

フッ素資源の環境持続型循環系構築を目指して

Construction of sustainable recycling system for fluorine resources

—生体触媒を用いたフッ素化反応系の開発—

— *Development of bio-catalytic fluorination* —

東京工業大学・フロンティア創造共同研究センター 助教 岩井 伯隆
NORITAKA IWAI (Assistant Professor)

Tokyo Institute of Technology and Frontier Collaborative Research Center

東京工業大学・大学院生命理工学研究科 教授 北爪 智哉
TOMOYA KITAZUME (Professor)

Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology

1. はじめに

近年、資源の(とりわけ石油の)枯渇化が現実問題視されるなかで、あらゆる化成品の持続可能な循環系による物質生産体制の重要性が提起されてきている。簡潔に言えば、ゴミとなるものを出さないシステムを作ろうということである。この取り組みは燃料などにも考え方が波及しており、バイオエタノールなどによる植物由来天然資源を利用した燃料生産などが車社会に浸透しつつあるのは、肌身でも感じられることである。

ところで、我々の身の回りには実にたくさんのフッ素化合物が用いられていることをご存知だろうか？ フッ素と聞くと、一般には歯磨き粉に含まれたり、テフロンなどフライパンのコーティングに用いられていることぐらいしか思いつかないかもしれないが、代替フロンなどの冷媒や樹脂、ゴム、塗料、光ファイバー、液晶、半導体、農薬、医薬品、ガラスなどのコーティング剤として用いられるなど実に様々な分野で応用されている。そして、これらほとんど全ての製品が石油を原料とした炭化水素系化合物と無機フッ素化合物を原料として有機化学的に製造されているのである。

では、フッ素化合物は環境に配慮された循環型のプロセスが構築されているだろうか？ 当然、これらを社会に提供している企業は一定の環境配慮や安全性をクリアした上で製造していることは言うまでもないが、クリーンな循環型プロセスとして完成されたものか？ と言えば、それはまだ不十分な点も多い。

このような背景から我々は、より安全かつ環境に配慮されたプロセスとして生物由来の酵素機能を利用したフッ素

化合物循環プロセスの構築を目指している。これまで、フッ素化合物について生物機能を利用して合成・分解することはほとんどなされなかったが、これにはフッ素の独特な性質が障壁となっていたからである。次の章では、フッ素という物質がもたらす特徴について紹介していこう。

2. フッ素

フッ素は地球上(正確には地殻上)で13番目(クラーク数では、17番目)に多い原子であると言われており、この順位は他のハロゲン原子(塩素、臭素、ヨウ素)と比べても塩素(クラーク数:11番目)の次に当たり、その量は塩素の6分の1程度である¹⁾。しかし、海水中に存在するフッ化物イオンの濃度は塩化物イオンに比べて1万分の1にも満たないし、有機化合物として天然に存在するフッ素化合物はこれまでにたった13種類しか知られていない(図1)²⁾。ほとんどのフッ素は無機塩として岩石中に含まれており、表舞台には出てこないのである。この理由は何か？ 答えはフッ素が水に溶けにくいことに由来する。フッ素の電気陰性度は全元素中で最も高く、それゆえに強力な求核剤として振舞う。イオン状態であれば、カルシウムなどと強固に結合し無機塩となってしまう。また、一方で水に溶けたフッ化物イオンは強い溶媒和を引き起こすため、反応性の低いイオンとなってしまう。

このような超安定的な性質は、常に代謝という形で物質を循環させている生物界においては厄介な性質であり、生物からはほとんど利用されずに今日まで来た。我々人類は、このフッ素の超安定的性質を利用することで様々な有機フッ素化合物を開発し、耐熱性、耐酸性、撥水性など

の恩恵を受けてきたのである。しかし、最近になってフッ素化合物のバイオテクノロジーへの展開が注目されつつある。フッ素化を行う微生物や、有機フッ素化合物を脱フッ素化する微生物の報告が出てきているのである³⁾。特にここで注目したいのはフッ素化を行う酵素の発見である。次章ではフッ素とバイオテクノロジーというこれまでに融合できないと思われてきた分野を結びつける大きな一歩として期待されているフッ素化酵素、フルオリナーゼの紹介をしよう。

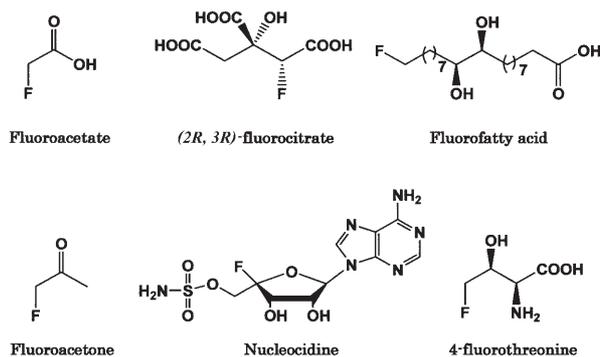


図1 天然化合物として見出されている有機フッ素化合物の代表例

3. フルオリナーゼの発見

有機フッ素化合物が生体の代謝産物として発見されたのは、1940年代のことであるが、無機のフッ化物イオンから直接フッ素化されたものができるという酵素反応が捉えられたのは、つい最近の2004年のことである⁴⁾。この事実は衝撃的なものであり、これまでのハロゲン化合物の合成機構とは全く異なる機構によるフッ素化反応が生体内で起こりうるということが証明された。

このフッ素化酵素、フルオリナーゼが見出された微生物 *Streptomyces cattleya* は、もともと無機のフッ化物イオンを培地に添加することで、モノフルオロ酢酸やモノフルオロトレオニンを生産することで知られていた細菌である⁵⁾。この細菌は抗生物質の生産など二次代謝能が豊富なことで知られている放線菌の一種で、フルオリナーゼと名づけられた酵素によってフッ化物イオンからC-F結合を作り、有機フッ素化合物である 5'-フルオロ-5'-デオキシアデノシン (5'-FDA) を作り出すことが明らかとなった (図2)。最終産物として報告されていたモノフルオロ酢酸やモノフルオロトレオニンからは、予想ができない化合物がフッ素化の出発物質であることが明らかとなり、その代謝経路には強い興味を持たれる。残念ながら、この代謝経路はいまだに全容がつかめていないが、明らかとなるのは時

間の問題であろう。

驚くべきは出発物質が *S*-アデノシル-*L*-メチオニン (SAM) であったことにある。SAMは生体内においてはメチル化の基質として供給され、ゲノムDNAのメチル化などに用いられる。DNAのメチル化反応は、生物が自己認識をする上で非常に重要な反応であるので、ほとんど全ての生物がSAMをメチル化の基質として用いているが、SAMが全く違う使われ方をした例は、恐らくこれが初めてであろう。フルオリナーゼは5'位の炭素をフッ素化することによって、アデノシンのフッ素化誘導体5'-FDAを生成する。この反応機構は、5'位の炭素を中心にして硫黄原子の背面からフッ化物イオンが求核的に攻撃する S_N2 型の反応であると考えられている。フッ化物イオンはこのとき水分子から脱溶媒和されていることが必要となり、非常に小さな結合ポケットにより、フッ化物イオンは脱溶媒和環境を提供されていることがフルオリナーゼタンパク質のX線結晶構造解析結果より示唆されている。

フルオリナーゼの大きな特徴の一つとして、このフッ化物イオンポケットの大きさが挙げられる。後に下流の引き込み系を強化することで塩素化合物の反応も進行することが明らかとなったが、結晶構造からの情報では塩化物イオンの入る大きさとしては不十分であると考えられていた。恐らく誘導適合などの酵素のフレキシビリティにより塩素化も多少は可能なのであろうが、その本質がフッ素化にあることは間違いなさだろう。いずれにせよ、初めてフッ化物イオンから C-F結合を作ることができる酵素が明らかとなったのである。

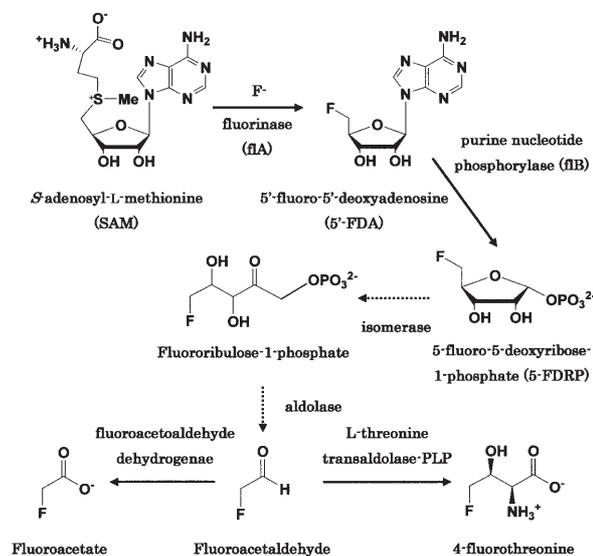


図2 放線菌 *S.cattleya* 内でのフッ素化反応とフッ素化合物の代謝経路

4. フルオリナーゼの応用と問題点

フルオリナーゼが、フッ化物イオンから有機フッ素化合物を合成することで知られている唯一の生体触媒であることを述べてきた。従って、この酵素が将来のフッ素化学とバイオテクノロジーを融合する上で、非常に重要な酵素であることは言うまでもなく、当面はフルオリナーゼをどのように応用できるかが重要課題であると言えよう。しかし、この酵素には少々問題がある。既に酵素の反応速度論的定数については、フルオリナーゼの立体構造が明らかにされると同時に報告されたが、回転数や基質との親和性はそれほど高いものではなく、酵素としての完成度は決して高いとは言えないものであった。実際、我々の研究室でも組換えのフルオリナーゼタンパク質を大腸菌内で発現して、精製した後、反応速度論的解析を行ったが、その反応性は非常に低いものであった。

そこで、将来的に応用する事を目指した上で、組換え系のフルオリナーゼタンパク質の効率を上げる方法が必要であると思われた。また、試験管内での酵素反応は基質の用意や、場合によっては酵素の精製が必要となり、必ずしも効率的とは言えない。組換え宿主内でフッ素化合物の生成が効率良く行えれば、発酵という形で生産が可能となり、生産性の向上も高く望める。次章からは、組換え系フルオリナーゼタンパク質を応用するための工夫として進めてきたアイデアを紹介しよう。

5. シャペロンタンパク質の導入による高効率化

生体の中にはシャペロンといわれるタンパク質が存在し、熱やその他のストレスにより変性・失活したタンパク質を再生する機構が備わっている。大腸菌においては GroE (GroEL/ES) (Hsp60/Hsp10 ファミリー)、DnaK/DnaJ (Hsp70/Hsp40 ファミリー)、HtpG (Hsp90 ファミリー) が主要シャペロンタンパク質として知られており、その中でも GroE タンパク質は生存に必須な唯一のシャペロンタンパク質である。外来のタンパク質を発現させると、タンパク質が不溶性画分や封入体を形成してしまうことが多く、そのような場合に GroE タンパク質を強制的に過剰発現することで、問題を解決できることが知られている⁶⁾。

そこで我々は、この外来タンパク質の効率的発現に有効な手段として知られている GroE タンパク質の導入をフルオ

リナーゼ組換え系に試みた(図3)。GroE タンパク質の過剰発現系によるフルオリナーゼの可溶化は期待したほどの成果には至らず、不溶性画分から可溶性画分へのタンパク質量の大きな移行は認められなかった。しかし興味深いことに、その後精製したフルオリナーゼを用いて反応速度論的解析を行ったところ、GroE タンパク質の過剰発現系で発現させたフルオリナーゼの方が酵素の回転数において4倍近くの向上が認められたのである⁷⁾。この原因ははっきりとは分かっていないが、組換え系のフルオリナーゼは精製を容易にするためにタンパク質の N 末端側にヒスチジンタグが付加されていることなどから、翻訳後の自然なフォールディングでは十分な酵素能力が発揮されず、シャペロン内でリフォールディングされることによって、より適切な状態へとタンパク質の立体構造が誘導されているのではないかと推測している。詳細な機構は今後の解析が待たれるが、いずれにせよシャペロンタンパク質を過剰発現させることにより、フルオリナーゼ組換え系の反応効率を上げることができた。

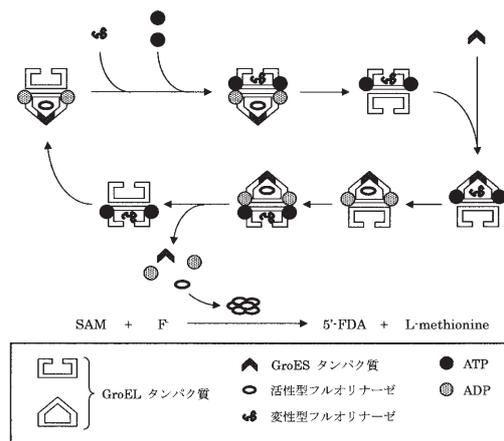


図3 GroE (GroEL/GroES)タンパク質によるフルオリナーゼの再生サイクル (フルオリナーゼは六量体を形成してフッ素化を行う。)

6. 基質供給系の強化

次に我々が改善策として注目したのは、基質の供給系である。フルオリナーゼが基質とする化合物は、フッ化物イオンと SAM である。SAM は前述の通り、生体内でのメチル化の基質として用いられるため、ほとんど全ての生物の中で合成される化合物である。しかし、フルオリナーゼ用の基質として十分に供給されているわけではない。試験管内でフルオリナーゼ反応を行うには、大過剰の SAM を加えて反応する必要がある。SAM が構造上不安定な物質であることに加えて、高価な化合物であることを考えると、SAM 合成酵素の共発現が迅速かつ安定的

な基質供給を可能にしてくれることが期待された(図4)。

この基質供給系の共発現による試験管内フルオリナーゼ反応の促進は、残念ながら現在のところ上手くいっていない。恐らくSAM合成酵素の不安定性によるものと思われるが、幸運なことに生細胞内でのフルオリナーゼ反応の促進にはつなげた。すなわち、これまではフルオリナーゼ組換え大腸菌の培養液にフッ化物イオンのみを添加しても、生成物であるフッ素化合物(5'-FDA)は検出できなかったが、SAM合成酵素の共発現によって充分検出が可能な量の生成が可能となったのである。将来的には、試験管内反応の促進にもつなげたいと考えているが、培地にフッ化物イオンを添加するだけで、後は培養するのみで5'-FDAの生成が可能となったことは、発酵法による有機フッ素化合物の生成を目指す上で非常に画期的な成果である。

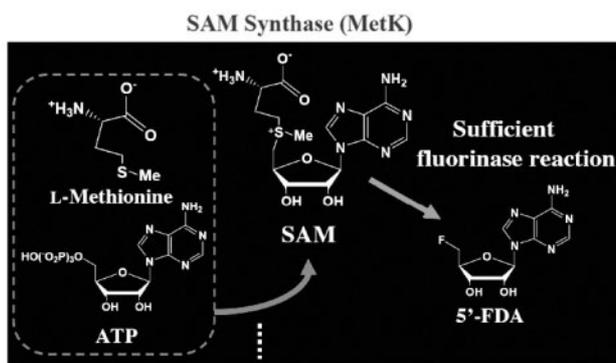


図4 効率的で安定な基質SAMの供給

7. フルオリナーゼの改変

近年、様々な手法を用いて元となるタンパク質のアミノ酸を変えたり、幾つかの相同的タンパク質配列をシャッフリングすることで、基質特異性を変化させたり反応性を上げる試みがなされてきている。進化工学などとも言われている手法である。フルオリナーゼはSAMに対しては結合定数 $74\mu\text{M}$ という高い親和性を示すが、フッ化物イオンに対しては 2mM と30倍近く、親和性が低い。我々はフルオリナーゼの完成度が低い原因(反応性の悪さ)はそこにあるのではないかと考えており、フッ化物イオンに対する親和性の向上が、反応の本質的な改善につながるものと考えている。

では、どこをどう改善すれば良いのだろうか?この答えは一朝一夕で導けるほど単純なものではないだろう。しかし、タンパク質の立体構造情報が明らかとなり、フッ化物イオンポケットを構成しているアミノ酸残基はほぼ明らかである(図5)。図5に示すように、フルオリナーゼの反応場は互いに異

なるフルオリナーゼのN末端ドメインとC末端ドメインによって挟まれる形で構成されており、N末端ドメイン側のアミノ酸残基によって形成されるフッ化物イオンポケットにフッ化物イオンは収まる。一番コンタクトをとると考えられるのは158番目のセリンであるが、脱溶媒と環境を形成するためには、156番目のフェニルアラニンも重要であると推測される。また、SAMのリボース環と水素結合を介すると思われる16番目のアスパラギン酸も、158番目のセリン残基であるヒドロキシル基の方向を規定すると思われ、これらのアミノ酸の変換がフッ化物イオンに対する親和性に大きく変化をもたらすことが容易に推測できる。現在我々の研究室では、この推測に従って研究を進めている。

酵素が長い年月を掛けて進化してきた賜物であることを考えれば、アミノ酸一置換がもたらす影響は基本的に向上ではなく減衰である。しかし、フッ素化酵素がまだ世の中に多く存在しないものであることを考えると、複数のアミノ酸置換などが面白い効果をもたらす余地があるのではないかと思う。我々もまだ見ぬ完成度の高いフッ化物イオンポケット構造を期待しながら、フルオリナーゼの変異体を設計し、進化型フルオリナーゼの構築を試みている⁸⁾。

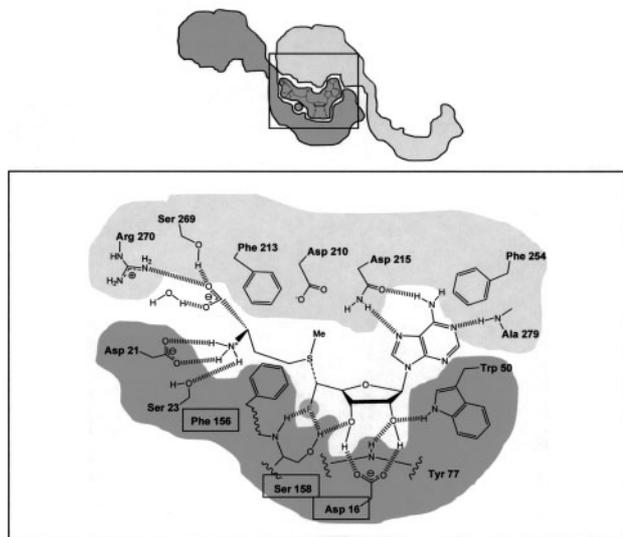


図5 X線結晶構造解析より明らかとなったフルオリナーゼの基質結合ポケット(フッ化物イオンポケットを形成する3残基を四角で囲った。)

8. 下流代謝経路の魅力

フルオリナーゼが発見されてからしばらく、その後の反応経路は謎に包まれていたが、2006年にフルオリナーゼをコードする*fIA*付近の遺伝子が調べられ、次の反応にかかわる酵素が報告された⁹⁾(図6)。*fIB*と名づけられたこの遺

伝子の産物は、5'-FDA を脱アデニン化しリン酸化するヌクレオチドホスファターゼの一種であり、5-フルオロ-3-デオキシ-1-リン酸リボース (5-FDRP) を生成する。興味深いことは、*flA* を挟んで前後に 12 kb (11 ORF) も、フッ素化合物代謝関連遺伝子候補が見つかったにもかかわらず、*flB* 以降の代謝関連遺伝子は一つも見つからなかったことである。フルオロクラスターと名づけられたこの一連の遺伝子群に含まれていたものは、フッ素化合物に対する耐性を獲得する上で重要となったであろうフルオロアセチル-CoA 分解酵素や、フルオリナーゼ反応の阻害剤となる *S*-アデノシル-*L*-ホモシステイン (SAH) の分解酵素 (SAH は SAM の脱メチル化合物であり、生体内では容易に生じる) だけで、他に ORF として見出されたものは輸送系タンパク質や DNA 結合タンパク質 (転写因子候補) のみであった。恐らく、*S. cattleya* のゲノム上にまだ他のフルオロクラスターが存在し、最終産物であるモノフルオロ酢酸やモノフルオロトレオニンまでつながる遺伝子がまとまっているのではないかと期待される。

flB からの下流反応を効率よくスクリーニングする系が構築できれば、第二のクラスター発見につながるのではないかと考えており、我々もスクリーニング系の構築を目指している。下流代謝経路はフッ素化反応には直接関わらない反応だが、有機フッ素化合物耐性メカニズムや、有機フッ素化合物代謝機構を考える上で非常に重要なヒントを与えてくれるであろう。これまでにリパーゼのような生体触媒がフッ素化合物を基質とすることが可能であることが示されてきたが、これらは生体にとって本質的なものではなく、フッ素化合物を生体触媒により利用するための核心的な情報にはつながりにくい。今後、生体触媒を用いたフッ素化合物循環プロセスの構築を目指す上で、フッ素化合物を本質的に扱う酵素の情報収集は非常に重要であり、フッ素のバイオテクノロジーの発展には欠かせない情報となるであろう。

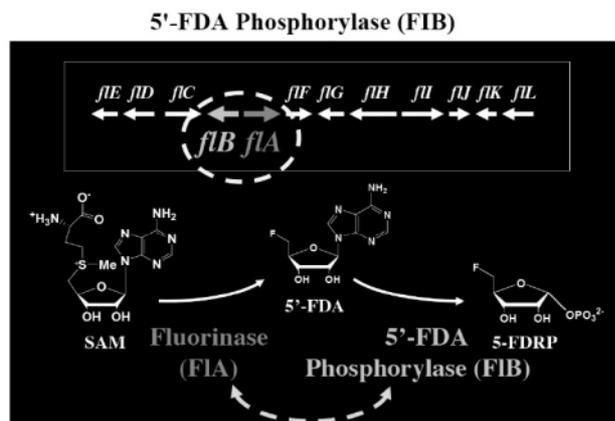


図6 下流代謝経路

9. 最後に

以上で、フッ素化酵素 (フルオリナーゼ) の概説と我々の研究室での応用化への試みを簡単に紹介してきたが、最後にフッ素化学とバイオテクノロジーの今後について述べてみたい。

冒頭でも述べたことであるが、フルオリナーゼはフッ素のバイオテクノロジーを切り開いていく上での第一歩である。数少ないとは言え、有機フッ素化合物を利用している生物は少なからず存在し、これらの生物のほとんどがフッ化物イオンをその原料としているであろう。従って、様々なアイデアを用いて、より巧妙なスクリーニング系を構築する事で第二、第三のフッ素化酵素も見つかるにちがいない。フルオリナーゼがこれまでに報告されてきたどのタンパク質とも類似していなかった (相同性が低かった) ことを考えると、新しいフッ素化酵素がまだまだ地球上には存在していても不思議ではないのである。このようなフッ素をとりまく生物情報が蓄積されていくことで、フッ素が生体触媒にとって不可能な材料ではない日が訪れることを強く期待している。

同時に、我々は作り出したものを元へ戻すことも考えなければならない時代に来ている。有機化学的に、また生物化学的に作り出された有機フッ素化合物を再度フッ化物イオンへと戻すシステムを生体機能により構築することも、重要な命題となるであろう。既に、有機フッ素化合物を分解し、脱フッ素化する微生物の報告があることは最初に述べた通りである。フッ素資源が生物機能のみで循環できるシステムが構築される日も夢ではないだろう。

参考文献

- 1) E.A. Paul, P.M. Huang, Handbook of Environmental Chemistry, 1980, **1**, 69
- 2) D. O'Hagan, D.B. Harper, *J. Fluorine Chem.*, 1999, **100**, 127
- 3) R. Natarajan, R. Azerad, B. Badet, E. Copin, *J. Fluorine Chem.*, 2005, **126**, 425
- 4) C. Dong, F. Huang, H. Deng, C. Schaffrath, J.B. Spencer, D. O'Hagan, J.H. Naismith, *Nature*, 2004, **427**, 561
- 5) M. Sanada, T. Miyano, S. Iwadera, J.M. Williamson, B.H. Arison, J.L. Smith, A.W. Douglas, J.M. Liesch, E. Inamine, *J. Antibiotics*, 1986, **39**, 259
- 6) J.G. Thomas, A. Ayling, F. Baneyx, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1997, **66**, 197
- 7) N. Iwai, T. Akashi, S. Nakajima, T. Kitazume, To be submitted.
- 8) 中島 聡, 松下 知宏, 岩井 伯隆, 北爪 智哉, 第30回フッ素化学討論会, 2006.
- 9) F. Huang, S.F. Haydock, D. Spiteller, T. Mironenko, T-L. Li, D. O'Hagan, P.F. Leadlay, J.B. Spencer, *Chem. & Biol.*, 2006, **13**, 475