

1 研究の背景と目的

光学活性を持つアミノ酸は、医薬品原料や農薬の原料として広く工業利用されている。本研究で対象とした D-2-フェニルグリシンはアンピシリンを始めとする β -ラクタム系の抗生物質に利用されており、酵素法で合成される L-アミノ酸 (L-Phe、L-Trp、L-Cys、L-Ala 等) と同程度の年間 1,000 t 生産されている。現在、D-2-フェニルグリシンの工業的な製造法は有機合成法であり、製造に伴う環境負荷が大きいこと改良点として挙げられる。

申請者は、芳香族アミン類の微生物代謝に関わる代謝酵素系の解析を行い、見出した特異な反応機構をヒントにして“微生物酵素による選択的な物質変換法の開発”に取り組んできた。2-フェニルグリシン類はキラルな脂肪族アミンで D-体および L-体ともに抗生物質などの医薬品合成時の原料となる付加価値のある化合物である。申請者オリジナルの *Chryseobacterium* sp. 5-3B は *N*-アセチルトランスフェラーゼ (NatA) を有し、同酵素を利用すると D,L-2-フェニルグリシンの光学分割が可能である (Fig. 1)。同酵素は既報の類縁酵素とは基質特異性や一次配列が全く異なっていたが、(推定) 高次構造モデルを解析することで補酵素 (アセチル CoA) や基質 (L-2-フェニルグリシン) の結合に関わる領域を推定するとともに基質特異性や触媒活性についての機能改変が期待できる。

本研究では、5-3B 株由来同酵素を 2-フェニルグリシン類の選択的合成のために活用すべく、形質転換株を生体触媒としての利用法を確立するとともに酵素の基質特異性の改変を目指した高次構造解析とアミノ酸置換した変異酵素の評価を目的とする。

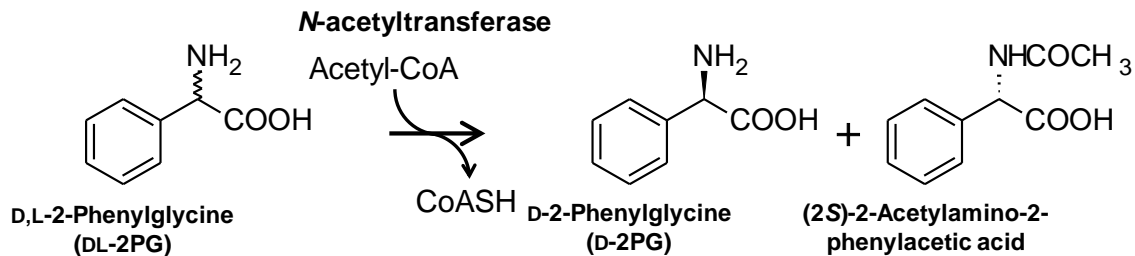


Fig. 1. Enantio-selective bioconversion by *N*-acetyltransferase

2 研究方法・研究内容

2-1 組換え *N*-アセチルトランスフェラーゼ発現株の取得

5-3B 由来 NatA は、*E. coli* BL21(DE3)-pET28b(+)の系で発現できるが、菌体中には活性体と不活性体が混合物に含まれるため、発現量が低い pGEM-T easy vector (プロメガ) および低温下で目的タンパク質を発現できる pCold II vector (タカラバイオ) を用いた発現系を検討することにした。得られた形質転換株における組換え酵素の発現は、添付マニュアル記載の方法に従った。また、*B. subtilis* RIK1285 を宿主とし、シグナル領域を除去した pBE-S expression vector (タカラバイオ) を用いた発現系も検討することにした。

2-2 組換え *N*-アセチルトランスフェラーゼの精製と活性測定

NatA の精製は既報の方法に従い、COSMOGEL® His-Accept (ナカライテスク) を用いたアフィニティークロマトグラフィーの他、酵素結晶化のサンプル調製時はさらに Toyopearl HW-55 (東ソー) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーも行った。

酵素活性は既報の方法に従い、5 mM L-2-フェニルグリシンおよび 5 mM acetyl-CoA を含む反応液に精製酵素を添加することで開始し、基質の *N*-アセチル化とともに遊離した CoA-SH を 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic Acid) (DTNB) により 5-メルカプト-2-ニトロ安息香酸を、412 nm (モル吸光係数 13,200 M⁻¹cm⁻¹) の吸光度を測定することで定量した。

2-3 組換え *N*-アセチルトランスフェラーゼ発現株 (Growing cell) による D,L-2-フェニルグリシンの光学分割

LB 培地 (Lennox タイプ、ナカライテスク) を基本培地とし、pH (6.0-9.0)、温度 (30°C および 37°C)、培養液量 (50、75、100 ml/500 ml 坂口フラスコ) の条件で培養 (140 rpm, 往復振とう) を行った。形質転換株の生育 (OD₆₆₀) を測定するとともに、培養上清中に含まれる D,L-2-フェニルグリシンとその *N*-アセチル化物を既報の方法に従い、Cosmosil 5C18-MS-II カラム (4.6 mm I.D. × 250 mm, ナカライテスク) 20 mM K₂PO₄ (pH 2.5)-Methanol (80:20, v/v) にて分別定量した。また、2-フェニルグリシンおよびその *N*-アセチル化物の光学活性は、Chiralcel OD-H カラム *n*-ヘキサン-2-プロパノール-トリフルオロ酢酸 (90:10:0.1, v/v/v) にて分別定量した。

2-4 精製した組換え酵素の結晶化条件の検討

精製した NatA をアミコンウルトラ (Amicon Ultra) -15 遠心式フィルターユニットにて濃縮 (5-10 mg/ml) した。初期結晶化条件のスクリーニングを Hampton Research 社製の結晶化スクリーニングキット (HR2-144) を用いて、ハンギングドロップ蒸気拡散法 5°C と 25°C で行った。経時的に各条件下での単結晶生成の有無を観察した。

2-5 推定高次構造モデルの作製と基質・補酵素およびアセチル基転移に関わるアミノ酸残基の推定

CPH models 3.2 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>) または RCSB PDB server (<https://www.rcsb.org/>) を用い、脂肪族アミン類のアミノ基を *N*-アセチル化する *B. subtilis* 由来 *N*¹-spermidine/spermine acetyltransferase (PaiA, 1TIQ)、*Vibrio cholera* 由来 spermidine/spermine acetyltransferase (SpeG, 4MHD)、*Sulfolobus solfataricus* 由来 *N*^α-acetyltransferase (SsArd1, 5C88) を参考に NatA の推定高次構造を作製するとともに、基質・補酵素およびアセチル基転移に関わるアミノ酸残基の推定を行った。

3 研究成果

3-1 組換え *N*-アセチルトランスフェラーゼの発現と精製

NatA を大腸菌の発現系 (*E. coli* DH5α-pGEM-NatA および *E. coli* BL21(DE3)-pCold II-NatA) にて発現させると菌体破碎液は確かに *N*-アセチルトランスフェラーゼの活性がそれぞれ **??? ± ??? U/ml** および **??? ± ??? U/ml** 見られた。既報の方法とは異なる宿主ベクター系を検討したが、同酵素は不溶性タンパク質としても破碎液中に蓄積していた。His-Accept を用いて同破碎液からそれぞれ NatA が単一に精製できた (Fig. 2)。また、2-フェニルグリシンのラセミ体混合物に対する立体選

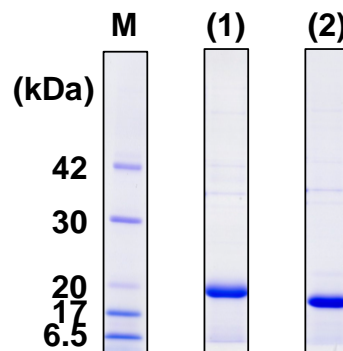


Fig. 2. SDS-PAGE of purified recombinant *N*-acetyltransferases from *E. coli* DH5α-pGEM-NatA (1) and *E. coli* BL21(DE3)-pCold II-NatA (2)

択性はL-体に対してであり、親株の同酵素と同様に99%であった。一方、*B. subtilis* RIK1285-pBE-S-NatAの発現系では $???\pm???$ U/mlであり、大腸菌の発現系よりも生産量は低かった。

大腸菌形質転換株によって発現したNatAを精製後、結晶化のための条件（インキュベート温度および酵素濃度）を検討したが、いずれもインキュベート中に不溶性のタンパク質として凝集沈殿し、微細結晶も得られなかった。

3-2 *N*-アセチルトランスフェラーゼ発現形質転換株による2-フェニルグリシンの変換

予備検討の結果、大腸菌の発現系よりも*B. subtilis* RIK1285-pBE-S-NatAの形質転換株の変換率が良かったことから、*Bacillus*形質転換株を用いて2-フェニルグリシンの変換に与える条件を検討した (Table 1)。

Table 1 Effect of various factors on the growth of *Bacillus* transformant and the transformation of D,L-2-phenylglycine

Factor	Cell growth (OD ₆₆₀)	Produced 2-APA ^b (mM)	Molar yield (%)
Concentration of 2-PG ^a			
0.1% (6.6 mM) D,L-2-PG ^a	5.7	1.3 ± 0.09	19.7
0.2% (13.2 mM) D,L-2-PG ^a	5.8	1.5 ± 0.08	22.7
pH (6.6 mM D,L-2-PG)			
6.0	4.5	0.8 ± 0.05	12.1
7.0	5.6	1.8 ± 0.07	27.3
8.0	5.5	1.9 ± 0.04	28.8
9.0	3.1	2.0 ± 0.02	30.3
Culture volume (ml/500 ml flask) (6.6 mM D,L-2-PG)			
50	5.7	1.5 ± 0.05	22.7
75	5.4	1.4 ± 0.07	21.2
100	5.5	0.8 ± 0.05	12.1

^a 2-PG, 2-phenylglycine; ^b 2-APA, 2-acetylamino-2-phenylacetic acid

3-3 推定高次構造モデルを基にした*N*-アセチル化に関わるアミノ酸残基の推定とアミノ酸置換した酵素の触媒効率の評価

作製した推定高次構造モデルについて*S. solfataricus* P2由来*N*-アセチルトランスフェラーゼ (5C88)との重ねあわせた図を示す (Fig. 3)。これを基に基質結合に関わるアミノ酸残基を選抜し (data not shown)、Ala残基に置換したと酵素を作成することでコントロール (組換えNatA)に対する相対活性を求めた。合計10種の変異酵素を調製して相対活性と推定高次構造モデル上での位置を勘案し、コントロールと比較して相対活性が140%まで増大したY40Fと逆に70%と減少したS85Aについて基質特異性の相違を比較した (Table 2)。その結果、NatAと比較してわずかではあるが、Y40FではL-2-Phenylglycineおよび2-Chlorophenylglycineに対する活性が増大し、S85Aでは4-ChlorophenylglycineおよびL-4-Hydroxyphenylglycineに対する活性が増大した。

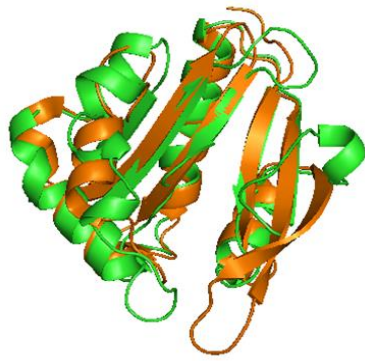


Fig. 3. Prediction of protein structures of *N*-acetyltransferase (green) from *Chryseobacterium* sp. strain 5-3B by template-based modeling and comparison with previously reported *N*-acetyltransferase from *N*-terminal acetyltransferase (SsArd1) from *S. solfataricus* P2 (5C88, orange).

Table 2 Substrate specificity of NatA and its variants toward L-2-phenylglycine

Substrate specificity (U/mg)	NatA	Y40F	S85A
L-2-Phenylglycine	34±0.80	47±1.6	23±1.2
D-2-Phenylglycine	0.63±0.017	0.95±0.30	0.62±0.016
2-Phenylglycine methyl ester	20±1.2	29±2.9	15±0.94
2-Chlorophenylglycine	8.3±0.21	12±1.6	5.7±0.39
4-Chlorophenylglycine	0.35±0.017	0.50±0.018	0.64±0.28
L-4-Hydroxyphenylglycine	0.42±0.026	0.45±0.030	0.96±0.061

4 生活や産業への貢献および波及効果

5-3B 株の Growing cell は、2-フェニルグリシンの最高溶解度 (16.5 mM) においても D,L-体を光学分割でき、生体触媒によるラセミ体混合物の光学分割法として有効である。しかしながら、「本菌は定常期以降溶菌が顕著であること」や「ヒドロキシやクロロ誘導体に対する *N*-アセチルトランスフェラーゼの相対活性が低いこと」を解決する必要がある。本研究において *Bacillus* 形質転換株の Growing cell による変換の可能性が明らかとなった。本研究で用いた *B. subtilis* RIK1285-pBE-S 発現系は、定常期においてより異種発現が進むことから cell mass をより増大させる培養条件をさらに検討するか発現ベクターのプロモーターを構成的発現のタイプに変更するとより効果的であると思われる。また、アミノ酸置換した変異酵素の触媒能を調べることで ⁴⁰Tyr や ⁸⁵Ser が有効であることがわかった。特に、2-フェニルグリシンの 4 位置換体は β -ラクタム系の抗生物質の合成に有用な鍵物質であることから、今後、これらのアミノ酸残基について Saturation mutagenesis を行うことで 4 位置換体に対する活性をさらに向上できると思われる。

2-フェニルグリシンおよびその誘導体は、 β -ラクタム系抗生物質製造の際の原料として重要で、栄養補助剤や酸化防止剤として用いられている L-Trp や L-Cys と年間の生産量は同程度であり、より効率的な生産法が望まれている。既存の製造法として hidantoinase と carbamylase を組み合わせた方法が採用されているが、ヒダントイン誘導体の前合成や製造に 2 種の酵素が必要である点において改良の余地がある。また、acylase や aminotransferase を用いる方法は、2-フェニルグリシンに対する活性が低く、実用レベルに至っていない。よって、申請者の研究は、微生物酵素を用いた選択的な物質変換・物質生産を行う製造業への貢献につながるといえる。