

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05400

研究課題名（和文）不完全TCA回路の補完性を利用したアミノ酸水酸化酵素探索ツールの開発と応用

研究課題名（英文）Development of screening tool for amino acid hydroxylase using insufficient TCA-cycle complementation test and its application

研究代表者

原 良太郎（Hara, Ryotaro）

京都大学・農学研究科・特定准教授

研究者番号：70553535

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：医薬品開発における有力な素材となるヒドロキシアミノ酸の生産法が求められている。実用生産においては、副産物が少なく、高効率なバイオプロセスが重要視される。本研究では、バイオプロセスの中心となる酵素の探索や改変に有効なツールを開発するとともに、有用ヒドロキシアミノ酸生産プロセスの創出を目指した。本研究では3つの成果を得た。まず、アミノ酸水酸化酵素により大腸菌の生育を相補可能な系を確立した。また、当該大腸菌を用いたtrans-3-ヒドロキシ-L-プロリン生産において、共基質の過剰な分解を抑えることができた。さらに、L-ヒスチジンおよびL-グルタミンを水酸化する新規酵素を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アミノ酸誘導体は、医薬品開発における重要な原料である。しかし、実用的に生産可能なものは限られている。アミノ酸誘導体の中でも、特にヒドロキシアミノ酸の合成は、従来法では多段階反応を要するため、シンプルな生産法が求められている。本研究で得た酵素は、化学合成では困難な位置選択的かつ立体選択的な水酸化により、ヒドロキシアミノ酸の生産を可能とする。成果物であるL-threo-3-ヒドロキシヒスチジンやL-threo-3-ヒドロキシグルタミンは合成例がなく、分子多様性が求められる医薬品開発に貢献できると考える。

研究成果の概要（英文）：To satisfy a need for a method to produce hydroxy amino acids, which are promising materials for pharmaceutical development, bioprocesses with environmentally friendly and high efficiency are promising. In this study, we aimed to develop a useful hydroxy amino acid production process by effective tools for screening and modifying the enzymes that play a central role in the bioprocess. In this study, we obtained three findings. First, we developed the screening system to complement the growth of engineered *E. coli* by amino acid hydroxylase. Then, in the production of trans-3-hydroxy-L-proline using the *E. coli*, the excessive degradation of the cosubstrate was suppressed. Furthermore, we found a novel enzyme that hydroxylates L-histidine and L-glutamine in a threo-selective manner.

研究分野：応用微生物学

キーワード：Screening Hydroxylase Enzyme Hydroxy amino acid Dioxygenase 3-Hydroxyhistidine 3-Hydroxyglutamine Insufficient TCA-cycle

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

化学反応に酵素を利用するプロセスは工業的に有用であり、一部は実用生産に用いられている。たとえば、加水分解酵素は比較的活性や安定性が高く、反応に必要とされる要素がシンプルであるため、産業用酵素として広く利用されている。一方で、酵素は多様であり、より精緻な反応を実現する酵素が注目を寄せている。しかし、加水分解酵素と比較して触媒活性や安定性が低いことが実用生産に応用する障壁となっている。その代表例として、水酸化酵素（酸素原子添加酵素）が知られている。水酸化酵素は、ヒドロキシ化のみならず、エポキシ化、スルホキシド化、不飽和化なども行うなど、酸化反应用触媒としての利用価値が高い。しかしながら実用化の観点では、複雑な電子伝達系に起因する反応制御の難しさや、反応持続性の低さが指摘されている。したがって、実践的な生産プロセスに適した水酸化酵素が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、多様な水酸化酵素の中でも活性が高く、複雑な電子伝達系を有さず、微生物発酵との連動が可能な 2-オキソグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼに着目し、汎用的に利用可能な酵素探索ツールを構築した。さらに、本ツールを利用した有用物質、特にヒドロキシアミノ酸の生産プロセスの開発を目指した。

3. 研究の方法

まず、研究の基盤となる酵素探索ツールとしての大腸菌遺伝子欠損株を構築した。具体的には、2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*sucAB*) とイソクエン酸リアーゼ遺伝子 (*aceA*) を、相同組換え法により欠損させた株を造成した。これにより、当該大腸菌は TCA 回路とグリオキシル酸回路が遮断され、自身ではコハク酸を生成できなくなるため、最少培地上では生育できなくなる (図 1)。一方、アミノ酸水酸化酵素は、2-オキソグルタル酸を共基質として利用し、反応の進行にともないコハク酸を生成する。この特性を踏まえると、水酸化酵素活性を発現する株においてのみ生育が可能となるため、生育を指標とした酵素スクリーニングが可能となる。さらに、生産においても宿主大腸菌による 2-オキソグルタル酸の分解を抑制できるため、水酸化反応を効率よく行うことが可能と期待される。

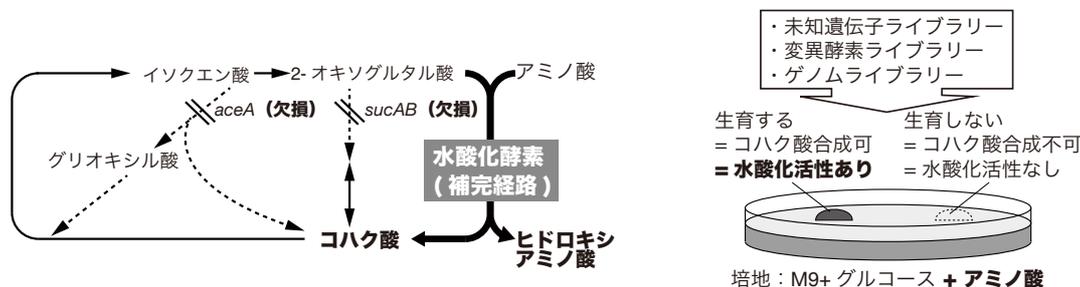


図 1. 不完全 TCA 回路を有する大腸菌(*aceA*, *sucAB* 欠損株)の生育を指標とする酵素スクリーニングの原理
左: 水酸化酵素によりヒドロキシアミノ酸とともにコハク酸を生成し、不完全な TCA 回路を補完する。
右: 遺伝子ライブラリーを作製し、アミノ酸を含む最少培地で生育したコロニーは水酸化活性を有する。

4. 研究成果

(1) スクリーニング系の構築と検証

L-イソロイシン水酸化酵素 (IDO) をモデルとし、水酸化酵素によるコハク酸生成能の相補性を検証した。IDO は、*Bacillus thuringiensis* 2e2 より見いだされた L-イソロイシンの 4-位を水酸化する 2-オキソグルタル酸依存型水酸化酵素である (Kodera et al (2009) *Biochem Biophys Res Commun* 390, 506-510)。構築した大腸菌欠損株において *ido* を発現させ、L-イソロイシンを含む M9 最少培地上で生育させた。その結果、L-イソロイシンを含む M9 最少培地では大腸菌が生育することを確認した。一方、IDO の基質とならないアミノ酸を含む M9 最少培地では大腸菌が生育しなかった。これは、IDO が欠損した TCA 回路を補完した結果、生育可能となった効果と考えられる。構築した系は、IDO に限定されるものではなく、原理的には 2-オキソグルタル酸依存型水酸化酵素であれば汎用的に活用できる。よって、本評価系は、機能未知酵素の基質探索、メタゲノムからのアミノ酸水酸化酵素の探索、ランダム変異による酵素の基質特異性改変などに有効であると予想される。

(2) 遺伝子欠損大腸菌の物質生産への適用

構築した欠損大腸菌では、2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ *SucAB* が機能せず、2-オキソグルタル酸の過剰な分解を抑制できるため、効率的な物質生産に有利であると予想した。そこで、プロリン水酸化活性を示す *Streptomyces cattleya* NBRC 14057 由来水酸化酵素 *EctD* をコードする遺伝子を、上記大腸菌欠損株にて発現させ、プロリン水酸化反応における菌体触媒として用いた。その結果、宿主による 2-オキソグルタル酸の分解は見られず、消費した 2-オキソグルタル酸はすべてプロリン水酸化反応に供給された (図 2)。一方、比較対象として親株の大腸菌を反応に供したところ、2-オキソグルタル酸は宿主により大半が分解され、開始 1 時間後にはプロリン水酸化反応が停止した (図 3)。すなわち、欠損株を用いることで 2-オキソグルタル酸の分解を抑制しつつ、*trans*-3-ヒドロキシプロリンを効率的に生産することに成功した (Hara et al (2019) *Appl Microbiol Biotechnol* 103, 5689-5698)。本技術は、既にも実証されている菌体増殖を伴う発酵生産 (Smirnov et al (2010) *Appl Microbiol Biotechnol* 88, 719-726) のみならず、非増殖系の菌体反応にも広く応用可能と考えられる。

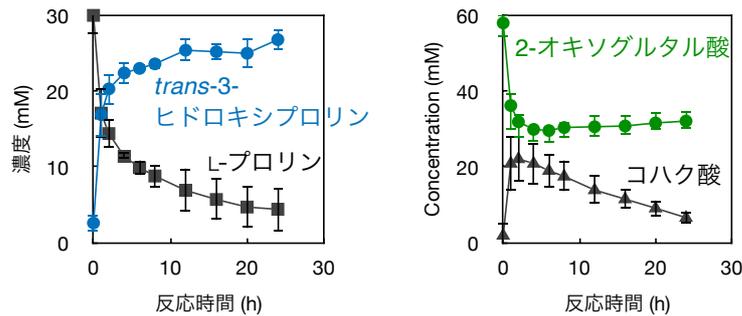


図2. *EctD*を発現させた欠損株を用いた*trans*-3-ヒドロキシプロリンの生産

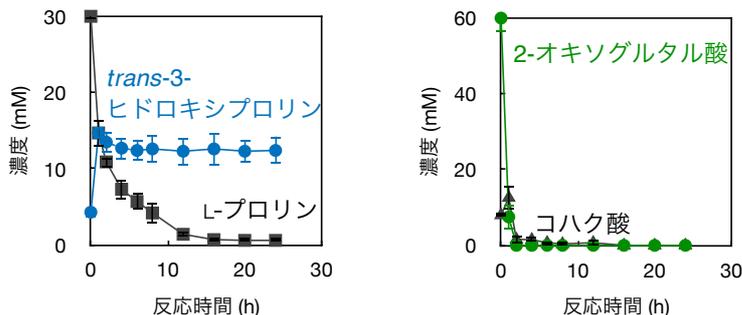


図3. *EctD*を発現させた親株を用いた*trans*-3-ヒドロキシプロリンの生産

(3) 機能未知酵素の探索

アミノ酸水酸化酵素の種類を拡張すべく、酵素の *in silico* スクリーニングを実施した。まず、既に構築している 2-オキソグルタル酸依存型ジオキソゲナーゼライブラリー (Hara et al (2017) *Appl Environ Microbiol* 83, e00693-00617) に着目した。当該ライブラリーは、新規リジン水酸化酵素の発見につながったが、大半は機能が不明のままである。そこで、機能未知タンパク質における基質探索を実施した。天然型アミノ酸を中心に基質として供した結果、*Sulfobacillus thermotolerans* 由来の酵素において、L-ヒスチジンおよび L-グルタミン水酸化活性を見出した。基質の構造類似性が低い化合物を水酸化する当該酵素は、酵素化学的に極めて興味深い。また、反応産物も新規化合物と考えられたため、特に重要なヒドロキシ基の絶対配置を解析した。反応生成物の単結晶を晶析によって取得後、X-線結晶構造解析を行った結果、水酸化産物の絶対構造はいずれも *threo*-体であった。続いて、取得した酵素の諸性質を解析し、最適反応条件を決定した。本結果に基づき、酵素遺伝子を発現させた組換え大腸菌の菌体を触媒とした L-ヒスチジンおよび L-グルタミンの水酸化反応を実施した。その結果、150 mM の L-ヒスチジンから 137 mM の L-*threo*-3-ヒドロキシヒスチジン、200 mM の L-グルタミンから 150 mM の L-*threo*-3-ヒドロキシグルタミンを生産した。いずれも 20 g/L 以上の生産性を示し、本研究で目指すヒドロキシアミノ酸の新規バイオ生産プロセスの一つを構築した (論文投稿中)。

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 0件）

1. 著者名 Hara Ryotaro, Nishikawa Takeyuki, Okuhara Takuya, Koketsu Kento, Kino Kuniki	4. 巻 103
2. 論文標題 Ectoine hydroxylase displays selective trans-3-hydroxylation activity towards L-proline	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 5689 ~ 5698
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-019-09868-y	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 -

1. 著者名 Hara Ryotaro, Kino Kuniki	4. 巻 104
2. 論文標題 Enzymatic reactions and microorganisms producing the various isomers of hydroxyproline	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 4771 ~ 4779
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-020-10603-1	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6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 原 良太郎
2. 発表標題 微生物由来アミノ酸修飾酵素を利用した有用アミノ酸生産プロセスの開発
3. 学会等名 第21回 酵素応用シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原 良太郎
2. 発表標題 微生物酵素の探索を基盤とした有用化合物生産プロセスの開発
3. 学会等名 2020年度 バイオインダストリー奨励賞 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原 良太郎
2. 発表標題 微生物酵素の探索と有用化合物生産への応用
3. 学会等名 2020年度 酵素工学奨励賞（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原 良太郎、西川 健幸、奥原 拓也、瀧澤 健人、木野 邦器
2. 発表標題 trans-3-ヒドロキシプロリンの実用生産に向けたバイオプロセス開発
3. 学会等名 日本生物工学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳川洋哉、勝又智哉、中島悠太、原良太郎、平沢泉、木野邦器
2. 発表標題 ヒスチジンおよびグルタミンを基質とする新規水酸化酵素による反応生成物の絶対構造解析
3. 学会等名 酵素工学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryotaro Hara, Makoto Hibi, Takayuki Iihoshi, Shoko Kozono, Satomi Takahashi, Kuniki Kino, Jun Ogawa
2. 発表標題 Enzymatic process for useful amino acid synthesis using microbial Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenases
3. 学会等名 1st Japan-Germany-Switzerland Workshop for Enzyme Technology and Bioprocess Development (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------