

博士論文

ニトリルおよびアミノ酸代謝関連酵素のタンパク質工学に よる機能改変および有機合成への応用研究

川原 寛弘

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科

主指導教員：高木 博史 教授

ストレス微生物研究室（バイオサイエンス領域）

令和 4 年 11 月 21 日提出

目次

序論.....	p. 3
第 1 章.....	p. 7
“ <i>Baliospermum montanum</i> 由来 <i>S</i> 立体選択的ヒドロキシニトリルリアーゼのタンパク質表面に位置する 156 番目アスパラギンへの変異導入による触媒効率及び立体選択性の改良”	
1-1. 緒言.....	p.8
1-2. 材料と方法.....	p.9
1-3. 結果と考察.....	p.13
第 2 章.....	p.24
“ブタ腎臓由来 <i>D</i> -アミノ酸オキシダーゼを用いた第一級アミンの酸化的シアン付加反応による α -アミノニトリルおよび非天然 α -アミノ酸の合成のための新規酵素手法の構築”	
2-1. 緒言.....	p.25
2-2. 材料と方法.....	p.27
2-3. 結果と考察.....	p.31
第 3 章.....	p.50
“ブタ腎臓由来 <i>D</i> -アミノ酸オキシダーゼを用いた第一級アミンの酸化による新規なイミン合成手法の構築”	
3-1. 緒言.....	p.51
3-2. 材料と方法.....	p.53
3-3. 結果と考察.....	p.56
統括.....	p.68
謝辞.....	p.71
参考文献.....	p.72

序論

酵素は生物において代謝経路を制御する生体触媒であり、特異な触媒活性をもつタンパク質である。化学反応よりも温和で高効率な反応を行う魅力的な触媒であり、生体内で天然成分に作用するだけでなく、非天然成分の分解、合成反応を触媒することも可能である。そのため、化学反応を酵素反応に置き換えるための研究は盛んに行われている。その中で、天然および非天然化合物の酵素を用いた生産のため、自然界からの酵素探索、既存酵素への変異導入による改良、酵素の性質検討、X線構造解析、複数酵素を組み合わせたカスケード反応の構築、化学反応系への酵素利用など、様々なアプローチで研究が進められている。

一般的に特定の化学反応に対する酵素反応を用いた手法の開発にはいくつかのステップがある。まず、適切な反応を触媒する酵素のスクリーニングが必要である。自然界から土壌の微生物や植物などの様々な生体が持つ酵素を対象とする場合や、すでに蓄積された様々な生物の遺伝子情報をGenBankなどのデータベースで検索し、その配列情報を用いることもある。次に必要に応じて異種宿主による酵素の発現系の構築を行い、それら酵素を精製し、十分量の精製酵素を得たのち、その酵素の諸性質を明らかにする。またタンパク質工学により、変異導入を行うことで酵素を改変し、酵素の諸性質で不足している点を改善する。最後に生産システムにおける酵素反応に関して最適な条件を決定する。

特に医薬品や農薬などのファインケミカル製品を製造するための新しい酵素法の開発では、酵素の選択的な合成の利点を活かしたキラル合成に着目し、中間体合成などで様々な研究が進んでいる。その中でもC-C結合の合成は有機合成化学における最も重要な課題の一つであり、酵素においても魅力的な研究分野の一つである。その中でも、特にシアン付加反応は、C-C結合の合成において非常に有用な反応であり、主にアルデヒドまたはケトンにシアンを付加する反応により、ニトリル化合物(-CN)を生成する。シアン付加は、C-C結合の形成と同時に化合物の良好なN源にもなる。ニトリルは産業において重要な化合物であり、アミド、カルボン酸、ニトロ化合物、およびアミンなどの様々な化学物質の合成に使用できる¹。このニトリル化合物は、生物においても酵素により合成、分解されている。例えばシアノヒドリンは、植物において疎水性アミノ酸(L-Tyr、L-Phe、L-Val、L-Ile、およびL-Leu)から合成される生体内の天然ニトリル化合物である。それらの反応はP450によって触媒され、シアノヒドリンはヒドロキシニトリルリアーゼ(HNL)によってアルデヒドおよびシアンに分解され、植物がもつ害虫に対する防御化学物質として使用されていることが知られ

ている²⁻⁵(Scheme 1A)。また、一部の微生物も、アルドキシムデヒドラターゼの作用によってアルドキシムからニトリル化合物を合成できる⁶。これらのニトリル化合物は、ニトリラーゼまたはニトリルヒドラターゼおよびアミダーゼによってカルボン酸に分解される^{7,8}。一部の微生物がなぜこの代謝経路を保有するかは不明であるが、これらニトリル代謝関連酵素は産業的に魅力的な反応を触媒する。このように、工業的な生産のため、ニトリル化合物に作用する酵素のスクリーニングは、世界中で広く行われている(Scheme 1B)。その中でも Asanoらは、ニトリル、アミノ酸、アミドなどの有用な化合物の合成のためにニトリル代謝酵素を自然界からスクリーニングし、性質を特定し、様々な物質生産に応用している。

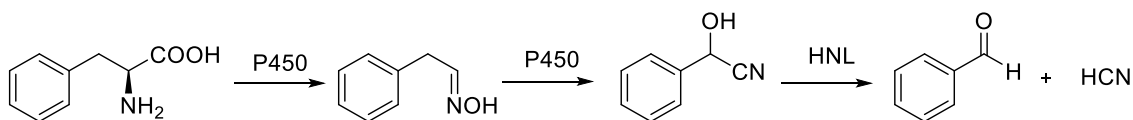
例えば、アミノ酸の立体選択的な合成のため、アミノ酸アミドラセマーゼと立体選択的なアミダーゼを組み合わせたラセミ体アミノ酸アミドの速度論的光学分割法が開発され、光学活性をもつ天然および非天然アミノ酸の合成に利用されている。さらにこの系にニトリルをアミドへ加水分解する反応を触媒する非立体選択的ニトリルヒドラターゼを組み合わせ、 α -アミノニトリルからD-またはL- α -アミノ酸への変換を可能にしている^{9,10}。また植物由来のHNLは、アルデヒドまたはケトンからのシアノヒドリンの立体選択的合成に有用である。Asanoらは、植物およびヤスデから複数の新しいタイプのHNLをスクリーニングにより発見し、アルデヒドからマンデロニトリルなどの芳香族シアノヒドリンの立体選択的合成に利用した^{11,12}。さらに、P450およびアルドキシムデヒドラターゼの組み合わせを使用して、シアニ化物を使用せずにアミノ酸またはアルドキシムからニトリルを合成するための新規な酵素によるニトリル合成手法についても報告している^{13,14}。さらに最近では、アミノ酸代謝関連酵素ブタ腎臓由来D-アミノ酸オキシダーゼ(pkDAO)を、そのX線結晶構造に基づき、変異導入を行うことでR選択的アミノオキシダーゼに変換し、還元剤の存在下で脱ラセミ化反応による芳香族アミンの光学分割に利用できることを報告している¹⁵。

このように、シアニ付加反応によりニトリル類を容易に合成し、またそのニトリル化合物を加水分解することでアミノ酸やアミノ酸アミドに変換することができること、さらにそのシアニ付加反応を立体選択的に行うことで、有用な医薬品中間体やアミノ酸などのキラル分子の合成を行うことができることなどから、本研究では、ニトリルおよびアミノ酸関連化合物に作用する酵素に着目し、有用な酵素を用いた物質生産の手法開発を進めた。

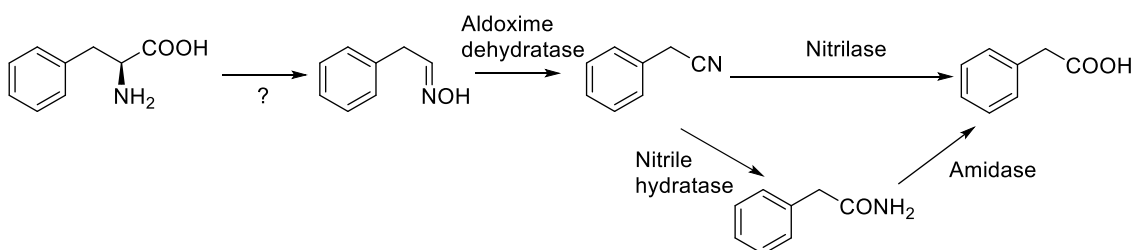
本論文では、シアニ付加反応に着目し、HNLに変異導入を行うことで、その立体選択性および触媒効率を改善した事例(Scheme 2A)や、これまで報告のない酵素反応による α -アミノニトリルの合成をオキシダーゼにより生成されるイミ

ンに着目し、反応系にシアンを共存させることで可能にした事例を報告する (Scheme 2B)。さらに同様の反応にシアンではなく、一級アミンを共存させることで、カップリング反応により、イミン合成を行う反応系の構築にも成功した (Scheme 2C)。それぞれの反応の最適化および反応メカニズムについても検討し、酵素反応と化学反応を組み合わせた新規な物質生産の可能性を示している。

A

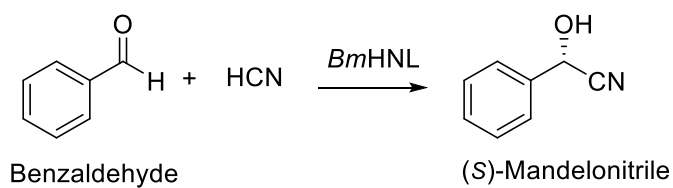


B

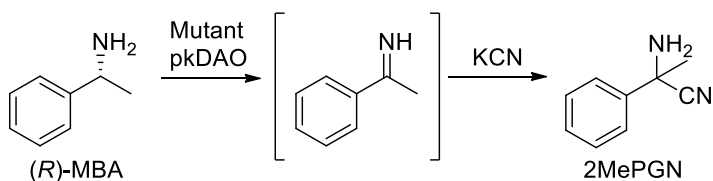


Scheme-1. 植物(A)と微生物(B)のニトリル代謝。

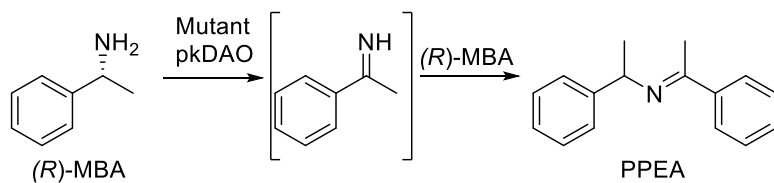
A



B



C



Scheme-2. (A) *BmHNL* による光学活性シアノヒドリンの合成。(B) 変異型 pKDAO による第一級アミンからの新規な酵素による α -アミノニトリルの合成手法。

(*R*)-MBA: (*R*)- α -Methylbenzylamine, 2MePGN: 2-Methyl-2-phenylglycinonitrile. (C) 変異型 pKDAO によるカップリング反応による第一級アミンからの新規な酵素によるイミン合成手法。PPEA: 1-Phenyl-*N*-(1-phenylethylidene)ethanamine.

第 1 章

Baliospermum montanum 由来 *S* 立体選択的ヒドロキシニトリルリアーゼのタンパク質表面に位置する 156 番目のアスパラギンへの 変異導入による触媒効率及び立体選択性の改良

要約

S 立体選択的な *Baliospermum montanum* 由来ヒドロキシニトリルリアーゼ (*BmHNL*) は芳香族化合物に対する広い基質特異性と同時に高い熱耐性を持つが、立体選択性および比活性が低い酵素である。この酵素を産業応用するために、(*S*)-mandelonitrile 生産に対する立体選択性および比活性を変異導入にて改善した。*BmHNL* の(*S*)-mandelonitrile 生成に対する比活性は 52 U/mg であったが、*BmHNLH103C/N156G* 変異体では 154 U/mg まで向上し、鏡像体過剰率は 55% から 93% まで向上した。反応速度論解析に関する(*R*)-mandelonitrile に対する K_m 値や(*S*)-mandelonitrile に対する k_{cat} 値は Asn156 の変異導入により上昇しており、鏡像体過剰率の向上に寄与していることが分かった。これは(*S*)-mandelonitrile に対する *BmHNL* の触媒効率と鏡像体過剰率の改善をランダム変異と部位特異的変異導入を組み合わせで行った初めての報告である。

1-1.緒言

ヒドロキシニトリルリアーゼ(HNL ; EC 4.1.2.10, 4.1.2.11, 4.1.2.46, and 4.1.2.47)は可逆的な反応を触媒する生体触媒で、立体選択的にシアノヒドリンの合成及び分解反応を触媒する。農薬や医薬品の生産に重要な中間体として利用される(*R*)もしくは(*S*)-mandelonitrile, 2-octanal cyanohydrin, ω -bromocyanohydrin など様々な光学活性シアノヒドリンの合成に利用が可能である¹⁶⁻²¹。

R-立体選択的な HNL(*R*-HNL)はアーモンド *Prunus dulcis (amyglutas) (PaHNL)*²²、パッションフルーツ *Passiflora edulis (PeHNL)*²³、*Granulicella tundricola (GtHNL)*²⁴、*Chamberlinius hualienensis (ChuaHNL)*¹² などから精製され、諸性質の検討が行われている。*S*-立体選択的な HNL(*S*-HNL)は *R*-HNL に比べ報告例が少なく、パラゴムノキ(*Hevea brasiliensis; HbHNL*)²⁵、キャッサバ(*Manihot esculenta; MeHNL*)²⁶、モロコシ(*Sorghum bicolor; SbHNL*)²⁷、*Baliospermum montanum (BmHNL)*¹¹ から精製し諸性質が検討され、報告されている。それら HNL は植物や細菌、ヤスデ由来であり、多様な性質を持ち、その立体構造にも特徴がある。酵素の構造的な特徴としては大きく 4 つのスーパーファミリーに分類できる²⁸。(oxidoreductases, α/β -hydrolases, Zn^{2+} -containing alcohol dehydrogenases, cupin like enzymes²⁸)その中でも α/β -hydrolases HNL は大腸菌での発現に関する研究が最も進められており^{25,26,29}、光学活性シアノヒドリンの応用に最も近い HNL である。^{5,18,30}

光学活性シアノヒドリンの工業的な生産において、酵素には一般的に高い立体選択性、高耐熱性、pH 安定性、高活性が求められる。*S* 立体選択的な *BmHNL*(α/β -hydrolases スーパーファミリー)は他の同タイプの *S*-HNL(*MeHNL, HbHNL*)と比較して、芳香族化合物に対する広い基質特異性と高い熱安定性をもつことから、産業的なシアノヒドリン合成のために、魅力的な HNL の一つである³¹。しかしながら、*BmHNL* は比活性や立体選択性においては他の *S*-HNL よりも低いという大きな欠点がある。本章では、様々な *S*-シアノヒドリンの合成を行う *BmHNL* の応用拡大のため、*BmHNL* の立体選択性及び比活性の改良を目的とし、すでに報告のある同タイプ(α/β -hydrolase)の高い立体選択性をもつ *S*-HNL、*MeHNL* や *HbHNL* との構造類似性を基に研究を進めた。

α/β -hydrolase HNL は一般的に大腸菌での発現を低温下(25°C以下)で行うが^{5,18,25,29}、Asano らは *MeHNL* において 103 番目のヒスチジンに変異導入を行うことで、一般的に大腸菌の培養に用いる温度、37°Cでの可溶性発現に成功している³²。本研究では、まずこの文献を参考に *BmHNL* のタンパク質発現を改良するため *BmHNL* の 103 番目のヒスチジンに変異を導入し、*BmHNLH103C* 変異体を構築した。*BmHNLH103C* は高い発現性を示すが、やはり立体選択性および

比活性は野生型と同様、低いままであった。そこで(*S*)-mandelonitrile に対する *BmHNLH103C* の立体選択性および比活性の改良のため、ランダムな変異導入を用いて実験を実施し、156 番目のアスパラギンに変異導入を行うことで立体選択性および比活性が向上することを発見した。さらに、変異酵素の特性解析を行い、(*S*)-mandelonitrile の立体選択的合成の増加に対して、Asn156 変異がどのように影響するか詳細に解析を行った。

1-2. 材料と方法

1-2-1. 化学物質と酵素の調整

全ての化学物質は特級グレードであり、benzaldehyde やラセミ体 mandelonitrile は Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) から購入した。(*R*)-mandelonitrile は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)、(*S*)-mandelonitrile は、Senbara によって記載された方法に従って *MeHNL* によって合成した³³。また遺伝子操作に関する試薬(制限酵素、ライゲーションミックス、ポリメラーゼなど)は Takara Bio Inc. (Kyoto, Japan) から購入した。

1-2-2. HNL 酵素活性測定

酵素の活性は mandelonitrile の分解と合成反応を測定している。mandelonitrile 合成のための酵素活性は、benzaldehyde とシアンから生成する光学活性 mandelonitrile の量を以下のように測定することにより評価した。mandelonitrile 合成の活性測定は、反応液(50 mM benzaldehyde、100 mM KCN、300 mM クエン酸緩衝液 pH 4.2)および 50 μ L の酵素溶液からなる反応混合物(0.5 mL)中で、25 $^{\circ}$ Cで行った。生成した光学活性 mandelonitrile の立体化学を、Asano らによって確立された方法に従って HPLC によって評価した¹¹。光学活性 mandelonitrile に対する合成活性の 1 U は、benzaldehyde から 1 分間に 1 μ mol の光学活性 mandelonitrile を生成する酵素の量として定義した。(*S*)-mandelonitrile への変換率(%)は、以下の式により算出した。(反応で生成した(*S*)-mandelonitrile (mM)/反応に用いた benzaldehyde 量(mM)) \times 100)さらに、(*S*)-mandelonitrile に対する鏡像体過剰 ee (%)は下記式により算出した。((*S*)-mandelonitrile (mM) - (*R*)-mandelonitrile (mM))/((*S*)-mandelonitrile (mM) + (*R*)-mandelonitrile (mM)) \times 100 mandelonitrile 分解に対する酵素活性を、2 mM ラセミ体 mandelonitrile、50 mM クエン酸緩衝液、pH 5.5、および酵素溶液からなる反応液(1 mL)を用いて 25 $^{\circ}$ C

で、280 nm における benzaldehyde の生成速度を測定した。HNL 活性測定のための mandelonitrile の酵素による分解反応の初速度を、以下の式によるバックグラウンド減算によって計算した。(測定値の分解速度-各 mandelonitrile 濃度の非酵素分解速度)。mandelonitrile の分解活性の 1 U は、1 分間に 1 μ mol の benzaldehyde を(R)-または(S)-mandelonitrile から生成する酵素量として定義した。また、(R)-および(S)-mandelonitrile のカイネティックパラメーターを、それぞれの分解反応の初速度から算出した。

1-2-3. 組換え酵素の発現のためのベクター構築

BmHNL 遺伝子を、pUC19 ベクターへの挿入のために、遺伝子配列³¹から設計したプライマー(P1 and P2 in Table 1-1)を用いた PCR により増幅した。増幅された PCR 産物を制限酵素 *Bam*HI および *Sph*I で消化し、アガロースゲル電気泳動によって分離し、Qiagen (Tokyo, Japan)の QIAquick™ゲル抽出キットで精製した。増幅した *HNL* 遺伝子を pUC19 ベクターの *lac* プロモーターの下流に挿入し、構築した発現ベクターにより大腸菌 JM109 を形質転換した。詳細な DNA 操作は、参照として先に記載した文献を参考にしている³²。

1-2-4. エラープローンPCRによるランダム変異導入

*BmHNL*遺伝子のランダム変異導入は、エラープローンPCRにより行った。ランダム変異導入のためのPCR反応液は、5 μ Lの10 \times Dream *Taq* buffer、0.4 mMまたは0.6 mM MnCl₂、0.2 mM それぞれdATP、dGTP、dCTPおよびdTTP、各プライマーP7およびP8の10 pmol、2.5 U Dream *Taq* DNAポリメラーゼ(Thermo Fisher Scientific Inc.)、および鋳型DNAとして500 ngまたは100 ngのプラスミドpUC19-*BmHNL* H103Cを用いた。PCRに用いる鋳型DNAの量によって変異導入効率を変化させた。PCRを30サイクル実施し、それぞれ98 $^{\circ}$ Cで30秒間の変性工程(第1サイクル、5分間)、50 $^{\circ}$ Cでのアニーリング工程を20秒間、ポリメラーゼによる伸長工程を60 $^{\circ}$ Cで1分間行った。増幅されたDNA断片または増幅された*HNL*遺伝子をpUC19における*lac*プロモーターの下流に挿入し、大腸菌JM109を形質転換した。

1-2-5. mandelonitrile 分解反応による高 HNL 活性のスクリーニング

変異 *HNL* 遺伝子を保有する組換え大腸菌細胞を、80 μ g/mL のアンピシリン

および 0.1 mM isopropyl- β -D- thiogalactopyranoside (IPTG)を含む、Luria-Bertani (LB)培地で培養した。ABgene 96 ディープウェルプレート(Life Technologies)を用い、それぞれのウェルに 160 μ L ずつ培地を分注し、そのウェルに個別に植菌し、バイオシェーカーM BR024(TAITEC, Saitama, Japan)上で 900 rpm 振とうし、37°Cで 12 時間培養した。その後 2,000 \times g で 10 分間遠心分離し、培養液から菌体を回収した。その菌体からリゾチーム溶液(100 mM リン酸カリウム緩衝液、pH 7.0、10 mM EDTA および 10 mg/mL リゾチーム)による凍結融解プロセスを用いた酵素消化によって個別に酵素液を抽出した。HNL 活性のハイスループットアッセイは、Asano らによって記載された方法によって実施した³²。

1-2-6. *Bm*HNL H103C の部位特異的変異導入および Asn156 の飽和変異導入

*Bm*HNL H103C 変異体は、P3 および P4 プライマー(Table 1-1)および pUC19-*Bm*HNL を鋳型として、Quick-Change 部位特異的変異導入キット(Stratagene, La Jolla, CA, USA)を用いて、以下のように PCR による部位特異的変異導入を行った。PCR 反応液は、5 μ L の 10 \times 反応緩衝液、1 μ L の dNTP ミックス、41 μ L の蒸留水、2.5 U *PfuTurbo* DNA ポリメラーゼ、1.25 μ L(10 ng/ μ l)のセンスおよびアンチセンスプライマー、および鋳型 DNA としての 10 ng pUC19-*Bm*HNL ベクターからなる。また PCR 反応を以下のステップで 18 サイクル行った。95°C で 20 秒間の変性ステップ(最初のサイクルは 95°C で 2 分間)、60°C でのアニーリングステップを 10 秒間、および 68°C で 4 分間の伸長反応ステップを実施した。生成物を 37°C で 10 U の *Dpn* I で 1 時間処理し、その処理後の液を大腸菌 JM109 の形質転換に使用した。

*Bm*HNLH103C における Asn156 の飽和変異導入も、同じキットおよび方法を用いて、NNK コドン(Table 1-1)および pUC19-*Bm*HNLH103C ベクターを含む P5 および P6 プライマーを用いて行った。

1-2-7. 組換え HNL の発現および酵素精製

組換え大腸菌細胞を、80 μ g/mL のアンピシリンを含む 5 mL の LB 培地中で 37°C、12 時間培養した。次いで、増殖した細胞(5 mL)を、80 μ g/mL のアンピシリンおよび 0.5 mM IPTG を含む 500 mL の LB 培地に移し、37°C で 12 時間培養した。菌体を遠心分離(5,000 \times g、15 分間)により回収し、pH 7.0 の 20 mM リン酸カリウム緩衝液(KPB)で洗浄後、懸濁した。

超音波処理により菌体を破砕した後、遠心分離(20,000 \times g、30 分、4°C)により菌体破砕物を除去し、上清溶液を回収し、以下のように酵素を精製した。回

収した粗酵素溶液を、20 mM KPB、pH 7.0 で平衡化した DEAE-Toyopearl カラム(10 cm×直径 2.8 cm)に供し、NaCl (0~0.5 M、それぞれ 150 mL)の直線勾配を用いて溶出した。次いで、活性画分を 30%硫酸アンモニウム飽和にし、硫酸アンモニウム(30%飽和)を含む 20 mM KPB、pH 7.0 で平衡化した Butyl-Toyopearl 650 M カラム(3.5 cm×2.8 cm)に供した。次いで、酵素を、硫酸アンモニウムの直線勾配(30%~0%飽和、それぞれ 100 mL)を用いて、20 mM KPB、pH 7.0 で溶出した。次いで、溶出物を、硫酸アンモニウム(30%飽和)を含む 20 mM KPB、pH 7.0 で平衡化した Resource Phenyl (3.5cm×0.64 cm)に供した。吸着した酵素を、硫酸アンモニウムの直線勾配(30%~0%飽和、それぞれ 10 mL)を用いて 20 mM KPB、pH 7.0 で溶出した。活性画分を回収し、20 mM KPB、pH 7.0 のバッファーにて透析した。

1-2-8. 統合計算科学システムmolecular operating environment (MOE)によるドッキングシミュレーション

(*S*)-mandelonitrileと*Bm*HNLの複合体構造を予測するために、(*S*)-mandelonitrileと*Hb*HNLの複合体(PDBコード1YB6³⁴同一性:56%)の構造をMOE解析によるドッキングシミュレーションのテンプレートとして用いた。(*S*)-mandelonitrileは、*Hb*HNLに結合する(*S*)-mandelonitrileをテンプレートとして*Bm*HNLの構造を重ね合わせることによって、プログラムASEDockを使用して*Bm*HNLとドッキングした。

Table 1-1. 遺伝子クローニング及び変異導入のために用いたプライマーの配列
太字は *BmHNL* における変異導入部分。

	Sequence	Comments
P1	5' - ATATGCATGCTAAGGAGATAGAAAATGGTGAGCGCTCATT -3'	Amplification of upstream of <i>BmHNL</i> gene
P2	5' -ATATGGATCCTCATGCGACAGCCAGCAAGT-3'	Amplification of downstream of <i>BmHNL</i> gene
P3	5' - CCAGAGAAAGTTTCTGCCTTAGTTTTCTGTAATGCATTGATGCC TGATGCATTGATCAC-3'	Site-directed mutagenesis of H103C
P4	5' - GTGATCAATGCATCAGGCATCAATGCATTACAGAAACTAAGG CAGAACTTTCTCTGG-3'	Site-directed mutagenesis of H103C
P5	5' -GTGACAGGACTTTAGCGGAGNNKATTTTTAGCAATTCGCC- 3'	Saturation mutagenesis of Asn156
P6	5' -GGCGAATTGCTAAAAATMNNCTCCGCTAAAGTCCTGTCAC- 3'	Saturation mutagenesis of Asn156
P7	5' -GTAAAACGACGGCCAGT-3'	Sequence and random mutagenesis in pUC19
P8	5' -AACAGCTATGACCATG-3'	Sequence and random mutagenesis in pUC19

1-3. 結果と考察

1-3-1. (S)-mandelonitrile に対する *BmHNL* の高活性変異体のスクリーニング

まず、エラーブローン PCR の条件検討を実施した。PCR の鋳型 DNA の量を変化させ、変異導入効率を確認したところ、鋳型 DNA を 500 ng 用いた場合は、*BmHNL* の遺伝子配列全体あたり約 1~2 塩基の変異が導入されており、100 ng の場合では 3~4 塩基の変異導入が確認された。今回の検討では 100 ng の鋳型 DNA にて PCR を実施した。

次に pUC19-*BmHNL* WT(野生型)を鋳型とし、変異体ライブラリーをエラーブローン PCR によって構築し、それら 1000 変異体の中から高い HNL 活性を示す変異体をスクリーニングした。しかしながら、高活性な変異体は得られなかった。*BmHNL* の大腸菌内での発現効率が悪いと考え、過去に Asano らが、*MeHNL* における His103 の変異(Leu、Met、Cys など)が可溶性の発現を増加させ、(*S*)-mandelonitrile の触媒効率をわずかに改善した事例を参考に³⁵、*BmHNL* の His103 に変異を導入し、システインへの置換により可溶性の発現を向上させた。しかし、この変異体の HNL 活性は低いままであった(0.9 U/mL 培養液)。そこで、pUC19-*BmHNL* H103C を鋳型としてエラーブローン PCR を行い、6,000 クローンを含む変異体ライブラリーを構築し、それら変異体に対して HNL 分解活性を基に、ハイスループットスクリーニングを行い、より高い HNL 活性を有する 3 つの変異体、Asn156Asp、Ile157Val、および Thr152Ile を取得した。これら 3 つの変異体、*BmHNL* H103C/N156D、H103C/I157V および H103C/T152I からの粗抽出物の HNL 活性は、それぞれ培養液あたり、3.8 U/mL、2.3 U/mL、および 2.4 U/mL を示した。したがって、H103C/N156D 変異体の HNL 活性は最も高く、H103C の約 4 倍活性の高い変異体であった。

1-3-2. *BmHNL* と (*S*)-mandelonitrile の MOE によるドッキングシミュレーション

α/β -hydrolase HNL において、Ser-His-Asp 触媒トライアドが Figure 1-1 の α/β -hydrolase HNL のアラインメントに示すように保存されており、全体的な構造は非常によく類似している。Lys236 は、(*S*)-mandelonitrile のシアン部分の領域との相互作用のための重要な残基であり、*S*-HNL において保存されているアミノ酸残基である。*R*-HNL における同様のアミノ酸残基は Met237 である。最近、Nakano らは、Phe121 および Phe178 などの *BmHNL* の活性部位の近くにあるいくつかの疎水性残基が、芳香族化合物に対する広範な基質特異性に寄与することを報告した³⁶。*MeHNL* および *HbHNL* において、これらの残基は Leu である (Figure 1-2)。またドッキングシミュレーションの結果から、*BmHNL* 特異的なアミノ酸残基である Thr152 および Ile157 が活性部位の近くに位置することを実証した。これらはそれぞれベンゼン環、および (*S*)-mandelonitrile のニトリル基と相互作用する可能性がある。また Asn156 を含む α -ヘリックスの一部もしくはその周辺に位置するアミノ酸であった。

スクリーニングにおいて、H103C/T152I および H103C/I157V 変異体が H103C よりも高い活性を示すことを見出し (Table 1-3)、したがって、活性部位付近の疎水性残基の両方の変異が *BmHNL* 活性を増加させるのに有効であることを示唆している。次に、Asn156 と (*S*)-mandelonitrile の関係を、*BmHNL* とのドッキングシ

ミュレーションをMOEプログラムで実行することによって解析した。(S)-mandelonitrileとBmHNLの複合体の予測構造は、Asn156が(S)-mandelonitrile(>8.0Å)の5Å以内に位置していないため、Asn156が(S)-mandelonitrileと直接相互作用できないことを示唆した(Figure 1-2)。H103C/N156DのHNL活性は他の変異体(H103C、H103C/I157VおよびH103C/T152V)よりも高く、通常は基質に直接作用するアミノ酸残基の変異が、酵素活性に与える影響は大きいと推測されるが、Asn156は(S)-mandelonitrileと直接相互作用することはできない。そこでAsn156変異をさらに詳細に調査し、この変異がどのように酵素活性を向上させるか引きつづき検討を進めた。

MeHNL (CAA82334)	1	-MVTAFHFLIHTICHGAWIWHKLPALERAGHKVTDLMAASGIDPRQIEQINSFDEYSE	59
HbHNL (AAC49184)	1	-MAFAHFVLIHTICHGAWIWHKLPLEALGHKVTALDLAASGVDPRIEEIGSFDEYSE	59
BmHNL (BAI50630)	1	-MVAHFVLIHTICHGAWLWYKLIPLLSAGHNATAIDLVASGIDPRQLEQIGTWEQYSE	59
AtHNL (AAN13041)	1	MERKHHFVLVHNAYHGAWIWHKLPLESAGHRVTAVELAASGIDPRPIQAVETVDEYSK	60
		*	
MeHNL (CAA82334)	60	PLLTFFLEKLPQGEKVIIVGESCAGLNIAIAADRYVDKTAAGVFFHNSLLPDTVHSPSYTVE	119
HbHNL (AAC49184)	60	PLLTFFLEALPPGEKVIIVGESCGLNIAIAADKYCEKIAAAVFFHNSVLPDTEHCPSYVVD	119
BmHNL (BAI50630)	60	PLFTLIESIPEGKKVILVGESGGGINIAIAAEKYPEKVSALVFFHNSLMPDIDHSPAFVYK	119
AtHNL (AAN13041)	61	PLIETLKSIPENEEVILVGESFSGGINIAIAADIFPAKIKVLFVFNALPDTTHVPSHVLD	120
MeHNL (CAA82334)	120	KLLESFPDWRDTEYFFTNITGETITTMKLGFLVLLRENLFCTDGEYELAKMVMRKGSL	179
HbHNL (AAC49184)	120	KLMEVFPDWKDTTYFTYTK-DGKEITGLKLGFTLLRENLYTLCGPPEYELAKMLTRKGL	178
BmHNL (BAI50630)	120	KFSEVFTDWKDSIFSNTY-TGNDTAVELGDRTLAENIFSNSPIEDVELAKHLVRKGSF	178
AtHNL (AAN13041)	121	KYMEMPGLGDCFEFSHET-RNGTMSLLKMGPKFMKARLYQNCPIEDYELAKMLHRQGSF	179
MeHNL (CAA82334)	180	FQNVLAQRPKFTEKEGYGSIKKVIITWTDQDKIFLPDFQRWQIANYPDKVYQVGGDHRLQ	239
HbHNL (AAC49184)	179	FQNILAKRPFTEKEGYGSIKKIYVWTDQDEIFLPEFQLWQIENYKPKDKVYKVEGGDHRLQ	238
BmHNL (BAI50630)	179	FEQDLDTLNFNFTSEGYGSIRRVYVYGEEDQIFSRDFQLWQINNYKPKDKVYCVPSADHRLQ	238
AtHNL (AAN13041)	180	FTEDLSKKEKFSEEGYGSVQRVYVMSSEDKAIPCDFIRWMIENFNVSKVYEIDGGDHVVM	239
MeHNL (CAA82334)	240	LTKTEEVAHILQEVADAYA-----	258
HbHNL (AAC49184)	239	LTKTKEIAEILQEVADTYN-----	257
BmHNL (BAI50630)	239	ISKVNELAQILQEVANSASDLLAVA	263
AtHNL (AAN13041)	240	LSKPQKLFDSLAIATDYM-----	258

Figure 1-1. α/β -hydrolase HNLのアミノ酸配列のアラインメント
 α/β -hydrolase HNLに属する *Manihot esculenta* (MeHNL)²⁶, *Hevea brasiliensis* (HbHNL)²⁵, *Baliospermum montanum* (BmHNL)³¹ and *Arabidopsis thaliana* (AtHNL)¹⁹ のアミノ酸配列を比較している。BmHNLのアミノ酸配列に対してHbHNLは56%、MeHNLは55%、AtHNLは46%の類似性を示す。図中、触媒トライアドをアスタリスクで、Lys236を緑枠で示した。

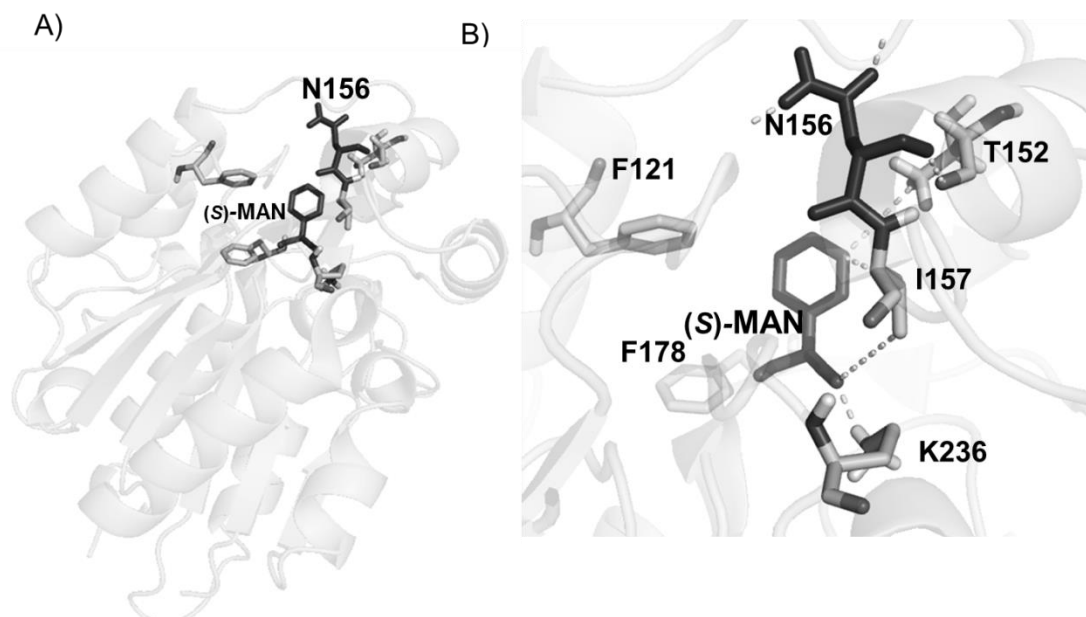


Figure 1-2. ドッキングシミュレーションによる*BmHNL*と(*S*)-mandelonitrile複合体の予測構造

A) (*S*)-mandelonitrile結合部位および*BmHNL*におけるAsn156の位置。B) (*S*)-mandelonitrileの結合ポケット。示された残基は、*BmHNL*中の活性部位残基である。この図は、ドッキングモデルにおける Thr152、Asn156、および Ile157 の関係を示し、Phe121およびPhe178は、*BmHNL*における特異なアミノ酸残基であり、芳香族化合物に対する広範な活性に寄与する。

Table 1-2. *S*-HNLの基質入口および活性部位に位置するアミノ酸残基

Residue	80*	81	<u>121</u>	<u>128</u>	<u>133</u>	<u>146</u>	152	157	<u>178</u>	207*	235*	236
<i>BmHNL</i>	S	G	F	W	F	<u>V</u>	T	I	<u>F</u>	D	H	K
<i>MeHNL</i>	S	C	L	W	Y	<u>M</u>	L	L	<u>L</u>	D	H	K
<i>HbHNL</i>	S	C	L	W	Y	<u>L</u>	L	L	<u>L</u>	D	H	K

アンダーラインは基質入口に位置する残基。Gly81, Phe121, Phe133, Thr152, Ile157, Phe178は*BmHNL*に特有のアミノ酸。アスタリスクは触媒トライアドを示す。

Table 1-3. *BmHNL* H103Cのランダム変異導入によるライブラリーから得られた高活性変異体の結果

Mutant	U/mL (culture)
<i>BmHNL</i> H103C (control)	0.9
+N156S/F121L	7.4
+N156S/I9V/I43V	4.5
+N156D	3.8
+T152I	2.4
+I157V	2.3
+K119R/A256V	2.1
+H132T	1.8
+I43V	1.8
+S257C	1.1

1-3-3. *BmHNL* H103CにおけるAsn156の飽和変異導入による解析

BmHNL H103CのAsn156を部位特異的変異導入法により19アミノ酸に置換し、全ての変異体のHNL活性を測定した。今回Asn156の飽和変異導入における変異体の比較においては、無細胞抽出液での比較であり、培養液当たりの活性(U/mL)で比較している。各変異体の精製酵素による比較はできていない。無細胞抽出液の全タンパク質量あたりの活性(U/mg)でも比較し、同様の傾向を確認している。しかし、培養液当たりの結果と比較して、誤差の大きな結果となったこと、また実際の物質生産に用いる際に重要なデータとして、培養液当たりの活性による比較データを示した。H103C/N156PおよびH103C/N156Hを除くすべての変異体は、H103Cよりも高いHNL活性を示し、H103C/N156Gが最も高い活性を示した(Figure 1-3)。H103C/N156Pでは、タンパク質が不溶化し、活性がほとんど消失する結果となったが、その他の変異体における発現量は大きく変化していなかった。H103C/N156Hでは、H103C変異体と同様の活性を保持した。この結果からAsn156の置換は、*BmHNL*の活性を増加させるために有効であることが示された。

さらに3つの*BmHNL*変異体(H103C、H103C/N156D、およびH103C/N156G)の無細胞抽出液を用いて、50 mM benzaldehydeおよび100 mM KCNを含む300 mM クエン酸緩衝液(pH 4.2)中に無細胞抽出液のタンパク質0.2 mgを添加した0.5 mL中の反応により(*S*)-mandelonitrileの生成に対するAsn156変異の影響を検討した。H103C/N156DおよびH103C/N156Gによる(*S*)-mandelonitrileの生成は、それぞれ70%および80%の変換率に増加した(H103C 54%)。(*S*)-mandelonitrileの鏡像体過剰率も顕著に高く、32%(H103C)と比較して60%(H103C/N156D)および80%(H103C/N156G)であった(Figure 1-4)。これらの結果は、Asn156の変異が(*S*-

mandelonitrile生成における変換収率および鏡像体過剰の改善に寄与する可能性を示している。

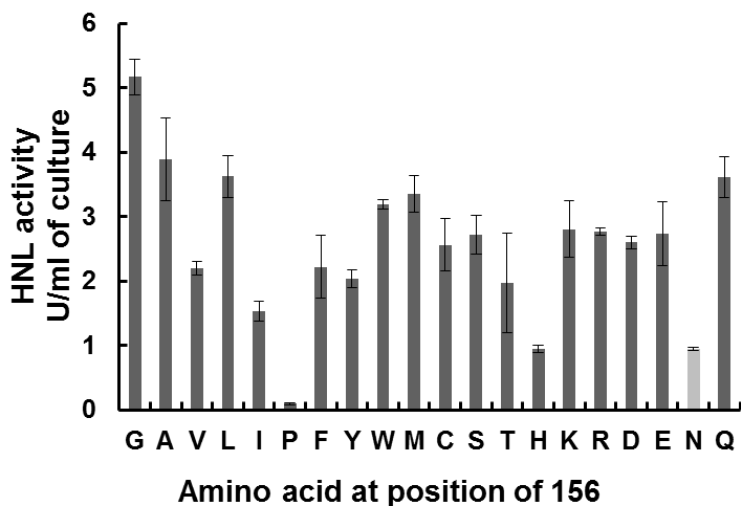


Figure 1-3. Asn 156飽和変異体の無細胞抽出液におけるHNL活性

H103C変異体においてAsn156に変異導入を加えたプラスミドを有する細胞をそれぞれ5 mLのLB培地中で前培養し、これらの変異体をIPTG添加後37°Cで12時間本培養した。HNL活性は、50 μ Lの無細胞抽出液を含む、mandelonitrile合成反応中で5分間反応させ、比較した。mandelonitrileは、254 nm(n=3)でHPLCにより測定した。

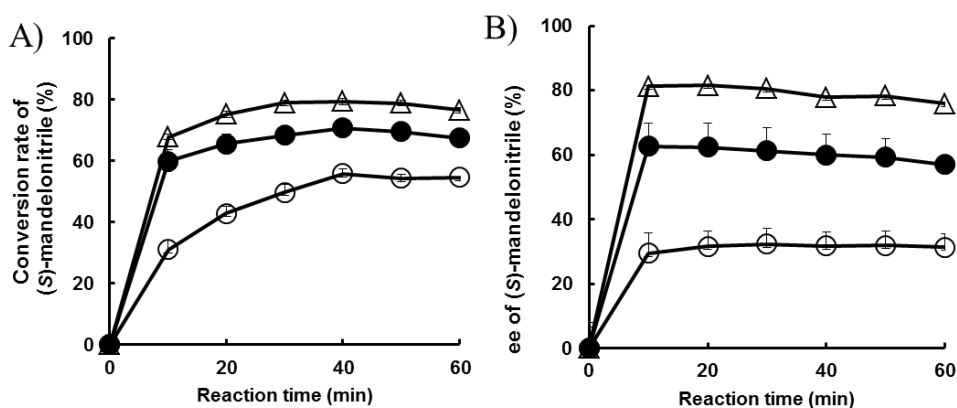


Figure 1-4. *Bm*HNL変異体の無細胞抽出液における(S)-mandelonitrileの生成
*Bm*HNLH103C、H103C/N156DおよびH103C/N156Gの無細胞抽出液(0.2 mg)を標準的なmandelonitrile合成反応にて使用した。A)各時間における(S)-mandelonitrile生成。B)各時間における生成物の鏡像体過剰率(ee)。

○, *Bm*HNLH103C; ●, *Bm*HNLH103C/N156D; △, *Bm*HNLH103C/N156G.

1-3-4. *BmHNL* 変異体の立体選択性

Asn156 の変異導入が(*S*)-mandelonitrile に対してより高い立体選択性を向上させることを証明するために、benzaldehyde および KCN からの mandelonitrile の合成反応を、3 つの精製した変異体酵素(*BmHNLH103C*, *BmHNLH103C/N156D*, *BmHNLH103C/N156G*)を用いて、反応に用いる酵素量を 0.65 U に統一して反応生成物を比較した。全 mandelonitrile 生産(*(R)*-mandelonitrile+*(S)*-mandelonitrile の生産量)の反応速度は、反応に用いた酵素活性量が同じであるため、各変異体について同じであった。しかし、(*S*)-mandelonitrile の鏡像体過剰率は、H103C 変異体で 54% であるのに対し、H103C/N156G 変異体で 76%、H103C/N156D 変異体で 63% であり、大きく向上することが分かった (Figure 1-5)。したがって、Asn156 におけるグリシンまたはアスパラギン酸への変異は、(*S*)-mandelonitrile の生成における鏡像体過剰率を増加させることに寄与することが明らかとなった。次に、(*S*)-mandelonitrile の生成に及ぼす酵素量の影響を検討した。H103C/N156G によって生成される(*S*)-mandelonitrile の鏡像体過剰率(ee)は、野生型酵素によって同じ条件下で生成される ee の 55% と比較して、酵素量が増加すると最大 93% に増加した(Figure 1-6)。これらの結果は、(*S*)-mandelonitrile に対する *BmHNL* の立体選択性が Asn156 変異によって顕著に改善されたことを示している。

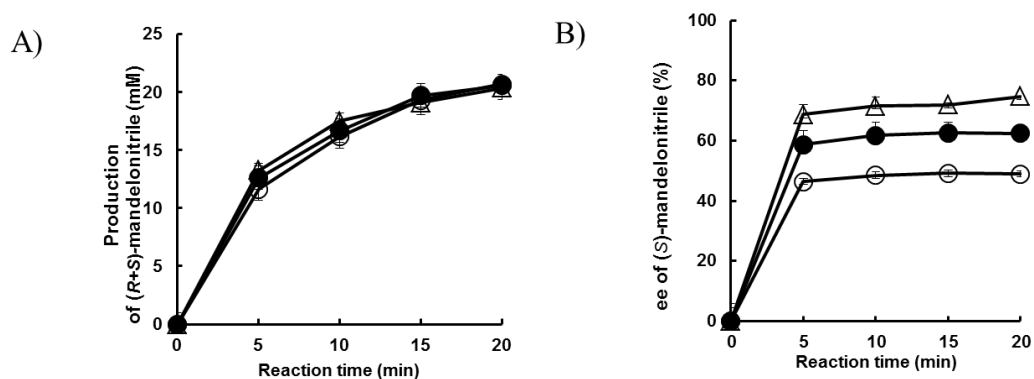


Figure 1-5. *BmHNL* 変異体の精製酵素による(*S*)-mandelonitrile に対する鏡像体過剰率

Mandelonitrile 生成は 0.65 U の酵素で行い、その量を HPLC により測定した。

A) (*R+S*)-mandelonitrile 生成量。B) 各反応における(*S*)-mandelonitrile の鏡像体過剰率

○, *BmHNLH103C*; ●, *BmHNLH103C/N156D*; △, *BmHNLH103C/N156G*.

1-3-5. (R)または(S)-mandelonitrile 分解反応における BmHNL 変異体の反応速度論的解析

BmHNL Asn156 変異体による(S)-mandelonitrile に対する鏡像体過剰率の向上に関してさらに詳細な解析を行うため、(R)-および(S)-mandelonitrile についてそれぞれの分解活性を基に反応速度論解析を行った(Table1-4)。精製酵素 H103C/N156D および H103C/N156G 変異体の(S)-mandelonitrile 合成反応の比活性は、それぞれ 117 U/mg および 154 U/mg であった(H103C 変異体酵素の 22.8 U/mg よりも 5~7 倍高い)。

まず H103C 変異体は、(R)-mandelonitrile および(S)-mandelonitrile の両方に対して酵素活性を示し、(S)-mandelonitrile の k_{cat} は 52.9 s^{-1} 、(R)-mandelonitrile の 7.98 s^{-1} の 6.6 倍高かったが、 K_m 値は類似していた(それぞれ 0.34 mM および 0.28 mM)。H103C/N156D 変異体の場合、(R)-mandelonitrile に対する K_m は 0.61 mM、(S)-mandelonitrile の 0.47 mM よりもわずかに高く、(R)-mandelonitrile の H103C 変異体よりも 2.2 倍高い値を示した。(S)-mandelonitrile の k_{cat} は 88.1 s^{-1} 、(R)-mandelonitrile の 9.27 s^{-1} の 9.5 倍高かった。したがって、(S)-mandelonitrile の H103C/N156D 変異体の k_{cat} 値は H103C 変異体の 1.7 倍であったのに対し、(R)-mandelonitrile の k_{cat} は H103C 変異体の k_{cat} と類似していた。H103C/N156G 変異体では、(R)-mandelonitrile(1.49 mM)の K_m 値は H103C 変異体(0.28 mM)の 5.3 倍であったのに対し、(S)-mandelonitrile の K_m 値はわずかに高かった(それぞれ 0.49 および 0.34 mM)。(S)-mandelonitrile)の k_{cat} 値は 122 s^{-1} 、(R)-mandelonitrile の 12.7 s^{-1} の 9.6 倍高かった。したがって、(S)-mandelonitrile の K_m は H103C および H103C/N156D 変異体と類似していたが、(S)-mandelonitrile の k_{cat} は H103C 変異体の 2.3 倍高かった。全体として、(S)-mandelonitrile の触媒効率は、H103C 変異体の $157 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ から H103C/N156G 変異体では $251 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ に増加したのに対し、(R)-mandelonitrile の触媒効率は、H103C 変異体の $29.7 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ から $8.8 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ に減少した。H103C/N156G 変異体に(S)-mandelonitrile の E 値は 28.5 であり、H103C 変異体(5.38)の 5.3 倍であった。

まとめると、3つの変異体の反応速度論的解析の結果は、Asn156 変異が立体選択的認識(mandelonitrile の場合)に寄与することを示した。(S)-mandelonitrile に対する H103C/N156G 変異体で向上した鏡像異性過剰率は、(S)-mandelonitrile の触媒効率の増加による結果であり、(R)-mandelonitrile の生成効率を低下させた。(R)-mandelonitrile の K_m と(S)-mandelonitrile の k_{cat} 値の増加が、(S)-mandelonitrile 生成効率および鏡像体過剰率の向上に寄与していることがわかった。

1-3-6. Asn156 アミノ酸置換における立体選択性及び活性向上メカニズムの考察

Reetz らは、酵素の立体選択性を改善するためドッキングシミュレーションを用いて、基質と相互作用するアミノ酸残基を特定し、反復飽和変異導入法を確立し、PAL の *S* 立体選択性(緑膿菌由来の α/β -加水分解酵素リパーゼ)の、*S* 基質の k_{cat} 値を増加させ、活性部位付近の 3 残基への変異によって *S* 基質の K_m 値を低下させることによって改善したことを報告している³⁷。この章では、(*S*)-mandelonitrile の k_{cat} 値を増加させることを見出した。しかし、(*S*)-mandelonitrile に対する立体選択性は、(*S*)-mandelonitrile に対する触媒効率の増加と(*R*)-mandelonitrile に対する触媒効率の低下の両方によって改善されている。同タイプの構造(α/β -hydrolase)を持つ酵素であるが、基質に直接相互作用する残基に絞った変異導入による改善で、 K_m 値を低下させ、基質との相互作用を向上させるパターンは非常に理解しやすいが、今回の HNL における Asn156 の変異導入による効果とは大きく異なる報告と考えられる。

一方 Liebeton らは、 α -ヘリックスの表面に位置する Ser149、Ser164、および Val55 のグリシンへの置換によって PAL の立体選択性が改善されたと報告している。これらの変異が水素結合の喪失および柔軟性の増加によって α -ヘリックスの二次構造を変化させることによって活性残基の配向に影響を与える可能性があることに言及している³⁸。上述のように、*Bm*HNL の Asn156 は、(*S*)-mandelonitrile と直接相互作用することができない。しかし、(*S*)-mandelonitrile の触媒効率と鏡像体過剰率は、*Bm*HNL の表面の α -ヘリックス上にある Asn156 の置換によって増加した。Asn156 は α -ヘリックスの C 末端に存在し、この α -ヘリックス上もしくは周辺には *Bm*HNL 特異的に存在する基質と相互作用するアミノ酸残基(Thr152, Ile157)が存在する。また α -ヘリックスの N 末端側は Gly であり、Asn156 が Gly へ置換されることで、両末端が Gly となることで、柔軟な α -ヘリックスとなり、基質との相互作用を変化させ、立体選択性及び活性の向上に寄与したと推測した。また *Bm*HNL の立体構造から Asn156 の側鎖が周辺のループ構造に存在する Gln208 の主鎖のカルボニル基と Lys129 の側鎖のアミノ基と水素結合を作り、 α -ヘリックス構造を固定していると推測された。今回 Asn156 は His および Pro 以外のアミノ酸残基への置換によって活性が向上することが分かっている。Pro への置換は構造内の水素結合形成ができず α -ヘリックス構造を破壊してしまうことで、タンパク質自体が不安定となり、不溶化したことで活性を消失させたと考えられる。His においてはその側鎖が Asn156 と同様に周囲のループに位置するアミノ酸残基と水素結合形成することで、 α -ヘリックス構造を同様に固定し、活性が向上しなかったと推測した。他のアミノ

酸への置換はすべてこの周囲のループに存在し、Asn156の側鎖と水素結合するアミノ酸残基との相互作用がなくなるもしくは緩和されることで、 α -ヘリックス構造を柔軟にしたと推測した。直接相互作用しないタンパク質表面に位置するアミノ酸残基の変異における酵素活性への影響に関する報告は多くはないが、活性部位に絞った変異導入では解決できない酵素の改良において、ランダム変異導入による酵素全体への変異導入のアプローチは非常に重要と考えられる。今回のAsn156変異のより詳細なメカニズムは、変異体酵素のX線結晶構造解析の取得により可能であると考えられる。

Table 1-4.(*R*)もしくは(*S*)-mandelonitrile に対する *BmHNL* 変異体の反応速度論的解析結果

	K_m (mM)		k_{cat} (s ⁻¹)		k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)		<i>E</i> -value (<i>S</i>)
	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	
H103C	0.34±0.02	0.28±0.03	52.9±2.7	7.98±0.68	157±16.4	29.2±1.1	5.38
H103C/N156D	0.47±0.02	0.61±0.09	88.1±3.4	9.27±1.26	191±18.8	15.4±0.17	12.4
H103C/N156G	0.49±0.03	1.49±0.26	122 ±1.6	12.7±1.78	251±2.7	8.81±0.37	28.5

パラメータは、280 nm における初速度を算出することによって、(*R*)-または(*S*)-mandelonitrile の分解活性に基づいて計算した。 $k_{cat} = (V_{max}) / 60 \times$ サブユニットの分子量 29 kDa)、 E 値= $((k_{cat} / K_m (S)\text{-mandelonitrile}) / (k_{cat} / K_m \text{ of } (R)\text{-mandelonitrile}))$

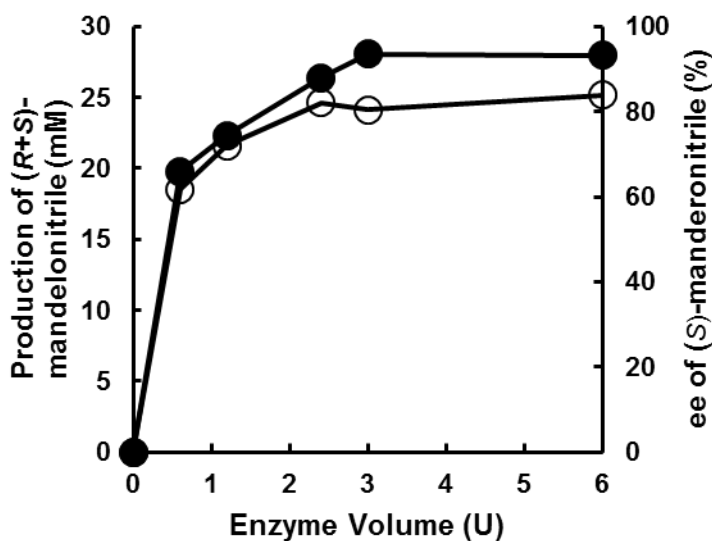


Figure 1-6. *BmHNLH103C/N156G*による(*S*)-mandelonitrile生成における酵素量の影響

Mandelonitrile 生成は、*BmHNLH103C/N156G* の 0.6-6.0 U で 25°C、10 分間の反応により行った。○: total (*R+S*)-mandelonitrile production, ●: enantiomeric excess of (*S*)-mandelonitrile.

第2章

ブタ腎臓由来 D-アミノ酸オキシダーゼを用いた第一級アミンの酸化シアン付加反応による α -アミノニトリルおよび非天然 α -アミノ酸の合成のための新規酵素法の構築

要約

アミンまたはアミノ酸中のアミノ基の酸化は、 sp^3 C α -H 結合を活性化してイミンを形成させ、 α 炭素原子をシアン化物などの求核剤の好ましい標的とする。したがって、イミンを介した α -アミノニトリルの生成のため、オキシダーゼ反応に焦点を当て研究を進めた。様々なオキシダーゼ反応を触媒する酵素からスクリーニングを行い、ブタ腎臓由来 D-アミノ酸オキシダーゼ(pkDAO)およびヘビ(*Crotalus atrox*)由来の L-アミノ酸オキシダーゼが、phenylalanine およびシアン化カリウム(KCN)から、2-アミノ-2-シアノ-3-フェニルプロパン酸の合成を触媒した。変異型 pkDAO(Y228L/R283G)は、(R)- α -メチルベンジルアミンおよび KCN からのラセミ-2-メチル-2-フェニルグリシノニトリルの合成を触媒した。これらの結果に基づいて、変異型 pkDAO とニトリラーゼ AY487533 を用いて、第一級アミンから非天然の α -アミノ酸を合成するための新しいカスケード反応を開発した。これは、 α -アミノニトリルと非天然 α -アミノ酸の酵素合成の初めての報告である。これらの方法は、水系における α -アミノニトリルおよび非天然 α -アミノ酸の合成において興味深い知見であると考えられる。

2-1. 緒言

α -アミノニトリルを介した α -アミノ酸の化学合成は、1850年に Adolph Strecker³⁹によってアルデヒド、アンモニア、およびシアン化物を原料として使用し、アルデヒドからシアン化カリウム(KCN)の存在下でアンモニアと縮合して α -アミノニトリルを形成し、その後加水分解されてアミノ酸を生成する反応として報告されており、ストレッカー反応と呼ばれ、古くからよく知られた反応の一つである。不斉助剤または不斉触媒を利用することで、立体選択的にアミノ酸を合成し、生物活性をもつペプチド、医薬品、または農薬などの前駆体の合成に有用である⁴⁰。最近、アミンからの α -アミノニトリルの新規化学合成が、アミンの光酸化によるシアン化によって報告されている。それらは、neopentylamine から 2-amino-3,3-dimethylbutanenitrile を介して *tert*-leucine 塩酸塩へ効率よく変換できる反応である⁴¹。これらのアミノ酸合成反応において、 α -アミノニトリル合成における sp^3 C α -H 結合の直接の活性化は、シアン化物と新たな C-C 結合を作るための重要な反応として考えられている。

天然および非天然の α -アミノ酸の酵素生産は、酵素が温和な条件下で基質と効率的に反応し、コンパクトな反応器を用いて合成を行うことができるため、広く研究されている。例えば、アミノ酸デヒドロゲナーゼ⁴²による α -ケト酸の不斉還元的アミノ化や、アミノ酸アンモニアリアーゼによる α,β -不飽和カルボン酸へのアンモニアの不斉付加など、アミノ酸代謝酵素を用いた天然および非天然アミノ酸の酵素合成法が開発されている⁴³。また、ニトリラーゼ^{44,45}による α -アミノニトリルから α -アミノ酸への立体選択的変換、およびニトリルヒドラーターゼ、アミノ酸アミドラーセマーゼ、および立体選択的アミノ酸アミド加水分解酵素を用いたアミノニトリルおよびアミノ酸アミドのダイナミックな光学分割法も、 α -アミノ酸の立体選択的生産のための魅力的な方法である^{9,10}。

ニトリルおよびアミノニトリルの合成のための酵素を用いた方法も、ニトリル代謝酵素を用いて報告されている。例えば、芳香族ニトリルは、アルドキシムの脱水を触媒するアルドキシムデヒドラーターゼを用いて合成できる¹⁴。植物または昆虫からのヒドロキシニトリルリアーゼは、ケトンまたはアルデヒドおよび KCN からシアノヒドリンを合成するために利用されている^{5,12}。この反応は、一部の酵素以外の化学触媒ではできない不斉 C-C 結合形成反応であるため、酵素の研究の中で行われている最も重要な反応の一つである。近年、オキシダーゼ反応を用いたアミンの酸化反応を介した、アミノニトリルの酵素合成も報告されている。*Aspergillus niger* 由来の変異型モノアミンオキシダーゼを利用して、KCN とのインキュベーションによりピロリジン化合物から対応するアミノニトリルを合成した事例である⁴⁶。ピロリジンはまずアミンから酸化反応で、第二級のイミンに変換され、得られたイミンはシアンの付加により、さら

に第二級の α -アミノニトリルに変換される。この酵素法は、第二級の α -アミノニトリルのみを合成するために利用でき、第一級のアミノニトリルの合成はできていない。第一級アミンから酸化反応によって生成する一級イミンは一般的に水中では速やかに加水分解され、ケトンやアルデヒドに変換される。そのためこれまでに酵素反応にて第一級アミンから α -アミノニトリル合成を行った報告はない。

最近、Asano らは、X線結晶構造に基づく部位特異的変異導入法により、ブタ腎臓由来のD-アミノ酸オキシダーゼ(pkDAO)からアミノオキシダーゼ活性を示す新たなR-立体選択的アミノオキシダーゼの創製に成功した(Figure 2-1)。彼らは、変異酵素 pkDAO(Y228L/R283G)が、(R)- α -Methylbenzylamine ((R)-MBA)、(R)-4-fluoro- α -methylbenzylamine ((R)-FMBA)、および(R)- α -ethylbenzylamine ((R)-EBA)などの特定の第一級アミンを酸化できることを報告している。さらにラセミ体 MBA から、変異型 pkDAO による酸化反応と NaCNBH₄¹⁵などの還元剤を組み合わせることで、デラセミ化反応による(S)-MBA の光学分割に成功している。第2章では、野生型 pkDAO および変異型 pkDAO(Y228L/R283G)が、それぞれのアミノ酸および第一級アミンから α -アミノニトリルを合成できることを発見し、変異型 pkDAO を用いて第一級アミンから α -アミノニトリルを合成するための最適条件を検討した。さらに、変異型 pkDAO とニトリラーゼ AY487533 を用いて、第一級アミンから非天然 α -アミノ酸を合成するためのカスケード反応を構築した。本研究は、これまで報告のない第一級アミンからの酵素による α -アミノニトリル合成手法に関する初めての研究である。

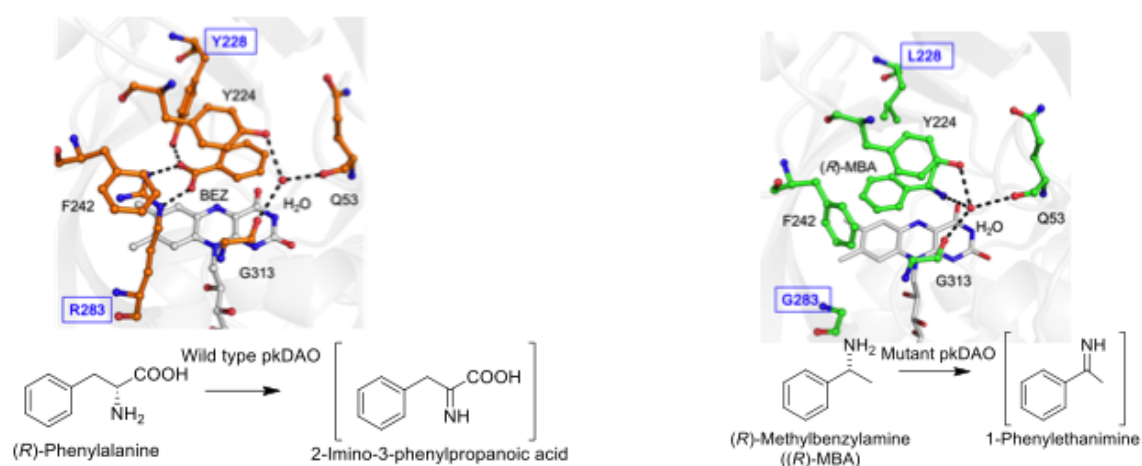


Figure 2-1.野生型 pkDAO と変異型 pkDAO の活性中心及び反応スキーム
野生型 pkDAO(左側)は、(R)-phenylalanine の酸化を触媒するアミノ酸オキシダーゼである⁴⁷。Y228L と R283G の2点変異により構築された変異型 pkDAO(右

側)は、(R)-MBA の酸化を触媒するアミノキシダーゼ活性を有する¹⁵。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 化学物質と試薬の調製

(R)- α -Methylbenzylamine ((R)-MBA)は、Acros Organics (Geel, Belgium)から入手した。D-および L-phenylalanine (Phe)、ラセミ-2-phenylglycine (2PG)、ラセミ-2-phenylglycinonitrile (2PGN)、(R)-4-fluoro- α -methylbenzylamine ((R)-FMBA)、(R)- α -ethylbenzylamine ((R)-EBA)、およびラセミ-2-amino-2-phenylbutyric acid (2EtPG)を Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)から購入した。(S)-2-Methyl-2-phenylglycine は、鏡像体過剰率の分析のために ASTATECH (Bristol, PA, USA)から入手した。ラセミ-2-MePG、ラセミ-2-methyl-2-phenylglycinonitrile (2MePGN)、およびラセミ-4-fluoro-2-methyl-2-phenylglycine (F-2MePG)を、それぞれ Strecker 反応、Bucherer-Bergs 反応、およびヒダントインの加水分解の方法に従って化学合成した⁴⁸⁻⁵¹。*Crotalus atrox* (CaLAO)由来の L-アミノ酸オキシダーゼおよびブタ腎臓由来の D-アミノ酸オキシダーゼは、Sigma-Aldrich から入手した。ライゲーションミックス、ポリメラーゼ、および制限酵素は、変異型 pkDAO およびニトリラーゼ AY487533 の遺伝子クローニングのために Takara Bio Inc (Otsu, Siga, Japan)から入手した。

2-2-2. 発現系の構築

pkDAO および変異型 pkDAO の発現ベクターは、Yasukawa らの報告と同様に構築した¹⁵。Chaplin らによって報告されたニトリラーゼ AY487533 遺伝子 (AY487533.1) は、Thermo Fisher Scientific (Bunkyo, Tokyo, Japan)で遺伝子合成した^{52,53}。合成した遺伝子を *NcoI* および *XhoI* で消化し、この断片を同じ制限酵素で消化した pET15b ベクターに連結した。構築したベクターを用いて、大腸菌 BL21(DE3)を形質転換した。形質転換体を用いて、ニトリラーゼ AY487533 遺伝子を発現させた。

2-2-3. 変異型pkDAOとニトリラーゼAY487533の調製および酵素精製

変異型pkDAO

pUC-18変異型pkDAO (Y228L/R283G)を保有する大腸菌細胞(JM109)を、80 μ g/mlのアンピシリンを含む5 mlのLB培地中で37°C、12時間前培養した。次に、増殖した細胞(5 ml)を、80 μ g/mlのアンピシリンおよび1 mM IPTGを含む

500 mlのLB培地に植菌し、37°C、24時間本培養して変異型pkDAO遺伝子を発現させた。細胞を遠心分離(5,000 ×g、15分間)により回収し、10 mMリン酸カリウム緩衝液(KPB) pH 8.0で洗浄、懸濁した。菌体(湿重量12 g)を超音波処理により破碎した後、菌体破碎物を遠心分離(20,000 ×g、30分、4°C)により除き、上清を酵素液とした。この上清に20~35%飽和硫酸アンモニウムによって形成された沈殿物を、0.1% 2-mercaptoethanol (2ME)を含む10 mM KPB、pH 8.0に溶解し、透析した。次いで、透析した酵素溶液を、0.1% 2MEを含む10 mM KPB pH 8.0で平衡化したDEAE-Toyopearlカラム(10 cm×直径2.8 cm)に供し、NaClの直線勾配(0~0.15 M、それぞれ150 mL)によって溶出した。活性画分を回収し、硫酸アンモニウムを20%飽和まで添加し、その溶液を、硫酸アンモニウム(20%飽和)を含む10 mM KPB pH 8.0で平衡化したButyl-Toyopearl 650Mカラム(3.5 cm×2.8 cm)に供した。吸着した酵素を、10 mM KPB、pH 8.0の硫酸アンモニウムの直線勾配(20~0%飽和、それぞれ100 mL)によって溶出した。活性画分を回収し、0.1%の2MEを含む10 mM KPB、pH 8.0を用いて透析した。

ニトリラーゼ AY487533

pET15b-ニトリラーゼ AY487533 を保有する大腸菌 BL21(DE3)細胞を、80 µg/ml アンピシリンを含む 5 ml LB 培地中で 37°C で 12 時間で前培養した。次に、増殖した細胞(5 ml)を 80 µg/ml アンピシリンを含む 500 ml の LB 培地に植菌し、37°C、12 時間培養した後、0.5 mM IPTG を加え、さらに 30°C で 12 時間インキュベートし、ニトリラーゼ AY487533 遺伝子を発現させた。細胞(湿重量 23 g)を遠心分離(5,000 ×g、15 分間)により回収し、20 mM KPB pH 8.0 で洗浄した。その後、超音波処理により菌体を破碎し、遠心分離(20,000 ×g、30 分、4°C)により菌体破碎物を除去し、上清を回収した。その上清を、0.1% 2ME を含む 10 mM KPB、pH 8.0 で平衡化した DEAE-Toyopearl カラム(10 cm×直径 2.8 cm)に供し、吸着した酵素を NaCl の直線勾配(0-0.5 M、それぞれ 150 ml)により溶出した。活性画分を回収し、0.1% の 2ME を含む 10 mM KPB、pH 8.0 に対して透析した。透析した酵素液を限外ろ過により約 100 U/ml まで濃縮し、実験に用いた。

2-2-4. アミノキシダーゼおよびニトリラーゼの活性測定

オキシダーゼ活性は、30°C で下記の反応液中の過酸化水素生成速度を測定することによって算出した。反応液は、20 mM (R)-MBA、1.5 mM 4-aminoantipyrine、2 mM phenol、2 U の西洋ワサビペルオキシダーゼ、100 mM KPB pH 8.0、および適量の酵素から構成され、最終容量は 1.0 ml で調整した。

酵素活性のアッセイは酵素溶液の添加によって開始され、過酸化水素の形成は 505 nm の吸光度を測定することによって 30°C で 5 分間、分光光度計にて測定した。オキシダーゼ活性の 1U は、1 分間に 1 μmol の過酸化水素の生成を触媒する酵素の量として定義した。13.6 x 10³ M⁻¹ cm⁻¹ のモル吸収係数を用いて酵素活性を算出している。

ニトリラーゼ活性は、2PGN から生成される 2PG の量を測定することによって測定した。基質として 20 mM 2PGN を含む反応溶液を 100 mM KPB pH 8.0、30°C で 3 分間インキュベートし、その後酵素溶液を加えて反応を開始した(反応液全量 0.5 ml)。反応混合物を 30°C で 5 分間インキュベートし、その後、0.1 ml の 2M HClO₄ を加えて反応を停止した。得られた沈殿物を遠心分離により除去し、上清中の 2PG の量を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分析した。ニトリラーゼ活性の 1 U は、1 分間に 2PGN から 1 μmol の 2PG の形成を触媒する酵素の量として定義した。

2-2-5. α -アミノ酸もしくは第一級アミンからの α -アミノニトリル合成可能な酵素反応の探索

酵素による α -アミノニトリルの生成反応は、最終容量1.0 mlの反応液でpH 6 ~10、アミノ酸オキシダーゼまたはアミノオキシダーゼの存在下で、10~200 mM KCNを有する10 mM α -アミノ酸または第一級-アミンを基質として用いて検討した。反応は30°Cで1時間行い、0.2 mlの2 M HClO₄を加えて停止した。得られた沈殿物を遠心分離により除去し、上清中の反応生成物をTLC及びHPLCにより分析した。TLCまたはHPLCによって新しいスポットまたは新しいピークが検出されると、その生成物をMSによって分析した。スクリーニングには、*Bacillus sphaericus*由来L-phenylalanine dehydrogenase⁵⁴, *Bacillus sphaericus*由来 L-leucine dehydrogenase⁵⁵, *Crotalus atrox*由来L-amino acid oxidase (CaLAO), pig kidney由来D -amino acid oxidase (pkDAO), pkDAO Y228L/R283G (変異型 pkDAO)¹⁵を用いた。TLC分析は、ヘキサン/酢酸エチル(1:1)またはブタノール/酢酸エチル/水(3:1:1)の溶媒を用いて行った。アミノ基を含有する化合物をTLCプレート上でニンヒドリン法により分析した。

2-2-6. アミノニトリルを同定するための Phe および(R)-MBA からの反応生成物の調製

D-または L-Phe(それぞれ 5 mM)を基質とし、2 U の pkDAO または CaLAO を用いて、150 mM KCN 存在下で HCl で pH 9.0 に調整した反応溶液(1 mL)を 20°C

で1時間インキュベートした。2 M HClO₄(0.1 mL)により反応を停止し、遠心分離により沈殿物を除去した。上清をMSによる生成物の分析に用いた。(R)-MBA(5 mM)を150 mM KCN存在下でHClでpH 9.0に調整した反応溶液(1 mL)に2 U変異型pkDAOを添加し、20°Cで1時間インキュベートした。反応生成物を500 μLのヘキサンで抽出し、ガスクロマトグラフィー質量分析(GC-MS)によって同定した。

2-2-7. HPLCによる反応生成物の分析

L-Phe、D-Pheおよび(R)-MBAからのα-アミノニトリル反応生成物を、60 mM HClO₄および20%アセトニトリル(80:20)を含む溶液を用いて、25°CでCrownpak CR-I (+)カラム(Daicel Co., Tokyo, Japan)を用いてHPLC (Waters, Tokyo, Japan)によって0.4 ml/minで分析した。生成物量を、UV検出器を用いて200 nmで測定した。

(R)-MBAからの反応生成物2MePGおよび2MePGNも、60 mM HClO₄および10% MeOHを含む溶液を用いて、30°CでCrownpak CR (+)カラム(Daicel Co., Tokyo, Japan)によって0.8 ml/minの流速で分析した。

2-2-8. Pheおよび(R)-MBAからの2-Amino-2-cyano-3-phenylpropanoic acidおよび非天然アミノ酸の同定

2-Amino-2-cyano-3-phenylpropanoic acidおよび非天然α-アミノ酸(2MePG、F2MePG、2EtPG)を、PositiveモードのESIイオン化法にてBruker-Daltonics装置(Bruker-Daltonics, Bremen, Germany)を用いて同定した。データ解析は、Bruker-Daltonics microTOF Data Analysis version 3.4のGenerate Molecular Formulaソフトウェアを使用して実施した。試料を0.1%ギ酸水溶液で希釈し、MSによるpositive modeでの分析を行った。

2-2-9. GC-MS解析による2MePGNの同定

(R)-MBAから2MePGNを0.5 mLヘキサンで1 ml反応混合物から抽出し、スプリットレスモードでHP-5msカラム(30 m × φ 0.25 mm; 0.25 μm, Agilent J&W)を用いてGCで分離した。この分析では、ヘリウムを1.00 ml/minの流量でキャリアガスとして使用している。各化合物のMSを分析し、MSデータベース(Wiley 9th/NIST 2011 MS Library; Hewlett Packard Co)⁵⁶を用いて解析を実施した。

2-2-10. 第一級アミンからの非天然 α -アミノ酸の生成

非天然 α -アミノ酸(2MePG、F2MePGおよび2EtPG)は、120~240 UのpkDAO、600~1200U(基質として2-PGNを用いた時の活性)ニトリラーゼAY487533、5 mMの各第一級アミンおよび150 mM KCNを含む最適条件下で合成した。(HClによってpH 9.0に調整。30 ml中30°Cで4時間反応)反応液に6 mlの2M HClを添加し反応を停止し、遠心分離して不溶性物質を除去した。上清をWakoのDowexTM (50Wx8 50-100 Mesh (H) Cation Exchange Resin)カラムに供し、10%アンモニウム溶液で溶出した。溶出液をエバポレーターにて蒸発させ、得られた粉体を核磁気共鳴(NMR)やESI-MSで分析した。NMRスペクトルは(¹H NMRおよび¹³C NMR)、Bruker Biospin AVANCE II 400 system (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany)を用いて測定した。

2-3. 結果と考察

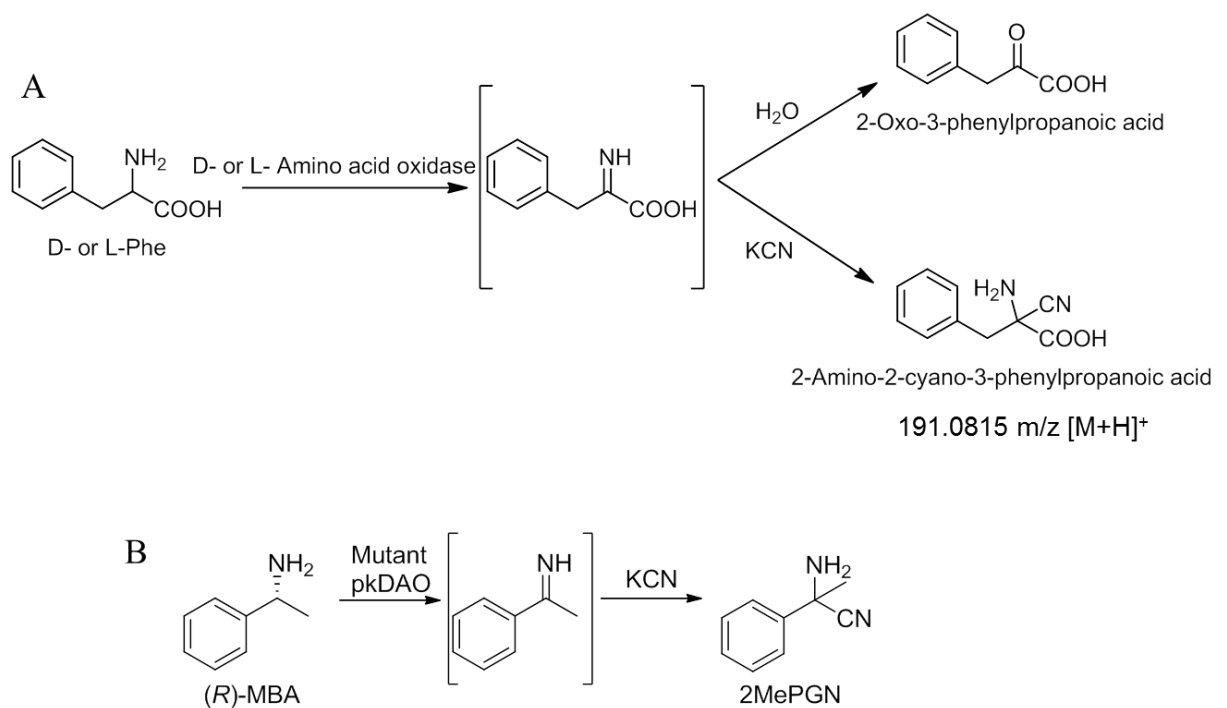
2-3-1. α -アミノニトリル生成を行う酵素反応の探索

イミンおよびイミノ酸は、オキシダーゼまたはデヒドロゲナーゼとの酵素反応によってアミンまたはアミノ酸から酸化され、生成される^{57,58}。合成されたイミンは、水溶液中で加水分解によって対応するケトンやケト酸に非酵素的に変換される。そこで水中で行われる酵素反応系にシアニオンが存在することでイミンが α -アミノニトリルに変換されると考えた。そこで、様々なオキシダーゼやデヒドロゲナーゼによる反応でイミン生成を行い、その反応液中にシアニ化物を添加することで α -アミノニトリルの生成が行えるか、様々な酵素を用いスクリーニングを行った。まず NADH 依存性アミノ酸デヒドロゲナーゼが対応するアミノ酸からシアニ存在下で、アミノニトリルを生成しないことを確認した。シアニ化物が反応液中の NAD⁺と反応することによってデヒドロゲナーゼ活性を阻害するという報告もあり、今回の検討でも同様の反応が進行してしまったと推測した⁵⁹。次に、KCN を含む緩衝液中で、 α -アミノ酸または第一級アミンを基質とし、アミノ酸オキシダーゼまたはアミノオキシダーゼにて反応を行った。その反応生成物に対して TLC、HPLC、および MS によって α -アミノニトリルの形成を確認した。

アミノ酸オキシダーゼ(D-アミノ酸オキシダーゼである pkDAO および L-アミノ酸オキシダーゼである CaLAO)による反応では、D-または L-phenylalanine を基質として、150 mM KCN を含む緩衝溶液中で 2 U の酵素を用い反応を行った。生成物は TLC 上のニンヒドリン反応(アミノ基を有する化合物を染色)によって検出し、オキシダーゼ反応では検出されない KCN の添加によって検出さ

れる新規生成物を確認できた。さらに新規生成物は、Crownpak CR-I (+)カラムを使用した HPLC 分析においても、保持時間 2.99 分付近にピークとして検出された(Figure 2-2A)。そのピークを分取し ESI-MS にて分析したところ、分子イオンピークは 191.0787 m/z [M+H⁺]であり(Figure 2-2B)、新規生成物が 2-Amino-2-cyano-3-phenylpropanoic acid であることを示唆した。この検討から、pkDAO および CaLAO がそれぞれ KCN 存在下で D-もしくは L-phenylalanine からの α -アミノニトリルの合成を触媒することを確認した(Scheme 2-1 A)。これは、アミノ酸からの α -アミノニトリルの新規な酵素合成が行われたことを示唆する大きな発見であると考えられた。

さらに変異型 pkDAO(Y228L/R283G)がアミノキシダーゼ活性によって(R)-MBA から対応するイミンを合成することから、第一級アミンである(R)-MBA からイミンを経由した α -アミノニトリルの合成が可能と考え、実験を進めた(Scheme 2-1B)。変異型 pkDAO を用い、100 mM KCN を添加した pH 8.0(HCl にて調整)の水溶液中で 5 mM (R)-MBA を基質として反応を行い、その反応生成物を Crownpak CR-I (+)カラムを用いた HPLC で分析した。2MePGN と同じ溶出時間に KCN 添加由来で生成される新規ピークが得られた(Figure 2-3)。さらに同様の反応を行った生成物をヘキサンで抽出し、GC-MS で分析を行った。GC スペクトルにおいて(R)-MBA からの生成物として 2 つの主要なピークが検出された(Figure 2-3B の 2 および 3)。ピーク 1 および 4 は、KCN の有無にかかわらず変異型 pkDAO の反応によって形成され、MS データベースによって acetophenone(120.06 m/z)および α -methyl-N-(1-phenylethylidene) benzenemethanamine (213.14 m/z)としてそれぞれ同定された。ピーク 2,3 は KCN 添加により特異的に生成される化合物であり、両方の化合物がシアンを添加しない(R)-MBA のオキシダーゼ反応では検出されなかった。ピーク 2 の分子イオンピークはイミン化合物で 119.1 m/z であり、2MePGN からシアンが脱離して生成したものと考えた。ピーク 3 は、マススペクトルから 2MePGN から 2 つのフラグメント化された化合物(119.1 および 131.05 m/z)を示していると推定した(Figure 2-3A)。これらフラグメントイオンが同時に主構造から生成する化合物は 2MePGN の構造と考えられる。これは、アミノキシダーゼ反応による第一級アミンからの α -アミノニトリルの酵素的合成が進行していることを示すデータの 1 つである(Scheme 2-1 B)。この反応の進行を証明するため、 α -アミノニトリルが水中で不安定であることから、アミノニトリルをさらにアミノ酸まで変換し、その生成物の同定を行うことで新規反応が進行していることを証明することとした。



Scheme 2-1. アミノ酸オキシダーゼによる酵素的 α -アミノニトリル合成
 (A) アミノ酸オキシダーゼを用いた D-または L-phenylalanine(Phe)からの 2-amino-2-cyano-3-phenylpropanoic acid の合成。(B) 変異型 pkDAO による (R)-MBA からの 2MePGN の合成。

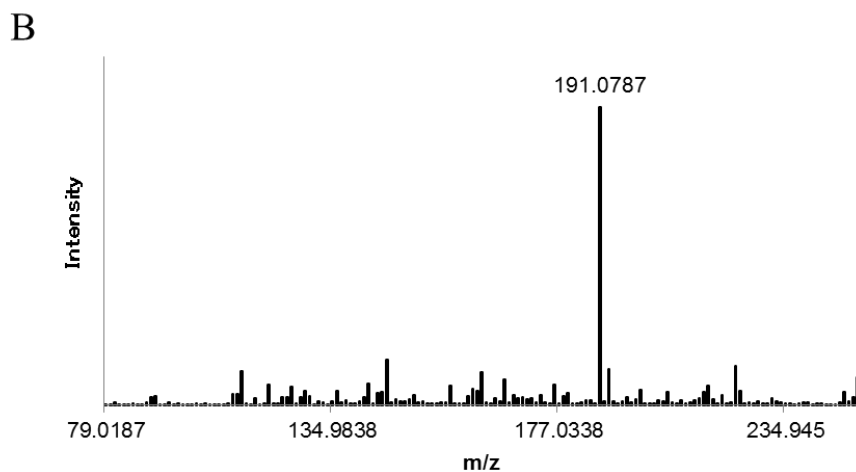
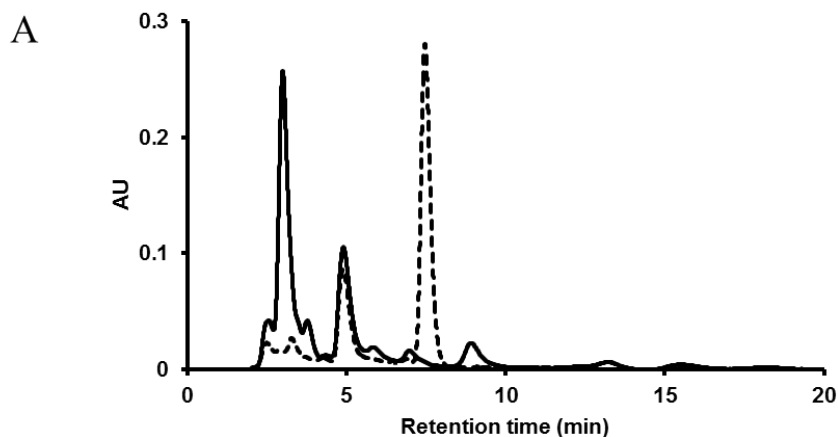
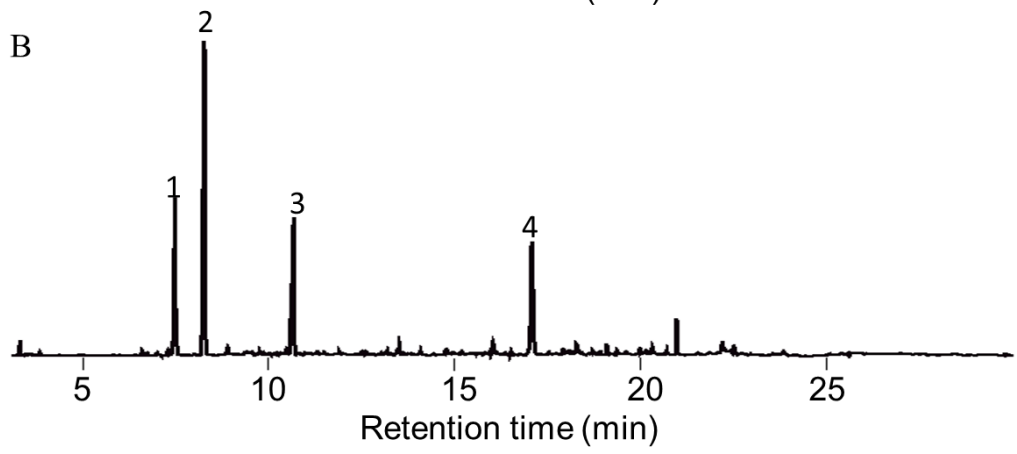
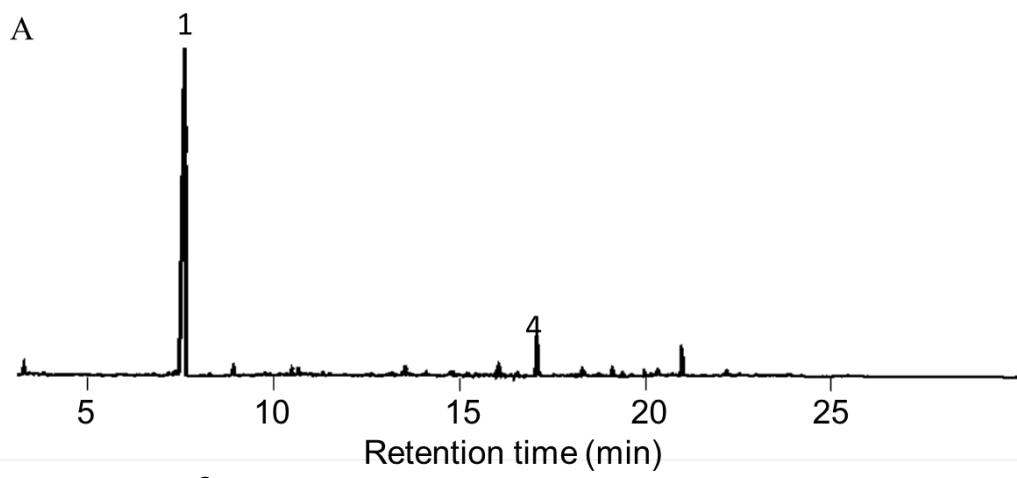


Figure 2-2. アミノ酸オキシダーゼによる D-または L-phenylalanine(Phe)からの 2-amino-2-cyano-3-phenylpropanoic acid の酵素合成確認

(A)L-または D-アミノ酸オキシダーゼとのインキュベーションによる D-または L-phenylalanine からの酸化生成物の HPLC 分析。100 mM KPB pH 8.0 (点線)または 100 mM KPB pH8.0、100 mM KCN(実線)の 2 条件で実施した結果を比較している。(B)シアン添加による D-または L-Phe から合成された 2-amino-2-cyano-3-phenylpropanoic acid の同定。酵素反応を HClO_4 で停止し、LC で分取し、0.1% ギ酸水溶液で希釈した後、Bruker-Daltonics 社製 microTOF 装置で分析した。



C

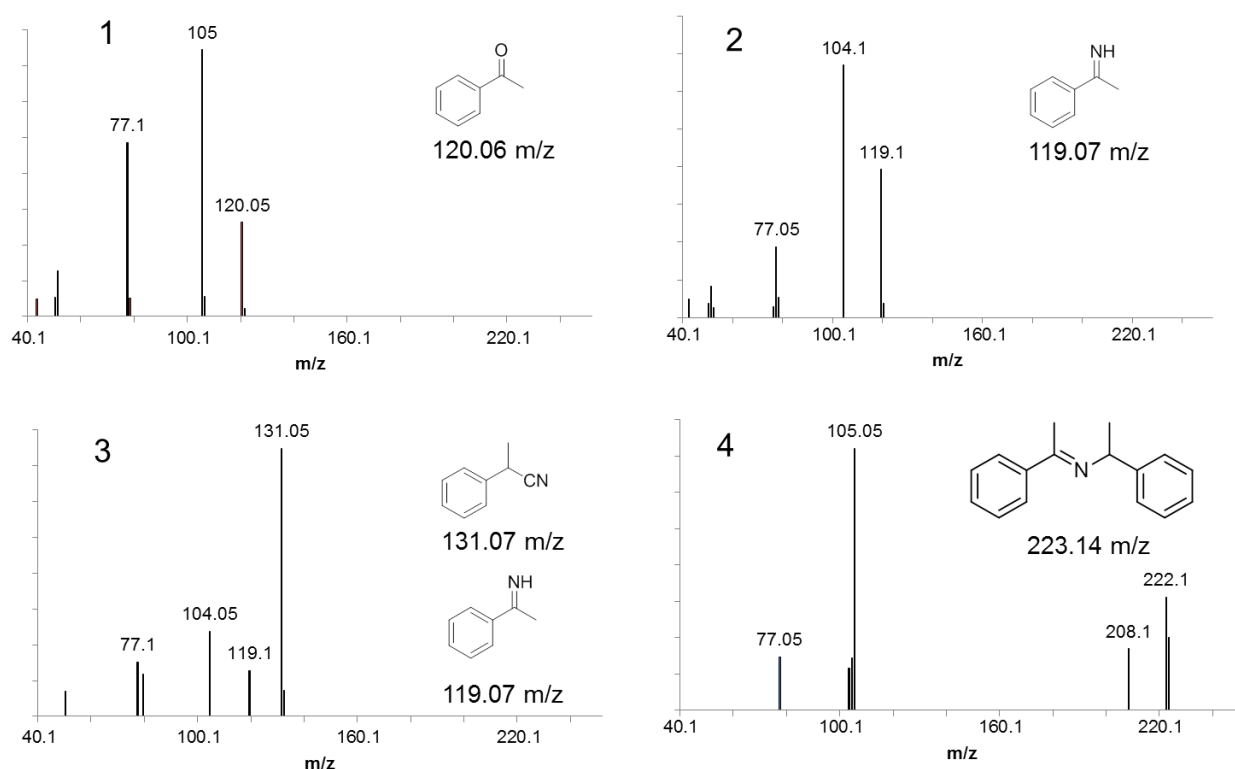


Figure 2-3. (A)KPB pH 8.0 中での変異型 pkDAO による(*R*)-MBA 由来の反応生成物の GC スペクトル。(B) 150 mM KCN pH 9.0 (HCl で調整)での変異型 pkDAO による(*R*)-MBA からの反応生成物の GC スペクトル。(C)Figure 2-3 B のピーク 1~4 の MS スペクトル。

2-3-2. 変異型 pkDAO による 2MePGN 合成反応の解析

上記のスクリーニング実験において、変異型 pkDAO が KCN の添加によって (*R*)-MBA からの 2MePGN 合成を触媒できることを示唆するデータが得られた。次に、酵素反応の初速度を詳細に解析し、最適な反応条件の検討を行った。まず pH においては、酸性側では反応速度が極めて低く、pH が 8.6~10.5 の範囲で高い反応速度を示した(Figure 2-4A)。反応温度は、40°C まで反応速度が上昇し、徐々に減少した(Figure 2-4B)。変異型 pkDAO 2 U を用いて、(*R*)-MBA(150 mM KCN、HCl によって pH 9.0 に調整)および KCN(5 mM (*R*)-MBA、KCN の各濃度に対して HCl によって pH 9.0 に調整)について K_m 値を算出した。その結果、それぞれ 1.42 ± 0.03 mM(*R*-MBA)および 25.1 ± 3.1 mM (KCN)であると推定された (Figure 2-5)。したがって、2MePGN 合成のための反応は pH 9.0 および 40°C で最適であり、(*R*)-MBA から 2MePGN を効率的に製造するためには、高

濃度の KCN が必要であることが分かった。

2-3-3. 変異型 pkDAO による 2MePGN 合成の最適化(Scheme 2-1 B)

酵素反応において、水溶液中での酵素および生成物の安定性は、酵素による物質生産にとって重要である。2MePGN の安定性は、pH 9.0 で 5~60°C で 30 分間インキュベーションすることにより残存する 2MePGN 量を測定することで評価した。その結果、2MePGN は 30°C 以下では安定であったが、30°C より高い温度では不安定であった(Figure 2-4C)。さらに変異型 pkDAO の KCN に対する安定性評価では、各 KCN 濃度で酵素を 1 時間インキュベートしたのち、残存活性量を比較した。酵素は高濃度の KCN と共にインキュベートすると、活性が低下することが分かった(Figure 2-6A)。しかしながら、高濃度の KCN との反応は、イミンからの acetophenone の形成を減少させ、効率的なアミノニトリルの物質生産には必要である(Figure 2-6B)。そのため、初速度は 40°C で最も高かったものの、2MePGN が安定な低温(20°C)を選択し、KCN 濃度は 150 mM を最適な濃度とした。5 mM (*R*)-MBA、20°C、pH 9.0、150 mM KCN の条件を 1 時間の合成反応において 2MePGN の生成を最も増加させるのに最適であると判断した。シアン化物は水よりも求核性が高いが、2MePGN の高収率合成を実現するためには、水(55.5 M)による加水分解に対応するために、5 mM (*R*)-MBA に対して高濃度の KCN(>100 mM) (Figure 2-5A)が必要であると判断した。必要なシアン化合物の量は、(*S*)-立体選択的アミンの光学分割を達成するための脱ラセミ化反応において、添加する還元剤 NaBH₄ および NaCNBH₄ などの量(20 当量、5 mM 基質に対して 100 mM)と同様であった。求核剤 KCN の濃度の最適化は、水中で非常に短い寿命であるイミンの効率的な変換のために非常に重要である。

また、酵素量と 2MePGN 収率の関係は、30°C で 1 時間のインキュベーション後に分析した。酵素をさらに添加した場合、2MePGN 収率は増加したが、2MePGN の最大収率は、変異型 pkDAO の 8 U を添加した場合の 5 mM (*R*)-MBA(収率 80%)から 4 mM であった。2MePGN 合成に対する酵素量および反応温度の影響をさらに調査した。2MePGN 合成は、1~4 U の変異型 pkDAO を用いて、30°C より 20°C で 1 時間反応した条件が最も良好であった。酵素濃度が高いほど、より多くの 2MePGN が合成された。最適な条件下では、4.8 mM 2MePGN を、4 U 変異型 pkDAO を用いて 5 mM (*R*)-MBA から合成できた(収率 96%)(Figure 2-8A)。さらに、10 mM (*R*)-MBA および 150 mM KCN を、4 U 変異型 pkDAO を用い、5°C で 6 時間インキュベートすると、9.2 mM 2MePGN が合成された。これらの結果は、反応温度が 2MePGN の合成に顕著に影響することを示している。20°C でのインキュベーションにより 0.2 mM の acetophenone が

副生成物として生成したが、5°Cでは acetophenone が検出されなかった。

イミン中間体および α -アミノニトリルは水溶液中で不安定であるが、様々な反応解析により、150 mM KCN 存在下で pH 9.0 および 20°C 以下の温度で 4 U より多くの変異 pkDAO を使用して反応を行うことで、効率的に(*R*)-MBA から 2MePGN を合成する新規酵素法を開発することに成功した。

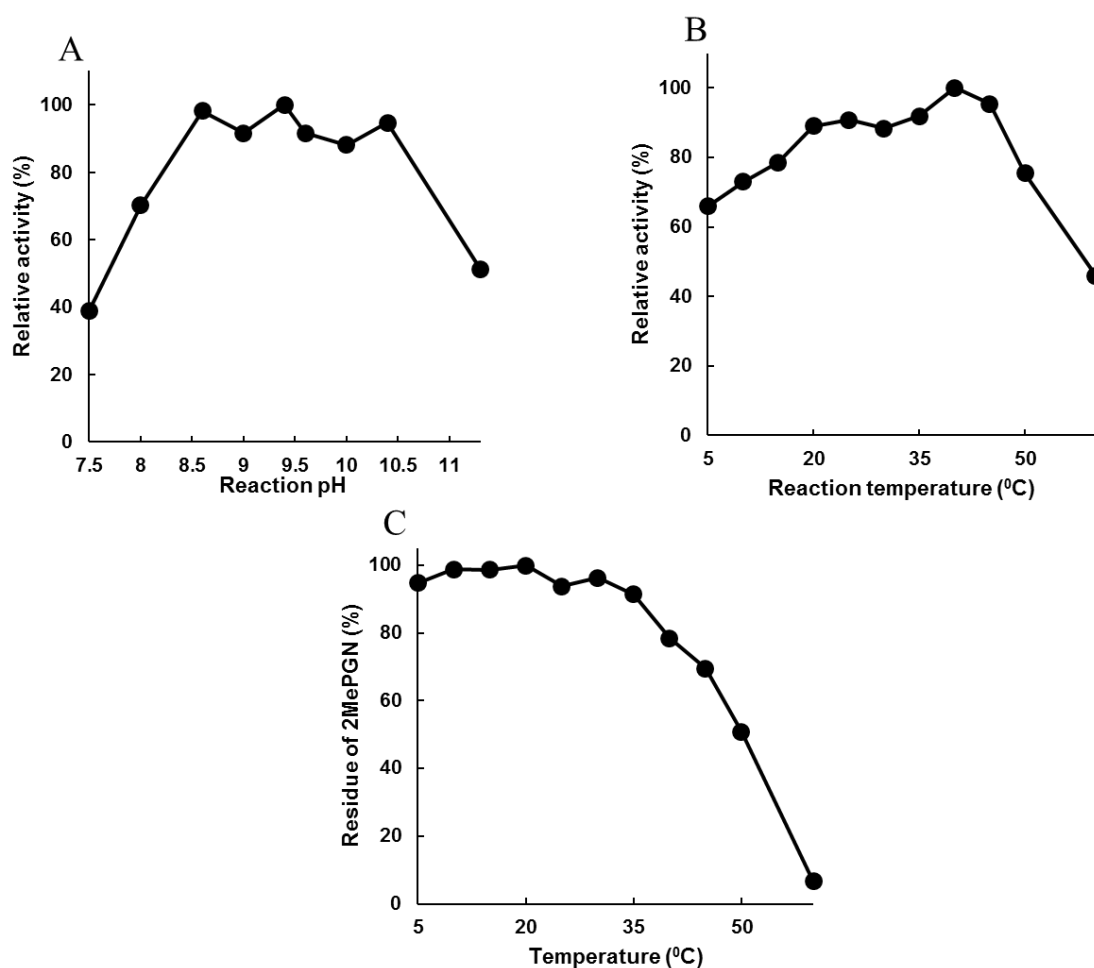


Figure 2-4. 変異型 pkDAO による 2MePGN 生成の pH(A)および温度(B)の影響および 2MePGN(C)の安定性。(A)最適反応 pH の検討。150 mM KCN、HCl 添加量で pH を 7.5~11.3 に調整した。5 mM (*R*)-MBA、および 2.6 U の変異型 pkDAO を用いて、20°C で 5 分間反応を行い、酵素活性を比較した。(B)最適反応温度の検討。150 mM KCN、HCl によって pH 9.0 に調整し、5 mM (*R*)-MBA、および 2.6 U の変異型 pkDAO を使用して、5~60°C で 5 分間行い、酵素活性を比較した。(C) 2MePGN を 5~60°C で 30 分間インキュベートし、HPLC により 2MePGN の残存量を測定した。各実験は n=3 で実施し、その平均値をデータとした。

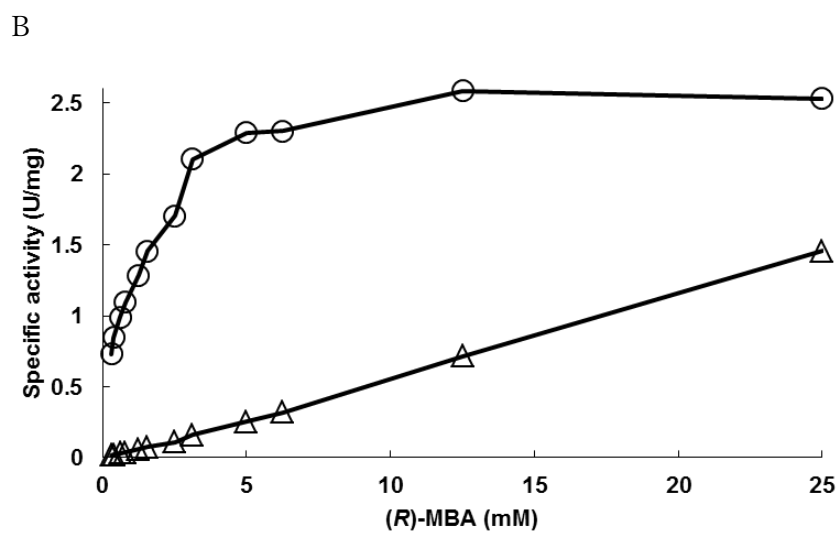
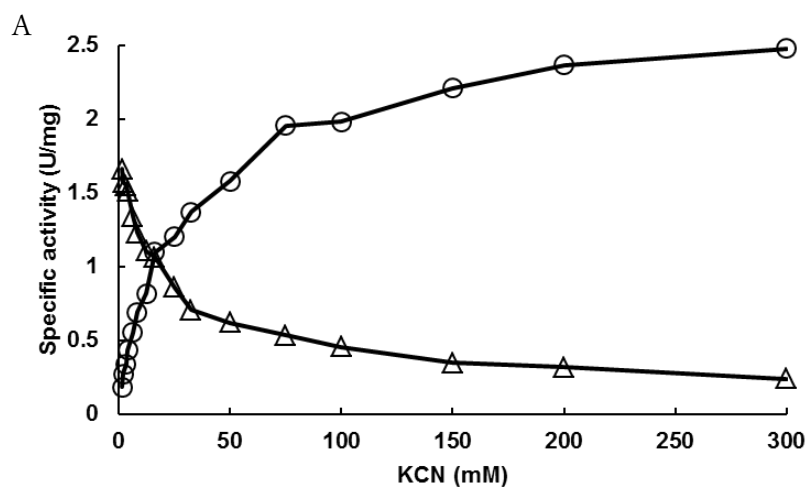


Figure 2-5. KCN(A)および(R)-MBA(B)に対する変異体 pkDAO による 2MePGN 生成の飽和曲線

○: 2MePGN, △: acetophenone.

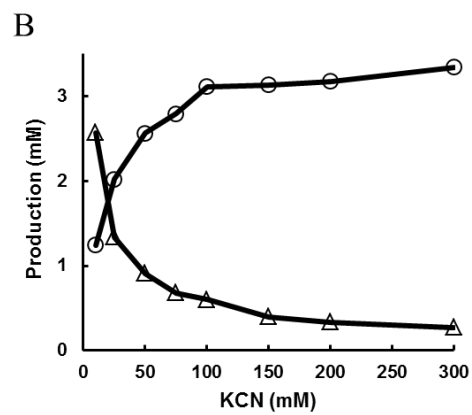
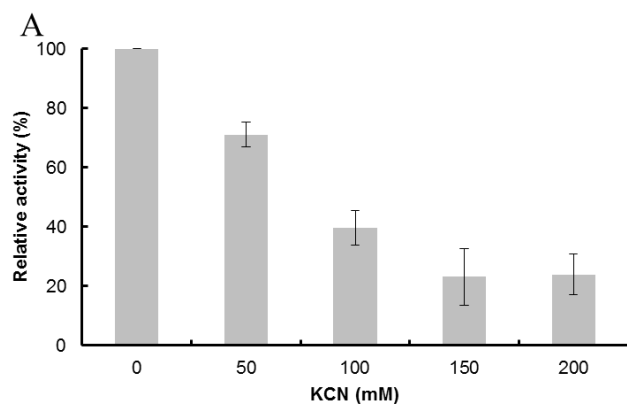
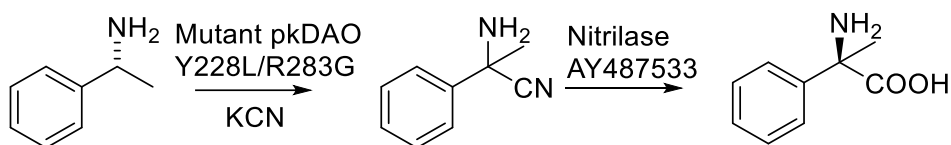


Figure 2-6. (A)変異型 pkDAO の KCN に対する安定性評価。変異型 pkDAO を 50~200 mM KCN 各濃度で HCl で pH 9.0 に調整した溶液にて 20°C で 1 時間インキュベートした。それら酵素の残存活性は、変異型 pkDAO のアミノキシダーゼ活性測定(n=3)を用いて測定した。比較とする 0 mM の条件では pH 9.0 の 100 mM Tris-HCl バッファーを用い、同条件(1 時間)でインキュベートし、活性測定を実施した。(B)KCN 濃度が 2MePGN の生成に及ぼす影響の検討。10~300 mM KCN、各濃度で HCl を用いて pH 9.0 に調整した反応液に、5 mM (R)-MBA、および 2.6 U の変異型 pkDAO を用いて 20°C で 1 時間反応を行った。その後 HPLC にて 2MePGN および acetophenone の量を測定した(n=3)。○: 2MePGN, △: acetophenone.

2-3-4. 変異型 pkDAO およびニトリラーゼ AY487533 を用いた第一級アミンからの非天然 α -アミノ酸の合成のためのカスケード反応



Scheme 2-2. 第一級アミンから α -アミノニトリルを介した非天然アミノ酸合成。

これまでの検討にて、変異型 pkDAO を用いて(R)-MBA から 2MePGN を生成するための新規反応の反応最適化に成功した。しかし、生成物である 2MePGN は水中で不安定であることから、直接的に 2MePGN の生成を証明することができていない。そこで、変異型 pkDAO とニトリラーゼ AY487533 を用いたカスケード反応によって(R)-MBA から 2MePG を生成する新しい酵素法の開発に挑戦した。2MePG は水溶液中で安定な α -アミノ酸であり、様々な生理活性を有する非天然アミノ酸である。これまで、多くのニトリラーゼがすでに同定され、ニトリルからのカルボン酸への立体選択的合成に使用されている。しかしながら、すでに報告のある多くのニトリラーゼは、2MePGN を基質として認識できず、反応が進行しなかった。Chaplin らは、メタゲノムスクリーニングによって様々なニトリラーゼ遺伝子の探索を行っている。その中で取得したニトリラーゼ AY487533 が、2MePGN からの 2MePG の合成を触媒することを報告しており、その遺伝子情報が公開されていた(特許では 45%鏡像体過剰(ee)(登録商標))⁵³。そこで、ニトリラーゼ AY487533 の DNA 断片を遺伝子合成により取得し、大腸菌で発現させ、ニトリラーゼ AY487533 を得た。粗精製酵素の性質検討によって、45~55°C、pH 8.0~10.0 で 2MePGN を高活性で加水分解できることから、今回の反応に応用可能と考えられた(Figure 2-7)。変異型 pkDAO による

2MePGN の酵素合成は pH 9.0 および 20°C で最適であったが、ニトリラーゼ AY487533 の酵素活性は 25°C 未満で低いことから、変異型 pkDAO とニトリラーゼとのカスケード反応に最適な反応条件を pH 9.0 で検討した。その結果、基質である(*R*)-MBA は 30°C で 2MePGN を介して効率的に 2MePG に変換され、5.0 mM (*R*)-MBA(収率 98%)から 4.9 mM 2MePG が合成できた(Figure 2-8B)。

これらの結果は、ニトリラーゼが、副生成物の形成がほとんどなく、(*R*)-MBA から生成される不安定な 2MePGN 中間体を水中で安定な 2MePG へ迅速に変換したことで、高収率な反応を触媒したことを示した。

2MePG の生成を確認するために、反応液 30 ml で同様の反応を行い、(*R*)-MBA からの生成物を Dowex カラムクロマトグラフィー(収率 62%)で精製し、NMR スペクトルおよび MS データを解析した。NMR データは、変異型 pkDAO およびニトリラーゼ AY487533 とのカスケード反応によって(*R*)-MBA から 2MePG が生成されたことを示した(Figure 2-11 A, Figure 2-12 A)。また生成された 2MePG についての立体化学をキラルカラム Sumichiral OA-5000 による HPLC 分析によって決定した。鏡像体過剰率(*ee*)は、(*R*)-2MePG について 40% *ee* を示した。光学純度は低い結果となったが、変異型 pkDAO とシアン付加反応およびニトリラーゼによる加水分解のカスケード反応により、(*R*)-MBA から 2MePG を生成する新しい酵素法の構築に成功した。この方法は、非天然アルキルアミノ酸の非酵素的多段階合成に関する化学合成の報告とは対照的である。これまで報告のある化学合成では、アミノ基保護されたアミノ酸エステルをジクロロメタン中で相間移動触媒にてメチル化し、続いて脱保護してアルキルアミノ酸を得ている⁶⁰。また Harel および Rozen は、対応するアミノ酸からの α アルキルアミノ酸の多段階合成を報告している。アミノ基をアセトニトリル中でフッ素を用いてニトロ基に酸化し、続いて相間移動アルキル化を行い、次いで還元して所望のアルキルアミノ酸を得ている⁶¹。化学反応では反応点を選択的に行うために、ほかの反応部位を修飾し、保護する必要があるため、反応工程が多くなる。今回、酵素を用い、2種類の酵素反応をつなげて、1つの反応系で原料から最終産物まで、選択的に反応を行うことに成功しており、酵素を用いることで煩雑な工程を経ず、選択的にシンプルな反応を実現した。

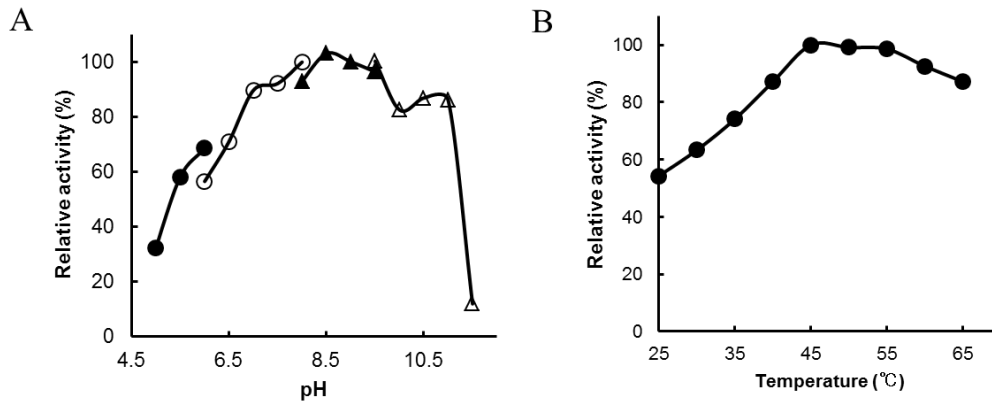


Figure 2-7. ニトリラーゼ AY487533 に対する pH および温度の影響。(n=3)
 (A) ニトリラーゼ AY487533 の酵素活性に対する pH の影響。2PGN に対するニトリラーゼ活性を、pH 5.0-11.5 の間で、酵素活性を測定し比較した。クエン酸緩衝液 pH 5.0-6.0(●)、KPB 緩衝液 pH 6.0-8.0(○)、Tris-HCl 緩衝液 pH 8.0-9.5(▲)、Glycine-KOH 緩衝液 pH 9.5-11.5(△)を使用した。(B) ニトリラーゼ AY487533 の酵素活性に及ぼす温度の影響。2PGN に対するニトリラーゼ活性を、pH 8.0 中にて各温度で測定した。

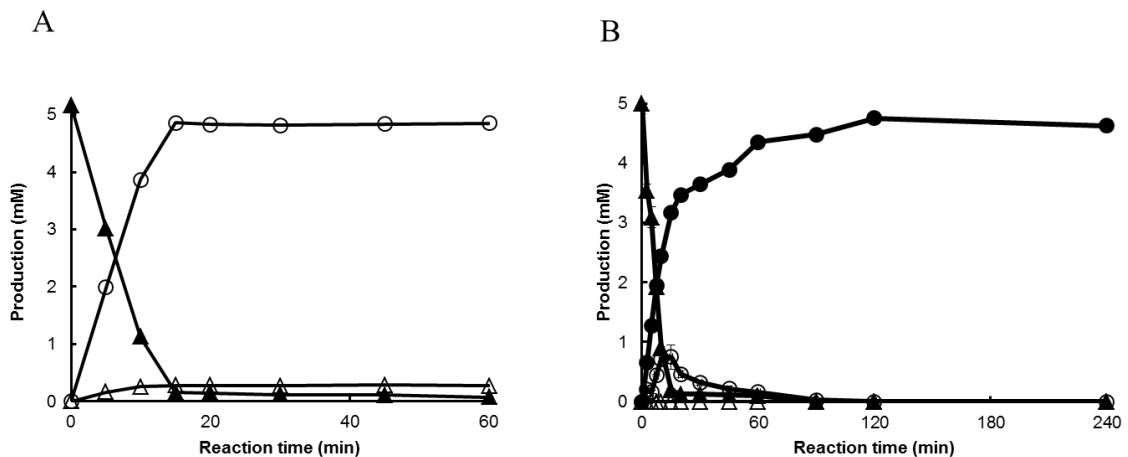


Figure 2-8. (A) 変異型pkDAOによるシアン付加反応による(R)-MBAからの2MePGN生成の経時変化。150 mM KCN、HClによってpH 9.0に調整した反応液中に5 mM (R)-MBAを基質として用い、20°Cで4 Uの変異型pkDAOを用い反応した。(B) 変異型pkDAOおよびニトリラーゼAY487533を用いたカスケード反応による(R)-MBAからの2MePG生成の経時変化。150 mM KCN、HClによってpH 9.0に調整した反応液中に5 mM (R)-MBAを基質として用い、30°Cで4 Uの変異型pkDAOおよび50 UのニトリラーゼAY487533を用い反応した。● : 2MePG, ○ : 2MePGN, ▲ : (R)-MBA, △ : acetophenone

2-3-5. カスケード反応による非天然 α -アミノ酸の合成

様々な非天然の α -アミノ酸を合成するために、(R)-EBAや(R)-FMBAから2EtPGおよびF2MePGの合成を検討した。変異型pkDAOの各アミンへの活性は、(R)-MBAの活性と比較して(R)-EBAは73.6%、(R)-FMBAは33.6%の活性を有する(Figure 2-9)。したがって、5 mM (R)-EBAを、上記で構築した条件で、反応液1 mlあたり6 Uの変異型pkDAOおよび100 UのニトリラーゼAY487533を混合し、カスケード反応を実施した。反応液30 mlから反応停止後の上清をDowexカラムクロマトグラフィーで精製し、収率は73%であった。その反応生成物をNMRとMSにて測定し、2EtPGと同定した(Figure 2-10, Figure 2-11 C, Figure 2-12 C)。F2MePGは、8 Uの変異型pkDAOおよび50 UのニトリラーゼAY487533(1 ml)を用いて、同じ条件下で(R)-FMBAから合成した。F2MePGは、69%収率で反応液30 mlから上記手順にて精製し、NMRとMSにて同定した(Figure 2-10, Figure 2-11 B, Figure 2-12 B)。これらの結果は、新規酵素法が、第一級アミンから他の非天然 α -アミノ酸を合成するためにも使用できることを示した。

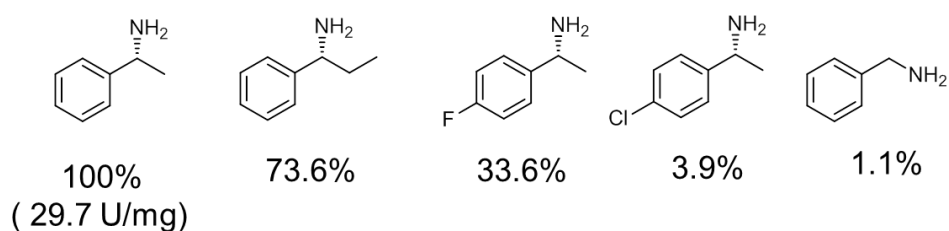


Figure 2-9. 第一級アミンに対する変異型pkDAOの基質特異性(n=3)。相対活性は、精製した変異型pkDAO及び20 mMの各第一級アミンを用いたオキシダーゼ活性測定をKPB pH 8.0で測定した。

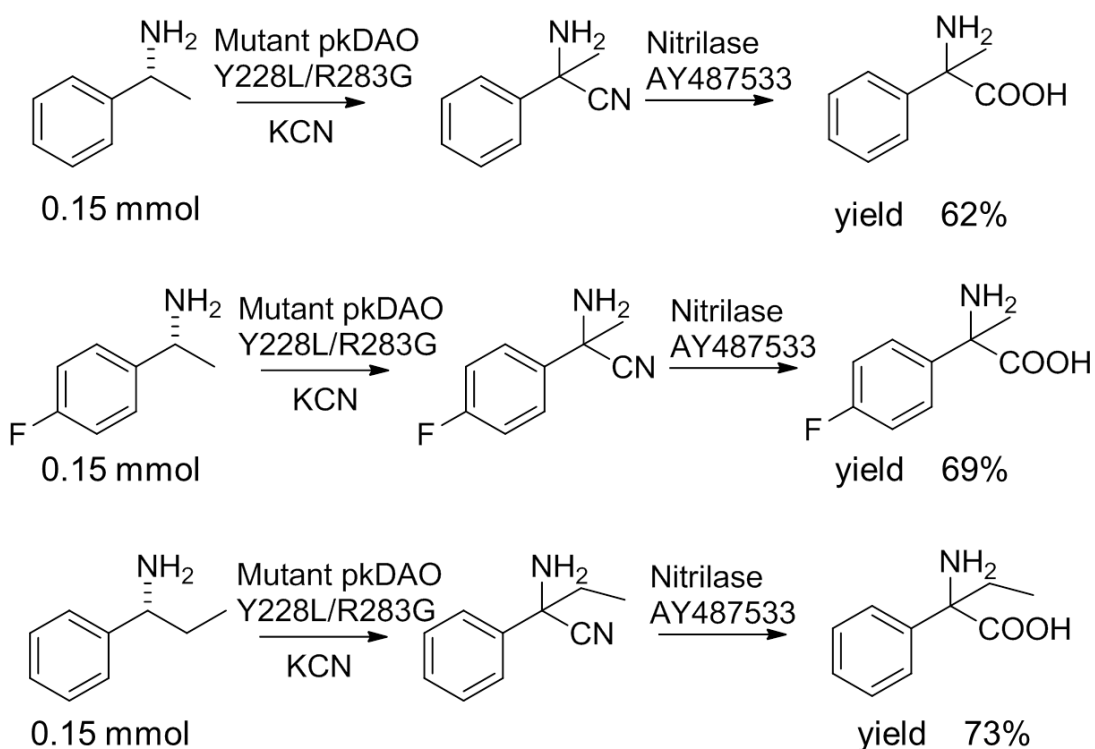


Figure 2-10.変異型pkDAOおよびニトリラーゼAY487533を用いたカスケード反応による第一級アミンからの非天然 α -アミノ酸の合成、150 mM KCN pH 9.0(HClによって調整)水溶液中に5 mM 第一級アミンを含む反応液に、120~240 U変異型pkDAOおよび600~1200 UのニトリラーゼAY487533を混合し、30°Cで4時間反応した(30 ml反応混合物)。反応を2M HClで停止し、反応生成物を精製した。生成物は、NMRおよびBruker-Daltonics microTOF装置によって測定し、同定した。

2-3-6. 酵素合成された非天然 α -アミノ酸のNMRスペクトルおよびMSスペクトル

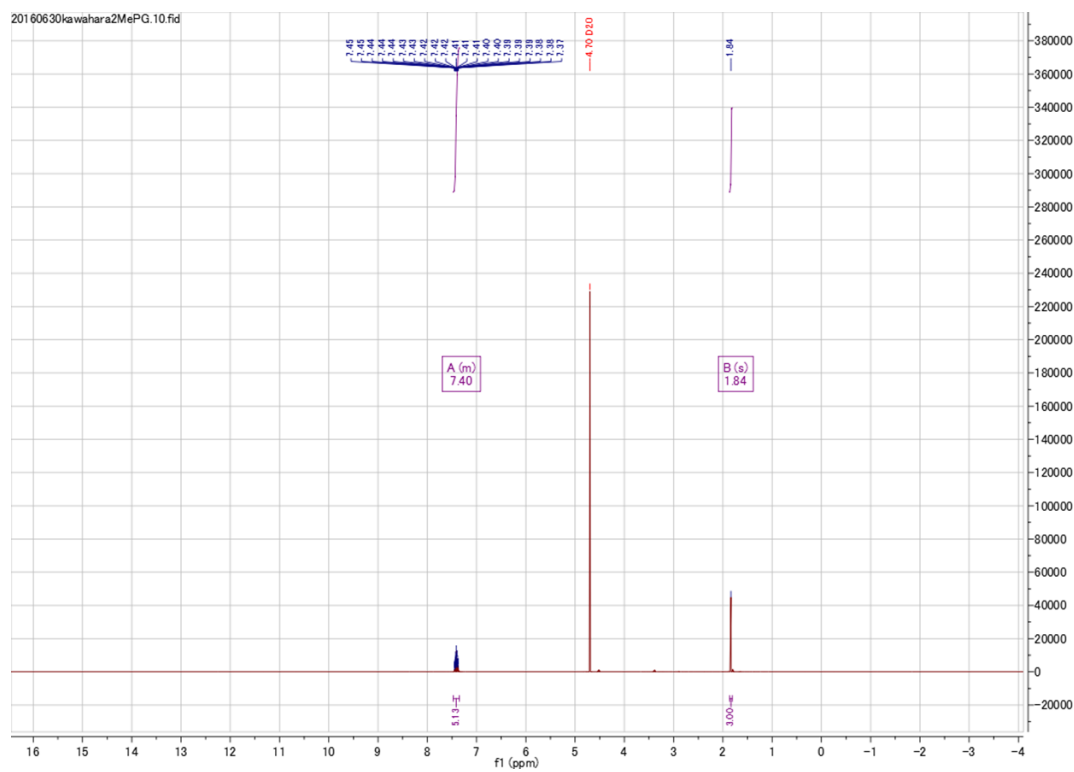
非天然 α -アミノ酸を、変異型pkDAOおよびニトリラーゼAY487533との新たなカスケード反応によって合成した。生成物をDowexカラムクロマトグラフィーで精製し、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ (δ 42.62:内部標準用ジメチルスルホン)およびブルカー・ダルトニクスmicroTOF装置によって同定した(Figure 2-11, Figure 2-12)。

(A) Product from (*R*)-MBA, 2-MePG : $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Deuterium Oxide) δ 7.47 – 7.35 (m, 5H), 1.84 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, Deuterium Oxide) δ 177.15, 138.65, 130.17, 126.88, 64.05, 22.28. MS (microTOF): m/z calcd for $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 168.0855; found: 166.0863.

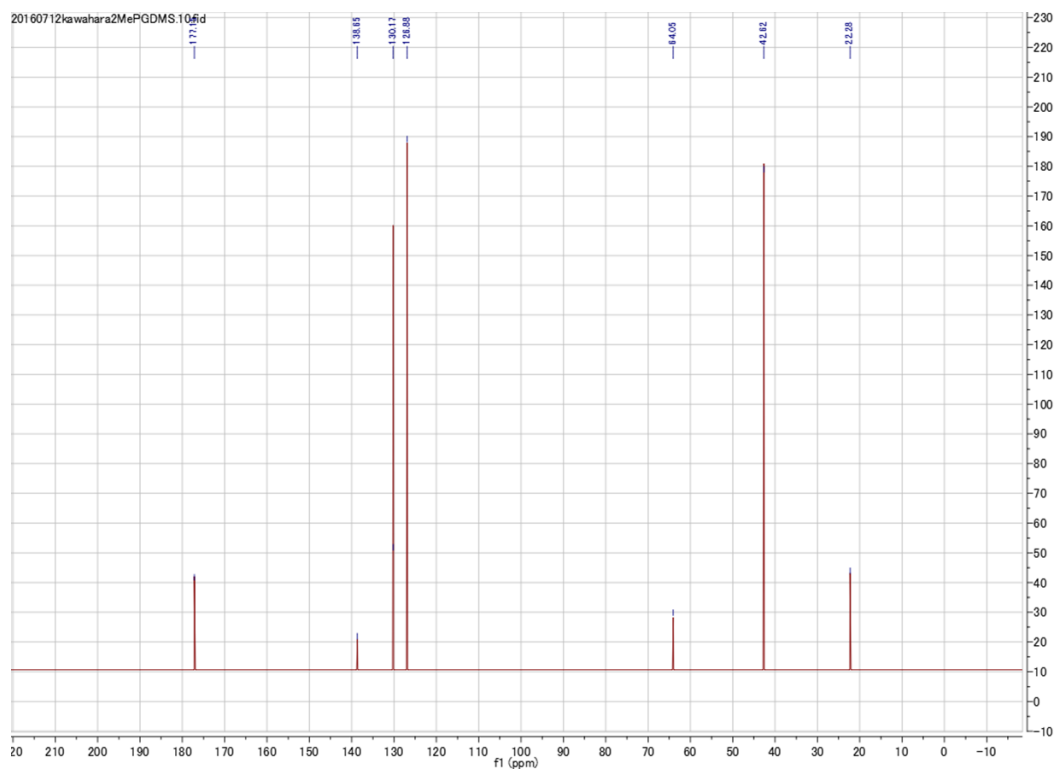
(B) Product from (*R*)-FMBA, F2-MePG : ^1H NMR (400 MHz, Deuterium Oxide) δ 7.48 – 7.38 (m, 2H), 7.18 – 7.07 (m, 2H), 1.82 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, Deuterium Oxide) δ 177.15, 138.65, 130.17, 126.88, 64.05, 22.28. MS (microTOF): m/z calcd for $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{FNO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 184.0768; found: 184.0767.

(C) Product from (*R*)-EBA, 2-EtPG : ^1H NMR (400 MHz, Deuterium Oxide) δ 7.46 – 7.33 (m, 5H), 2.38 – 2.18 (m, 2H), 0.96 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, Deuterium Oxide) δ 177.15, 138.65, 130.19, 130.17, 126.88, 64.05, 22.28. MS (microTOF): m/z calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 180.1019; found: 180.1014.

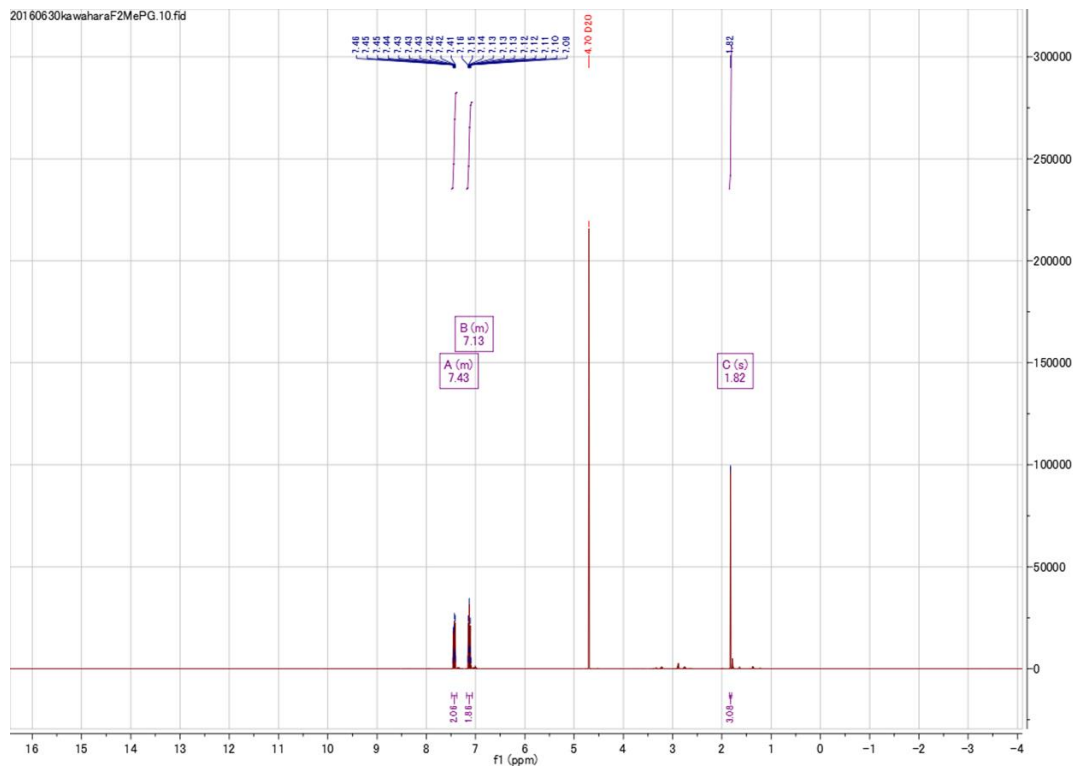
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O)



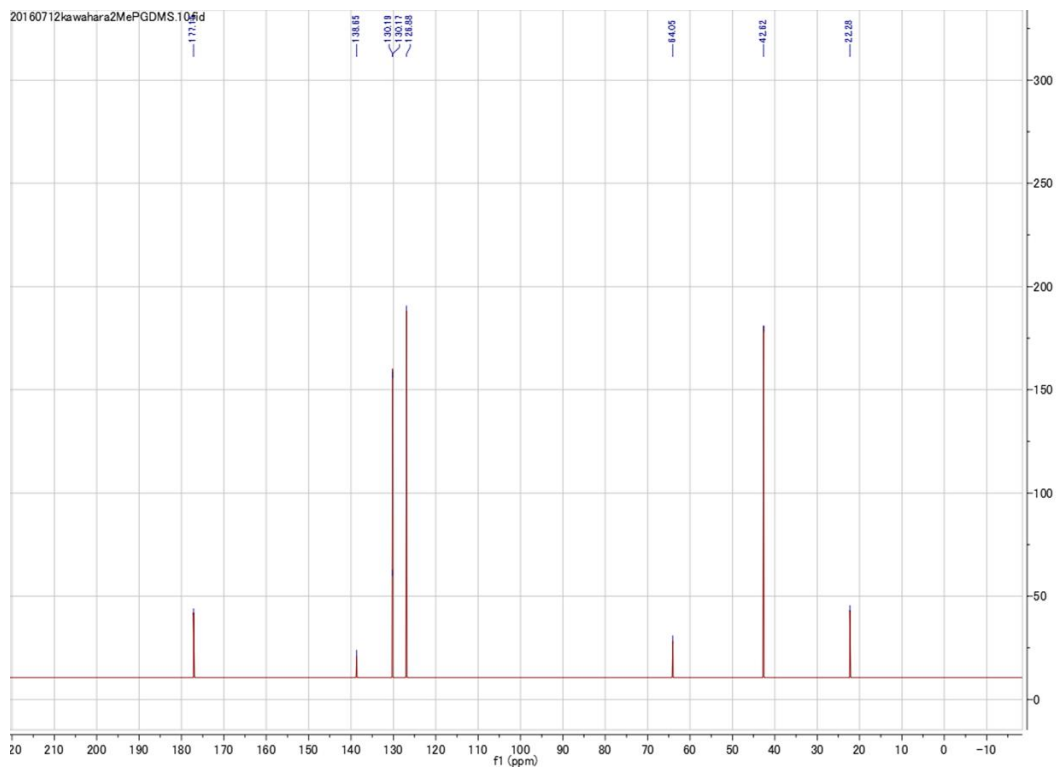
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O)



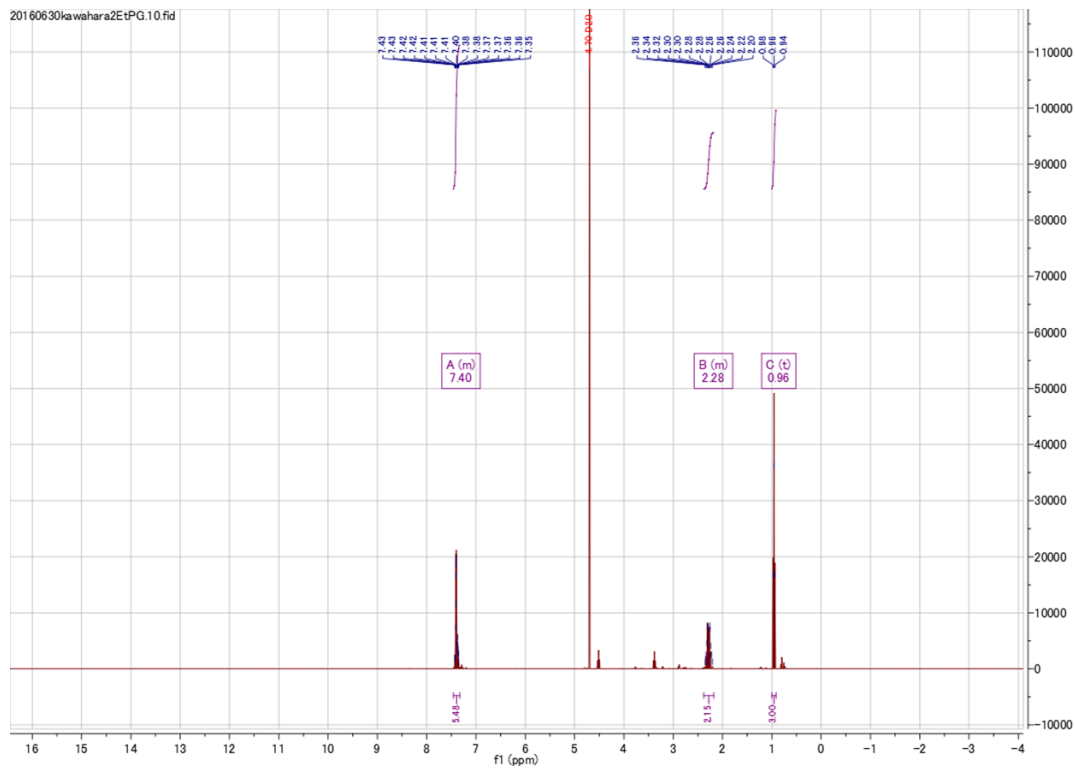
B ^1H -NMR (400 MHz, D_2O)



^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O)



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O)



$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O)

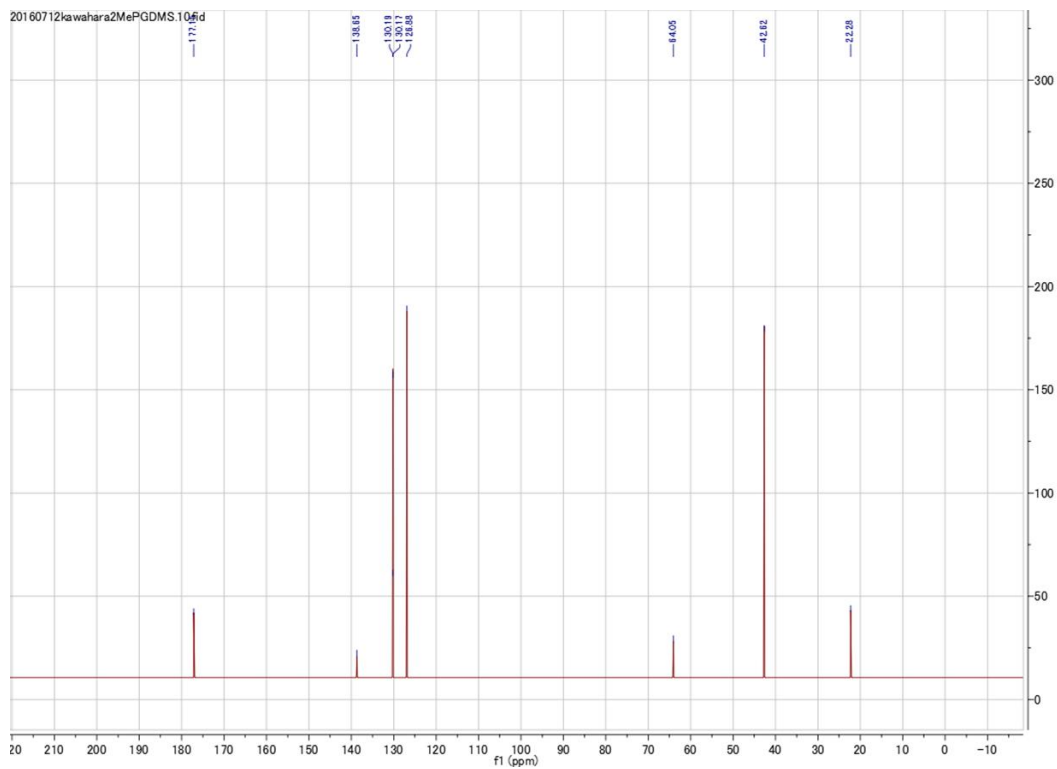
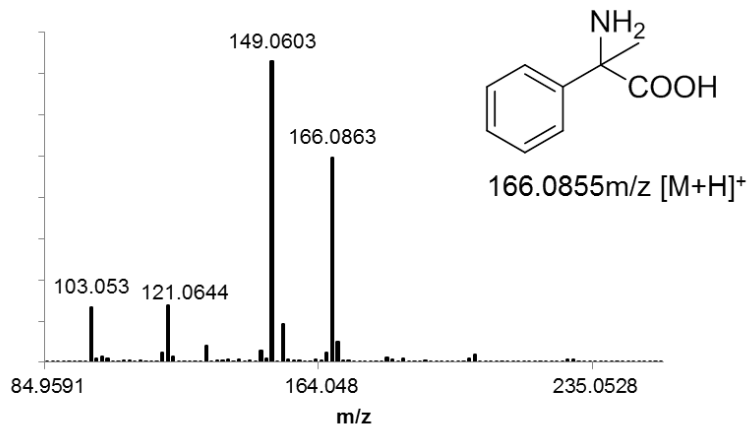
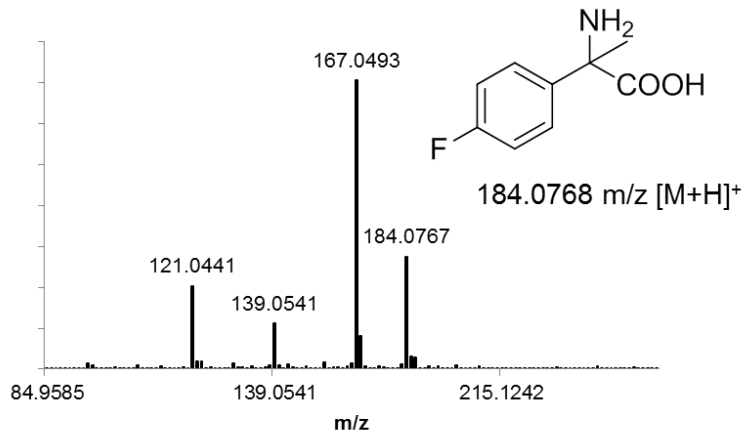


Figure 2-11. 酵素的に合成された非天然 α -アミノ酸の同定のためのNMRデータ (A) 2MePG, (B) F-2MePG, (C) 2EtPG

A



B



C

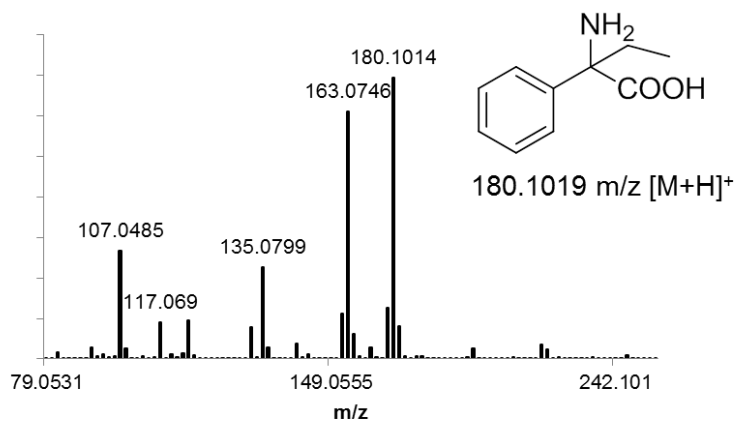


Figure 2-12.に合成された非天然 α -アミノ酸の同定のためのMS分析

第3章

ブタ腎臓由来 D-アミノ酸オキシダーゼを用いた第一級アミンの酸化による新規なイミン合成手法の構築

要約

変異型ブタ腎臓(pkDAO)由来の D-アミノ酸オキシダーゼ(Y228L/R283G)によって触媒される酸化的シアン化反応に関する研究に、副産物として 1-phenyl-*N*-(1-phenylethylidene)ethanamine (PPEA)の予期せぬ形成が検出された。反応条件を最適化することで PPEA を効率的に合成できると考え、最適な反応条件および反応機構を、変異型 pkDAO を用いて調査した。その結果、pH 9.0 および 20°C での 150 mM (*R*)-MBA における反応条件で最も高効率な PPEA 合成を行うことが分かった。この反応は、変異型 pkDAO の基質ではない ¹⁵N-*n*-hexylamine によって中間体 1-phenylethanimine (1-PEI)をトラップすることによっても進行したため、PPEA は(*R*)-MBA などの系内に存在する第一級アミンによる、酵素の酸化反応で生成されるイミン 1-PEI への求核置換によって合成されると推測された。PPEA は、NaBH₄による還元にて bis(1-phenylethyl)amine (BPEA)への変換も行うことが可能である。このように、変異型 pkDAO を用いた第一級アミンの酸化によるイミン合成の新しい酵素的方法を初めて発見した。

3-1. 緒言

イミンは、アミド、キラルアミン、オキサゾリジン、ヒドロキシアミン、ニトロン、アミノニトリルなどの生物活性をもつ分子もしくはその合成中間体の製造に有用な化合物である^{62,63}。さらに、抗生物質の核となる β ラクタム複合体はイミン中間体から合成される⁶⁴。これまで、第一級アミン⁶⁵または第二級アミン^{66,67}の酸化、アミンとアルデヒドまたはケトンの縮合、およびアミンとアルコールの酸化縮合^{68,69}によってイミンを合成するための多種多様な化学的方法が開発されている。特に、その研究の多くは、目的の化合物以外の窒素含有化合物の形成を防止できるように、第一級アミンからの選択的イミン合成を効率的に行う方法を開発するための報告である。近年イミンおよびアミノニトリル化合物を製造するための技術として、有機溶媒中での第一級アミンの光酸化反応が報告されている⁷⁰。また室温の水溶液中での硫酸銅と過酸化水素を用いて行われる反応も知られている⁷¹。さらに第一級アミンの酸化のために有機触媒としてオルトキノキシド触媒を利用したイミン合成の報告もある。この方法は、銅アミンオキシダーゼの補因子であるトパキノキシドから有機触媒の構造に関するインスピレーションを得ている⁷²。

酵素反応は、化学反応で使用する毒性を有する化合物や有機溶媒を使用せずに、温和な条件下(水中、常温、常圧)にて反応を行うことができる。しかし、イミン類の合成および単離は、水中ではイミン類の加水分解により、生成物が不安定であるため、非常に困難な反応である。アミンの酵素的酸化により形成される中間体イミンは活性種であり、水中では速やかに加水分解されてしまう。アミンの酵素による酸化反応は生体内で、アミンオキシダーゼによって行われる。イミン中間体を介して進行すると考えられているオキシダーゼ反応を応用した物質生産のいくつかの例を以下に列挙した。変異型 *Aspergillus niger* (MAO-N)モノアミンオキシダーゼによるデラセミ化反応を用いた医薬品に有用な様々なキラルアミン合成⁷³、変異型 *Brevibacterium oxydans* (CHAO)由来モノアミンオキシダーゼによる1,2,3,4-テトラヒドロキノリン類の環状アミンに対するデラセミ化反応によるキラルアミン合成⁷⁴、変異型 *Arthrobacter nicotinovorans* 由来1-ヒドロキシ-D-ニコチンオキシダーゼ(6-HDNO)による(S)-ニコチンなどのデラセミ化反応による(S)体三級アミンの合成、L-リジンオキシダーゼによりL-lysineから生成される環状イミンピペリジン-2-カルボキシレートを経由したリジンオキシダーゼとリジндеヒドロゲナーゼによるL-pipecolic acidの合成⁷⁶などが報告されている。これらの研究は、アミンやアミノ酸からオキシダーゼ反応によって生成するイミンに還元剤を作用させ、デラセミ化反応によってアミンの光学分割を行うもしくは、さらに酵素反応を組み合わせ、イミンを反応のターゲットにし、キラル分子を合成する反応である。私たちの

最近の研究においても、活性イミン中間体を標的とする、デラセミ化反応による光学活性アミンおよび、酸化的シアン化反応による α -アルキルアミノニトリル合成など、オキシダーゼにより生成するイミン中間体をターゲットにした反応の利用に焦点を当てた研究に関する報告をしている⁷⁷。この報告中で、X線結晶構造に基づく部位特異的変異導入法を用いて、pkDAOからアミノオキシダーゼ活性を示す新しい*R*立体選択的酵素の創製に成功している¹⁵。変異型pkDAO(pkDAO Y228L/R283G)は、(*R*)- α -methylbenzylamine ((*R*)-MBA)、(*R*)-4-fluoro- α -methylbenzylamine ((*R*)-FMBA)、(*R*)- α -ethylbenzylamine ((*R*)-EBA)などの特定の第一級アミンの酸化を触媒できることを実証し、またNaCNBH₄などの還元剤の存在下でのデラセミ化反応によるラセミ体MBAからの(*S*)-MBAの合成に応用した¹⁵。さらに、変異体Y228L/R283GのX線結晶学解析に基づくタンパク質工学によりpkDAOから変異体I230A/R283Gを取得し、NaBH₄によるデラセミ化法による(*R*)-4-chloro-benzhydrylamineの合成に利用した⁷⁸。さらに変異型pkDAOの立体選択性に関して、X線結晶構造解析、FMO分析、および生化学的解析を組み合わせたアプローチによって詳細を明らかにし、報告している⁷⁹。Asanoらは、新しいアミノオキシダーゼを応用するだけでなく、酵素のメカニズムを詳細に解明するためにも研究を進めている⁸⁰⁻⁸²。また、野生型pkDAOと変異型pkDAO(Y228L/R283G)は、ニトリラーゼを含むカスケード反応により、第一級アミンから α -アミノニトリルおよび非天然 α -アミノ酸を合成できることも発見した。本章では、変異型pkDAOを用いた(*R*)-MBAからのラセミ体2-メチル-2-フェニルグリシノニトリル(2MePGN、 α -アルキルアミノニトリル)の酵素による生成に関する研究中に、PPEAが予期せず形成されたことから、反応条件を最適化することで、PPEAの効率的な生成が酵素を用いてできるのではと考え、研究を進めた。PPEAは、ガスクロマトグラフィー質量分析(GC-MS)によって反応生成物として同定されている¹⁵。一級アミンの酸化反応によるイミンの酵素的生成に関する文献はほとんどないため、イミンの形成に関する酵素触媒反応の最適化およびそのメカニズムに関して研究を進め、安定同位体標識したアミンを用いた実験も実施した。

3-2.材料と方法

3-2-1. 化学物質の調製

(*R*)-MBA は、Acros Organics (Geel, Belgium)から入手した。PPEA は化学合成によって引用論文を参考に合成した⁸³。Bis(1-phenylethyl)amine (BPEA)、他の化学物質はすべて Sigma-Aldrich (St.Louis, MI, USA)で購入した。¹⁵N 標識塩化アンモニウムは、Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, MA, USA)から購入した。

3-2-2. 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による酵素反応の分析

(*R*)-MBA から合成した PPEA は、HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan)を用いて、90% hexane/10% 2-propanol 溶液にて、OD-H カラム(Daicel Co., Tokyo, Japan)により、40°C、流速 1 mL/min で分析した。生成物は、UV 検出器を用いて 200 nm で測定した。また BPEA、(*R*)-MBA、および acetophenone を、HPLC (Waters, Tokyo, Japan) を用いて、80% 60 mM HClO₄ / 20% acetonitrile 溶液を用いて、Crownpack CR-I (+)カラム(Daicel Co., Tokyo, Japan)にて 25°C、流速 0.4 mL/min で分析した。

3-2-3. GC-MS を用いた酵素反応生成物の分析

150 mM の(*R*)-MBA を含む水溶液を 2 M HCl(終濃度 170 mM)で pH 9.0 に調整し、2 U の pkDAO(Y228L/R283G)を添加して、酵素反応を行った。20°C で 1 時間反応した後、反応液から生成物を、内部標準として 1 mM 1,3,5-trimethylbenzylamine を含む 0.5 mL のヘキサンで抽出した。生成した二級イミンおよびアミンは、GC-MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)を用いて分析した。HP-5ms カラム(30 m ×φ 0.25 mm; 0.25 μm, Agilent J & W)を 7890A GC システムに用いて、スプリットレスモード注入後、40°C、2 分間後、分析を開始し、10°C /分で 290°C までオープン温度を上昇させ、最後に 290°C で 5 分間保持した。キャリアガスとしてヘリウムを 1 mL/min の流量で用いた。GC および GC/MS スペクトルは、MS データベース(Wiley 9th/NIST 2011 MS Library (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA))を参考にしながら、Agilent ChemStation (Hewlett-Packard Co., Chongqing, China)を用いて解析した。

3-2-4. GC/MS 分析による(*R*)-MBA からの反応生成物の同定

反応液 0.1 mL 中の変異型 pkDAO(Y228L/R283G)による (R)-MBA からの反応生成物を、0.9 mL のヘキサンで抽出した。HP-5ms カラム(30 m ×φ 0.25 mm; 0.25 μm, Agilent J & W)を用いた GC で分析した。スプリットレスモードで注入後 60°C、2 分間後分析を開始し、10°C /分で 290°C までオープン温度を上昇させた。この分析では、ヘリウムを 1 mL/min の流量でキャリアガスとして使用した。各化合物の MS を、MS database のデータと比較して解析した (Wiley 9th/NIST 2011 MS Library; Hewlett Packard Co.)⁵⁶。

3-2-5. ¹⁵N 標識 *n*-hexylamine の合成

変異型 pkDAO(Y228L/R283G)によって触媒される第二級イミンを合成するための酵素反応をより詳細に解析するため、変異型 pkDAO の基質ではない ¹⁵N 標識 *n*-hexylamine を第一級アミンの供給源として使用した。¹⁵N 標識 *n*-hexylamine を調製するために、*n*-hexanoic acid から合成された ¹⁵N-*n*-hexanamide を、Noguchi らの記載の方法にてアミンに還元し、合成した⁸⁴。まず、hexanoic acid (1.01 g, 9.18 mmol)、クロロギ酸エチル (1.39 g, 12.85 mmol)、およびトリエチルアミン (2.79 g, 27.54 mmol) を無水テトラヒドロフラン (20 mL) に加え、その反応液を窒素下、0°C で 30 分間攪拌した。¹⁵N 標識塩化アンモニウム(0.5 g, 9.18 mmol)に 28%の水を加え、0°C で 30 分間攪拌した。反応をクエンチするために、飽和 NaHCO₃を加えたのち、酢酸エチルで抽出し、MgSO₄で乾燥した。次いで、溶媒を蒸発させ、粗生成物を得た。¹⁵N-*n*-hexanamide (500 mg, 4.34 mmol)を無水テトラヒドロフラン(15 mL)中の水素化アルミニウムリチウム (LiAlH₄, 329 g, 8.68 mmol)を用いて ¹⁵N-hexylamine に還元した。この手法は引用文献の Xu、Tambar によって記載された方法に従った⁸⁵。硫酸ナトリウム十水和物(4.34 mmol, 1.39 g)を用いて反応をクエンチし、酢酸エチルを加え、溶媒を濾過し、蒸発させ、¹⁵N 標識 *n*-hexylamine をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにてメタノール/ジクロロメタン/トリエチルアミンの溶出(1:5:1~1:1:1)で精製した。分析用の薄層クロマトグラフィーはシリカプレート上で行った。ニンヒドリンエタノール TS スプレー(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)及び過マンガン酸カリウムを用いて成分を可視化した。さらに合成生成物を GC/MS および核磁気共鳴(NMR)を用いて分析した。

3-2-6. 1-Phenyl-N-(1-Phenylethylidene)Ethanamine (PPEA)合成反応の速度論的解析

PPEA 合成における(R)-MBA の K_m 値は、6.25~200 mM (R)-MBA(HCl で pH を 9.0 に調整)と、1 mL の反応液中に変異型 pkDAO 2 U を 20°C で 5 分間反応を行

い、その反応液中の PPEA 生成量を分析し、算出した。反応終了後、反応生成物(0.1 mL)を 0.9 mL の hexane/2-propanol(9:1)を用いて抽出し、HPLC を用いて分析した。PPEA 合成のための酵素活性の 1U は、1 分間に 1 μ mol の PPEA の生成を触媒する酵素の量として定義した。

3-2-7. (R)-MBA からの PPEA の生成

まず PPEA 合成のための酵素量の影響を最適な酵素量を決定するため実施した。反応液 150 mM (R)-MBA (pH 9.0) の 1 mL 中に 0.6~7.5 U 変異型 pkDAO を添加し、20°C で 1 時間インキュベートすることによって、生成する PPEA 量を比較することで調査した。反応終了後、反応液 0.1 mL 中の生成物を hexane/2-propanol(9:1)の有機溶媒 0.9 mL を用いて抽出し、HPLC を用いて分析した。その後 PPEA を下記条件下で合成した。1 mL の反応混合物中で 150 mM (R)-MBA (pH 9.0) および 7.5 U の変異型 pkDAO を用いて反応を行い、反応生成物を 0.5 mL の hexane を用いて抽出し、その後、GC-MS を用いて分析した。

3-2-8. (R)-MBA および ^{15}N -*n*-hexylamine を用いた *N*-hexyl-1-phenylethan-1-imine の酵素による合成

(R)-MBA および ^{15}N -*n*-hexylamine から *N*-hexyl-1-phenylethan-1-imine を合成するために、5 mM (R)-MBA (pH 9.0)、150 mM ^{15}N -*n*-hexylamine (pH 9.0)、および 2 U の変異型 pkDAO を混合した 1 mL の反応液を 20°C で 1 時間反応した。次に、反応液から生成物を、内部標準として 1 mM 1,3,5-Trimethylbenzylamin を添加した 0.5 mL の hexane を用いて抽出した。生成物は、HP-5ms カラムを用いて GC/MS によって分析した。

3-2-9. (R)-MBA からの Bis(1-Phenylethyl)Amine (BPEA) の合成

BPEA を (R)-MBA から変異型 pkDAO にて PPEA を合成し、その後以下のように NaBH_4 を用いて還元することで合成した。まず、150 mM (R)-MBA (pH 9.0) を、反応混合物 1 mL 中で 20°C で 7.5 U の変異型 pkDAO と共に 60 分間インキュベートし、PPEA を合成した。反応終了後、反応液中に 100 mM NaBH_4 を添加し、30 分間静置した。その後生成物を HPLC および GC/MS 分析を用いて同定した。BPEA は、100 mL の反応混合物中の 150 mM (R)-MBA (pH 9.0)、750 U の変異型 pkDAO、および 100 mM NaBH_4 を用いて、最適条件下で (R)-MBA からより大きなスケールで合成した。BPEA は、hexane/AcOEt の段階的溶出

(50:1~25:1)を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。

3-2-10. 酵素反応を用いた(*R*)-MBA と hexylamine からの *N*-(1-phenylethyl)hexane-1-amine の合成と同定

(*R*)-MBA および hexylamine から *N*-(1-phenylethyl)hexane-1-amine を合成するために、5 mM (*R*)-MBA および 150 mM hexylamine(pH 9.0、2 M HCl で調整)と 20 U の変異型 pkDAO を混合した 20 mL の反応液、を 20°C で 4 時間振とうしながらインキュベートした。その後反応液に 100 mM NaBH₄ を添加し、30 分間静置した。*N*-(1-phenylethyl)hexane-1-amine の合成後、生成物を GC/MS を用いて同定した。NMR を用いて生成物を同定するために、反応混合物を hexane で抽出し、メタノール:ジクロロメタン(1:5)による溶出を介してシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。

3-3. 結果と考察

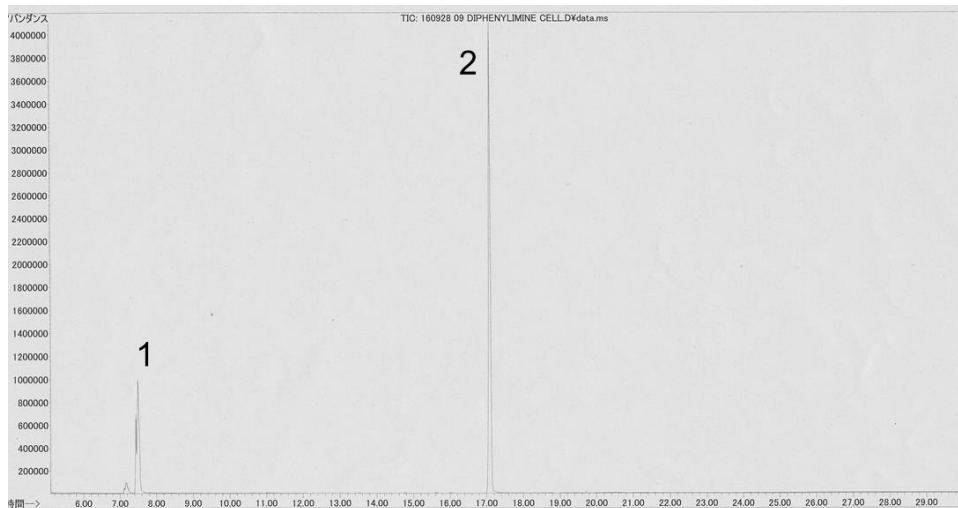
3-3-1. (*R*)-MBA からの PPEA の生成と同定

(*R*)-MBA は変異型 pkDAO の酵素による酸化反応によって、1-phenylethanamine (1-PEI)へ酸化され、水溶液中のイミンの加水分解によって非酵素的に acetophenone に変換される⁷⁷。この反応に高濃度の(*R*)-MBA(>10 mM)を使用した場合、GCMS 分析により、反応生成物が 2 つのピークに分離され、新規ピーク(Figure 3-1A)が検出されることを発見した。MS を解析すると、生成物の 1 つが acetophenone(120.06 m/z)、もう一つが PPEA(213.14 m/z)として同定された(Figure 3-1B)。(*R*)-MBA からの PPEA 合成の反応機構は明らかになっていないが、温和な条件下である水系中で(*R*)-MBA から酵素的に PPEA が生成されていることが分かった。

化学反応では、イミンは一般に有機溶媒中のアミン、ケトン、またはアルデヒドから合成される⁸⁶⁻⁸⁸。Scheller らは、カルボニル化合物と様々なアミン求核剤の組み合わせを用いたイミンレダクターゼによる立体選択的アミン合成を報告している。彼らは¹H-NMR によって benzaldehyde と methylamine からのイミン形成をモニターすることに成功しているが、acetophenone と methylamine からイミンの形成は確認できていない⁸⁹。このデータは、acetophenone のアミノ化が水中条件下では生じにくいことを示唆しており、アルデヒドでは求核性のアミンによって容易にイミン形成できるが、ケトンとなるとそのイミン形成は生じにくいと推測される。以後本章では、PPEA が変異型 pkDAO から形成される

中間体 1-PEI と(*R*)-MBA から生成されることを実験的に明らかにしている。

A



B

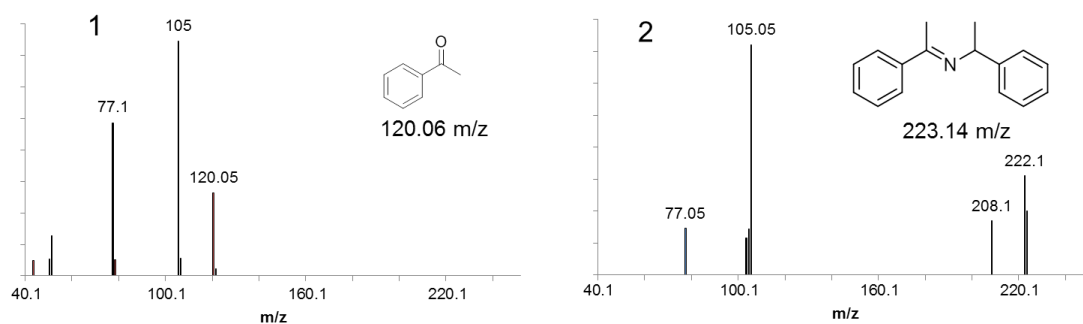


Figure 3-1.変異型 pkDAO との反応による(*R*)-MBA からの反応生成物の同定。
(A) 100 mM (*R*)-MBA と変異型 pkDAO を混合し、1 時間反応後の生成物の GC-MS クロマトグラム(B) その生成物の MS 解析

3-3-2. PPEA 合成反応の最適化

(*R*)-MBA から変異型 pkDAO による PPEA 合成を効率的に行うため、PPEA 合成に最適な pH と温度を解析した。温度、pH を変化させ、生成物として PPEA および副産物として acetophenone の量を HPLC で測定し、酵素活性を算出した。PPEA 合成活性は 35°C まで、温度上昇とともに増加し、pH 範囲 8.0-9.5 で高い活性が得られた(Figure 3-2)。さらに、acetophenone の形成は 50°C が最大で温度の上昇とともに増加していた。20°C では、その反応率は 50°C での反応率の 39%であった(Figure 3-2 B)。そこで反応温度は 20°C が PPEA 合成に最適であ

ると判断した。また、PPEA 合成に最適な(R)-MBA 濃度を検討した。6.25-200 mM (R)-MBA を 2 U の変異型 pkDAO にて pH 9.0 で反応させ、PPEA の酵素活性を測定した。PPEA 合成の酵素活性は 150 mM (R)-MBA で最も高く、反応速度は飽和しており、(R)-MBA の K_m 値は 41 mM と推定された(Figure 3-3)。さらに、PPEA 合成は pH 9.0 および 20°C で最適であり、反応液 1 mL 中の PPEA の効率的な生成には 150 mM (R)-MBA が最適であると判断した。これまで行ってきたデラセミ化反応及び、シアン付加反応によるアミノニトリル合成と同様の条件となった。

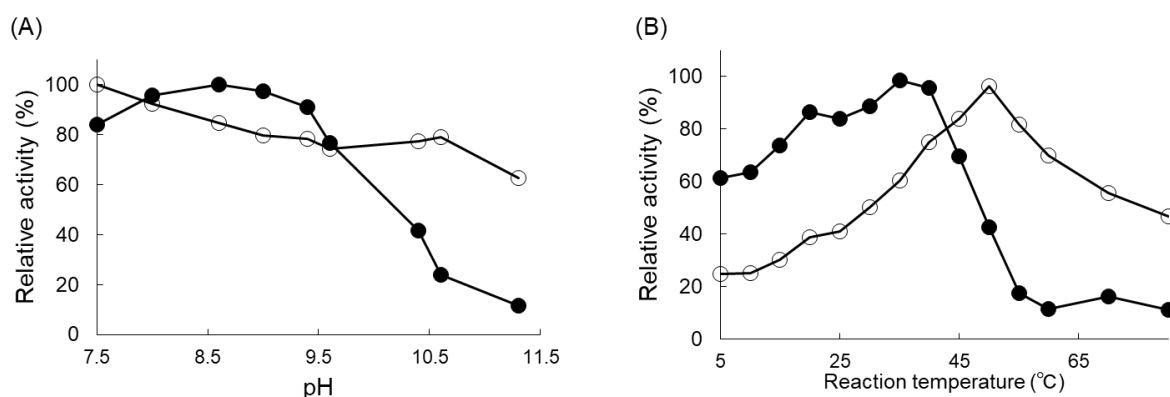


Figure 3-2. PPEA (●) および acetophenone (○) の合成のための酵素活性に対する温度および pH の影響。(A) 反応液は、150 mM (R)-MBA に対して HCl にて pH 7.5~11.3 に調整し、さらに 2 U の変異型 pkDAO を添加した。20°C で 5 分間反応を行った。(B) 反応液は、150 mM (R)-MBA、pH 9.0 (HCl で調整) および変異型 pkDAO 2 U で調整され、5~80°C で 5 分間反応を行った。PPEA および acetophenone の量は、HPLC を用いて測定した。

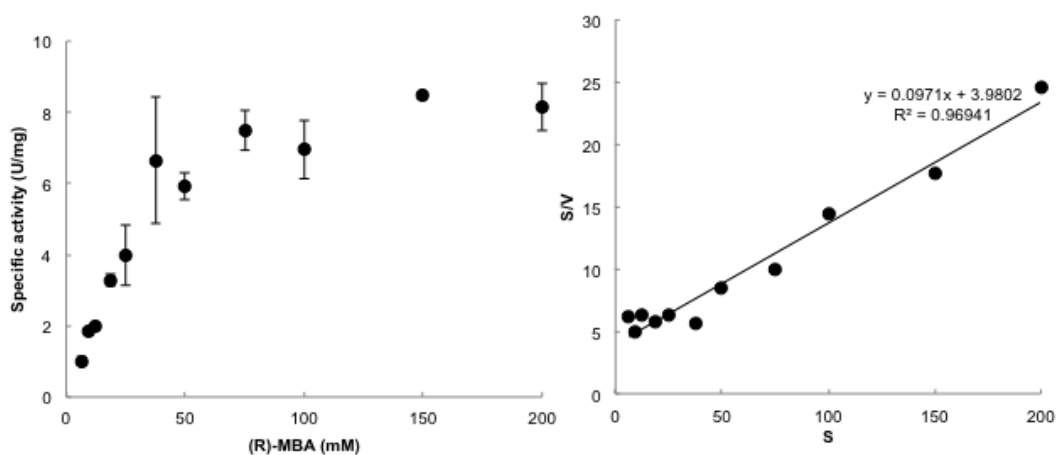


Figure 3-3. 変異型 pkDAO による PPEA 合成反応の速度論的解析。(A) 変異型 pkDAO を用いた (R)-MBA からの PPEA 合成の飽和曲線。(B) 変異型 pkDAO を用

いた(R)-MBA からの PPEA 合成の Hanes-Woolf plot。

3-3-3. (R)-MBA からの PPEA の生成

これまで検討した最適な反応条件、変異型 pkDAO (2 U)、150 mM (R)-MBA (pH 9.0 HClにて調整)にて反応液を調製し、20°Cで60分間反応した。60分で、最大 PPEA を約 47 mM 合成した。一方、acetophenone の生成は、反応時間とともに増加した(Figure 3-4A)。これらの結果は、より長い反応時間が PPEA の効率的な生産に適していないことを示した。実際、60分以上の反応で acetophenone の量が増加し、PPEA は水溶液中で不安定であることが示唆された。徐々に加水分解されて acetophenone、アンモニア、MBA になることが分かっている。そこで、反応時間を60分に固定し、酵素量を最適化した。その結果、2 U もしくはそれ以上の酵素量を用いることでイミンを高収率(最大 68 mM)で合成できることを見出した。(Figure 3-4B)。

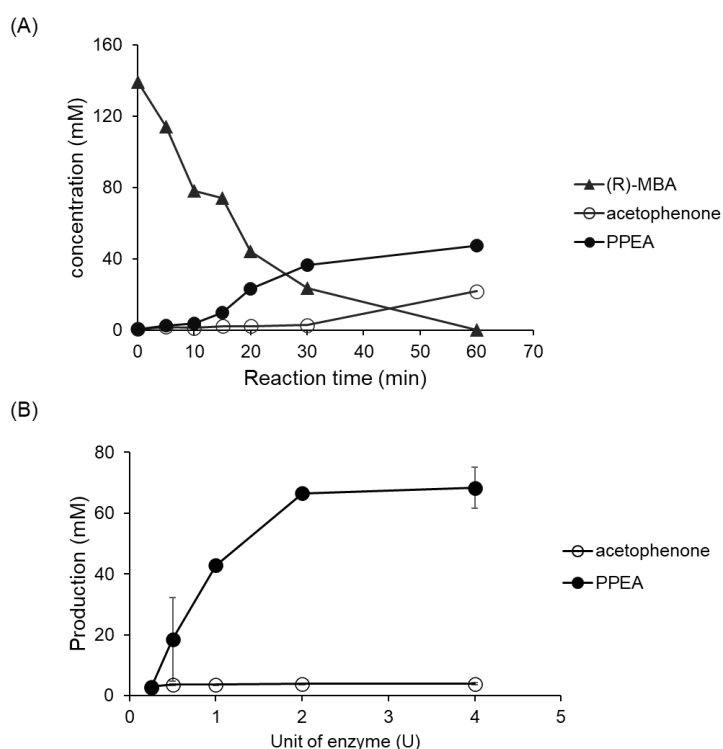


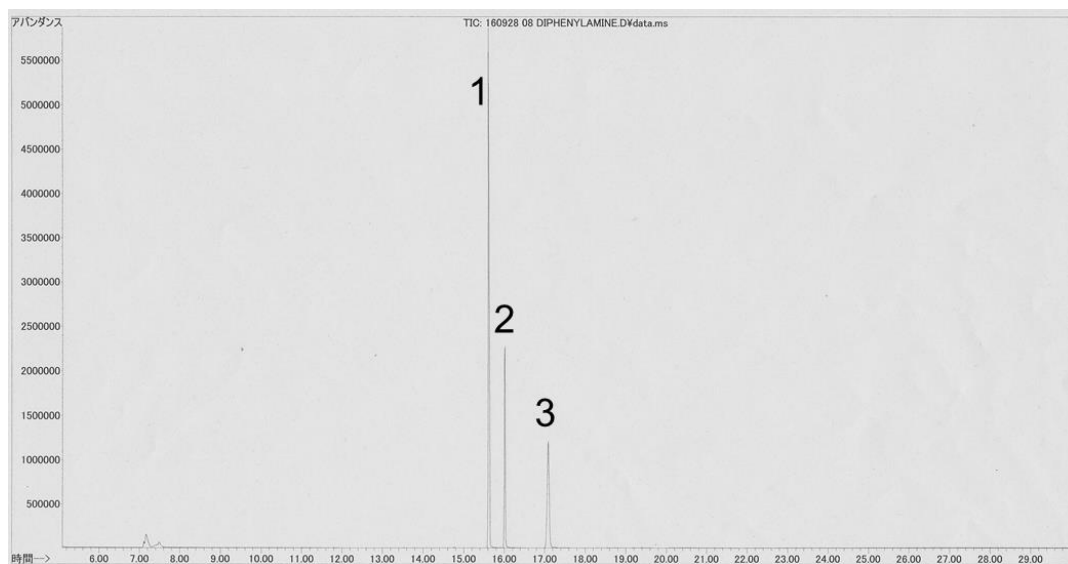
Figure 3-4. 変異型 pkDAO による (R)-MBA (▲) からの PPEA (●) および acetophenone (○) の生成の経時変化。(A) 反応は、150 mM (R)-MBA、pH 9.0 に変異型 pkDAO を 2 U を添加し、開始した。各時間帯で反応液を回収し、GCMS にて PPEA および acetophenone の生成量を測定した。(B) 反応は、150 mM (R)-MBA、pH 9.0 および変異型 pkDAO を 0.5~4 U を用いて、20°C で 60 分間行っ

た。PPEA および acetophenone の量は、GCMS を使用して測定した。

3-3-4. PPEA を介した(R)-MBA からの BPEA の生成

BPEA は β -アミノ酸の立体選択的合成の中間体として魅力的な化合物であり、水中で安定であるため、PPEA を介した(R)-MBA からの BPEA 合成の反応条件を変異型 pkDAO にて検討した⁹⁰。(R)-MBA からの PPEA 合成のための最適条件を、この反応に使用し、PPEA を変異型 pkDAO 7.5 U と 150 mM (R)-MBA から生成させ、PPEA 合成が最大に達した後、反応混合物に 100 mM NaBH₄を加えた。反応生成物を GCMS 分析によって確認すると、GC によって分離されたピーク 1 および 2 の化合物は、MS データベースによって同定されるように、BPEA(225.15 m/z)として同定された。化合物 3 は PPEA(213.14 m/z)として同定された(Figure 3-5 B)。化合物 1 および 2 は同じ MS スペクトルを示したが、GC によって分離された化合物は BPEA のジアステレオマーであると考えられた(Figure 3-5 A ピーク 1 および 2)。化合物 1 および 2 のピーク面積は、それらが等しく形成されていないことを示した。化合物のより詳細な同定は進行中であり、今後の課題である。

(A)



(B)

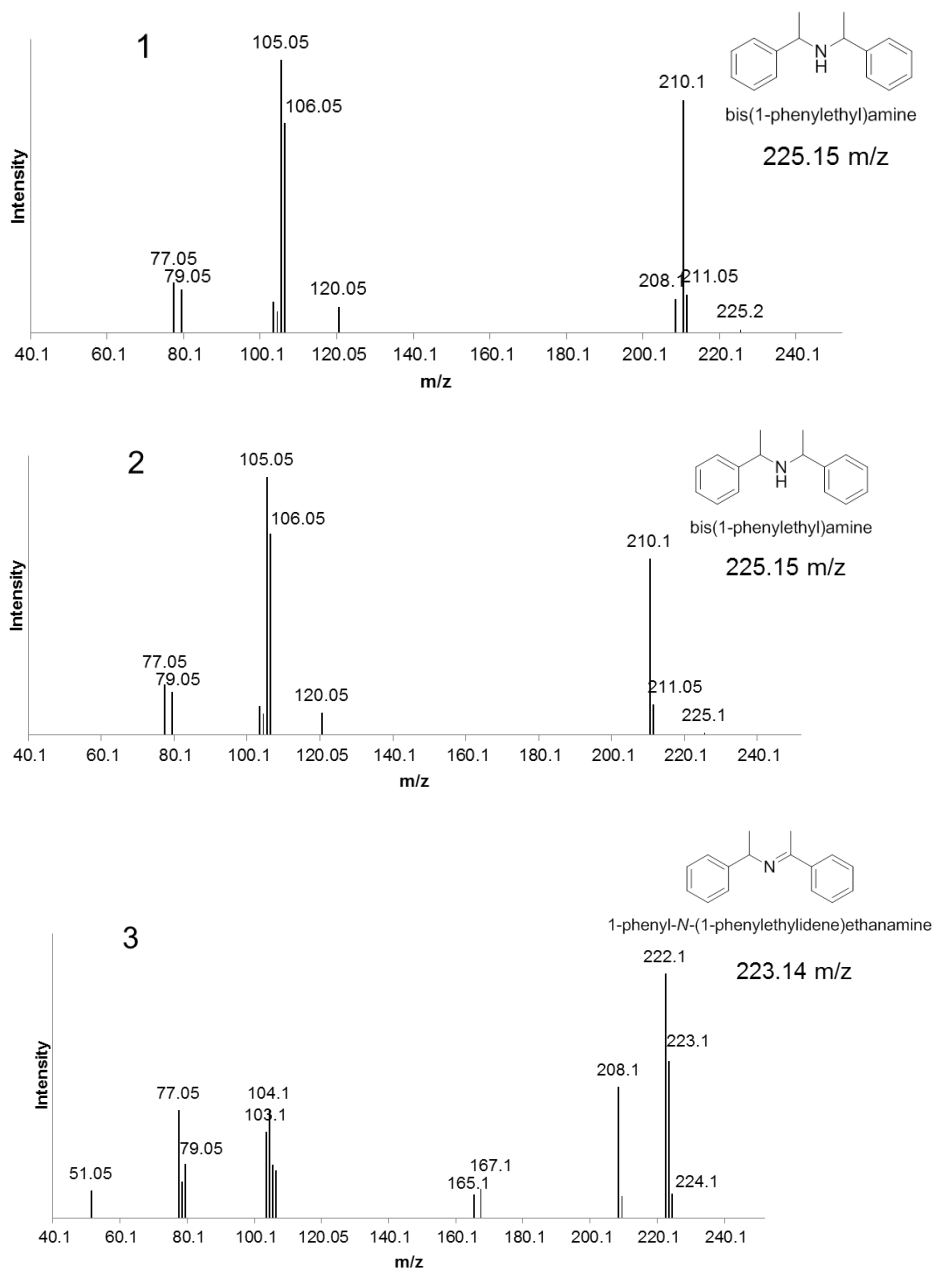


Figure 3-5.変異型 pkDAO および NaBH₄ 添加による(*R*)-MBA からの反応生成物 (BPEA)の同定。(A)生成物の GC クロマトグラム。(B)3 つの生成物の MS 分析。

3-3-5. アルキルアミンを用いた変異型 pkDAO による第一級アミンからのイミン生成の解析

まず、反応液中に変異型 pkDAO を含まない場合 PPEA が形成されるかどうか

かを確認した。この実験では、GC および GC/MS 分析では PPEA は検出されなかった。そこで、(R)-MBA から酸化反応により生成されるイミン 1-PEI が PPEA 合成のための非常に重要な中間体であるという仮説を立て、研究を進めた。まず、変異型 pkDAO の基質として認識できない第一級アミン *n*-hexylamine がイミン 1-PEI を求核付加するか検証した。反応は、*n*-hexylamine や *sec*-ブチルアミンなどのアルキルアミン(変異型 pkDAO が基質としないアミン)150 mM と (R)-MBA(変異型 pkDAO が基質として認識でき、1-PEI に変換できるアミン)を 5 mM を用いて、HCl にて pH を 9.0 に調整し、反応を行った。(R)-MBA を変異型 pkDAO により酸化し、*n*-hexylamine または *sec*-butylamine と反応させると、反応後、対応するイミンと推定される成分が GC-MS によって検出された (Figure 3-6, Figure 3-7A)。また変異型 pkDAO の非存在下では生成物は形成されなかった。この結果は、変異型 pkDAO の作用により (R)-MBA から生成される 1-PEI の α 炭素へのアミンの求核付加によってイミンが形成されることを強く示唆している。次に、PPEA 中の窒素の起源を決定するために ^{15}N 標識 *n*-hexylamine を反応に使用した。*n*-hexylamine が 1-PEI の α 炭素を攻撃し、そのアンモニアを除去すると、 ^{15}N が PPEA に取り込まれ、*n*-hexylamine のアミノ基が求核付加したことを証明できる。 ^{15}N 標識 *n*-hexylamine は、 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ を用いた化学的方法により合成した。 ^{15}N 標識 *n*-hexylamine を付加剤として用いた場合、反応液中に (*E*-*n*-hexyl-1-phenylethan-1-imine- ^{15}N) (^{15}N -HPI) が形成された。GC/MS の結果から *n*-hexylamine をもちいた場合と ^{15}N -*n*-hexylamine を用いた場合で、同じ保持時間に分子量が 1 異なる成分 (^{15}N -*n*-hexylamine の場合に分子量が 1 大きい成分) が検出されていたことから、変異型 pkDAO により酸化され生成される 1-PEI に hexylamine のアミノ基が求核付加していることが証明された。(Figure 3-7B)。

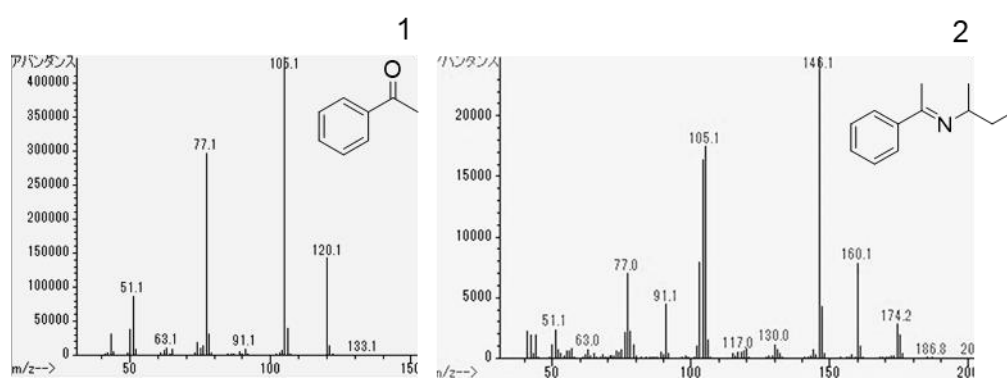
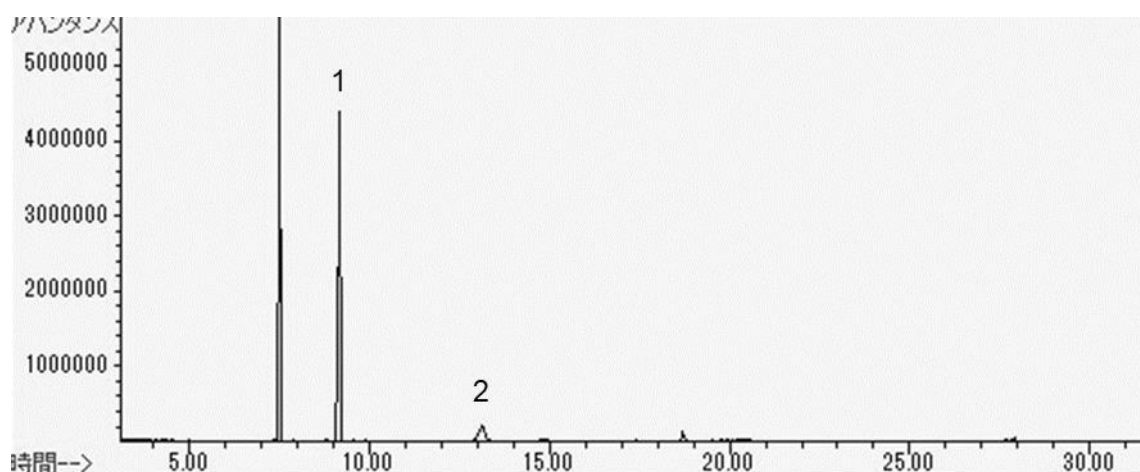
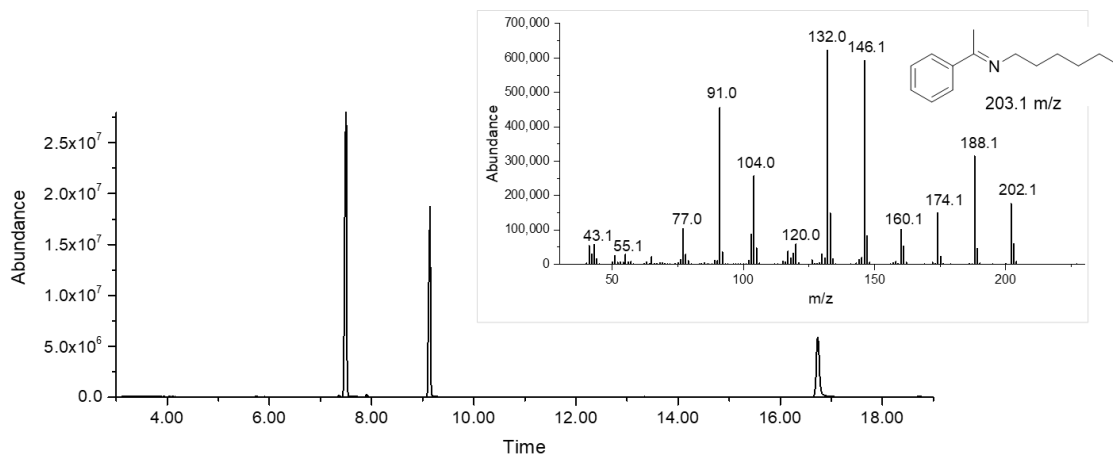
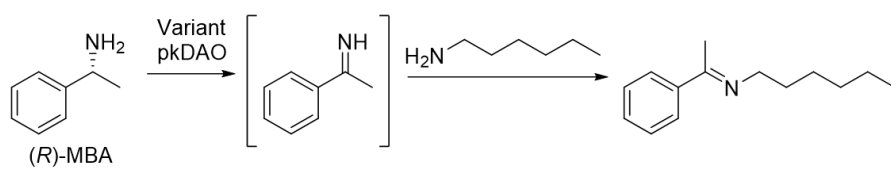


Figure 3-6. sec-butylamine を用いた変異型 pkDAO と (R)-MBA の酸化反応によるイミン合成の GC-MS による生成物解析。下記反応液を hexane で抽出後 GC-MS で分析した。反応は 5 mM (R)-MBA および 150 mM Sec-butylamine を pH 9.0 に HCl にて調整し、変異型 pkDAO 2 U を加えたのち、20°C で 30 分間行った。

(A)



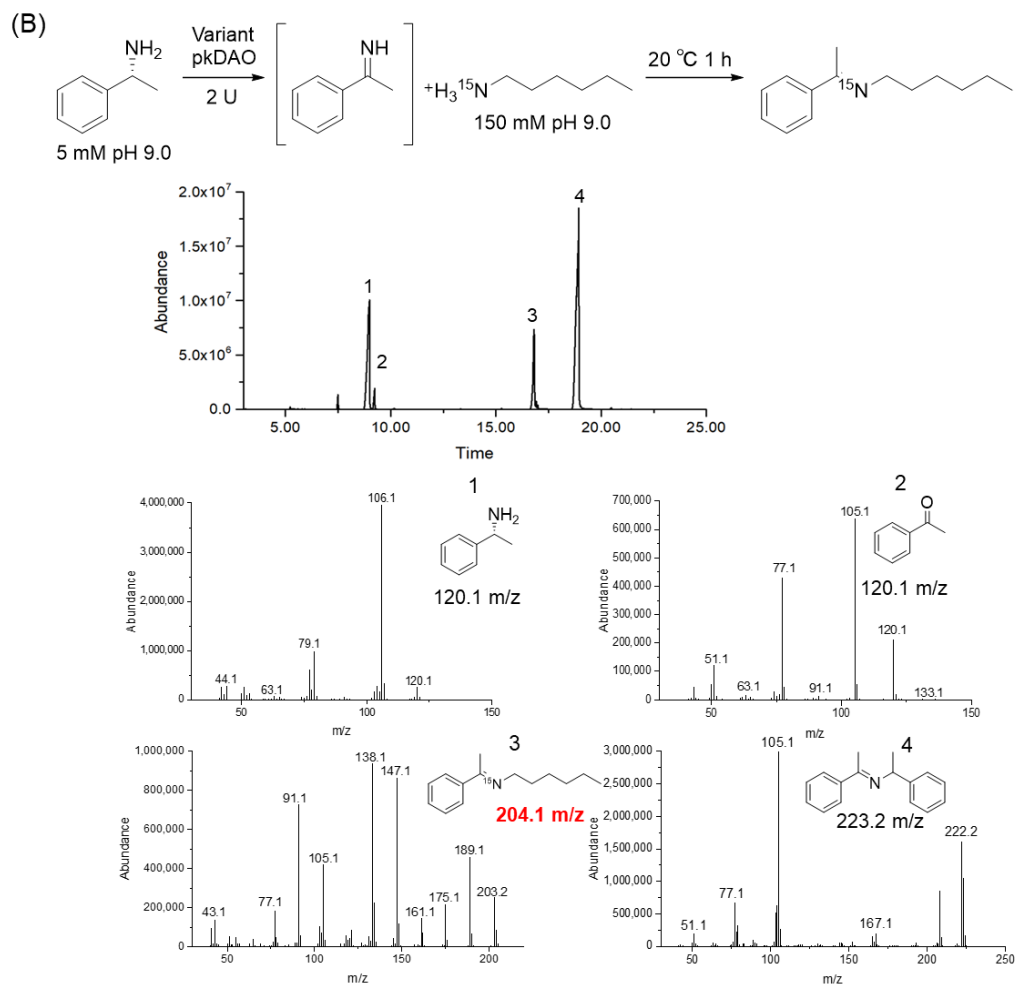
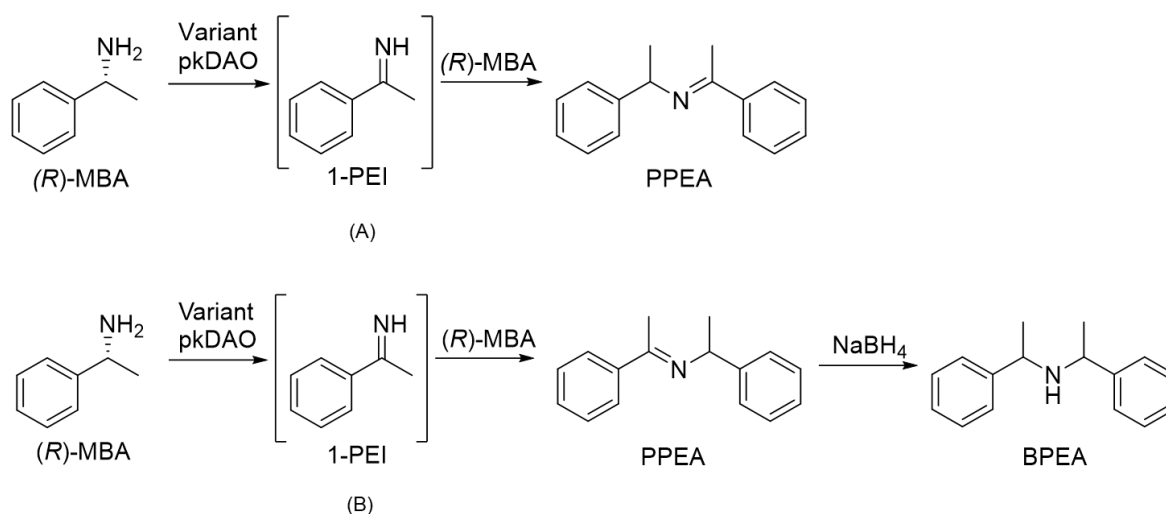


Figure 3-7. *n*-hexylamine(A)または ¹⁵N-*n*-hexylamine(B)を用いた変異型 pkDAO と (*R*)-MBA の酸化反応によるイミン合成の GC-MS による生成物解析。反応液には 5 mM (*R*)-MBA および 150 mM *n*-hexylamine もしくは ¹⁵N-*n*-hexylamine を pH 9.0 に HCl にて調整し、変異型 pkDAO 2 U を加えたのち、20°C で 1 時間反応した。



Scheme 3-1. (R)-MBA から変異型 pkDAO を用いた反応。(A)PPEA を生成するための酵素反応。(B)BPEA を生成するための酵素反応。

3-3-6. 変異型 pkDAO による (R)-MBA の酸化によるイミン生成反応の考察

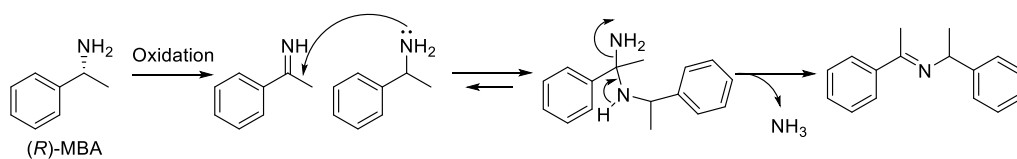
第一級アミンからのイミン類の合成のための有機および金属触媒の使用は、以前から報告されている^{72, 91, 92}。これらの化学的方法は有用であると認識されているが、高濃度の金属イオン、有機溶媒、高温、高圧などに、過酷な条件下で実施される。したがって、酵素法は、イミン合成の代替として環境に優しい方法の一つである。しかしながら、これまでに直接の化学的証拠を有する第一級アミンからの酵素的イミン合成に関する報告はない⁹³。第一級アミンが酸化して生成するイミンは水溶液中で不安定であり、加水分解によってケトンやアルデヒドに変換されるため、酵素によるイミン合成法の開発は困難とされてきたと推測する。この章では、第一級アミンからのイミン生成のため、新しい酵素的方法を開発し、イミンが水溶液中で合成できることを示した。具体的には、温和な条件下での変異型 pkDAO の作用によって、(R)-MBA から 1-PEI を介した PPEA 生成を確認し、その反応条件を最適化した(Scheme 3-1A)。さらに、PPEA 合成が完了した後に反応液に NaBH₄ を添加することにより、PPEA を介して (R)-MBA を BPEA に変換する新しい酵素法を開発できた(Scheme 3-1B)。BPEA は水溶液中で安定であったため、シリカゲルカラムクロマトグラフィーなどにより容易に単離精製できると考えられる。

しかし、課題も多くある。やはりイミンが水中で不安定であるため、直接イミンを反応系から取り出すことは難しい。この章では還元剤を用い、アミンへの変換を行っているが、より効率的な反応、生成物の回収ができれば魅力的である。イミン類の効率的な製造には、水溶液中での生成物の安定性が必要であ

ることを示唆している。例えば、有機溶剤と水の二相反応系の使用は、PPEAなどの生成物に対して有効であると考えられる。今回、PPEAは水と混合しないヘキサン等で簡単に抽出できる。したがって、溶媒安定性を有する酵素のスクリーニングまたは機能改変、固定化など、さらなる効率的なイミンの酵素合成を促進するための検討を進めることで、反応の効率化が可能と期待できる。また(*R*)-MBAなどの第一級アミンからの変異型 pkDAO によって生成されるイミン中間体の求核剤としてより多様な一級アミンが使用されると、多種多様なイミンがこの反応系にて合成されることが期待される。今後もこの報告をきっかけに様々な研究の発展が行われることを強く望んでいる。

また最後に第一級アミンから変異型 pkDAO によるイミン合成の反応機構を以下のように提案する。*(R)*-MBA および変異型 pkDAO の酸化により生成した 1-PEI は、反応のトリガーとして機能する。*(R)*-MBA は、PPEA を形成するため 1-PEI に対する求核剤として作用する(Scheme 3-2)。通常、アミンの酵素による酸化によって生成したイミンは水中で短寿命であり、加水分解によってアルデヒドおよびケトンに変換される。今回、変異型 pkDAO により生成される 1-PEI は求核付加もしくは加水分解されるまで、共鳴構造を持つ安定した形で存在している。水よりも多く、強い求核性基質(*(R)*-MBA)が系内に存在すると、1-PEI の α -炭素が求核剤を受け入れ、別の安定化合物(PPEA)が形成される。

第一級アミンからイミンを合成するための上記の反応は、多種多様なイミンおよびその誘導体の酵素合成のための新規な方法を開発するために拡張できることから、今後この反応をきっかけとして、酵素を用いた環境にやさしい新規物質生産手法が多く構築されることを願う。



Scheme 3-2. 変異型 pkDAO を用いた第一級アミンからのイミン合成の反応機構

総括

第1章

この章では、*BmHNL* のランダム変異ライブラリーから (*S*)-mandelonitrile に対して高活性を有する酵素をスクリーニングし、Asn156 の変異が (*S*)-mandelonitrile 生成の向上に寄与することを実証した。さらに H103C/N156X(X; タンパク質構成アミノ酸 19 種) の変異型酵素の中で、H103C/N156G は (*S*)-mandelonitrile に対して最も高い比活性と立体選択性を示した。H103C/N156G によって生成された (*S*)-mandelonitrile の鏡像体過剰率は、野生型 *BmHNL* の 55% から 93% に増加した。速度論的解析により、H103C/N156G による (*S*)-mandelonitrile に対する高活性は、(*S*)-mandelonitrile に対する触媒効率の向上と (*R*)-mandelonitrile に対する触媒効率の低下の組み合わせによって達成されることが示された。したがって、(*S*)-mandelonitrile に対する H103C/N156G 変異体の *E* 値は、H103C 変異体の *E* 値よりも 5.3 倍高くなった。Asn156 は (*S*)-mandelonitrile と直接相互作用できないが、基質結合残基を含む α ヘリックスのタンパク質表面に位置しており、Asn156 の変異は基質と相互作用するアミノ酸残基を含む α ヘリックス構造の立体構造変化に影響し、*BmHNL* における (*S*)-mandelonitrile との相互作用を改善している可能性がある。この詳細なメカニズムを明らかにするには、Asn156 変異体の X 線構造解析が今後の課題である。また近年、効率的にタンパク質工学を進めるために、基質結合ポケット周辺のアミノ酸残基に変異導入を行うような、一部のアミノ酸に変異のターゲットを絞るアプローチが多く報告されている。しかし、今回のような基質と直接相互作用しないアミノ酸残基の置換が酵素活性や、立体選択性におおきく影響する場合もある。酵素の変異導入による機能改変において立体選択性の向上など予測が難しい機能改変では、酵素全体のアミノ酸残基全体に対してランダムに変異導入を行い、その変異による機能向上を見逃さず効率的に高活性体を見つけるスクリーニングのプロセス(発現量、変異の導入率、変異体の培養発現手法、高活性体の効率的な探索手法)を最適化することも重要と考えられる。また HNL は光学活性シアノヒドリンの合成に有用な酵素であり、よく研究されている酵素の一つである。産業利用のためには、さらなる高活性で安定性の高い酵素が求められている。今回、ランダム変異導入により、他のアミノ酸変異により高活性を示した結果も得られており、Asn156 変異と組み合わせることでより高活性な *BmHNL* 変異体の取得も可能と考えられる。

第2章

ブタ腎臓由来 D-アミノ酸オキシダーゼ(pkDAO)または *Crotalus atrox* 由来 L-

アミノ酸オキシダーゼによって D-または L-phenylalanine および KCN から α -アミノニトリルを合成できることを実証した。第一級アミンの酸化反応を触媒する変異型 pkDAO では、(R)-MBA から 2MePGN を合成した。この反応は、通常のアキシダーゼ反応において、KCN が添加されないと、水中では加水分解が進行し、対応するケト酸およびケトンが生成する。KCN を反応中に添加することによってアミノ酸またはアミンから生成されるイミンにシアン化物が付加されたことを示唆する。さらに変異型 pkDAO による酸化とシアン添加のワンポット反応による (R)-MBA からの 2MePGN の合成反応の条件を最適化した。最適化条件において、それぞれ約 4.8 mM および 9.2 mM 2MePGN を、20°C で 1 時間または 5°C で 6 時間反応を行うことによって合成することができた。さらに上記の反応は、変異型 pkDAO およびニトリラーゼ AY487533 によって非天然アミノ酸を合成するために使用できる。このカスケード反応を用い、最適条件下で (R)-MBA から 2MePGN を介して 2MePG を、98% の収率で効率的に合成した。この章ではこの新規酵素法を用いて、2MePG、F2MePG、2EtPG などの第一級アミンから様々な非天然 α アミノ酸を合成できることを示した。

これはアミノ酸オキシダーゼおよびアミノオキシダーゼを用いた酸化シアン化による α -アミノニトリルおよび非天然 α -アミノ酸の酵素合成を示した初めての報告である。この新規反応は、新たな非天然の α -アミノ酸の酵素合成の可能性を生み出し、シアン化と酵素によるニトリル加水分解を組み合わせたワンポット反応により、環境に優しい合成に貢献できる可能性がある。さらにキラルな貴重なアミノ酸の立体選択的合成的のために、アミノオキシダーゼとアミノ酸オキシダーゼの基質特異性の改善や、立体選択的なニトリラーゼを用いることでのキラルな非天然アミノ酸合成の研究の発展により、より付加価値の高い反応として注目されることを期待する。またすでに報告のある α -アミノニトリルを非立体選択的にニトリルヒドラーゼでアミノ酸アミドへ加水分解し、その後、アミノ酸アミドラーゼおよび立体選択的なアミダーゼによる加水分解反応にて、ラセミ体 α -アミノニトリルから立体選択的な α -アミノ酸への合成反応を行うダイナミックな光学分割法¹⁰に、今回の一級アミンから α -アミノニトリルを合成する反応を組み合わせることにより、一級アミンから立体選択的に α -アミノ酸の合成が可能になる。ニトリルヒドラーゼなどのシアンに対する耐性における機能改変などの課題もあるが、酵素反応の組み合わせにより、非常に興味深い、付加価値の高い反応を実現できる。

第 3 章

第 2 章中、(R)-MBA からの 2MePGN の酵素生成における副産物として PPEA が生成されていることに着目し、酵素量、pH および反応温度などの最適化によ

り PPEA 生成の最大化を検討した。また PPEA を反応後、還元剤 NaBH_4 によりさらに BPEA まで還元することも可能であることを確認した。さらに変異型 pkDAO が基質として認識できないアルキルアミンを反応系に添加することで、(R)-MBA とそのアルキルアミンがカップリングして生成するイミンが合成することも確認した。さらに ^{15}N 標識 *n*-hexylamine を用い、この反応における生成機構を明らかにしている。(R)-MBA の変異型 pkDAO の酸化により生成する 1-PEI が反応系に存在する求核性のある第一級アミンのターゲットになることが明らかとなった。酵素反応におけるイミン生成反応も初めての報告であり、今後さらに変異型 pkDAO の基質特異性が改変されることで、より多様なイミン合成反応への応用が期待される。第 2 章、第 3 章では化学反応と、酵素反応を組み合わせ、新規な反応を構築できた事例を示した。酵素反応だけ、化学反応では効率的に進行しない反応でも、反応を組み合わせ、その反応条件を最適化することで新規な反応系を構築することも可能であることを示した。

現在、自然界から様々な酵素が報告され、さらに遺伝子情報各においても生物のゲノム解析等も進み非常に多くのデータが蓄積されている。本研究ですでに報告のある酵素に対して、タンパク質工学を用いた機能改変を行い、様々な反応に用いた。HNL においては、様々な植物などの生物から発見されており、その 1 次構造や X 線構造解析が明らかとなっていることから、構造情報を用いた基質特異性の改変などが進められている。しかし立体選択性に関する改変はなかなか困難であり、例えばすでに多く報告のある R-HNL から数種しか報告されていない S-HNL への立体選択性の改変等の報告はなく、X 線構造解析の情報のみでは予測が難しい。S 体シアノヒドリン合成において酵素の選択性が限られる点は、大きな課題となっている。本研究における Asn156 の変異による立体選択性の向上への貢献は、HNL において新しい発見であり、詳細にそのメカニズムを解明することで、HNL の立体選択性に関する新たな知見となる可能性がある。

また既存の酵素においてもその反応メカニズムを理解し、反応系を工夫することでこれまで困難とされていた反応を構築することも可能である。アミノ酸オキシダーゼは古くから知られる酵素の一つであるが、その反応ではアミノ酸が酸化されイミノ酸が形成し、水が付加する反応で α -ケト酸まで反応が進行する。本研究ではシアンや一級アミンを用い、その求核性を利用して、オキシダーゼ反応でアミンやアミノ酸から生成されるイミンをアミノニトリルや、イミンに変換することに成功した。他にも求核性のある分子は多くあり、例えばチオール基を持った化合物を添加することで、C-S 結合形成を行うことも可能であると考えられる。こういった多様な求核性の高い分子を反応系に共存させることにより、水中で様々な分子の合成が可能になると考えられる。

謝辞

今回の私の論文博士取得の背景には、複数の先生方の尽力があり、本研究をまとめることができました。

まず、富山県立大学の浅野泰久教授に対し、本研究の過程での継続的な指導と励ましに心から感謝しています。浅野先生は、私に研究へのアプローチ方法と、目標を達成するために粘り強くある必要があることを教えてくれました。また様々な挑戦的な課題や経験をさせていただき、人間的な面でも大きく成長させてくれました。奈良先端大学院大学の高木博史教授には、大学院時代にご指導いただき、その後も変わらず親密にコミュニケーションをとっていただき、今回の論文博士取得の際も、ご尽力いただき、成果をまとめることができました。

この研究のほとんどは、富山県立大学での **ERATO** 浅野酵素活性分子プロジェクトの中で行われた成果であり、富山県立大学生物・医薬品工学研究センターおよび生物工学科の酵素化学工学研究室並びに **JST**、**ERATO** および浅野酵素活性分子プロジェクトのメンバーの皆様のご厚意に深く感謝いたします。特に磯部公安教授との活発な議論、論文作成へ協力いただいたことに感謝します。さらに、日々の研究生活において、現在立命館大学の松井大亮助教および富山県衛生研究所の安川和志研究員には多くのアドバイスをいただき研究を進めるうえで、非常にお世話になりました。また特に第 3 章の報告では、**Kunwadee Palasin** 研究員に実験および論文作成にご協力いただきました。また岩崎源司博士も有機合成の部分でご支援いただき、この成果をまとめることができ、博士取得が可能になりました。皆様のご支援のおかげで、長い期間の間、モチベーションを保ち、様々な困難な状況を乗り越えることができました。

最後になりましたが、家族の励まし、支援、寛容さに感謝します。

参考文献

1. H. Gröger. (2003). Catalytic Enantioselective Strecker Reactions and Analogous Syntheses. *Chem. Rev* 103, 2795-2827.
2. Bak S, Kahn RA, Nielsen HL, et al. (1998). Cloning of three A-type cytochromes P450, CYP71E1, CYP98, and CYP99 from *Sorghum bicolor* (L.) Moench by a PCR approach and identification by expression in *Escherichia coli* of CYP71E1 as a multifunctional cytochrome P450 in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin. *Plant Mol Biol.* 36, 393-405.
3. M. Lechtenberg, A. Nahrstedt. (1999). Cyanogenic glycosides. In 'Naturally occurring glycosides. *John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom.* 147-191.
4. T. Yamaguchi, K. Yamamoto, Y. Asano. (2014). Identification and characterization of CYP79D16 and CYP71AN24 catalyzing the first and second steps in L-phenylalanine-derived cyanogenic glycoside biosynthesis in the Japanese apricot, *Prunus mume* Sieb. et Zucc. *Plant Molec Biol.* 86(1), 215-223.
5. M. Dadashipour, Y. Asano. (2011). Hydroxynitrile Lyases: Insights into Biochemistry, Discovery, and Engineering. *ACS Catalysis.* 1(9), 1121-1149.
6. Y. Kato, R. Ooi, Y. Asano. (2000). Distribution of aldoxime dehydratase in microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(6), 2290-2296.
7. Y. Asano. (2002). Overview of screening for new microbial catalysts and their uses in organic synthesis--selection and optimization of biocatalysts. *J Biotechnol.* 94(1), 65-72.
8. Y. Asano. (2015). Hydrolysis of Nitriles to Amides, In *Science of Synthesis: Biocatalysis in Organic Synthesis*, K. Faber, W.D. Fessner, N. Turner, (Germany Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG), pp. 255-260.
9. Y. Asano and S. Yamaguchi. (2005). Dynamic kinetic resolution of amino acid amide catalyzed by D-aminopeptidase and alpha-amino-epsilon-caprolactam racemase. *J. Amer. Chem. Soc.*, 127, 7696-7697.
10. K. Yasukawa, R. Hasemi and Y. Asano. (2011). Dynamic Kinetic Resolution of α -Aminonitriles to Form Chiral α -Amino Acids. *Adv. Syn. Catal.* 353, 2328-2332.
11. Y. Asano, K. Tamura, N. Doi, T. Ueatrongchit, A. H-Kittikun, T. Ohmiya. (2005). Screening for new hydroxynitrilases from plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69(12), 2349-2357.
12. M. Dadashipour, Y. Ishida, K. Yamamoto and Y. Asano. (2015). Discovery and molecular and biocatalytic properties of hydroxynitrile lyase from an invasive

- millipede, *Chamberlinius hualienensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 10605-10610.
13. Y. Miki, Y. Asano. (2014). Biosynthetic pathway for the cyanide-free production of phenylacetonitrile in *Escherichia coli* by utilizing plant cytochrome P450 79A2 and bacterial aldoxime dehydratase. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(21), 6828-6836.
 14. R. Metzner, S. Okazaki, Y. Asano and H. Gröger. (2014). Cyanide-free Enantioselective Synthesis of Nitriles: Synthetic Proof of a Biocatalytic Concept and Mechanistic Insights. *ChemCatChem*, 6, 3105-3109.
 15. K. Yasukawa, S. Nakano and Y. Asano. (2014). Tailoring D-amino acid oxidase from the pig kidney to *R*-stereoselective amine oxidase and its use in the deracemization of α -methylbenzylamine. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 4428-4431.
 16. R. N. Patel. (2008). Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *Coord. Chem. Rev.* 252, 659-701.
 17. D. J. Pollard, J. M. Woodley, (2007). Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends Biotechnol.* 25, 66-73.
 18. A. Glieder, R. Weis, W. Skranc, P. Poehlauer, I. Dreveny, S. Majer, M. Wubbolts, H. Schwab, K. Gruber. (2003). Comprehensive step-by-step engineering of an (*R*)-hydroxynitrile lyase for large-scale asymmetric synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 4815-4818.
 19. J. Andexer, J. von Langermann, A. Mell, M. Bocola, U. Kragl, T. Eggert, M. Pohl. (2007). An *R*-selective hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana* with an alpha/beta-hydrolase fold. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, 8679-8681.
 20. U. Hanefeld. (2013). Immobilisation of hydroxynitrile lyases. *Chem. Soc. Rev.* 42, 6308-6321.
 21. K. Steiner, A. Glieder, M. Gruber-Khadjawi. (2015). Biocatalysis in Organic Synthesis 2. K. Faber, W.-D. Fessner, N. J. Turner. (Stuttgart: Thieme), pp. 1-31.
 22. Y. Fukuta, S. Nanda, Y. Kato, H. Yurimoto, Y. Sakai, H. Komeda, Y. Asano. (2011). Characterization of a new (*R*)-hydroxynitrile lyase from the Japanese apricot *Prunus mume* and cDNA cloning and secretory expression of one of the isozymes in *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 214-220.
 23. T. Ueatrongchit, K. Tamura, T. Ohmiya, A. HKittikun, Y. Asano. (2010). Hydroxynitrile lyase from *Passiflora edulis*: Purification, characteristics and application in asymmetric synthesis of (*R*)-mandelonitrile. *Enzyme Microb. Technol.* 46, 456-465.
 24. I. Hajnal, A. Łyskowski, U. Hanefeld, K. Gruber, H. Schwab, K. Steiner. (2013). Biochemical and structural characterization of a novel bacterial manganese-dependent hydroxynitrile lyase. *FEBS J.* 280, 5815-5828.

25. M. Hasslacher, M. Schall, M. Hayn, H. Griengl, S. D. Kohlwein, H. Schwab. (1996). Molecular cloning of the full-length cDNA of (*S*)-hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*. Functional expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* and identification of an active site residue. *J. Biol. Chem.* 271, 5884-5891.
26. H. Wajant, K. Pfizenmaier. (1996). Identification of potential active-site residues in the hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 271, 25830-25834.
27. H. Wajant, K.W. Mundry. (1993). Hydroxynitrile lyase from *Sorghum bicolor*: a glycoprotein heterotetramer. *Plant Science.* 89, 127-133.
28. J. N. Andexer, J. V. Langermann, U. Kragl, M. Pohl. (2009). How to overcome limitations in biotechnological processes - examples from hydroxynitrile lyase applications. *Trends Biotechnol.* 27, 599-607.
29. H. Semba, E. Ichige, T. Imanaka, H. Atomi, H. Aoyagi. (2008). Efficient production of active form of recombinant cassava hydroxynitrile lyase using *Escherichia coli* in low-temperature culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 563-569.
30. M. Schmidt, S. Hervé, N. Klempier, H. Griengl. (1996). Preparation of optically active cyanohydrins using the (*S*)-hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*. *Tetrahedron.* 52, 7833-7840.
31. M. Dadashipour, M. Yamazaki, K. Momonoi, K. Tamura, K. Fuhshuku, Y. Kanase, E. Uchimura, G. Kaiyun, Y. Asano. (2011). *S*-selective hydroxynitrile lyase from a plant *Baliospermum montanum*: molecular characterization of recombinant enzyme. *J. Biotechnol.* 153, 100-110.
32. Y. Asano, M. Dadashipour, M. Yamazaki, N. Doi, H. Komeda. (2011). Functional expression of a plant hydroxynitrile lyase in *Escherichia coli* by directed evolution: creation and characterization of highly in vivo soluble mutants. *Prot. Eng. Des. Sel.* 24, 607-616.
33. H. Semba, Y. Dobashi, T. Matsui. (2008). Expression of hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* in yeast and its application in (*S*)-mandelonitrile production using an immobilized enzyme reactor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 1457-1463.
34. G. Gartler, C. Kratky, K. Gruber. (2007). Structural determinants of the enantioselectivity of the hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*. *J. Biotechnol.* 129, 87-97.
35. M. Dadashipour, Y. Fukuta, Y. Asano. (2011). Comparative expression of wild-type and highly soluble mutant His103Leu of hydroxynitrile lyase from *Manihot*

- esculenta* in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Prot. Expr. Purif.* 77, 92-97.
36. S. Nakano, M. Dadashipour, Y. Asano. (2014). Structural and functional analysis of hydroxynitrile lyase from *Baliospermum montanum* with crystal structure, molecular dynamics and enzyme kinetics. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.* 1844, 2059-2067.
 37. M. T. Reetz, S. Prasad, J. D. Carballeira, Y. Gumulya, M. Bocola. (2010). Iterative saturation mutagenesis accelerates laboratory evolution of enzyme stereoselectivity: rigorous comparison with traditional methods. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 9144-9152.
 38. K. Liebeton, A. Zonta, K. Schimossek, M. Nardini, D. Lang, B. W. Dijkstra, M. T. Reetz, K.E. Jaeger. (2000). Directed evolution of an enantioselective lipase. *Chem. Biol.* 7, 709-718.
 39. A. Strecker, (1850). Ueber die künstliche Bildung der Milchsäure und einen neuen, dem Glycocoll homologen Körper. *Justus Liebigs Annalen der Chemie.* 75, 27-45.
 40. D. Enders and J. P. Shilvock. (2000). Some recent applications of α -amino nitrile chemistry. *Chem. Soc. Rev.* 29, 359-373.
 41. D. B. Ushakov, K. Gilmore, D. Kopetzki, D. T. McQuade and P. H. Seeberger, (2014). Continuous-flow oxidative cyanation of primary and secondary amines using singlet oxygen. *Angew. Chem.*, 53, 557-561.
 42. Y. Asano, A. Yamada, Y. Kato, K. Yamaguchi, Y. Hibino, K. Hirai and K. Kondo. (1990). Enantioselective synthesis of (*S*)-amino acids by phenylalanine dehydrogenase from *Bacillus sphaericus*: use of natural and recombinant enzymes. *J. Org. Chem.* 55, 5567-5571.
 43. S. Wiyakrutta and V. Meevootisom. (1997). A stereo-inverting D-phenylglycine aminotransferase from *Pseudomonas stutzeri* ST-201: purification, characterization and application for D-phenylglycine synthesis. *J. Biotechnol.* 55, 193-203.
 44. J. Qiu, E. Su, W. Wang and D. Wei. (2014). High yield synthesis of D-phenylglycine and its derivatives by nitrilase mediated dynamic kinetic resolution in aqueous-1-octanol biphasic system. *Tetrahedron Lett.* 55, 1448-1451.
 45. T. C. Bhalla, A. Miura, A. Wakamoto, Y. Ohba and K. Furuhashi. (1992). Asymmetric hydrolysis of α -aminonitriles to optically active amino acids by a nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* PA-34. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 184-190.
 46. V. Kohler, K. R. Bailey, A. Znabet, J. Raftery, M. Helliwell and N. J. Turner. (2010). Enantioselective biocatalytic oxidative desymmetrization of substituted

- pyrrolidines. *Angew. Chem.*, 49, 2182-2184.
47. C. Setoyama, R. Miura, Y. Nishina, K. Shiga, H. Mizutani, I. Miyahara and K. Hirotsu. (1996). Crystallization of expressed porcine kidney D-amino acid oxidase and preliminary X-ray crystallographic characterization. *J. Biochem*, 119, 1114-1117.
 48. R. G. Murray, D. M. Whitehead, F. Le Strat and S. J. Conway. (2008). Facile one-pot synthesis of 5-substituted hydantoins. *Org. Biomol. Chem.*, 6, 988-991.
 49. R. C. Atkinson, F. Fernandez-Nieto, J. Mas Rosello and J. Clayden. (2015). Pseudoephedrine-Directed Asymmetric α -Arylation of α -Amino Acid Derivatives. *Angew. Chem.*, 54, 8961-8965.
 50. R. Sarges, S. W. Goldstein, W. M. Welch, A. C. Swindell, T. W. Siegel and T. A. Beyer. (1990). Spiro hydantoin aldose reductase inhibitors derived from 8-aza-4-chromanones. *J. Med. Chem.* 33, 1859-1865.
 51. J. Handzlik, A. J. Bojarski, G. Satala, M. Kubacka, B. Sadek, A. Ashoor, A. Siwek, M. Wiecek, K. Kucwaj, B. Filipek and K. Kiec-Kononowicz. (2014). SAR-studies on the importance of aromatic ring topologies in search for selective 5-HT(7) receptor ligands among phenylpiperazine hydantoin derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 78, 324-339.
 52. D. E. Robertson, J. A. Chaplin, G. DeSantis, M. Podar, M. Madden, E. Chi, T. Richardson, A. Milan, M. Miller, D. P. Weiner, K. Wong, J. McQuaid, B. Farwell, L. A. Preston, X. Tan, M. A. Snead, M. Keller, E. Mathur, P. L. Kretz, M. J. Burk and J. M. Short. (2004). Exploring nitrilase sequence space for enantioselective catalysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2429-2436.
 53. J. A. Chaplin, D. P. Weiner, A. Milan, E. Chi, J. M. Short, M. Madden, M. Burk, D. Robertson, G. Desantis. (2011). Nitrilases. EP2327766 A1.
 54. Y. Asano, A. Nakazawa and K. Endo. (1987). Novel phenylalanine dehydrogenases from *Sporosarcina ureae* and *Bacillus sphaericus*. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 262, 10346-10354.
 55. W. Hummel, H. Schütte and M.-R. Kula. (1981). Leucine dehydrogenase from *Bacillus sphaericus*. Optimized production conditions and an efficient method for its large-scale purification. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 12, 22-27.
 56. Y. Kuwahara, N. Shimizu and T. Tanabe. (2011). Release of hydrogen cyanide via a post-secretion Schotten-Baumann reaction in defensive fluids of polydesmoid millipedes. *J. Chem. Ecol.* 37, 232-238.
 57. E. W. Hafner and D. Wellner. (1971). Demonstration of imino acids as products of the reactions catalyzed by D- and L-amino acid oxidases. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68,

- 987-991.
58. T. J. Stillman, P. J. Baker, K. L. Britton and D. W. Rice. (1993). Conformational flexibility in glutamate dehydrogenase. Role of water in substrate recognition and catalysis. *J. Mol. Biol.* 234 (4), 1131-1139.
 59. J. W. Burgner and W. J. Ray. (1984). Acceleration of the NAD cyanide adduct reaction by lactate dehydrogenase: the equilibrium binding effect as a measure of the activation of bound NAD. *Biochemistry.* 23, 3620-3626.
 60. M. J. O'Donnell and S. Wu. (1992). A catalytic enantioselective synthesis of α -methyl amino acid derivatives by phase-transfer catalysis. *Tetrahedron: Asymmetry.* 3, 591-594.
 61. T. Harel and S. Rozen. (2007). Transforming natural amino acids into alpha-alkyl-substituted amino acids with the help of the HOF.CH₃CN complex. *J. Org. Chem.* 72, 6500-6503.
 62. R. Bloch. (1998). Additions of organometallic reagents to CN bonds: Reactivity and selectivity. *Chem. Rev.* 98, 1407-1438.
 63. R. Neumann, M. Levin. (1991). Selective aerobic oxidative dehydrogenation of alcohols and amines catalyzed by a supported molybdenum-vanadium heteropoly anion salt Na₅PMo₂V₂O₄₀. *J. Org. Chem.* 56, 5707-5710.
 64. Shiri, P. (2021). Novel hybrid molecules based on triazole- β -lactam as potential biological agents. *Mini Rev. Med. Chem.* 21, 536-553.
 65. Nakayama, K.; Hamamoto, M.; Nishiyama, Y.; Ishii, Y. (1993). Oxidation of benzylic derivatives with dioxygen catalyzed by mixed addenda metallophosphate containing vanadium and molybdenum. *Chem. Lett.* 22, 1699-1702.
 66. Éll, A.H.; Samec, J.S.; Brasse, C.; Bäckvall, J.-E. (2002). Dehydrogenation of aromatic amines to imines via ruthenium-catalyzed hydrogen transfer. *Chem. Commun.* 10, 1144-1145.
 67. Nicolaou, K.; Mathison, C.J.; Montagnon, T. (2003). New reactions of IBX: Oxidation of nitrogen- and sulfur-containing substrates to afford useful synthetic intermediates. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 4077-4082.
 68. Gnanaprakasam, B.; Zhang, J.; Milstein, D. (2010). Direct synthesis of imines from alcohols and amines with liberation of H₂. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 1468-1471.
 69. Donthiri, R.R.; Patil, R.D.; Adimurthy, S. (2012). NaOH-catalyzed imine synthesis: Aerobic oxidative coupling of alcohols and amines. *Eur. J. Org. Chem.* 2012, 4457-4460.
 70. Ushakov, D.B.; Gilmore, K.; Kopetzki, D.; McQuade, D.T.; Seeberger, P.H. (2014).

- Continuous-flow oxidative cyanation of primary and secondary amines using singlet oxygen. *Angew. Chem. Int. Ed.* *53*, 557–561.
71. Marui, K.; Nomoto, A.; Ueshima, M.; Ogawa, A. (2015). Eco-friendly copper sulfate-catalyzed oxidation of amines to imines by hydrogen peroxide in water. *Tetrahedron Lett.* *56*, 1200–1202.
 72. Qin, Y.; Zhang, L.; Lv, J.; Luo, S.; Cheng, J.-P. (2015). Bioinspired organocatalytic aerobic C–H oxidation of amines with an ortho-quinone catalyst. *Org. Lett.* *17*, 1469–1472.
 73. Ghislieri, D.; Green, A.P.; Pontini, M.; Willies, S.C.; Rowles, I.; Frank, A.; Grogan, G.; Turner, N.J. (2013). Engineering an enantioselective amine oxidase for the synthesis of pharmaceutical building blocks and alkaloid natural products. *J. Am. Chem. Soc.* *135*, 10863–10869.
 74. Duan, J.; Li, B.; Qin, Y.; Dong, Y.; Ren, J.; Li, G. (2019). Recent progress in directed evolution of stereoselective monoamine oxidases. *Bioresour. Bioprocess.* *6*, 37.
 75. Heath, R.S.; Pontini, M.; Bechi, B.; Turner, N.J. (2014). Development of an *R*-selective amine oxidase with broad substrate specificity and high enantioselectivity. *ChemCatChem* *6*, 996–1002.
 76. Tani, Y.; Miyake, R.; Yukami, R.; Dekishima, Y.; China, H.; Saito, S.; Kawabata, H.; Mihara, H. (2015). Functional expression of L-lysine α -oxidase from *Scomber japonicus* in *Escherichia coli* for one-pot synthesis of L-pipecolic acid from DL-lysine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *99*, 5045–5054.
 77. Kawahara, N.; Yasukawa, K.; Asano, Y. (2017). New enzymatic methods for the synthesis of primary α -aminonitriles and unnatural α -amino acids by oxidative cyanation of primary amines with D-amino acid oxidase from porcine kidney. *Green Chem.* *19*, 418–424.
 78. Yasukawa, K.; Motojima, F.; Ono, A.; Asano, Y. (2018). Expansion of the substrate specificity of porcine kidney D-amino acid oxidase for *S*-stereoselective oxidation of 4-Cl-benzhydrylamine. *ChemCatChem.* *10*, 3500–3505.
 79. Nakano, S.; Yasukawa, K.; Tokiwa, T.; Ishikawa, T.; Ishitsubo, E.; Matsuo, N.; Ito, S.; Tokiwa, H.; Asano, Y. (2016). Origin of stereoselectivity and substrate/ligand recognition in an FAD-dependent *R*-selective amine oxidase. *J. Phys. Chem. B* *120*, 10736–10743.
 80. Asano, Y. (2019). Screening and development of enzymes for determination and transformation of amino acids, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *83*, 1402–1416.
 81. Asano, Y.; Yasukawa, K. (2019). Identification and development of amino acid

- oxidases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *49*, 76–83.
82. Yasukawa, K.; Kawahara, N.; Motojima, F.; Nakano, S.; Asano, Y. (2020). Porcine kidney D-amino acid oxidase-derived *R*-amine oxidases with new substrate specificities. *The Enzymes.* *47*, 117–136.
 83. Nugent, T.C.; Williams, R.V.; Dragan, A.; Méndez, A.A.; Iosub, A.V. (2013). An investigation of the observed, but counter-intuitive, stereoselectivity noted during chiral amine synthesis via *N*-chiral-ketimines. *Beilstein J. Org. Chem.* *9*, 2103–2112.
 84. Noguchi, T.; Tehara, N.; Uesugi, Y.; Jung, S.; Imai, N. (2012). Convenient peptide synthesis without protection of *C*-terminals. *Chem. Lett.* *41*, 42–43.
 85. Xu, B.; Tambar, U.K. (2019). Remote allylation of unactivated C (sp³)–H bonds triggered by photogenerated amidyl radicals. *ACS Catal.* *9*, 4627–4631.
 86. Patil, R.D.; Adimurthy, S. (2013). Catalytic Methods for Imine Synthesis. *Asian J. Org. Chem.* *2*, 726–744.
 87. Abdel-Magid, A.F.; Carson, K.G.; Harris, B.D.; Maryanoff, C.A.; Shah, R.D. (1996). Reductive amination of aldehydes and ketones with sodium triacetoxyborohydride. studies on direct and indirect reductive amination procedures. *J. Org. Chem.* *61*, 3849–3862.
 88. Mirza-Aghayana, M.; Tavanaa, M.M.; Rahimifarda, M.; Boukherroub, R. (2014). Palladium on activated carbon catalyzed reductive amination of aldehydes and ketones by triethylsilane. *Appl. Organomet. Chem.* *28*, 113–115.
 89. Scheller, P.N.; Lenz, M.; Hammer, S.C.; Hauer, B.; Nestl, B.M. (2015). Imine reductase-catalyzed intermolecular reductive amination of aldehydes and ketones. *ChemCatChem* *7*, 3239–3242.
 90. Guzmán-Mejía, R.; Reyes-Rangel, G.; Juaristi, E. (2007). Preparation of chiral derivatives of β -Ala containing the α -phenylethyl group: Useful starting materials for the asymmetric synthesis of β -amino acids. *Nat. Protoc.* *2*, 2759–2766.
 91. Enthaler, S. (2011). Practical one-pot synthesis of secondary amines by zinc-catalyzed reductive amination. *Catal. Lett.* *141*, 55–61.
 92. Giovenzana, G.B.; Imperio, D.; Penoni, A.; Palmisano, G. (2011). Reductive amination with zinc powder in aqueous media. *Beilstein J. Org. Chem.* *7*, 1095–1099.
 93. LARGERON, M. (2013). Protocols for the catalytic oxidation of primary amines to imines. *Eur. J. Org. Chem.* *24*, 5225–5235.