

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658027

研究課題名（和文） 生活習慣病改善に有効な代謝調節機能を有する新規分岐鎖アミノ酸誘導体の創出

研究課題名（英文） Design of novel branched chain amino acids with metabolic control function for clinical improvement of lifestyle diseases.

研究代表者

小川 順 (OGAWA JUN)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：70281102

研究成果の概要（和文）：

本研究では、微生物に見いだした新たな分岐鎖アミノ酸代謝系にて機能する新規酵素群を活用して、水酸化分岐鎖アミノ酸誘導体を中心とする新規な生理活性アミノ酸誘導体の合成法構築を試みた。その結果、ジオキシゲナーゼを用いる水酸化脂肪族アミノ酸誘導体の合成、アルドラーゼを用いる水酸化アミノ酸の合成、ならびに、酸化還元酵素を用いる 4-ヒドロキシイソロイシン異性体の合成など、様々な立体選択的酵素合成を可能とした。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we attempted to construct novel synthetic procedures for the physiologically active amino acid production, such as hydroxylated branched chain amino acid derivatives, using enzymes involved in newly found microbial branched chain amino acid metabolisms. As the results, stereoselective fine syntheses, such as hydroxylated aliphatic amino acids by dioxygenases, hydroxylated amino acids by aldolases, and 4-hydroxyisoleucine stereoisomers by oxidoreductases were established.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	0	1,700,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

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：分岐鎖アミノ酸、4-ヒドロキシイソロイシン、肥満、糖尿病、ジオキシゲナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

最近になり、分岐鎖アミノ酸(バリン、ロイシン、イソロイシン)にエネルギー源としての生理機能のみならず、代謝を調節する栄養シグナル分子としての機能が見いだされつつある。例えばロイシンにはタンパク質合成を刺激し分解を抑制する機能が、また、イ

ソロイシンにはインスリン非依存的に血中グルコースの骨格筋への取り込みを促進する機能が見いだされてきている。さらに、イソロイシン誘導体である 4-ヒドロキシイソロイシン (HIL) には、ヒトに対する経口投与にて血糖降下作用を示すことが見いだされてきている。これらの成果は、分岐鎖アミ

ノ酸誘導体に、これまでにない代謝調節機能が存在することを想起させるものである。

我々はこれまでに、微生物における各種アミノ酸代謝を詳細に検討する過程で、*Bacillus* 属細菌において、L-イソロイシンをHILを経て $\gamma$ -ケートイソロイシン (AMKP) へと変換する新規な代謝経路を発見し、この代謝系に関与する新規酵素、L-イソロイシンジオキシゲナーゼならびに 4-ヒドロキシイソロイシン脱水素酵素が HIL の合成に活用できる可能性を見いだした。また、*Arthrobacter* 属細菌に発見した  $\alpha$ -ケート酪酸とアセトアルデヒドを縮合する新規アルドラーゼと分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素を用いて、HIL が誘導可能なことも見いだした。すなわち、これらの新規微生物酵素を用いて、興味深い生理活性が期待される分岐鎖アミノ酸誘導体を中心とした各種アミノ酸誘導体の合成が可能であることが示された。

## 2. 研究の目的

本研究では、微生物に見いだした新たな分岐鎖アミノ酸代謝系にて機能する新規酵素群を活用して、水酸化分岐鎖アミノ酸誘導体を中心とする新規な生理活性アミノ酸誘導体の合成法構築を試みた。具体的には、ジオキシゲナーゼを用いる水酸化脂肪族アミノ酸誘導体の合成、アルドラーゼを用いる水酸化アミノ酸の合成、ならびに、酸化還元酵素を用いる HIL 異性体の合成を試みた。最終的には、糖尿病・肥満を改善する栄養シグナル分子としての機能を中心に、様々な生理機能を発揮しうるアミノ酸誘導体の提供を可能とすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ジオキシゲナーゼを用いる水酸化脂肪族アミノ酸誘導体の合成

既に取得している L-イソロイシンジオキシゲナーゼ遺伝子の情報を用いた *in silico* 解析から、既報の微生物ゲノム上にホモログ遺伝子を探索した。これらのホモログ酵素を大腸菌にて発現し、その基質特異性検討に基づいて水酸化分岐鎖アミノ酸誘導体の合成を試みた。

(2) アルドラーゼを用いる水酸化アミノ酸の合成

既に取得している新規アルドラーゼ遺伝子の情報を用いた *in silico* 解析から、既報の微生物ゲノム上にホモログ遺伝子を探索した。これらのホモログ酵素を大腸菌にて発現し、その基質特異性検討に基づいて水酸化アミノ酸誘導体の合成を試みた。

(3) 酸化還元酵素を用いる HIL 異性体の合成

様々な微生物を対象に AMKP 還元活性を探索し、得られた立体選択性の異なる還元酵素群を化学合成ラセミ体 AMKP に作用させ、様々な立体の HIL 光学異性体の酵素合成を試みた。

## 4. 研究成果

(1) ジオキシゲナーゼを用いる水酸化脂肪族アミノ酸誘導体の合成

新規な生理活性アミノ酸誘導体の合成を念頭に置いたジオキシゲナーゼを用いる水酸化脂肪族アミノ酸の生産法の開発を実施した。アミノ酸水酸化酵素の一種である *Bacillus thuringiensis* 由来のイソロイシンジオキシゲナーゼ (IDO) の基質特異性解析と反応産物の構造解析を行ったところ、分岐鎖アミノ酸に対して広い水酸化活性を保持していることを明らかにできた。この結果により図 1 に示すような新規水酸化脂肪族アミノ酸誘導体として供給できるようになった。

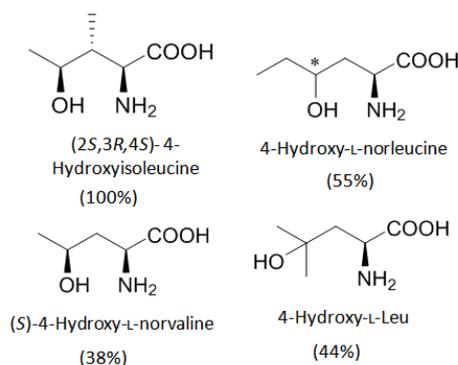


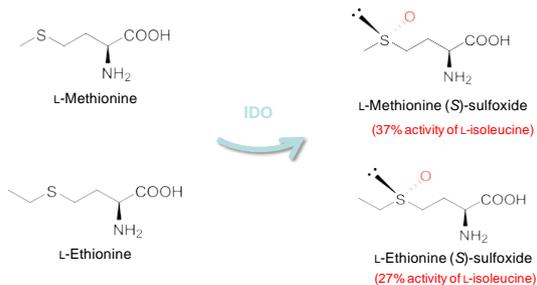
図 1. IDO 触媒反応により生成する水酸化アミノ脂肪族酸。( ) 内の数値は L-イソロイシンに対する活性を 100 とした際の相対活性値。

さらに IDO は L-methionine 等の百脈 L-アミノ酸を酸化して L-methionine sulfoxide を生じる別種の反応も触媒できることを発見した。非対称なスルフォキッドにはスルフィニル基 [-S(=O)-] の不斉に由来した立体異性が存在している。光学活性なスルフォキッドの中には有益な薬理活性を持った医薬品や機能性食品として利用されているものが知られている。スルフィドからスルフォキッドへの化学的な酸化反応は比較的容易であるが、反応産物であるスルフォキッドはラセミ体となり、光学活性スルフォキッドの取得のためには光学分割過程が必須であるという問題がある。そこで、IDO を光学活性スルフォキッド生産のための有望な酵素触媒として利用できると考え、IDO の触媒するスルフォキッド化反応の詳細な特性を解析した。

その結果、IDO は L-methionine の他にも、L-ethionine、L-homocysteine などに作用する事が判明した。L-methionine に対する相対

活性はそれぞれL-ethionineにおいては73%、L-homocysteineにおいては104%であった(図2)。L-methionineを基質とした際の生成物であるL-methionine sulfoxideの光学純度を分析したところ、99%以上の純度でL-methionine-(S)-sulfoxideが生成していることが分かった(図2)。同様に、L-ethionineをL-ethionine-(S)-sulfoxideへ99%ee以上のエナンチオマー過剰率でスルフォキシド化した。

#### Sulfoxidation of sulfur-containing L-amino acids by IDO



IDO catalyzes not hydroxylation but sulfoxidation of L-methionine and L-ethionine stereoselectively.

図2. IDO触媒反応により生成するアミノ酸スルフォキシド。( )内の数値はL-イソロイシンに対する活性を100とした際の相対活性値。

#### (2) アルドラーゼを用いる水酸化アミノ酸の合成

これまでに、HIL 生産に有用な微生物酵素として、HMKP アルドラーゼ asHPAL を、*Arthrobacter simplex* AKU626 株より取得している。asHPAL と分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素 IlvE を用いることで、アセトアルデヒドと2-ケト酪酸からHILを生産することが可能である。また遺伝子解析の結果、asHPAL はHpaI/HpcH アルドラーゼファミリーに属することが判明している。そこで本研究では、アルデヒドと2-ケト酸のアルドール縮合物を IlvE によってアミノ化することで、多様な4-ヒドロキシアミノ酸を生産するという反応系を想定し、HpaI/HpcH アルドラーゼファミリーの基質特異性解析をおこなった。

HpaI/HpcH アルドラーゼファミリーに属する *A. simplex* 由来 asHPAL、*E. coli* 由来 YhaF、*E. coli* 由来 YfaU、ならびに *Novosphingobium aromaticivorans* 由来 BphF の遺伝子をクローニングし、それぞれの遺伝子を発現する形質転換 *E. coli* 株を構築した。精製した組み換え酵素を用いて基質特異性を解析した結果、すべてのアルドラーゼの2-ケト酸に対する選択性はピルビン酸と2-ケト酪酸に特異的であった。一方、アルデヒドに対する選択性は非常に広く、脂肪族化合物以外にも、ベン

ゼン環や、チオフェン、ピリジンを有するものなど、多様な4-ヒドロキシアミノ酸の生産がある程度の立体選択性をもって可能であることが判明した(図3)。

No.	Substrate	
	Aldehyde	2-Keto acid
1	Acetaldehyde	
2	Isonicotinaldehyde	2-Ketobutyrate
3	Terephthalaldehyde	
4	Nicotinaldehyde	
5	Chloroacetaldehyde	
6	Isobutyraldehyde	
7	Phenylacetaldehyde	Pyruvate
8	<i>m</i> -Chlorobenzaldehyde	
9	2-Thiophenecarboxaldehyde	

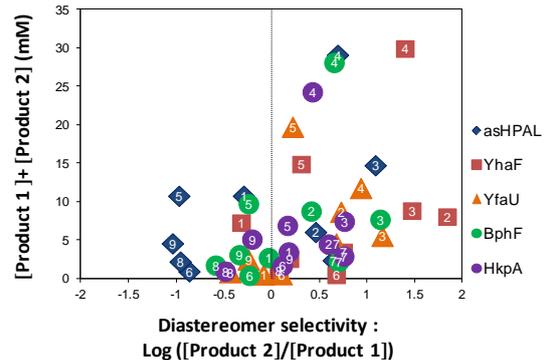


図3. HpaI/HpcH アルドラーゼファミリー酵素と分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素のカップリングによる4-ヒドロキシアミノ酸類の立体選択的合成。

#### (3) 酸化還元酵素を用いる HIL 異性体の合成

2,3,4,6-tetra-O-acetyl  $\beta$ -D-glucopyranosyl isothiocyanate を利用したキラル誘導体化法を用いることで、4種のAMKP立体異性体及び8種の4-HIL立体異性体、計12種の化合物のHPLC一斉分析法を確立できた(図4)。

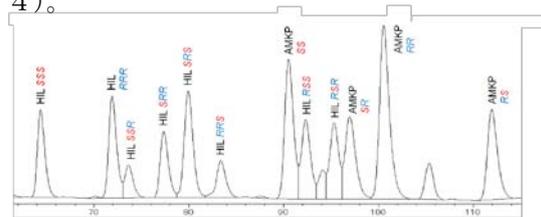


図4. 8種のHIL異性体と4種のAMKP異性体の一斉分析。

この分析法を用いて、研究室保存菌からスクリーニングによって選抜したAMKP還元活性菌及びAMKP還元酵素が生成する4-HILの立体異性を評価した。AMKP還元活性菌として選抜されたバクテリア2種(AKU 146, AKU 301)、カビ1種(AKU 3651)、酵母4種(AKU 4438, AKU 4507, AKU 4806, AKU 4810)、担子菌5種(AKU 5518, AKU 5519, AKU 5520, AKU 5608, AKU 5709)、冬虫夏草5種(IG 212, IG 213, IG 301, IG 503, IG 611)の無細胞抽

出液を反応に供した。また *B. thuringiensis* 2e2 株由来 (HILDH)、*Aureobasidium pullulans* NBRC 4466 株由来 (ARAP)、*Fusarium solani* TG-2 AKU 3710 株由来 (ARFS)、*F. graminearum* PH-1 株由来 (ARGZ)、*Acremonium fusidioides* IG 305 株由来 (ARAF)、*A. strictum* 20-14 株由来 (ARFA547) の AMKP 還元酵素を発現する組み換え大腸菌株の無細胞抽出液も併せて反応に用いた。

AMKP 還元活性菌は HIL(2*S*, 3*R*, 4*S*) と HIL(2*S*, 3*S*, 4*S*) を生成するものが主であったが、幾つかの菌では HIL(2*R*, 3*R*, 4*R*) の生成も見られ、特に IG 212 では HIL(2*R*, 3*R*, 4*S*) が特徴的に生成していた。一方 AMKP 還元酵素では HILDH の生成する HIL(2*S*, 3*R*, 4*S*) を例外として、全て 4*S* 体の水酸基を持つ HIL が生成しており、各酵素が厳密な立体選択性を持った還元反応を触媒することを明らかにできた (図 5)。

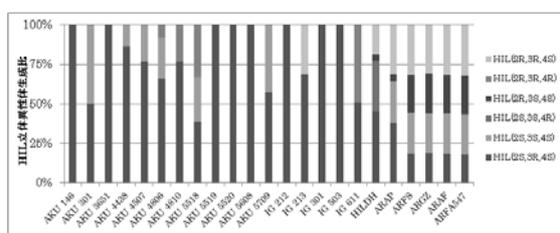


図 5. AMKP 還元活性菌及び AMKP 還元酵素の生成する HIL の立体異性体分析。

## 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 5 件)

- ① Hibi, M., T. Kawashima, T. Kodera, S.V. Smirnov, P.M. Sokolov, M. Sugiyama, S. Shimizu, K. Yokozeki, J. Ogawa, Characterization of *Bacillus thuringiensis* L-isoleucine dioxygenase toward the production of useful amino acids., Applied and Environmental Microbiology, Vol. 77, 2011, pp. 6926-6930, 査読有、DOI: 10.1128/AEM.05035-11
- ② 日比 慎、小川 順、アミノ酸水酸化触媒としての  $\alpha$ -ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ、バイオサイエンスとインダストリー、Vol. 69、2011、pp. 384-386、査読無
- ③ 小川 順、櫻谷英治、岸野重信、日比 慎、堀之内伸行、横関健三、清水 昌、代謝的視点からの機能探索に基づく産業プロセス用酵素開発、BIOINDUSTRY、Vol. 28、2011、pp. 7-13、査読無

- ④ Ogawa, J., T. Kodera, S.V. Smirnov, M. Hibi, N.N. Samsonova, R. Koyama, H. Yamanaka, J. Mano, T. Kawashima, K. Yokozeki, S. Shimizu, A novel l-isoleucine metabolism in *Bacillus thuringiensis* generating (2*S*, 3*R*, 4*S*)-4-hydroxyisoleucine, a potential insulinotropic and anti-obesity amino acid., Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 89, 2011, pp. 1929-1938, 査読有、DOI: 10.1007/s00253-010-2983-7
- ⑤ Smirnov, S.V., T. Kodera, N.N. Samsonova, V.A. Kotlyarova, N.Y. Rushkevich, A.D. Kivero, P.M. Sokolov, M. Hibi, J. Ogawa, S. Shimizu., Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce (2*S*, 3*R*, 4*S*)-4-hydroxyisoleucine., Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 88, 2011, pp. 719-726, 査読有、DOI: 10.1007/s00253-010-2772-3

[学会発表] (計 6 件)

- ① 日比 慎、清水 昌、横関健三、小川 順、*Bacillus thuringiensis* 2e2 株由来 Fe(II)/ $\alpha$ -ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼによる光学活性スルフォキシド生産、日本農芸化学会 2012 年度大会、3 月 25 日 (2012)、京都 (京都女子大学)
- ② 日比 慎、笠原拓也、河嶋隆志、横関健三、清水 昌、小川 順、アミノ基修飾酵素と水酸化酵素を共役させた  $\beta$ -ヒドロキシアミノ酸生産系の開発、日本農芸化学会 2012 年度大会、3 月 25 日 (2012)、京都 (京都女子大学)
- ③ Hibi M., Shimizu S., Yokozeki K., Ogawa J., Novel dioxygenases for hydroxy amino acid production., Biotrans 2011 (招待講演)、Oct. 4 (2011)、Sicilia, Italia
- ④ 日比 慎、河嶋隆志、清水 昌、横関健三、小川 順、 $\alpha$ -ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼを利用した有用アミノ酸の立体選択的生産、第 63 回 日本生物工学会大会 (2011)、9 月 26 日 (2011)、東京 (東京大学)
- ⑤ Hibi M., Shimizu S., Yokozeki K., Ogawa J.,  $\alpha$ -Ketoglutarate-dependent dioxygenase: Biocatalyst for useful amino acid production., The 16th Japanese-German Workshop on Enzyme Technology (招待講演)、Sept. 14 (2011)、富山 (富山国際会議場)
- ⑥ 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、3 月 26 日 (2011)、京都  
(京都女子大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 順 (OGAWA JUN)  
京都大学・農学研究科・教授  
研究者番号 : 70281102

(2) 研究分担者

日比 慎 (HIBI MAKOTO)  
京都大学・農学研究科・助教  
研究者番号 : 30432347

萩下大郎 (HAGISHITA TAIRO)  
京都大学・農学研究科・准教授  
研究者番号 : 20432346  
(平成 23 年 3 月まで)

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :