

平成23年4月4日現在

機関番号：15301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20550152
 研究課題名（和文）高機能酵素変異体の創製と合成化学的応用
 研究課題名（英文）Creation of Excellent Mutant Enzymes and Synthetic Application

研究代表者

依馬 正 (EMA TADASHI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号：20263626

研究成果の概要（和文）：汎用生体触媒であるリパーゼとカルボニル還元酵素を合理的変異導入あるいはランダム変異導入により進化させて高機能化するとともに、有用な光学活性化合物を不斉合成した。①苦手基質に対する触媒活性とエナンチオ選択性が同時に向上した二重変異体（I287F/I290A）リパーゼを創製し、その合成化学的有用性を実証した。②カルボニル還元酵素を用いてジフルオロメチレン基を有するβ-ケトエステルを高濃度不斉還元し、得られた光学活性アルコールを含フッ素β-アミノ酸誘導体へ変換した。

研究成果の概要（英文）：The catalytic function of versatile biocatalysts such as lipase and carbonyl reductase were improved by rational design or random mutagenesis, and useful optically active compounds were synthesized. ① Catalytic activity and enantioselectivity of lipase toward poor substrates have been dramatically improved by rational design. ② The bioreduction of α, α -difluorinated β -keto ester with recombinant *E. coli* gave the corresponding optically active alcohol, which was converted into α, α -difluorinated β -amino acid derivative.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：酵素・変異・遷移状態・エナンチオ選択性・光学活性化合物・不斉合成

1. 研究開始当初の背景

酵素は環境に優しい生体触媒であるが、有機合成の立場からは基質適用範囲が限られるなどの欠点もある。一方、我々は酵素反応の遷移状態を制御することにより触媒活性と立体選択性の両方を同時に制御できるはずであると信念に基づいて研究を続けていた。

2. 研究の目的

汎用生体触媒（基質適用範囲の広い酵素）であるリパーゼとカルボニル還元酵素を合理的な変異導入あるいはランダム変異導入により進化させて高機能化し、有用な光学活性化合物を不斉合成する。リパーゼについては、反応機構に基づいて合理的に構造改変し、カルボニル還元酵素については、遺伝子にランダム変異を導入後に機能向上した変異体を選別することにより進化させる。これらを利用して光学活性化合物を不斉合成する。さらに、構造と機能の関係を精査する。

3. 研究の方法

(1) **リパーゼ**: メカニズムと X-線結晶構造に基づいて、リパーゼの活性部位近傍に点変異を導入し、合理的にエナンチオ選択性を向上させる。すでに第 1 世代の変異体を創製していたので、そこへ第 2、第 3 の変異を導入し、第 2、第 3 世代の変異体を創製していく。とくに、活性中心近傍の 3 つのアミノ酸残基 Ile287、Ile290、Gln292 を選択し、これらを他のアミノ酸残基に置き換える。遷移状態で働く分子間相互作用を操作することにより、エナンチオ選択性を制御する。多重変異を導入し、エナンチオ選択性を逐次的に向上させていく。

(2) **カルボニル還元酵素 SCR**: ランダム変異導入とスクリーニングを組み合わせた進化分子工学的手法により進化させていく。含フッ素ケトンの不斉還元を実施する。

4. 研究成果

(1) リパーゼ

変異導入については、コンピュータを用いて検討した。苦手基質 1-phenyl-1-hexanol (**1a**) を用いて、以下の作業仮説を見出した。遷移状態モデル (下図 a) に基づいて、287 番目のアミノ酸 (イソロイシン; 下図 b) をフェニルアラニン (下図 c) に置換すると、(**R**)-**1a** のアルキル鎖とフェニルアラニン 287 のフェニル基との間にアトラクティブな相互作用が働き、反応速度が向上する可能性があると考えた。一方、(**S**)-**1a** に関しては、(**S**)-**1a** のフェニル基とフェニルアラニン 287 のフェニル基の間に立体反発的な相互作用が働き、反応速度が低下すると予測した。このようなフェニルアラニンのデュアルモードの相互作用 (**R** 体に対してはアトラクティブな相互作用、**S** 体に対しては立体障害による不利な相互作用) により、触媒活性とエナンチオ選択性が同時に向上すると考えた。一方、290 番目のアミノ酸と(**R**)-**1a** のアルキル鎖の間には立体反発的な相互作用が働くと予想できたので、290 番目のアミノ酸を立体障害の小さいアラニンに置換すれば、不利な相互作用を取り除くことができ (下図 c)、**R** 体の反応速度がさらに向上すると予測した。

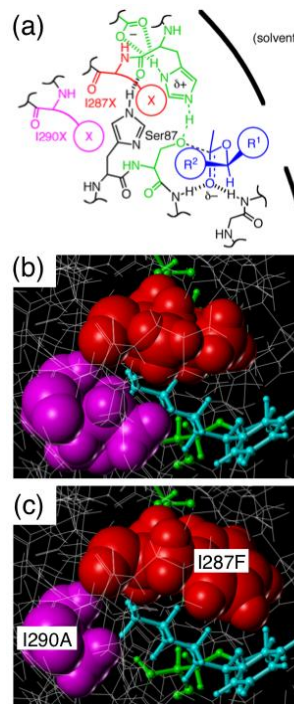
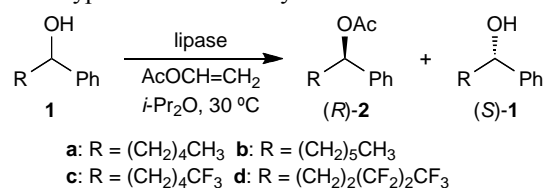


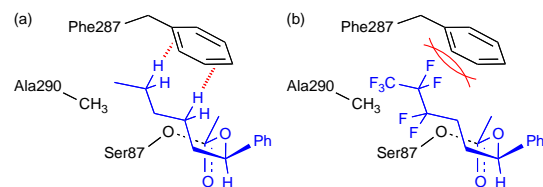
Table 1. Kinetic resolution of **1** with the wild-type and mutant enzymes.



entry	1	lipase	time (h)	conv (%)	<i>E</i>
1	1a	wild-type	41	23	5
2	1a	I287F	41	46	32
3	1a	I287A	41	20	1.4
4	1a	I287F/I290A	2.5	50	>200
5	1a	I287F/I290F	41	10	4
6	1a	I290A	41	41	79
7	1b	wild-type	41	39	9
8	1b	I287F	22	47	71
9	1b	I287F/I290A	4	47	>200
10	1c	wild-type	41	34	14
11	1c	I287F	22	47	55
12	1c	I287F/I290A	4	50	>200
13	1d	I287F/I290A	75	19	10

作業仮説に基づいて変異酵素を調製し、**1**の速度論的光学分割を行った (表 1)。野生型酵素の **1a** に対する *E* 値は 5 であったが、I287F 変異体を用いた場合は、*E* 値が 32 と 6 倍に向上した (entries 1, 2)。I287F 変異体は同じ反応時間で野生型酵素の 2 倍の変換率を与えたことから、反応速度に関しても向上している。I287A 変異体を用いた場合は、*E* 値が 1.4 と低下した (entry 3)。287 番目のアミノ酸の高さを小さくすると、*S* 体のアルコールのフェニル基との立体障害が小さくなり、より速く反応するようになった結果、*E* 値が低下したと考えられる。I287F/I290A 二重変異体を用いて速度論的光学分割を行った。**1a** の反応時間が大幅に短縮され、*E* 値も 200 以上と触媒機能が大きく向上した。(entry 4)。一方、I287F/I290F 二重変異体は反応速度と *E* 値共に低下した (entry 5)。これは、290 番目のフェニルアラニンと *R* 体の基質のアルキル鎖との間の立体反発が増加し、*R* 体の反応速度が低下したためと考えられる。I290A 変異体の *E* 値と反応速度は野生型酵素と I287F/I290A 二重変異体の中間の値となった (entry 6)。**1a** よりもアルキル鎖の長い **1b** に対しても同様

の結果が得られた (entries 7–9)。CH/π 相互作用が起こっている位置を検証するため、H を F に置換した **1c** と **1d** を用いた (entries 10–13)。I287F/I290A 二重変異体は **1c** に対しては *E* >200、**1d** に対しては *E* = 10 を与えた。従って、CH/π 相互作用は下図 a のように、ω-1 位と ω-3 位のメチレン基で起こっていると推定している。



リパーゼ二重変異体の基質適用範囲を調査した (表 2)。アルキル鎖の末端に置換基を持つ基質 (**1e–1g**)、ベンゼン環に電子求引性基や電子供与性基を持つ基質 (**1h–1j**) に対しても高い触媒活性とエナンチオ選択性 (*E* >145) を示した。**1f** と **1i** は他と比較して反応時間が長く、反応性が低かった。**1i** は CF₃ 基によりアルコールの求核性が低下し反応時間が長くなったものと考えられる。

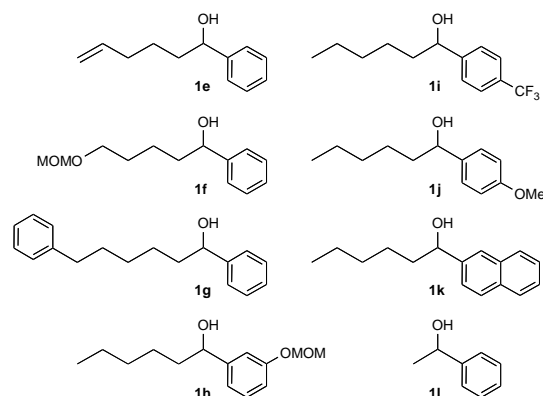


Table 2. Substrate scope of the I287F/I290A double mutant and the wild-type enzyme.

entry	1	I287F/I290A			wild-type	
		time (h)	conv (%)	<i>E</i>	conv (%)	<i>E</i>
1	1e	7	39	>200	0	–
2	1f	22	46	145	12	–
3	1g	6.5	41	>200	3	–
4	1h	7	42	>200	3	–
5	1i	54	45	>200	4	–
6	1j	7	37	>200	2	–
7	1k	7	41	>200	0	–
8	1l	3	50	>200	45	68

ナフチル基を持つ基質**1k**であっても高いエナンチオ選択性 ($E > 200$) を示した。また、本来リパーゼが得意とする基質 (**1l**) に対しても高い触媒活性とエナンチオ選択性を示した。一方、野生型酵素は得意基質**1l**に対してのみよい結果を与え、**1e-1k**に対しては12%以下の変換率しか示さなかったため、変異酵素は触媒機能を大きく向上したといえる。

次に、I287F/I290A二重変異体を動的速度論的光学分割 (DKR) に応用した。DKRとは速度論的光学分割において未反応のエナンチオマーをラセミ化し、最大収率100%で生成物を得る方法である。ラセミ化触媒として温和な条件下で使用でき、酵素と共存して反応できるBäckvallの(η^5 -Ph₅C₅)Ru(CO)₂Cl (**3**)を用い、基質**1a**, **1e-1l**に対してDKRを行った (表3)。

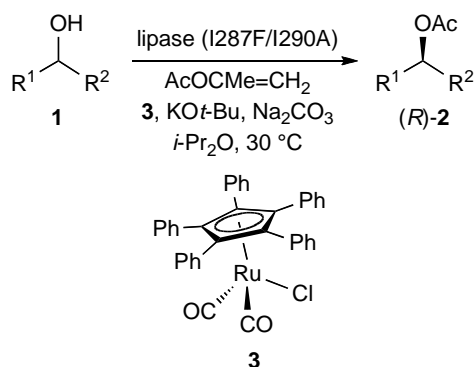


Table 3. Dynamic kinetic resolution of secondary alcohols using the I287F/I290A double mutant and the Ru catalyst.

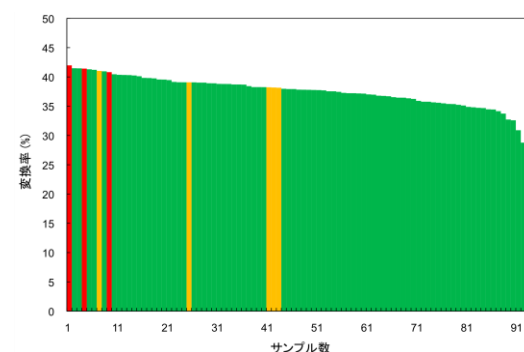
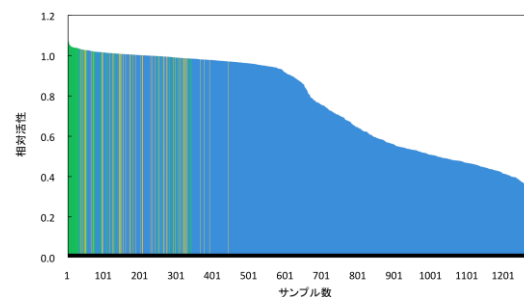
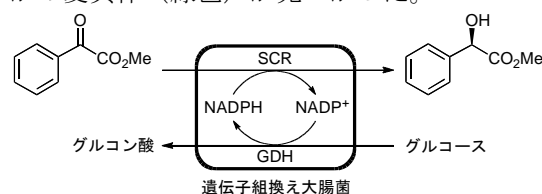
entry	1	3 (mol %)	time (h)	% yield (% ee)	
				(R)-2	ketone
1	1a	10	72	88 (94.6)	2
2	1e	10	72	88 (94.7)	1
3	1f	10	120	55 (96.1)	29
4	1g	10	72	87 (95.4)	9
5	1h	10	72	85 (96.9)	4
6	1j	10	72	67 (93.9)	16
7	1k	10	72	78 (98.4)	5
8	1l	4	24	87 (96.1)	0

基質 **1a**, **1e-1l** に対して収率は 55–88% と中程度から高い収率で得られ、エナンチオ過剰率は 94–98% ee と高い値を示し DKR に成功した (entries 1–8)。副生成物としてケトンが得られたが、これは未反応のエナンチオマーのラセミ化における触媒サイクルで発生したものであると考えられる。特に **1f**, **1j** ではケ

トンの生成量が多く、アセチル体の収率が低いのはこのためであるといえる。また、得意基質である **1l** では 4 mol% の Ru 触媒を用いて、24 時間で反応が終了するのに対し (entry 8)、苦手基質では 10 mol% の Ru 触媒を用いて、72–120 時間必要であった (entries 1–7)。苦手基質の場合は、アルコールが Ru 触媒に配位したときの立体障害のためにラセミ化が遅くなっていることも一因と考えられる。

(2) カルボニル還元酵素

カルボニル還元酵素 (SCR) を高発現する遺伝子組換え大腸菌を用いて α -ケトエステルの不斉還元を行った。遺伝子にランダム変異を導入しておき、不斉還元反応を実施し、その変換率をガスクロマトグラフィーにより求めた。1280 個のコロニーを調査したところ、下図のように野生型 (黄色) を上回るいくつかの変異体 (緑色) が見つかった。



その変異体 90 個を再度同じ反応にかけて再現性を調査した。上図のうち、野生型 (黄色) を上回る 3 つの変異体 (赤色) を選択し、さらに再現性を確認した。これらの変異体は

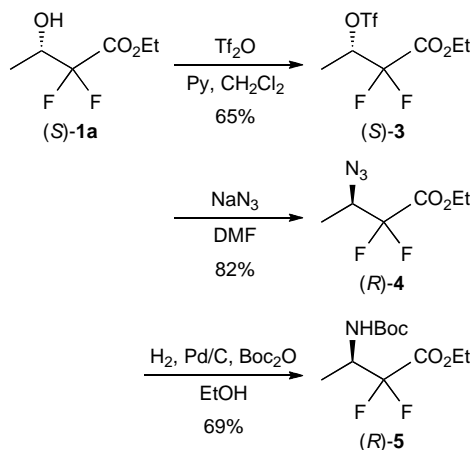
確かに野生型を上回るとはいえ、活性の向上は僅かであった。

次に表 1 に示すように、カルボニル還元酵素を高発現する大腸菌を用いてジフルオロメチレン基を有するケトンを不斉還元した。 β -ケトエステル **2a** を不斉還元した結果、99% ee 以上の光学純度、単離収率 55% で対応する (*S*)-体のアルコール(*S*)-**1a** が得られた。基質濃度を 0.4 M に上げてても効率よく反応し、61%収率で生成物を単離できた。基質濃度を 0.5 M まで上げると、変換率は 84%に下がった。次に、 β -ジケトン **2b** を不斉還元した。その結果、99%以上の変換率、99% ee 以上の光学純度、単離収率 74%で位置選択的に (*S*)-**1b** が得られた。基質濃度を 1 M (200 g/L) まで上げてても、99%以上の変換率、99% ee 以上の光学純度、単離収率 84%で(*S*)-**1b** が得られた。

Table 1. Asymmetric reduction of **2** with carbonyl reductase.

entry	ketone 2		alcohol 1	
	2	(M)	(g/L)	% yield (% ee)
1	2a	0.3	50	55 (>99)
2	2a	0.4	67	61 (>99)
3	2b	0.3	60	74 (>99)
4	2b	0.6	120	82 (>99)
5	2b	1.0	200	84 (>99)

下スキームに従って、得られた光学活性アルコール(*S*)-**1a** を新規含フッ素 β -アミノ酸 (BABA) 誘導体(*R*)-**5** へ変換した。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Chemoenzymatic Synthesis of Optically Active Alcohol and β -Amino-Acid Derivative Containing the Difluoromethylene Group.
Ema, T.; Kadoya, T.; Akihara, K.; Sakai, T. *J. Mol. Catal. B: Enz.* **2010**, *66*(1–2), 198–202. <査読有り>
- ② Rational Creation of Mutant Enzyme Showing Remarkable Enhancement of Catalytic Activity and Enantioselectivity toward Poor Substrates.
Ema, T.; Kamata, S.; Takeda, M.; Nakano, Y.; Sakai, T. *Chem. Commun.* **2010**, *46*(30), 5440–5442. <査読有り>
< Selected as a Hot Article >

[学会発表] (計 13 件)

- (1) Tadashi Ema, Shusuke Kamata, Masahiro Takeda, Yasuko Nakano, Toshinobu Korenaga, Takashi Sakai
Rational Creation of Mutant Enzyme Showing Remarkable Enhancement of Catalytic Activity and Enantioselectivity toward Poor Substrates
2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010)
2010.12.19 (Hawaii, USA)
- (2) 依馬 正, 中野靖子, 鎌田修輔, 是永敏伸, 酒井貴志
酵素の合理的改変：遷移状態で CH/ π 相互作用を働かせる
第 4 回バイオ関連化学シンポジウム
2010. 9. 26 (豊中)
- (3) 依馬 正, 中野靖子, 鎌田修輔, 武田匡弘, 是永敏伸, 酒井貴志
酵素の合理的改変：遷移状態で CH/ π 相互作用を働かせる
第 14 回生体触媒化学シンポジウム in 静岡
2010. 9. 23 (静岡)
- (4) 依馬 正, 中野靖子, 鎌田修輔, 是永敏伸, 酒井貴志
多重変異導入によるリパーゼの触媒活性とエナンチオ選択性の合理的向上

- 日本化学会第 90 春季年会
2010. 3. 28 (大阪)
- (5) 依馬 正
酵素の合理的進化と機能強化
日本化学会第 90 春季年会
2010. 3. 26 (大阪)
- (6) Tadashi Ema
Synthesis of Chiral Intermediates with Biocatalysts and Organocatalysts
The 3rd International Symposium for Future Technology Creating Better Human Health and Society: Molecular Targets for the Development of Therapeutic Agents against Cancer and Infectious Diseases in vitro, in vivo and in silico
2010.2.3 (Okayama)
- (7) 依馬 正, 鎌田修輔, 武田匡弘, 中野靖子, 是永敏伸, 酒井貴志
変異導入による酵素の触媒活性とエナンチオ選択性の合理的向上
第 13 回生体触媒化学シンポジウム
2009. 12. 3 (香川)
- (8) 依馬 正, 穂原久美子, 門屋太郎, 是永敏伸, 酒井貴志
gem-ジフルオロ化ケトンのバイオ不斉還元
日本化学会第 89 春季年会
2009. 3. 29 (船橋)
- (9) 依馬 正, 鎌田修輔, 武田匡弘, 是永敏伸, 酒井貴志
二重変異導入によるリパーゼのエナンチオ選択性の合理的向上
日本化学会第 89 春季年会
2009. 3. 29 (船橋)
- (10) 依馬 正, 井手彩矢佳, 門屋太郎, 穂原久美子, 是永敏伸, 酒井貴志
カルボニル還元酵素を用いた有用キラル化合物群の不斉合成
第 12 回生体触媒化学シンポジウム
2008. 12. 4 (習志野)
- (11) 依馬 正, 門屋太郎, 穂原久美子, 是永敏伸, 酒井貴志
カルボニル還元酵素を用いたジフルオロメチレン基を有する光学活性アルコールの合成
第 12 回生体触媒化学シンポジウム
2008. 12. 4 (習志野)
- (12) 依馬 正, 鎌田修輔, 武田匡弘, 是永敏伸, 酒井貴志
点変異導入による酵素の触媒活性とエナンチオ選択性の制御
第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム
2008. 9. 19 (横浜)
- (13) 依馬 正, 井手彩矢佳, 沖田修康, 是永敏伸, 酒井貴志
遺伝子組換え大腸菌を用いた医薬中間体の不斉合成に関するプロセス研究
第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム
2008. 9. 19 (横浜)
- [その他]
ホームページ等
<http://achem.okayama-u.ac.jp/soc/index.html>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
依馬 正 (EMA TADASHI)
岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授
研究者番号：20263626
- (2) 研究分担者
該当なし
- (3) 連携研究者
該当なし