

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：32685

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07733

研究課題名(和文) レドックスニュートラルな合成プロセスを志向した酸化還元酵素群の探索と機能解析

研究課題名(英文) Screening and functional analysis of oxidoreductases for redox-neutral synthetic process

研究代表者

富宿 賢一 (Fuhshuku, Ken-ichi)

明星大学・理工学部・准教授

研究者番号：70392090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ドミノ型酸化、不斉環化およびイミニウムイオン不斉還元を触媒する生体触媒を開発し、生物活性アルカロイド類のレドックスニュートラルな合成プロセスへと展開することを目的として研究に取り組んだ。鍵となるドミノ型酸化、不斉環化やイミニウムイオン不斉還元を触媒する微生物について、保存菌株や土壌微生物を用い幅広く探索したが、高い立体選択性にて目的の物質変換を達成するには至らなかった。しかし、市販のトリプタミンあるいは3,4-ジメトキシフェネチルアミンから出発する基質や標品の効率的な合成経路を確立し、湿潤生菌体を用いる微生物変換や無細胞抽出液を用いる酵素活性測定を可能にした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レドックスニュートラルな生体触媒反応系の合理的なデザインにより、生成物の他は触媒量の酵素と補酵素を反応系内に含むだけの、クリーンかつアトムエコノミーに優れた合成プロセスへとつながる。このような合成プロセスは、資源が枯渇しつつある現代においてますます重要になるものである。既存のゲノムやタンパク質のデータベースに捉われることなく、従来報告のない新しい酵素活性を自然界から探索することにより、性質や機能、構造に基づく新しい酵素の体系化につながる。これにより、生体触媒を利用する新しい化学合成プロセスの開発だけでなく、生合成系の人為的な再構築による、天然物を凌ぐ生物活性を示す有用物質の供給につながる。

研究成果の概要(英文)：Biocatalysts catalyzing domino-type oxidation-asymmetric cyclization or iminium ion asymmetric reduction were developed and were studied for redox-neutral synthetic process of bioactive alkaloids. We have screened for microorganisms that catalyze domino-type oxidation-asymmetric cyclization or iminium ion asymmetric reduction, which are the key processes in this study, using stock cultures and soil microorganisms. Although the desired biotransformations were not achieved with high stereoselectivity, efficient pathways for the synthesis of substrates and standard products starting from commercially available tryptamine or 3,4-dimethoxyphenethylamine were established, and allowed for biotransformations using wet cells and enzyme activity measurements using cell-free extracts.

研究分野：応用微生物学、酵素化学、有機化学

キーワード：生体触媒 微生物変換 不斉反応 ドミノ反応 アルカロイド 光学活性物質 酸化還元反応

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内で様々な代謝反応をつかさどる酵素による物質変換は、温和な条件下で利用可能であり、環境にやさしく省エネルギーを可能にする。近年では、これら酵素の示す高い立体選択性と比較的広い基質特異性を活かし、生体触媒として精密な有機合成への応用が盛んに行なわれている。

報告者はこれまで、微生物や植物由来の酵素を生体触媒として用いる酵素法と、有機合成化学の諸技法、双方の利点を組み合わせた化学-生物相補的合成による有用物質の合成に取り組んできた。例えば、カルボニル化合物の不斉還元を可能にする微生物を探索し、各種の酵母を用い、様々な光学活性アルコールを合成した。合成した各種の光学活性アルコールに対し新しい化学変換を開拓し、生物活性天然物の合成に展開してきた。

2. 研究の目的

これまでの研究成果を踏まえ、生体触媒を利用する有用物質合成をより一層大きく展開する。具体的には、外部からの補酵素の添加や補酵素の再生に必要な酵素系の導入が不可欠であるという酵素触媒による酸化還元反応の本質的な問題点に対し、同一生成物を与える酸化と還元との2種類の生体触媒を組み合わせたレドックスニュートラルな合成プロセスの開発による解決を図る。生成物の他は触媒量の酵素と補酵素を含むだけのクリーンかつアトムエコノミーに優れた物質合成の開発につながる。

具体的には、ドミノ型酸化-不斉環化およびイミニウムイオン-不斉還元を触媒する生体触媒を開発し、生物活性アルカロイド類のレドックスニュートラルな合成プロセスへと展開する(図1)。アルカロイド類の特徴的な骨格(A)の構築に向け、アミン(B)から合成されるアミノアルコール(C)の酸化と酵素内での立体選択的な環化とが連続的に進行するドミノ型酸化-不斉環化を生体触媒により一挙に達成する。

さらに、アミノアルコール(C)に対応するイミニウム塩(D)を基質として生体触媒によるイミニウムイオン-不斉還元を開発する。

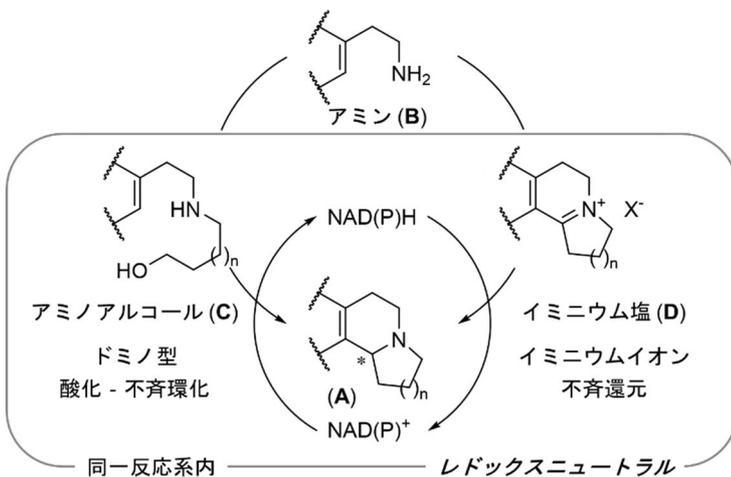


図1. 酸化還元酵素によるレドックスニュートラルなアルカロイド合成系

酸化反応と還元反応を触媒する2種類の生体触媒を組み合わせることにより、同一系内で補酵素が循環するレドックスニュートラルな反応系を構築することができる。さらに、この反応系では、酸化反応を補完する還元反応の生成物が同一化合物になる。これらのことから、生成物の他は触媒量の酵素と補酵素を反応系内に含むだけの、クリーンかつアトムエコノミーに優れた合成プロセスを構築することができ、目的物質の合成と補酵素の再生という両方の目的を一挙に達成することができる。

3. 研究の方法

(1) ドミノ型酸化-不斉環化を触媒する微生物群の探索

市販のアミンからアミノアルコール(C)を合成し、これらを基質として酸化する微生物を探索した(図2)。しかし、目的とする生成物はアルコールの酸化により生じるアルデヒドではない。酸化により生じるアルデヒドは、酸化(脱水素)酵素内に留まったまま、環化と脱水を経て分子内イミニウムイオンへと変換される。

ここから、活性部位および近傍のアミノ酸残基により形成される不斉反応場を活かして分子内Pictet-Spengler反応による酵素内不斉環化反応までもが進行し、カルボカチオン中間体を経て立体選択的に2つの環構造を形成することを期待した。この一連の反応が連続的なドミノ型で進行する「ドミノ型酸化-不斉環化反応」を実現することができれば、必要な官能基変換と同時に立体選択的に炭素骨格を構築することができ、複雑な生物活性アルカロイド類の骨格(A)の効率的な合成に直結する。

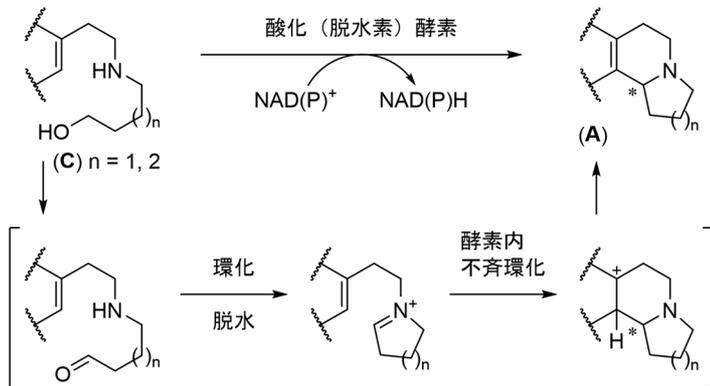


図2. 酸化(脱水素)酵素によるドミノ型酸化-不斉環化

(2) イミニウムイオン不斉還元を触媒する微生物群の探索

市販のアミンからイミニウム塩(D)を合成し、これらを基質として不斉還元する微生物を探索した(図3)。可逆的な反応である酸化還元反応の特徴から、目的物であるアミン(A)に対する酸化活性に着目した。無細胞抽出液を用いる酵素反応での補酵素の吸光度変化から酵素活性を求め、その評価により微生物を選抜し、微生物変換を検討した。

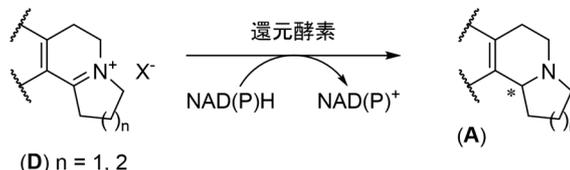


図3. 還元酵素によるイミニウムイオン不斉還元

4. 研究成果

(1) ドミノ型酸化 不斉環化を触媒する微生物群の探索

市販のトリプタミンや 3,4-ジメトキシフェネチルアミンから出発し、ドミノ型酸化 不斉環化の基質となるアミノアルコール(C)を合成した(図4)。

酸性条件下で γ -ブチロラクトンあるいは δ -バレロラクトンと縮合し、対応するアミドへと変換後、加熱還元流下で水素化アルミニウムリチウムを用いてヒドリド還元し、基質となるアミノアルコール(C)へと変換した。いずれも比較的良好な収率で合成を達成した。

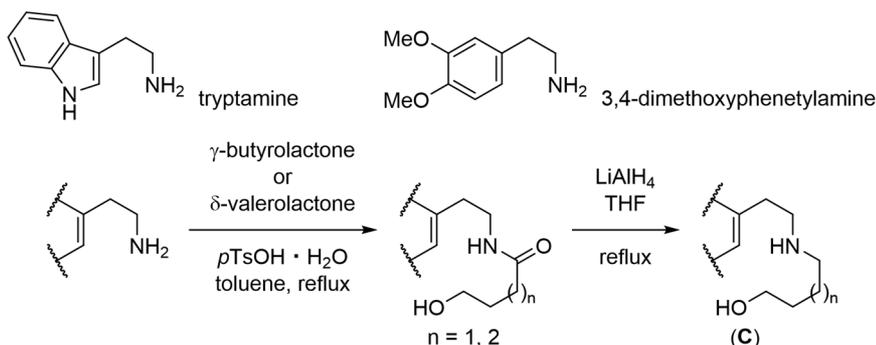


図4. ドミノ型酸化 - 不斉環化の基質となるアミノアルコール(C)の合成

アミノアルコール(C)を基質としてアルデヒドへと酸化する微生物を探索した。微生物を液体培養後、遠心分離による集菌とマルチビーズショックによる微生物の破碎を行い、無細胞抽出液を調製した。アミノアルコール(C)と補酵素 NAD(P)⁺と一緒に混合し酵素反応を行い、補酵素 NAD(P)⁺が NAD(P)H へと還元される際の吸光度の変化から酵素活性を求めた。200 菌株近くの微生物を用いて活性評価した中で、ほとんどの微生物は酵素活性を示さなかった。培地や pH の変更、酵素の濃縮を行いながら注意深く観察した中で、わずかに有意な活性を検出した。選抜した微生物を液体培養後、集菌と洗浄を行い、湿潤生菌体を調製した。これをリン酸緩衝液で懸濁後、アミノアルコール(C)を基質として加え微生物変換を試みた。反応の進行を TLC により確認し、原料と異なる生成物について NMR により構造を確認した。微生物 50 菌株以上を用いて検討したが、高い立体選択性にて目的の不斉環化を触媒する微生物の発見には至らなかった。

(2) イミニウムイオン不斉還元を触媒する微生物群の探索

市販のトリプタミンや 3,4-ジメトキシフェネチルアミンから出発し、イミニウムイオン不斉還元の標品および基質となるアミン(A)およびイミニウム塩(D)を合成した(図5)。

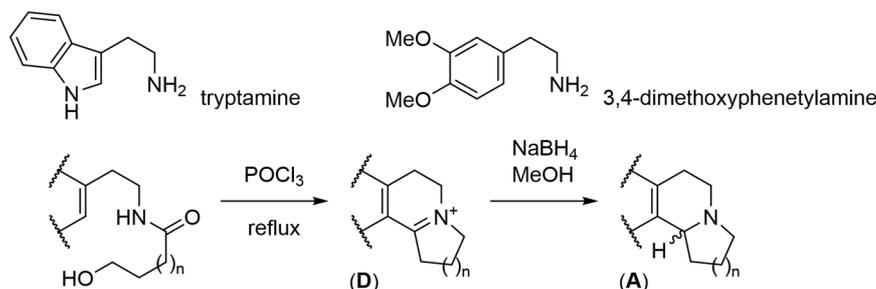


図5. イミニウムイオン不斉還元の標品および基質となるアミン(A)およびイミニウム塩(D)の合成

前述のラクトンとの縮合によるアミドへの変換後、加熱還元流下での塩化ホスホリルとの脱水環化により、イミニウム塩(D)へと変換した。次いで、水素化ホウ素ナトリウムを用いてヒドリド還元し、ラセミ体のアミン(A)へと変換した。いずれも比較的良好な収率で合成を達成した。

イミニウム塩(D)を基質としてアミン(A)へと還元する微生物を探索した。調製した無細胞抽出液を用い、アミン(A)と補酵素 NAD(P)⁺と一緒に混合し酵素反応を行い、補酵素の吸光度の変化から酵素活性を求めた。200 菌株近くの微生物を用いて活性評価した中で、ほとんどの微生物は酵素活性を示さなかった。弱いながらも再現性良く酸化活性を示した微生物を含め、その後網羅的に湿潤生菌体を調製し微生物変換を検討したが、高い立体選択性にて目的の不斉還元を触媒する微生物の発見には至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsui Daisuke, Fuhshuku Ken-ichi, Nagamori Shingo, Takata Momoko, Asano Yasuhisa	4. 巻 44
2. 論文標題 Isolation and characterization of racemase from <i>Ensifer</i> sp. 23-3 that acts on -aminolactams and -amino acid amides	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1503 ~ 1510
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10295-017-1981-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 富宿 賢一	4. 巻 96
2. 論文標題 補酵素のレドックスを制御した絶妙な「ものづくり」	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 27 ~ 27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井坂 圭汰、大足 美和、相澤 雄太、久嶋 優歩、楠山 なつみ、富宿 賢一
2. 発表標題 ドミノ型酸化 不斉環化反応を触媒する微生物酵素の探索
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----