

博士學位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

(平成25年度授与分)

第16号

平成26年 5 月



富 山 県 立 大 学

目 次

論文博士

(学位の種類)	(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博士 (工学)	論博生第7号	安 川 和 志	New enzymatic synthetic methods of chiral amino acids and amines	1

氏 名 やす かわ かず ゆき
安 川 和 志

学位の種類 博士（工学）

学位授与日 平成26年3月24日

論文題目 New enzymatic synthetic methods of
chiral amino acids and amines
(光学活性アミノ酸とアミンの新規不斉合成法に関する研究)

論文審査委員 (主査) 富山県立大学 教 授 浅野 泰久
教 授 加藤 康夫
教 授 中島 範行
准教授 米田 英伸
関西大学 教 授 老川 典夫

内容の要旨

光学活性アミノ酸およびアミン化合物は、農薬や医薬品などの重要な合成中間体である。それらをより効率的に生産する手法の開発は、基礎および応用の両面から注目を集めている。光学活性アミノ酸の合成には、1) 不斉有機合成技術を利用する製造法、2) 光学分割剤を利用する製造法、および3) 酵素触媒を利用する製造法などを挙げることができる。1) の手法には、不斉Strecker合成や不斉C-Cカップリング反応などがある。これらの合成法の問題点として、触媒にかかるコストおよび触媒除去に関わる操作の煩雑さが挙げられる。2) の手法は古くに開始され、現在も広く利用されているが、用いる光学分割剤は高価であり入手が難しい。また、光学分割剤と光学活性アミノ酸の分液抽出は酸や塩基の添加による中和を経なければならないため、それらの回収操作は煩雑である。3) の手法では、非天然型L-アミノ酸やD-アミノ酸については、発酵による生産法が確立されておらず、酵素を用いる変換法が主である。酵素法では、生産できるアミノ酸の種類が酵素の基質特異性に依存するため、特定のアミノ酸のみにしか適用できない場合が多い。また、酵素反応の温度、pH、基質濃度、溶媒などの条件は限定されており、使用条件を逸脱すると酵素活性は著しく低下してしまうなどの問題点を有している。

一方、光学活性アミンの合成法としては、主に酒石酸、酒石酸誘導体、光学活性マンデル酸などとジアステレオマー塩を作り晶析を行う方法、ラセミ体アミンのリパーゼを用いるアミド形成反応による方

法、およびアミノトランスアミナーゼを用いる方法が知られているが、いずれの方法も光学分割法であるため理論収率は50%を越えることがない。また、これらの方法は、未反応の基質と生成物を分離しなければならず、その工程は、煩雑さを伴う問題点がある。近年では、S立体選択的なアミノキシダーゼと還元剤を同時に用いる、ラセミ体アミンからR体アミンへのデラセミ化法に関する研究が行われている。しかし、R立体選択的なアミノキシダーゼに関する知見は無く、デラセミ化法によるS体アミンの合成法は報告されていない。

本研究は、 α -アミノニトリルのダイナミックな光学分割 (DKR) による光学活性アミノ酸の合成、およびラセミ体アミンのデラセミ化法による (S)-アミンの合成に関するものである。第一章から第三章では、 α -アミノニトリルのDKR法による光学活性アミノ酸の合成に関して、第四章では、新規に開発したR立体選択的なアミノキシダーゼを用いるラセミ体アミンのデラセミ化法によるS体アミンの合成法について記載した。

第一章では、 α -アミノニトリルを基質とするNHaseの酵素化学的諸性質の解明を行い、それを用いるDKR法による α -アミノニトリルから光学活性アミノ酸への変換を述べている。ラセミ体 α -アミノニトリルから光学活性アミノ酸を得る酵素的な方法としては、1) ニトリルヒドラーゼ (NHase) と立体選択的なアミダーゼを組み合わせる方法、および2) 立体選択的なニトリラーゼを用いる方法がある。しかし、両方法とも光学分割法であるので、得られる光学活性アミノ酸の収率は、最大で50%を上回ることはない。土壌サンプルより分離した*Rhodococcus opacus* 71Dが生産するNHaseは、培地中へのブチロニトリルの添加により誘導され、 α -アミノブチロニトリルに対して非立体選択的に α -アミノブチルアミドへと変換する高いNHase活性を有していた。*R. opacus* 71D由来NHaseを、種々のカラムを用いて均一に精製し、酵素化学的諸性質を明らかにした。本酵素の基質特異性は、 α -アミノブチロニトリルに対する活性を100% ($1,040\text{Umg}^{-1}$) とすると、アクリロニトリルやブチロニトリルの脂肪族ニトリルに対する比活性は、それぞれ147%、363%であった。また、ベンズニトリルやマンデロニトリルのような芳香族ニトリルに対してそれぞれ比活性72.9%、70.7%と高い活性を示し、非常に幅広い基質特異性を示した。また、種々の α -アミノニトリルに対しても非立体選択的に作用することを明らかにした。アラニニトリル、 α -アミノブチロニトリル、バリロニトリル、ロイシノニトリル、フェニルグリシノニトリルおよびフェニルアラニニトリルに対するE値は、それぞれ、1.3、1.2、1.1、2.1、1.6および1.0と算出され、目的の反応に合致する性質を示した。本反応の基質である α -アミノニトリルは、水中で容易にアルデヒドとシアンに分解され、また一般的にNHaseは低濃度のシアンで強く阻害されやすい。しかし、本NHaseは、高いシアン耐性を有しているため、シアン存在下でも効率良く α -アミノニトリルから α -アミノ酸アミドへの変換が可能であった。このように、 α -アミノニトリルに作用するNHaseの詳細な酵素化学的諸性質を初めて明らかにした。さらにNHase、RまたはS立体選択的なアミド加水分解酵素およびACLラセマーゼの精製酵素を用いて、 α -アミノニトリルからRまたはS体の光学活性アミノ酸への変換が可能であることを示した。

第二章では、NHase遺伝子の発現および3種類の組換え大腸菌を用いる、 α -アミノニトリルのDKRによる光学活性 α -アミノ酸の合成について論じている。第一章では、 α -アミノニトリルに対して非立体選択的に作用するNHaseを開発し、NHase、RまたはS立体選択的なアミド加水分解酵素、およびACLラセマーゼの3種類の精製酵素を用いて、 α -アミノニトリルから光学活性アミノ酸へのDKRに成功している。しかし、菌体やその菌体処理物を用いて光学活性アミノ酸を合成する際の問題点として、菌体のアミノ酸代謝に関わる酵素群による副生成物の増加、収率の低下、あるいはアミノ酸ラセマ

ーゼによる望まない立体のアミノ酸の副生などが挙げられる。本章ではまず、*R. opacus* 71D由来NHase遺伝子のクローニングを行い、その遺伝子配列とアミノ酸配列を決定した。NHase遺伝子はアルドキシムデヒドラターゼ、アミダーゼ、NHase遺伝子などと遺伝子クラスターを形成していることが知られている。本NHase遺伝子周辺にも同様の遺伝子クラスターの存在を確認した。またNHase遺伝子の下流には、NHaseシャペロンタンパク質遺伝子 (p15K遺伝子) が存在し、その下流にインバーテッドリピート配列を確認した。よって、本菌株では、他のNHase生産菌同様に、アルドキシムデヒドラターゼ遺伝子からp15K遺伝子がポリシストロニックなオペロンを形成していることが明らかとなった。本NHase遺伝子を大腸菌内で発現させた。NHaseは、 α 、 β サブユニット遺伝子の下流に存在するシャペロンタンパク質遺伝子と共発現させることにより活性型のNHaseとして発現できることが知られている。本菌株由来NHase遺伝子も同様にp15K遺伝子と共発現を行ったが発現量は非常に低いものであった。そこで、NHase遺伝子の終止コドンとp15K遺伝子の開始コドンがオーバーラップ (ATGA配列) している区間に着目しNHase遺伝子とp15K遺伝子の間に新しくSD配列を加え、大腸菌で発現させた。このように改良したNHase遺伝子は、大腸菌内で高発現し、乾燥菌体 1 g当たり野生株の30倍の活性を示した。NHase、ACLラセマーゼ、およびDAP遺伝子をそれぞれ発現させた大腸菌の無細胞抽出液を用いて200mM α -アミノブチロニトリルから (*R*)- α -アミノ酪酸を合成した。しかし、68.6% eeと非常に低い鏡像体過剰率しか得られなかった。種々条件検討を行い、ACLラセマーゼ遺伝子を発現させた大腸菌の無細胞抽出液を熱処理し、基質の α -アミノブチロニトリルを逐次添加することで効率良く *R* 体アミノ酪酸の合成に成功した。

第三章では、芳香族 α -アミノニトリルのDKRについて述べている。第一章および第二章で述べたように、 α -アミノニトリルのDKRによる光学活性アミノ酸の合成に成功した。しかし、側鎖の大きいアミノ酸アミドのラセミ化は、ACLラセマーゼの狭い基質特異性のため効率が悪かった。そこで、すでに得られていたフェニルアラニンアミドに対し高活性を示す変異型ACLラセマーゼ (L19V/L78T) を用いた。変異型ACLラセマーゼおよび*R* 立体選択的アミダーゼ遺伝子を共発現させた組換え大腸菌を作成し、それを用いてフェニルアラニンアミド (400mM) から効率よく (*R*)-フェニルアラニン (395mM) を合成することに成功した。また、変異型ACLラセマーゼおよび*S* 立体選択的アミダーゼ遺伝子を共発現させた組換え大腸菌を用い、フェニルアラニンアミド (400mM) から (*S*)-フェニルアラニン (390mM) を合成することにも成功した。その他、同様に*R* および*S* 体のフェニルアラニンアナログを合成した。さらにNHase遺伝子を発現させた大腸菌、および変異型ACLラセマーゼ並びに*R* 立体選択的アミダーゼ遺伝子を共発現させた大腸菌を用いることにより、フェニルアラニンニトリルから効率よく (*R*)-フェニルアラニンを合成した。

以上のように第一章から第三章では、 α -アミノニトリルを非立体選択的に水和してラセミ体 α -アミノ酸アミドを生成するNHaseを取得し、その酵素化学的諸性質を明らかにした。遺伝子組換え技術で大量発現させたNHase、ACLラセマーゼおよび立体選択的アミダーゼを用いる α -アミノニトリルのDKRによる光学活性アミノ酸の合成に成功した。NHaseを用いる既報の α -アミノニトリルの光学分割法では、収率が50%を超えることは無かったが、本法は理論収率100%の新しい光学活性 α -アミノ酸合成法である。また、フェニルアラニンアミドに対しラセミ化反応を示す変異型ACLラセマーゼを野生型の代わりに用いることにより、芳香族 α -アミノニトリル化合物のDKRによる光学活性アミノ酸の合成に成功した。

第四章では、*R* 立体選択的アミノキシダーゼ活性を有する変異型ブタ腎臓由来D-アミノ酸オキシダ

ーゼの開発とデラセミ化反応への応用を述べている。デラセミ化法は、ラセミ体基質の片方の立体のみをもう一方の立体へと反転させる方法であり、理論収率100%で目的の光学活性体を得ることができる。また、出発基質と反応生成物の構造が同じであるため、未反応基質と生成物の煩雑な分離が不要であり、他の合成法と一線を画する大きなメリットを有する。

動物、植物および微生物由来の非常に多くのアミノキシダーゼ (AOx) が報告されているにも関わらず、それらが光学活性アミン合成に応用された例はわずかしかない。一例として、S 立体選択的な AOx の開発により、それらの酵素と還元剤を反応系内で同時に用いることによる、ラセミ体アミンから R 体アミンへのデラセミ化法の研究が報告されている。しかし、自然界に R 立体選択的な AOx の存在は知られておらず、それをを用いたデラセミ化法による S 体アミンの合成法は不可能であった。本研究では、ブタ腎臓由来 D-アミノ酸オキシダーゼ (pkDAO) を基に R 立体選択的な AOx の開発に成功した。次に、それをを用いたラセミ体アミンから S 体アミンへのデラセミ化法を実現した。野生型 pkDAO の立体構造を基に、基質のアミノ酸の α -カルボキシル基と相互作用している Arg283 と Tyr228 に着目して飽和変異を導入しスクリーニングを行った結果、(RS)- α -メチルベンジルアミン (MBA) に対して酸化活性を示す変異株を複数得た。得られた全ての変異株は、MBA に対して極めて高い R 立体選択性を示した。これら変異株の中から最も活性の高い変異型酵素 (Y228L/R283G) を、SDS-PAGE 上で単一に精製し基質特異性の検討を行った。変異型酵素は、(R)-フェニルアラニンなど D-アミノ酸に全く作用せず、(RS)-MBA に対して R 立体選択的に酸化することを明らかにした。アミノ酸オキシダーゼとアミノキシダーゼはそれぞれ交わることのない全く別の基質特異性を示す。今回、このようにわずか 2 残基のアミノ酸の変異により、酵素活性の変換を行うことができた。また、精製した変異型酵素を用いて、100mM NaBH₄ 存在下で (RS)-MBA (5 mM, 0.24g) を (S)-MBA に効率良く変換することに成功した。変異型酵素と基質複合体の結晶構造解析を行った。既知の野生型 pkDAO の結晶構造中の阻害剤の安息香酸のフェニル環が FAD のウラシル環上にあるのに対し、(R)-MBA のフェニル環は、Y228L と R283G の変異により FAD のキシレン環上に新たに形成された疎水性ポケットに位置し、FAD と Tyr224 のキシレン環にはさまれる形で π - π スタッキングを形成していた。そのため、本変異体酵素では、(R)-MBA の α -H が FAD の N5 原子の方向に位置することで反応可能な距離を形成し、(R)-アミンの触媒反応に必要な構造を形成していることを明らかにした。

以上のように、第四章では、新規な R 立体選択的な AOx を開発し、デラセミ化法による S 体アミンの合成に成功した。また、変異型酵素の基質複合体結晶構造を解明した。この結果は、将来 R 立体選択的な AOx の改良や第二の R 立体選択的な AOx の開発に役立たせることができる。

審査の結果の要旨

本論文は、光学活性アミノ酸およびアミンの効率的な生産法の開発を主題としている。アミノニトリルに作用するニトリルヒドラーゼ(NHase)を新たに開発し、その酵素化学的諸性質を解明した。NHase、ACLラセマーゼ、および*R*または*S*立体選択的なアミド加水分解酵素を用いるダイナミックな光学分割(DKR)法により、光学活性アミノ酸の効率的な生産システムの構築を行っている。新規に*R*立体選択的なアミノキシダーゼを開発し、酵素の機能解析を行い、X線構造解析により基質認識メカニズムを明らかにした。また開発した酵素をラセミ体アミンから*S*体アミンへのデラセミ化反応に応用している。

本論文は、光学活性アミノ酸とアミンの新規不斉合成法に関する研究と題し、全四章で構成されている。主な内容は以下の通りである。

(1) アミノニトリルを非立体選択的に水和するNHase生産菌*Rhodococcus opacus* 71Dを土壌サンプルより分離した。本菌株由来のNHaseを単一に精製し、未だ検討されていなかったアミノニトリルを含む幅広いニトリル化合物との相対活性を算出し、酵素化学的諸性質を明らかにした。精製したNHase、各種立体選択的アミダーゼ、およびACLラセマーゼの各3種類の酵素を用いて、過去に全く報告のないラセミ体アミノニトリルのDKRによる光学活性アミノ酸の合成法を開発した。

(2) *R. opacus* 71D由来NHase遺伝子のクローニングを行い、本遺伝子を大腸菌内で発現させた。NHaseとACLラセマーゼ、および*R*立体選択的アミダーゼを含む3つの無細胞抽出液を一つの反応槽で用いて、ラセミ体 α -アミノブチロニトリルから*R*体アミノ酪酸への変換に成功した。得られた反応生成物は、高純度の光学活性体であることを証明した。

(3) 変異型ACLラセマーゼおよび*R*または*S*立体選択的アミダーゼ遺伝子を共発現させた大腸菌を製作し、ラセミ体フェニルアラニンアミド誘導体から対応する*R*または*S*体アミノ酸へのDKRに成功した。さらにNHase遺伝子を発現する大腸菌と組合わせて用い、フェニルアラニニトリルから効率よく(*R*)-フェニルアラニン合成することに成功した。

(4) ブタ腎臓由来D-アミノ酸酸化酵素を基にする進化分子工学的手法により、自然界に存在が確認されていない*R*立体選択的アミノ酸化酵素を開発した。変異型酵素と基質複合体の結晶構造解析により、(*R*)-アミンの触媒反応に必要な構造を形成していることを明らかにした。変異型酵素と還元剤とを同時に用いて、ラセミ体 α -メチルベンジルアミン(MBA)から*S*体MBAへのデラセミ化に世界で初めて成功した。

以上のように第一章から第四章まで、光学活性アミノ酸とアミンの新規不斉合成法について論じている。DKR法とデラセミ化法は、基質を理論収率100%で光学活性体へと変換できる極めて優れた合成法である。光学活性アミノ酸の合成に関する研究では、 α -アミノニトリルに非立体選択的に作用するNHaseを開発し、その酵素化学的諸性質を解明した。NHaseを高発現する組換え大腸菌を作成し、光学活性アミノ酸を理論収率100%で合成できる α -アミノニトリルのDKR法を開発した。光学活性アミンの合成に関する研究では、*R*立体選択的なアミノキシダーゼを進化工学的手法により開発し、X線構造解析より変異酵素の基質認識機構の解明を行うと共に、デラセミ化法によるラセミ体MBAから*S*体MBAへの合成に成功している。本研究が当該分野に寄与する影響は大きい。

平成26年2月5日に博士論文の審査および最終試験を行った結果、申請者は、学術研究にふさわしい討論ができ、当該分野に関して博士としての十分な学識と独立して研究を遂行する能力を有するものと判定し、本論文は博士(工学)の学位論文として合格であると認められた。

