

## 論文内容の要旨

論文題目 L-リジンから L-ホモグルタミン酸および L-ピペコリン酸への微生物変換系の構築に関する研究

氏名 藤井 匡

今日、世界で販売されている医薬品の約 40%が、また開発中の医薬品の約 80%がキラル化合物であり、キラル化合物の世界市場は 2000 年で 66.3 億ドルで 2007 年には 160.3 億ドルになると予想されている。微生物変換法はキラル化合物を生産する上で最も有効な方法の一つであることから、著者は L-リジンから L-ホモグルタミン酸および L-ピペコリン酸への微生物変換系の構築を行った (図 1)。

L-ホモグルタミン酸は  $\beta$ -ラクタム系抗生物質の前駆体となる非タンパク性のアミノ酸で、医薬品合成のキラル中間体として重要な化合物である。このような非蛋白性のアミノ酸は医薬品の原料としての需要が多いが、蛋白性のアミノ酸と違って通常の発酵法で製造することが難しい。L-ホモグルタミン酸の生合成経路は  $\beta$ -ラクタム抗生物質生産菌 *Streptomyces clavuligerus* において生化学的、分子生物学的な研究がなされており、まず L-リジン 6-アミノトランスフェラーゼ (LAT)により L-リジンが  $\alpha$ -アミノアジピン酸セミアルデヒドあるいはこれと平衡状態にある  $\Delta^1$ -ピペリدين-6-カルボン酸 (P6C)に変換され、次いで P6C 脱水素酵素 (PCD)により L-ホモグルタミン酸に変換されることが知られていた。

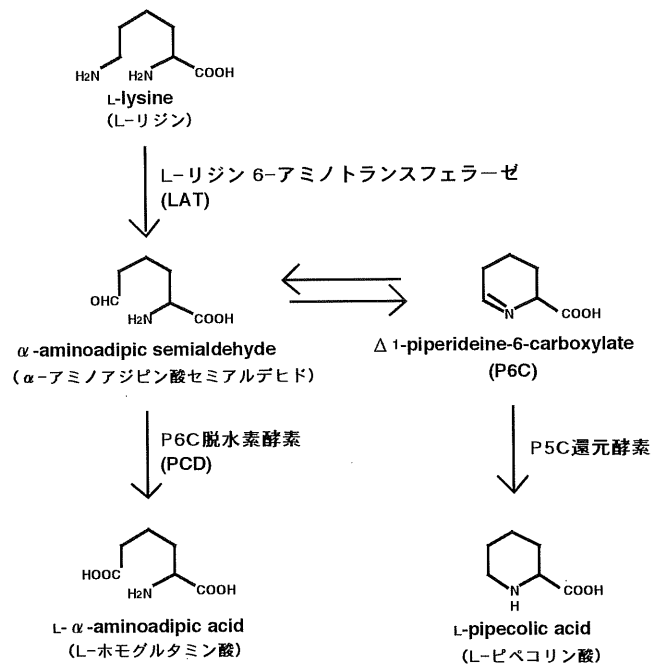


図1 L-リジンからL-ホモグルタミン酸およびL-ピペコリン酸への微生物変換反応

グラム陰性菌 *Flavobacterium lutescens* IF03084 株により L-リジンが L-ホモグルタミン酸に立体選択的に変換されることが知られており、実際に著者はこの菌株を用いて L-リジンから市場価値の高い L-ホモグルタミン酸への微生物変換を行っていた。そこで著者は、*F. lutescens* IF03084 株においても LAT と PCD により L-ホモグルタミン酸が生合成されるものと考え、*F. lutescens* IF03084 株による L-リジンから L-ホモグルタミン酸への微生物変換速度の向上を目的として、その変換反応に参与する遺伝子 *lat* と *pcd* をクローニングすることを試みた。まず著者は *F. lutescens* IF03084 株の LAT を精製し、その N 末端のアミノ酸配列から LAT をコードする *lat* 遺伝子をクローニングした。LAT のアミノ酸配列は種々のアミノトランスフェラーゼに相同性を示していた。精製した LAT は native PAGE では分子量約 110,000 を示し、SDS-PAGE では分子量約 53,000 を示した。このことは *F. lutescens* IF03084 株の LAT がホモダイマーとして機能していることを示していた。また、大腸菌で発現した組換え LAT もホモサブユニット構造をとり、LAT 活性を示した。これらの結果は、他の種々のアミノトランスフェラーゼがモノマーかホモポリマーとして機能していることと合致しており、既に報告されていた「*F. lutescens* IF03084 株の LAT はヘテロテトラマー構造をとる」という報告を覆す結果であった。

次に著者はショットガンクローニングにより、PCD をコードする *pcd* 遺伝子をクローニングした。PCD と LAT との共役反応により L-リジンを L-ホモグルタミン酸に変換することを示した。また、*lat* と *pcd* を増幅した *F. lutescens*/pCF335 株を構築

し、L-リジンから L-ホモグルタミン酸への微生物変換反応効率を約 1.7 倍に向上させることに成功した。*F. lutescens*/pCF335 株の L-ホモグルタミン酸生産量は培養開始後 96 時間で約 13.4 g/L であったが、この生産量は十分工業生産に耐えうる数値であり、実際に著者らは現在この菌株を用いて L-ホモグルタミン酸の工業生産を行っている。

一方、L-ピペコリン酸も非タンパク性のアミノ酸で、医薬品合成のキラル中間体として重要な化合物である。これまで L-ピペコリン酸を蓄積する微生物の報告はあったが蓄積量が少ないことから経済的に L-ピペコリン酸を発酵生産するには至っておらず、L-ピペコリン酸の製造法としては、ジアステレオマーの塩を形成させてラセミ体から L 体を分別結晶化する方法と酵素によるラセミ体の立体選択的変換法が知られていた。しかし、これらの方法では光学純度 100%の L-ピペコリン酸は得られていない。そこで著者は P6C の酵素的還元による L-ピペコリン酸の製造を考えた。これまで P6C の L-ピペコリン酸への還元反応を触媒する酵素については同定されていなかった。これはこの酵素反応の基質となる P6C が化学的に不安定であり容易に単離できないため、P6C を用いた実験が難しいからであった。

本研究により著者は *lat* を発現させた大腸菌が L-リジンを L-ピペコリン酸へ変換することを見出した。さらに大腸菌の *proC* がコードするピロリン-5-カルボン酸還元酵素 (P5C 還元酵素)が、LAT により L-リジンから生成される P6C を還元して L-ピペコリン酸に変換することを *in vivo* および *in vitro* における実験により示した。これにより遺伝子組換え大腸菌による L-リジンから L-ピペコリン酸への変換菌をはじめて構築することができた。この *lat* 発現大腸菌による微生物変換反応で蓄積する L-ピペコリン酸の光学純度は 100%であった。つまり、光学純度 100%の L-ピペコリン酸を生産できる系が初めて構築されたのである。

さらに著者は、*lat* 発現大腸菌による L-リジンから L-ピペコリン酸への変換速度の向上を試みた。リジン特異的透過酵素をコードする *lysP* 遺伝子を *lat* と共に乗せたプラスミド pRH125 を *E. coli* BL21 に導入し、培養試験によりこの株の L-リジンから L-ピペコリン酸への微生物変換速度を調べた。この結果 *E. coli* BL21/pRH125 株の変換速度は 140 mg/L/h であり、これは *lat* のみを乗せたプラスミドを導入した *E. coli* BL21/pRH124 株の変換速度 28 mg/L/h の約 5.0 倍であった。このように、*lysP* の増幅は *lat* 発現大腸菌による L-リジンから L-ピペコリン酸への微生物変換速度の向上に対して有効であることが示された。

また、*lysP* のすぐ上流には *yeiE* という ORF が存在することが大腸菌のゲノム情報から知られていた。*yeiE* のコードする蛋白質 YeiE のアミノ酸配列は、LysR フ

ファミリーと呼ばれる転写因子群に相同性を示していた。このことから *YeiE* はおそらく転写因子として他の遺伝子の転写を調節しているのであろうと考えられていたが、*YeiE* の機能についての報告はこれまで全くなかった。著者は RT-PCR による解析により、*yeiE* が *lysP* の正の転写制御因子であることを明らかにした。*yeiE* を *lysP* と *lat* と共に乗せたプラスミド pRH127 を *E. coli* BL21 に導入し、培養試験によりこの株の L-リジンから L-ピペコリン酸への微生物変換速度を調べた。この結果 *E. coli* BL21/pRH127 株の変換速度は 180 mg/L/h であり、これは *lat* のみを乗せたプラスミドを導入した *E. coli* BL21/pRH124 株の変換速度 28 mg/L/h の約 6.4 倍であった。このように、*yeiE* と *lysP* の増幅は *lat* 発現大腸菌による L-リジンから L-ピペコリン酸への微生物変換速度の向上に対して有効であることが示された。

このように著者は、光学純度 100% の L-ピペコリン酸を生産できる系を初めて構築し、それを工業生産で用いることが可能なレベルにまで生産性の向上を行った。実際に著者らはここで構築した *E. coli* BL21/pRH127 株を用いて L-ピペコリン酸の工業生産を行っている。

本研究を進める上で、基本的な遺伝子操作技術はもちろんであるが、大腸菌のゲノム情報の貢献度は非常に高かった。第 3 章で P6C を還元して L-ピペコリン酸に変換する酵素が P5C 還元酵素であることを発見したこと、および第 4 章で *lysP* の転写を正に制御する *yeiE* の存在を示したことなどは、ゲノム情報がなければ迅速には進まなかったであろう。微生物変換反応によるキラル化合物の工業生産という研究分野においても、今後ゲノム情報をうまく使うことが重要であろう。本研究はその良いモデルケースと言えるのではないだろうか。

我々の最終的な目標は大腸菌を酵素反応の場とすることによって光学純度の高い様々なキラル化合物を経済的に製造することにある。これまでの化学合成法や酵素を直接用いる酵素合成法では、コストがかかりすぎたり、その生産量や光学純度を上げられなかったり、あるいはそれを生産する系すら存在しなかったような目的キラル化合物について、組換え大腸菌を用いた微生物変換法による発酵生産が可能になり得ることを本研究は示した。さらに共通の宿主として大腸菌を用いることによっていろいろなキラル化合物の製造に同じ培養技術が使えるであろう。また、培養液からの回収工程も共通化でき精製工程もいくつかの共通の工程を組み合わせることで対応できると考えられる。これらの培養工程と回収精製工程の共通化は製造プロセスの開発に必要な時間と経費を節約できることを意味している。このように本研究における組換え大腸菌を用いた微生物変換法による L-ピペコリン酸工業生産の成功は、今後光学純度の高い様々なキラル化合物を経済的に製造していく戦略の上で、確かな指針を示した。