

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780070

研究課題名 (和文) オンデマンド型水酸化アミノ酸生産を目指した新規微生物酵素の包括的スクリーニング

研究課題名 (英文) Comprehensive screening of novel microbial enzymes toward on-demand production of hydroxy amino acids

研究代表者

日比 慎 (HIBI MAKOTO)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：30432347

研究成果の概要 (和文)：有用な生理活性を持ち医薬品や食品用途などへの利用が期待されている水酸化アミノ酸類を効率的に生産する酵素変換法の開発に取り組んだ。本研究において微生物由来の4種のアミノ酸水酸化酵素に関して基質特異性と反応産物の構造を決定することができた。各酵素の水酸化活性は新規な反応であり、また何れの反応においてもその立体特異性は高く、光学活性水酸化アミノ酸の生産のための産業用酵素触媒として非常に優れていることが分かった。

研究成果の概要 (英文)：Hydroxy amino acids are promising compounds for the use to drugs and foods, because some of them possess useful physiological activities. Then efficient production method for hydroxy amino acids is desired. In this research, four dioxygenases obtained from microorganisms were found to catalyze hydroxylation of amino acids, and their substrate specificities and chemical structure of the products were determined. The hydroxylating activities of these dioxygenases were novel types of reactions, and all of their reaction was highly stereospecific. Thus these dioxygenases were useful for the biocatalysts for the production of chiral hydroxy amino acids.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：水酸化アミノ酸、微生物スクリーニング、ジオキシングナーゼ、酵素触媒

## 1. 研究開始当初の背景

水酸基を分子構造内に含んだアミノ酸は動植物の代謝物として産出され、その多くが多様な機能性を示す事が報告されている。単体として、またはペプチドやタンパク質の一部として機能を示すものや医薬品の合成原料として有用なものが多数存在する。現状の

水酸化アミノ酸生産は有機化学合成法に大きく依存している。しかし水酸化アミノ酸は多くの場合その分子構造の中に不斉炭素原子を2つ以上含んでおり、収率も選択性も低い有機化学合成法では目的の光学活性体のみを安価に高純度で得る事が非常に困難である。さらに合成反応に用いられる試薬には

有毒なものも多く、また有機溶媒や重金属の廃棄物は自然環境に悪影響を与えるという問題も内包している。これに対して酵素を用いた反応では比較的穏やかな条件下で効率良く光学選択性の高い化合物を生産することができる。しかし酵素反応を用いた水酸化アミノ酸の生産法としては、3,4-ヒドロキシ-L-フェニルアラニン (L-DOPA) や 4-ヒドロキシ-L-プロリンなどの数例しか見られないのが現状である。動物や高等植物由来の水酸化酵素である場合にはその精製・同定が困難であり、またペプチド性のアミノ酸にしか反応しない水酸化酵素が多々ある事がその原因として挙げられる。

申請者は微生物酵素を用いた水酸化アミノ酸の生産例として 4-ヒドロキシ-L-イソロイシン (4-OH-Ile) の生産法に関する研究を行っていた。4-OH-Ile は元来フェヌグリーク (*Trigonella foenum-graecum*) の種子より抽出される天然の水酸化アミノ酸であり、その機能性から糖尿病治療薬や抗肥満薬としての利用が期待されている。申請者は L-イソロイシン (L-Ile) を基質に用いた微生物スクリーニングを実施し、水酸化反応により天然型と同じ立体異性を持つ活性型 4-OH-Ile を生産する *Bacillus* 属の微生物を取得した。さらにこの水酸化反応を触媒する新規酵素の精製・同定を行ない、 $\alpha$ -ケトグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼ ( $\alpha$ -KGDO) の一種である事を明らかにした。この新規水酸化酵素を大量発現した大腸菌を用いた反応系により、L-Ile から活性型 4-OH-Ile を高純度で安価に生産する手法を確立した。

## 2. 研究の目的

水酸化アミノ酸の需要は今後飛躍的に高まっていくと考えられるが、申請者らのこれまでの研究も含め、ある化合物にターゲットを絞り込んでから酵素を探し出すといったやり方ではどうしても対応が遅れてしまう。これとは対照的に本研究ではその時々で需要の高まった水酸化アミノ酸を迅速かつ大量に市場に送り出すというオンデマンド型生産法の確立を目指している。この目的の達成のためには多種多様な特性を持った水酸化酵素ライブラリーの構築と拡充が必要である。特に本研究期間内にはこのライブラリーの基本骨格となるべくものとして、最も安価で手に入りやすい 20 種類のタンパク質構成アミノ酸やその誘導体を基質に用いる水酸化酵素群の収集を行なう。微生物の保持する  $\alpha$ -KGDO 相同タンパク質の解析により、各アミノ酸基質に対する反応性や水酸導入位置の異なった酵素群をできる限り多く取得すると共に、各酵素の触媒特性を明らかにしていく。

## 3. 研究の方法

アミノ酸を基質とする既知の  $\alpha$ -KGDO として、*Bacillus thuringiensis* strain 2e2 由来の L-Ile ジオキシゲナーゼ (IDO)、*Streptomyces griseoviridis* P8648 および *Streptomyces* sp. strain TH1 由来 L-プロリンジオキシゲナーゼの 3 種類を選択した。これら酵素に共通して存在している領域のアミノ酸配列を基にしたゲノムデータベース検索を行ない、相同性の認められるタンパク質配列群を抽出した。この配列の中より  $\alpha$ -KGDO に特徴的な配列

(H-X-D-X<sub>50-150</sub>-H-X<sub>10-20</sub>-R/K) が保存されている配列のみを選択することで、アミノ酸水酸化酵素の候補配列を得た。各  $\alpha$ -KGDO 相同タンパク質の遺伝子配列より DNA プライマーを設計し、対象微生物のゲノムから目的の  $\alpha$ -KGDO 酵素遺伝子断片を増幅した。得られた遺伝子断片を適当な発現ベクターに組み込み、宿主大腸菌に導入する事でヒスチジンタグ融合型の  $\alpha$ -KGDO 大量発現系を構築した。ニッケルアフィニティーカラムを用いて精製した  $\alpha$ -KGDO 相同タンパク質は、アミノ酸やアミノ酸誘導体に対する反応性を評価した。

酵素反応は 10 mM 基質アミノ酸、15 mM  $\alpha$ -KG、0.5 mM FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、10 mM アスコルビン酸、1 mM DTT、50 mM Bis-Tris buffer (pH 6.0)、1 mg/ml 組み換え精製  $\alpha$ -KGDO を含む反応液中で、好氣的条件下、25°C にて終夜行なった。酵素反応終了後の反応液の一次評価は  $\alpha$ -KGDO 反応の副生成物であるコハク酸の生成量を F-Kit (ロシュ社製) により分光光学的に一括して測定した。併せて反応液は薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて分離し (シリカゲルプレート/1-ブタノール:酢酸:水=4:1:1)、反応産物である水酸化アミノ酸をニンヒドリン法により検出した。一次評価で活性が確認できた反応液に関しては二次評価として高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた定量的分析を実施した。さらに液体クロマトグラフィー質量分析計により反応産物の分子量を測定することで、水酸化アミノ酸の生成の有無を確認した。

生成した水酸化アミノ酸は分取クロマトグラフィーにより精製した後、核磁気共鳴装置 (NMR) を用いた構造解析を行なうことで、水酸化位置の特定と立体構造の決定を試みた。

## 4. 研究成果

ゲノムデータベース検索により 36 種類の  $\alpha$ -KGDO 相同タンパク質をアミノ酸水酸化酵素の候補として取得できた。この内 25 種類の  $\alpha$ -KGDO に関して大量発現系を構築することができた。各  $\alpha$ -KGDO は精製後アミノ酸やアミノ酸誘導体と反応させ、その酵素活性を

評価した。この結果、本研究において新たに *Nostoc punctiforme* PCC73102 株由来ジオキシゲナーゼ (LdoA)、及び *Burkholderia ambifaria* AMMD 株由来の 2 種のジオキシゲナーゼ (SadA、SadB) に関して基質となるアミノ酸・アミノ酸誘導体を特定することができた。そこで IDO 及び LdoA、SadA、SadB、に関して、詳細な基質特異性解析と反応産物の構造決定を実施した。

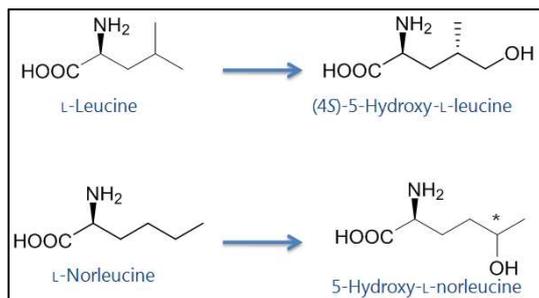
IDO は L-イソロイシンの他に、L-ノルバリン、L-ノルロイシン、L-ロイシン等の疎水性の脂肪族 L 体アミノ酸の 4 位炭素に立体選択的に水酸基を導入し、(S)-4-ヒドロキシ-L-イソロイシン、(S)-4-ヒドロキシ-L-ノルバリン、4-ヒドロキシ-L-ノルロイシン、4-ヒドロキシ-L-ロイシンなどを生成できる事を明らかにした (図 1)。

LdoA は L-ロイシンと L-ノルロイシンの 5 位炭素に立体選択的に水酸基を導入し、それぞれ (4S)-5-ヒドロキシ-L-ロイシン、5-ヒドロキシ-L-ノルロイシンを生成できる事を明らかにした (図 2)。

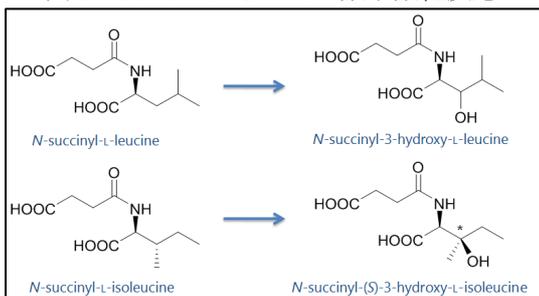
SadA と SadB は共に様々な種類の N 置換の疎水性脂肪族 L 体アミノ酸類の 3 位炭素に立体選択的に水酸基を導入し、例えば N-スクシニル-L-ロイシンを基質に用いた際には N-スクシニル-3-ヒドロキシ-L-ロイシンを生成できる事を明らかにした (図 3)。

この様に本研究で見出し、詳細に解析を行った各アミノ酸水酸化酵素は基質特異性が大きく異なり、特に L-ロイシンもしくはその誘導体に関しては 3 位、4 位、5 位水酸化体を個別に作り分ける事ができる様になった。これらの各アミノ酸水酸化酵素が保持する酵素活性は全くの新規なものであり、また何れの反応においてもその立体選択性は高く、キラル水酸化アミノ酸の生産のための産業用酵素触媒として非常に優れていることを発見できた。また本研究での成果で得られた多様なアミノ酸水酸化酵素情報は、今後期待されるアミノ酸水酸化酵素ライブラリーの構築とさらなる拡充に対して大きく貢献できるものとなった。

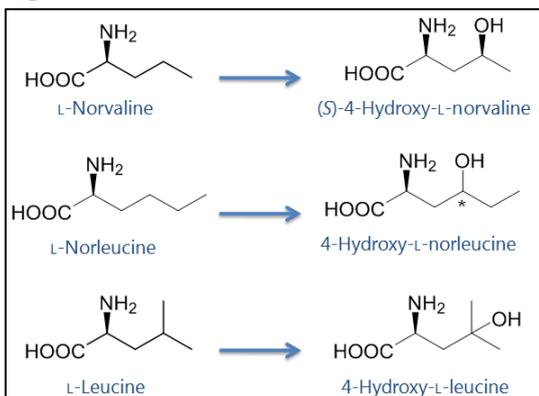
<図 1 IDO によるアミノ酸水酸化反応>



<図 2 LdoA によるアミノ酸水酸化反応>



<図 3 SadA、SadB によるアミノ酸水酸化反応>



## 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 3 件)

1. Ogawa J, Kodera T, Smirnov SV, Hibi M, Samsonova NN, Koyama R, Yamanaka H, Mano J, Kawashima T, Yokozeki K, Shimizu S., A novel L-isoleucine metabolism in *Bacillus thuringiensis* generating (2S, 3R, 4S)-4-hydroxyisoleucine, a potential insulinotropic and anti-obesity amino acid, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89: 1929-1938 (2011), 査読有

2. Smirnov SV, Kodera T, Samsonova NN,

Kotlyarova VA, Rushkevich NY, Kivero A D, Sokolov PM, Hibi M, Ogawa J, Shimizu S., Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce (2*S*, 3*R*, 4*S*)-4-hydroxy isoleucine, Applied Microbiology and Biotechnology, 88: 719-726 (2010), 査読有

3. Kodera T, Smirnov SV, Samsonova NN, Kozlov YI, Koyama R, Hibi M, Ogawa J, Yokozecki K, Shimizu S, A novel l-isoleucine hydroxylating enzyme, l-isoleucine dioxygenase from *Bacillus thuringiensis*, produces (2*S*, 3*R*, 4*S*)-4-hydroxyisoleucine, Biochemical and Biophysical Research Communications. 390:506-510 (2009), 査読有

[学会発表] (計 9 件)

1. 日比 慎、河嶋 隆志、清水 昌、横関健三、小川 順, *Bacillus thuringiensis* 2e2 株由来 L-isoleucine dioxygenase による有用アミノ酸の立体選択的合成, 日本農芸化学会 2011 年度大会, 京都, 2011 年 3 月 26 日

2. 河嶋 隆志, 日比 慎, 横関 健三, 清水 昌, 小川 順, *Burkholderia ambifaria* AMMD 株由来新規 dioxygenase の機能解析及び反応生成物の同定, 日本農芸化学会 2011 年度大会, 京都, 2011 年 3 月 26 日

3. 河嶋 隆志, 日比 慎, 横関 健三, 清水 昌, 小川 順, 微生物由来新規アミノ酸水酸化酵素の基質特異性解析及び生成物の同定, 第 62 回日本生物工学会, 宮崎, 2010 年 10 月 28 日

4. Makoto Hibi, Jun Ogawa, Kenzo Yokozeki, and Sakayu Shimizu, Application of microbial enzymes in the production of functional hydroxy amino acids, The 12th Japanese-Swiss Meeting on Biotechnology and Bioprocess Development, 富山, 2010 年 10 月 11 日

5. 河嶋 隆志, 日比 慎, 小川 順, 横関健三, 清水 昌, 微生物由来新規アミノ酸水酸化酵素の探索及び基質特異性解析, 日本農芸化学会 2010 年度大会, 東京, 2010 年 3 月 28 日

6. 日比 慎, 小川 順, 横関 健三, 清水昌, *Bacillus* 属細菌における新規 L-イソロイシン代謝経路とその生理的意義, 2009 年度日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部、日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同沖縄大会, 沖縄, 2009 年 10 月 31 日

7. 日比 慎, 河嶋 隆志, 小川 順, 横関健三, 清水 昌, *Bacillus* 属細菌由来 4-ヒドロキシイソロイシン脱水素酵素の機能解析, 2009 年度日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部、日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同沖縄大会, 沖縄, 2009 年 10 月 31 日

8. Makoto Hibi, Jun Ogawa, Tomohiro Kodera, Sergey V. Smirnov, Kenzo Yokozeki, and Sakayu Shimizu, Enzymatic synthesis of 4-hydroxy isoleucine with novel dioxygenase, 15th German-Japanese Workshop on Enzyme Technology, Rostock (Germany), 2009 年 9 月 26 日

9. M. Hibi, J. Ogawa, T. Kodera, S. V. Smirnov, K. Yokozeki, and S. Shimizu, Enzymatic Synthesis of 4-Hydroxy isoleucine with Novel Dioxygenase, Enzyme Engineering XX, Groningen (Netherlands), 2009 年 9 月 23 日

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

1. 名称: Method for producing hydroxylated amino acids  
発明者: Smirnov, S.V., Samsonova, N.N., Kotlyarova, V.A., Rushkevich, N.Y., Fedorina, E.A., Sokolov, P.M., Kolokolova, A.V., Ogawa, J., Hibi, M., Shimizu, S., Imabayashi, Y., Suzuki, S., Sugiyama, M.  
権利者: Ajinomoto Co., Inc.

種類: PTC 特許

番号: WO/2011/021717

取得年月日: 2011 年 2 月 24 日

国内外の別: 外国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日比 慎 (HIBI MAKOTO)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号: 3 0 4 3 2 3 4 7

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: