

特異二次代謝酵素の精密解析と人為制御による有用物質生産

Mechanistic Analysis and Engineering of Enzyme Systems in Secondary Metabolism

(研究プロジェクト番号：JSPS-RFTF 96I00302)

プロジェクトリーダー

柿沼 勝己 東京工業大学大学院理工学研究科・教授

コメンバ

海老塚 豊 東京大学大学院薬学系研究科・教授

斉藤 和季 千葉大学薬学部・教授

浅野 泰久 富山県立大学工学部・教授



I. 研究目的

摂取した食物から作られた私達の身体が巧妙に活動するように、微生物や植物の細胞は精巧且つ効率のよい、そして多彩な化学変換・物質合成能を持つ分子のアセンブリーラインである。人類は有史以来、生合成というこの仕組みで出来る物質を医薬や香料等々としてさまざまに利用している。細胞ではこの仕組みの設計情報は遺伝子に書かれ、それに従って作られた酵素という反応装置によって実際に原料から有用な物質が生産される。生合成装置は常温常圧のもと水の中で稼働し、エネルギー効率がよく不要の排出物を作らない優れた天然触媒である。本研究は、この天然触媒の仕組みを今まで以上に活用し、人類の智慧でこの仕組みを作り変え、優れた医薬や農薬、産業資源などの有用な物質を作る新しいアセンブリーラインを構築することを究極の目的として取り組んだ。そのため、(1)生合成の仕組みと触媒の詳細な化学的解明、(2)遺伝子情報の解読とそれによる酵素触媒の量的確保、(3)遺伝子作り換えによる触媒の改変、等々を相互に行き来・融合しながら、(4)酵素の合理的改変指針の確立と新たな物質生産法の構築への展開、等を中心に研究を進めた。

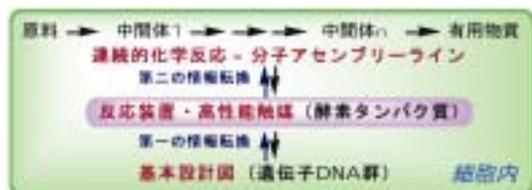


図1 細胞内二次代謝の設計図・反応装置・分子アセンブリーライン

II. 研究成果の概要

多様性に富む有用物質生産のアセンブリーラインとして、抗生物質の生合成系、イソプレノイド生合成系、アルカロイド生合成系、アミノ酸及び含窒素化合物の生産系を取り上げた。先ず関与する生合成反応と酵素系を機器分析等を駆使して有機化学レベルで精密に分子解析した。次いで酵素遺伝子を探索し、酵素及び遺伝子資源として蓄積した。さらにこれら遺伝子群を同種・異種生物によって高度に発現させて酵素を取得するとともに、遺伝子改変やキメラ化を検討した。これらにより二次代謝・特異代謝系の自然界での設計原理を明らかにし、「生合成工学」という新しい有用物質生産技術の構築を目指した。

1. 抗生物質生合成系では、(1)臨床医学上重要な古典

抗生物質の生合成遺伝子が欧米で続々と同定される中、デオキシストレプトアミン含有抗生物質の生合成遺伝子群及び遺伝子機能を初めて明らかにし；(2)固形ガンに有効な抗腫瘍抗生物質ピセニスタチンの生合成反応過程を解明し、生合成遺伝子をほぼ解読した；(3)ベンゾイソクロマンキノン系抗生物質生合成の逐次反応について各酵素遺伝子を同定した；さらに(4)これらにより解明した遺伝子から酵素タンパク質を生産して活用する研究を行い、糖質環化酵素を使ってベンゼン系工業資源であるカテコールの合成法(図2の新酵素 DOIS)を開発して、再生可能資源としての炭素循環系の完結に新たな方法を提案した。

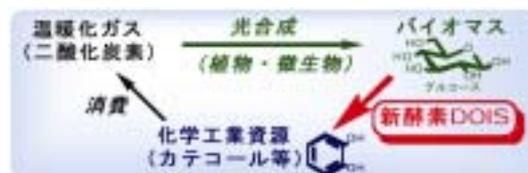


図2 炭素資源循環の完結

2. 地球上で最も多様性に富むといわれるイソプレノイド生合成系では、まず(1)生薬成分を作り出す酵素として30種以上のトリテルペン合成酵素遺伝子を各種植物から同定し；(2)部位特異的に点変異させ、またキメラ酵素を創成して反応機構を解明；さらに(3)これにより酵素タンパク質中のアミノ酸残基を一つだけ変異すると違う生成物が出来ることを初めて発見した；一方、(4)三重に遺伝子組み換えした大腸菌で完全重水素化メバロン酸から高々度に重水素化したβ-カロチンなどのカロテノイドを生産することが出来た。これは多方面の研究に有用なツールである。

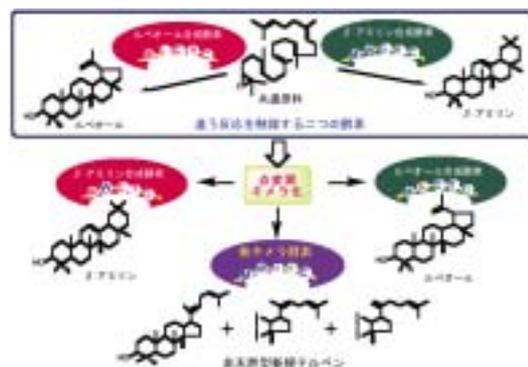


図3 点変異・キメラ酵素による新物質生合成

3. 生体色素の生合成系では、(1)カビの孢子色素及びメラニン生合成に関わるポリケチド合成酵素遺伝子の同定と新しい反応系を発見し；(2)化学成分の変種である赤ジソと青ジソにより色素生合成酵素及びその遺伝子を同定して他植物との比較に展開し；さらに(3)フラボノイドの生合成酵素遺伝子の解析とその制御の仕組みを解明した。
4. アルカロイド生合成系では、チャボイナモリの毛状根の生合成系を工夫し、図4のような培養により抗腫瘍物質カンプトテシンの効率的生産法を開発した。



図4 チャボイナモリ毛状根培養による抗腫瘍性カンプトテシンの生産

5. アミノ酸及び含窒素代謝物の生合成酵素として、(1)植物のセリンアセチル転移酵素、システイン合成酵素の遺伝子を解明し、その制御機構を明らかとし；(2)化学的極限条件に曝した微生物からオピン脱水素酵素を単離し、その遺伝子の解明と酵素を結晶化して構造解析を行い(図5) さらに点変異酵素を作り出して反応機構の詳細を解明した；さらに(3)同様のアプローチでアルドキシムデヒドラターゼとその遺伝子を初めて解明し、酵素による効率的なニトリル合成法の構築に成功した。

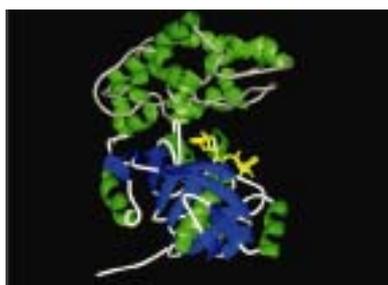


図5 化学的極限細菌のオピン脱水素酵素の構造

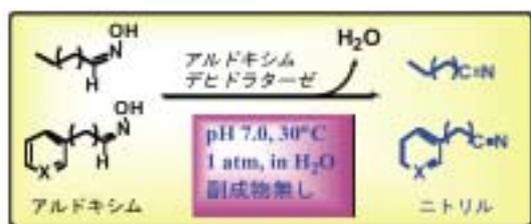


図6 アルドキシムデヒドラターゼによるニトリルの製法

生合成工学の一翼を担う資源として非常に重要であり、今後医薬品等の有用物質生産系の開発に貢献すると期待され、食品工業、化粧品、農薬など関連分野の産業へもいろいろの波及効果があると考えられる。また飛躍思考を基盤に、従来は石油製品と考えられてきたニトリル化合物やベンゼン系化合物を糖質資源から特異代謝酵素を用いて合成する、ユニークな可能性を提案したが、これは今後枯渇が危惧される化石資源に代わる持続型の再生可能資源の確保の観点に新たな展望をもたらすものと考えられる。

IV. まとめ

(1)潜在力を秘めた新しい物質生産系として、抗生物質生合成系をはじめとする微生物及び植物の二次代謝・特異代謝の酵素系を検討し、逐次反応過程及び酵素について化学的に精密解析を行い、新しい反応系を見出すと共に、未開拓の新規酵素遺伝子の取得、それらの機能解析、さらに異種生物による発現などを行い、有用物質生産への展開に向けた方向性を示し、重要な基盤を構築した。その上、(2)トリテルペノイド環化酵素の点変異及びキメラ酵素により非天然型物質の創出とその設計要素を明らかにし、(3)酵素反応系による糖質からカテコールの短工程合成法を開拓するとともに、(4)抗腫瘍性カンプトテシンの高生産系の確立と、(5)新酵素アルドキシム脱水素酵素の発見など、多くの成果を挙げることが出来た。

主な発表論文

- Mami Yamazaki *et al.* Molecular cloning and biochemical characterization of a novel anthocyanin 5-O-glucosyltransferase by mRNA differential display for plant forms regarding anthocyanin. *J. Biol. Chem.* **274** [11], 7405-7411 (1999).
- Katsumi Kakinuma *et al.* An expeditious chemo- enzymatic route from glucose to catechol by the use of 2-deoxy-scylo-inosose synthase. *Tetrahedron Lett.*, **41** [12], 1935-1938 (2000).
- Yasumasa Ota *et al.* Butirosin-biosynthetic gene cluster from *Bacillus circulans*. *J. Antibiot.* **53** [10], 1158- 1167 (2000).
- Tetsuo Kushiro *et al.* Mutational studies on triterpene synthases: Engineering lupeol synthase into β -amyrin synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **122** [29], 6816-6824 (2000).
- Yasuo Kato *et al.* Novel heme-containing lyase, phenylacetaldoxime dehydratase from *Bacillus* sp. Strain OxB-1: Purification, characterization, and molecular cloning of the gene. *Biochemistry*, **39** [4], 800-809 (2000).
- Isao Fujii *et al.* Identification of Claisen cyclase domain in fungal polyketide synthase WA, a naphthopyrone synthase of *Aspergillus nidulans*. *Chem. & Biol.* **8** [2], 189-197 (2001).
- Katsumi Kakinuma *et al.* New approach to multiply deuterated isoprenoids using triply engineered *Escherichia coli* and its potential for mechanistic enzymology. *J. Am. Chem. Soc.* **123** [6], 1238-1239 (2001).

III. 今後の展望

本研究で得られたさまざまな生合成酵素及び酵素遺伝子、並びにそれらの機能改変酵素遺伝子は、