

氏名 (本籍)	府川 祐太 (神奈川県)
学位の種類	博士 (工学)
学位授与番号	甲第640号
学位授与日付	令和5年3月25日
専攻	工学専攻
学位論文題目	Development of enzymatic synthesis of chiral cyclic amines (光学活性環状アミンの酵素合成法の開発)
学位論文審査委員	(主査) 教授 藤澤 哲郎 (副査) 教授 吉田 豊和 准教授 岡 夏央

論文内容の要旨

光学活性環状アミンは医薬品や農薬の合成原料として有用な化合物である。一般的に遷移金属触媒やキラル化合物等を用いて化学的に合成される。しかし、高価な遷移金属やキラル分子触媒が必要であるため、簡便な合成法の開発が求められている。近年、遷移金属や有機分子触媒の代わりにトランスアミナーゼやイミン還元酵素 (IRED) を用いた、安全性が高く、環境負荷の少ない方法が研究されている。しかし、光学活性環状アミンの実用的スケールでの合成例は依然として少ない状況である。一方、*S* 体のキラル環状アミンの合成に利用できる酵素として、ハイドロラーゼ K5 (SHA K5) および IRED-GF3546 (SIR46) がこれまでに発見されている。SHA K5 はラセミ体 *N*-アシルピペリジン を立体選択的に加水分解することで直接的にキラルピペリジン を生成する酵素である。SIR46 は当初にスクリーニングで見出された5つのイミン還元酵素の中で唯一 *S* 体選択性を示す酵素である。しかし、SIR46 の還元活性は *R* 体選択性を示す IRED-GF3587 の 80 分の 1 程度である。以降、多くの *S* 体選択的な IRED が発見されたが、いずれも安定性や立体選択性において課題がある。これらの背景を踏まえて、酵素法による *S* 体の光学活性環状アミンの実用的な合成法を開発することを目指した。

rac-N-Acetyl-2-methylpiperidine (*rac-N*-acetyl-2-MPI) を立体選択的に加水分解する土壌微生物を探索し、速度論的に *S* 体選択性を示す活性菌 *Arthrobacter* sp. K5 を見出した。K5 は *rac-N*-acetyl-2-MPI に対しては立体選択性を示さないが、アセチル基をピバロイル基に置き換えると、光学純度 88% *ee* の (*S*)-2-methylpiperidine (*S*-2-MPI) が生成した。休止菌体反応では 100 mM *rac-N*-pivaloyl-2-MPI から変換率 38% で *S*-2-MPI (80% *ee*) が得られた。*Arthrobacter* sp. K5 菌体から SHA K5 を精製後、精製酵素の N 末端および内部アミノ酸配列と活性菌 K5 のゲノム配列から、SHA K5 遺伝子を同定した。BLASTp 検索から、フェニルウレアハイドロラーゼや *Gulosibacter milinativorax* 由来 molinate ハイドロラーゼと中程度の配列相同性 (<66%, 67%) を示した。本酵素の基質作用範囲は広く、各種アシルピペリジンやピロリジン、インドリンを加水分解することが判明した。SHA K5 を発現する組換え体を作製し、休止菌体反応を行うと 100 mM *rac-N*-pivaloyl-2-MPI から変換率 48% で *S*-2-MPI (84% *ee*) が生成した。

SIR46 とグルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) を共発現させた組換え大腸菌は、長時間反応および有機溶媒存在下で溶菌しやすいことや SIR46 の安定性が低いことから、高濃度の環状イミンの還元が不可能であった。そこで、堅牢な細胞骨格を有するロドコッカス属細菌を宿主とした異種発現系を構築した。休止菌体反応では大腸菌宿主と比べて高濃度の 2-methyl-1-pyrroline (2-MPN) でも効率良く反応が進行するだけでなく、反応はグルコースを添

加するのみで進行し、GDH と NADPH は不要であった。しかし、酵素自体の不安定性が際立ち、1 ヶ月以上の冷蔵保存によって酵素活性が 50%以上低下した。そこで酵素への変異導入により、安定性の高い SIR46 変異体の作製を試みた。変異体の安定性は熱耐性を指標に評価した。酵素タンパク質の結晶構造や 2 次構造の安定性、および BLASTp 検索で得られた複数の IRED の配列アライメントの比較を基に、安定性に寄与する変異を見出した。その結果、熱耐性だけでなく酵素活性が向上する変異も見出され、R158L 変異体が最も高い活性を示した。得られた複数の有用変異をかけあわせた最終変異体 M9 は野生型と比べて高い熱安定性を示し、50°C、30 分または 35°C、24 時間の熱処理、50 日以上 4°C 保存では酵素活性を 100%維持した上、酵素活性は約 2 倍増大した。変異体 M9 と GDH を共発現させた組換えロドコッカス属細菌を用いて休止菌体反応を行ったところ、500 mM 2-MPN 存在下でも変換反応は 5 日間以上にわたり持続した。300 mM 2-MPN の還元反応を行い、反応生成物を Boc 保護して単離したところ、収率 60%で *N*-Boc-(*S*)-2-methylpyrrolidine (92.4% ee) が得られた。組換え体を用いて他の環状イミンに対する活性を評価したところ、2-(4-methoxyphenyl)-1-pyrroline に対する活性は低下したものの、2-phenyl-1-pyrroline や 1-methyl-3,4-dihydroisoquinoline への還元活性および立体選択性、およびシクロヘキサノンとメチルアミンを用いた還元的アミノ化活性は、野生型と比べて 2.5 倍から 5.5 倍に向上した。

論文審査結果の要旨

光学活性環状アミンは医薬品や農薬の合成原料として有用であり、その簡便な合成法の開発が望まれている。本論文では、二つの酵素をとりあげ、環状アミンの光学分割とキラル環状アミン合成を検討している。環状アミンの光学分割では、新奇ハイドrolラーゼを微生物に見出し、その遺伝子組換え体を触媒として活用することで、2-メチルピペリジンを立体選択的に高濃度で合成できるプロセスを開発している。また、キラル環状アミン合成では、従来は不安定で触媒能が低かったイミン還元酵素に対して、指向性進化法を駆使して機能改変を施している。機能改変した酵素分子は、熱安定性と触媒活性が顕著に高まり、高効率でのキラル環状アミン合成を達成している。これらの成果は、酵素利用工学の観点から学術的に価値の高い研究と評価できる。これらのことから、本論文は博士（工学）の学位論文に値するものと判断する。

最終試験結果の要旨

学位論文審査委員会では、提出論文の基礎となる発表論文の内容を確認した。また、令和 5 年 2 月 14 日に開催された学位論文公聴会における発表内容、質疑応答にもとづき、申請者が学位授与にふさわしい専門知識を有することを確認し、最終試験に合格と判定した。

発表論文（論文名、著者、掲載誌名、巻号、ページ）

1. Novel (*S*)-selective hydrolase from *Arthrobacter* sp. K5 for kinetic resolution of cyclic amines, Y. Fukawa, Y. Mizuno, K. Kawade, K. Mitsukura, T. Yoshida, *Catalysts*, 2021, 11, 809-817
2. Improvement of (*S*)-selective imine reductase GF3546 for the synthesis of chiral cyclic amines, Y. Fukawa, K. Yoshida, S. Degura, K. Mitsukura, T. Yoshida, *Chem. Commun.*, 2022, 58, 13222-13225