大きな問題点である。これまでに様々な解決法が報告されているが、これらの方法は、原理の理解が進んでおらず、多大な時間と労力を要する試行錯誤が必要であった。現在まで常法は確立されておらず、封入体の形成が解消されない酵素が数多く存在する状況が続いている。わずかに、植物由来酵素遺伝子のランダム変異ライブラリーから、活性を持つ酵素として大腸菌で発現する変異型酵素を得た報告があったが、変異による可溶性発現の一般則を明らかにした研究は皆無であった。本研究では、多数の変異体から活性型酵素を簡便に選抜する方法を考案し、ランダム変異の手法で可溶性発現する変異型酵素を多数得て、法則性を明らかにすることを計画した(図2)。

大腸菌で不溶性発現する節足動物由来マンデロニトリル酸化酵素(EC 1.1.3.49)変異型酵素ライブラリーを構築し、およそ20,000コロニーから活性を示す酵素を選抜した。その変異部位Val455を他のアミノ酸に飽和変異した結果、Valよりもハイドロパシーインデックス値が低い(親水度が高い)アミノ酸に置換した変異体の酵素活性が高く、特に、親水性アミノ酸に置換した酵素は、高い酸化活性を示した。次に、本酵素のアミノ酸配列から二次構造を推定した結果、変異箇所のVal455は、 α -ヘリックス構造中に存在し、ヘリカルホイール上で、親水性領域に存在する疎水性アミノ酸であった(図3A)。同様に大腸菌で不溶性発現する植物由来L-アルギニン脱炭酸酵素(EC 4.1.1.19)の変異型酵素ライブラリーおよそ20,000コロニーから、 α -ヘリックス構造に含まれるLeu435がアスパラギン、Lys441がロイシンに置換された活性を示す酵素を見出した。ヘリカルホイール図を用いて解析した結果、Leu435が、「親水性領域に存在する疎水性アミノ酸」、Lys441が「疎水性領域に存在する親水性アミノ酸」であることが明らかとなった(図3B)。そのヘリカルホイール図において、「疎水性領域に存在する親水性アミノ酸」もしくは、「親水性領域に存在する疎水性アミノ酸」を特定し、それらの残基に対して飽和変異プライマーでライブラリーを構築し、活性型酵素を探索した。その結果、昆虫由来D-アミノ酸酸化酵素(EC 1.4.3.3)、L-オルニチン脱炭酸酵素(EC 4.1.1.17)、L-グルタミン酸脱水素酵素(EC 1.4.1.2)を活性型酵素として発現することに成功した(α -ヘリックス法)。また本手法に、一次配列解析ソフトINTMSAlignに追加された機能である

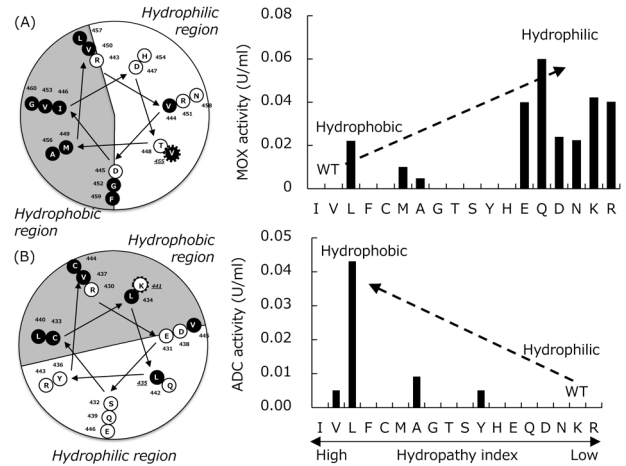


図3. α -ヘリックス構造における変異部位の位置と他のアミノ酸に置換した際の酵素活性
(A) マンデロニトリル酸化酵素の Val455 (B) L-アルギニン脱炭酸酵素の Lys441

HiSol値(保存されているアミノ酸残基を同定し、アミノ酸のハイドロパシーインデックス値から、疎水性度が大きく異なる残基を抽出するための値)を見出す手法(Hydropathy contradiction法)を組み合わせた複合手法の有用性を検討した結果、海洋性プランクトン由来ルシフェラーゼやヒト成長ホルモンの可溶性発現に成功した。さらに本手法は、ニトリル化合物の物質変換に利用できる *Bacillus* sp. OxdB-1由来アルドキシム脱水酵素(EC 4.99.1.7)遺伝子の発現量の増加や、野生型酵素では結晶形成が困難であった本酵素に変異導入で結晶形成を促進させ、X線結晶構造解析にも発展させた。

おわりに

本研究では主にL-アミノ酸代謝関連酵素を斬新な視点で開発し、また新規可溶性発現技術の開発といった新しい分野に挑戦し、それらは広く化学工業や医療産業に有効に利用される。

謝辞 本研究は、主として富山県立大学工学部生物工学科酵素化学工学研究室で行われたものです。多大なご指導ご鞭撻をいただきました浅野泰久先生(富山県立大学教授)に衷心より御礼申し上げます。多くのご助言を頂きました磯部公安先生(岩手大学名誉教授)に心より感謝の意を表します。学生時代から長年にわたり暖かいご助言を受け賜りました老川典夫先生(関西大学教授)に厚く御礼申し上げます。本研究を遂行するにあたって、伏信進矢先生(東京大学教授)、Do-Hyun Im博士(東京大学)、Pimchai Chaiyen先生(Mahidol大学教授)、Duangthip Trisrivirat博士(Mahidol大学)、稲垣賢二先生(岡山大学教授)、中野祥吾先生(静岡県立大学准教授)、Harald Gröger先生(Bielefeld大学教授)、青野重利先生(分子科学研究所教授)、村木則文先生(分子科学研究所助教)、その他多くの共同研究者の皆様へ心より御礼申し上げます。富山県立大学酵素化学工学研究室およびJST ERATO浅野酵素活性分子プロジェクトの博士研究員や補助研究員、学生諸氏には多大なご協力を頂きました。皆様に感謝申し上げます。現所属への着任以来ご支援いただいている若山守先生(立命館大学教授)に深く感謝申し上げます。最後に、本奨励賞にご推薦いただきました浅野泰久先生(富山県立大学教授)ならびにご支援賜りました学会の諸先生方に厚く御礼申し上げます。