

令和元年6月20日現在

機関番号：32685

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05706

研究課題名(和文) アルブミン変異体を用いる効率的な不斉ニトロアルドール反応に関する研究

研究課題名(英文) Studies on Asymmetric Nitroaldol Reaction using mutant albumins

研究代表者

松本 一嗣 (Matsumoto, Kazutsugu)

明星大学・理工学部・教授

研究者番号：90260215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：HSAを用いた反応を応用し、ポリマー合成原料や蛍光標識物質、機能性リガンド等になりうる光学活性ビフェニル誘導体を効率的に合成することが可能となった。一方、<sup>1</sup>H-NMRのWaterLOGSY法により、HSAにおける低分子結合部位の立体構造がエナンチオ面選択の反応に必須であることを確かめることが出来た。

HSAを高度に精製するため、多くのHSAを産生する必要がある。PichiaPink Expression System (Invitrogen) により、HSA分泌発現株を構築した。その結果、培養上清1 mlあたり0.32 mgのHSAを分泌発現する高発現クローンを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルブミンというありふれたタンパク質の新機能を用いて、現在注目される水中不斉合成を試みた本研究は、有機合成化学・タンパク質化学の境界領域の研究テーマとして極めてユニークといえる。また、本反応の最適化を達成し、光学活性ビフェニル化合物を効率的に得られる新手法を明示したことにより、有機化学的にも大きな意味がある。一方で、HSAを高度に精製するために、HSAを分泌発現する高発現クローンを構築することができ、アルブミン変異体ライブラリー作製のノウハウを築けたことは、分子生物化学的にも医学的にも意義深いといえる。

研究成果の概要(英文)：We applied the reaction to prepare optically active biaryl-containing compounds. The reaction of 4-phenylbenzaldehyde with nitromethane was carried out using human serum albumin to afford the corresponding (R)-alcohol. The NMR analysis of the reaction mixture indicated that the substrate apparently interacted with albumin under the reaction conditions.

In order to obtain highly purified HSA, it is necessary to express and secrete a lot of HSA. Therefore, we conducted a construction of the PichiaPink Expression System (Invitrogen). Six kinds of plasmids were constructed by the combination of pPink-HC and pPink-LC plasmids and three secretion signals. These plasmids were introduced into Pichia pink strains 1 to 4 to construct a total of 141 HSA-secreting Pichia strains. As a result, a high expression clone was obtained which expressed and secreted 0.32 mg of HSA per 1 ml of culture supernatant.

研究分野：有機合成化学

キーワード：アルブミン 不斉ニトロアルドール クローニング 光学活性ビフェニル化合物

## 1. 研究開始当初の背景

グリーン・サステイナブル化学が重視される近年、安価で無毒な水を溶媒として用いる合成手法の開発が盛んである。特に、有機分子触媒を用いる反応手法の発展はめざましいが、水だけを溶媒とした場合には必ずしも十分な結果は得られていない。それに対し、生体内で働く酵素等の生体触媒は、本来水中で機能を発揮するものであり、水を溶媒とした反応としては一日の長があるといえる。

酵素は生体内で特定の反応を触媒するが、近年、本来の働き以外にも異なる機能を有していることが明らかになりつつある。加水分解酵素リパーゼが、芳香族アルデヒドとアセトンのアルドール反応を触媒するのも、その一例である。このような、生体触媒の別機能発現は「promiscuity」と呼ばれ、新たな研究領域として世界的に注目されている。一方、類似した現象として、本来触媒機能を有しない生体由来物質が、有機合成反応を触媒する例も見出されている。例えば、ありふれたタンパク質の血清アルブミン (Serum Albumin) が、様々な有機合成反応を触媒することが知られてきている。元々マルチな生理機能を有するアルブミンは、低分子有機化合物を識別して結合し、血液中を輸送する役割をもつ。この結合部位が、あたかも酵素活性部位のような反応場を与えるものと考えられている。アルブミン自体は以前からよく研究されているが、有機合成反応への応用に関してはまだまだ未知の部分が多く、国内外で研究例が増えつつある。

申請者は以前から、アルブミンの持つ特異な機能に注目し、エノールエステルの酵素加水分解における不斉選択性発現機能や、芳香族アルデヒドを基質としたニトロアルドール反応不斉触媒機能を水溶媒中で見出し、研究を進めてきた。特にヒト血清アルブミン (Human Serum Albumin, HSA) を用いる後者は、*in vitro* 系では酵素でも困難な C-C 結合形成により、医薬品原料となる光学活性ニトロアルコールを得られるものであり、新規性・有用性が共に高いものである。しかし、反応性・エナンチオ選択性は十分なものではなく、基質適用範囲の狭さ、高純度アルブミンが比較的高価といった問題点もあった。これらの解決には、有機化学的なアプローチだけでは限界があるので、遺伝子工学的手法により、アルブミンの大量調製、及び、反応場を構成するアミノ酸残基の置換により、問題点を克服し研究を発展させられるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

安価で無毒な水が反応溶媒として見直されている今日、本研究では、新たな生体触媒として期待されるアルブミンの触媒機能を探るとともに、更なる機能向上を試み、水を溶媒としてアルブミンを用いる環境調和型新規不斉合成反応を発展・確立させることが目標である。反応としては、申請者が既に明らかにしているヒト血清アルブミン (HSA) による不斉ニトロアルドール反応に焦点を絞り、以下の検討を行う。

### (1) 従来反応のブラッシュアップと応用

市販の様々なアルブミンを用いることで、反応条件の最適化で、より効率的な不斉合成反応を確立する。また、幅広い基質での反応を試み、特に、実用性が期待できる光学活性ビフェニル体の合成を試みる。また、組換えアルブミンを用いた反応を想定し、スクリーニングに最適な反応条件を確立する。また、反応における、アルブミンと基質の相互作用を NMR により解析する。

### (2) アルブミン変異体ライブラリーの構築と反応への応用

市販の HSA 遺伝子を元に、ピキア酵母の形質転換体から組換えアルブミンを分泌発現させる。そして、これをベースに、部位特異的あるいはランダム突然変異法により、アミノ酸配列を入れ換えた各種アルブミン変異体のライブラリーを構築する。

## 3. 研究の方法

### アルブミンを用いた生体触媒反応

触媒として用い、水を溶媒として、*p*-フェニルベンズアルデヒドとニトロメタンの縮合反応の検討を行った。そして HSA、H<sub>2</sub>O、ニトロメタンのそれぞれの量、温度、反応時間などを変えて反応を試み、条件を最適化した。その際に光学活性カラムを用いた HPLC により反応変換率、エナンチオ選択性の解析を行った。

### アルブミンと基質の相互作用に関する分析

重水素置換ニトロメタン-水を溶媒として、NMR チューブに基質とアルブミンを加え、生体触媒反応のリアルタイム解析を行った。解析手法としては、タンパク質とリガンドの相互作用解析として実績のある、WaterLOGSY 法を採用した。

### ピキア酵母用 HSA 分泌発現プラスミドの構築

pTOT\_HSA\_BC036003 (transOMIC technologies) 中のヒト HSA のシグナルペプチドを除いた cDNA または cDNA をインフュージョニングにより、pPICZαA プラスミドの α ファクター分泌シグナルの下流、または α ファクター分泌シグナル (α-factor secretion signal, αSS) と入れ換えるように、それぞれサブクローニングし、HSA 分泌発現プラスミド pRK002 または

pRK004 を構築した。さらに、pRK002 または pRK004 の分泌シグナルを含んだ HSA の cDNA を、pPink-HC または pPink-LC プラスミドにサブクローニングし、pTT021 ( HC  $\alpha$ SS-HSA ) 022 ( LC  $\alpha$ SS-HSA ) 023 ( HC short- $\alpha$ SS-HSA ) 024 ( LC short- $\alpha$ SS-HSA ) pTH037 ( HC HSA ) 038 ( LC HSA ) を構築した。

#### HSA 分泌発現株の構築

上記の HSA 分泌発現プラスミドを制限酵素で直鎖状にし、ピキア酵母株 X-33、ピキアピンク Strain 1~4 を LiCl 法またはエレクトロポレーション法により形質転換した。選択培地上に形成された形質転換体を単離し、各プラスミドのゲノムへの挿入部位を PCR 法により解析し、HSA 分泌発現ピキア酵母株を構築した。

#### HSA の分泌発現とその定量

HSA 分泌発現株を 5 ml の BMGY 培地で 30°C、30 時間、200 rpm で培養し増殖させた ( 約 0.3 g 湿重量 )。次に、0.5 ml の BMMY 培地で 30°C、36 時間、200 rpm で培養し、HSA の分泌発現を行なった。18 時間後に 100%メタノールを 2.5  $\mu$ l 添加した。培養液を遠心し細胞を沈殿とし、その上清を SDS-PAGE に供した。CBB 染色を行い、分泌された HSA の質量を定量した。

#### HSA の精製

2.5 L の培養上清に 976 g の硫酸アンモニウムを徐々に添加しスターラーで穏やかに攪拌しながら溶解し、60%飽和溶液とした。4°C で 2 時間、攪拌した。4°C、8000 rpm で遠心し沈殿を得た。その沈殿を、10 ml の蒸留水に溶解した。次に、脱塩カラム( Econo-Pac 10DG Desalting Columns, Bio-Rad ) により精製し、アミコン ( MILLIPORE, Ultracel-3K ) により濃縮し、粗精製 HSA とした。

### 4. 研究成果

#### ( 1 ) 従来反応のブラッシュアップと応用

これまでに、ヒト血清アルブミン ( Human Serum Albumin, HSA ) を用いることで、芳香族アルデヒドを基質としたニトロアルドール反応不斉触媒機能を見出している。高純度 HSA が比較的高価であり、反応性・エナンチオ選択性をさらに向上させる上でも、更なる検討が必要となった。まず、従来反応を見直し、反応条件の最適化を行った。基質としては、4-ニトロベンズアルデヒドを用いて最適条件を探ただけでなく、様々な基質での反応を行うことで、本反応の基質適用範囲の確認を行うことができた。また、市販されている米の種子から得られる組換え HSA を用いた反応でも、不斉ニトロアルドール反応が進行することを確認した。また、タンパク量を抑えた、組換えアルブミンを用いる反応におけるスクリーニング法を開発した。

一方、HSA を用いた反応を応用し、ポリマー合成原料や蛍光標識物質、機能性リガンド等になりうる光学活性ビフェニル誘導体の効率的な合成を試みた。HSA を触媒として用い、水を溶媒として、*p*-フェニルベンズアルデヒドとニトロメタンの縮合反応の検討を行った。反応条件の検討から、基質 12.0 mg ( 0.066 mmol ) に対し HSA 15 mg、H<sub>2</sub>O 0.25 mL、ニトロメタン 0.625 mL を用いたときに最も効率的に反応が進行することを明らかにした。<sup>1</sup>H-NMR の WaterLOGSY 法により、反応条件下で HSA と基質の相互作用があることが確認された。また、変性した HSA を用いて同様の反応を行うと、反応変換率はほぼ同じであったが、得られた化合物はラセミ体であった。これらのことから、HSA における低分子結合部位の立体構造がエナンチオ面選択的反応に必須であることを確かめることが出来た。

#### ( 2 ) アルブミン変異体ライブラリーの構築と反応への応用

ピキア酵母の組換えタンパク質発現系による HSA の調製を試みた。HSA の cDNA をピキア酵母の分泌発現ベクター pPICZ  $\alpha$ A に In-Fusion クローニングし、ピキア酵母ゲノムのメタノール誘導性の AOX1 遺伝子プロモーター領域に HSA タンパク質の遺伝子を導入するためのプラスミドを構築した。このプラスミドを制限酵素処理により線状化したのち、ピキア酵母 X-33 株に導入した。得られた形質転換ピキア酵母株の中からメタノール誘導により HSA を培地中に多く分泌するクローンを選択し、RKY005 株を得た。この株を BMGY 液体培地にて培養し増殖させた後、さらに 2 L の BMMY 液体培地にて 48 時間振盪培養し、メタノール誘導により HSA を培地中に HSA を分泌発現させた。この分泌された HSA を硫酸沈殿した後、脱塩カラム処理により粗精製した。その結果、2 L の培養上清中から分泌発現された 19 mg の HSA を粗精製することに成功した。しかし、この粗精製 HSA を用いて、ニトロアルドール反応を行ったところ、不斉触媒活性が検出されなかった。粗精製画分に塩やその他の阻害物質が含まれていたと考えられた。次に、ニトロアルドール反応の不斉触媒活性を有する HSA タンパク質を調製するための高発現系として PichiaPink Expression System ( Invitrogen ) による構築を進めた。発現ベクターとして、高コピー用 pPink-HC 及び低コピー用 pPink-LC プラスミドを用いた。分泌シグナルとして、HSA 由来の 1 種と  $\alpha$  ファクター由来の 2 種の計 3 種のシグナルを用いた。これらの組み合わせで、計 6 種のプラスミドを構築した。これらプラスミドを 4 種のピキアピンク株 1~4 に導入し、計 141 株の HSA 分泌発現ピキア株を構築した。これら発現株から 0.5%メタノールにより HSA を分泌発現し、分泌された HSA 量を比較した。その結果、ピキア酵母細胞 1 g あ

たり 0.69 mg、培養上清 1 ml あたり 0.32 mg の HSA を分泌発現する HSA 高発現クローンを得た。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

穴井佳那子、近藤涼太、松本一嗣、須賀則之、有機合成反応を触媒するヒト血清アルブミンのピキア酵母による発現と精製、第 18 回生体触媒化学シンポジウム、2016

朝倉翔太、原田徳将、加藤正治、松本一嗣、アルブミンを用いる不斉ニトロアルドール反応(1)、第 18 回生体触媒化学シンポジウム、2016

松本一嗣、劉 智永、朝倉翔太、嶺岸賢宗、鈴木峻太、アルブミンを用いる不斉ニトロアルドール反応(2)、第 18 回生体触媒化学シンポジウム、2016

松本一嗣、朝倉翔太、原田徳将、北林亮太、須賀則之、田代 充、ヒト血清アルブミンによる不斉ニトロアルドール反応、第 19 回生体触媒化学シンポジウム、2017

松本一嗣、北林亮太、朝倉翔太、原田徳将、須賀則之、田代 充、アルブミン触媒による不斉ニトロアルドール反応を利用した光学活性ビフェニル誘導体の合成、日本化学会第 9 8 春季年会、2018

松本一嗣、福地直輝、北林亮太、生体触媒を用いる光学活性ピアリアル誘導体の合成研究、日本化学会第 9 9 春季年会、2019

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 須賀 則之

ローマ字氏名: Suka, Noriyuki

所属研究機関名: 明星大学

部局名: 理工学部

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 00396219

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。