

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18677

研究課題名（和文）位置・立体選択的水酸化反応を利用した有用ヒドロキシプロリン類の酵素的合成法の開発

研究課題名（英文）Enzymatic synthesis of useful hydroxyproline derivatives by regio- and stereo-selective hydroxylation

研究代表者

原 良太郎 (HARA, Ryotaro)

早稲田大学・理工学術院総合研究所（理工学研究所）・次席研究員（研究院講師）

研究者番号：70553535

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、医薬品原料として有用なtrans-3-ヒドロキシプロリンの合成法の開発を目指した。ゲノム情報を利用した酵素探索の結果、放線菌Streptomyces cattleya由来エクトイン水酸化酵素においてプロリンを水酸化し、trans-3-ヒドロキシプロリンを合成する活性を見出した。また、当該酵素発現大腸菌を触媒に用いることで効率的なtrans-3-ヒドロキシプロリンの合成を可能とした。一方、アルギニンを出発物質とし、アルギニン水酸化酵素、アルギナーゼ、オルニチンシクロデアミナーゼを作用させることで、trans-3-ヒドロキシプロリンの選択的な合成プロセスの開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to develop an enzymatic production process for trans-3-hydroxyproline. Sequence-based screening for a novel proline hydroxylating enzyme approach allowed the identification of a proline trans-3-selective hydroxylation activity in ectoine hydroxylase from Streptomyces cattleya. Using the Escherichia coli expressing the ectoine hydroxylase gene as a biocatalyst, an efficient trans-3-hydroxyproline production was achieved. Further, a novel trans-3-hydroxyproline synthetic route was developed via arginine hydroxylation, hydrolysis, and cyclodeamination in this order.

研究分野：農学

キーワード：プロリン ヒドロキシプロリン エクトイン 水酸化酵素 微生物変換

1. 研究開始当初の背景

ヒドロキシプロリン (Hyp) は医薬品原料として工業的に重要な化合物である。天然に存在する Hyp にはヒドロキシ基とカルボキシ基の配置の相違により理論上 4 種類の異性体が存在する。これまでに、我々の研究を含め、*cis*-4-Hyp, *cis*-3-Hyp, *trans*-4-Hyp は酵素法による L-プロリンの直接的水酸化によって極めて高効率に生産されているが、唯一 *trans*-3-Hyp は合成可能な酵素が無く、実用レベルでの生産には至っていない (図 1)。原料となるプロリンは既に発酵生産が可能であり、安価に供給できるため、プロリンを *trans*-3-位特異的に水酸化する酵素の発見は工業レベルでの *trans*-3-Hyp 生産につながるため、L-プロリンを位置・立体選択的に水酸化し、*trans*-3-Hyp を合成可能な酵素が強く望まれていた。さらに、全異性体を酵素法によって工業的に生産可能となれば、医薬品開発における Hyp の利用価値が大幅に高まると予想される。

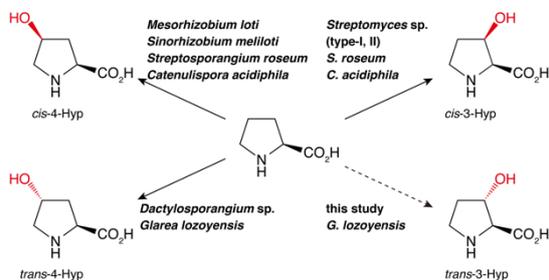


図 1. 多様な水酸化酵素を用いた Hyp の合成。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに報告されているアミノ酸水酸化酵素の知見を踏まえ、①プロリン類似化合物を基質とするエクトイン水酸化酵素による *trans*-3-Hyp 合成、および②多酵素反応による *trans*-3-Hyp 合成を目的とした。

3. 研究の方法

(1) エクトイン水酸化酵素遺伝子の発見と酵素精製

エクトイン水酸化酵素 (EctD) として遺伝子配列が既知の好塩菌 *Halomonas elongata* 由来 EctD を選択した。当該酵素遺伝子を PCR により増幅し、pET-21a(+)プラスミドの NdeI および HindIII サイトに挿入し、C-末端に His-tag が付加するように設計した。構築したプラスミドを大腸菌 Rosetta 2(DE3)に導入し、LB 培地で培養し、IPTG 誘導により酵素遺伝子を高発現させた。

酵素精製の手順は、大腸菌の菌体を超音波破碎し、遠心分離後の可溶性画分からニッケルカラムとゲルろ過カラムを用いた 2 段階のクロマトグラフィーによって精製酵素を取得した。

(2) 系統樹にもとづく酵素の分類

H. elongata 由来 EctD のアミノ酸配列情報をクエリーとして BLAST 相同性検索をおこない、ヒットした上位 100 種の EctD ホモログ

を ClustalW により解析し、系統樹を作製した。

EctD 候補の起源には、*Streptomyces coelicolor*, *S. avermitilis*, *S. cattleya*, *Saccharopolyspora erythraea* の 4 種類を選択した。これらの株のゲノムから PCR により EctD ホモログ遺伝子を増幅し、pET-21a(+)または pQE30 に挿入した。上記同様、His-tag が付加するように設計し、大腸菌 Rosetta 2(DE3)または JM109 に導入し、遺伝子を高発現させた。

(3) 基質特異性の検討

酵素反応は、5 mM アミノ酸、10 mM 2-オキソグルタル酸、1 mM L-アスコルビン酸、0.5 mM FeSO₄, 100 mM HEPES-NaOH (pH 7.0), および 0.5 mg/mL EctD を含む 1 mL 溶液にて、30°C で攪拌しながらおこなった。加熱により反応停止後、遠心した上清に含まれるアミノ酸をラベル化剤で誘導体化し、HPLC および MS にて分析した。

(4) 菌体触媒の調製と *trans*-3-Hyp の合成

ジャーファーマンター (1 L スケール) を利用し、Terrific broth にて大腸菌を培養した。触媒活性が最大となったとき (OD₆₀₀=15) に菌体を回収し、菌体反応に用いた。

菌体反応は 60 mM L-プロリン、200 mM 2-オキソグルタル酸、5 mM FeSO₄, 100 mM HEPES-NaOH (pH 7.0), および菌体を含む 5 mL 溶液にて、25°C で激しく攪拌しながらおこなった。

(5) アルギニン代謝関連酵素を利用した *trans*-3-Hyp の合成

Streptomyces sp. NBRC 13098 由来アルギニン水酸化酵素、*Mesorhizobium loti* MAFF303099 由来アルギナーゼおよびオルニチンシクロデアミナーゼの各遺伝子を pET-21a(+)に挿入し C-末端に His-tag が付加するように設計し、それぞれ大腸菌 Rosetta 2(DE3)において IPTG により遺伝子発現を誘導後、菌体を超音波破碎し、上記(1)と同様に、精製酵素を得た。

アルギニン水酸化反応は 5 mM L-アルギニン、10 mM 2-オキソグルタル酸、0.5 mM L-アスコルビン酸、0.1 mM FeSO₄, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0), および 0.5 mg/mL 精製酵素を含む 0.5 mL 溶液にて 30°C で攪拌しながらおこなった。

アルギナーゼ反応は、5 mM 3-ヒドロキシアルギニン、0.2 mM MnCl₂, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0), および 0.03 mg/mL 精製酵素を含む 0.5 mL 溶液にて 25°C で静置しておこなった。

シクロデアミナーゼ反応は、2.5 mM 3-ヒドロキシオルニチン、0.2 mM NAD⁺, Tris-HCl (pH 8.0), および 5 mg/mL 精製酵素を含む 0.5 mL 溶液にて 30°C で静置しておこなった。

4. 研究成果

(1) *H. elongata* 由来 EctD による L-プロリンの水酸化

H. elongata 由来 EctD 遺伝子を大腸菌 Rosetta 2(DE3)において高発現させ、SDS-PAGE で菌体内における発現を確認したところ、目的酵素の大部分が可溶化していた。続いて、大腸菌を破碎後の無細胞抽出液からの酵素精製を検討した。組換え酵素はC-末端に His-tag が付加しているため、Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィーにより容易に精製することが可能であった。精製した酵素を用いて、L-プロリンに対する活性評価をおこなった。反応上清を HPLC にて分析したところ、L-プロリンの減少とともに、*trans*-3-Hyp の増加が確認された。これにより、*H. elongata* 由来 EctD は従来知られていたエクトインに対する水酸化活性のみならず、構造が類似する L-プロリンに対する水酸化活性も有していることが明らかになった (図 2)。また、比活性を算出したところ、エクトインに対しては 530 nmol/min/mg であり、L-プロリンに対しては 40.1 nmol/min/mg であった。さらに、反応速度論解析によってミカエリス定数 K_m を算出したところ、エクトインに対しては 0.56 mM であったのに対し、L-プロリンに対しては 5.5 mM であった。以上より、EctD の本来の基質はエクトインであり、効率は低下するものの L-プロリンも基質とし得ることを初めて明らかにした。

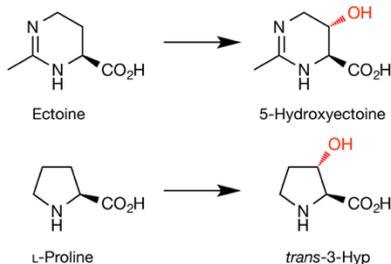


図 2. EctD を用いたヒドロキシエクトインおよび *trans*-3-Hyp の合成.

(2) EctD ホモログ酵素の評価

H. elongata 由来 EctD が L-プロリン水酸化活性を有していたことから、類縁酵素における同活性の有無についても検討することとした。ゲノム解析株を対象とし、EctD ホモログのアミノ酸配列に基づく系統樹を作製し、分類をおこなった。すると、*H. elongata* 由来 EctD を含むグラム陰性細菌型 EctD と、*Streptomyces* 属細菌由来 EctD を中心としたグラム陽性細菌型 EctD の 2 グループに大別された。グラム陰性型 EctD は報告例が多く、生体内における役割が解明されているものの、グラム陽性型 EctD は知見が少なく、未知な部分が多かった。両酵素のアミノ酸配列上の一致度は 40~50% とそれほど高くなかったため、従来とは異なる酵素特性を期待し、グラム陽性細菌型 EctD の機能評価を実施することとした。系統樹解析結果を踏まえ、代表的な 4 種類の放線菌由来 EctD ホモログ遺伝子をクローニングし、大腸菌において高発現させた。*H. elongata* 由来 EctD と同様に、エクトインおよび L-プロリン

に対する水酸化活性を評価したところ、どちらの基質に対しても活性があることが判明した (図 3)。中でも、*S. cattleya* 由来 EctD は *H. elongata* 由来 EctD よりもエクトインおよび L-プロリンに対する水酸化活性が高かったため、以後は当該酵素を詳細に検討することとした。

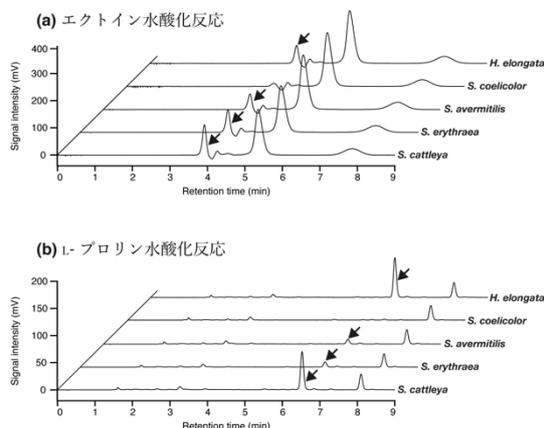


図 3. 放線菌由来 EctD を用いた反応. 矢印は生成物を示す.

(3) プロリン類似体に対する水酸化活性評価

EctD と同じ酵素ファミリーに属するプロリン水酸化酵素 (*cis*-3, *cis*-4, *trans*-4-水酸化酵素) はいずれも L-プロリンのみならず、その構造類似体に対しても活性を有している。そこで、*S. cattleya* 由来 EctD についても基質特異性を詳細に検討した。精製酵素反応後の上清を HPLC および MS で分析した結果、2-メチル-L-プロリン、3,4-デヒドロ-L-プロリン、L-ピペコリン酸に対しても活性を示すことが明らかになった (図 4)。よって、EctD は従来知られていたよりも広範な化合物に対しても活性を示し、多様なヒドロキシ体の合成に適用できることが示された。

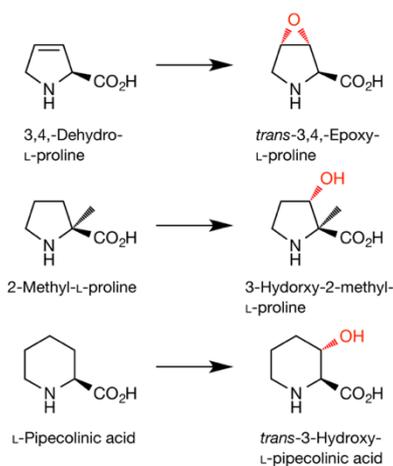


図 4. プロリン類似化合物に対する反応.

(4) 菌体反応による *trans*-3-Hyp の合成

これまでの検討において、*S. cattleya* 由来 EctD はエクトインのみならず L-プロリン類似体に対する水酸化活性を有していることを明らかにした。本特性を生産に用いるために、菌体反応系での *trans*-3-Hyp 合成プロセスの開

発を目指した。菌体反応系において宿主として用いる大腸菌には L-プロリンの分解経路が存在する。そこでまず、大腸菌における基質 L-プロリンの分解を回避し *trans*-3-Hyp 合成収率の向上を図るため、プロリンデヒドロゲナーゼ欠損株を造成した。さらに、宿主・ベクター系もいくつかの組み合わせを検討した結果、大腸菌 JM109 と pQE30 ベクターの利用において最も効率の良い *trans*-3-Hyp 合成が可能となったため、当該大腸菌を菌体触媒として利用した。

基質 L-プロリンと補基質 2-オキソグルタル酸を含む溶液に、ジャーファーメンターを用いて培養した組換え大腸菌を添加し、激しく攪拌させながら 25°C, pH 7.0 の条件下で 48 時間微生物変換反応を実施した。その結果、55 mM の *trans*-3-Hyp を合成することに成功した。L-プロリンは残存したが、消費した L-プロリンは全て *trans*-3-Hyp に変換したことから、プロリンデヒドロゲナーゼの欠損が有効であることが示された。

(5) 多酵素反応による *trans*-3-Hyp の合成

EctD による L-プロリンの水酸化のみならず、多酵素反応系による *trans*-3-Hyp の合成も開発した。アルギニン水酸化酵素、アルギナーゼ、オルニチンシクロデアミナーゼを用いた 3 段階の反応経路を設計し、L-アルギニンから *trans*-3-Hyp への反応を検討した (図 5)。実際に、アルギニン水酸化酵素によりアルギニンから 3-ヒドロキシアアルギニン (3-hArg) を合成し、次いでアルギナーゼによって 3-ヒドロキシオルニチン (3-hOrn) へと変換した。さらに、オルニチンシクロデアミナーゼにより 3-hOrn から *trans*-3-Hyp を合成可能であることを確認した。続いて各反応条件を最適化し、*trans*-3-Hyp の合成を検討した。その結果、アルギニン水酸化酵素による 3-hArg の合成、およびアルギナーゼによる 3-hOrn の合成は短時間で効率よく進行したものの、3 段階目のオルニチンシクロデアミナーゼによる *trans*-3-Hyp の合成は反応速度が遅く、変換率も約 50% で停止したため、さらに検討の余地があると考えられる。以上より、アルギニンから *trans*-3-Hyp へのユニークな合成経路の開発に成功した。

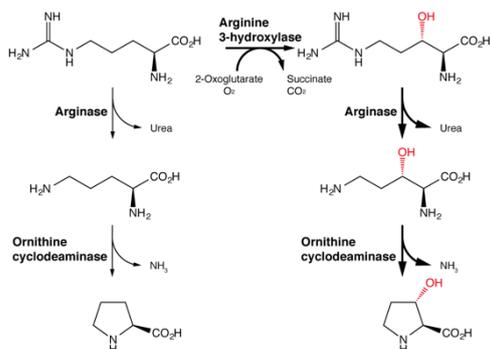


図 5. *trans*-3-Hyp の合成スキーム。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① R. Hara, S. Kitatsuji, K. Yamagata, K. Kino, “Development of a multi-enzymatic cascade reaction for the synthesis of *trans*-3-hydroxy-L-proline from L-arginine” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 243–253 (2016) 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

- ① 原良太郎, 北辻早希, 山縣海, 木野邦器 “酵素法によるアルギニンからの 3-ヒドロキシオルニチンおよび *trans*-3-ヒドロキシプロリンの合成” 第 68 回日本生物工学会大会, 講演番号 1P-1p020, 富山国際会議場 (富山) 2016 年 9 月 28 日
- ② 原良太郎 “微生物酵素の開発と産業への応用” 日本学術振興会「先端ナノデバイス・材料テクノロジー第 151 委員会」平成 27 年度 第 4 回研究会, 早稲田大学 (東京) 2015 年 12 月 17 日
- ③ 西川健幸, 原良太郎, 木野邦器 “エクトイン水酸化酵素発現大腸菌によるヒドロキシプロリン類縁化合物の生産” 酵素工学研究会第 74 回講演会, 講演番号 B-6, 講演要旨集 p63, 東京大学山上会館 (東京) 2015 年 10 月 16 日
- ④ 原良太郎, 中野雅至, 北辻早希, 山縣海, 木野邦器 “アミノ酸水酸化酵素と加水分解酵素の組み合わせによるヒドロキシアミノ酸の合成” 酵素工学研究会第 74 回講演会, 講演番号 B-4, 講演要旨集 p61, 東京大学山上会館 (東京) 2015 年 10 月 16 日
- ⑤ 北辻早希, 原良太郎, 木野邦器 “選択的 *trans*-3-ヒドロキシプロリン合成経路の構築と多様なヒドロキシイミノ酸合成への展開” 第 5 回 CSJ 化学フェスタ 2015, タワーホール船堀 (東京) 2015 年 10 月 13 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 良太郎 (HARA, Ryotaro)

早稲田大学 理工学術院総合研究所 (理工学研究所)・次席研究員 (研究院講師)

研究者番号 : 70553535