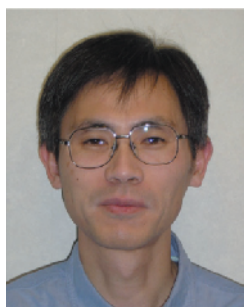


生物学的手法を用いた光学活性非天然型アミノ酸ライブラリー構築法の開発



澤井俊哉 (1)



駒大輔 (2)

橋本絢子 (3)

(1) 早稲田大学チーム (2),(3) NITE

研究目的

化合物多様性 (Chemical Diversity) は、新規機能物質創製の産業技術基盤となる。有機化合物を得るには化学合成法が主流になっているが、位置選択性や立体特異性を制御できる生物反応の特徴を利用しつつそこに新たな技術を導入することで、多様な化合物を精密かつ効率的に合成することが可能となり、多彩な化合物ライブラリーを整備することができる。

アミノ酸は分子内にアミノ基とカルボキシル基を持つために反応性が高く、医薬品合成における重要な原料として利用されている。なかでも、非天然型アミノ酸 (生体内でタンパク質を構成する20種類のアミノ酸以外のものの総称とする) を部分構造に持つ医薬品は、天然型アミノ酸を用いた場合では得られない効果を発現することがあるため、非天然型アミノ酸含有医薬品は増加傾向にある。また、非天然型アミノ酸を有するオリゴペプチドには特異な生理活性を有するものが多いことから、医薬品開発への非天然型アミノ酸導入の有用性がうかがえる。実際に、エイズプロテアーゼの阻害剤や整腸剤など、非天然型アミノ酸を利用したさまざまな医薬品が開発されている。

非天然型アミノ酸を医薬品原料として使用するには、その光学純度の高さが重要であるため、生体触媒を用いる合成法は極めて有効である。その代表的な方法として、 α -アミノ酸アミノトランスフェラーゼを用いる方法が挙げられる (Fig.1)。 α -アミノ酸アミノトランスフェラーゼは α -ケト酸のカルボニル基にアミノ基を転移させ、 α -ケト酸を対応するアミノ酸に変換する酵素である。本酵素を用いることにより、光学活性を持たない α -ケト酸から、光学純度がほぼ100%の非天然型アミノ酸を合成することが可能である。本法の特徴は、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼとD-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを使い分けることにより、一つの原材料から選択的にL体とD体の両方の非天然型アミノ酸を合成できることである。また、アミノトランスフェラーゼの基質特異性が比較的低いことも非天然型アミノ酸を合成する上で有利な点であると考えている。原料となる非天然型 α -ケト酸の効率的な化学合成法が共同研究チームである早稲田大学清水功雄研究室で開発されているため、基質特異性の異なるさまざまな酵素を使いわけて用いることで、任意にデザインした多種多様な非天然型アミノ酸を効率的に合成することが可能となる。

本研究では、生合成ルート上にはない多様な α -ケト酸を化学合成し、アミノ酸アミノトランスフェラーゼを作用させて目的の非天然型アミノ酸を効率的に合成する手法の開発を検討した。より具体的には、NITEが有する微生物遺伝資源ライブラリーの中から、これらの反応に適した生体触媒を探索し、医薬品などの機能性物質創製のために有用な光学活性非天然型アミノ酸の化合物ライブラリーを構築する方法を確立した。

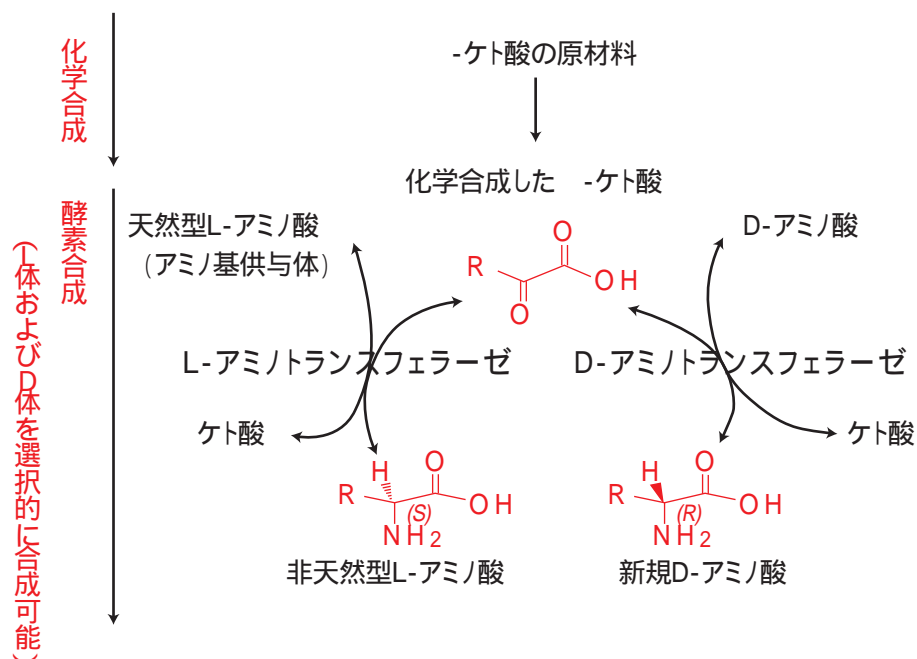


Fig.1 化学酵素合成法を用いた非天然型アミノ酸の合成スキーム

研究結果

1. α -アミノ酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子ライブラリーの構築

ゲノム解析の行われた15種類の微生物より、遺伝子情報に基づいて、104種類の α -アミノ酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子が大腸菌にクローニングした。工業的な利用も視野に入れ、好熱性菌を中心に遺伝子のクローニングを行った。また、アミノトランスフェラーゼは、その一次構造に基づいて ~ までの5つのクラスに分類されるが、本研究では各クラスの遺伝子を洩れなくクローニングした。

2. α -アミノ酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子の大腸菌での発現(酵素ライブラリーの構築)

pETシステムを用いて、各アミノトランスフェラーゼ遺伝子が大腸菌Rosetta株で発現させた。好熱性菌の遺伝子は大腸菌では封入体を形成するケースが多いことが知られており、それを改善するために、本研究では遺伝子発現時に大腸菌の培養温度を工夫することで、好熱性菌由来の遺伝子を効率的に発現させる手法を開発した(特願2005-58193、農芸化学会2004年度大会要旨集)。大腸菌Rosetta株の生育限界温度付近となる46℃で遺伝子を発現させた場合に、89種類の好熱性菌由来遺伝子のうち18種類が可溶性タンパク質として発現しやすくなった (Fig.2)。

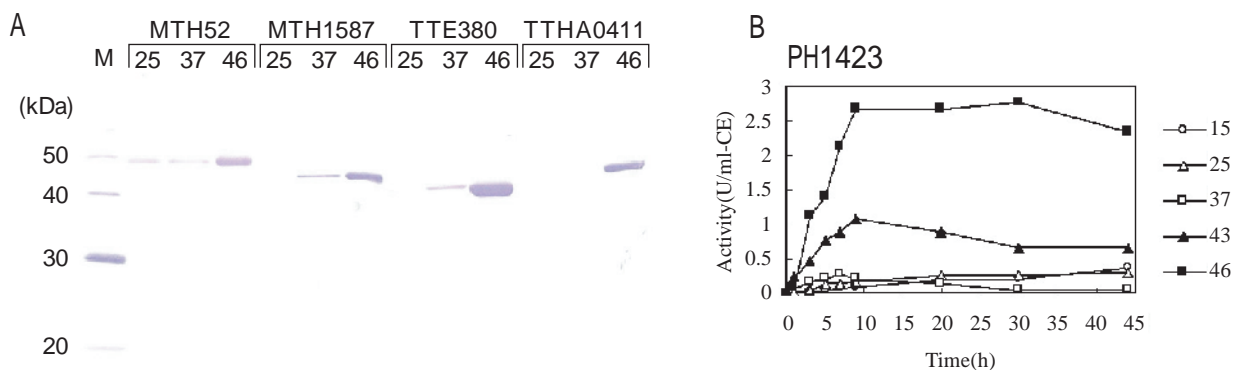


Fig.2 培養温度に依存した好熱性菌由来遺伝子の発現のSDS-PAGE解析(A)と活性測定 (B)

3. 酵素のキャラクタリゼーション(酵素カタログ作成)

大腸菌で可溶性タンパク質として発現したアミノトランスフェラーゼの活性を測定した。2-オキソグルタル酸をアミノ基アクセプター、さまざまな天然型アミノ酸をアミノ基ドナーとして、グルタミン酸を生成する反応活性を測定することで評価を行った。この評価系において十分な活性(10U/mg)を有する酵素 39 種類について、それぞれ基質特異性、反応温度およびpHの至適値を求めて、カタログ化した。

基質特異性の解析の過程で、いくつかの酵素が疎水性アミノ酸全般に対して非常に高い活性を有していた(Fig.3)。これらはクラス に属する酵素であったが、系統樹上では、本クラスの代表的な酵素であるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼや芳香族アミノ酸アミノトランスフェラーゼとは別のクラスターを形成した。また、クラス やクラス に属する酵素からも、従来とは基質特異性の大きく異なる酵素を発見した(生物工学会2005年度大会要旨集)。例えば*Sulfolobus*由来のST1217はクラス に属する酵素であるが、多種類の疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸を認識する全く新しいタイプの酵素であった。

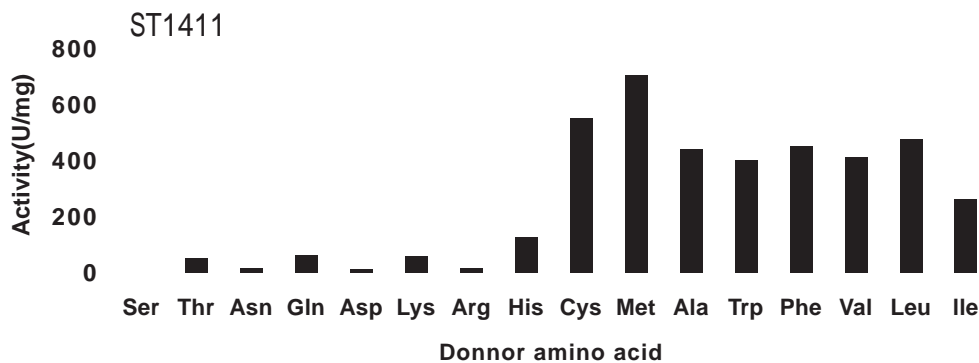


Fig.3 疎水性アミノ酸全般に対して高活性を有する広基質特異性アミノトランスフェラーゼ

4. α -アミノ酸アミノトランスフェラーゼのスクリーニングシステムの構築

本研究で構築した酵素ライブラリーから、任意の非天然型アミノ酸を合成可能な酵素をハイスクリーンアップにスクリーニングできるシステムの構築を検討し、Fig.4に示す呈色反応系を考案した。このスクリーニングシステムの特徴は、 α -アミノ酸アミノトランスフェラーゼが非天然型アミノ酸に対して活性を有する場合には、NAD(P)Hが生成し、最終的にテトラゾリウムを還元して呈色性のあるホルマザンを生じることである。本反応系に適した酵素をゲノム解析終了株から探索し、10種類の α -アミノ酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子と14種類のアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子が大腸菌にクローニングし、発現させた。これらの中から目的の活性を有するもの選別し、酵素の基質特異性、至適温度、至適pH、および反応阻害の程度を解析し、さらにカイネティクスパラメーターの測定を実施して最適な酵素を組み合わせた。その結果、呈色反応により活性測定も可能なハイスクリーンアップスクリーニングシステムの構築に成功した(特願2005-58194、農芸化学会2004年度大会要旨集、生物工学会2005年度大会要旨集)。

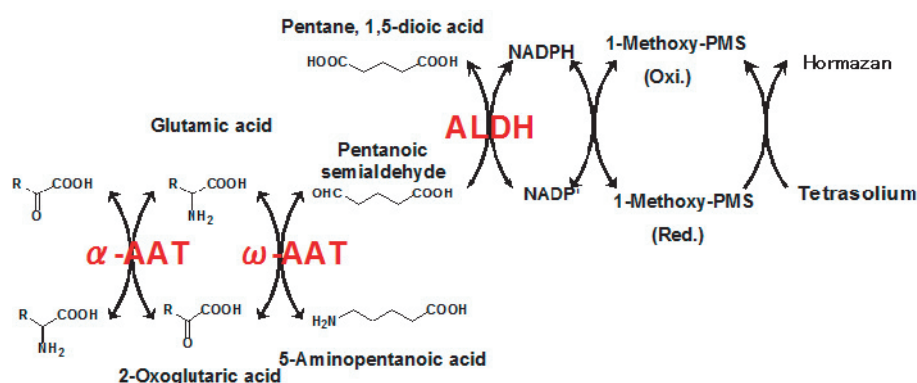


Fig.4 スクリーニングシステムの反応スキーム

5. 非天然型アミノ酸ライブラリーの構築

構築した酵素ライブラリーとスクリーニングシステムを用いて、フェニルグリシン誘導体に属する非天然型アミノ酸合成に有用な酵素の探索を行い、非天然型アミノ酸ライブラリーの構築と中規模スケールでの合成を実施した。34種類の非天然型ケト酸から29種類の非天然型アミノ酸が合成可能であった。7種類の非天然型アミノ酸については数百mg単位で合成し、精製して純度検定等を行った。

今回確立した画期的な技術を用いて、任意の非天然型アミノ酸を合成できる酵素の迅速な探索が可能となった。また、多彩な化合物ライブラリーの構築も可能となり、これらを原料とする医薬品候補化合物の創製など、ダウンストリーム研究の進展に大きく貢献するものと考えている。



木野 邦器

工学博士、早稲田大学理工学部教授