微生物のアスパラギン酸誘導体変換酵素に関する新たな展開

和田 大

北海道大学大学院農学研究科

アミノ酸変換酵素, 特にラセマーゼ, トランスフェラーゼ, β -リアーゼなどのピリドキサルリン酸 (PLP) 依存性酵素には長い研究の歴史がある。アミノ酸は生命に必須な物質であるため, PLP 依存性酵素も古細菌から高等動物に至るすべての生物に存在している。それだけに, 反応機構や立体構造に関しても多くのデータが蓄積され, もはや「やり尽くされた」感がある。実際, 新規な酵素の報告も最近では少なくなっている。

しかし, タンパク質を構成している20種類のアミノ酸以外のアミノ酸を変換する酵素に注目すると, まだまだ研究の進んでいないものも多い。たとえばアスパラギン酸誘導体である3-ヒドロキシアスパラギン酸に作用する微生物酵素については, 1960年代

に2つの酵素, ヒドロキシアスパラギン酸デヒドラターゼ⁽¹⁾とヒドロキシアスパラギン酸アルドラーゼ⁽²⁾が報告されている。両酵素ともグリオキシル酸を単一炭素源として *Micrococcus denitrificans* を培養するという特殊な条件で誘導される。これら2種の酵素は, EC 番号が付与されているものの完全精製の報告はなく, コードする遺伝子も単離されていなかった。3-ヒドロキシアスパラギン酸はアスパラギン酸の-OH アナログであり, 天然界ではペプチド性抗生物質の構成成分などとして見いだされる。図1に示すように分子中に2個の不斉炭素有し, 4つの光学異性体が存在する。

最近, *Paracoccus denitrificans* (*Micrococcus denitrificans* より改名) IFO13301 株からヒドロキシア

パラギン酸アルドラーゼが精製され, 遺伝子がクローニングされた⁽³⁾。本酵素は分子量43,000であり, D体のヒドロキシアスパラギン酸に作用する(図1(a))。しかし, D-スレオ体とD-エリスロ体の区別はできない。ヒドロキシアスパラギン酸以外に, スレオニン, フェニルセリンなどの β -ヒドロキシアミノ酸のD体も基質となる。また, Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} などの2価金属で活性化される。本酵素をコードするDNAは1,161 bpからなり, D-スレオニンアルドラーゼやD-セリンデヒドラターゼと相同性を示す。

また, ヒドロキシアスパラギン酸デヒドラターゼについても, 最近筆者らによって再発見されている⁽⁴⁾。ヒドロキシアスパラギン酸を単一炭素源として, 新たにスクリーニングした土壌細

図1 ■ 微生物に見いだされた各種アスパラギン酸誘導体変換酵素

(a) D-3-ヒドロキシアスパラギン酸アルドラーゼ, (b) L-スレオ-3-ヒドロキシアスパラギン酸デヒドラターゼ, (c) L-スレオ-3-クロロアスパラギン酸リアーゼ, (d) メチルアスパルターゼ

菌 *Pseudomonas* sp. T62 より、ヒドロキシアスパラギン酸デヒドラターゼが電気泳動的にほぼ均一に精製された。本酵素はヒドロキシアスパラギン酸を単一炭素源として培養した場合に誘導され、グリオキシル酸単一炭素源という条件は必要としない。分子量は SDS-PAGE 上で約 39,000 であり、L-スレオ体のヒドロキシアスパラギン酸に特異的に作用し、エリスロ体のヒドロキシアスパラギン酸やスレオニン、セリンなどは基質とならない(図 1(b))。本酵素も Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} などの 2 価金属で活性化される。遺伝子はクローニングされていない。ヒドロキシアスパラギン酸アルドラーゼ、ヒドロキシアスパラギン酸デヒドラターゼともに PLP 依存型酵素である。

本酵素の N 末端アミノ酸配列は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のアミノトランスフェラーゼと推定される (putative aminotransferase) YKL218c 遺伝子産物の N 末端部分と有意な相同性を示すことから、真核生物である *S. cerevisiae* にもヒドロキシアスパラギン酸デヒドラターゼの存在する可能性が示された。そこで、データベース情報をもとに *S. cerevisiae* のゲノムから PCR で YKL218c を釣りに上げて大腸菌内で強制的に発現させたところ、YKL218c 遺伝子産物は、大腸菌内で不溶化しやすい傾向があり、通常の 37°C で培養すると、大腸菌細胞抽出液にはごく低い活性しか認められなかったが、18°C にすると高いヒドロキシアスパラギン酸デヒドラターゼ活性が検出された。

S. cerevisiae の酵素は分子量約 39,500 であり、やはり L-スレオ体のヒドロキシアスパラギン酸に特異的である⁽⁶⁾。*Pseudomonas* 属細菌だけでなく *S. cerevisiae* にもヒドロキシア

スパラギン酸分解酵素が存在している理由は何か？ 環境中で微生物がヒドロキシアスパラギン酸に出会う確率は、我々が考えているよりも高いのかもしれない。

S. cerevisiae に見いだされた酵素に関しては、YKL218c 遺伝子の破壊実験も行なわれ⁽⁵⁾、破壊株はヒドロキシアスパラギン酸により生育が阻害された。生育阻害は培地へのアスパラギン酸の添加で回復することから、*S. cerevisiae* 内ではヒドロキシアスパラギン酸はアスパラギン酸のアナログとして作用し毒性を発揮するものと考えられる。以前、本酵素はその一次構造の相同性から、セリンラセマーゼではないかと考えられていたが、活性は検出されず、現在ではデータベースからもセリンラセマーゼホモログのアノテーションは削除されている。一次構造だけからのアノテーションの不正確さ、また基質特異性の予想の難しさを示す一例ではないだろうか。これら 2 つの酵素では残念ながら逆反応は進行せず、光学活性なアスパラギン酸誘導体の合成に直接利用することは難しい。また、クロロアスパラギン酸に作用して、 β -脱離を触媒する PLP 依存型酵素も報告されており⁽⁶⁾ (図 1(c))、ヒドロキシアスパラギン酸デヒドラターゼと類似の酵素と考えられる。

一方、グルタミン酸の嫌気代謝中間体であるメチルアスパラギン酸を分解するメチルアスパルターゼに関しては、以前は絶対嫌気性の *Clostridium* 属細菌にしか存在が報告されていなかったが、最近、通性嫌気性菌である *Citrobacter* にもその存在が見いだされ⁽⁷⁾ (図 1(d))、一次構造のみならず X 線結晶構造解析も行なわれ、反応機構も推定されている⁽⁸⁾。反応様式は

PLP 依存型 β -リアーゼとは異なり、補酵素も要求しない。メサコン酸からの逆反応も進行するので、光学活性な各種アスパラギン酸誘導体の合成に利用できる。二重結合への立体選択的な付加反応で一気に 2 個の不斉中心を導入できるので、物質生産の観点から有用な酵素である。

*

研究の歴史の長いアミノ酸変換酵素であるが、このように一般的なアミノ酸にこだわらずに探索すれば、まだユニークな酵素も存在すると思われる。またパイオインフォマティクスの発達した現在でも、酵素のアミノ酸配列からその基質特異性を正確に予想するのは難しい。データベース中に大量に登録されている“putative aminotransferase”の中にも、新規な反応を触媒する酵素がまだ存在するのではないだろうか。

- 1) R.G. Gibbs & J.G. Morris : *Biochim. Biophys. Acta*, **85**, 501 (1964).
- 2) R.G. Gibbs & J.G. Morris : *Biochem. J.*, **97**, 547 (1965).
- 3) J.Q. Liu, T. Dairi, N. Itoh, M. Kataoka & S. Shimizu : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **62**, 53 (2003)
- 4) M. Wada, T. Matsumoto, S. Nakamori, M. Sakamoto, M. Kataoka, J. Q. Liu, N. Itoh, H. Yamada & S. Shimizu : *FEMS Microbiol. Lett.*, **179**, 147 (1999).
- 5) M. Wada, S. Nakamori & H. Takagi : *FEMS Microbiol. Lett.*, **225**, 189 (2003).
- 6) Y. Kato & Y. Asano : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 435 (2001).
- 7) Y. Kato & Y. Asano : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 468 (1998).
- 8) C.W. Levy, P.A. Buckley, S. Sedelnikova, Y. Kato, Y. Asano, D.W. Rice, & P.J. Baker : *Structure*, **10**, 105 (2002).