

有機溶媒耐性酵素を活用したケミカル生産

吉田 豊和*・長澤 透

酵素は穏やかな条件下で触媒機能を発揮し、基質変換プロセスにおいて高い立体選択性や位置選択性を示すため、化成品や医薬品などの合成に酵素反応を導入する研究が展開されている。しかしながら、合成ステップにおいて、基質が難水溶性で有機溶媒に溶解している場合や、水溶液中で不安定な場合も多く、酵素反応が適用できる範囲を狭めている。本来、酵素は水系で触媒能力を発揮するタンパク質分子であり、有機溶媒存在下では変性・失活しやすい。有機溶媒の存在下において安定で、十分に機能を発揮できる酵素を造り出すことができれば、効率的な物質変換プロセスの開発につながっていく。

これまでに、有機溶媒に対して耐性を示す微生物が自然界から分離され、微生物細胞の有機溶媒耐性メカニズムの解明が進められている。一方、生体反応を担っている酵素の有機溶媒耐性については、リパーゼなどが有機溶媒耐性を示すことが知られているが、酵素タンパク質の耐性メカニズムの詳細は明らかでない。しかしながら、種々の酵素タンパク質に有機溶媒耐性を付与できれば、その応用範囲の拡張が期待できる。このような観点にもとづいて最近見いだされてきた有機溶媒耐性を示すニトリラーゼをとりあげ、非水系反応場における活用例について紹介する。

有機溶媒耐性ニトリラーゼのスクリーニング

ニトリラーゼはニトリルを対応するカルボン酸とアンモニアに加水分解する酵素で、温和な条件下でニトリルの加水分解を触媒することから、工業用生体触媒としての応用研究が数多く報告されている¹⁾。有機溶媒の存在下で効率的に触媒機能を発揮するニトリラーゼを得ることができれば、難水溶性ニトリルの変換に活用できる。代表的なニトリラーゼ生成菌として、*Rhodococcus rhodochrous* J1が知られているが²⁾、J1株のニトリラーゼは有機溶媒耐性を示さず、低濃度の下で完全に活性を失う(図1)。*Fusarium*由来の酵素も同様の傾向を示す。このような有機溶媒に対して耐性を持たないニトリラーゼに、人為的に有機溶媒耐性を付与しようとする直接的なアプローチは困難であると予想される。そこで、有機溶媒耐性を示すニトリラーゼを保有する微生物を探索した。ニトリラーゼ活性を誘導した134株の微生物菌体をアセトン

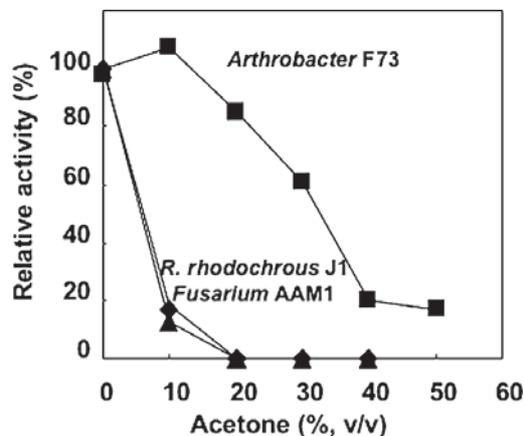


図1. ニトリラーゼの有機溶媒耐性評価。培養菌体を種々の濃度のアセトンで20°C、1時間処理し、残存する活性を測定した。

10~30% (v/v)で処理し、残存するニトリラーゼ活性を評価した。30% (v/v)のアセトン存在下でも、活性が残存する細菌3株を見いだした。これらの菌株はすべてアリアルアセトニトリル類に作用するニトリラーゼ(アリアルアセトニトリラーゼ:EC3.5.5.5)の保有株であった。この知見にもとづき、ピリジンアセトニトリルやチオフエンアセトニトリルなどを用いた集積培養を行い、新たにニトリラーゼ生成菌を土壌から分離し、アセトン耐性を指標として有機溶媒耐性ニトリラーゼを持つ微生物を選抜した。その中で、*Arthrobacter* F73のニトリラーゼが最も強いアセトン耐性を示した(図1)。

このスクリーニング過程では、細胞内にニトリラーゼを誘導した培養菌体をそのままアセトンで処理している。よって、*Arthrobacter* F73細胞自体の有機溶媒耐性に依存して、酵素が耐性を示すかのように振る舞っている可能性が懸念された。しかし、細胞を破碎して調製した酵素液に種々の有機溶媒を添加して評価した時にも、*Arthrobacter* F73ニトリラーゼは他起源酵素に比べて強い有機溶媒耐性を示し、酵素タンパク質自体が有機溶媒耐性を示すことを確認した³⁾。

有機溶媒耐性ニトリラーゼによるケミカル合成

Arthrobacter F73のニトリラーゼが持つ有機溶媒耐性の優位性を検証するために、2-クロロマンデロニトリル

*著者紹介 岐阜大学工学部生命工学科(准教授) E-mail: toyosida@gifu-u.ac.jp



図2. ニトリラーゼが触媒する2-クロロマンデロニトリルの立体選択的加水分解.

から2-クロロマンデル酸への加水分解(図2)をとりあげ、反応性および立体選択性に及ぼす有機溶媒の効果を調べた。基質として反応系に添加する2-クロロマンデロニトリルは、水系において2-クロロベンズアルデヒドとシアナイドイオンに解離し、平衡状態で存在する。ラセミ体の2-クロロマンデロニトリルを反応系に添加すると、ニトリラーゼの立体選択的加水分解によって、R体の2-クロロマンデル酸が優先的に生成する。実際には、添加したラセミ体の基質はアルデヒドとの平衡状態にあるため、S体の2-クロロマンデロニトリルは反応系に残存せず、この変換反応における最大理論収率は100%となる。ただし、2-クロロベンズアルデヒドがニトリラーゼ活性を顕著に阻害する。そこで、有機溶媒を添加した二相系の反応場を構築し、基質を有機溶媒に溶解させるとともに、2-クロロベンズアルデヒドによる活性阻害の回避を図った。

ニトリラーゼ活性を誘導した*Arthrobacter* F73の培養菌体をリン酸緩衝液に懸濁し、2-クロロマンデロニトリルの酵素変換を行った。有機溶媒を添加せず、2-クロロマンデロニトリルを逐次添加した水系の反応では、反応を開始して数時間後には2-クロロマンデル酸の生成速度は顕著に低下した。2-クロロベンズアルデヒドがニトリラーゼ活性を強く阻害することが原因である(図3)。この時、生成した2-クロロマンデル酸の光学純度は87% e.e. (R体)であった。一方、酢酸エチルを添加した反応系(酢酸エチル:水=1:8)で、酢酸エチルに溶解した2-クロロマンデロニトリルをフィーディングした場合、反応開始後24時間まで変換活性の顕著な低下は認められず、48時間後には149 g/lの2-クロロマンデル酸が生成蓄積した。

注目すべき点は、2-クロロマンデル酸の生成濃度が大きく向上したこと以外に、光学純度が97.7% e.e.にまで高まったことである。種々の有機溶媒を用いた時の、2-クロロマンデル酸の光学純度に及ぼす影響を調べたところ(図4)、アセトンでは光学純度の低下が見られ、ジメチルホルムアミド、メタノールなどで光学純度の向上が認められた。酢酸エチルの添加濃度と光学純度の相関を

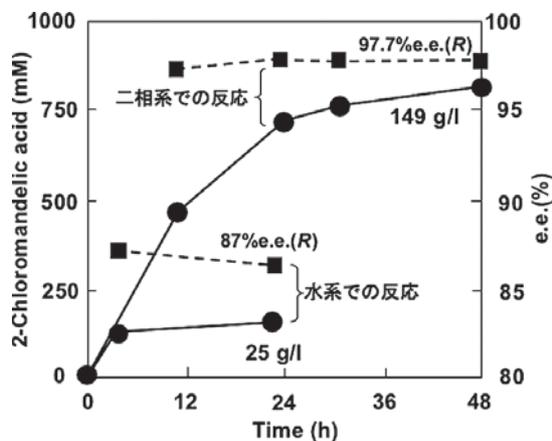


図3. *Arthrobacter* F73ニトリラーゼによる2-クロロマンデル酸生産の経時変化。2-クロロマンデル酸の生成濃度を実線で、その光学純度を破線で示した。

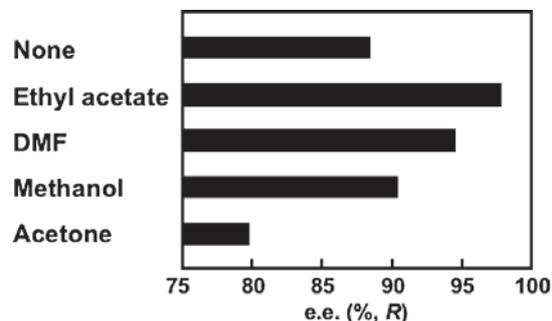


図4. 有機溶媒添加による2-クロロマンデル酸の光学純度の変化。有機溶媒を10% (v/v)添加して反応を行い、生成した2-クロロマンデル酸の光学純度を測定した。

検討した結果、1~2% (v/v)程度の低濃度の添加でも、95% e.e.を超える値が得られた。この光学純度の変化が何に起因するかは明らかでないが、添加した有機溶媒がニトリラーゼのコンフォメーション変化を引き起こし、基質結合部位に微妙な構造変化が生じた可能性や、活性中心近傍に有機溶媒分子が入り込み、基質変換の立体選択性に影響を及ぼしている可能性などが考えられる。

有機溶媒耐性酵素の宿主依存性

Arthrobacter F73の有機溶媒耐性を持つニトリラーゼを用いると、酢酸エチル存在下で2-クロロマンデロニトリルを立体選択的に加水分解し、高い光学純度でR体の2-クロロマンデル酸が酵素合成できることが示された。酵素法を用いる物質変換プロセスにおいて、酵素遺伝子を発現させた組換え体を作製し、高活性を示す菌体を微生物触媒として用いる手法は幅広く利用されてい

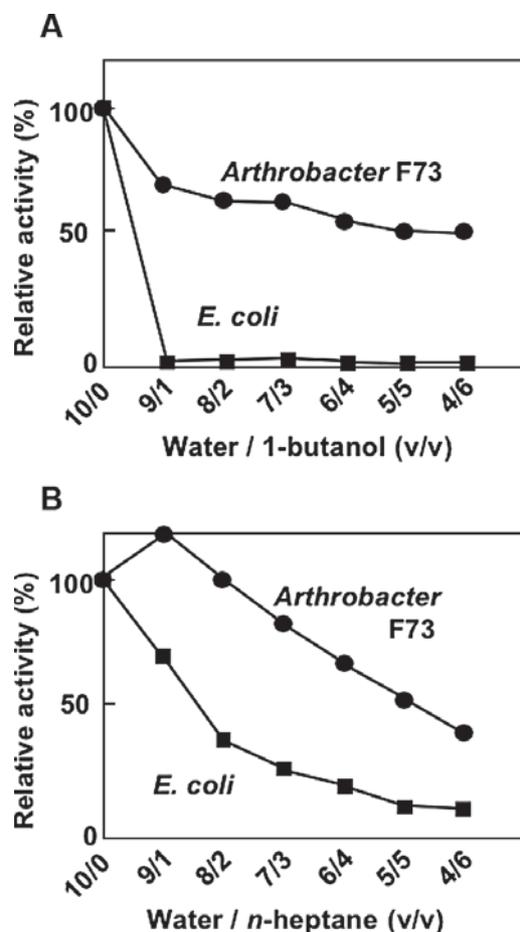


図5. 宿主に依存した*Arthrobacter* F73ニトリラーゼの有機溶媒耐性. 有機溶媒として, 1-ブタノール (A) と *n*-ヘプタン (B) を用いて菌体を処理後, 残存活性を測定した.

る. *Arthrobacter* F73ニトリラーゼ遺伝子を大腸菌で発現させ, 培養菌体を用いてニトリラーゼの有機溶媒耐性を評価すると, 野生株である*Arthrobacter* F73細胞を用いた挙動と異なる結果が得られた(図5). 組換え大腸菌細胞内において, ニトリラーゼは1-ブタノールに対し

て強い耐性を示さないが, *Arthrobacter* F73細胞内では高濃度の1-ブタノール存在下でも活性を維持していた. また, *n*-ヘプタンの場合でも同様に, 大腸菌宿主では顕著な失活が認められる. このことは, *Arthrobacter* F73の細胞自体がある程度の有機溶媒耐性を持ち, 細胞内での酵素の安定性に影響を与えていることを意味している.

近年, 種々の有機溶媒存在下においても溶菌しない微生物として*Kocuria rhizophila* DC2201が見いだされ⁴⁾, 次世代宿主細胞として形質転換系の開発が進められている. 難水溶性物質を効率的に微生物触媒によって酵素変換するためには, 有機溶媒耐性を示す酵素と*K. rhizophila* DC2201のような有機溶媒耐性宿主細胞のコンビネーションが重要であろう.

おわりに

ここで紹介した有機溶媒耐性ニトリラーゼのどのような構造特性が, 有機溶媒耐性に寄与しているかは現時点では明らかでない. よって, 冒頭で紹介した*R. rhodochrous* J1などの有機溶媒に対して感受性を示すニトリラーゼに, 耐性を自在に付与することは容易でない. 現在, *Arthrobacter* F73ニトリラーゼにランダム変異を導入した変異体ライブラリーを作製し, 有機溶媒耐性が向上した耐性強化変異体のスクリーニングを進めている. 強化変異体あるいは弱体化変異体における変異部位を解析することで, 耐性に関わる構造特性が明らかになってくることを期待している.

文 献

- 1) Nagasawa, T. and Yamada, H.: *Trends Biotechnol.*, **7**, 153 (1989).
- 2) Kobayashi, M. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **182**, 349 (1989).
- 3) 松田章太郎: 日本生物工学会大会講演要旨集, p.113 (2004).
- 4) <http://www.bio.nite.go.jp/ngac/DC2201.html>