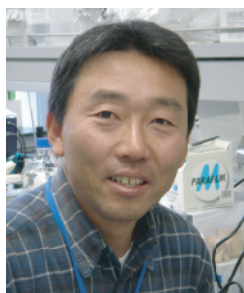
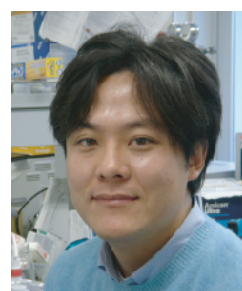


R I T E バイオプロセスによる高効率化学品製造に資する基盤技術要素開発の研究



吉岡秀樹 (1)

富木亜紀 (3)



白桑好 (2)

(1) RITEチーム (2), (3) NITE

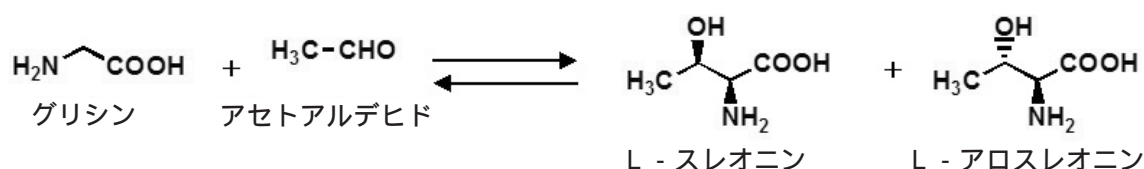
「酵素による光学活性 -ヒドロキシアミノ酸の一段階合成」

-ヒドロキシアミノ酸は、医薬品や医薬品の合成中間体としての用途が期待される有用な化合物である。この化合物には不斉炭素が二つ以上存在することから化学合成法で製造した場合、通常四種類以上の光学異性体が生成し、光学活性体を得る為に高価な分割剤や保護・脱保護を必要とする。すなわち、化学合成法で -ヒドロキシアミノ酸を製造する場合、工程が複雑となり、製品は非常に高価なものとなる。一方、スレオニンアルドラーゼを用いた酵素法は、位の立体は厳格に制御でき、位の立体は曖昧なことから二種類のジアステレオマーが生成してくるものの、保護基を導入することなくアルデヒドとグリシンから一段階で目的の化合物を合成することができることから、安価な合成法と言える。

我々は、L-スレオ型の -ヒドロキシアミノ酸をターゲットに、立体選択性の高い L-スレオニンアルドラーゼのスクリーニングを行い、得られた酵素遺伝子を高発現させた組換え微生物を創製し、工業的なプロセスの検討を行なった。

1. 高立体選択性L-スレオニンアルドラーゼのスクリーニング

L-スレオニンアルドラーゼは下記に示した様に、L-スレオニンをグリシンとアセトアルデヒドに分解する酵素で、又、同時にその逆反応も触媒する酵素である。この逆反応を旨く利用すれば、種々のアルデヒドとグリシンから、対応する -ヒドロキシアミノ酸が一段階で合成することが可能となる。



我々は、本スレオニンアルドラーゼでL-スレオ型を選択的に合成する酵素をNITE保存微生物からスクリーニングする計画を立てた。しかし、NITE保存微生物から全ての菌株をスクリーニングにかけるのは多大な時間と労力を必要とする。そこで、効率的スクリーニングを実施する為、まずは土壌等から

L-スレオニンやその他のL-α-ヒドロキシアミノ酸を単一炭素源とした集積培養を試みた。集積培養により得られた菌株を同定し、それらと同属の菌株をNITE保存菌から検索した結果、*Ensifer arboris* NBRC 100383 株が最もスレオ型を優先的に合成する能力のある L-スレオ型特異的アルドラーゼをもつことがわかった。

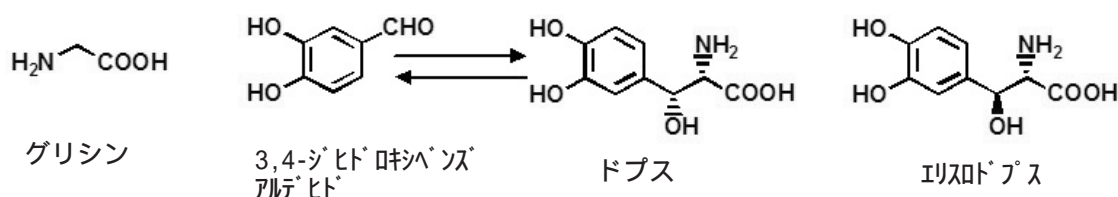
また一方で、NITEが構築した遺伝子データベース(DOGAN)に登録された *Streptomyces avermitilis* NBRC 14893 等の遺伝子情報に基づいてプライマーを設計し、放線菌 *Streptomyces coelicolor* NBRC 12854 株由来のL-スレオニンアルドラーゼ遺伝子を得た。本放線菌酵素の L-スレオ立体選択性は約 20 % d. e. であり、*Ensifer* 由来酵素の約 70 % d. e. よりも劣っていた。

2. 組換え菌の創製

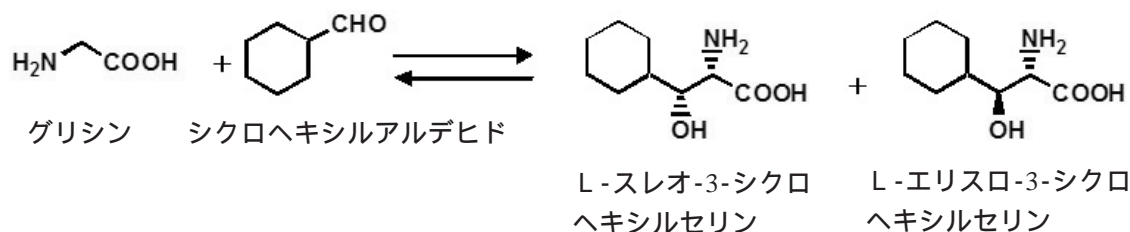
得られた酵素遺伝子が大腸菌あるいは RITE 微生物研究グループが所有するコリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* R 株に導入した組み換え菌の創製を試みた。*E. arboris* NBRC 100383 株由来の L-スレオニンアルドラーゼ遺伝子は、近縁の *Mesorhizobium loti* や *Sinorhizobium meliloti* のスレオニンアルドラーゼの遺伝子配列を参考に設計したプライマーから、PCRにより増幅することができた。この遺伝子が大腸菌高発現用ベクターpTrc99A に連結し、大腸菌に導入することにより高発現組換え大腸菌を創製した。同様に、コリネ型細菌 *C. glutamicum* R 株には、大腸菌とコリネ菌を宿主とするシャトルベクターpCRB1 に上述の遺伝子を連結後導入し組換えコリネ菌を創製した。

3. 変換条件の最適化

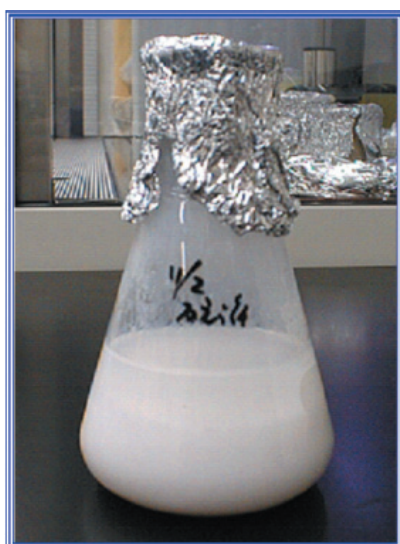
L-スレオニンアルドラーゼ高発現組換え菌の休止菌体を用いて、グリシンと3,4-ジヒドロキシベンズアルデヒドを基質として医薬品であるドプス(L-threo-3,4-ジヒドロキシフェニルセリン)の合成反応条件の検討を行った。



反応には基質の透過性を促進する界面活性剤のTriton X-100が必要であった。又、反応温度は10-15℃と低温が合成反応には良好であった。触媒として用いる菌体量は、それぞれ、*Ensifer* 酵素組換え菌の場合は反応液と等量～2倍量、*Streptomyces* 酵素組換え菌の場合は10倍量の培養液量から得られた菌体が必要であった。又、反応の最適pHは6.5付近であった。至適反応条件化でのドプスの一段階合成反応では、グリシン150 g/L、3,4-ジヒドロキシベンズアルデヒド20 g/Lからドプスが約8 g/Lの濃度で得られた。反応時間を延長してもこれ以上の濃度には上がらず平衡となった。



一方、アルデヒドとしてシクロヘキシルアルデヒドを用いた場合、3,4-ジヒドロキシベンズアルデヒドと同様の条件で、20 g /Lの3-シクロヘキシルセリンが得られた。更に、アルデヒドを途中添加すると最高で40 g /Lの濃度にまで高めることができた。この時の反応液には3-シクロヘキシルセリンの結晶が観察され(写真1)、このことが高濃度の蓄積に繋がったものと考えられる。又、本反応におけるL-スレオ選択性は90% d. e.を越える結果となった。



4. 連続反応システムを用いた大量合成

組換えコリネ菌を用いて連続的なドプスの合成反応を行った。システムは1Lのリアクター、フォローファイバー型膜モジュール、冷却ユニット、循環ポンプ、基質添加ポンプ、濾液抜き取りポンプから構成されている。スタート時の反応液量は500 mLとし、連続反応時の新鮮な基質溶液の添加速度は約20~40 mL/Hとして、反応液量を一定となるように添加速度と同じ速度で反応濾液を抜き取った。ドプスの濃度は70時間の反応の間約2.5 g /Lが維持された。

← 写真1. 結晶化した3-シクロヘキシルセリンの合成反応液

5. 精製プロセスの開発

連続反応によって得られたドプスの合成反応液には基質の残存であるグリシン、3,4-ジヒドロキシベンズアルデヒド、合成生成物のドプスが含まれている。三つの成分から生成物ドプスの分離精製を試みた。第一段階として吸着樹脂のSP-207(三菱化学社製)に反応液を通液すると、3,4-ジヒドロキシベンズアルデヒドが特異的に樹脂に吸着された。通過液を第二段階として、活性炭カラムに通液した。グリシンは活性炭カラムを通過し、目的物のドプスは活性炭カラムに吸着された。ドプスは50%メタノールにより活性炭カラムから溶出された。二種類のカラムクロマトにより三成分を効率良く分離することができた。

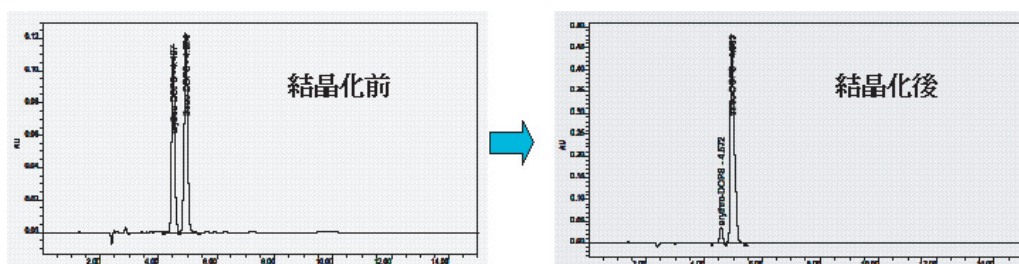
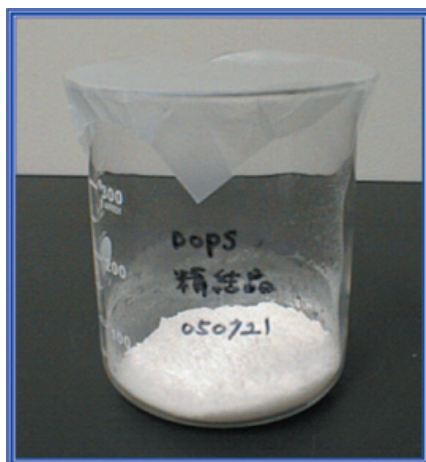


図1. 結晶化による異性体の除去

6. 放線菌酵素の改変

先に述べた様に放線菌 L-スレオニンアルドラーゼは、グリシンと3,4-ジヒドロキシベンズアル



デヒドを基質とした場合、生成してくるドプスの立体配置は L-スレオ体過剰率約 20% d. e. であった。我々は、本放線菌酵素の立体選択性の改変を試みた。放線菌酵素遺伝子にエラープローン PCR の手法を用いて変異を導入した組換え大腸菌ライブラリーを構築した。その中からハイスループットスクリーニングにより、選択性の向上した変異体を選択した。これまでの所、立体選択性は 50% d. e. 以上にまで向上させることができた。又、同様に手法を用いて、酵素の熱安定性を大幅に向上した変異酵素を取得することができた。



写真2. バイオプロセスにより合成された医薬品ドプス

7. おわりに

我々が見出した立体選択性の高い *Ensifer arboris* NBRC 100383 株由来の L-スレオニンアルドラーゼを用いて、現在、種々のアルデヒドとの基質特異性を調査中である。ドプスの合成反応では、生成物濃度は最高で約 8 g / L で、基質からの変換率も非常に低く、実用化には更なる検討が必要である。一方、シクロヘキシルアルデヒドとグリシンとの反応に見られた様に、生成物が反応液中に結晶として沈殿して高濃度に蓄積する反応生成物が幾つか見出されている。我々は、これらのアルデヒドの場合、沈殿化した反応生成物の精製は簡単な工程で実施できると考えられることから、実用化は比較的容易ではないかと考えている。



湯川 秀明

農学博士、(財)地球環境産業技術研究機構
微生物研究グループ グループリーダー
主席研究員