

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23560941

研究課題名(和文)新規エナンチオ選択的イミン還元酵素の発見と光学活性アミンの効率的合成

研究課題名(英文)Discovery of novel enantioselective imine reductases and efficient enzyme synthesis of optically active amines

研究代表者

満倉 浩一 (Mitsukura, Koichi)

岐阜大学・工学部・准教授

研究者番号：70324283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：キラルアミンは、医薬品等の合成において有用な化合物である。キラルアミンを効率的に化学合成する方法として、イミンの不斉還元が検討されているが、酵素による合成イミンの不斉還元に関する報告はなかった。そこで、土壌からイミン還元酵素を探索し、世界に先駆けて R体とS体選択的イミン還元酵素を見出した。酵素精製と特徴解析を行ったのち、遺伝子解析、組換え体の作製を行った。イミン還元酵素を用いて、高光学純度の光学活性アミンを効率的に合成した。

研究成果の概要(英文)：Chiral amines are useful compounds for the synthesis of pharmaceuticals. In an efficient chemical synthesis of optically active amine, asymmetric reduction of imine has been well studied.

However, enzymatic reduction of synthetic imine have not been reported yet. We therefore surveyed imine reductase from soil samples, and first found R-and S-imine reductases. After purification and characterization of the enzymes, gene analysis and preparation of recombinant cells were performed. We efficiently synthesized optically active amines with high optical purity using their imine reductases.

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：Chiral amine Enantioselectivity Enzymatic synthesis Imine reductase

1. 研究開始当初の背景

光学活性アミンは、医薬品や農薬などの合成中間体として用いられており、簡便かつ効率的な合成法の開発が望まれている。酵素合成では、酵素の立体特異性や広い基質特異性などの優れた特徴に加えて、それらの酵素遺伝子や立体構造に関する情報が入手しやすいこともあり、加水分解酵素、アミノ基転移酵素、アミン酸化酵素を用いる方法が数多く報告されている。有機合成では、イミンの不斉還元が効率的な光学活性アミン合成法として知られており、様々な合成法が報告されている。一方、合成イミンに作用するイミン還元酵素に関する報告は皆無であり、イミン還元酵素の発見が切望されていた。そこで本申請者らは、水系で安定な 2-メチル-1-ピロリン(2-MPN)を用いたスクリーニングを行い、新規 R 体特異的および S 体選択的イミン還元活性を示す土壌放線菌 *Streptomyces* sp. GF3587 と GF3546 をそれぞれ見出した。グルコース存在下で菌体による 2-MPN の不斉還元反応を行ったところ、GF3587 と GF3546 の菌体は、それぞれ変換率 90%以上で (R)-2-メチルピロリジン ((R)-2-MP) と (S)-2-MP を生産した (図 1)。そこで、本研究では、エナンチオ選択的イミン還元酵素を利用した光学活性アミンの効率的合成法の構築を目指して、酵素の特徴解析を行い、基質特異性ならびに酵素反応場を調査した。また、組換え体の作製し、光学活性アミンの効率的な合成に向けた基盤技術の構築を目指した。

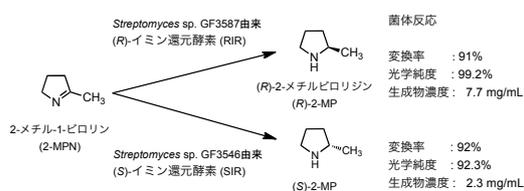


図 1. 2-MPN の微生物不斉還元

2. 研究の目的

(1) 光学活性アミンの酵素合成系を構築するために、R 体特異的および S 体選択的イミン還元酵素 (RIR および SIR) について特徴解析および遺伝子解析を行う。

(2) 疎水性の高いイミンを用いた酵素反応を想定し、水-有機溶媒二相系およびイオン液体中での酵素反応を検討する。

(3) 野生株のイミン還元酵素は、RIR と SIR のどちらも構成酵素であり、菌体内のタンパク量はどちらも微量であった。そこで、組換え菌の調製を行い、RIR と SIR の高発現系の構築を検討する。

3. 研究の方法

(1) 至適温度と熱安定性・至適 pH と pH 安定性・金属イオンおよび酵素阻害剤に対する影響を調べる。

(2) キネティックパラメーター (2-MPN や NADPH に対する K_m など) を算出する。

(3) 本酵素の酸化活性評価各種イミンあるいはエナミン類を調達あるいは合成し、R および S-イミン還元酵素 (RIR および SIR) の基質作用範囲を探る。またアルデヒドとアミン共存下で微水環境下あるいはイオン液体反応場での酵素反応を検討する。難水溶性あるいは加水分解を受けやすい化合物は、水系での酵素反応には適さない。イミン還元酵素について、水-有機溶媒二相系およびイオン液体の反応場での酵素活性を調査する。

(4) 酵素精製標品の PVDF 膜転写後、アミノ酸シーケンサーによる N 末端アミノ酸配列分析および本酵素のリジルエンドペプチダーゼ処理後、HPLC 分取し、アミノ酸シーケンサーによる内部アミノ酸配列を行う。

(5) 得られた一次配列情報をもとに、RIR および SIR 遺伝子の解析を行う。N 末端および内部アミノ酸配列情報を利用してプライマーを作成し、PCR で目的酵素遺伝子断片を増幅させる。部分断片の配列情報を利用してプライマーを設計し、ゲノムを制限酵素で切断した断片を鋳型にしてインバース PCR を行い、目的酵素遺伝子とその周辺領域の配列解析を行う。本イミン酵素のアミノ酸配列をデータベース検索し、他酵素との相同性を調べる。

(6) RIR および SIR 遺伝子をそれぞれ、発現プラスミドに挿入し、大腸菌内での酵素発現を検討する。また、本イミン還元酵素は、NADPH を補酵素として要求するため、発現プラスミドに本イミン還元酵素とグルコース脱水素酵素の各遺伝子をタンデムに組み込み、両酵素の発現を検討する。

4. 研究成果

(1) RIR と SIR を精製し特徴解析を行った。RIR は、菌体内に存在する構成酵素であった。菌体を破碎後、無細胞抽出液を調製し、硫酸分画、各種クロマトグラフィーを経て精製を行い、均一な精製酵素標品を得た。そのサブユニット分子量は、SDS-PAGE から 32,000 と算出された。また HPLC ゲルろ過の結果から、本酵素は、ホモダイマーを形成していることが示唆された。RIR は、補酵素として NADPH を要求する還元酵素であった。補酵素存在下、

本酵素の最適 pH を調べたところ、還元反応では pH 7.5、酸化反応では pH 11 であった。ただし、最適反応条件下では、還元活性は、酸化活性に比べて約 30 倍高い値を示した。基質特異性を調べたところ、イミン還元を触媒する既知のジヒドロ葉酸還元酵素 (EC 1.5.1.3) や Δ^1 -ピペリدين-2-カルボン酸還元酵素 (EC 1.5.1.21) に該当する基質には作用しなかった。

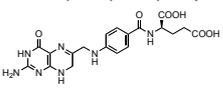
SIR についても特徴解析を行ったところ、比活性を除いて RIR と多くの類似点が見られ

表 1. RIR と SIR の特徴

	RIR	SIR
Molecular mass	64 kDa	79 kDa
Subunit molecular mass	32 kDa	29 kDa
Cofactor	NADPH	NADPH
Km for 2-MPN	3.52 mM	7.15 mM
Km for NADPH	3.7 μM	3.7 μM
Specific activity	10.2 U/mg	0.12 U/mg
Optimum pH (reduction)	7.5	7.0
(oxidation)	11.0	10.5
pH stability	6-8	6.5-8.5
Optimum temperature	50 $^{\circ}$C	40 $^{\circ}$C
Thermal stability	< 35 $^{\circ}$C	< 35 $^{\circ}$C

た(表 1)。

一方、基質特異性では、RIR と SIR に大きな違いが見られた。RIR は、2-MPN のみに作用する基質特異性の極めて高い酵素であったが、SIR は、 Δ^1 -pyrroline-2-carboxylic acid やイソキノリン骨格をもつイミンにも作用した。生成したアミンは、プロリンのみ光学純度が低いものの、他のアミンの光学純度は高い値を示した(図 2)。脂肪族および芳香族アルデヒドとアミン(アンモニア)を用いて、水系で合成したイミンに対する酵素活性を RIR と SIR について調べたところ、どちらの場合もアミンは生成しなかった。

Imine	Amine formed	Relative activity (%)	%ee	Config.
 2-Methyl-1-pyrroline		100	93	(S)
 Δ^1 -Pyrroline-2-carboxylic acid		34	27	(R)
 1-Methyl-3,4-dihydroisoquinoline		23	96.4	(S)
 6,7-Dimethoxy-1-methyl-3,4-dihydroisoquinoline		2	>99	(S)
 Dihydrofolic acid		0	-	-
 (E)-N-(1-phenylethylidene)aniline		0	-	-

100%: 0.130 μ mol/min/mg protein

図 2. SIR の基質特異性

(2) 難水溶性のイミンに対する酵素反応を行うための酵素反応場として、水-有機溶媒二相系、あるいは有機溶媒の使用が考えられる。そこで、反応液に対して 10% (v/v) になるように有機溶媒を添加した条件で、2-MPN に対する酵素活性を調べたところ、メタノールやジメチルスルホキシドの添加は、酵素活性への影響が比較的少ないことが判明した。

表 2. 有機溶媒存在下での酵素活性

Organic solvent (10% (v/v))	Relative activity (%)	
	RIR	SIR
None	100	100
Ethyl acetate	0	0
Methanol	72	82
Ethanol	27	27
1-Propanol	0	16
2-Propanol	0	10
Acetone	12	24
Dimethyl sulfoxide	74	44

RIR と SIR は、反応系中に 20% (v/v) を越える有機溶媒存在下では、酵素活性が著しく低下した。現在、イオン液体ヘキサフルオロリン酸 1-ブチル-3-メチルイミダゾリウム (BMIM-PF6)-有機溶媒中での酵素反応は、行っておらず、今後の検討課題である。

(3) 精製酵素の N 末端および内部アミノ酸配列情報を用いて、プライマーをデザインし、PCR で部分遺伝子断片を増幅させた。得られた遺伝子配列に基づいて、インバース PCR を行い、酵素遺伝子の全配列を決定した。RIR と SIR 遺伝子をデータベース検索したところ、6-ホスホグルコン酸脱水素酵素と 50-60% 程度の相同性を示した。また、RIR と SIR 間での相同性は、40% 程度であった。また、両酵素とも、6-ホスホグルコン酸には作用しなかった。これらの結果から、RIR と SIR は、どちらも新規酵素であると考えられた。さらに一次構造解析を進めたところ、RIR と SIR の N 末端から中央の配列間では、60% 程度の相同性を示すことから、活性部位は、中央から C 末端側の間に存在することが示唆された。RIR と SIR 遺伝子を発現ベクターに組込んだのち、大腸菌 *E. coli*. BL21 (DE3) を形質転換した。さらに、グルコース脱水素酵素 (GDH) 遺伝子をタンデムに連結した発現ベクターを組込んだ組換え大腸菌も作製した。RIR あるいは SIR と GDH 遺伝子を組込んだ組換え大腸菌を用いて、光学活性 2-MP の生産を試みた。RIR を用いた反応系では、基質阻害が生じない濃度で、最終的に 200 mM 2-MPN の還元反応を実施した。一方、SIR の系では、40 mM 2-MPN の還元反応を行った。その結果、変換率 98-100% で (R)-2-MP と (S)-2-MP の合成にそれぞれ成功した(図 3)。

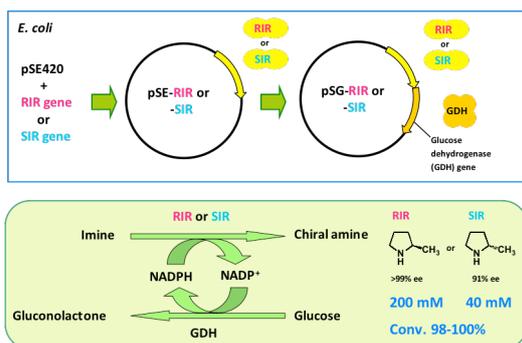


図3. 組換え菌を用いたキラルアミンの効率的合成

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4件)

- ① 満倉浩一、倉本達也、吉田豊和、木本訓弘、山本浩明、長澤 透、A NADPH-dependent (S)-imine reductase (SIR) from *Streptomyces* sp. GF3546 for asymmetric synthesis of optically active amines: purification, characterization, gene cloning, and expression, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*、査読有、97、2013、pp. 8079-8086
- ② 満倉浩一、長澤 透、*化学と生物* 新規エナンチオ選択的イミン還元酵素の探索と発見、査読無、65、2012、pp. 158-160
- ③ 満倉浩一、鈴木麻衣、篠田 祥、倉本達也、吉田豊和、長澤 透、Purification and characterization of a novel (R)-Imine reductase from *Streptomyces* sp. GF3587、*Biosci. Biotechnol. Biochem.*、査読有、75、2011、pp. 1778-1782
- ④ 満倉浩一、長澤 透、新規エナンチオ選択的イミン還元酵素の発見とその特徴解析、*酵素工学ニュース*、査読無、50、2011、pp. 23-25

[学会発表] (計5件)

- ① 満倉浩一、吉田豊和、長澤 透、Application of enantioselective imine reductases for the synthesis of optically active amines、Enzyme Engineering XXII、2013年9月24日、富山
- ② 満倉浩一、吉田豊和、長澤 透、Asymmetric synthesis of optically active amines from imines using enantioselective imine reductases、Biotrans 2013、2013年7月22日、マンチェスター、イギリス
- ③ 満倉浩一、吉田豊和、長澤 透、エナンチオ選択的イミン還元酵素を利用した光学活性アミン合成、生体触媒化学シンポジウム、2012年11月30日、富山

④ 満倉浩一、福岡達也、倉本達也、吉田豊和、長澤 透、(S)-イミン還元酵素による光学活性アミン合成、日本生物工学会、2012年10月24日、神戸

⑤ 満倉浩一、吉田豊和、長澤 透、Occurrence and characterization of a novel imine reductase、Biotrans 2011、2011年10月3日、シチリア島、イタリア

6. 研究組織

(1) 研究代表者

満倉 浩一 (MITSUKURA, Koichi)
岐阜大学・工学部・准教授
研究者番号：70324283

(2) 研究分担者

吉田 豊和 (YOSHIDA, Toyokazu)
岐阜大学・工学部・教授
研究者番号：90220657