

平成30年6月14日現在

機関番号：13701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06843

研究課題名(和文) プロキラルジオールの不斉酸化酵素の発見と創薬リード化合物の合成

研究課題名(英文) Development of asymmetric oxidizing enzyme acting on prochiral diols and synthesis of lead compounds for drug

研究代表者

菊川 寛史 (KIKUKAWA, Hiroshi)

岐阜大学・工学部・助教

研究者番号：80758805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：平成28年度に、アルキル側鎖をもつ立体障害が大きい2,2-ジエチル-1,3-プロパンジオールを酸化する微生物(A株およびB株)を見出した。光学純度を算出したところ、A株は光学純度65% eeでR体、B株は光学純度33%でS体のヒドロキシアルカン酸を生成した。

平成29年度は、この不斉酸化活性を担う酵素遺伝子の単離と異種発現による更なる機能評価を進めた。プロテオーム解析と全ゲノム解析から複数の候補遺伝子を選抜し、これら候補遺伝子を異種発現した。光学純度を算出したところ、3種の組換え株においてR体選択性を確認した。そのうち、一種のアルコール脱水素酵素遺伝子の発現株では、90% eeでR体を生成した。

研究成果の概要(英文)：In the first year, we found microbes A and B asymmetrically oxidizing 2,2-diethyl-1,3-propanediol. As a result of optical purity analysis, strain A synthesized (R)-hydroxypropanoate at 65% ee, and strain B synthesized (S)-hydroxypropanoate at 33% ee.

In the second year, we aimed to isolate and characterize the genes coding asymmetrically oxidizing enzyme using heterologous expression system. Several candidate genes were selected through both proteome and whole-genome analysis, and were heterologously expressed. As a result of optical purity analysis, three recombinants exhibited (R)-selectivity. One of the recombinant expressing an alcohol dehydrogenase synthesized (R)-hydroxypropanoate at 90% ee.

研究分野：応用微生物学

キーワード：プロキラルジオール 不斉酸化 ヒドロキシアルカン酸 アルコール脱水素酵素 プロテオーム解析

### 1. 研究開始当初の背景

医薬等に利用される生理活性物質や生体分子には鏡像異性体が存在することが多い。なかでも、光学活性ヒドロキシアルカン酸は医薬合成中間体、機能性ポリマー原料等広範に利用されている。例えば、R-2-ヒドロキシメチルヘキサン酸 (R-2-HMHA) は多剤耐性黄色ブドウ球菌に対する抗生物質の合成中間体であり、3-ヒドロキシ酪酸の重合体であるポリヒドロキシ酪酸は生体にも適応する生分解性ポリマーとして医療等へ応用が期待されている。また、タンパク質を構成するアミノ酸の多くもキラル化合物であり、非天然アミノ酸を骨格とする創薬リード化合物の探索も行われている。しかし、生体内で目的の機能を有するのは一方の鏡像異性体であることが多く、鏡像異性体の選択的・効率的合成法が不可欠である。有機化学合成法では合成反応ステップが多段階となるために高価な触媒や有機溶媒が多量に必要であることに加え、反応位置や立体配置の選択が困難である。そこで、生体触媒を用いる酵素法による効率的な合成法の確立が期待されている。(大橋武久, キラルテクノロジーの進展, 173-186 (2001))

本研究室は、自然界から有用酵素の発見により立体選択的合成法を多数確立してきた。特に 2-HMHA の合成において、従来法と異なる基質 2-ブチル-1,3-プロパンジオールから R 体と S 体の 2-HMHA に各々変換する微生物を単離・機能解析を行い、新規な 2-HMHA 合成法を確立した (Mitsukura et al. Applied Microbiology and Biotechnology, 76:61-65 (2007))。この酵素はプロパンジオールの一方のヒドロキシメチル基にのみ作用し、カルボン酸まで変換する。しかし、この反応は立体障害の小さな化合物によく作用し、立体障害の大きな置換基をもつジオールには反応しなかった。また、これら酵素は膜結合型であり精製及び異種発現系の構築が容易ではなかった。そこで、立体障害が大きなジオールをモデル基質として酸化能を有する微生物を新規探索するに至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、種々の基質に広く作用する汎用性の高い不斉酸化酵素を選抜する。具体的には、立体障害の大きな置換基を不斉酸化する酵素を発見し、反応機構及び構造的特徴を解明する。また、立体障害の大きなアルキル基やアミノ基を置換基にもつプロパンジオールの不斉酸化により、効率的な光学活性ヒドロキシアルカン酸合成法と非天然アミノ酸合成法の確立を目指した (図 1)

将来的には、不斉酸化反応機構の解明と不斉酸化反応の制御、また様々な化合物を変換する酵素触媒のレパートリー化により、創薬リード化合物の合理的・精密な合成法の確立を目指した。

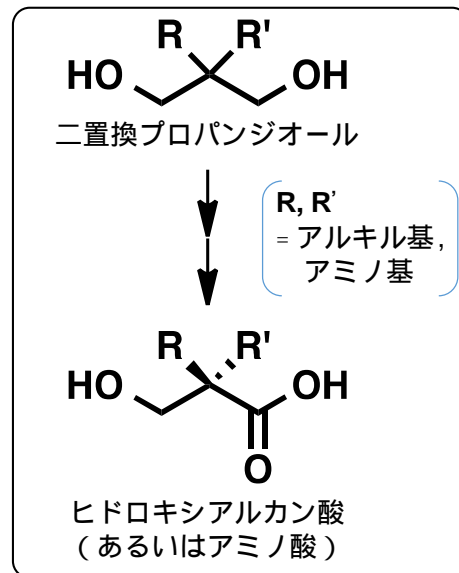


図 1. ジオール類の酵素的な不斉酸化

### 3. 研究の方法

(1) 2,2-ジエチル-1,3-プロパンジオールを立体障害の大きなジオールのモデルとし、これを単一炭素源にして微生物を集積培養したところ、酸化活性を示す微生物を 1 株得た。この株をもとに探索条件を最適化し、S, R 体の選択性も考慮して活性菌の探索を網羅的に行う。さらに、基質の変換効率及び立体選択性の観点から候補株を選抜する。

(2) 選抜株に関して、立体障害の大きな置換基 (C2 以上のアルキル基及びアミノ基) をもつ種々の二置換プロパンジオールを基質として反応性を評価する。アミノ基に関しては、特に 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオールの不斉酸化による L-メチル-L-セリン合成に挑む。さらに、(1) で得た酵素活性の情報と併せて評価することで変換効率・立体選択性・基質特異性の全てにおいて汎用性の高い不斉酸化酵素を選抜し、候補微生物を数株に絞る。

(3) 誘導発現性、及び可溶性を示す酵素を優先的に選抜・酵素精製し、プロテインシーケンスにて N 末端アミノ酸配列を決定する。

(4) 次世代シーケンサーを用いて、選抜した微生物の全ゲノムを解析し、部分的アミノ酸配列をもとに酵素遺伝子を同定する。また、酵素遺伝子の異種発現系を構築し、大量に精製することで後の諸性質解析の促進を図る。

(5) 有用物質生産 (種々のヒドロキシアルカン酸、L-メチル-L-セリンなど) の実用化に向け、酵素の諸性質解明と酵素反応条件の最適化を行う。

#### 4. 研究成果

アルキル側鎖を2つもち立体障害が大きい化合物である2,2-ジエチル-1,3-プロパンジオール (DEPD) を単一炭素源として土壌微生物を単離した。得られた微生物群から、DEPDの片方のヒドロキシメチル基をカルボキシル基へと酸化 (不斉酸化) する活性を示す菌株を1株 (A株) 得た。さらに、種々の反応条件を最適化し、A株の休止菌体を用いることで、プロキラル基質である2-エチル-2-メチル-1,3-プロパンジオール (EMPD) の不斉酸化反応を試行した。キラル HPLC 分析の結果、A株は変換効率 50%、エナンチオマー過剰率 65% ee で R 体のヒドロキシアルカン酸の生成を示した。

一方、DEPDを単一炭素源とした集積培養では、二つの置換基の立体障害が大きいため、基質として利用する活性菌が多く得られなかったと考えた。そこで、EMPDを単一炭素源として再度集積培養を行ったところ、不斉酸化活性を示す微生物を数株取得した。なかでも B株は、変換効率 95%、エナンチオマー過剰率 33% ee で S 体のヒドロキシアルカン酸の生成を示した。

表 1. 選抜菌の不斉酸化活性の諸性質

	Strain A	Strain B
Inducer	DEPD	DEPD
Stereoselectivity	R-selective	S-selective
Optimal pH	8.0	8.0
Optimal temperature	30°C	35°C
Substrate specificity	R <sup>1</sup> =CH <sub>3</sub> R <sup>2</sup> =Et R <sup>1</sup> =CH <sub>3</sub> R <sup>2</sup> =CH <sub>3</sub> R <sup>1</sup> =Et R <sup>2</sup> =Et R <sup>1</sup> =CH <sub>3</sub> R <sup>2</sup> =Pr R <sup>1</sup> =CH <sub>3</sub> R <sup>2</sup> =H	R <sup>1</sup> =CH <sub>3</sub> R <sup>2</sup> =Et R <sup>1</sup> =CH <sub>3</sub> R <sup>2</sup> =CH <sub>3</sub> R <sup>1</sup> =Et R <sup>2</sup> =Et R <sup>1</sup> =CH <sub>3</sub> R <sup>2</sup> =Pr

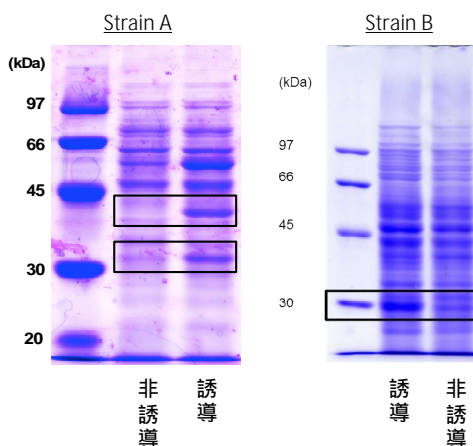
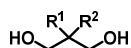


図 2. 活性菌の無細胞抽出液の電気泳動図

立体選択性の観点から選抜した2株 (A及びB株) について、諸性質を解析した (表 1)。なお、これら2株においては、ヒドロキシカルボン酸の酸化によるジカルボン酸化合物の生成は確認されなかった。すなわち、これら2株のもつジオール酸化活性は厳密な位置選択性をもつことと伺える。これら2株の無細胞抽出液を SDS-PAGE に供したところ、目的酵素は誘導発現性であること、可溶性タンパク質であることが示唆された (図 2)。

続いて、A株がもつ不斉酸化酵素をコードする遺伝子の同定と組換え酵素を用いた更なる機能解析・反応性評価を行った。A株における誘導発現タンパク質のうち発現量が高いと考えられるタンパク質の N 末端アミノ酸配列解析を行った。また、A株のゲノムを抽出し、次世代シーケンサーにより全ゲノム情報を得た。N 末端アミノ酸情報より候補遺伝子を選抜し、異種発現系において組換え酵素を作製した。EMPD の変換を行ったところ、発現株はエナンチオマー過剰率 30% ee で S 体のヒドロキシアルカン酸を生成した。このように、野生株と異種発現株の示す立体選択性が異なることから、A株は複数の不斉酸化酵素を誘導発現していることが示唆された。そこで、プロテオーム解析により更なる候補遺伝子の選抜を試みた。

誘導・非誘導の各条件下で A株を培養しプロテオーム解析に供したところ、複数の候補遺伝子を選抜した。これら候補遺伝子の異種発現系を再構築し、同様に生成物の光学純度を解析したところ、複数の発現株において R 体選択性を示した。そのなかで最も良い立体選択性を示すものは、90% ee で R 体のヒドロキシアルカン酸の生成を示した (表 2)。

#### 【今後の展開】

B株についても遺伝子の同定を進め、各種遺伝子発現株を用いた効率的な酵素法の確立を目指す。また、アミノ基含有プロパンジオールなど種々の合成基質に対する基質特異性を再評価し、種々のヒドロキシアルカン酸、非天然アミノ酸の合成レパートリー化を目指す。

表 2. 各遺伝子発現株の不斉酸化活性

Gene	Conversion (%)	Purity (%ee)
Control	0.8	-
peg.1886	1.0	-
peg.4264	40.7	66.7 (R)
peg.4275	1.2	-
peg.4365	2.0	-
peg.7145	48.8	53.0 (R)
peg.7157	28.0	90.6 (R)

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

菊川寛史,子安伶奈,八十原良彦,伊藤紀幸,  
満倉浩一,吉田豊和.「ジオール類の不斉酸  
化による光学活性ヒドロキシルカン酸の  
微生物合成」.日本農芸化学会大会.2018年  
3月.名城大学

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

菊川 寛史 ( KIKUKAWA Hiroshi )

岐阜大学・工学部・助教

研究者番号：80758805