

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07720

研究課題名(和文)ホルムアルデヒド駆動型ヒドロキシメチル転移酵素の探索と育種

研究課題名(英文) Exploration and functional analysis of a formaldehyde-driven glycine hydroxymethyltransferase

研究代表者

本田 孝祐 (HONDA, Kohsuke)

大阪大学・生物工学国際交流センター・教授

研究者番号：90403162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、C1化合物の代謝に関わる生体反応の多様性を探るとともに、将来的にはこれをC1化合物の有効利用技術へと展開することを目的とし、微生物におけるグリシンヒドロキシメチル転移酵素(GHMT；グリシンをヒドロキシメチル化しセリンを生成する酵素)の反応特異性を精査した。好熱性アーキアである *Thermoplasma acidophilum* 由来酵素が、GHMTの本来のヒドロキシメチル基供与体であるメチレンTHFのほか、ホルムアルデヒドを基質としうることを示した。また同酵素が、当初予想されたセリンの代謝ではなく、スレオニン代謝に関与するものである可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は微生物におけるC1化合物(メタンなど)の代謝の多様性を解明することを目的に実施された。この結果、超好熱性アーキアの一つである *Thermoplasma acidophilum* 由来酵素が、当初予想されたグリシンへのC1付加によるセリン生成に加え、C2付加によるスレオニン生産を効率的に触媒することを見出した。本成果は、真正細菌、真核生物とともに第3の生物ドメインを形成するアーキアのユニークな代謝反応の一端を示したものであり、微生物由来酵素が触媒する反応の多様性を示唆するものと位置づけられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, reaction specificities of microbial glycine hydroxymethyltransferase (GHMT) was investigated to explore the diversity of microbial metabolisms of C1 compounds (e.g., methane, methanol, and formaldehyde) and their potential to be a novel biocatalytic tool for industrial utilization of C1 compounds. The enzyme derived from a thermophilic archaeon, *Thermoplasma acidophilum*, was shown to be able to use formaldehyde as a C1 donor for the hydroxymethylation of glycine to serine in addition to its physiological substrate, methylene-THF. The enzyme also showed significant activity in the cleavage of threonine to glycine and acetaldehyde, suggesting that the enzyme is more related to the metabolism of threonine, rather than serine, in *Thermoplasma acidophilum*. This result shed a new light on a unique C1 metabolisms in archaea.

研究分野：応用微生物学

キーワード：グリシンヒドロキシメチル転移酵素 スレオニンアルドラーゼ *Thermoplasma acidophilum*

## 1. 研究開始当初の背景

研究開始当時、米国におけるシェールガス革命などを背景に、メタンなどの C1 化合物の新規利用技術の開発に高い社会的関心が寄せられていた。C1 化合物を利用した生物反応の例としては、光合成生物による炭酸固定のほか、methylotroph と総称される微生物群によるメタノール資化などがよく知られている。光合成生物におけるカルビン-ベンソン回路や methylotroph におけるリブローズモノリン酸経路など、C1 化合物取り込みの「入り口」となる代謝経路は、古くから活発な研究対象となっており、多くの知見が蓄積していた。一方で、細胞内における C1 化合物の動態については未だ不明確な点も多く、生体触媒反応による C1 化合物の有効利用を制限する要因ともなっている。

こうした背景のもと本研究は、生物における C1 代謝の多様性の一端を明らかにすべく、当時発見されて間もなかったホルムアルデヒド駆動型 3-メチル-2-オキソブタン酸ヒドロキシメチル転移酵素 (MOBHMT) の発見に着想を得て立案された。具体的には、MOBHMT と類似の反応を触媒する酵素であるグリシンヒドロキシメチル転移酵素 (GHMT) を対象に、ホルムアルデヒドを C1 ユニット供与体として利用可能な新規酵素の探索と解析に取り組んだ。

## 2. 研究の目的

細胞内において C1 ユニットは、S-アデノシルメチオニン (SAM) や 5-メチルテトラヒドロ葉酸 (メチル THF)、5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸 (メチレン THF) の形で運搬され、様々な代謝物のメチル化、ヒドロキシメチル化に利用される。このうちメチレン THF は、GHMT や MOBHMT といった酵素反応における C1 ユニット供与体として働く。GHMT と MOBHMT は、それぞれ L-セリン、2-デヒドロパント酸 (CoA の生合成前駆体) の主たる合成酵素として、生体内で重要な役割を担っている。一方、MOBHMT の C1 ユニット供与体の選択性は必ずしも厳密ではなく、*Mycobacterium tuberculosis*、*Thermococcus kodakarensis* といった微生物から、メチレン THF に加え、ホルムアルデヒドを C1 ユニット供与体として 3-メチル-2-オキソブタン酸のヒドロキシメチル化を触媒する MOBHMT が発見されている。本研究では、MOBHMT におけるこれらの報告に着想を得て、様々な微生物由来の GHMT を対象にこれらの C1 ユニット供与体要求性を精査することで、未だ報告のないホルムアルデヒド駆動型 GHMT の探索を行った (図 1)。これにより、微生物における C1 化合物代謝の多様性を示すとともに、将来的にはメチレン THF に比べ、格段に安価な物質であるホルムアルデヒドを原料としたセリン製造への展開が期待できる。

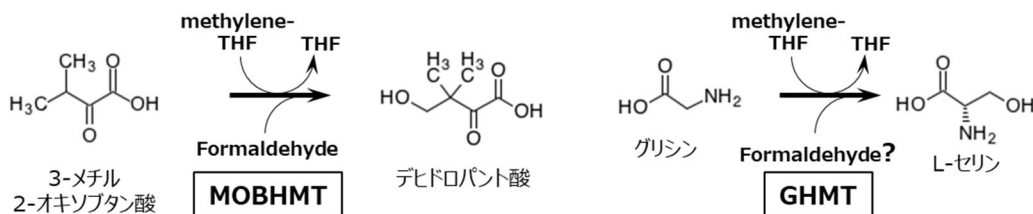


図 1 : MOBHMT および GHMT が触媒する反応。ホルムアルデヒドを基質とできる GHMT はこれまで報告がなく、本研究での探索対象となった。

## 3. 研究の方法

### 3 - 1) 組換え GHMT の調製

代表者の研究室が保有する約 20 株の (超) 好熱菌ゲノムライブラリーをリソースとして、既知酵素との相同性検索の結果に基づき、GHMT 遺伝子の取得を行った。選抜された遺伝子を PCR クローニングにより発現プラスミドベクターに連結し、大腸菌内で過剰発現させた。SDS-PAGE 解析により組換え酵素が可溶性タンパク質として生産されていることが認められた GHMT について解析の対象とした。

### 3 - 2) 酵素活性測定

組換え GHMT を生産させた大腸菌の無細胞抽出液に対して 70°C、30 分間の熱処理を施し、宿主由来酵素を変性・除去した。得られた酵素をゲルろ過カラムクロマトグラフィーによって精製し、活性測定に用いた。活性測定は、メチレン THF およびホルムアルデヒドを C1 供与体としたグリシンのヒドロキシメチル化によるセリンの生産を定量することで行った。また逆反応であるセリンからグリシンへの開裂反応を、THF の存在/非存在下でモニターすることでも評価を行った。セリンのほか、スレオニンからグリシンへの開裂反応も同様に評価した。適当な反応条件下で酵素と基質をインキュベーションした後、トリクロロ酢酸の添加により酵素反応を停止させ

た。サンプルを減圧乾固させたのち、トリエチルアミンとイソチオシアン酸フェニル (phenylisothiocyanate, PITC) を含む溶液中で誘導体化 (PITC 化) を行った。PITC 化されたアミノ酸を逆相 HPLC 解析に供し、基質と生産物を定量した。

#### 4. 研究成果

##### 4-1) 組換え GHMT の調製

本研究では、(超)好熱菌を GHMT の分離源とした。これは超好熱性アーキアのひとつである *Thermococcus kodakarensis* からホルムアルデヒド依存型の MOBHMT が見出されている事実に基づくものである。また、安定性に優れた酵素を取得することをねらいとしたことも好熱菌を分離源とした理由のひとつである。既知の GHMT との相同性検索により、9 種類の好熱菌に由来する 11 種類の GHMT 遺伝子を選抜した。またこれらが大腸菌内で発現させ、組換えタンパク質を生産させた。この結果、2 種類のアーキア (*Pyrococcus horikoshii*, *Thermoplasma acidophilum*)、および 2 種類の細菌 (*Thermotoga maritima*, *Thermus thermophilus*) 由来の GHMT について、これらを可溶性タンパク質として得ることができた。

##### 4-2) GHMT の反応特異性の検証

得られた 4 種類の組換え GHMT について、本研究の探索目標であったホルムアルデヒドを C1 供与体としたグリシンのヒドロキシメチル化によるセリン合成活性を評価した。この結果、*T. acidophilum*, *T. thermophilus* 由来する酵素 (それぞれ GHMT<sub>Ta</sub>, GHMT<sub>Tt</sub> とする) において微弱ではあるものの目的の活性を見出すことができた (表 1)。一方、これらの酵素が本来触媒すると考えられるメチレン THF を供与体としたセリン合成活性を定量したところ、GHMT<sub>Tt</sub> においては予想どおり、ホルムアルデヒド使用時に比べて顕著に高い活性 ( $k_{cat}/K_m$  値において 930 倍) が認められた。その一方で、GHMT<sub>Ta</sub> ではメチレン THF 使用時においても微弱な活性しか検出することができなかった。また GHMT<sub>Ta</sub>, GHMT<sub>Tt</sub> のそれぞれについて、上記でアッセイした反応の逆反応 (セリンからグリシンへの開裂反応) の触媒能力を評価したところ、GHMT<sub>Tt</sub> では THF 存在下でのみ活性が検出されたのに対して、GHMT<sub>Ta</sub> は THF の存在/非存在下のいずれにおいても活性を示すことはなかった。こうした結果から、GHMT<sub>Ta</sub> は *T. acidophilum* において GHMT としては機能していない可能性が考えられた。

表 1: ホルムアルデヒドおよびメチレン THF を C1 ユニット供与体とした GHMT<sub>Ta</sub>, GHMT<sub>Tt</sub> によるセリン合成活性。

Enzyme	C1 donor	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )
GHMT <sub>Ta</sub>	Formaldehyde	50	0.41	0.0082
	Methylene-THF	1.8	0.2	0.11
GHMT <sub>Tt</sub>	Formaldehyde	14	0.06	0.0043
	Methylene-THF	0.8	3.17	4.0

以上の結果に基づき、われわれは GHMT<sub>Ta</sub> の生理的役割に焦点を当てた解析に取り組んだ。上記のとおり GHMT<sub>Ta</sub> は、ホルムアルデヒドとグリシンのアルドール縮合を THF に非依存的に触媒可能である。また、多くの GHMT において、本反応のアナログ反応でもあるアセトアルデヒドとグリシンのアルドール縮合によるスレオニン生産、すなわちスレオニナルドラーゼ反応が触媒されることが知られている。そこでわれわれは、GHMT<sub>Ta</sub> は生理的環境下において GHMT としてではなく、スレオニナルドラーゼとして機能しようとの仮説を立て、その検証に取り組んだ。

GHMT<sub>Ta</sub> ならびに比較対象として GHMT<sub>Tt</sub> を用いてスレオニナルドラーゼ活性の測定を行った。活性評価はスレオニンの開裂反応によるグリシンの生産をモニターすることで実施した。またこの際、THF の有無が活性に及ぼす影響を評価した。いずれの条件でもスレオニンからのグリシン生産が認められたが、GHMT<sub>Ta</sub> は GHMT<sub>Tt</sub> に比して顕著に高い活性を示した (表 2)。また反応液中への THF の添加は、GHMT<sub>Ta</sub> に対しては目立った影響を及ぼさなかった一方で、GHMT<sub>Tt</sub> に対しては阻害的な効果を示した。この結果は、セリンの開裂反応において GHMT<sub>Tt</sub> は THF の添加を要求したことは対象的であった。以上のことより、GHMT<sub>Tt</sub> は当初の想定どおり、セリンを本来の生理的基質とし、その反応には THF が必須となるものと結論付けられる。これに対し、GHMT<sub>Ta</sub> はセリン、スレオニンのいずれに対する反応でも THF によって影響を受けず、またその活性値から考えてもセリン代謝ではなくスレオニン代謝に関与するものである可能性が示唆された。一方、*T. acidophilum* のゲノム上からは、GHMT<sub>Ta</sub> をコードする遺伝子 (Ta0811) のほか、既知の GHMT と有意な相同性を示すもうひとつの遺伝子 (Ta1509) を見出すことができ、*T. acidophilum* においては、これらがそれぞれスレオニン、セリン代謝における中心的役割を果たすという仮説も考えられる。今後は、Ta1509 の転写産物に対しても本研究と同様の

詳細な検証調査が必要となろう。我々の知る限り、アーキアにおいては、これまで生化学的特性が調査されたスレオニナルドラーゼの例は知られておらず、本研究はアーキアにおけるアミノ酸代謝の全容解明に向けた端緒となりうるものである。

表 2 : GHMT<sub>Ta</sub>、GHMT<sub>Tt</sub> のスレオニナルドラーゼ活性。

Enzyme	Substrate	Methylene-THF	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )
GHMT <sub>Ta</sub>	L-Serine	+	ND	ND	-
		-	ND	ND	-
	L-Threonine	+	0.64	0.10	0.16
		-	0.22	0.20	0.91
GHMT <sub>Tt</sub>	L-Serine	+	23	0.29	0.012
		-	ND	ND	-
	L-Threonine	+	61	0.16	0.0026
		-	6.4	0.24	0.037

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Taniguchi Hironori、Imura Makoto、Okano Kenji、Honda Kohsuke	4. 巻 18
2. 論文標題 Developing a single strain for in vitro salvage synthesis of NAD+ at high temperatures and its potential for bioconversion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbial Cell Factories	6. 最初と最後の頁 75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12934-019-1125-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hanatani Yohei、Imura Makoto、Taniguchi Hironori、Okano Kenji、Toya Yoshihiro、Iwakiri Ryo、Honda Kohsuke	4. 巻 103
2. 論文標題 In vitro production of cysteine from glucose	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 8009 ~ 8019
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00253-019-10061-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----