

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：23201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850053

研究課題名(和文) アミノラクタム代謝酵素群の機能解析と光学活性アミノ酸合成への展開

研究課題名(英文) Study of the enzymes in the aminolactam metabolic pathway and their utilization for the optically active amino acid synthesis

研究代表者

富宿 賢一 (Fuhshuku, Ken-ichi)

富山県立大学・工学部・研究員

研究者番号：70392090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： α -位にアミノ基を有し環状の γ -アミノ酸アミドとみなすことのできる γ -アミノラクタムの微生物代謝に関する研究を進め、 ϵ -アミノ- ϵ -カプロラクタム(ACL)を単一の炭素・窒素源とする微生物の集積培養を行い、その酵素活性を評価した。その結果、2種の細菌がACLをL-体選択的に加水分解することを見出した。このうち、*Mesorhizobium* sp. L88を用いる微生物変換が、D-体のアミノラクタム類の調製に利用できることを示した。さらに、8種の細菌がACLのラセミ化を触媒することを見出し、このうち、*Ensifer* sp. 23-3からラセマーゼを精製し、その諸性質を明らかにした。

研究成果の概要(英文)： α -Aminolactams containing an amino group at the α -position can be considered as cyclic γ -amino acid amides. For the study on the metabolism of γ -aminolactams, the synthesis of a series of optically active medium-sized γ -aminolactams had been already reported by us. By the screening of microorganisms that can assimilate ϵ -amino- ϵ -caprolactam (ACL) as a sole source of carbon and nitrogen from soil samples, two microorganisms that can hydrolyze ACL L-enantioselectively and degrade further have been isolated and identified as *Mesorhizobium* sp. L88 and *Aneurinibacillus migulanus* L168. This microbial degradation has been developed to the production of D- γ -aminolactams under mild conditions. Furthermore, eight bacterial strains that have the ability to racemize ACL have been isolated and identified. Among them, γ -aminolactam racemase from *Ensifer* sp. 23-3 has been purified and characterized.

研究分野：応用微生物学、酵素化学、有機化学

 キーワード：微生物変換 微生物酵素 γ -アミノラクタム γ -アミノ酸アミド 加水分解 ラセミ化 加水分解酵素
ラセマーゼ

1. 研究開始当初の背景

光学活性物質の合成は現代有機化学の大きなテーマの一つであり、その方法は、キラルプール法、不斉合成法、光学分割法の3種類に大別できる。我々はこれまでに、微生物や酵素を温和な条件下利用可能な高選択的な物質変換試剤としてとらえ、さまざまな合成基質を変換する微生物や酵素をスクリーニングにより見出し、光学分割や不斉合成による光学活性物質の合成へと展開してきた。

光学分割は、比較的容易に調製可能なラセミ体を利用し両鏡像体を調製できるという利点を有するものの、理論上、収率50%を超えることができないという問題点がある。我々はこれまでに、あらかじめ簡便な方法で一方の鏡像体へと偏らせた基質を用いる方法や、プロキラルな基質を用いる不斉合成へと転換する方法により、この問題点を解決してきた。一方、光学分割の理論収率の壁を乗り越える別の方法として、ダイナミックな光学分割(動的光学分割)という方法がある。未反応の基質を系内でラセミ化させながら分割を行うことにより、最終的に収率100%で目的物質を得ることができる。

我々は、ダイナミックな光学分割による光学活性なアミノ酸の合成を志向し、本研究を計画した。アミノ酸は、カルボキシル基とアミノ基の両官能基を構造内に含み、各種の医薬品や農薬、機能性材料等の合成原料として、L-体やD-体、天然型、非天然型を問わず、非常に重要な化合物群である。また、近年のタンパク質工学の発展により、部位特異的な非天然型アミノ酸の導入によるタンパク質の機能改変も盛んになっており、今後益々その需要は増すと考えられている。

ダイナミックな光学分割に用いられるラセミ化酵素(ラセマーゼ)の代表的な例として、東レと左右田らにより精製された *Achromobacter obae* 由来の α -アミノ- ϵ -カプロラクタム(ACL)ラセマーゼが挙げられる。この酵素はリジンの工業生産に一時用いられていたが、近年、浅野らにより、鎖状アミノ酸アミドに対するラセミ化活性をも示すことが新たに見出された。これにより、立体選択的なアミノ酸アミド加水分解酵素と組み合わせることにより、ダイナミックな光学分割による光学活性なアミノ酸の定量的な合成が可能になった。しかし、ACLに比べアミノ酸アミドに対する活性は低く、また、嵩高い官能基や極性官能基、芳香環を含むアミノ酸アミドに対してはほとんど活性を示さないという欠点を有しており、より高い活性を示すアミノ酸アミドラセマーゼの開発が必要とされていた。

2. 研究の目的

アミノラクタムやアミノ酸アミドに作用するラセマーゼと立体選択的な加水分解酵素とを新規に探索および精製し、その機能の解明を目指すとともに、両酵素を組み合わせ

たダイナミックな光学分割(動的光学分割)による光学活性なアミノ酸の合成へと展開することを目的として、新規なラセマーゼや加水分解酵素に関する酵素化学的な基礎研究と、これら酵素を用いるダイナミックな光学分割による光学活性なアミノ酸の合成へと展開するための基盤研究を行う。

3. 研究の方法

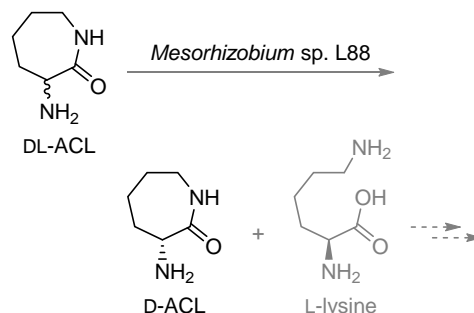
土壌微生物からの酵素の探索と精製、生化学的解析、各種基質の化学合成や酵素反応解析、遺伝子クローニングと大腸菌での異種発現等、応用微生物学や酵素化学、有機合成、遺伝子工学等の多岐に亘る技術を複合的に用い、以下の4つの課題に取り組んだ。

- (1) *Achromobacter obae* 由来のACLラセマーゼの基質認識機構の解明と基質特異性の改変
- (2) 新規なラセマーゼや立体選択的な加水分解酵素の探索と酵素化学的な基礎研究
- (3) 閉環オレフィンメタセシスを鍵反応とするアミノラクタム合成法の確立
- (4) ダイナミックな光学分割によるアミノラクタムからの光学活性なアミノ酸の合成

4. 研究成果

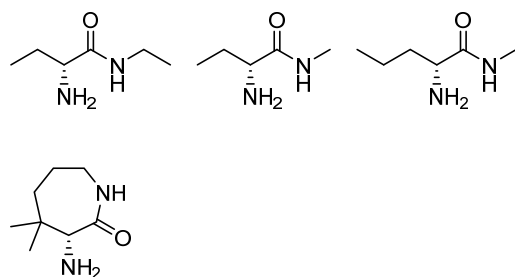
平成25年度:

α -アミノラクタムは、 α -位にアミノ基を有しカルボキシ基と末端アミノ基が脱水縮合により閉環した、アミノ酸と類似した構造を有する化合物であり、bengamide類や capuramycin 類など数多くの天然物の部分構造として存在する。 α -アミノラクタムに作用する酵素群を探索するため、各地の土壌サンプルを用い α -アミノラクタムを単一の炭素源や窒素源とする微生物の集積培養を行った。集積培養により単離した微生物を液体培養後集菌し、静止菌体を用いてDL-ACLを基質とする加水分解反応を行った。一定時間後回収し、その反応性と立体選択性をHPLCにより評価した。優れた反応性と立体選択性を示す微生物を選抜し、その微生物変換の反応条件や、この反応を活かしたD- α -アミノラクタム類の調製を検討した。土壌サンプルの集積培養により単離した微生物から、ACLをD-立体選択的に加水分解する微生物を見出すことはできなかったが、L-立体選択的に加水分解する微生物を複数見出した。その中でも *Mesorhizobium* sp. L88 は特に高い立



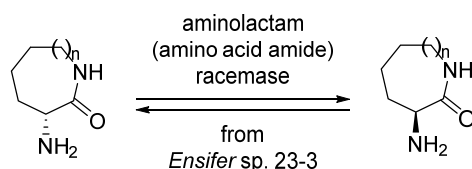
体選択性を示し、L-体のみを加水分解し D-体に対しては全く作用しなかった。この微生物の培養条件や微生物変換の反応条件を最適化した後基質特異性を評価し、五～八員環の各種の D- α -アミノラクタムを調製した。

Achromobacter obae 由来の ACL ラセマーゼの基質認識機構の解明を目指し、ACL の環構造を切断し鎖状にした化合物やアミノラクタムの環上に嵩高い置換基を含む化合物を対応するアミノ酸とアミンから合成し、その酵素反応を解析した。その結果、*Achromobacter obae* 由来の ACL ラセマーゼはこれらの化合物に対し、全く活性を示さないことが判明した。



平成 26 年度：

前年度までに、 α -アミノラクタムを単一の炭素源や窒素源とする培地での土壌サンプルの集積培養により、 α -アミノラクタムや α -アミノ酸アミドに作用するラセミ化活性を複数の微生物から見出した。この結果を基に、まず、単離した微生物を液体培養後集菌し、静止菌体を用いて D-体あるいは L-体の α -アミノラクタムを基質とする菌体反応を行った。一定時間後、残存する α -アミノラクタムの鏡像体過剰率を HPLC により測定し、そのラセミ化活性を評価した。その結果、 α -アミノラクタムに対して再現性良くラセミ化活性を示す 8 菌株に絞り込んだ。高いラセミ化活性を示したこれら 8 菌株は、16S rDNA 解析と形態観察、生理・生化学的性状試験により同定し、それぞれ *Ensifer* sp. と *Rhizobium* sp.、*Shinella* sp. の 3 種類のいずれかに分類された。無細胞抽出液での酵素反応により、 α -アミノラクタムに対するラセミ化活性と共に、 α -アミノ酸アミドに対するラセミ化活性も評価したところ、低活性ながらも、 α -アミノ酸アミドに対しても良好なラセミ化活性を示すことがわかった。最も良好な活性を示した *Ensifer* sp. 23-3 株の酵素について各種クロマトグラフィーによる精製を行い、SDS-PAGE 上で単一のバンドを示すまで精製した。精製した酵素を用いその酵素化学的諸性質を明らかにし、遺伝子クローニングを実施するために重要な N-末端アミノ酸配列の情報を得ることができた。



我々によるアリルエステルのクライゼン転位と閉環オレフィンメタセシスを鍵反応とするアミノラクタムの合成経路は、安価なグリシンから出発し、共通の合成中間体を実験室レベルで数～数十グラムのスケールで合成可能である。この合成経路の反応条件や保護基についてより詳細な検討を行ったが、閉環オレフィンメタセシス以降の各段階の収率を改善するには至らなかった。

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)

Fuhshuku, K.; Takata, M.; Iwatsubo, H.; Asano, Y.

Preparation of D- α -aminolactams by L-enantioselective degradation of α -aminolactam mediated by *Mesorhizobium* sp. L88
Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 査読有, **2014**, 3 (3), 42-47.

DOI:10.1016/j.bcab.2014.01.003

[学会発表](計 3 件)

富宿 賢一、高田 桃子、岩坪 宏香、浅野 泰久

立体選択的な微生物変換を活かした D- α -アミノラクタムの調製

第 6 回北陸合同バイオシンポジウム、石川県七尾市、2013 年 11 月 8 日

永森 慎吾、高田 桃子、富宿 賢一、浅野 泰久

アミノラクタムやアミノ酸アミドに作用するラセミ化酵素の探索と精製

第 6 回北陸合同バイオシンポジウム、石川県七尾市、2013 年 11 月 8 日

Fuhshuku, K.; Takata, M.; Iwatsubo, H. Asano, Y.

Screening for microorganisms and their enzymes acting on α -aminolactams

Biotrans2013: マンチェスター (英国)、2013 年 7 月 22 日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富宿 賢一 (FUHSHUKU, Ken-ichi)

富山県立大学・工学部・生物工学科および

生物工学研究センター
研究者番号：70392090