

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24350078

研究課題名(和文) 酵素による糖質の炭素環化を基軸とする有機工業資源化グリーンケミストリー

研究課題名(英文) An enzymatic method for preparation of 6-membered carbocyclic compound from D-glucose

研究代表者

江口 正 (EGUCHI, Tadashi)

東京工業大学・理工学研究科・教授

研究者番号：60201365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：炭素6員環を有する化合物である2-デオキシ-scyлло-イノソースをD-グルコースからポリリン酸塩とNAD⁺の存在下で2-デオキシ-scyлло-イノソース合成酵素(BtrC)とポリリン酸グルコキナーゼと反応させることで、ワンポットで調製する方法を開発した。2-デオキシ-scyлло-イノソースは容易に芳香族化合物へ誘導可能であるため、本手法は広く入手可能なD-グルコースから、有機工業資源の生産へと繋がる持続可能なグリーンケミストリーの手法を示したものである。

研究成果の概要(英文)：A potential one-step process to 6-membered carbocyclic compound, 2-deoxy-scyлло-inosose, from D-glucose comprising one-pot incubation of D-glucose with recombinant 2-deoxy-scyлло-inosose synthase (BtrC) and polyphosphate glucokinase in the presence of polyphosphate and NAD⁺ was developed. It should be emphasized here that the present approach has significant potential for the production of 6-membered carbocyclic compound from widely available D-glucose and further implies significant opportunity for developing acceptable 'green' ways for the production of organochemical resources from sustainable agricultural and biomass products by utilizing enzymes involved in natural product biosynthesis.

研究分野：生物有機化学

キーワード：糖質環化酵素 グリーンケミストリー ポリリン酸グルコキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

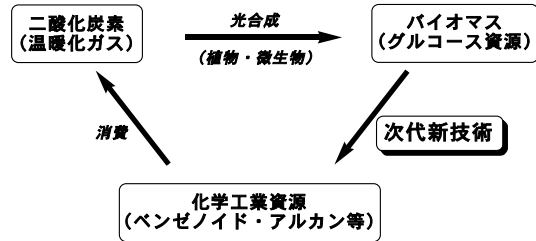
物質文明を謳歌してきた人類が直面する21世紀の課題は、食糧、物質資源、エネルギーの安定的確保である。将来枯渇の運命にある化石資源を二酸化炭素として大気に出す図式の中で現在、資源とエネルギーを獲得しており、地球温暖化や環境汚染等々を含めてさまざまな面で困難に遭遇している。次世代人類の生存のためには、持続可能な有機工業資源の開拓と人類の生存環境に矛盾しないそれらの活用技術の開発は急務であると考えられる。

地球上の炭素資源の循環に鑑みる時、大気中二酸化炭素の一方的増大は物質収支の面から見ても不都合であることは自明である。最近、バイオテクノロジーの進歩によって農業生産技術は大きく変わりつつあり、デンプンを中心とする糖質の生産量を著しく増大出来るに至っている。また、従来からセルロースをはじめとする多糖類光合成産物の有機資源化が論じられ、一部実践されてきた。アルコール発酵、乳酸やヒドロキシ酪酸など短鎖ヒドロキシ酸の生産とその重合による生分解性ポリマーの製造はその例であろう。これらの技術には、地球温暖化ガスの削減というグローバルな環境問題に寄与しようとする側面も含まれると考えられる。

化学工業技術の観点では、環境との調和のとれた技術、すなわちグリーンケミストリー技術が求められている。有害有機溶媒や各種の有害薬品を使用することなく、有害廃物を生み出さず、触媒の素材である希少資源等も浪費しないなど、地球環境の保全に必要なさまざまな要素を現実化する技術の開発が喫緊の課題になっている。21世紀技術としては触媒自体が再生可能で持続的に生産できる必要があり、また高温高圧や極低温などというエネルギー消費が不可避の特殊条件を必要としないものが求められている。

生物の体内で行われるさまざまな化学反応は酵素と総称される触媒により実現している。通常生物の生育条件である常温・常圧という穏和な条件の下、水環境中で高効率に反応を進める触媒である。人類は、これまでも発酵技術の進歩とともに酵素利用技術を発展させてきているが、さらに多様な物質変換反応として利用可能な酵素反応を開拓する必要がある。さまざまな生物種のゲノム計画によって、遺伝子・酵素の情報が急速に蓄積されつつあり、人類はこれを系統的に解明して、工業資源の生産や医薬農薬資源の開拓などに向けて、今後の物質生産における触媒技術として開発・展開すべきであろう。

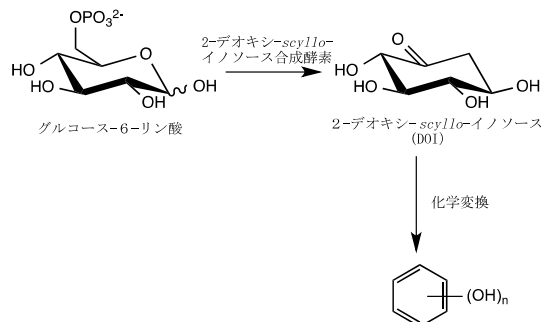
有機化学工業資源という観点では、光合成産物を脂肪族あるいは芳香族化合物として活用する方法の樹立が重要である。再生可能資源の開拓という側面では、糖類の化学工業資源化が今こそ重要な意味を持って来ている。糖質を利用した工業資源の生産に向けて、開発・展開すべき課題と考えられた。



2. 研究の目的

本研究は、植物や微生物による光合成（二酸化炭素の糖質化）を物質生産の素反応として捉え、その第一義の産物であるグルコースあるいはグルコース-6-リン酸の炭素環化を鍵工程としてベンゼノイドやシクロヘキサン化合物に至るグリーンケミストリーな有機工業資源化プロセスを開発することを究極の目的とする。では、如何にしてグルコースを中心とする光合成糖質生産物をアルカンやベンゼノイドの工業資源に導くことが出来るであろうか。

本研究の着想の起点は、臨床医学上重要な2-デオキシストレプトアミンを含むアミノサイクリトール抗生物質の生合成過程を研究する中で、グルコース-6-リン酸が炭素環化化合物である2-デオキシ-scyllo-イノソースに閉環される反応を具体的に検出し、2-デオキシ-scyllo-イノソース合成酵素と命名したその酵素を実体として発見単離し、さらにその酵素遺伝子を見出してクローニングと機能発現が実現できたことである。さらには、その生成物である2-デオキシ-scyllo-イノソースが簡便な化学変換により、芳香族化合物への変換が実現できたことである。しかしながら、現在のところ、2-デオキシ-scyllo-イノソースの生産量は、組換え大腸菌を用いての発酵法で、10数 g/L程度であり、実用化には未だ満足できるレベルではない。



従って、本酵素による2-デオキシ-scyllo-イノソースの生産をコアに物質生産に展開するためには、2-デオキシ-scyllo-イノソース生産の方法・効率の改良が、まず必要である。そのため、(1)発酵法によらない2-デオキシ-scyllo-イノソースの生産技術の開発、(2)2-デオキシ-scyllo-イノソース合成酵素反応の高効率化、(3)他種起源の新規類似酵素の探索、等々の基礎的検討が重要である。本研究では、2-デオキ

シ-*scyllo*-イノソースの生産に焦点を絞り、こられの基礎的な検討を行い、酵素による糖質の炭素環化を基軸とする有機工業資源化を目指すものである。

3. 研究の方法

2-デオキシ-*scyllo*-イノソース合成酵素は、グルコース-6-リン酸を基質として用いて、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD⁺)を補酵素として、炭素6員環化合物、2-デオキシ-*scyllo*-イノソースへの変換反応を触媒する酵素である。従って、2-デオキシ-*scyllo*-イノソース生産のためには、基質としてグルコース-6-リン酸の供給が必要である。試験管内では、グルコース-6-リン酸は、グルコースからアデノシン三リン酸(ATP)の存在下、ヘキソキナーゼの作用により調製できるが、非常に高価なATPを用いるため、実用的に用いることができない。従って、現在のところ、微生物の代謝系を利用したグルコース-6-リン酸の供給、すなわち発酵系による2-デオキシ-*scyllo*-イノソース生産利用が考えられている。しかしながら、グルコース-6-リン酸は一次代謝である解糖系における最初の化合物であるが故に、発酵法においてグルコース-6-リン酸の2-デオキシ-*scyllo*-イノソースへの変換の効率は必ずしも高いものではない。また、生成した2-デオキシ-*scyllo*-イノソースの精製法も問題点である。現在では、微生物の遺伝子工学による代謝の遮断により、2-デオキシ-*scyllo*-イノソースの蓄積生産の可能性も試みられているが、精製法、コストの問題など本質的に組換え微生物による発酵系に由来する問題点は残されている。

そこで本研究では、これらの問題点を鑑み、新たな2-デオキシ-*scyllo*-イノソース生産法を考案するに至った。それはグルコース-6-リン酸の供給をポリリン酸キナーゼあるいはポリリン酸グルコキナーゼにより調製しようとするものである。ポリリン酸キナーゼは、ポリリン酸をリン酸供与源としてアデノシン二リン酸(ADP)をATPへと変換する酵素である。また、ポリリン酸グルコキナーゼは最近明らかにされた酵素であり、ポリリン酸をリン酸供与源として、グルコースの6位を直接リン酸化する酵素であるが、性質の明らかにされた酵素の数は限られている。

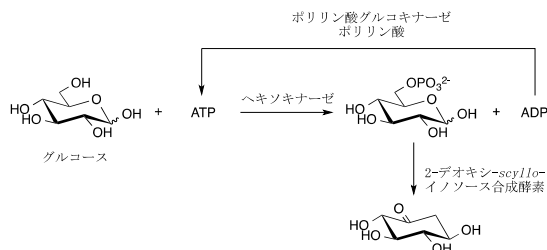
ATPを介してポリリン酸キナーゼとヘキソキナーゼにより、グルコースの6位リン酸化あるいはポリリン酸グルコキナーゼによる直接グルコース-6-リン酸の供給が可能であれば、2つあるいは3つの酵素を利用した1ポットの反応で、2-デオキシ-*scyllo*-イノソース生産が可能となる。その際には、リン酸供給源として、食品添加物として非常に安価で入手可能なポリリン酸を使用することになり、2-デオキシ-*scyllo*-イノソース生産のコスト低減を計ることができる。また、この反応系が効率よく進行すると、反応系に

中性分子は目的生産物の2-デオキシ-*scyllo*-イノソースだけが存在することになり、イオン交換樹脂を用いて簡単に2-デオキシ-*scyllo*-イノソースを精製でき、この点でも2-デオキシ-*scyllo*-イノソース生産のコスト低減を計ることができる。さらには、将来的には酵素固定化による流体型反応プロセスへの応用も可能と考えられ、更なる効率化も期待できる。

4. 研究成果

2-デオキシ-*scyllo*-イノソースは簡単な化学反応で芳香環化し、有用工業資源であるカテコール等に変換可能である。すなわち、本酵素は再生可能資源の糖質から有機化学工業資源を生産する手段になり得ると考えられる。2-デオキシ-*scyllo*-イノソース生産のためには、基質としてグルコース-6-リン酸の供給が必要である。試験管内では、グルコース-6-リン酸は、ATPの存在下、ヘキソキナーゼの作用により調製できるが、高価なATPを用いるため、実用に用いることができない。そこで、グルコース-6-リン酸の供給法としてポリリン酸キナーゼあるいはポリリン酸グルコキナーゼによる調製を検討した。

まず、ポリリン酸キナーゼを用いる方法を検討した。大腸菌 K-12 株由来のポリリン酸キナーゼを利用することで、安価なポリリン酸を使用してATPの再生を行うことで、ヘキソキナーゼ、2-デオキシ-*scyllo*-イノソース合成酵素存在下で、グルコースから2-デオキシ-*scyllo*-イノソースへの変換を目指すことにした。大腸菌 K-12 株のゲノムにコードされているポリリン酸キナーゼ(EC. 2.7.4.1.)をクローニングし、大腸菌による発現・精製を行い、精製酵素を得た。そこで想定した酵素反応が進行するかを確認することとした。精製した *E. coli* K12 ポリリン酸キナーゼと *Bacillus circulans* 由来の2-デオキシ-*scyllo*-イノソース合成酵素 BtrC を用いて、10 mM グルコース及びポリリン酸、1 mM ADP、0.5 □M ヘキソキナーゼ、0.5 mM NAD⁺ を加え、37 °C で一晩反応させた。

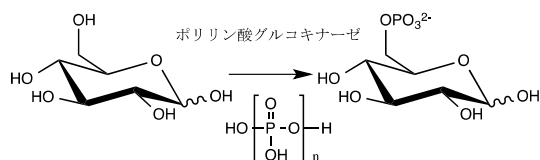


その結果、低収率(37%)ながら、1ポットでグルコースから2-デオキシ-*scyllo*-イノソースへの変換に成功した。しかしながら、ポリリン酸キナーゼを利用する系ではヘキソキナーゼも用いなくてはならないので、次に、ポリリン酸とグルコースから一挙にグルコース-6-リン酸を合成可能なポリリン酸グルコキナーゼを利用する系での2-デオキ

シ-scyllo-イノソース生産も検討することにした。

ポリリン酸グルコキナーゼは、安価なポリリン酸をリン酸供与源として、グルコースの6位を直接リン酸化する酵素である。ポリリン酸グルコキナーゼによるグルコース-6-リン酸の供給が可能であれば、2つの酵素を利用した1ポットの反応で、2-デオキシ-scyllo-イノソース生産が可能となる。

まず、鍵となるポリリン酸グルコキナーゼの入手が必要である。そこで種々のポリリン酸グルコキナーゼの発現・精製および酵素活性を検討した。ポリリン酸グルコキナーゼとして、以下の3つの酵素を選択した。それらは、放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) 由来ポリリン酸グルコキナーゼ (SCO5059)、アミノ酸生産に工業的に利用されている放線菌 *Corynebacterium glutamicum* 由来ポリリン酸グルコキナーゼ (Cgppgk) および好熱性菌 *Thermobifida fusca* 由来ポリリン酸グルコキナーゼ (Tfppgk) である。

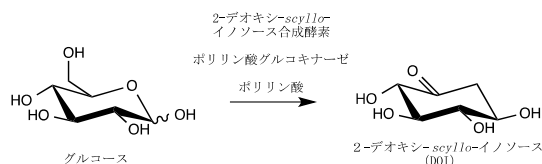


まず、これらの酵素をクローニングして、大腸菌内で発現して精製したところ、His-tag タンパク質として発現させ、金属アフィニティーカラムを用いて、活性を保持したまま簡単に精製できることを確認した。次にこれら酵素を用いて、グルコースからグルコース-6-リン酸への変換効率を検討した。リン酸供与体として、重合度6のポリリン酸6、重合度25のポリリン酸25、重合度60-70のポリリン酸をリン酸供与体として用いて、酵素反応を行った。酵素反応活性は、ポリリン酸グルコキナーゼの反応で生成したグルコース-6-リン酸を、NAD⁺とグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼをカップリングさせて生じるNADHを経時的に追跡して行った。その結果、Cgppgkを用いたときに最も高い比活性 0.76 Umg⁻¹[μmol/min・mg]が観測された。ポリリン酸25をリン酸供与体として用いた場合、SCO5059の15倍、Tfppgkの1.9倍の比活性を示した。これらの結果から、Cgppgkを2-デオキシ-scyllo-イノソース生産に用いるポリリン酸グルコキナーゼとした。また、いずれの酵素も、鎖長が長いほど比活性が高くなることが分かった。また、ポリリン酸グルコキナーゼは、ポリリン酸の他に ATP もリン酸供与体として働くことが知られている。そこで ATP を用いて、上記の3種の酵素で酵素反応を検討したが、全てポリリン酸25、60-70よりも低い活性を示した。また、ポリリン酸60-70を用いたときの方が、ポリリン酸25を用いた場合より活性が高かったが、ポリリン酸60-70は高価 (株式会社バイオエネックス200 mg 12000円)

であり、工業的なDOI生産を考慮すると現実的ではない。一方、ポリリン酸25は安価 (メルクミリポア社 1 kg 8900円) で入手やすく、ポリリン酸25の比活性がポリリン酸60-70の約3分の1でありさほど差が大きくなかったことから、ポリリン酸25をリン酸供与体として選択した。

次に、グルコースから2-デオキシ-scyllo-イノソースへのワンポットでの酵素合成系を検討した。*Bacillus circulans* 由来の2-デオキシ-scyllo-イノソース合成酵素 BtrC と組み合わせてグルコース、ポリリン酸 25、Mg²⁺、および酵素の濃度や緩衝液を種々検討した結果、25 mM リン酸緩衝液 (pH 7.7) 中、グルコース 5 mM、ポリリン酸 25 を 3.0 mM、MgCl₂ 0.5 mM、NAD⁺ 0.3 mM、cgppgk 及び BtrC 7.5 μM の条件の時、24 時間ワンポットで完全に反応が進行し、安価なグルコースとポリリン酸を原料として、2-デオキシ-scyllo-イノソースを収率 90% 以上という効率的に酵素合成する系を確立することができた。また、2-デオキシ-scyllo-イノソースの精製検討を行い、[H⁺]フォームの陽イオン交換樹脂 CG-50、[HCOO⁻]フォームの陰イオン交換樹脂 DOWEX 1X8 を用いて、ステップワイズで容易に精製することができた。

また、さらに金属アフィニティー樹脂に保持した両酵素を用いてもポリリン酸および NAD⁺ の存在下でグルコースから2-デオキシ-scyllo-イノソースの生成も確認しており、酵素固定化による反応プロセスへの応用も可能であることが分かった。



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)

Mai Koide, Akimasa Miyana, Fumitaka Kudo, Tadashi Eguchi, Characterization of Polyphosphate Glucokinase SCO5059 from *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読あり, Vol. 77, No. 11, 2013, 2322-2324.
doi: 10.1271/bbb.130498

[学会発表](計2件)

森 彩花、小出麻依、宮永顕正、工藤史貴、江口 正、糖質から炭素六員環化合物への酵素的変換、日本化学会第 95 春季年会、2015 年 3 月 27 日、日本大学船橋キャンパス (千葉)
2-デオキシ-scyllo-イノソース合成酵素

の部位特異的変異実験による触媒機構解析
小出麻依、工藤史貴、江口 正、第 2
回 CSJ 化学フェスタ 2012、2012 年 10 月
14 日、東京工業大学（東京）

〔産業財産権〕

取得状況（計 1 件）

名称：2-デオキシ-*scyllo*-イノソースの調製
法

発明者：江口正、工藤史貴

権利者：東京工業大学

種類：特許

番号：特開 2014-064513

出願年月日：2012.09.26.

取得年月日：2014.04.17

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cms.titech.ac.jp/~eguchi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江口 正 (EGUCHI, Tadashi)

東京工業大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：60201365