

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：34204

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15103

研究課題名(和文)革新的ハロゲン制御型ラクトン化酵素と有機触媒系ハイブリッド補因子の創製

研究課題名(英文)Development of an innovative halogen-controlled lactone synthase and an organocatalytic hybrid cofactor

研究代表者

知名 秀泰 (China, Hideyasu)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・助教

研究者番号：70570282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ペルヒドロラーゼのカルボン酸の補因子となり得る2-ヨード安息香酸類に対し、水存在下で3価の環状型超原子価ヨウ素化合物(ヨード安息香酸類)を選択的に合成する方法を見出した。ペルヒドロラーゼのBPO-A1においては、不飽和カルボン酸の高選択的なプロモラクトン化活性の検出により、カルボン酸依存型プロモペルオキシダーゼとしての機能を示した。また、遺伝学的手法により、BPO-A1のC末端へ様々な親水性オリゴペプチドを導入した変異体に対し有機溶媒安定性を評価した結果、特に塩基性オリゴペプチドが著しく高い効果を示した。更に、生体直交型反応を利用し親水性オリゴペプチドを選択的に化学修飾する方法を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

5価の超原子価ヨウ素化合物は爆発性を有することから、超原子価ヨウ素化合物の工業的利用は避けられる傾向にあるが、3価体のみを選択的に合成できたことは工業的な観点で意義がある。また、ペルヒドロラーゼは非酵素学的過程を含む非金属型ハロペルオキシダーゼとして知られていたが、本研究により非酵素学的過程を含まないプロモラクトン化の機能が見つかったことから、合成用酵素としてペルヒドロラーゼの価値を高めたことは学術的に意義がある。更に、親水性オリゴペプチドを酵素表面上の疎水性コア近辺に付与することで有機溶媒安定性を高めたこと、および任意の位置にそれを化学修飾する技術の構築は学術的な発展性において価値がある。

研究成果の概要(英文)：A method for selective synthesis of trivalent cyclic hypervalent iodine compounds (iodosobenzoic acids) using oxone for 2-iodobenzoic acids, which can be cofactors of carboxylic acids of perhydrolase, in the presence of water at room temperature was constructed. BPO-A1, a perhydrolase, was found to function as a carboxylic acid-dependent bromoperoxidase by detecting highly selective bromolactonization activity of unsaturated carboxylic acids. In addition, organic solvent stability was evaluated for BPO-A1 mutants with various hydrophilic oligopeptides introduced at the C-terminus by genetic methods. As a result, the basic oligopeptide showed a significantly high effect. Furthermore, a method for selectively chemically modifying hydrophilic oligopeptides using bioorthogonal reactions was constructed.

研究分野：酵素化学

キーワード：有機溶媒耐性酵素 ペルヒドロラーゼ プロモラクトン化反応 exo/endo選択性 ハロゲンイオン結合部位 塩基性オリゴペプチド メチオニン選択的修飾法 超原子価ヨウ素化合物

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ペルヒドロラーゼは α/β ヒドロラーゼフォールドファミリーに属する酵素であり、代表的なリパーゼやエステラーゼの他にハロペルオキシダーゼやデハロゲナーゼなど様々な酵素と構造的に類似している(*Curr. Protein Pept. Sci.* **2000**, *1*, 209)。中にはハロゲン化活性を有するエステラーゼやマクロラクトン化活性を有するリパーゼ(*Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 805)など複数の活性を兼ね備えた酵素が存在しており、ペルヒドロラーゼからエステラーゼへの異種変換(*Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 6748)やヒドロラーゼからペルヒドロラーゼの異種変換(*Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2742)も可能になっている。また興味深いことに、デハロゲナーゼのハロゲン原子結合部位にある Arg は(*J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 30672)、ペルヒドロラーゼのハロゲンイオン結合部位にも保存されているが、これまでに異種変換は行われていない。

含ハロゲン有機化合物は、炭素-炭素結合を繋ぎ効率的な有機合成を成立させる上で欠かせない鍵物質であり、ペルヒドロラーゼは犠牲試薬のハロゲン化剤を用いることなく含ハロゲン有機化合物を生産することができる。しかし、多くの有機化合物は水に難溶性を示すため、酵素には有機溶媒耐性能が必要であった。このような中、研究代表者は好熱細菌から有機溶媒耐性ペルヒドロラーゼを獲得したが、基質汎用性が低いことが実用を遮る大きな要因となっている。本酵素のハロゲン化活性には幾つかのカルボン酸を補因子とするが、ここにも炭素鎖数や立体障害などの制限要因が存在する(*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *516*, 327)。

2. 研究の目的

化学合成では活性化された多量の犠牲試薬を使用することから、環境科学を重視した近代化学では環境に調和した触媒の開発が強く求められている。特にクロスカップリングによる骨格形成や様々な反応の活性化にハロゲン化は必要であり、多くの医薬品合成にラクトン化は必要なプロセスであるが、未だこれらの反応には化学量論量の犠牲試薬が用いられている。このような犠牲試薬に依存した現状を打破するために、本研究では、ハロゲンを制御できる環境調和型触媒の開発を試みる。具体的には、有機合成反応に利用できるハロラクトン化酵素と脱ハロラクトン化酵素および超原子価ヨウ素補因子の創製に取り組む。

3. 研究の方法

①超原子価ヨウ素補因子の創製：グリーン酸化剤の過酸化水素で駆動する酵素・有機分子触媒ハイブリッド型触媒系の構築を目的に、温和な水中条件下での超原子価ヨウ素化合物合成法を開発すると共に、過酸を生産するペルヒドロラーゼ(非金属型ハロペルオキシダーゼ)との融合を試みた。

②酵素学的プロモラクトン化反応の開発：以前に有機溶媒耐性ペルヒドロラーゼとして開発した *Streptomyces aureofaciens* 由来の BPO-A1 において、不飽和カルボン酸に対してプロモラクトン化反応を検討した。また、*exo/endo* 選択性の向上と基質汎用性の拡大を目的とし、部位特異的変異導入による変異酵素の作製を試みた。

③ペルヒドロラーゼの有機溶媒安定化：人工遺伝子合成技術を利用しペルヒドロラーゼにおいて親水性オリゴペプチド付与し、得られた組換え酵素において有機溶媒安定性を評価した。また、Fmoc 法により固相合成したペプチドを酵素表面上の任意の位置に化学修飾する方法を検討した。更に、酵素表面上の Met 側鎖数を制限した変異体に対し生体直交型反応を施し得られた複合体に対して有機溶媒安定性を評価した。

4. 研究成果

まず、ペルヒドロラーゼのカルボン酸の補因子となり得る 2-ヨード安息香酸類に対し、水中・室温下で過酸のオキソンを用い、3 価の環状型超原子価ヨウ素化合物(ヨードソ安息香酸類)を選択的に合成する方法を見出した(図1)。5 価体は爆発性を有することから、これを混入させることなく 3 価体を選択的に合成できたことは工業的な観点で非常に価値がある。また、この選択性の制御要因に水中に含まれる微量の鉄イオンが過剰酸化防止剤として寄与していることが明らかになった。ペルヒドロラーゼを触媒としオキシソンの代わりに過酸化水素を用いることができるヨードソ安息香酸類の触媒的合成法の構築を志向していたが、ヨードソ安息香酸類に対しては過酸化水素が還元剤として働くことが示された。

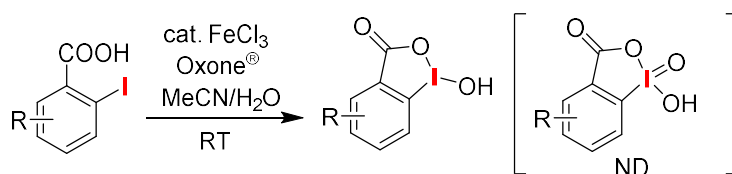


図1. ヨードソ安息香酸類の選択的合成法

一方、ペルヒドロラーゼの BPO-A1 において、エステラーゼ活性を確認すると共に不飽和カルボン酸のプロモラクトン化の活性を見出した (図 2)。特に、後者のプロモラクトン化としてはペルヒドロラーゼの初の例となった。また、既にプロモラクトン化を可能にしているバナジウム依存型ハロペルオキシダーゼでは非酵素学的過程の経路を示唆する副産物を与えるのに対し (ACS Sustainable Chem. Eng. 2020, 8, 2602)、BPO-A1 を用いたプロモラクトン化反応ではこのような副産物は与えないことから、酵素学的過程のみで進行すると共にハロゲンイオン結合部位が存在するカルボン酸依存型ハロペルオキシダーゼであることが示唆された。プロモラクトン化反応では *exo* 環化体と *endo* 環化体が与えられるが、野生型では高い *exo/endo* 比を与えた。ハロゲンイオン結合候補部位の R55 において幾つかの変異体を検討したが、野生型よりも低い *exo/endo* 比となり、選択性に影響を及ぼす部位であることが示唆された。また、基質汎用性向上を目指し、基質ポケット周辺の部位特異的変異導入を試みたところ、通常の活性測定で用いる基質であるモノクロロジメドンに対するプロモペルオキシダーゼ活性は著しく低下したもののプロモラクトン化活性は高まる変異体を得た。この結果は、基質ポケットの空洞は環化反応の反応効率に影響を及ぼすことを示した。

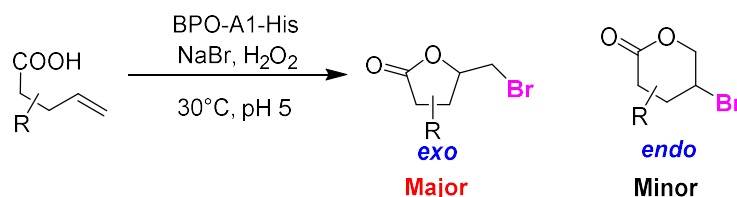


図 2. ペルヒドロラーゼを用いた *exo* 環化選択的プロモラクトン化反応

C 末端へのヒスタグ付与による有機溶媒安定化効果において、BPO-A1 を類縁の異種酵素等 (*Streptomyces* 属由来の BPO-A2 と CPO-L, *Serratia* 属由来の CPO-S, *Pseudomonas* 属由来の Est-F および *Acinetobacter* 属由来の DCH) と比較した結果、BPO-A1 が最も優れていた (図 3 A)。また、遺伝学的手法により、BPO-A1 の C 末端へ様々な極性アミノ酸のオリゴペプチドを導入し、それらの有機溶媒安定性を評価した結果、全種の親水性オリゴペプチドが有機溶媒安定性を高める中、His₈、Arg₈ 及び Lys₈ などの塩基性オリゴペプチドは、著しく高い効果を示すことが分かった (図 3 B)。この原因は、BPO-A1 の C 末端領域には疎水性コアが存在しており、付与したオリゴペプチドが酵素内部への有機溶媒の侵入妨害に寄与するものと考えられる。尚、N 末端へのヒスタグ付与は、酵素活性の低下を招いた。

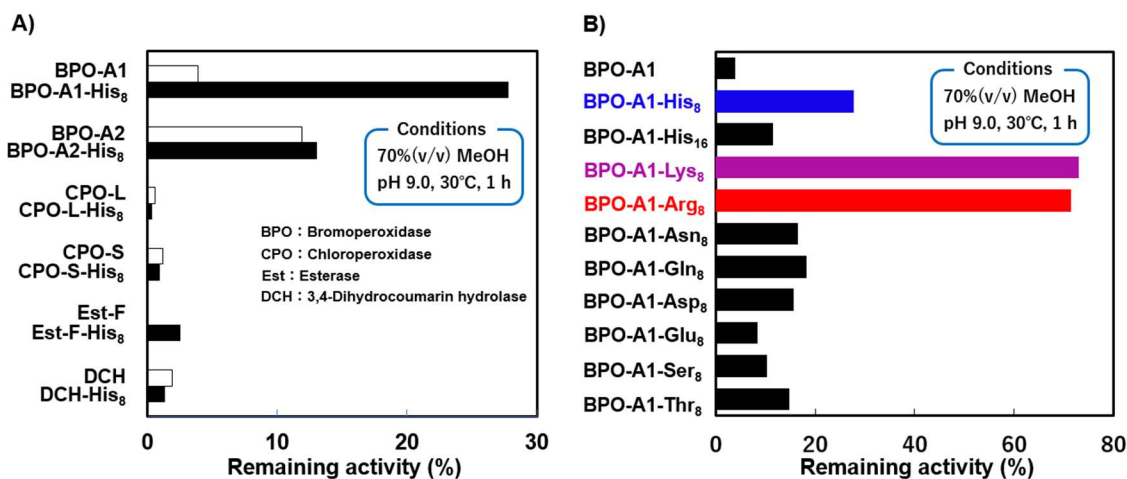


図 3. (A) 各種ペルヒドロラーゼへの C 末端ヒスタグ付与による有機溶媒安定化の効果. (B) BPO-A1 への C 末端オリゴペプチド付与による有機溶媒安定化効果.

これまでの遺伝学的手法では、親水性オリゴペプチドの付与は酵素の両末端に限定されることから、任意の疎水性コア近辺に適用できる方法が必要になった。そこで、生体直交型反応を利用し、親水性オリゴペプチドを選択的に化学修飾する方法を構築した (図 4 A)。特に、チオエーテル類におけるオキサジリジンの反応性を利用したメチオニン選択的修飾法 (Science 2017, 355, 597) は、酵素表面上に出現頻度の低い Met 側鎖を標的にできることから、選択的に修飾に適している。この方法と共にヒスチジン塩酸塩をリガンドとしたクリック反応 (Eur. J. Org. Chem. 2016, 2016, 430) を併用することにより His₈ のキレート効果による反応阻害に打ち勝ち、様々な任意の疎水性コア近辺 (E11、Q19、D213、N242、C 末端: 図 4 B) にヒスタグを化学修飾することができた。アフィニティークロマトグラフィー後、得られた精製複合体の有機溶媒安定性を検討した結果、何れにおいても有機溶媒安定性を高めることが示された (図 4 C)。

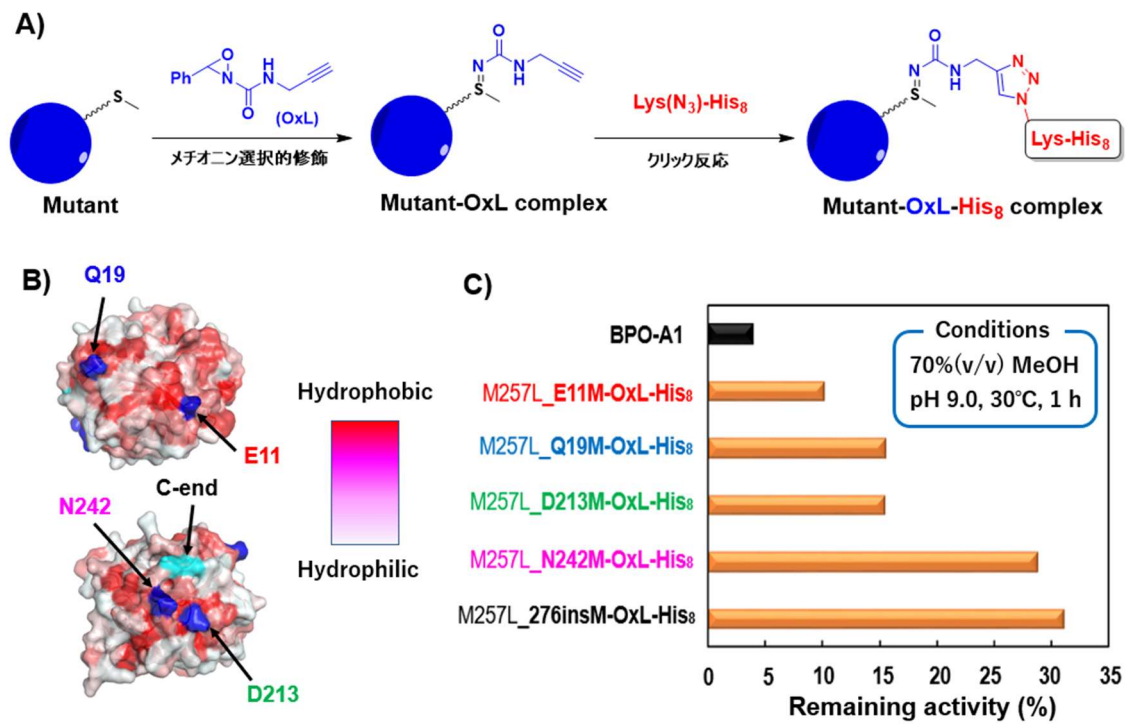


図4. (A) 生体直交型反応を利用した BPO-A1 変異酵素への選択的なヒスタク化学修飾. (B) BPO-A1 変異体における Met の置換・導入部位. (C) BPO-A1 変異体へのヒスタグ付与による有機溶媒安定化効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hideyasu China, Hyroyasu Ogino	4. 巻 640
2. 論文標題 Effect of attaching hydrophilic oligopeptides to the C-terminus of organic solvent-tolerant metal-free bromoperoxidase BPO-A1 from <i>Streptomyces aureofaciens</i> on organic solvent-stability	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 142-149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.12.012	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 Hideyasu China, Toshifumi Dohi, Ravi Kumar	4. 巻 4
2. 論文標題 Comprehensive chemistry for electrochemical enzyme biosensors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Multifaceted Bio-sensing Technology	6. 最初と最後の頁 169-198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/B978-0-323-90807-8.00008-7	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 該当する
1. 著者名 Rimi Rimi, Sakshi Soni, Bhawna Uttam, Hideyasu China, Toshifumi Dohi, Viktor V Zhdankin, Ravi Kumar	4. 巻 54
2. 論文標題 Recyclable Hypervalent Iodine Reagents in Modern Organic Synthesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Synthesis	6. 最初と最後の頁 2731-2748
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/s-0041-1737909	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 該当する
1. 著者名 Hideyasu China, Nami Kageyama, Hotaka Yatabe, Naoko Takenaga, Toshifumi Dohi	4. 巻 26
2. 論文標題 Practical synthesis of 2-iodosobenzoic acid (IBA) without contamination by hazardous 2-iodoxybenzoic acid (IBX) under mild conditions.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1897
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules26071897	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 該当する

1. 著者名 Hideyasu China, Ravi Kumar, Kotaro Kikushima, Toshifumi Dohi	4. 巻 25
2. 論文標題 Halogen-induced controllable cyclization as diverse heterocycle synthetic strategy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 6007
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25246007	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 該当する

[学会発表] 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 知名秀泰、松浦拓哉、中村卓
2. 発表標題 親水性オリゴペプチド付与による有機溶媒耐性プロモペルオキシダーゼの開発
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松浦拓哉、知名秀泰、中村卓
2. 発表標題 環境調和を志向したプロモラクトン合成酵素の開発
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 知名 秀泰, 松浦 拓哉, 中村 卓
2. 発表標題 有機溶媒耐性プロモラクトン化酵素の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------