

論文の内容の要旨

論文題目 Development of enzymatic catalysts working in nonaqueous media
(非水溶媒中での利用を目的とした酵素触媒の開発)

氏名 平川 秀彦

1. 緒言

酵素は多くの化学反応を触媒し、有機合成の触媒として多くの有用性質を有している。特に、酸化還元酵素は不斉、あるいは、位置選択的酸化還元反応を触媒することができ、これらの反応によって得られる有機化合物は医薬品などファインケミカルのビルディングブロックとして重要である。酸化還元酵素の基質となる有機化合物の多くは水に溶けにくいいため、酸化還元酵素による反応は非水溶媒中で行われることが望ましいものの、酸化還元酵素の中には水溶性補酵素を要求するものもあり、酵素反応を利用した有機合成では非常に大きな反応容積が必要となる。さらに、補酵素は高価なため非水溶媒において補酵素再生系を確立することが大きな課題である。また、市販されている酸化還元酵素は限られているため、安定な有用化合物生産のための新規な酵素触媒系を開発することは極めて重要である。

2. 超好熱古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 由来アルコールデヒドロゲナーゼの諸性質

2.1 緒言

アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) は広く自然界に存在し、多くのほ乳類、植物、微生物から見出されている。この酵素はさまざまな生理的過程において重要な役割を担っている。様々な生物種よりカルボニル基の立体特異的な還元反応を触媒するアルコールデヒドロゲナーゼが発見されてきている。例えば、*Rhodococcus erythropolis* や *Thermoanaerobium brockii* 由来アルコールデヒドロゲナーゼは(S)-アルコール、*Lactobacillus kefir* 由来 ADH は(R)-アルコールを生成する。光学活性なアルコールは様々な天然化合物、医薬品を合成する際の重要なビルディングブロックである。しかし、多くのアルコールデヒドロゲナーゼは不安定であるため、工業利用には適していない。

近年、好熱性生物由来のアルコールデヒドロゲナーゼが単離されている。これらのアルコールデヒドロゲナーゼは熱安定であり、広い基質特異性を示す。本項では近年、構造が解かれた超好熱古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 由来の亜鉛要求性中鎖アルコールデヒドロゲナーゼの精製およびその諸性質について報告する。

2.2 結果及び考察

リコンビナント *A. pernix* ADH は誘導無しで大腸菌発現系を利用して発現させることに成功した。精製した *A. pernix* ADH は SDS-PAGE では単一バンドを示した。遺伝子配列より計算して得られる分子量は 39.57 kDa であり、SDS-PAGE の結果から得られて分子量は 40 kDa であった。ゲルろ過クロマトグラフィーから得られた未変性体の分子量は 1.6×10^2 kDa であった。このことは *A. pernix* ADH がホモ四量体を形成していることを示唆している。

A. pernix ADH の活性の温度依存性を図 1 に示す。これまで最も熱安定性が高いことが知られていた中鎖 ADH である *S. solfataricus* ADH と同様に、反応速度は 95°C まで上昇した。アレニウスプロットには 30°C から 95°C までの範囲で明らかな転移点は見られなかった。98°C で 30 分間のインキュベーション後、*A. pernix* ADH は 24%の活性を維持していた。一方、これまで最も熱安定性が高いと報告されている *S. solfataricus* ADH は 95°C で 30 分間のインキュベーションにより 90%の活性を失うことが報告されている。したがって、*A. pernix* ADH は現在最も熱安定性の高い中鎖 ADH である。

脂肪族から芳香族までの様々なアルコールの酸化反応において *A. pernix* ADH の基質特異性を検討した。脂肪族直鎖アルコ

ールでは幅広い第一級アルコールを酸化した。アルキル鎖が長くなるにつれ K_m は減少した。第二級アルコールでも同様に長いアルキル鎖を有するものを好んだ。芳香族アルコールに関してもアルキル鎖が長くなるにつれて K_m は減少した。したがって、長いアルキル鎖を有するアルコールを基質として好むようであった。

還元反応における基質特異性を脂肪族ケトン、環状ケトン、芳香族ケトン、ベンズアルデヒドについて検討した。脂肪族ケトンでは、アルキル鎖が長くなるにつれて K_m は減少した。また、芳香族ケトンは良い基質ではなかった。

さまざまな脂肪族ケトンに関してエナンチオ選択性を示したのが表 1 である。この酵素は脂肪族ケトンを選択的に (*S*)-アルコールへと還元した。2-ヘキサノンを除いてエナンチオ過剰率の値はアルキル鎖が長くなるほど向上した。

エナンチオ選択的な還元反応を触媒する超好熱性生物由来 ADH はこれまでのところ報告されていない。高い熱安定性、可逆性、広い基質特異性、そして高いエナンチオ選択性という *A. pernix* ADH の性質はキラルな脂肪族アルコールの工業生産の有用な生体触媒の一つといえよう。

3. 好熱性アルコールデヒドロゲナーゼに対する有機溶媒の log *P* 効果

3.1 緒言

非水溶媒中の酵素学が発展するにつれて、付加的な効果が示されるようになった。特に微少な水を含む水非混和性有機溶媒中での懸濁酵素や固定化酵素は水系に比べれば多くの場合

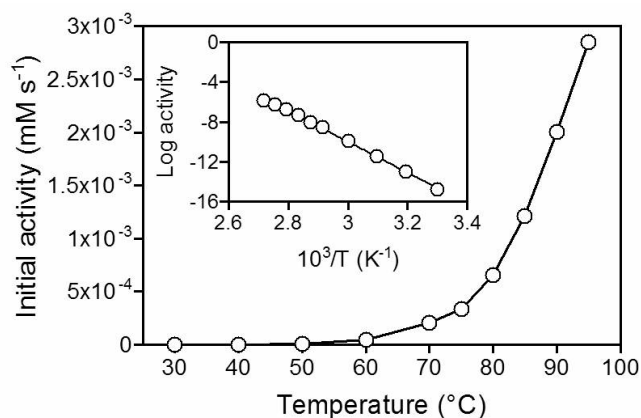


表 1 脂肪族ケトンの還元反応におけるエナンチオ過剰率 (ee)

基質	生成物	ee (%)
2-ペンタノン	(<i>S</i>)-2-ペンタノール	60
2-ヘキサノン	(<i>S</i>)-2-ヘキサノール	37
2-ヘプタノン	(<i>S</i>)-2-ヘプタノール	79
2-オクタノン	(<i>S</i>)-2-オクタノール	92
2-ノナノン	(<i>S</i>)-2-ノナノール	95
2-デカノン	(<i>S</i>)-2-デカノール	92

に触媒活性はかなり低下するが、新たな性質を獲得することが示されている。水溶性補酵素を必要とする酵素、例えば、デヒドロゲナーゼはこれらの溶媒中ではほとんど利用されていない。それは市販されている補酵素要求性酵素の多くは不安定であり、また、補酵素の再生手段が限られてしまうためである。水非混和性有機溶媒中の酵素反応では物質移動が律速段階となりうるのに対して水混和性有機溶媒を含む均一溶媒系では物質移動が律速段階とはなりえないが、水混和性有機溶媒は酵素から酵素活性を維持するのに必要な水分子を剥ぎ取るために、多くの酵素が水混和性有機溶媒により失活することが知られている。したがって、水混和性有機溶媒中でのほとんどの研究は水混和性有機溶媒に対する耐性に集中しており、酵素、特に補酵素要求性酵素に対する水混和性有機溶媒の正の効果については検討されていない。そこで、本項では *A. pernix* ADH に水混和性有機溶媒に与える影響について検討を行った。

3.2 結果及び考察

酸化反応は水混和性有機溶媒の添加により向上した。水のモル分率を一定にした場合の速度論パラメータに対する $\log P$ の影響を調べたところ、 V_{\max} は溶媒の $\log P$ に対して強い正の相関を示した (図2) が、 K_m は V_{\max} ほどの相関は示さなかった。Log P 値と水のモル分率を一定にした場合、 V_{\max} は溶媒の組成には影響を受けなかったが、 K_m は溶媒の組成に影響を受けた。このことは酵素と有機溶媒分子との間の直接的な相互作用の影響

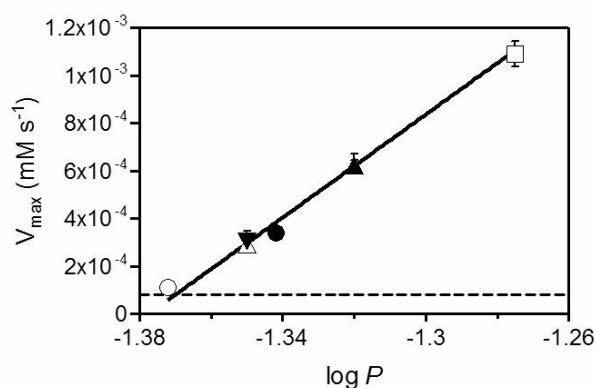


図2 V_{\max} に対する $\log P$ の効果

は酵素活性に対して無視できるほど小さく、酵素分子周辺の極性が触媒活性に対する支配因子であることを示している。酵素活性に対する $\log P$ の影響は加水分解酵素についてのみ報告されているが、 $\log P$ 依存的な活性化は報告されていない。

酵素活性は系中の水分量に大きな影響を受けるということがよく知られているが、本酵素においても水分量は大きな影響を与え、 $\log P$ が一定の条件下では水分量の低下と共に V_{\max} は減少した。

4. 自己完結型 P450cam システムの構築

4.1 緒言

シトクロム P450 は幅広い酸化反応を触媒するヘム含有モノオキシゲナーゼの一つのスーパーファミリーである。このスーパーファミリーは細菌からほ乳類まで広く分布しており、多くの生理的機能に関わっている。最もこれまで研究されてきた *Pseudomonas putida* 由来のシトクロム P450cam は電子伝達タンパク質としてプチダレドキシシンとプチダレドキシシン還元酵素を必要とする。プチダレドキシシンは P450cam に対して基質として作用するために過剰量が必要となる。このため、プチダレドキシシン還元酵素-プチダレドキシシン-P450cam の直鎖型

融合タンパク質による人工自己完結型 P450cam システムが報告されている。しかし、立体的制約のために活性は極めて低い。本項では *Streptomyces mobaraensis* 由来トランスグルタミナーゼを用いて分岐型 P450cam システムを構築した (図 3)。

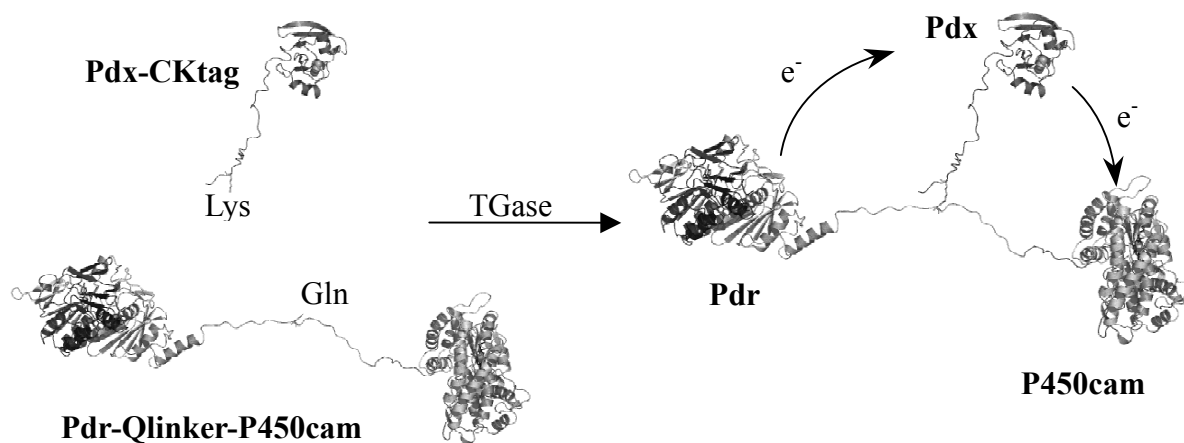


図3 分岐型融合タンパク質

4.2 結果及び考察

Pdr-Qlinker-P450cam と Pdx-CKtag を個別に大腸菌発現系により発現させ、カラムクロマトグラフィーにより精製した。分岐型融合タンパク質は Pdr-Qlinker-P450cam と Pdx-CKtag をトランスグルタミナーゼで反応させることによって得た。

(+)-カンファーの存在下における酸化型は典型的なハイスピンのスペクトルを示した。亜二チオン酸ナトリウムによる還元後に一酸化炭素を吹き込むとソーレー体は 450 nm に移動した。P450 は変性すると一酸化炭素付加体のソーレー体は 420 nm にあらわれることが知られていることを考慮すると、この分岐型融合タンパク質のヘムドメインは未変性であると考えられる。

この融合タンパク質の活性は(+)-カンファーの濃度に対してミカエリス-メンテン型の依存性を示した。また、活性はタンパク質濃度に対して一次の依存性を示した (図 4) ことは分子内電子伝達が起こっていることを示唆している。

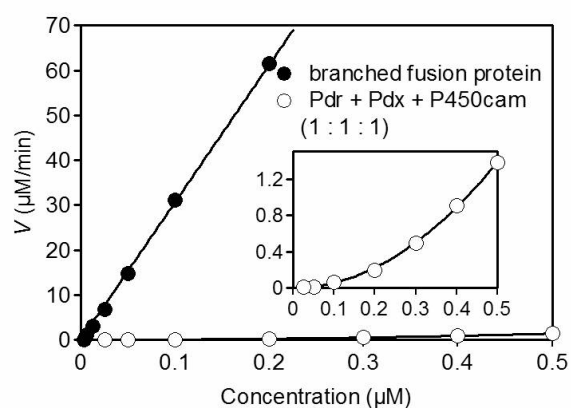


図4 触媒活性のタンパク質濃度依存性