

変異型酸性ホスファターゼによるヌクレオシドリン酸化反応

三原 康博

核酸系うま味調味料の製法と当社の取り組み

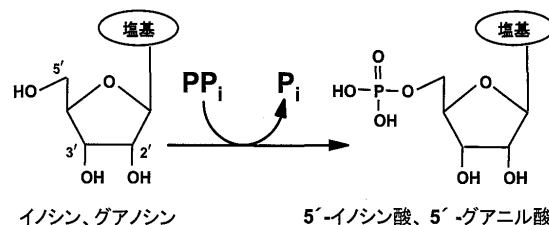
5'-イノシン酸ナトリウムは鰹節のうま味成分として、5'-グアニル酸ナトリウムは干し椎茸のうま味成分として知られ、うま味調味料の原料として有用な核酸化合物である。これらの核酸系うま味調味料は、昆布のうま味成分であるアミノ酸系うま味調味料と併用することによってうま味の相乗効果を示すことが知られており、1909年以来グルタミン酸ナトリウム事業を世界的に展開してきた当社にとって、核酸系うま味調味料の供給は重要な課題であった。

これら 5'-ヌクレオチドは、RNA の酵素分解、直接発酵法、ヌクレオシド発酵と酵素的あるいは化学的リン酸化の組み合わせなど、さまざまな方法で工業生産が行われている。発酵法で効率よく生産したヌクレオシドをリン酸化する方法は主要な製法のひとつであり、イノシンの酵素的リン酸化法として *Escherichia coli* イノシン-グアニンキナーゼを *Corynebacterium ammoniagenes* の ATP 再生系と共役させて用いる方法が協和発酵によって開発されている¹⁾。本稿では、ATP 再生系を必要とせず、ピロリン酸をリン酸供与体として用いる、ヌクレオシドのリン酸化法の開発について紹介する。

5'位特異的リン酸基転移酵素の探索

無機リン酸化合物をリン酸供与体としてヌクレオシドをリン酸化する活性が動植物、微生物に広く存在することが古くから報告されており²⁾、当社でも 1960 年代より各種リン酸化合物を用いた酵素的リン酸化法を検討してきた。リン酸供与体として、パラニトロフェニルリン酸³⁾やポリリン酸⁴⁾を用いて検討し、それぞれの化合物をリン酸供与体としてリン酸化反応を触媒する活性を見いだしたが、反応の位置特異性、基質の価格および副生物の処理などに課題があり、実用化には至らなかった。今回は、リン酸供与体をピロリン酸 (PP_i) に限定し、図 1 に示す反応で、イノシンをリン酸化する活性を持つ菌のスクリーニングから研究を開始した。

ピロリン酸は、食品添加物として使用されている安全で安価な化合物であるが、ATP よりも高い高エネルギーリン酸結合を持ち、反応によって副生したリン酸を加熱

図 1. 5'位選択的 PP_i-ヌクレオシドリン酸基転移反応

によってピロリン酸に縮合して、再利用できるという利点を有する。

ヌクレオチドはリン酸化される位置によっていくつかの異性体が存在するが、呈味性を示すのは 5'位がリン酸化された 5'-ヌクレオチドのみで、3'や 2'位がリン酸化された異性体はうま味がない。そこでスクリーニングではイノシンの 5'位を特異的にリン酸化することを第一の指標とした。

およそ 3000 株の微生物をスクリーニングした結果、イノシンのリン酸化活性は比較的広い範囲の菌に見いだされたが、多くの菌はリン酸基転移反応の位置特異性が低く、3'-および 2'-イノシン酸を副生した。生成するイノシン酸異性体の比率は菌によってさまざまであった。さまざまな条件でスクリーニングした結果、*Escherichia* 属をはじめとする腸内細菌群の菌に、イノシンの 5'位を 95% 以上の高い位置選択性でリン酸化する活性が見いだされた⁵⁾ (表 1)。菌体反応ではわずかに 2'および 3'-イノシン酸の副生が認められたが、精製酵素の位置特異性は非常に高く、イノシンの 5'位のみをリン酸化することがで

表 1. PP_i-イノシンリン酸基転移活性スクリーニング結果の一部

由来菌株	イノシン酸異性体の生成比 5' : 3' : 2'
<i>Achromobacter parvulus</i>	29.2 : 70.8 : 0
<i>Candida lipolytica</i>	43.4 : 31.8 : 24.8
<i>Corynebacterium rathayi</i>	62.7 : 33.4 : 3.90
<i>Escherichia blattae</i>	99.8 : 0.200 : 0
<i>Morganella morganii</i>	95.4 : 3.25 : 1.35
<i>Pseudomonas diminuta</i>	32.2 : 67.8 : 0
<i>Serratia grimesii</i>	60.9 : 31.0 : 8.01
<i>Serratia ficalia</i>	95.0 : 2.06 : 1.24

特 集

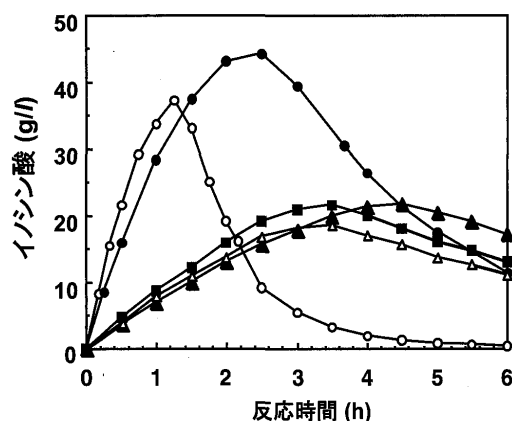


図2. 各種野生型リン酸基転移酵素によるイノシン酸生成のタイムコース。●, *Morganella morganii*; ○, *Providencia stuartii*; ■, *Klebsiella planticola*; ▲, *Enterobacter aerogenes*; △, *Escherichia blattae* 由来の野生型酵素高発現 *E. coli* 菌体を用いて反応。

きた⁶⁾。

リン酸基転移酵素の性質検討

スクリーニングで得られた菌より、リン酸化酵素の遺伝子をクローニングしたところ、本酵素はリン酸基転移活性を持つ酸性ホスファターゼであることが明らかとなった⁷⁾。酸性ホスファターゼは、いくつかのファミリーに分類されているが、興味深いことに、本酵素はピロリン酸-グルコースリン酸基転移活性を示すホスファターゼとして知られているグルコース-6-ホスファターゼ⁸⁾と同じファミリーに分類された。5属の菌から得られた酵素はイノシン酸の蓄積量が高いグループと低いグループの二つに大別できたが(図2)、その一次構造は非常に高い相同性を示した。

次に、本酵素がイノシン酸の生産に適用できるどうかを検討したところ、最も収率の高かった *Morganella morganii* 由来酵素でも40%収率と、実用的に満足する収率では反応できなかった。また、リン酸基転移反応が停止すると、一度生成したイノシン酸が同じ酵素のヌクレオチダーゼ活性によって速やかに加水分解をうける現象も認められ、生産に適用するのは難しいと考えられた。

リン酸基転移反応の推定メカニズム

グルコース-6-ホスファターゼ⁸⁾の知見から、本酵素のリン酸基転移反応は図3のように ping-pong 反応で進むと推定された。すなわち、はじめにリン酸エステル化合物が酵素と反応し、酵素-リン酸複合体を形成する。次に、水が求核攻撃して、リン酸を遊離させて加水分解反応が完結する。一方、水の代わりにイノシンなどの水酸基をもった化合物もリン酸基受容体となり、ヌクレオチドが求核攻撃した場合には、ヌクレオチドが生成され、

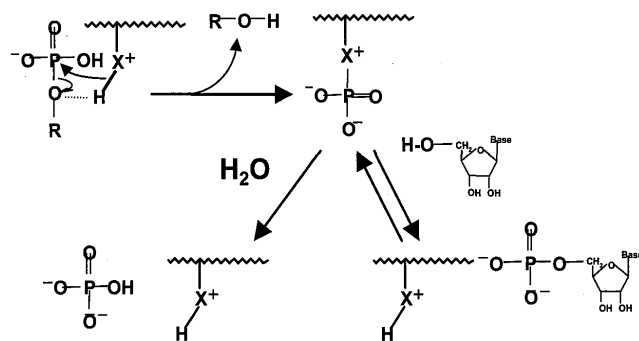


図3. リン酸基転移反応の推定反応機構。R-O-は脱離基を示す。ピロリン酸の場合はR-O-＝オルソリン酸。Xは活性中心のアミノ酸残基を示す。

リン酸基転移反応となる。しかしながら、生成したヌクレオチドはリン酸エステルであり、本酵素の基質となるため分解を受ける。*Escherichia blattae* 酵素を用いて、活性中心の His 残基にモリブデン酸が結合した遷移状態アナログの X 線結晶構造が得られた⁹⁾ことから、この反応機構が支持された。

したがって、リン酸基受容体の基質特異性によりリン酸基転移反応の効率が決定されるが、最も親和性の高かった *M. morganii* 由来酵素のリン酸基転移反応におけるイノシンの K_m 値が117 mMであり、いずれの菌由来の酵素もイノシンの親和性は非常に低かった。これより、本酵素の本来の反応は脱リン酸反応であり、イノシンが高濃度で存在する場合にのみリン酸基転移反応が進むことが示唆された⁵⁾。

進化工学的手法による酵素の改変

本酵素をヌクレオチドの生産に適用するためには、脱リン酸反応を抑え、リン酸基転移反応のみを促進するという一見困難な改変が必要となった。酵素の推定反応機構から、両者の反応の違いはリン酸基の受容体が水となるかヌクレオチドとなるかにあることが示唆されたが、イノシン酸蓄積の異なる5種の菌株由来の酵素の比較から、表2のようにリン酸基転移反応におけるイノシンの親和性が高い酵素ほどイノシン酸の蓄積量が高かった⁴⁾。これよりヌクレオチドに対する親和性をさらに向上させることで、リン酸基転移反応の効率を上げることが可能だと考え、進化分子工学的手法による酵素改変を試みた。

最もイノシン酸蓄積の高かった *M. morganii* 由来酵素遺伝子にPCRによるランダム変異を導入し、変異型酵素を発現させた *E. coli* 菌体からイノシン酸合成能力の向上した株をスクリーニングした。変異導入とスクリーニングを繰り返して行い、生産性の向上を試みたところ、2ラウンドのランダム変異導入により、野生型酵素に比べ

表2. 各種酸性ホスファターゼのイノシンに対する親和性

由来菌株	K_m (mM)	V_{max} (u/mg)
<i>Morganella morganii</i>	117	6.09
<i>Providencia stuartii</i>	156	6.21
<i>Enterobacter aerogenes</i>	218	3.75
<i>Escherichia blattae</i>	200	2.78
<i>Klebsiella planticola</i>	231	2.65

表3. *M. morganii* 野生型および変異型酵素の反応速度定数

活性 (基質)	変異体	K_m (mM)	V_{max} (u/mg)
Phosphotransferase (イノシン)	野生型	117	6.09
	I171T	73.9	2.77
	G92D	114	0.983
	G92D/I171T	42.6	2.67
Nucleotidase (5'-イノシン酸)	野生型	0.836	30.3
	I171T	1.63	11.6
	G92D	1.49	4.70
	G92D/I171T	1.35	5.67

て大きく生産性が向上した株を得ることができた¹⁰⁾。得られた変異型酵素には、Gly92AspおよびIle171Thrの2アミノ酸残基の変異が導入されていた。

各変異型酵素の性質を比較した結果を表3に示した¹⁰⁾。野生型酵素はリン酸基受容体のイノシンに対する親和性が低かったが、変異型酵素はこれが約3倍に上昇した結果、リン酸基転移反応の効率が向上したものと考えられた。また、それぞれの単独変異体の速度定数からIle171Thrの変異は単独でイノシンとの親和性向上に、Gly92Aspの変異はIle171Thrとの相乗効果によってイノシンとの親和性を高めると共に、脱リン酸活性の低下に寄与していることが示唆された。X線結晶構造解析の結果から二つのアミノ酸残基は活性中心近傍に位置しており、Thr171はイノシンと水素結合を形成して親和性を高めていることが示唆された¹¹⁾。

変異型酵素を大量発現させた *E. coli* 菌体を用いてイノシン酸生産反応を行ったところ、図4に示すように生産性が大きく向上すると共に、生成したイノシン酸の脱リン酸化反応も抑えられ、大量のイノシン酸を生成蓄積させることができた。以上のように、分子進化工学の手法によって、酵素の性質を大きく改変することにより、実用レベルまで生産性を上げることができ、新規酵素的リン酸化法の基本技術が確立された。

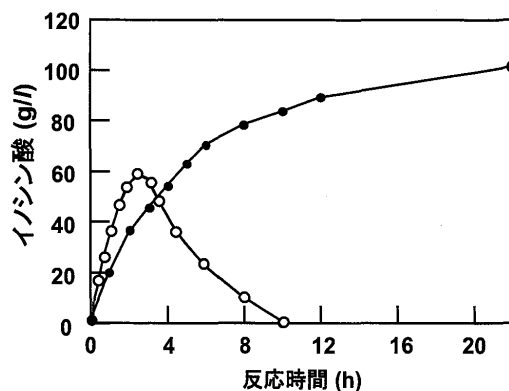


図4. 野生型および変異型酵素高発現 *E. coli* 菌体によるイノシン酸生産反応のタイムコース。○, 野生型酵素; ●, G92D/I171T変異型酵素高発現 *E. coli* 菌体を用いて反応。

工業化へのとりくみ

本酵素のリン酸基受容体の基質特異性は広く、イノシン酸だけでなく、各種の5'-ヌクレオチドを合成することができたが、グアニル酸の場合には生産性が低く、グアニル酸も高収率で生産できる技術が求められた。本特集の趣旨から詳細は割愛するが、続いて酵素のX線結晶構造⁹⁾に基づいた合理的の改変によって、グアノシンのリン酸化反応にも適用できるよう酵素を高機能化することに成功した¹¹⁾。これらの知見を基にして、実生産に適用できる非組換え酵素菌を構築した。

さらに、当社の多くの研究者・技術者により発酵プロセスの最適化、単離・精製プロセスの開発などの検討が重ねられて生産技術が確立され、2003年より新規酵素的リン酸化法による核酸系うま味調味料の工業生産が開始されている。

研究のご指導を賜りました富山県立大学工学部生物学研究センター浅野泰久先生、山田秀明先生に感謝いたします。

文 献

- 1) Mori, H. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**, 693 (1997).
- 2) Brawerman, G. *et al.*: *Biochem. Biophys. Acta*, **15**, 549 (1954).
- 3) Mitsugi, K. *et al.*: *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 586 (1964).
- 4) 中沢英次ら: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p.483 (1978).
- 5) Asano, Y. *et al.*: *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*, **6**, 271 (1999).
- 6) Asano, Y. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 732 (1999).
- 7) Mihara, Y. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 50 (2001).
- 8) Nordlie, R. C.: *The enzymes*, 3rd ed., Vol. 4., p.543, Academic Press (1972).
- 9) Ishikawa, K. *et al.*: *EMBO J.*, **19**, 2412 (2000).
- 10) Mihara, Y. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 2811 (2000).
- 11) Ishikawa, K. *et al.*: *Protein Engineering*, **15**, 539 (2002).