

養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名：三野 光識

2. 養成カリキュラム名：新規産業用酵素の大量生産とその実用化

3. 養成カリキュラムの達成状況

(1) 新規産業用酵素として、新規な基質特異性を示す超耐熱性システイン合成酵素を超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* から発見した。すなわち、従来のシステイン合成酵素はアセチルセリンを基質とするが、本酵素はアセチルセリン以外にホスホセリンをシステイン合成速度の最も高い基質として用いることを見出した。また、(2) 本酵素の結晶を調製し、X-線結晶解析により、立体構造を決定した。新規システイン合成酵素を用いることによって、有用アミノ酸（システイン、及び、非天然アミノ酸）合成への応用が可能である。

4. 成果（A 4版3枚程度）

超好熱性古細菌から新規酵素を発見し、その酵素の実用化を図ることを目的として研究を行った。

既知のシステイン合成酵素（O-アセチルセリンスルフヒドリラーゼ [EC2.5.1.47]）は、アセチルセリンからシステインを合成する（図 1a）。我々は、アセチルセリン合成経路の見つかっていない超好熱性の古細菌（始原菌）*Aeropyrum pernix*（アエロパイラム・ペルニックス）のシステイン合成酵素の解析を進めてきた。その結果、ホスホセリンからシステインを合成する新規な反応を本酵素が触媒することを発見した（図 1b）¹⁾。ホスホセリンからのシステイン合成速度は、従来知られていたシステイン合成速度よりもはるかに大きい値を示した（図 2）^{1,2)}。以下、本酵素を O-ホスホセリンスルフヒドリラーゼと記す。

超好熱性古細菌は、過酷な環境（高温、高圧）下で生育する。従ってその酵素は、常温で生育する生物の酵素が変性し働けなくなる 100℃付近でも生化学反応を触媒することができる。しかしながら、高温下で生育する生命体が熱に対してどのように適応しているかは謎である。

ホスホセリンは 90℃付近での高温でも安定である。さらに、ホスホセリンを原料として本酵素は高いシステイン合成速度を示したことから、超好熱性古細菌は熱に弱いアセチルセリンを用いないシステイン合成の新規経路を持つ可能性がある。古細菌は、「真正細菌」（大腸菌など）とも、「真核生物」（ヒトを含むほ乳類、鳥、魚、酵母、植物など）とも異なるカテゴリーに分類される。大腸菌、高等植物、酵母、及びほ乳類におけるシステイン合成経路は詳細に解析されている。一方、古細菌におけるシステイン合成経路は未だ分かっていない。本研究の成果は、超好熱性古細菌におけるシステイン合成経路を理解し、それを工学に役立てるための鍵を与える。

超好熱性古細菌由来 *O*-ホスホセリンスルフヒドリラゼはホスホセリンをどのように認識し、高いシステイン合成反応速度を示すのであろうか。本酵素の結晶を調製し (図 3a)、大型放射光施設 SPring-8 で立体構造を決定した (図 3b)。本酵素は 2 つの同一サブユニットから成り、活性部位にピロキサルリン酸が結合している。これまでサルモネラ菌由来 *O*-アセチルセリンスルフヒドリラゼ-A、及び *C*-末端領域の欠損したヒト由来シスタチオンβ-合成酵素[EC4.2.1.22]の立体構造が報告されている。これらの既知酵素と *A. pernix* 由来 *O*-ホスホセリンスルフヒドリラゼの構造を比較すると基質の結合に関与すると推測される部分はややアミノ酸残基の違いが見られた。現在、基質特異性に関与するアミノ酸残基を特定する実験を行っている。

システインはアミノ酸の一種で、しみ・そばかすなどの色素沈着改善薬として用いられる。また、カルボシステイン(システイン誘導体)は代表的な去痰剤として、キスカル酸は薬物受容体の研究に有用である。本酵素を用いることにより、比較的廉価で入手でき安定でもあるホスホセリンを原料としてシステイン、カルボシステインなどの合成を、環境にやさしい方法で行うことができる。*Aeropyrum pernix* 由来 *O*-ホスホセリンスルフヒドリラゼをコードする遺伝子は特許として出願した³⁾。人間系特別研究体では、今後本酵素の応用法の開発に力を入れていく予定である。

参考資料

- 1) K. Mino and K. Ishikawa: FEBS Lett. *in press* (2003)
- 2) K. Mino and K. Ishikawa: J. Bacteriol. Vol.185, No.7, 2277-2284 (2003)
- 3) 石川一彦、三野光識: 特願2002-335876「耐熱性システイン合成酵素および該酵素をコードするDNA」

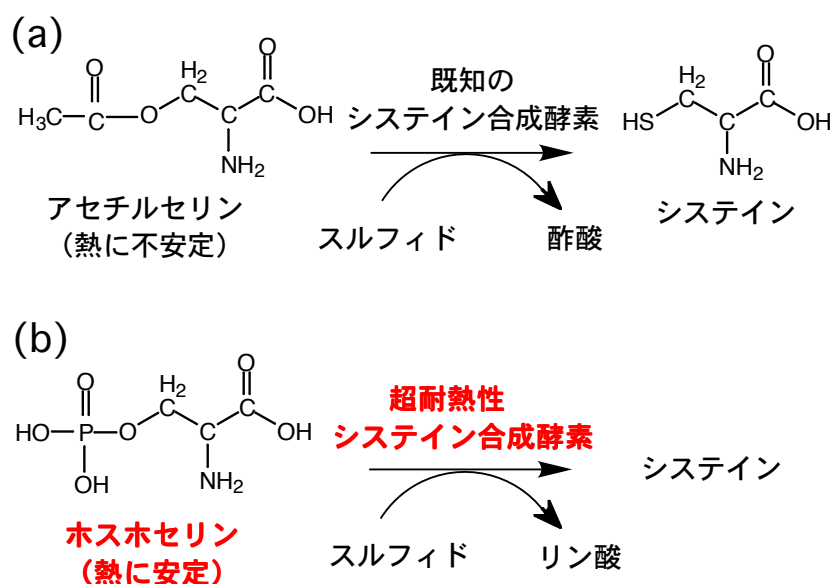
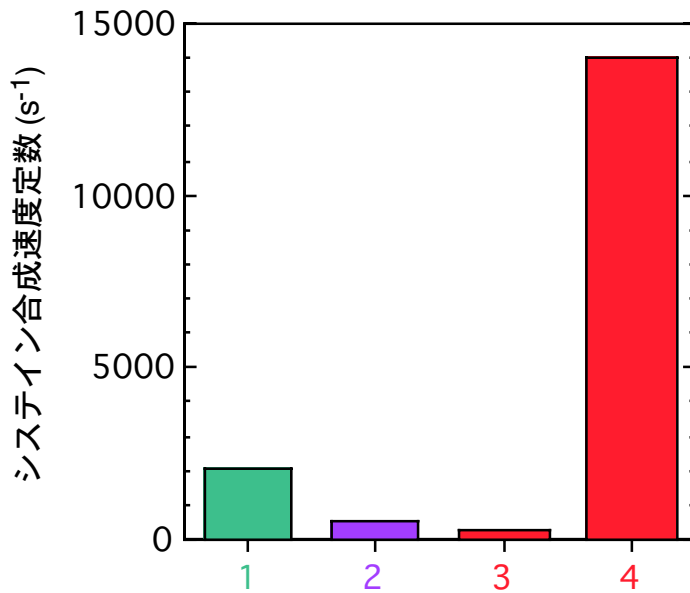


図1 (a)従来のシステイン合成反応、(b)今回発見したシステイン合成反応



No	原料	酵素の起源	反応温度 (°C)
1	アセチルセリン +スルフィド	大腸菌	25
2	アセチルセリン +スルフィド	好熱菌 (<i>Thermus</i>)	50
3	アセチルセリン +スルフィド	超好熱性古細菌 (<i>Aeropyrum pernix</i>)	60
4	ホスホセリン +スルフィド	超好熱性古細菌 (<i>Aeropyrum pernix</i>)	85

← 今回の方法

図2 単位時間あたりにシステインを合成する速度の比較

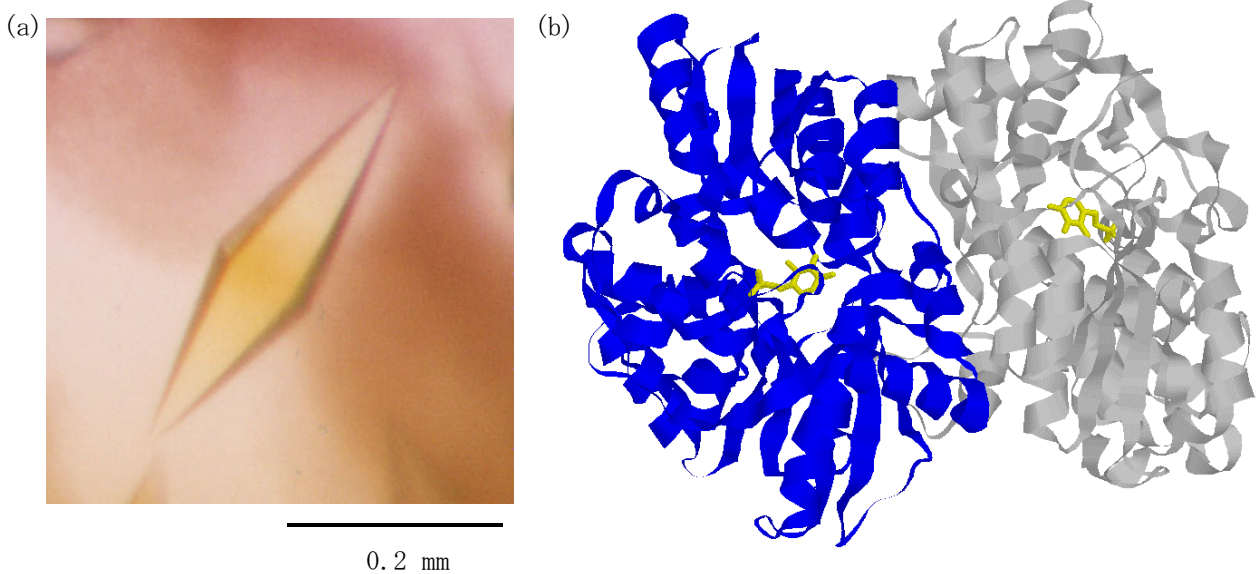


図3 (a) 新規 *l*-ホスホセリンスルフィドヒドラーゼの単結晶, 及び、(b) 立体構造
ピリドキサルリン酸を黄色で示した。2つの同一サブユニット (青、グレー) の2つから成る。

5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表 (論文掲載済、または査読済を対象。)

- ・Mino, K., Oda, Y., Ataka, M., and Ishikawa, K., Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *O*-acetylserine sulphydrylase from *Aeropyrum pernix* K1. Acta crystallographica section D, D59, 338-340 (2003).
- ・Mino, K. and Ishikawa, K., Characterization of a novel thermostable *O*-acetylserine sulphydrylase from *Aeropyrum pernix* K1. J. Bacteriology, 185, 2277-84 (2003).
- ・Mino, K. and Ishikawa, K., A novel *O*-phospho-L-serine sulphydrylation reaction catalyzed by *O*-acetylserine sulphydrylase from *Aeropyrum pernix* K1. FEBS Letters, 551, 133-138 (2003).

(2) 口頭発表 (発表済を対象。)

- ・2002年3月 日本農芸化学会大会
「*Aeropyrum pernix* K1 由来超耐熱性 *O*-アセチルセリンスルフヒドリラーゼの諸性質」三野光識、石川一彦
- ・2003年4月 日本農芸化学会大会
「*Aeropyrum pernix* K1 由来超耐熱性 *O*-アセチルセリンスルフヒドリラーゼの示すシスタチオニン β -シンターゼ活性についての解析」三野光識、石川一彦
- ・2003年9月 日本生物工学会大会
「超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 由来 *O*-アセチルセリンスルフヒドリラーゼの示す新規システイン合成反応」三野光識、石川一彦
- ・2003年9月 THERMOPHILES (国際学会-英国)
「A novel thermostable *O*-acetylserine sulphydrylase from *Aeropyrum pernix* K1」三野光識、石川一彦

(3) 特許等の出願件数

3 件