位置および立体選択的プロリン水酸化酵素の開発とその応用

柴 崎 剛*・森 英 郎*・尾 崎 明 夫*

Development of the Regio- and Stereospecific Proline Hydroxylases and Their Application

Takeshi SHIBASAKI*, Hidero MORI* and Akio OZAKI*

This article describes microbial proline hydroxylases which carry out regio- and stereospecific hydroxylation of free L-proline and their application to the enzymatic synthesis of hydroxyprolines and related compounds. Proline 4-hydroxylase activities were detected in 8 actinomycetes strains, and proline 3-hydroxylase activities were detected in 3 actinomycetes and 2 *Bacillus* strains. Both enzymes were purified and characterized. The enzymes required 2-oxoglutarate and Fe^{2+} for the reaction. Proline 4-hydroxylase hydroxylated L-proline in a regio- and stereospecific manner at C-4 to form *trans*-4-hydroxy-L-proline, while 3-hydroxylase hydroxylated C-3 of L-proline to form *cis*-3-hydroxy-L-proline. Efficient biotransformation systems of L-proline to *trans*-4-hydroxy-L-proline or *cis*-3-hydroxy-L-proline were established using recombinant DNA technology. Both of the enzymes hydroxylated L-2-azetidine carboxylate, 3,4-dehydro-L-proline and L-pipecolate in a regio- and stereospecific manner, however, D-proline, N-substituted L-proline, L-proline ester and peptidyl L-proline do not react as substrates for either 4- or 3-hydroxylases.

Key words: Proline 4-hydroxylase, Proline 3-hydroxylase, 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenases, *trans*-4-Hydroxy-L-proline, *cis*-3-Hydroxy-L-proline, Biotransformation, Enzymatic synthesis, Regio- and stereospecific hydroxylation

はじめに

ヒドロキシプロリンは、2つの光学活性中心を持つことを大きな特徴とする環状アミノ酸であり、理論的にはカルボン酸(C-2)の立体および水酸基の位置(C-3およびC-4)と立体の相違により、1から8の8種の異性体の存在が可能である(図1)。*trans*-4-L体1(*trans*-4-hydroxy-L-proline)が自然界に著量存在している他、*trans*-4-D体(4)、*trans*-3-D体(7)、*cis*-3-D体(8)の3種の異性体を除く合計5種の異性体の自然界での存在が確認されているが、*trans*-4-L体1以外の異性体は極めて微量にしか存在しない。*trans*-4-L体1は必須アミノ酸

Fig.1 Regio- and stereoisomers of hydroxyprolines.

ではないが、動植物界に糖蛋白やコラーゲンなどの構成成分として広く存在している¹⁾。微生物界においても、アクチノマイシン(actinomycin)²⁾、エタマイシン(etamycin)³⁾、テロマイシン(telomycin)⁴⁾、エチノカンジン(etinocandin)⁵⁾等々いくつかのペプチド系二次代謝産

* 協和発酵工業株式会社 東京研究所
()

* Tokyo Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd. ()

Fig. 2 Synthetic pharmaceuticals using hydroxyproline as chiral building block.

物の構成成分としてヒドロキシプロリン類が存在することが報告されている。

2つの光学活性中心を持つことを利用することにより、*trans*-4-L体1を出発原料として、ピロリジン環のすべての位置に比較的容易に置換基を導入することが可能であることが知られており、様々な光学活性プロリン誘導体、ピロリジン誘導体の合成が可能である⁶⁾。このため *trans*-4-L体1は、キラルな合成原料として、消炎剤(*N*-Acetylhydroxyproline)やカルバペネム系抗生物質(Carbenin, Melopenem等)、血圧降下剤(Spirapril, Fosinopril等)等の医薬品(図2)の製造などに用いられている他、抗喘息薬、血液凝固阻止剤等々現在開発中の種々の薬剤の合成原料として用いられている。一方、*trans*-4-L体1は、それ自身が保湿性や呈味性等の機能を有することから、保湿剤として化粧品などにも用いられているほか、将来的には食品分野への応用可能性も指摘されている。

ヒドロキシプロリン類の化学合成に関しては Eguchi⁷⁾がD-グルタミン酸から8段階の反応で、Takano⁸⁾が(S)-O-benzylglycidolから10段階の反応でいずれも1の合成を、Roemmeleら⁹⁾はL-セリンから7段階の反応で *cis*-3-D体(8)の合成を報告するなど幾つか知られているが、工業的な合成法は知られていない。一方、ヒドロキシプロリン類は他のアミノ酸と異なり、微生物中では一般的には生合成されないため、発酵生産することも困難であった。このような背景から、工業的にはこれまで、*trans*-4-L体1を10-15%当量含有する動物由来のコラーゲンの酸加水分解物からの抽出精製によって生産されてきたが、精製操作が複雑で生産性が低い、製造過程で大量の廃液を発生する、原料の安定供給に限界がある、狂牛病を契機とした動物組織を原料

とする製品の安全性への懸念等々の理由から、コラーゲンからの抽出法に代わる方法が求められていた。

我々は、発酵法によって工業生産されているL-プロリンに着目し、酵素を用いてL-プロリンの4位を立体特異的に水酸化することが可能になれば、*trans*-4-L体1の工業的製造方法となる可能性があると考え、検討を行った。

1. ヒドロキシプロリンの生合成

L-プロリンから *trans*-4-L体1を生成するには、遊離のL-プロリンを、位置および立体選択的に水酸化するプロリン水酸化酵素が必要とされる。

ヒドロキシプロリン類の生合成に関しては、動物コラーゲン生合成において詳細に検討されており^{10,11)}、2-オキソグルタル酸依存性ジオキソゲナーゼの1つである prolyl 4-hydroxylase(EC 1.14.11.2)によりペプチド中のL-プロリンが水酸化され *trans*-4-L体1が生成することが知られている。しかし本酵素は、ペプチド中、X-Pro-Gly配列を有するL-プロリンのみを基質として認識し、遊離のL-プロリンは基質としない。一方微生物ではエタマイシン生産性放線菌の一菌株(*Streptomyces griseoviridis* P-8648)で、遊離のL-プロリンが水酸化され *trans*-4-L体1が生成すると言われていたが、極めて微弱な粗酵素活性の存在が示唆されているのみで、その酵素的実体は確認されていなかった¹²⁾。

2. 位置および立体選択的プロリン水酸化酵素の探索

そこで、位置および立体選択的プロリン水酸化酵素を見いだすべく、微生物からの探索を開始した。

2.1. ヒドロキシプロリン分析法の開発

これまでで唯一のL-プロリン水酸化酵素活性の報告例では¹²⁾、活性が微弱でその検出は¹³Cラベル化合物を用いて行われており、また反応産物の異性体構造の区別をつけることができないものであった。そこで、探索を行うに当たり、放射性化合物を用いることなくヒドロキシプロリン類を特異的かつ高感度に、しかもすべての異性体構造が識別可能な簡便な検出方法について検討した。

近年、高速液体クロマトグラフィーにおける光学分割カラムの発達には著しいものがあり、アミノ酸類の光学分割においては、配位子交換型カラムを用いることでDL分離が可能である。そこで種々の入手可能なカラムについてヒドロキシプロリンおよびプロリンの立体異性体の分離検討を行ったところ、SUMICHIRAL OA-5000(住化分析センター)を用いるとすべての立体異性体の分離が可能であることが判明した。しかし通常溶出には硫酸銅溶液を用いるため検出方法に限界があり、特に、高

Fig. 3 Chiral resolution of 4-hydroxyproline and proline.

Stereoisomers of 4-hydroxyproline and proline were separated through HPLC equipped with SUMICHIRAL OA-5000 and were detected by post-column derivatization with NBD¹⁴⁾.

1. *trans*-4-hydroxy-L-proline, 2. *cis*-4-hydroxy-D-proline, 3. L-proline, 4. *cis*-4-hydroxy-L-proline, 5. D-proline.

感度かつ特異的な検出方法であるイミノ酸特異的な誘導体化試薬を用いた検出は、アルカリ条件での反応を必要とするため適用することができなかった。

そこで検出方法について検討した結果、光学分割カラムで異性体を分離溶出した後、EDTA存在下7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole(NBD)¹³⁾を用いてポストカラム誘導体化し、その反応産物を蛍光検出することで、ピコモル量のヒドロキシプロリンおよびプロリンのすべての立体異性体を、特異的かつ簡便に検出することが可能となった(図3)¹⁴⁾。

2.2. プロリン水酸化酵素の探索

確立した立体異性体の特異的分析方法を用いて、プロリン水酸化酵素のスクリーニングを行った。菌株の分離方法に種々工夫を加えながら、様々な土壌から菌株分離を行い、静止菌体反応によってプロリン水酸化酵素活性を測定した。3000株以上にも及ぶ菌株について検討した結果、粗酵素活性が報告されているエタマイシン生産性の*S. griseoviridis* P-8648¹²⁾の他7株の*Dactylosporangium*属、*Amycolatopsis*属および*Streptomyces*属放線菌に新たにプロリン4位水酸化酵素活性を見いだすことができた(表1)。さらにスクリーニングの過程で、幾つかの菌株において目的とする*trans*-4-L体1とは異なる反応産物が観察された。この反応産物は新規なプロリン誘導体と推定されたことから、反応産物を単離精製し構造確認を行った結果、*cis*-3-L体5であることが判明した。L-プロリンから*cis*-3-L体5を生成するこのような活性はこれまで全く報告されておらず、L-プロリンの3位を立体選択的に水酸化する新規な水酸化酵素(L-プロ

Table 1 Results of the screening of proline hydroxylases.

strain	cellular activity (U/g cell) ⁽¹⁾	specific activity (U/mg protein) ⁽¹⁾
4-hydroxylases		
<i>Dactylosporangium</i> sp. RH1	28.0	2.32
<i>Dactylosporangium</i> sp. RH3	21.5	0.22
<i>Dactylosporangium</i> sp. RH4	4.0	-
<i>Amycolatopsis</i> sp. RH2	7.0	-
<i>Amycolatopsis</i> sp. RH5	3.0	-
<i>S. griseoviridis</i> RH6	20.0	0.86
<i>S. daghestanicus</i> RH7 (2)	9.0	0.14
<i>S. griseoviridis</i> P-8648 (2)	22.0	1.63
3-hydroxylases		
<i>Streptomyces</i> sp. TH1	101.6	1.19
<i>Bacillus</i> sp. TH2	72.7	1.47
<i>Bacillus</i> sp. TH3	84.1	1.32
<i>S. canus</i> TH4 & TH5 (3)	30.6	0.29

(1) 1U = 1 nmole/min

(2) Etamycin producers

(3) Telomycin producers

リン3位水酸化酵素)が存在することが示唆された¹⁵⁾。本活性は *cis*-3-L 体 5 を含有するペプチド抗生物質テロマイシン(telomycin)⁴⁾生産菌である *S. canus* を始めとする *Streptomyces* 属菌株および *Bacillus* 属菌株計 5 株で見いだされた(表 1)。

3. プロリン水酸化酵素の性質

スクリーニングで見いだされたプロリン水酸化酵素活性はいずれも極めて微弱で、そのままでは工業生産に用いることはできない。そこで酵素の性質を明らかにすると同時に遺伝子クローニングによる活性強化を目的に、4 位水酸化酵素を *Dactylosporangium* sp. RH1 株より、3 位水酸化酵素を *Streptomyces* sp. TH1 株より精製し、その性質を検討した(表 2)。

その結果、両酵素とも反応に 2-オキソグルタル酸を基質として必要とし、2 価鉄イオンを補因子として要求する 2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼであることが判明した(図 4)。反応の位置および立体選択性は厳密で、4 位水酸化酵素は L-プロリンの 4 位を水酸化して *trans*-4-L 体 1 を、3 位水酸化酵素は L-プロリンの 3 位を水酸化して *cis*-3-L 体 5 を生成し、他の異性体は観察されなかった。両酵素ともに、遊離の L-プロリンのみを基質とし、D-プロリンやコラーゲン生成において

Fig. 4 Enzymatic reactions of proline 4-hydroxylase and 3-hydroxylase.

prolyl 4-hydroxylase が基質とする X-Pro-Gly 配列などのペプチド状プロリンは基質とはしなかった。また種々の N 置換プロリン、カルボン酸エステルなども基質とはならないことが判明した。

一方本研究とはほぼ同時期に、J. E. Baldwin らのグループにより、*S. griseoviridis* P-8648 株の L-プロリン 4 位水酸化酵素について報告されている¹⁶⁾。報告された精製酵素の比活性が 0.907 nmol/min/mg 蛋白質であるのに対し、筆者らが同株で測定した粗酵素活性が 1.63 nmol/min/mg 蛋白質であることは指摘されるべきであろう。

Table 2 Characterization of proline hydroxylases.

	4-Hydroxylase	3-Hydroxylase
(1) M.W. (SDS-PAGE)	32K	35K
(2) Requirement	Fe ²⁺ , 2OG ⁽¹⁾	Fe ²⁺ , 2OG ⁽¹⁾
(3) Isoelectric point	5.2	4.3
(4) Opt. Temp.	35°C	35°C
(5) Opt. pH	6.5	7.0
(6) Specific activity (nmol/min/mg)	2,080	1,723
(7) <i>K_m</i> (mM)	L-Pro/ 2OG 0.27/ 0.55	0.55/ 0.11
(8) Inhibitors	Cu ²⁺ , Zn ²⁺ Co ²⁺ , Ba ²⁺	Cu ²⁺ , Zn ²⁺ Co ²⁺ , Ba ²⁺
(9) N-terminal a.a.	MLTPTELKQYREAGY LLIEDGLGP	MRSHILGRIELDQER LGRDLEYLAPVTPV
(10) Internal a.a.	1 NRTDNALPAQAAPRP 2 AARDAT	1 EAFDATVYAPNLSPD VRERKPFTK 2 NIPLYNASGGSEDRL YRDLEGSPAQ

(1) 2OG: 2-oxoglutarate

4. 遺伝子取得と大腸菌での活性発現

4.1. 遺伝子クローニング

精製した両酵素の N 末アミノ酸配列情報をもとに、ジゴキシゲニンでラベルした DNA プローブを PCR 法により作製し、大腸菌で構築した両菌株の染色体 DNA ライブラリーより、それぞれ 4 位水酸化酵素および 3 位水酸化酵素に対応する遺伝子をクローン化した¹⁷⁾。RH1 株からは 272 アミノ酸からなる 4 位水酸化酵素をコードする遺伝子が、TH1 株からはいずれも 290 アミノ酸からなる異なる 3 位水酸化酵素をコードする 2 種の遺伝子 (タイプ 1 およびタイプ 2) が取得された。いずれの遺伝子も、複数の遺伝子が連続して存在するクラスター構造の中の 1 つの遺伝子として存在しており、これらの遺伝子が何らかの形で 2 次代謝に組み込まれている可能性が示唆される。またこれらの遺伝子から推定されるアミノ酸配列と、既知の 2-オキシグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼのアミノ酸配列との間には、明確な相同性は観察されなかった。しかしこれらの酵素に共通して存在し、2 価鉄イオンの保持に働くことが知られている Hisモチーフ (...H-D...H...) ¹⁸⁾ の存在が認められた。

4.2. 大腸菌での活性発現

次いでこれらの酵素を大量に取得することを目的に大腸菌での遺伝子発現を行った。放線菌由来の遺伝子は GC 含量が高く、遺伝子コードの使用頻度が大腸菌と大きく異なるため、そのままでは放線菌遺伝子が大腸菌中で高発現するのは困難である。そこでこれらの遺伝子の N 末アミノ酸配列に対応する遺伝子コードを大腸菌での使用頻度に最適化し、トリプトファン生成オペロンのプロモーターを直列に 2 つ繋げた強力なプロモーター支配下で活性発現する様なプラスミド pWFH1, pWTH21, pWTH22 をそれぞれ構築し、大腸菌中での遺伝子発現を行った。これらの組換え大腸菌中では、4 位水酸

化酵素は元株である放線菌の約 1400 倍の、3 位水酸化酵素は約 1000 倍の酵素活性が発現した (表 3)。

5. 工業生産プロセスの確立

これまでに述べたように、十分な活性を示すプロリン水酸化酵素の遺伝子発現が可能となったので、構築した 4 位水酸化酵素遺伝子が発現する組換え大腸菌を用いて、L-プロリンからの *trans*-4-L 体 1 の生産システムの検討を行った。

5.1. 2-オキシグルタル酸供給システム

水酸化反応の基質となる 2-オキシグルタル酸は比較的高価なため、*trans*-4-L 体 1 の生産用の原料として使用することができない。そこで 2-オキシグルタル酸を工業的規模で供給可能な安価な原料から供給することを検討した。2-オキシグルタル酸は、細胞内においてグルコースから解糖系およびトリカルボン酸回路を経て供給され、大腸菌ではグルコースから 2-オキシグルタル酸の発酵生産が可能であることが報告されている¹⁹⁾。そこで、このような大腸菌の有する細胞代謝活性を利用して、水酸化反応の基質として必要な 2-オキシグルタル酸をグルコースから供給することを考え種々検討を行った。その結果、組換え大腸菌を用いた静止菌体反応により、2-オキシグルタル酸はグルコースから十分に供給され *trans*-4-L 体 1 が効率良く生成すること、さらに組換え大腸菌の培養中に L-プロリンを添加することで、より効率的な生産が可能であることが判明した。また反応の結果生ずるのはく酸も、培地中に蓄積することなく良好にリサイクルされることが判明した (図 5)。

5.2. プロリン分解経路の遮断

L-プロリンは、一般的に微生物により分解され良好な CN 源となる。組換え大腸菌による L-プロリンの転換においても、その転換収率は 80% 程度に留まっており、添加した L-プロリンが一部分解されていることが示唆さ

Table 3 Expression of proline hydroxylase genes in *Escherichia coli*.

Enzyme	Starin/plasmid	Promoter	Type of genetic code of N-terminal amino acids	Relative cellular activity
4-hydroxylase	<i>Dactylosporangium</i> sp. RH1	-	actinomycetes type	1
	<i>E. coli</i> ATCC12435/pTr2-4OH	P _{trp} x 2 ⁽¹⁾	actinomycetes type	468
	<i>E. coli</i> ATCC12435/pWFH1	P _{trp} x 2	<i>E. coli</i> type	1428
3-hydroxylase Type 1 Type 2	<i>Streptomyces</i> sp. TH1	-	actinomycetes type	1
	<i>E. coli</i> ATCC12435/pWTH21	P _{trp} x 2	<i>E. coli</i> type	1012
	<i>E. coli</i> ATCC12435/pWTH22	P _{trp} x 2	<i>E. coli</i> type	1193

(1) Proline hydroxylase gene was expressed under tryptophan tandem promoter.

Fig. 5 Cellular reaction of proline hydroxylase with 2-oxoglutarate recycling system in *E. coli*. HYP, hydroxyproline; 2-OG, 2-oxoglutarate.

れた。大腸菌ではL-プロリンの菌体内への取り込みに関与する遺伝子(*putP*)およびL-プロリンをグルタミン酸へと転換する遺伝子(*putA*)の2遺伝子が、培地中に存在するL-プロリンの分解に関与することが知られている(図5)²⁰⁾。

そこで、L-プロリンの菌体内への取り込み能を維持しつつ分解系のみを遮断することを目的に、グルタミン酸への転換遺伝子(*putA*)を不活化した菌株 WT1 株を作製した。WT1 株を用いることにより、添加したL-プロリンは分解されることなく定量的に *trans*-4-L 体1に転換されることが判明した。

5.3. L-プロリンからの *trans*-4-L 体の生産

宿主大腸菌にさらに幾つかの工夫を加え、組換え大腸菌の培養条件および水酸化酵素の反応条件を最適化した結果、通常のアミノ酸発酵と同等の生産性を有する *trans*-4-L 体1の工業生産プロセスを確立することができた。本プロセスでは、L-プロリンから *trans*-4-L 体1への転換は定量的に進行し(図6)、反応液中には他のアミノ酸はほとんど存在しないため、高品質の *trans*-4-L 体1を効率良く取得できる。本プロセスでは、遺伝子を3位水酸化酵素遺伝子に交換するだけで、L-プロリンから *cis*-3-L 体5を、*trans*-4-L 体1と同様に効率良く生産することが可能である。

5.4. グルコースからの *trans*-4-L 体1の生産

L-プロリンは、工業的にはグルコースを原料として発酵生産されているが、大腸菌においても、生合成の制御が外れた(脱感作された)プロリン生合成遺伝子(*proB74A*)をプラスミド pPF1 を用いて導入することで、容易にL-プロリン生産能を付与することができる(表4)。このような微生物機能を利用すると、酵素の基質であるL-プロリンを添加することなく、グルコースのみを原料としてヒドロキシプロリンを生産することが可能である

Fig. 6 Production of *trans*-4-hydroxy-L-proline from L-proline.

E. coli WT1/pWFH1 cells were cultured in 5 liter fermenter. L-Proline was added to the culture medium at the start of the culture. Glucose was added continuously to the medium during the culture. Open circle and triangle indicate the relative molar amounts of L-proline and *trans*-4-hydroxy-L-proline (4HYP), respectively. Open square indicates the cellular growth level. Conditions for the culture were as follows. Temperature, 33 °C; agitation 400 rpm; aeration 1 liter/liter.

うと思われる。そこで、前項で述べたL-プロリンからの転換プロセスにおいて、水酸化酵素遺伝子とともに脱感作されたプロリン生合成遺伝子(*proB74A*)を有するプラスミド pWFP1 を宿主大腸菌に導入したところ、グルコースから *trans*-4-L 体1が良好に生産されることが判明した(表4, 図7)。

Table 4 Production of L-proline and *trans*-4-hydroxy-L-proline from glucose.

Plasmid	Genes introduced	Amounts in medium (g/l)	
		L-Pro	4-HYP
none	none	0.07	not detected
pWFH1	4-hydroxylase	0.01	0.09
pPF1	<i>proB74A</i>	1.04	not detected
pWFP1	4-hydroxylase <i>proB74A</i>	0.47	1.28

E. coli WT1 cells containing the plasmid indicated in the table were cultured in a test tube. Amounts of L-proline and *trans*-4-hydroxy-L-proline (4HYP) in the medium were determined.

Fig. 7 Fermentation production of *trans*-4-hydroxy-L-proline from D-glucose. *E. coli* WT1/pWP1 cells were cultured in 5 liter fermenter. Glucose was added continuously to the medium during the culture. Open circle and triangle indicate the relative molar amounts of L-proline and *trans*-4-hydroxy-L-proline (4 HYP) produced in the medium, respectively. Open square indicates the cellular growth level. Conditions for the culture were as follows. Temperature, 33 °C; agitation 400 rpm; aeration 1 liter/liter.

6. プロリン水酸化酵素の基質特異性

先に述べたように、4位水酸化酵素および3位水酸化酵素はいずれも遊離のL-プロリンを基質とし、D-プロリンやペプチド状プロリン、N置換プロリン、カルボン酸エステル等は基質としない。そこでさらに、プロリン水酸化酵素の基質特異性を詳細に検討した。

プロリン4位水酸化酵素遺伝子および2種のプロリン3位水酸化酵素遺伝子を高発現する3種の組換え大腸菌より、それぞれ対応する3種類の酵素を精製し、4員環-6員環のイミノカルボン酸について、その反応性を検討した(表5)。その結果、4位水酸化酵素においては、4員環のL-2-アゼチジンカルボン酸では反応産物を検出することはできなかったが、5員環の3,4-デヒドロ-L-プロリンではエポキシドが、6員環のL-ピペコリン酸では、水酸化物が検出された。反応産物を単離しその構造を確認したところ、エポキシ化あるいは水酸化はいずれも、イミノ基からカルボン酸と反対側2番目の炭素に対

Table 5 Substrate specificity of proline 4- and 3-hydroxylases.

Substrate	Structure of products	
	Relative Activity (apparent <i>K_m</i> in mM)	
	4-hydroxylase	3-hydroxylase
L-2-azetidinecarboxylate	not detected	40 (2.1)
L-proline	100 (0.2)	100 (0.4)
3,4-dehydro-L-proline	66 (5.1)	57 (8.4)
L-pipecolate	109 (5.7)	15 (3.8)

して起きており、その立体はカルボン酸に対してトランスの関係であった。一方、3位水酸化酵素においては、タイプ1およびタイプ2の間で若干反応性の差はあるものの、いずれもL-2-アゼチジンカルボン酸およびL-ピペコリン酸において水酸化物を、3,4-デヒドロ-L-プロリンではエポキシドの生成が認められた。同様に反応産物を単離しその構造を確認したところ、エポキシ化あるいは水酸化はいずれもβ位で起きており、その立体はカルボン酸に対してシスの関係であった。

上記の結果は、これらの酵素がいずれも遊離の環状イミノカルボン酸を認識し、水酸化の位置および立体が、カルボキシル基あるいはイミノ基との相対的な位置関係で厳密に規定されていることを示唆する。今後の反応機構の解明が待たれるとともに、酵素の基質特異性を応用することにより、水酸化酵素の利用可能性が拡大し、表5に示した化合物をはじめとする種々の化合物の生産が可能となることが期待される。

おわりに

ここで紹介したプロリン水酸化酵素およびその機能を利用したヒドロキシプロリン生産技術によって、従来法

Fig.8 Interconversion of hydroxyprolines.

Reactions were summarized from the reports of Baker *et al.*²⁴⁾ and Seki²⁵⁾.

が内包していた、生産性、安全性環境などの諸問題を解決しつつ、発酵生産できないと考えられていた *trans*-4-L 体 1 の効率的な生産が可能になるとともに、これまで供給方法が無く利用できなかった *cis*-3-L 体 5 も供給可能となった。

trans-4-L 体 1 は、(R)-3-pyrrolidinol²¹⁾, (2S,4R)-4-hydroxyprolinol^{22,23)} 等々を経由することで比較的容易に種々の有用な光学活性化合物に変換することが可能である。*trans*-4-L 体 1 を出発原料とする多くの反応⁶⁾とともに、1 を他の異性体と比較的容易に変換することもできる (図 8)^{24,25)} ことから、光学活性の供給源として今後さらに用途が増大すると期待される。一方 *cis*-3-L 体 5 は、ここで確立した方法により供給可能となったことから、今後 *trans*-4-L 体 1 と同様に、その化学的応用が広がるものと思われる。さらには 4 員環-6 員環基質における応用も期待される。本研究の過程では、ここで紹介した反応の他にも特異性の異なったプロリン水酸化酵素が存在する可能性が示唆されており、プロリン水酸化酵素の利用技術が今後更に進展することが期待される。

基礎的側面においても興味深いものがある。2-オキソグルタル酸依存性のジオキシゲナーゼは、微生物から植物、動物に至るまで広範囲に存在する酵素群である。今回見いだしたプロリン水酸化酵素は、これまでの酵素とは相同性が低く、生物進化を考えるうえで興味深い。機能的には、プロリン水酸化酵素は低分子ペプチドの生合成と密接に関連していることが示唆されており、低分子

ペプチド合成の観点からも興味深いものがある。

本研究の成果は、生物界に多用に存在する希少な有用機能を利用することで、従来の発酵生産の枠を超えた物質生産が可能であることを示しており、今後の生産技術の方向性に重要な示唆を与えるものである。生物機能は、時として有機合成化学的発想や手法を超える能力を有するが、実用的には使用することができないことが多い。近年の遺伝子組換え技術の進展は、これまで実用的には使用することができなかった様々な生物機能の使用を可能としつつある。ここで紹介したヒドロキシプロリン生産技術は 1 つの典型的な例であるが、特に新規な(微)生物機能の探索の重要性は強調しておきたい。新規な生物機能を見いだすことは、有機合成化学など他の分野との関わりの中で、幅広い効果を及ぼすものと信ずる。

trans-4-L 体生産プロセスは、平成 9 年 2 月 6 日に通産省より「組換え DNA 技術工業化指針」適合確認を得、平成 9 年より工業化されている。

謝 辞 本研究は、協和醗酵工業株式会社の多数の関係者の方々のご協力をいただけて行われたものである。これら関係各位に深く感謝申し上げます。

(平成 11 年 2 月 1 日受理)

文 献

- 1) R. Kuttan, A.N. Radhakrishnan, *Advances in Enzymology*, **37**, 273 (1973)

- 2) E. Katz, D.J. Prockop, S. Udenfriend, *J. Biol. Chem.*, **237**, 1585 (1962)
- 3) D.J. Hook, L.C. Vining, *Can. J. Biochem.*, **51**, 1630 (1973)
- 4) F. Irreverre, K. Morita, B. Witkop, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **9**, 69 (1962)
- 5) C.F. Wichmann, J.M. Liesch, R.E. Schwartz, *J. Antibiotics*, **42**, 168 (1989)
- 6) P. Remuzon, *Tetrahedron*, **52**, 13803 (1996)
- 7) C. Eguchi, A. Kakuta, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **47**, 1704 (1974)
- 8) S. Takano, Y. Iwabuchi, J. Ogasawara, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1988**, 1527
- 9) R.C. Roemmele, H. Rapoport, *J. Org. Chem.*, **54**, 1866 (1989)
- 10) G.J. Cardinale, S. Udenfriend, *Advances in Enzymology*, **41**, 245 (1974)
- 11) K.I. Kivirikko, R. Myllyla, T. Pihlajaniemi, *The FASEB Journal*, **3**, 1609 (1989)
- 12) M. Onishi, Y. Okumura, R. Okamoto, T. Ishikura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **120**, 45 (1984)
- 13) W.J. Lindbald, R.F. Diegelmann, *Anal. Chem.*, **138**, 390 (1984)
- 14) A. Ozaki, T. Shibasaki, H. Mori, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1764 (1995)
- 15) H. Mori, T. Shibasaki, Y. Uosaki, A. Ozaki, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1903 (1996)
- 16) C.C. Lawrence, W.J. Sobey, R.A. Field, J.E. Baldwin, C.J. Schofield, *Biochem. J.*, **313**, 185 (1996)
- 17) (a) A. Ozaki, H. Mori, T. Shibasaki, WO 96/27668 (1996); (b) *idem*, WO 96/27669 (1996); (c) H. Mori, T. Shibasaki, K. Yano, A. Ozaki, *J. Bacteriol.*, **179**, 5677 (1997)
- 18) P.L. Roach, I.J. Clifton, V. Fulop, K. Harlos, G.J. Barton, J. Hajdu, I. Anderson, C.J. Schofield, J.E. Baldwin, *Nature*, **375**, 700 (1995)
- 19) A. Yokota, F. Shimizu, Y. Terasawa, F. Tomita, *Appl. Microbiol. Biotech.*, **41**, 638 (1994)
- 20) T. Leisinger, "E. coli and Salmonella", 2nd ed., F.C. Neidhardt (ed.), ASM Press, Washington, D.C., vol.1, p.434 (1996)
- 21) G. Giardina, G. Dondio, M. Grugni, *Synlett.*, **1995**, 55
- 22) H. Azami, D. Barrett, A. Tanaka, H. Sasaki, K. Matsuda, T. Chiba, Y. Matsumoto, S. Matsumoto, K. Ishiguro, S. Tawara, K. Sakane, H. Takasugi, *Bioorganic & Med. Chem. Lett.*, **5**, 2199 (1995)
- 23) J. Cossy, C. Dumas, P. Michel, D.G. Pardo, *Tetrahedron Lett.*, **36**, 549 (1995)
- 24) G.L. Baker, S.J. Fritschel, J.R. Stille, J.K. Stille, *J. Org. Chem.*, **46**, 2954 (1981)
- 25) M. Seki, K. Matsumoto, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1161 (1995)