

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450089

研究課題名(和文) 微生物由来N-アセチルトランスフェラーゼの機能解析とR体アミノ酸合成への応用

研究課題名(英文) Characterization of arylalkylamine N-acetyltransferase: application for synthesis of D-form of phenylglycine

研究代表者

竹中 慎治 (Takenaka, Shinji)

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：40314512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、*Chryseobacterium* sp. 5-3B株由来N-アセチルトランスフェラーゼの活性発現に関わるアミノ酸残基について調べた。既報のN-アセチルトランスフェラーゼ類とはアミノ酸レベルでの類似性が低かったが、データベースを参考に、推定高次構造モデルを作成することができた。これを基に活性発現に関わるアミノ酸残基と推定されるものについてアミノ酸置換を行い、酵素反応速度論パラメータを基に比較した。その結果、アセチルCoAとの結合には100Tyr、126Leu、132Leu、135Lys、131Lysが関わり、83Gluと133Tyrがアセチル基の転移に関わると推定することができた。

研究成果の概要(英文)：Objectives To predict the amino acid residues playing important roles in acetyl-CoA and substrate binding and to study the acetyl group transfer mechanism in *Chryseobacterium* sp. strain 5-3B N-Acetyltransferase (5-3B NatA).  
Results We constructed a 3-dimensional homology model of 5-3B NatA and compared the theoretical structure with the structures of previously reported proteins belonging to the bacterial GCN5 N-acetyltransferase family. Homology modeling of the 5-3B NatA structure and a characterization of its kinetic parameters identified the essential amino acid residues involved in binding and acetyl-group transfer. Thus, 126Leu, 132Leu, and 135Lys and 100Tyr and 131Lys were implicated in the binding of phosphopantothenic acid and adenosyl biphosphate, respectively. Both 83Glu and 133Tyr were suggested to catalyze acetyl-group transfer to L-2-phenylglycine.

研究分野：応用微生物学

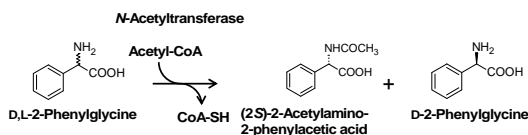
キーワード：Chryseobacterium N-acetyltransferase 2-phenylglycine

1. 研究開始当初の背景

化学工業界ではグリーンケミストリーの達成を目指して、化成品・医薬品などの合成に生体触媒を利用する研究が行われてきた。申請者はこれまでに環境浄化・保全を念頭に、芳香族アミン類の微生物代謝・酵素系を明らかにしてきた。その過程で、既報の代謝系とは異なる“特異な酵素系が関与する代謝ステップ”を数多く見出すことができた。それらの代謝系は、効率的で環境に負荷を与えない生産プロセスへのヒントを与えてくれる。そこで、『微生物酵素による芳香族・脂肪族アミン類の選択的な物質変換』を提案し、目的に叶う酵素の検索とその利用に取り組むこととした。

申請者は芳香族アミン類の微生物代謝を明らかにする過程で、アリルアミン N-アセチルトランスフェラーゼが、芳香族アミン類の無毒化にかかわるだけでなく、様々な芳香族アミンのアミノ基をアセチル化できることを見出した。細胞内のアミン類(グルタミン酸、グルコサミン、ヒストン、セロトニン等)のアミノ基を N-アセチル化する酵素について調べると、いずれの酵素も生体内での生理・生化学的役割の解明がなされているだけで、その利活用は進んでいなかった。よって、加水分解酵素と比較して触媒作用や反応機構の異なる N-アセチル化酵素類を網羅的に検索し、特性や反応機構を明らかにすることは環境にやさしい物質変換法の拡充につながると考えた。そこで、『N-アセチルトランスフェラーゼによるアミン類からアセチルアミド類への高選択的な変換法の開発研究』を着想した。まず、芳香族アミン類のアミノ基を位置選択的に修飾するアリルアミン N-アセチルトランスフェラーゼを見出し、同酵素および遺伝子の解析や変換に与える各種因子を検討し、特許を含めてその成果を報告することができた。

5-3B 株は、続いて、キラルな脂肪族アミン類を立体選択的に N-アセチル化する微生物酵素を網羅的に検索した。その結果、分離菌 5-3B 株は、N-アセチルトランスフェラーゼにより、RS-2-フェニルグリシンの S-体を立体選択的に N-アセチル化し、結果として高付加価値な R-体のみが高純度で蓄積することを見出した。2-フェニルグリシン類の R-体は、 $\beta$ -ラクタム環を有する抗生物質の合成に必要な鍵物質であり、L-フェニルアラニンや L-トリプトファンと同じく年間 1,000 トン以上製造されている。そこで、同 N-アセチルトランスフェラーゼを生産する Growing cell を生体触媒として利用した選択的合成法の確立を目指すことにした。



酵素反応機構

2. 研究の目的

*Chryseobacterium* sp. 5-3B 株は、培地中に添加した RS-2-フェニルグリシン(終濃度 15 mM)を完全に光学分割できるが(研究業績 2)、定常期以降溶菌が顕著になるため、さらなる高変換は望めない。また、同 N-アセチルトランスフェラーゼの立体選択性は類縁酵素と比較しても特異な性質であるが、これを RS-2-フェニルグリシン類の効率的分割にも利用するには、基質特異性の改変も必要である。そこで、N-アセチルトランスフェラーゼ生産株を生体触媒として利用するため、以下の研究項目に取り組む。

3. 研究の方法

- a. 同酵素遺伝子をクローニングし、大腸菌形質転換株による同酵素の発現系を構築する。
- b. 組換え酵素について、基質特異性・酵素反応速度論解析を中心にその性質を明らかにする。
- c. 形質転換株 (Growing cell) による RS-2-フェニルグリシンの光学分割を高変換・高純度で行うために、培養条件の検討を行う。
- d. 酵素の高次構造解析を行い、活性中心を形成するアミノ酸残基を同定する。
- e. 基質特異性・酵素反応速度論パラメータを指標に、活性中心付近に配位するアミノ酸残基を置換し、2-フェニルグリシン類 (S-体) に対しても高活性な変異酵素を得る。
- f. 得られた変異酵素を大腸菌形質転換株にて発現させ、Growing cell による RS-2-フェニルグリシン類の光学分割を検討する。

4. 研究成果

*Chryseobacterium* sp. 5-3B 由来 N-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子のクローニングを目的として本菌から N-アセチルトランスフェラーゼの精製条件を検討した。本酵素の分子質量は、18 kDa と比較的分子量が低いため、ゲル濾過法クロマトグラフィーを精製ステップに入れた。したがって、既報の方法と比較してより効率的に本酵素を精製できた。N 末端アミノ酸配列の解析から既報のアリルアミン N-アセチルトランスフェラーゼとは異なるタンパク質であることが予想された。タンパク質データベース検索から同酵素の N 末端アミノ酸配列と類似性が高いタンパク質を見出し、保存性のある領域からクローニング用 PCR プライマーを設計し、5-3B 株から目的遺伝子をクローニングすることができた。

決定した塩基配列から推定されるアミノ酸配列についてデータベースによりアミノ酸レベルでの類似性を調べたところ、*Chryseobacterium gleum* ATCC35910 由来 transcriptional regulator と高い類似性を示した。natA の上流に位置する ORF1 の部分配列についてアミノ酸レベルでの類似性を調べたところ、natA と同様に

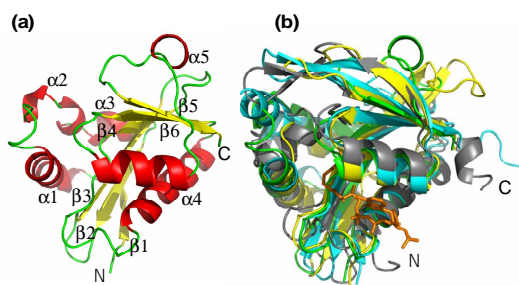
*Chryseobacterium gleum* ATCC35910 由来 transcriptional regulator と高い類似性を示した。同配列中には、DNA 認識配列とされるヘリックス-ターン-ヘリックス構造をもつと予想され、同遺伝子が転写調節因子として機能すると思われる。また、*natA* の上流には SD 配列等の転写調節領域と推定される配列は存在しなかったことから、ORF1 と *natA* が同一の転写単位に位置すると考えられる。

5-3B 株由来の *N*-アセチルトランスフェラーゼについて、組換え酵素を用いて基質特異性試験を試みた。本酵素は親株とほぼ同様の基質特異性を示し、L 体の 2-フェニルグリシン以外に 2-クロロフェニルグリシンと L 体の 4-ヒドロキシフェニルグリシンに対しても活性を示した。L 体の 2-クロロフェニルグリシンは、抗血栓剤である clopidogrel 製造の際の出発原料であり、D 体の 4-ヒドロキシフェニルグリシンはセファロsporin やペニシリン合成の中間体である。よって、本酵素はクロロフェニルグリシン類およびヒドロキシフェニルグリシン類の光学分割に有用であると思われる。

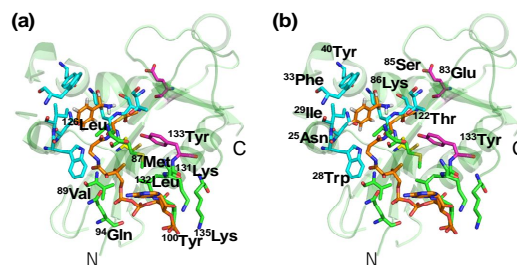
つづいて、アセチル CoA や基質の認識や結合など活性発現に重要なアミノ酸残基を推定することを目的として研究を進めた。同酵素の構造を明らかにするために結晶化を試みたが、試験した条件ではうまくいかなかったことから、データベースを基に活性発現に必要なアミノ酸残基を推定することにした。推定高次構造モデルは、*Staphylococcus aureus subsp. aureus* Mu50 由来 SAV2568 (PDB code: 3D8P, GNAT\_Mu50) を基に、モデルを作製することができた。これを基に再度一次配列比較すると、*Bacillus subtilis* 168 由来 *N1*-spermidine/spermine acetyltransferase や *Vibrio cholera* N16961 由来 spermidine *N*-acetyltransferase と類似性が高いことがわかった。そこで、アライメント比較を参考にアセチル CoA の認識・結合に関わるアミノ酸残基として 9 つに着目し、M87A、V89A、Q94A、K97A、Y100F、L126A、K131A、L132A、K135A の変異酵素を調製し、反応速度論パラメータの比較からと推定高次構造モデル上の位置から、126Leu、132Leu および 135Lys がアセチル CoA のホスホパントテン酸部と 100Tyr および 131Lys が同アデノシル 2 リン酸と結合することがわかった。つづいて、アセチル CoA のアセチル基周辺領域に位置するアミノ基が基質 (2-フェニルグリシン) 認識に関わると推定し、N25A、W28A、I29A、F33A、M35A、Y40A、Y40F、S85A、K86A、T122A の変異酵素を調製した。反応速度論パラメータの比較から、28Trp、33Phe、40Tyr、86Lys が基質認識に関わると推定できた。さらに、アセチル基転移に関わるアミノ酸残基については、83Glu および 133Tyr であることも推定することができた。

推定高次構造モデルを参考に 5-3B 株由来

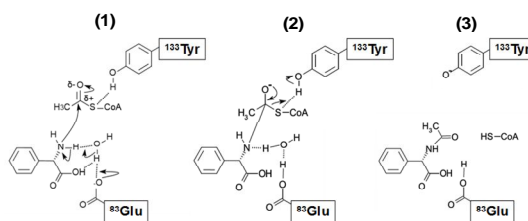
*N*-アセチルトランスフェラーゼの反応機構を推定すると、83Glu のカルボキシル基が、L-2-フェニルグリシンのカルボキシル基とともに、水分子を經由して 2-フェニルグリシンのアミノ基のプロトンの引き抜きを生じさせ、これがアセチル CoA のカルボニル基を求核攻撃する。つづいて、133Tyr 残基の水酸基からプロトンが受け渡されることでアセチル基の転移とともに CoA-SH が遊離すると推定できた。



*Chryseobacterium* sp. 5-3B 株由来 *N*-アセチルトランスフェラーゼの推定高次構造モデル (a) と高次構造作成にあたり参考にした既報の *N*-アセチルトランスフェラーゼとの重ね合わせモデル (b)



*Chryseobacterium* sp. 5-3B 株由来 *N*-アセチルトランスフェラーゼにおいて活性発現に関わるアミノ酸残基。アセチル CoA との結合に関わるアミノ酸残基 (緑)、基質との結合に関わるアミノ酸残基 (シアン)、アセチル基転移に関わるアミノ酸残基 (マゼンダ)



*Chryseobacterium* 5-3B 株由来 *N*-アセチルトランスフェラーゼにおけるアセチル基転移機構

また、アミノ酸置換を行い、基質特異性試

験を行う過程で 85Ser を Ala に置換すると L-2-フェニルグリシンだけでなくその 4 位置換体に対しても活性を示すことがわかった。今後、結晶構造解析を進めることで基質認識に関わるアミノ酸残基がより明らかとなり、タンパク質工学による基質特異性の改変にもつながると思われる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takenaka Shinji, Yoshida Kenji, Tanaka Kosei, Yoshida Kenichi. Molecular characterization of a novel N-acetyltransferase from *Chryseobacterium* sp. APPLIED ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. (2014) 80(5):1770-1776.

〔学会発表〕(計 2 件)

*Chryseobacterium* sp. 5-3B 由来 N-アセチルトランスフェラーゼの発現と特性解析  
尾関貴博、田中耕生、吉田健一、竹中慎治  
日本農芸化学会 2015 年度本大会(岡山)講演番号 2A34p01

*Chryseobacterium* sp. 5-3B 由来 N-アセチルトランスフェラーゼの基質認識部位の探索  
竹中 慎治、尾関 貴博、田中 耕生、石川 周、吉田 健一  
日本農芸化学会 2017 年度本大会(京都)講演番号 4C26a05

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/ans-hakko3/index.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

竹中 慎治 (Takenaka, Shinji)

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：40314512

(2)研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )