

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292041

研究課題名(和文)アルドキシム-ニトリル経路の酵素類の有機合成への利用と生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Enzymes in the Aldoxime-Nitrile pathway -application to organic synthesis and their physiological importance-

研究代表者

浅野 泰久 (Asano, Yasuhisa)

富山県立大学・工学部・教授

研究者番号：00222589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：Bacillus sp. 0xB-1由来のアルドキシム脱水酵素(Oxd)を用いて、ラセミ体2-(E/Z)フェニルプロピオンアルドキシム(E/Z比99:1)から、2-(S)-フェニルプロピオニトリル(98%ee)を合成した。Arabidopsis thaliana由来のCYP79A21とOxdを大腸菌で同時に発現し、フェニルアセトニトリルを合成した。Bacillus sp. 0xB-1およびRhodococcus sp. YH3-3の全ゲノム解析を行った。Geobacillus sp. 315由来のニトリルヒドラーゼ(NHase)を、R. rhodochrous J-1由来のそれと比較した。

研究成果の概要(英文)：The product by aldoxime dehydratase (Oxd, Bacillus sp. 0xB-1) reaction showed high enantioselectivity to form 2-(S)-phenylpropionitrile (98%ee) from a substrate rac 2-(E/Z)-phenylpropionaldoxime (E/Z ratio of 99:1). E. coli transformant with the genes encoding Oxd, cytochrome P450 (CYP) 79A2 and CYP reductase from Arabidopsis thaliana was constructed. The concentration of phenylacetonitrile synthesized from L-Phe was 4.9 mM (662mg/L). The complete genome sequences of Bacillus sp. 0xB-1 and Rhodococcus sp. YH3-3 were analyzed. Nitrile hydratase (NHase) from Geobacillus sp. 315 showed much better heat stability and resistance to acrylamide inhibition than those of Rhodococcus rhodochrous J-1 NHase.

研究分野：酵素化学工学

キーワード：アルドキシム ニトリル経路 ニトリルヒドラーゼ アルドキシム脱水酵素 Rhodococcus sp. Bacillus sp. Geobacillus sp.

### 1. 研究開始当初の背景

我々は、微生物酵素を用いて、基礎化学品アクリルアミド等の新規工業的製造法を開発し、企業と共に工業的利用レベルまで研究を展開して来た。また、アクリルアミド等の工業的生産菌である *Pseudomonas chlororaphis* B23 および *Rhodococcus rhodochrous* J-1 を分離し、アクリルアミドの高濃度蓄積の現象を発見した。ニトリルヒドラーゼ (NHase) についての最初の論文を著して以来 30 余年が経過し、世界で NHase に関して約 2,000 報の論文や特許が発表されている。その間、我々は、NHase の上流にアルドキシムを脱水して定量的にニトリルを生成するアルドキシムデドラーゼ (Oxd) を発見し、酵素化学的諸性質を明らかにすると共に、世界で初めてヘム鉄を有する新規な立体構造を解明した。また、多くの細菌で一般的に *nhase* や *oxd* 遺伝子がクラスターを形成し、連関していることを見出し、細菌、植物におけるアミノ酸代謝経路「アルドキシム-ニトリル経路」を提唱して来た。具体的な背景と課題は次のとおりである。

(1) Oxd の立体選択性の解明は医薬原料として重要な光学活性ニトリルの酵素的合成法を開発する上で極めて重要である。

(2) アクリルアミドは *Rhodococcus* 属等細菌菌体の NHase を用いて世界で年間 70 万トン以上も工業生産されているが、NHase についての研究は限られている。すなわち、アクリルアミド製造に使われる *Rhodococcus* 属等細菌は可溶性タンパク質の 50% にも及ぶ著量の NHase を誘導生産するが、ゲノム解析の視点からの「アルドキシム-ニトリル経路」上のアルドキシム合成酵素、NHase、Oxd 等の誘導現象、NHase の著量誘導機構等は、未知のままである。

(3) タンパク質としての NHase の熱耐性、基質アクリロニトリルや生成物アクリルアミドに対する安定化機構についての系統的評価が全くなされていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、(1) Oxd を用いて、シアンを必要としない光学活性ニトリルの合成について検討する。(2) Oxd および NHase を含むアルドキシム-ニトリル経路のアミノ酸代謝経路としての意義について、特に未知のアルドキシム合成酵素を求めてゲノム解析および多数の微生物のスクリーニング手法を用いて探索する。また動植物がアルドキシム-ニトリル経路を有することを明らかにし、その代謝様式を微生物のそれと比較する。(3) *Rhodococcus* 属等細菌が生産する NHase の熱耐性およびアクリルアミドの著量蓄積における NHase の安定化機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 合成アルドキシムを基質とする Oxd 反応の立体選択性の解明と光学活性ニトリルの

合成への利用： $\alpha$  あるいは  $\beta$  置換アルドキシムを基質とする Oxd 反応を開発し光学活性ニトリルを合成する。新しい耐熱性 Oxd の探索、およびそれらの構造解析と変異により反応を最適化する。

(2) アルドキシム-ニトリル経路の生理学的意義の解明：*Bacillus* sp. OxB-1 および *Rhodococcus* sp. YH3-3 の全ゲノム解析を行う。

(3) 耐熱性や高アクリルアミド耐性の NHase 産生菌の探索と *Rhodococcus* 属細菌の NHase との比較：酵素レベルで NHase の耐熱性およびアクリルアミド耐性を論ずる。

### 4. 研究成果

合成アルドキシムを基質とするアルドキシム脱水酵素(Oxd)反応の立体選択性の解明と光学活性ニトリルの合成への利用： $\alpha$  位に置換があり、*R, S* の立体と、*E, Z* のジアステレオマーを有し、4 種類の異性体がある 2-フェニルプロピオンアルドキシム (2-PPOx) を基質として用いた。*Bacillus* sp. OxB-1 由来の *oxd* 遺伝子を発現する大腸菌形質転換株を用いて、ラセミ体基質 (*E/Z* 比 99:1) を基質とした場合、98%ee の 2-(*S*)-フェニルプロピオニトリルが合成できた。さらに、ラセミ体 2-フェニルプロピオンアルドキシム (*E/Z* 比 99:1) を基質とした場合、98%ee の 2-(*S*)-ニトリルを得た。一方、ラセミ体基質 (*E/Z* 比 1:11.5) を反応させたところ、67%ee の 2-(*R*)-ニトリルを得た。これらはいずれも 8°C で得られ、30°C では、*E, Z* 異性化反応によりラセミ体が合成された。いずれも、*E*-2-(*R*)-フェニルプロピオンアルドキシムは、基質とならなかった。また、*Arabidopsis thaliana* 由来の CYP79A21 を *Bacillus* sp. OxB-1 由来の Oxd と共に大腸菌で同時に発現し、L-Phe を原料としてフェニルアセトニトリルを 662mg/L の濃度で、代謝工学的に合成した。

様々なアルドキシム分解菌由来の Oxd を用いてアルドキシムのエナンチオ選択性の検討を行った。Oxd を有する細菌ライブラリーより、十数株の *oxd* 遺伝子を発現する大腸菌形質転換株を作成した。それらを用いて、2-PPOx に対するエナンチオ選択性を検討したところ、OxdB と同様の結果である *S*-選択性を示した。また、2-(thiophen-2-yl)-propionaldoxime (2-TPOx) および 2-(cyclohexyl-2-yl)-propionaldoxime (2-CPOx) 等を合成し、OxdB を用いてエナンチオ選択的反応を行った。その結果、2-TPOx の場合では、2-PPOx の場合と同様に、4 つのジアステレオマーのうち、3 つはニトリルへ変換されたが、残り 1 つのジアステレオマーは変換されなかった。

(2) アルドキシム-ニトリル経路の生理学的意義の解明を行うために、*Bacillus* sp. OxB-1 および *Rhodococcus* sp. YH3-3 の全ゲノム解析

を行った。

*Bacillus* sp. OxB-1 株のゲノムは、3,594,618塩基対であり、GC含量は47.85%であった。3,587個のタンパク質コーディング領域、7個のrRNAオペロン、および83tRNA遺伝子を含んでいた。3,234個(90%)のタンパク質コーディング領域は既知タンパク質から類推できた。アルドキシムニトリル経路にかかわる遺伝子は、*oxd* およびニトリラーゼ遺伝子(*nit*)が存在し、*arac*様転写調節因子の下流に位置していた。

*Rhodococcus* sp. YH3-3のゲノムは、7,316,908塩基対であり、GC含量は62.15%であった。7,281個のタンパク質コーディング領域、5個のrRNAオペロン、および54tRNA遺伝子を含んでいた。6,893個(94.6%)のタンパク質コーディング領域は既知タンパク質から類推できた。ゲノムDNA上に5'端より、*oxd*、*ami*、*nhasea*(Fe)、*nhaseβ*の順でのクラスターおよびコバルトタイプでは、*ami*、*nhaseβ* および *nhasea*(Co)の順でクラスターを形成していた。ここには、*oxd* 遺伝子は見いだせなかった。

(3)耐熱性や高アクリルアミド耐性のNHases産生菌の探索と *R. rhodochrous* J-1 のNHaseとの比較：新たに土壌より分離した好熱性細菌 *Geobacillus* sp. 315 が耐熱性のNHaseを産生することを明らかにし、菌体レベルでの耐熱性やアクリルアミド耐性を *R. rhodochrous* J-1 のそれらと比較した。本酵素オペロンは *nhasea*(Co)、*nhaseβ*、および activator gene から構成されていた。大腸菌で発現させると、野生株の培養当たり、約6倍の活性を示し、比活性は469U/mg(基質：アクリロニトリル)であった。*Geobacillus* sp. 315 由来および、*R. rhodochrous* J-1 由来の精製NHaseの酵素化学的諸性質を比較した。

## 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 13件)

Y. Miki, and Y. Asano

Construction of the biosynthetic pathway for the cyanide-free production of phenylacetone in *Escherichia coli* utilizing plant cytochrome P450 79A2 and bacterial aldoxime dehydratase, *Applied and Environmental Microbiology*, **80** (21), 6828-6836 (2014)

DOI: 10.1128/AEM.01623-14

R. Metzner, S. Okazaki, Y. Asano, and H. Gröger

Cyanide-free enantioselective synthesis of nitriles: synthetic proof of a biocatalytic concept and mechanistic insights, *ChemCatChem*, **6** (11), 3105–3109 (2014).

DOI: 10.1002/cctc.201402612

T. Yamaguchi, and Y. Asano

Complete genome sequence of an aldoxime degrader, *Bacillus* sp. OxB-1, *Genome Announcements*, **3** (1) e00025-15 (2015). doi:10.1128/genomeA.00025-15.

T. Yamaguchi and Y. Asano

Draft genome sequence of an aldoxime degrader, *Rhodococcus* sp. strain YH3-3, *Genome Announcements*, **4** (3), e00406-16 (2016).

doi: 10.1128/genomeA.00406-16.

Y. Miao, R. Metzner, and Y. Asano

Kemp elimination catalyzed by naturally occurring aldoxime dehydratases, *ChemBioChem*, **18** (5), 451-454 (2017).

DOI: 10.1002/cbic.201600596

浅野泰久

微生物・植物由来の新規ニトリル分解・合成酵素の産業利用、化学と生物、**52** (10), 651-658 (2014).

<https://katosei.jsbba.or.jp/index.php?aid=267>

浅野泰久

発見と発明に関する怪談、日本生物工学会誌、**93** (10) (2015).

[https://www.sbj.or.jp/news/news\\_9310\\_zuie\\_n\\_zuui\\_20151102.html](https://www.sbj.or.jp/news/news_9310_zuie_n_zuui_20151102.html)

浅野泰久

タンパク質構造解析支援技術を用いる高機能酵素の開発と産業利用、北陸経済研究、**441** (3-4), 48-49 (2016).

<http://www.hokukei.or.jp/book/2016.html>

浅野泰久

神様は直球しか投げず、空振りしているのは人間か、VITA,**104** (3), 28 (2016).

[http://www.toyama-shakyo.or.jp/vita/magazine-2/1\\_vita-no-104/#subtop](http://www.toyama-shakyo.or.jp/vita/magazine-2/1_vita-no-104/#subtop)

浅野泰久

酵素開発に魅せられて 生物の力を開拓する、現代化学、**539** (2), 48-53 (2016).

<http://www.tkd-pbl.com/book/b216063.html>

[学会発表](計 37件)

Y. Miki, K. Oike, and Y. Asano,

Cyanide-free microbial production of phenylacetone nitrile utilizing enzymes from “the aldoxime-nitrile pathway”, 7th international congress on biocatalysis (biocat2014), 2014.8.31-9.4 (Hamburg, Germany)

- Y. Miki, and Y. Asano, Cyanide-free production of phenylacetonitrile by a hybrid “aldoxime-nitrile pathway”, Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology, 2014.9.24-28 (Kyoto)
- Y. Asano, Novel enzymes for organics synthesis and diagnostics uses, 4th International Conference on Novel Enzymes, 2014.10.14-17 (Ghent, Belgium)
- R. Metzner, S. Okazaki, H. Gröger, and Y. Asano, Synergetic analysis of enantioselective aldoxime dehydratases by combination of in vitro and *in silico* methods, Japan-Italy Joint Symposium, 2014.11.5-7 (Nara)
- R. Metzner, S. Okazaki, Y. Asano, and H. Gröger, Enantioselective aldoxime dehydratases – Synthetic proof and in silico studies, Active Enzyme Molecule 2014, 2014.12.17-19 (Toyama)
- T. Yamaguchi, and Y. Asano, Biocatalytic synthesis of (*R*)-mandelic acid from L-phenylalanine using a combination of plant cytochrome P450s and bacterial nitrilase, Active Enzyme Molecule 2014, 2014.12.17-19 (Toyama)
- K. Hounoki, K. Yasukawa, and Y. Asano, Screening for thermostable nitrile hydratase, Active Enzyme Molecule 2014, 2014.12.17-19 (Toyama)
- Y. Miki, K. Oike, and Y. Asano, Cyanide-free microbial production of phenylacetonitrile utilizing enzymes from “the aldoxime-nitrile pathway”, Active Enzyme Molecule 2014, 2014.12.17-19 (Toyama)
- Y. Asano, Newly discovered enzymes and their applications, Biotrans 2015, 2015.7.26-30 (Vienna, Austria)
- Y. Asano, Microbial, plant and animal aldoxime-nitrile pathways–Discovery of new enzymes, their comparative studies and applications, Enzyme Engineering XXIII, 2015.9.6-10(Florida, USA)
- Y. Asano, Enzymes from microbial, plant and animal aldoxime-nitrile pathways and their applications, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2015.12.15-20 (Honolulu, Hawaii, USA)
- Y. Asano, Development of Enzymes for Industrial Uses, Center for Bioindustrial Technology Agency for the Assessment and Application of Technology, 2016.5.27 (Jakarta, Indonesia)
- Y. Asano, Enzymatic Processes for Industrial Applications, Institute of Chemical Engineering Science (ICES), 2016.5.30 (Singapore)
- Y. Asano, Enzymatic Processes for Industrial Applications, Bioenergy and Biorefinery Conference - Southeast Asia 2016, 2016.5.30-6.1 (Singapore)
- Y. Asano, Development of Enzymatic Processes for Industrial Applications-from enzyme discovery side-, National University of Singapore, 2016.6.1 (Singapore)
- Y. Asano, Cyanide-free nitrile synthesis and “metabolic tuning” of molecular parts, 11th Metabolic Engineering Conference, 2016.6.26-30 (Awaji)
- A. Nuylert, Y. Ishida and Y. Asano, Contribution of N-glycosylation site to the enzyme stability of hydroxynitrile lyase from *Passiflora edulis* in the differential expression system, 17th European Congress on Biotechnology, 2016.7.3-6 (Krakow, Poland)
- A. Nuylert, T. Yamaguchi, Y. Ishida, Y. Kuwahara and Y. Asano, Molecular cloning of the full-length cDNA of hydroxynitrile lyase from a millipede, *Parafontaria laminata* and its expression in *Escherchia coli*, The Fifth International Conference on Cofactors and Active Enzyme Molecule 2016, 2016.9.4-8 (Unazuki, Japan)
- R. Metzner, Y. Asano, Aldoxime dehydration in the (bio)synthesis of nitriles, 第 68 回日本生物工学会大会, 2016.9.28-30 (Toyama, Japan)
- Y. Asano, Exploration and molecular characterization of hydroxynitrile lyase, an industrial enzyme from nature, The 28th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, 2016.11.28-30 (Chiang Mai, Thailand)
- 21 A. Nuylert, C. Khanongnuch and Y. Asano, The occurrence of hydroxynitrile lyase in two passion fruit leaves, *Passiflora edulis* Sims and *Passiflora edulis* forma *flavicarpa* and their application in asymmetric synthesis of (*R*)-mandelonitrile, The 28th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, 2016.11.28-30 (Chiang Mai, Thailand)
- 22 浅野泰久、未知の酵素を表舞台に引っ張り出す、第 31 回「とやま賞」贈呈式・記念講演会、2014.5.29 (富山)
- 23 浅野泰久、酵素・活性・分子 - 新しい大学での酵素化学工学研究と教育 -、富山県理科教育振興会全体研修会記念講演会、2014.6.11 (富山)
- 24 浅野泰久、酵素・活性・分子 —将来の酵素化学工学研究に向けて—、日本生物工学会中部支部 20 周年記念講演会・祝賀会、2014.11.1 (静岡)
- 25 浅野泰久、有用含窒素化合物生産用酵素および新規利用法の開発 I、第 7 回北陸合同シンポジウム in 越中八尾、

- 2014.11.28-29 ( 富山 )
- 26 浅野泰久、有用含窒素化合物生産用酵素  
および新規利用法の開発 II, 第 7 回北陸  
合同シンポジウム in 越中八尾、  
2014.11.28-29 ( 富山 )
- 27 A. Nuylert, Y. Ishida, and Y. Asano,  
Characterization of wild-type and  
recombinant hydroxynitrile lyase from  
*Passiflora edulis* in *Escherichia coli* and  
*Pichia pastoris* - effect of glycosylation on  
the enzyme stability, 日本農芸化学会 2015  
年度大会、2015.3.26-29 ( 岡山 )
- 28 朴木佳那、安川和志、浅野泰久、耐熱性  
ニトリルヒドラーゼの性質検討、日本  
農芸化学会 2015 年度大会、2015.3.26-29  
( 岡山 )
- 29 浅野泰久、酵素・活性・分子—スクリ  
ーニング研究をスクリーニングする—、  
第 16 回酵素応用シンポジウム、2015.6.12  
( 北名古屋 )
- 30 浅野泰久、微生物、植物、動物の「アル  
ドキシム-ニトリル経路」の比較と利用、  
2015 年度酵素補酵素研究会、  
2015.7.10-11 ( 福井 )
- 31 大池敬子、R. Metzner, H. Gröger, 浅野  
泰久、合成アルドキシムを基質とするア  
ルドキシム脱水酵素反応のエナンチオ  
選択性の解明、2015 年度日本農芸化学会  
中部・関西支部合同大会、2015.9.19-20  
( 射水 )
- 32 浅野泰久、酵素・活性・分子—探索研究  
を探索する—、相模中央化学研究所創立  
50 周年記念事業、2015.10.24 ( 東京 )
- 33 A. Nuylert, T. Yamaguchi, Y. Ishida, Y.  
Kuwahara, and Y. Asano, Purification and  
characterization of hydroxynitrile lyase  
from millipedes, *Parafontaria laminata*, 日  
本農芸化学会 2016 年度大会、  
2016.3.27-30 ( 札幌 )
- 34 浅野泰久、スーパー酵素イノベーション  
のための酵素活性分子研究、Japan  
Science and Technology Agency Fair、  
2016.8.25 ( 東京 )
- 35 浅野泰久、酵素活性分子の探索、「生合  
成リデザイン」キックオフシンポジウム、  
2016.9.10 ( 東京 )
- 36 R. Metzner, Y. Miao, A. Yagi, A. Hinzmann,  
Y. Asano, Application of aldoxime  
dehydratases (Oxd) in organic nitrile  
synthesis, 日本農芸化学会 2017 年度大会、  
2017.3.17-20 ( 京都 )
- 37 A. Nuylert, Y. Asano, C-terminal truncation  
improved the enzyme stability of  
recombinant hydroxynitrile lyase from  
*Passiflora edulis* in *Escherichia coli*, 日本  
農芸化学会 2017 年度大会、2017.3.17-20  
( 京都 )

〔図書〕(計 2 件)

Y. Asano ( 分担執筆 ), K. Faber, W.-D.

Fessner, N. Turner, Eds., Georg Thieme  
Verlag KG, Hydrolysis of nitriles to amides,  
Science of Synthesis, In “Biocatalysis in  
Organic Synthesis” 1, pp 255-276 (2015).

Y. Asano, S. Okazaki, and K. Yasukawa ( 分  
担執筆 ), Recent developments in amino  
peptidases, oxidases and racemases, In  
“Biocatalysis-Green Technology”, Ed.  
Ramesh Patel, John Wiley & Sons, Inc.,  
Hoboken, New Jersey (2016), pp 489-502.

〔産業財産権〕  
該当なし

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.pu-toyama.ac.jp/BR/asano/homepage.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者  
浅野泰久 ( ASANO, Yasuhisa )  
富山県立大学・工学部・教授  
研究者番号 : 00222589

(2)研究分担者  
米田英伸 ( KOMEDA, Hidenobu )  
富山県立大学・工学部・准教授  
研究者番号 : 50285160

(3)研究分担者  
松井大亮 ( MATSUI, Daiske )  
富山県立大学・工学部・助教  
研究者番号 : 40748513  
(平成 28 年度より研究分担者)