

平成 21 年 6 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2005～2008

課題番号：17360402

研究課題名（和文） 水素移動型バイオ不斉還元プロセスの高機能化と触媒酵素のライブラリー構築

研究課題名（英文） Development of efficient method for producing optically pure alcohols with an asymmetric hydrogen-transfer biocatalysts and their library construction

研究代表者

伊藤 伸哉 (ITO NOBUYA)

富山県立大学・工学部・教授

研究者番号：90213066

研究成果の概要：フェニルアセトアルデヒド還元酵素(PAR)を進化分子工学的手法にて改良し、変異酵素Sar268/HAR1を取得した。これら酵素の機能解析を行った結果、明らかに極性溶媒中での活性が向上していた。また、同酵素を触媒とし、高濃度のケトン類（10-30%）から100%近い収率で目的の光学活性体を合成できた。さらに、Sar268および*Leifsonia*由来アルコール脱水素酵素 (LSADH) の発現菌体を固定化し、水溶性の高いケトンの還元反応を流動層型のリアクターで行う事に成功した。PAR/LSADHの類縁酵素遺伝子の土壌DNAからの分離を行い、PARとLSADHの基質特異性が異なる酵素ライブラリーの構築を目指した。PARについては、約60種のDNA断片の増幅に成功したが、活性を確認することができなかった。他方LSADHでは、生産菌の類縁微生物ゲノム情報を基に約30種の遺伝子を単離（LSと命名）し、その基質特異性、立体選択性を測定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	3,200,000	0	3,200,000
2006年度	2,300,000	0	2,300,000
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
総計	9,300,000	1,140,000	10,440,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：バイオ不斉還元、光学活性アルコール生産、バイオリアクター、進化分子工学、有機溶媒耐性酵素、メタゲノム、遺伝子ライブラリー

## 1. 研究開始当初の背景

本来生体触媒反応による不斉還元・酸化は生物に特有のものであるが、その応用については補酵素等の再生の問題もあり、実用的なレベルに至っている例は少ない。その一方で、BINAP を始めとする不斉金属触媒を用いた不斉還元や酸化の方が注目され、2001年度のノーベル化学賞の対象となった。しかし、バイオプロセスは立体選択性のみならず生産性でも、こうした化学不斉触媒よりも多くの場合優れた潜在能力を有しており、またプロセスのグリーン度はバイオプロセスの方が優れている。従って、不斉還元技術の高機能化や酵素触媒のライブラリー化を行うことにより、不斉還元プロセス技術の実用化が可能となる。

## 2. 研究の目的

本研究テーマは、不斉還元バイオプロセスを中心に、既得のアルコール脱水素酵素遺伝子 (*par*, *lsadh*) の改良と類縁酵素遺伝子のメタゲノムからの探索を行う。すなわち、水-極性有機溶媒の反応場における生体触媒の一層の安定性・反応性の向上と多様な基質特異性を有する PAR, LSADH 酵素群の取得を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) PARの進化分子工学的改良：PARの進化分子工学的的手法による改良を行い2-propanol (IPA) /水系での反応性・安定性の高い酵素触媒を創製する。目標は、各種ケトン類やIPAに対する耐性の強化による高濃度基質の効率的変換に重点を置く。また可能であれば、メタゲノムライブラリーから得られた遺伝子データと進化分子工学的的手法にて改良した酵素遺伝子との比較検討を行う予定である。

(2) 酵素蛋白質の極性溶媒中での反応性とその解析：PARの変異酵素Sar268（6個のアミノ酸が変異）の変異アミノ酸部位が基質特異性の異なるPAR相同性遺伝子でも有効であるかどうかを、部位特異的変異により確認する予定である。またSar268から更に生産性の向上した変異酵素を取得する。得られた変異酵素の動力学定数や各種極性有機溶媒中での安定性や反応性をチェックする。特に優れた変異酵素が得られた場合は、変異酵素とnative酵素との構造的差異をX線構造解析または

docking modelで解析する。これらの基礎的知見の蓄積は、極性溶媒中での酵素反応の強化ならびに耐性の向上に有用な情報を与えるものと考えている。

(3) PAR/LSADH触媒のバイオリクター化：Sar268およびLSADH組換え酵素を菌体のまま二官能性試薬を用いて固定化することにより、さらに酵素の安定性を強化できることが判明した。これらの生体触媒を用いて水溶性の高いケトンの立体選択的還元プロセスを流動層型のリアクターで行う実験を行い、そのデータを解析する。

(4) PARならびにLSADHのメタゲノムライブラリーの作成：PAR/LSADH 類縁遺伝子のメタゲノム（主に土壌 DNA）からの単離と遺伝子ライブラリーの作成技術を確立するとともに、実際に遺伝子ライブラリーの作成と解析を行う（約 100 サンプル程度）。また優れた酵素ライブラリーについては、固定化し固体触媒として保存する。また得られた酵素ライブラリーからの有用酵素の探索を行い、触媒活性、基質特異性、立体選択性を解析する。

## 4. 研究成果

(1) PARの進化分子工学的改良：PARの進化分子工学的的手法による改良を続け、Sar268 酵素から最終的に7個の変異が導入された HAR1 酵素 (A3S, E12C, D42L, K67R, L125M, S173P, A327V) が取得できた。下記に当該酵素のサブユニットの変異導入場所(アミノ酸側鎖が黄色の部分)を docking model から推定した図を示す。

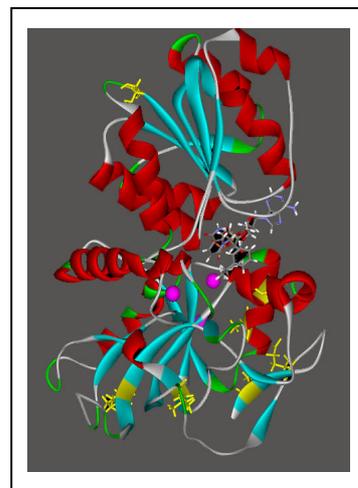


図 1. HAR 1 変異酵素のモデル

変異は主に酵素表面に分布し、活性中心部位から離れていることが明らかになった。また HAR1 を用いて各種ケトン類の不斉還元反応を行ったところ、ほとんどの基質において Sar268 よりも高い生産性を示し、立体選択性は維持されていた。

(2) 酵素蛋白質の極性溶媒中での反応性とその解析: 変異酵素 (Sar268) の解析データを PAR と比較した。相対活性でみると変異酵素の方が、各種極性溶媒の濃度上昇に伴う活性の低下の程度が緩慢であり、10% IPA 中での反応性の向上 (約 3 倍) が確認された。また、各種基質に対して  $K_m$ 、 $V_{max}$  値の著しい減少が認められた。他方  $V_{max}/K_m$  値は同等かやや増加している。しかし、予想に反して、各種溶媒中での酵素の安定性は Sar268 の方が PAR よりも劣っていた。野生型酵素は元々各種極性有機溶媒中での安定性が高く、エタノール、アセトン、1-/2-propanol、DMF については 20% 程度まで 24 時間インキュベーションしても活性低下はほとんど認められない。しかし、野生型酵素は極性溶媒中での反応性が非常に低く、十分な生産性が得られなかったことになる。本研究例では、溶媒中での物質生産性の向上のため、安定性と反応性のトレードオフが起こったと考えられる。

(3) PAR/LSADH 触媒のバイオリアクター化: PAR/LSADH を高発現している *E. coli* 細胞をポリエチレンイミン (PEI) とグルタルアルデヒド (GA) で固定化し、固定化 *E. coli* 触媒を調製し (図 2)、その反応について検討を加えた。同触媒は、10% の IPA 中で 500 時間以上の連続使用が可能であり、固定化により酵素触媒の半減期は 5 倍以上 (約 600 時間) 向上した。この固定化 *E. coli* 触媒をバイオリアクターとして利用すると、5% の 4-hydroxy-2-butanone から (R)-1,3-butanediol (99% e. e.) を 99% の収率で連続的に生産することができた。このように、水-IPA 系に溶解度の高いケトンであれば、リアクターを用いる連続的な不斉還元による光学活性アルコールの生産も可能であることを示した。

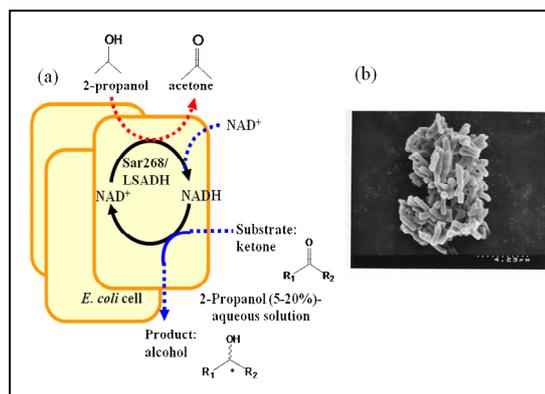


図 2. 水素移動型酵素不斉還元反応 (a) 水-IPA 系での酵素触媒反応、(b) PEI と GA で固定化した *E. coli* 触媒の SEM 写真

(4) PAR ならびに LSADH のメタゲノムライブラリーの作成: PAR については、相同遺伝子の内部共通配列部分を基に縮重プライマーを作成し、これを各種微生物ゲノムやメタゲノム (土壌 DNA) に対して PCR を行い、約 60 種の DNA 断片 (約 950bp) の増幅に成功した。しかし、この部分をカセットとして導入し、PAR のキメラ酵素として高発現させる方法を種々行ったが、活性を確認することができなかった。その理由については現在検討中である。他方 LSADH については、生産菌の類縁微生物のゲノム情報を基にして土壌 DNA から直接 LSADH 類縁遺伝子を単離した。これら約 30 種の酵素ライブラリー (LS と命名) については、発現後、その基質特異性、立体選択性を測定した。その結果、LS-1, LS-7 など数種の酵素が、LSADH が作用しないベンゾイルギ酸エチルを立体選択的に還元することが明らかとなった (図 3)。また立体選択性は、LSADH と同様であった。今後、両酵素遺伝子について、ライブラリーの作成方法を改良し、そのライブラリー数を増やすとともに遺伝子解析データを蓄積する。将来的には、これらのライブラリーを保存し、必要に応じて不斉還元プロセスに応用する予定である。

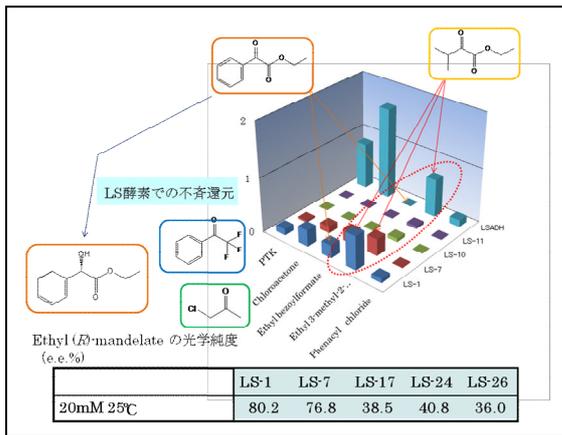


図 3. メタゲノムから取得した酵素触媒の基質と立体選択性 (LSADH との比較)

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. H. Asako, M. Shimizu, N. Itoh, Engineering of NADPH-dependent aldo-keto reductase from *Penicillium citrinum* by directed evolution to improve thermostability and enantioselectivity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 80, 803-812 (2008). 査読有
2. N. Itoh, M. Nakamura, K. Inoue, Y. Makino, Continuous production of chiral 1,3-butanediol using immobilized biocatalysts in a packed bed reactor: promising biocatalysis method with an asymmetric hydrogen-transfer bioreduction, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 75, 1249-812 (2008). 査読有
3. 伊藤伸哉, 牧野祥嗣, 酵素触媒の極性有機溶媒耐性と不斉還元バイオプロセスへの応用, *酵素工学ニュース*, 58, 27-34 (2007). 査読なし
4. Y. Makino, T. Dairi, N. Itoh, Engineering the phenylacetaldehyde reductase mutant for improved substrate conversion in the presence of concentrated 2-propanol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 77, 833-843 (2007). 査読有
5. K. Inoue, Y. Makino, T. Dairi, N. Itoh,

Gene Cloning and expression of *Leifsonia* alcohol dehydrogenase (LSADH) involved in asymmetric hydrogen-transfer bioreduction to produce (*R*)-form chiral alcohols., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 418-426, (2006). 査読有

6. H. Asako, R. Wakita, K. Matsumura, M. Shimizu, J. Sakai, N. Itoh, Purification and cDNA cloning of NADPH-dependent aldoketoreductase, involved in asymmetric reduction of methyl 4-bromo-3-oxobutyrate, from *Penicillium citrinum* IF0463, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 1101-1104 (2005). 査読有

7. K. Inoue, Y. Makino, N. Itoh, Production of (*R*)-chiral alcohols by a hydrogen-transfer bioreduction with NADH-dependent *Leifsonia* alcohol dehydrogenase (LSADH), *Tetrahedron: Asymmetry*, 16, 2539-2549 (2005). 査読有

8. K. Inoue, Y. Makino, N. Itoh, Purification and characterization of a novel alcohol dehydrogenase from *Leifsonia* sp. strain S749: a promising biocatalyst for an asymmetric hydrogen transfer bioreduction, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 3633-3641 (2005). 査読有

9. Y. Makino, K. Inoue, T. Dairi, N. Itoh, Engineering of phenylacetaldehyde reductase for efficient substrate conversion in concentrated 2-propanol, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 4713-4720 (2005). 査読有

[学会発表] (計 3 4 件)

1. 磯谷、石母田、加藤、牧野、朝子、伊藤 メタゲノムを用いた酸化還元酵素遺伝子ライブラリーの構築とその評価, 日本農芸化学会大会 2009年3月28日 福岡
2. 伊藤伸哉, 牧野祥嗣 進化分子工学による極性有機溶媒耐性酵素の創製とそのメカニズム 第11回生体触媒化学シンポジウム 2008年1月24日鳥取
3. N. Itoh, Y. Makino, T. Dairi, K. Inoue, M. Nakamura Efficient method for producing optically pure alcohols with an asymmetric hydrogen-transfer biocatalysis and evolutionary mechanism of alcohol dehydrogenase (ADH) to increase the activity in polar organic solvent.

Biotrans 2007, 2007年7月10日 Oviedo, Spain

4. 伊藤伸哉, 不斉還元バイオ触媒を用いる高効率な光学活性アルコール生産法の開発, グリーン・サステイナブルケミストリーシンポジウム 2006年3月8日 東京

5. N. Itoh, Y. Makino, T. Dairi, K. Inoue, Asymmetric hydrogen-transfer bioreduction by *Leifsonia* alcohol dehydrogenase (LSADH) to produce chiral alcohols. Biotrans 2005, 2005年7月7日 Delft, The Netherlands

〔図書〕(計 3件)

1. 伊藤伸哉, 有機溶媒耐性酵素の開発と医薬品中間体製造, バイオインダストリー 4, 34-44 (2009) 査読なし

2. 伊藤伸哉, 水素移動型バイオ不斉還元による光学活性アルコールの効率的生産, ファインケミカル, 37, 44-48 (2008) 査読なし

3. 伊藤伸哉, 牧野祥嗣, 有機溶媒耐性酵素, 酵素開発・利用の最新技術 今中忠行監修 シーエムシー出版, 32-41 (2006) 査読なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計 4件)

1. 朝子弘之, 伊藤伸哉, 牧野祥嗣, 大利徹 (権利者:住友化学, 伊藤伸哉) 還元酵素及びその利用 特願 2008-078602 2008年3月25日 国内

2. 伊藤伸哉, 牧野祥嗣, 朝子弘之(権利者:住友化学, 伊藤伸哉) 還元酵素遺伝子の取得方法、及び、還元酵素遺伝子, 特願 2008-291407 2008年11月13日 国内

3. 伊藤伸哉, 牧野祥嗣, 大利徹(権利者:住友化学, 伊藤伸哉) 還元酵素遺伝子を含む発現ベクター, 特開 2008-17773 2006年7月13日 国内

4. 伊藤伸哉, 牧野祥嗣, 大利徹(権利者:住友化学, 伊藤伸哉) 還元酵素及びその利用 特開 2007-61065 2005年9月2日 国内

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

関連 URL :

<http://www.pu-toyama.ac.jp/BR/itoh/>

6. 研究組織

(1)研究代表者 伊藤伸哉 富山県立大学 工学部 教授 90213066

(2)研究分担者 牧野祥嗣 (2005~2006年度) 富山県立大学 工学部 講師 20347355

(3)連携研究者