

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月26日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580083

研究課題名（和文）微生物由来アミノ基修飾酵素を利用した高選択的なアセチル化反応の生化学的解明と応用

研究課題名（英文）Characterization of *N*-acetyltransferase that can catalyze enantio-selectively acetylation of chiral amines.

研究代表者

竹中 慎治 (TAKENAKA SHINJI)

神戸大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：40314512

研究成果の概要（和文）：2-フェニルグリシンは、医薬品や農薬製造時の鍵物質となる化合物であり、光学純度の高いD-体またはL-体を得ることは重要である。本研究では、2-フェニルグリシンのD,L-体のうち片方のみを立体選択的に*N*-アセチル化できる微生物を自然界から単離し、分離菌を用いた光学分離代謝に関する*N*-アセチルトランスフェラーゼの特性解析を目的として研究を進めた。分離菌 *Chryseobacterium* sp. 5-3B は2-フェニルグリシンのD,L-体のうちL-体のみを立体選択的に*N*-アセチル化し、(2*S*)-2-アセチルアミド-2-フェニル酢酸へと変換する。その変換率と光学純度は49.9%および99.5%であった。その結果、培地中には光学純度99.0%でD-体の2-フェニルグリシンが蓄積していた。立体選択的な*N*-アセチル化反応を触媒する酵素は、アセチル-CoA依存型*N*-アセチルトランスフェラーゼであり、2-フェニルグリシン類により誘導的に生合成されていた。本酵素を各種クロマトグラフィーにて精製し、その性質を調べた。基質特異性について調べたところ、L-2-phenylglycine 以外に2-(2-chlorophenyl) glycine に対して活性を示した。本酵素のN末端アミノ酸配列および類似酵素の保存領域を基に酵素遺伝子をクローニングした。決定した塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、*Chryseobacterium* gleum ATCC35910 や *Chryseobacterium* sp. CF314 に似て*N*-アセチルトランスフェラーゼと推定されているタンパク質と高い類似性を示した。

研究成果の概要（英文）：The demand for optically active D-2-phenylglycine used to synthesize semisynthetic antibiotics and pesticides has been increasing. Here we report the isolation of a bacterium of the genus *Chryseobacterium* that selectively transformed the L-form of racemic D,L-2-phenylglycine to (2*S*)-2-acetylamido-2-phenylacetic acid with a molar yield of 49.9% and an enantiomer excess of >99.5% under optimal culture conditions, consequently resulting in 99.0% pure D-2-phenylglycine remaining in the culture. The enantioselective *N*-acetylation was catalyzed by an acetyl-CoA-dependent *N*-acetyltransferase whose synthesis was induced by L-2-phenylglycine. The enzyme differed from previously reported bacterial arylamine *N*-acetyltransferase in molecular mass and substrate specificity. The relative activity ratio of the enzyme with the substrates L-2-phenylglycine, D-2-phenylglycine, 2-(2-chlorophenyl) glycine, and 5-aminosalicylic acid (a good substrate of arylamine *N*-acetyltransferase) was 100:0:56.9:5.49, respectively. The biotransformation by the *N*-acetyltransferase-producing bacterium reported here could constitute a new preparative route for the enzymatic resolution of D,L-2-phenylglycine. We cloned the gene encoding *N*-acetyltransferase of *Chryseobacterium* sp. 5-3B which showed high identity with putative *N*-acetyltransferases of *Chryseobacterium* gleum ATCC35910 and *Chryseobacterium* sp. CF314.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物酵素

1. 研究開始当初の背景

化学工業界ではグリーンケミストリーの達成を目指して、化成品・医薬品などの合成に生体触媒を積極的に利用する研究が盛ん

に行われている。申請者はこれまでに環境保全・環境浄化を念頭に、芳香族アミン類の微生物代謝・酵素系の解明を行ってきた。炭素、水素、酸素原子から構成される芳香族化合物の代謝系と申請者が明らかにした芳香族アミン類の代謝系を比較すると、既報の代謝系とは異なる特異な酵素系が働いている代謝ステップを数多く見出すことができた。これまで明らかでなかった代謝酵素や代謝ステップは、効率的で環境に負荷を与えない生産プロセス・物質生産開発へのヒントを与えてくれる。そこで、見出した反応機構を基に、微生物酵素による選択的な物質変換や有用物質の生産へ応用する研究を提案し、生体触媒による物質の合成研究にも積極的に取り組んできた。

芳香族アミンや脂肪族アミンには、医薬品・農薬合成時の鍵物質や α -や β -アミノ酸など有用な化合物が多く、加水分解酵素を中心に有用な異性体を得るための高選択的な変換法の開発研究がおこなわれてきた。一方、触媒作用や反応機構の異なる転移酵素もまた物質変換の分野では有用な生体触媒と言える。その類縁酵素を網羅的に検索し、特性や反応機構を明らかにすることは環境にやさしい物質変換法の拡充につながると考えた。そこで、「*N*-アセチルトランスフェラーゼによるアミン類から高付加価値のあるアセチルアミド類の生産法の開発研究」を着想した。まず、芳香族アミン類のアミノ基を位置選択的に修飾するアリルアミン *N*-アセチルトランスフェラーゼの特性解析に着手した。本研究では、脂肪族アミン類とそのアミノ基を立体選択的にアセチル化する酵素に重点を置いて研究を進める。

2. 研究の目的

本研究では、対象化合物として2-フェニルグリシンを選択した。同化合物は α -アミノ酸であり、そのD-体およびL-体ともに生理活性を示し、さらにはそれぞれ医薬品合成時の鍵物質として利用されている付加価値のある脂肪族アミンである。分離菌 *Chryseobacterium* sp. 5-3B は、D,L-2-フェニルグリシンのL-体のみを立体選択的に *N*-アセチル化し、(2*S*)-2-アセチルアミノ-2-フェニル酢酸へと変換する。よって、5-3B 株を Growing cell としてまたは *N*-アセチル化に関わる酵素・遺伝子を明らかにできれば生体触媒として利用できる。本研究では、growing cell による D,L-2-フェニルグリシンの光学分割法の検討および *N*-アセチル化に関わる酵素の特性解析を目的とした。

3. 研究の方法

2-フェニルグリシンおよび *N*-アセチル化物 (2-アセチルアミノ-2-フェニル酢酸) の分別定量

TLC、GC-MS、HPLC 分析によった。特に、ODS カラム (COSMOSIL 5C₁₈-MS-II、0.02 M K₂HPO₄ (pH 2.5) -MeOH (80:20, v/v)、UV254) またはキラルカラム (Chiralcel OD-H、*n*-ヘキサン-2-プロパノール-TFA (90:10:0.1, v/v)、UV254) を用いて、培養上清中または酵素反応溶液中の2-フェニルグリシンおよび2-アセチルアミノ-2-フェニル酢酸とR-体およびS-体を分別定量した。

5-3B 株 Growing cell を用いた2-フェニルグリシンから2-アセチルアミノ-2-フェニル酢酸への変換に与える因子 (培養条件) の検討
i) pH の影響 (pH 5.5-10.0)、ii) 2-フェニルグリシン濃度の影響 (0.1-0.3%)、iii) 炭素源の影響 (糖類 10 種、有機酸 4 種)、iv) 窒素源の影響 (3 種)、v) 天然培養基の影響、vi) 金属塩の影響、vii) 変換物 (2-アセチルアミノ-2-フェニル酢酸) の影響、viii) 通気量の影響について調べた。

酵素活性測定法 (*N*-アセチルトランスフェラーゼ)

5 mM 2-フェニルグリシン、5 mM acetyl-CoA および酵素液を含む 100 mM リン酸カリウムナトリウム緩衝液 (pH 7.5) にて 30°C で 1 時間反応を行い、2-フェニルグリシンから生成した2-アセチルアミノ-2-フェニル酢酸量を HPLC にて測定することで活性を求めた。また、必要に応じて acetyl-CoA から生成した CoASH 量を DTNB 法にて分光光学的 (A_{407 nm}) に定量した。

酵素精製

i) 粗酵素液の調製

5-3B 株を培養し、培養液 840 ml から湿菌体 20 g を得た。湿菌体を 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) にて懸濁し、超音波破砕機にて破砕を行った。つづいて、硫酸ストレプトマイシンを加えることでリボ核酸を除いた。

ii) 硫酸分画

50%飽和から70%飽和の画分を回収後、20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) にて透析した。

疎水カラムクロマトグラフィー

Butyl-toyopearl を用い、0.15 M から 0 M 硫酸を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) にてリニアグラジエント法で酵素タンパク質を溶出した。

iii) イオン交換クロマトグラフィー

DEAE-Cellulofine を用い、0 M から 0.25 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) にてリニアグラジエント法で酵素タンパク質を溶出した。

iv) プレパラティブ電気泳動
 ATTO 社製 分取電気泳動装置 AE-6760
 NATIVEN と同社マニュアルを参考に
 Native-Page により活性体タンパク質として
 目的酵素を分画した。

酵素の性質

i) 物理化学的性質

SDS-PAGE およびゲル濾過法 (Cellulofine GCL-1000SF) を用いて分子質量を決定した。N 末端アミノ酸配列は ATTO 社製電気泳動装置 (AE-6530) および転写装置 (AE-6677) を用いて電気泳動後、PVDF 膜に転写した後、ABI Procise 492 プロテインシーケンサーにてアミノ酸配列を解析した。

ii) 触媒化学的性質

活性に与える pH (pH 5.5-12.0) および温度 (30-80°C) の影響を調べた。
 SH 基修飾試薬、金属キレート剤等の各種試薬の影響をしらべた。
 2-フェニルグリシンのおよびそのヒドロキシ
 やクロロ誘導体について基質特異性を調べた。

N-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子のクローニング

i) N-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子部分断片の取得

5-3B 株由来の N-アセチルトランスフェラーゼの N 末端アミノ酸配列 22 残基について
 相同性検索した。既報の N-アセチルトランス
 フェラーゼについて高い保存性のみられた
 領域のアミノ酸配列を参考に PCR 用プライマ
 ーを設計し、目的遺伝子のクローニングを試
 みた。

ii) ゲノム DNA の調製

5-3B 株の湿菌体からキアゲン社製 Blood &
 Cell culture DNA mini kit を用いてゲノム
 DNA を得た。

iii) サザンブロット解析

調製したゲノム DNA を各種制限酵素で消化
 した後、1.0%アガロースゲルにて電気泳動し
 た。つづいて、VacuGene XL システム (GE ヘ
 ルスサイエンス) にてナイロンメンブレン上
 に転写した。つづいて、DIG High Prime DNA
 Labelling and Detection Starter Kit I に
 て上述の N-アセチルトランスフェラーゼ遺
 伝子部分断片をラベル化し、同キットのマニ
 ュアルに従い、ハイブリダイゼーション操作
 を行った。

iv) インバース PCR 法による遺伝子のクロー ニング

N-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子部
 分断片の塩基配列を参考に同遺伝子とその
 周辺領域を増幅できるプライマーを設計し
 た。5-3B 株のゲノム DNA を *EcoRI* で消化した
 サンプルを用いてセルフライゲーションを

行い、これを鋳型として PCR を行った。

4. 研究成果

2-フェニルグリシンのアミノ基を立体選択 的に N-アセチル化する微生物の分離

TLC および HPLC 分析結果を基に、2-フェニ
 ルグリシンから 2-アセチルアミノ-2-フェニ
 ル酢酸へと変換する微生物を 8 株単離するこ
 とができた。これらの菌株について、2-フェ
 ニルグリシン残量、2-アセチルアミノ-2-フ
 エニル酢酸の生成量と光学純度等を求めた
 (Table 1)。その結果、8 株の中で変換率お
 よび 2-アセチルアミノ-2-フェニル酢酸の光
 学純度が高かった 5-3B 株を以後の実験に用
 いることにした。また、GC-MS 分析およびキ
 ラルカラムを用いた分析から 5-3B 株におけ
 る 2-フェニルグリシン変換は、L-体のアミノ
 基が立体選択的に N-アセチル化され、
 (2S)-2-アセチルアミノ-2-フェニル酢酸が
 生成し、D-体の 2-フェニルグリシンのみが残
 ることがわかった (Fig. 1)。

Table 1 Biotransformation of
 D, L-2-phenylglycine to
 2-acetylamino-2-phenylacetic acid by
 isolated strains.

Strain	Remaining 2-PG (mM)	Produced 2-APA (mM)	Enantiomeric excess (%)	Molar yield (%)
1-7B	3.8 ± 0.39	2.9 ± 0.39	> 99.5%	43.8
2-5E	4.0 ± 0.39	2.6 ± 0.17	5.8%	39.3
5-3B	3.8 ± 0.11	2.8 ± 0.12	> 99.5%	42.3
6-11F	4.1 ± 0.12	2.6 ± 0.19	36.7%	39.3
7-3B	4.5 ± 0.08	2.2 ± 0.05	> 99.5%	33.3
7-4D	4.2 ± 0.12	2.5 ± 0.15	> 99.5%	37.8
7-5D	4.1 ± 0.20	2.5 ± 0.23	> 99.5%	37.8
7-8D	4.1 ± 0.18	2.5 ± 0.14	> 99.5%	37.8

5-3B 株の同定

形態観察、生理生化学的性質および 16S
 rRNA 遺伝子解析から 5-3B 株を
Chryseobacterium 属と同定した。16S rRNA
 遺伝子塩基配列 (1,514 bp) は DDBJ に登録
 済みである (accession no. AB773870)。

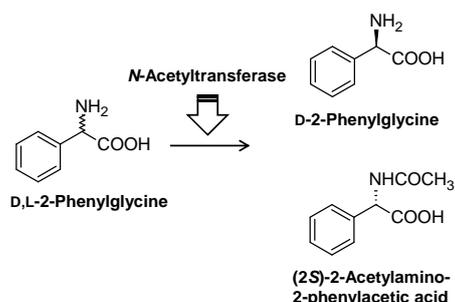


Fig. 1. Enantioselective

biotransformation of D,L-2-phenylglycine by *Chryseobacterium* sp. strain 5-3B.

5-3B 株における 2-フェニルグリシンから 2-アセチルアミノ-2-フェニル酢酸への変換

試験した炭素源、窒素源、天然培養基の中でポリペプトン添加培地が 5-3B 株の生育、2-フェニルグリシンから 2-アセチルアミノ-2-フェニル酢酸への変換に最適であった。変換に与える基質濃度の影響を調べたところ、最高 19.8 mM まで変換可能で、これ以上は 2-フェニルグリシンが溶解せず、試験できなかった。また、培地の pH については 8.0 から 9.0 の範囲が最高であった。

最適条件 (1% ポリペプトン-0.1% 2-フェニルグリシン培地 (pH 8.0)、7 ml/tube、30°C、140 rpm) にて試験した。その結果、生育とともに L-体の 2-フェニルグリシンのみが N-アセチル化され、(2S)-2-アセチルアミノ-2-フェニル酢酸と D-体の 2-フェニルグリシンが残った。それぞれの光学純度は 99%以上であることから、Growing cell による光学分割法を達成することができた (Fig. 2)。

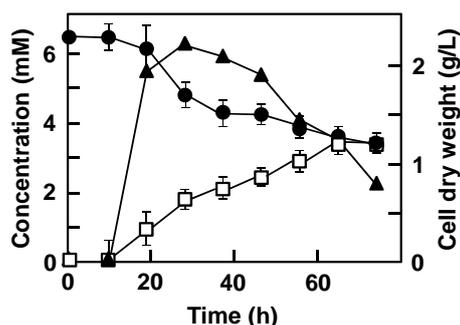


Fig. 2 Growth and biotransformation of D,L-2-phenylglycine by *Chryseobacterium* sp. strain 5-3B. The bacterium was cultivated under optimum conditions established based on the effects of various factors on the biotransformation. The strain was incubated at 30 °C with shaking for 64 h in 1.0% (w/v) polypeptone/0.1% (w/v) (6.6 mM) D,L-2-phenylglycine medium (pH 8.0, 7 ml/tube). Cell dry weight (filled triangles) was measured on cell pellets from 500 microL culture; D,L-2-phenylglycine (filled circles) and (2R)-2-acetylaminophenylacetic acid (open squares) were measured by HPLC (see text).

N-アセチル化に関わる酵素系の検索

2-フェニルグリシン培地にて培養して得られた菌体から調製した細胞抽出液を用い

て、2-フェニルグリシンおよび Acetyl-CoA 共存下で酵素活性測定したところ、確かに Acetyl-CoA に依存した N-アセチル化反応が見られ、DL-2-フェニルグリシンのうち、L-体のみが N-アセチル化された。2-フェニルグリシンの代わりに 2-フェニルグリシン誘導体を添加した培地で培養して得られた菌体についても同酵素活性を調べたところ、活性が見られた。一方、2-フェニルグリシン無添加の培地では活性は見られなかったことから、同酵素は 2-フェニルグリシン類により誘導的に生合成される酵素であることがわかった。

N-アセチル化に関わる酵素 (N-アセチルトランスフェラーゼ) の精製

2-フェニルグリシン添加培地で培養して得られた菌体から調製した細胞抽出液から硫酸分画および各種クロマトグラフィーにより同酵素を精製した (Table 2)。比活性は 90 U/mg であり、細胞抽出液と比較して 64 倍まで精製できた。

Table 2 Summary of purification

Fraction	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U·mg ⁻¹)	Recovery (%)
1: Cell extract	1,100	1,800	1.4	100
2: Streptomycin sulfate	1,400	2,100	1.1	140
3: Ammonium sulfate	320	160	1.9	29
4: Butyl-Cellulofine	280	20	12	25
5: DEAE-Cellulofine	32	0.96	33	2.9
6: Preparative electrophoresis	4.2	0.047	90	0.38

N-アセチルトランスフェラーゼの特性

物理化学的性質

i) 分子量測定

ゲル濾過法による同酵素の分子量は 18,000 であった。また、SDS-PAGE による同酵素の分子量もまた 18,000 であった。よって、本酵素は単量体で活性を示すことがわかった。

ii) N 末端アミノ酸配列の解析

SDS-PAGE で見られた分子量 18,000 のペプチドについて N 末端アミノ酸配列を 10 残基 (NDLLNAALKK) 決定することができた。データベースで解析した結果、高い類似性を示す類縁酵素はなかった。

iii) 触媒化学的性質

本酵素は pH 7.5 および 60°C において最大活性を示した。また、SH 基修飾試薬の中で特に PCMB や DTNB により阻害を受けた。

基質特異性について調べたところ、L 体のフェニルグリシンに対して高い基質特異性を示した。また、フェニルグリシンの誘導体の中でも 2-置換体の 2-クロロフェニルグリシ

ンに活性を示した。その他 4-置換体のフェニルグリシン誘導体 (4-クロロフェニルグリシン、4-ヒドロキシフェニルグリシン)、芳香環を持つアミノ酸 (フェニルアラニン、ホモフェニルアラニン)、芳香族アミン (5-アミノサリチル酸)、脂肪族アミン (フェニルエチルアミン) に対してはほとんど活性を示さなかった。

N-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子のクローニング

既報の N 末端アミノ酸配列解析の結果および既報の N-アセチルトランスフェラーゼの保存性の高いアミノ酸配列 (KLGFIHT) からプライマーを設計し、PCR を試み、0.4 kb の増幅断片を得た。得られた増幅断片の塩基配列 (383 bp) を決定し、決定した塩基配列から推定されるアミノ酸配列中には、5-3B 株由来精製酵素の N 末端アミノ酸配列と同様の配列が含まれていることを確認した。

つづいて、サザンブロット解析、セルフライゲーション、インバース PCR 法にて約 1.6 kb の断片をクローニングし、塩基配列解析の結果から、N-アセチルトランスフェラーゼをコードする ORF を見出した。塩基配列から推定されるアミノ酸配列 (161 a. a.) についてデータベースにて検索したところ、*Chryseobacterium gleum* ATCC35910 および *Chryseobacterium* sp. CF314 において putative N-acetyltransferase と機能推定されているタンパク質と 80%以上の類似性が見られた。

キラルアミン (2-フェニルグリシン) の立体選択的分割に利用できる微生物酵素を検索したところ、分離菌 (*Chryseobacterium* sp. 5-3B) 由来 N-acetyltransferase が 2-フェニルグリシンの L-体のみを N-アセチル化することを見出した。同反応に関わる N-acetyltransferase は、基質特異性や一次構造の点から既報の N-acetyltransferase とは異なっていた。本菌 (Growing cell) を用いることで培地中の 2-フェニルグリシンを効率的に分割できる。同酵素遺伝子の発現系の構築や形質転換下部を用いたより効率のよい生体触媒の取得が、今後の課題である。

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 1 件)

- ① Takenaka S, Honma Y, Yoshida K, Yoshida KI, Enantioselective N-acetylation of 2-phenylglycine by an unusual

N-acetyltransferase from *Chryseobacterium* sp. Biotechnology Letters. 査読有, 35, 2013, 1053-1059.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 竹中 慎治、吉田 健二、本間 悠太、吉田 健一、*Chryseobacterium* sp. 5-3B 由来 N-アセチルトランスフェラーゼの遺伝子クローニングと発現、日本農芸化学会 (仙台)、2013 年 3 月 25 日.
- ② 吉田 健二、竹中 慎治、吉田 健一、*Chryseobacterium* sp. 5-3B 由来 N-アセチルトランスフェラーゼの酵素化学的性質と遺伝子クローニング、日本農芸化学会 (神戸支部例会)、2012 年 12 月 1 日.
- ③ 吉田 健二、竹中 慎治、吉田 健一、*Chryseobacterium* sp. 5-3B 由来 N-アセチルトランスフェラーゼの特性解析、日本農芸化学会 (京都)、2012 年 3 月 24 日.
- ④ 竹中 慎治、吉田 健一、*Microbacterium paraoxydans* FK-2-1 由来 N-アセチルトランスフェラーゼの特性解析、生物工学会 (宮崎)、2010 年 10 月 28 日.

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹中 慎治 (TAKENAKA SHINJI)
神戸大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：40314512

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：