

平成 27 年 5 月 23 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24655160

研究課題名(和文) 超好熱性酵素の活性部位を利用した熱駆動型反応の実現

研究課題名(英文) Thermally driven asymmetric reaction using a chiral space of a thermostable esterase

研究代表者

宮本 憲二 (MIYAMOTO, KENJI)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号：60360111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、超好熱性酵素の活性部位を「熱に強い不斉な空間」ととらえる。そして、本来その酵素の基質ではないが、活性部位に結合する様な化合物をデザインし、不斉空間を反応場として様々な熱駆動型反応を実現することを目的とした。

基質としてアリールメチルマロン酸モノエステルを選択し、加水分解活性の消失した変異体エステラーゼを作用させた。そして、熱駆動型反応を行ったところ、目的とするエステルが得られ、その光学純度も高いものであった。更に、この変異体を用いてアリールマロン酸に作用させたところ、不斉脱炭酸反応が起こることを確認した。この様に当初目的としていた熱駆動型反応を達成することができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, the active site of the hyperthermophilic enzyme is used as "a heat resistant chiral space". We designed a compound which was not originally a substrate of the enzyme, but was binded to the active site. We aimed to achieve a variety of thermally driven asymmetric reactions using a heat resistant chiral space.

Arylmethylmalonic acid monoester was selected as a substrate, and the mutant esterase to which the hydrolyzing activity disappeared was used. Under high temperature conditions, the aimed ester was obtained, and the optical purity was also high. In addition, it was confirmed that the asymmetric decarboxylation occurred when this mutant was act on prochiral arylmethylmalonic acid. We have been succeeded in developing thermally driven asymmetric reactions.

研究分野：酵素工学

キーワード：熱駆動型反応 好熱性エステラーゼ 脱炭酸反応 変異酵素 ドミノ型反応

### 1. 研究開始当初の背景

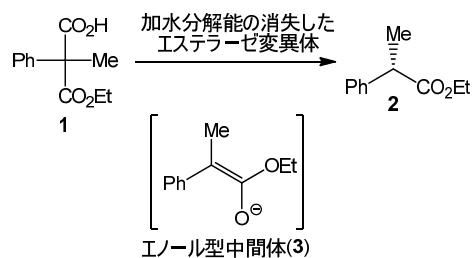
酵素は、優れた触媒として様々な分野で利用されてきた。そして現在では、多くの酵素において詳細な立体構造と反応機構が解明され、それらの情報を参考とした機能改変が盛んに行われている。しかし、酵素が本来持つ機能を逸脱するような改変はほとんど報告例が無い。そこで研究代表者は、酵素の全く新しい利用方法として、酵素の活性部位内の不斉空間を反応場として用いることで、本来その酵素が触媒することができない様々な反応を行わせることができるのではないかと考えた。しかし、基質ではない化合物を活性部位に置けたとしても反応は起こらないので、外部からエネルギーを供給する必要がある。そこで、反応系を加熱してそれを駆動力とすることで、「酵素の活性部位内での熱駆動型反応」を実現できるのではないかと考えた。

熱駆動型反応を実現するためには、熱安定性の高い酵素を用いる必要がある。そこで、好熱性古細菌の酵素を用いて、様々な熱駆動型反応の実現を目指す。この様に酵素の活性部位を「不斉な反応場」として用いるという概念は全く新規なものであり、独創性が非常に高いものである。さらに、高温条件下で自発的に起こる様々な反応に展開が可能であり、タンパク質の利用方法において新しい潮流を創り出すものである。

### 2. 研究の目的

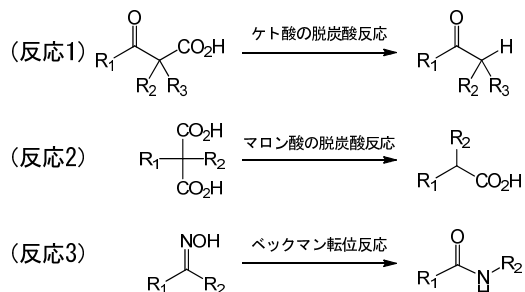
酵素は優れた触媒であり、様々な分野で使用されている。また、グリーンケミストリーの観点からも、その更なる利用拡大が急務と考えられる。しかし、酵素によって行える反応は限られており、化学触媒を全て置き換えることは困難である。本研究課題では、酵素の活性部位を不斉反応場として利用しようとしているが、その酵素自体が持つ触媒作用ではなく、熱を駆動力として様々な反応を起こすことを目指している。したがって、用いる酵素に求められる性質は、高い熱安定性と様々な化合物との結合能である。タンパク質による分子認識としては、抗体触媒が良く研究されている。しかし、抗体は分子を認識する能力は優れているものの熱安定性は低く、熱駆動型反応の利用には不向きである。そこで、熱安定性が非常に高い好熱性古細菌の酵素が最適と考えた。またその中でも、基質特異性が広く様々な化合物を変換可能で、反応機構が明らかなエステラーゼをターゲットタンパク質とした。

具体的には、非ステロイド系抗炎症薬として広く利用されている  $\beta$ -アリアルプロピオン酸や  $\alpha$  位に不斉点を有するケトンターゲット化合物とする。そして、室温では安定な前駆体に高温で好熱性古細菌由来エステラーゼを作用させることで、熱駆動型に不斉反応を実現することを目指す。



例えば、ハーフエステル(1)は、本エステラーゼの生成物なので、パインディングサイトに取り込まれることが期待できる。しかし、活性部位に取り込まれただけでは何も反応は起こらない。そこで、ハーフエステルが自発的に脱炭酸するように反応系を加熱することにより不斉空間での脱炭酸反応を検討する。この時、中間体と考えられるエノール(3)に活性部位内で面選択的にプロトン化が起これば、光学活性な生成物(2)が得られることが期待できる。

また、このコンセプトは、加熱により自発的に進行するケト酸(反応1)やマロン酸の脱炭酸反応(反応2)やベックマン転移反応(反応3)にも展開できる汎用性の高い技術であると考えている。

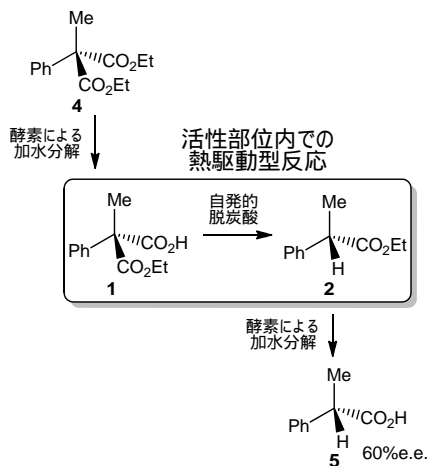


### 3. 研究の方法

既に我々は、超好熱性古細菌 *Sulforobus tokodaii* 由来のエステラーゼ ST0071 遺伝子のクローニングと発現に成功し、酵素学的諸性質を明らかとした(以下、本酵素を Est0071 と呼ぶ)。その結果、Est0071 は 80 で 1 時間加熱しても失活しない高い安定性を有していた。また Est0071 の活性中心には特徴的な GGG(A)X モチーフが存在していた。先行研究から、このモチーフを有する酵素は、立体障害の高い化合物に作用することが報告されていた。そこで、Est0071 は基質特異性が広く様々な化合物をその活性部位に取り込むことが期待された。

そこで、我々は Est0071 を用いるドミノ型反応をデザインした。これは、立体障害が高く加水分解されにくいマロン酸ジエステル(4)に 80 程度の高温でエステラーゼを作用させると、1 ポットで連続反応が起こり光学活性な生成物(5)を与えるものである。この一連の反応では、室温では安定なハーフエステル(1)に熱を加えることで、自発的脱炭酸反応を行わせている。しかし、酵素と相互作用がない状態で自発的脱炭酸が起こると、生成物(2)は当然ラセミ体として生成する。ま

た、Est0071 はエステル(2)の両鏡像体を、同じ速度で加水分解することがわかっており、エステル(2)の加水分解反応では立体選択性はない。したがって、カルボン酸(5)が光学活性体であるという事実は、1 2への自発的脱炭酸反応が、エステラーゼの活性部位内で進行している立体選択的な反応であることを強く示唆している。



以上の様な背景の基、ハーフエステル(1)からエステル(2)への Est0071 の活性部位を利用した熱駆動型脱炭酸反応を目指す。そのためには、エステル(2)の加水分解活性が消失した変異体を作成する必要がある。本エステラーゼは、一般的な加水分解酵素に於いて高く保存されている活性中心(Asp, His, Ser)を有しており、これら活性残基に変異導入することにより加水分解活性は容易に消失できると考えた。そして、この様にして作成した加水分解活性の消失したエステラーゼを、高温下でマロン酸ハーフエステル(1)に作用させることにより、不斉脱炭酸反応(1 2)を実現する。また、その変異体酵素をマロン酸などの他の基質に対して作用させて、熱駆動型反応の汎用性の拡張も検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 熱駆動型ドミノ型反応の選択性向上

我々は既に、マロン酸ジエステル(4)に高温条件下で好熱性エステラーゼを作用させることで、自発的脱炭酸反応を経由する不斉ドミノ型反応に成功している。しかし、その生成物(5)の光学純度は 40%e.e. 程度と低いものであった。そこで、ホモロジーモデルを構築し、推定した活性部位近傍の残基に変異導入を行い、選択性の向上を検討した。その結果、加水分解活性が消失した変異体も多数存在したが、147 変異体については活性が残存していた。これら変異体について、高温にて熱駆動型反応を行い、ドミノ型生成物である -フェニルプロピオン酸(5)の光学純度を測定した。その結果、野生型酵素より大幅に選択性の向上した 6 変異体(A179M/L198Y, I203R, A179K, I203E, A179M/L198S)を得る

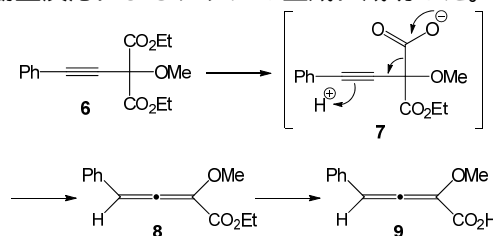
ことに成功した。この様に、活性部位近傍のアミノ酸残基に絞って変異を導入することにより、選択性の大幅な向上に成功した。

変異体	収率 (%)	光学純度(%) <sup>a</sup>
A179M/L198Y	37	80 (S)
A179M/L198E	43	77 (S)
I203R	5	74 (S)
A179K	56	70 (S)
I203E	15	67 (S)
A179M/L198S	35	66 (S)
Wild-type	85	48 (S)

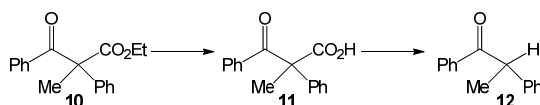
反応条件: pH 7, 70°C, 48 h

##### (2) 熱駆動型ドミノ型反応の適用拡大

次に、ドミノ型反応の基質特異性の拡張を検討した。アレン化合物(9)は、不斉炭素原子がないにもかかわらず、軸上のねじれによって誘起された軸不斉を持つ。しかし、酵素による光学活性アレンの調製は困難であった。そこで、熱駆動型ドミノ型反応によるアレン化合物の合成を試みた。基質としては化学合成したアセチレンマロン酸ジエステル(6)を用いて、これに Est0071 を作用させた。その結果、酵素的加水分解反応より生成した中間体(7)が脱炭酸と共に異性化を起し、更に加水分解されたと考えられるアレンカルボン酸(9)の生成を確認した。しかし、反応は定量的な収率で進行するものの、光学純度は 4%e.e. と低いものであった。この様に、立体選択性は不十分なものの、目的とする熱駆動型反応によるアレンの生成に成功した。



次に、基質としてケトエステル(10)をデザインドミノ型反応も試みた。この場合、最初に嵩高いエステル(10)を Est0071 が加水分解できれば、ケトカルボン酸(11)が生成する。この化合物は高温条件下で自発的な脱炭酸反応を起し、ケトン(12)を生成することが期待できる。実際に基質を合成し反応を試した結果、定量的な収率で目的とするケトン(12)を 70%e.e. の光学活性体として得ることに成功した。この反応は、ケトン類の汎用的な合成法になると考えられる。この様に熱駆動型ドミノ型反応は汎用性が広く、様々なタイプの反応や基質に適応可能な実用性の高いものであることを明らかとした。



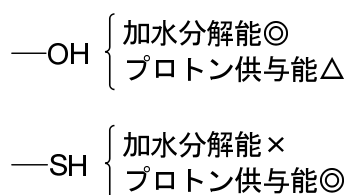
また、シクロヘキサノンオキシムを基質としたベックマン転位反応を検討した。その結果、高温条件(70~90 )に於いて、Est0071 を作用させたが、目的とする  $\gamma$ -カプロラクタムを得ることはできなかった。一般的に、シクロヘキサノンオキシムのベックマン転位反応には、濃硫酸などの強酸存在下で転位が進行する。今回我々が用いた条件では、酵素が安定な中性で行う必要があったこと、また酵素による活性化が不足していたのでベックマン転位が進行しなかったのではないかと考えている。

### (3) 加水分解活性の消失した変異体の作成

加水分解酵素の活性残基である Asp、His、Ser をそれぞれ Ala に置換し、加水分解活性の消失した変異体を作成した。これらをマロン酸のハーフエステル(1)に高温で作用させたところ、目的とする脱炭酸反応のみが起こり  $\gamma$ -フェニルプロピオン酸エステル(2)が定量的な収率で得られた。そして、カルボン酸(5)への加水分解は起こらないことを確認した。しかし、生成したエステルはほぼラセミ体であった。この原因として、選択性を決定するエノール中間体(3)へのプロトン付加がうまくいっていないのではないかと考えた。そこで、新たな変異体のデザインを行った。

### (4) 変異体を用いた熱駆動型反応の実現

加水分解活性の消失とエノール型中間体へのプロトン供与能の向上を目指して、Ser を Cys に変異した変異体をデザインした。Ser が Cys に変わることで、加水分解活性は消失するものと考えた。一方、Cys のチオールプロトンは  $pK_a=8$  程度であり、プロトン供与能は Ser 残基の OH よりも圧倒的に高いことが期待された。

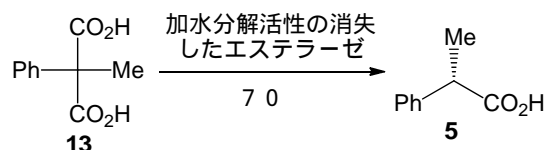


また、Ser と Cys では OH が SH に変わっただけなので、Asp や His との水素結合は野生型と同じく形成できると考えられる。以上の様な考えの基、実際に変異体を作成した。変異体を発現・精製を行い、*p*-ニトルフェニルブチレートを基質として加水分解活性を測定したところ、野生型と比較して 1/100 以下に低下していた。次に、この変異体をマロン酸のハーフエステル(2)に 70 で作用させたところ、95%の収率で 85%e.e.のエステル(3)を得ることに成功した。この様に、本研究課題での最大の目的であった、加水分解活性の消失した加水分解酵素による不斉脱炭酸反応を達成することができた。現在更なる選択性

の向上を目指して、変異体の作成や条件の最適化を行っている。

### (5) 熱駆動型反応の汎用性の拡大

Cys 変異体をフェニルメチルマロン酸(13)に作用させて、熱駆動型脱炭酸反応を試みた。その結果、90%の収率で 25%e.e.の  $\gamma$ -フェニルプロピオン酸(5)を得ることに成功した。光学純度はあまり高くは無いが、収率よく熱駆動型反応を行えたことは、非常に重要な発見であると考えている。この様に本来加水分解を行うエステラーゼで脱炭酸反応を実現できたことは、今回が最初の例とである。現在、論文の投稿に向けて準備を進めている。



以上の様に、酵素の活性部位を不斉の反応場とする熱駆動型反応の開発にした。また、この反応により様々な光学活性化合物を合成可能であることも明らかとした。そして、本課題の目的の大部分を達成できたと考えている。

### 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2件)

Robert Kourist, Jan-Karl Guterl, Kenji Miyamoto, Volker Sieber, *Enzymatic decarboxylation; An emerging reaction for chemicals production from renewable resources*, ChemCatChem, 6, 689-701 (2014), DOI:10.1002/cctc.201300881(査読有)

Reina Wada, Takashi Kumon, Robert Kourist, Hiromichi Ohta, Daisuke Uemura, Shosuke Yoshida, Kenji Miyamoto, *Thermally driven asymmetric dimono reaction catalyzed by a thermostable esterase and its variants*, Tetrahedron Letters, 54, 1921-1923 (2013), DOI:10.1016/j.tetlet.2013.01.080(査読有)

#### [学会発表](計6件)

五十嵐康輔、吉田昭介、川上了史、宮本憲二、加水分解活性の消失した好熱性エステラーゼを用いた熱駆動型反応の実現、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(千葉県・船橋市)  
宮本憲二、酵素機能を合理的にデザインする、公益社団法人 新化学技術推進協会ライフサイエンス技術部会・反応分科会 講演会、2015年1月21日、公益社団法人 新

化学技術推進協会 会議場(東京都・千代田区)

五十嵐康輔、吉田昭介、宮本憲二、熱駆動型ドミノ型反応の機構解析、日本化学会第94春季年会、2014年3月27日、名古屋大学・東山キャンパス(愛知県・名古屋市) 宮本憲二、自然界に存在しない酵素を創り出す、第65回日本生物工学会大会、2013年9月18日、広島国際会議場(広島県・広島市)

九門孝史、和田玲奈、吉田昭介、宮本憲二、好熱性酵素を用いた熱駆動型ドミノ型反応、日本化学会第93春季年会、2013年3月23日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県・草津市)

和田玲奈、九門孝史、吉田昭介、宮本憲二、アーキア由来好熱性酵素を用いた熱駆動型ドミノ型反応、第16回生体触媒化学シンポジウム、2012年11月30日、富山県民会館(富山県・富山市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計1件)

名称：好熱性古細菌由来エステラーゼを用いた光学活性カルボン酸の製造方法  
発明者：宮本憲二、太田博道  
権利者：学校法人慶應義塾  
種類：特許  
番号：特許第5506658号  
出願年月日：平成21年2月23日  
取得年月日：平成26年3月28日  
国内外の別：国際

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.bio.keio.ac.jp/labs/kmiyamoto>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮本 憲二(MIYAMOTO KENJI)  
慶應義塾大学理工学部・准教授  
研究者番号：60360111

### (2) 研究分担者

吉田 昭介(YOSHIDA SHOSUKE)  
京都大学・工学(系)研究科・研究員

研究者番号：80610766

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：