

酵素を用いたL-2-ナフチルアラニンの合成

| | | | |
|---|---|---|---|
| 半 | 澤 | | 敏 |
| 大 | 江 | 正 | 剛 |
| 徳 | 久 | 賢 | 治 |
| 河 | 野 | 和 | 久 |
| 柿 | 谷 | | 均 |
| 石 | 黒 | 敬 | 彦 |

Chemo-enzymatic Synthesis of L-2-Naphthylalanine

Satoshi HANZAWA
Seigo OE
Kenji TOKUHISA
Kazuhisa KAWANO
Hitoshi KAKIDANI
Takahiko ISHIGURO

L-2-Naphthylalanine (Nal) was synthesized by the enzymatic transamination between 2-naphthylpyruvate (NPA) and L-glutamate (Glu) using a hyperthermostable aminotransferase (MsAT) from the hyperthermophile *Thermococcus profundus*. The equilibrium of this exchange reaction considerably shifted to the Nal side due to its low solubility. Hence, the amino acid separated out as the reaction proceeded. Using this methodology, the product of optical purity above 99%ee was obtained in 93% yield from 180 mmol/L of NPA and 360 mmol/L of Glu. MsAT exhibited high activity toward a wide range of α -amino acids and 2-keto acids, thus providing a new convenient route to a variety of unnatural amino acids.

1. 緒 言

L-2-ナフチルアラニン (Nal, Fig. 1) の様な非天然型アミノ酸をペプチド医薬やペプチドミミック構造の医薬の合成に利用すると、天然のペプチドでは得られない特性を付与することができる。薬物受容体構造の研究やコンビナトリアルケミストリーの進歩とあいまって今後こうした構造の医薬は増加していき、それに伴って非天然型アミノ酸の需要も増加していくと推測される。天然に存在しないアミノ酸は発酵法では製造できないため、これらは有機合成法で製造されるが、幾つかの非天然型アミノ酸の場合は有機合成法と生化学的方法を組み合わせる生産されている¹⁻³⁾。ここでは

酵素を触媒として用いることを生化学的方法と呼ぶが、有機化学的に合成したアキラルな前駆体に酵素を作用させることで目的物が非常に高い不斉収率で得られる。

今回我々が注目したNalは偏頭痛薬FK-888、喘息薬/偏頭痛薬NKT-343、S-18523、MEN-10930及びプロテアーゼ阻害剤SA-7060などの部分構造として利用が試みられている非天然型アミノ酸である(Fig. 1)^{4,5)}。Nalはこれらの他にも様々なペプチド性化合物の構成ユニットとして利用が試みられている。Nalはこのような多様な医薬品の合成原料として利用されているにも関わらず、効率よく不斉合成する方法が確立されていなかった。そこで我々はNalの効率の良い不斉合成

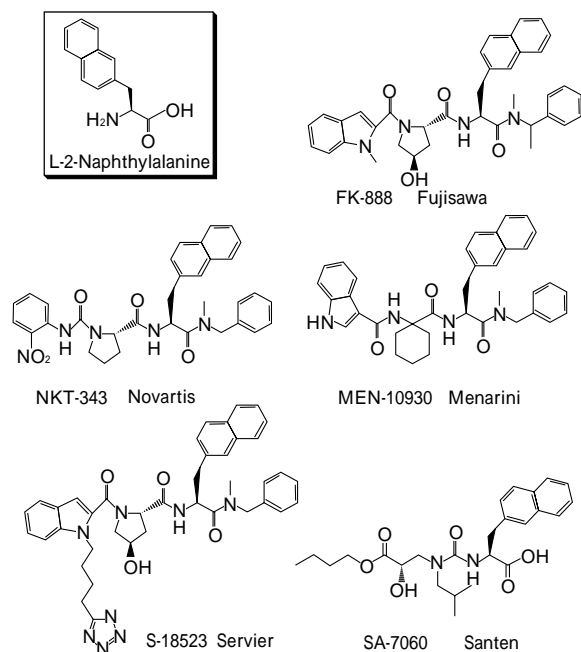


Fig. 1 L-2-Naphthylalanine (Nal) and peptidomimetic investigational drugs.

法の確立を目指して検討を開始した。また非天然型アミノ酸の開発中医薬への利用状況を調査すると、Nalを初めとしてL-チエニルアラニン、L-ピフェニルアラニン、L-ターシャリロイシン等の疎水性アミノ酸の利用例が多く見出された。Nalを題材に不斉合成方法を研究することで、これら非天然型アミノ酸を合成するための基礎技術を構築できると考えられた。

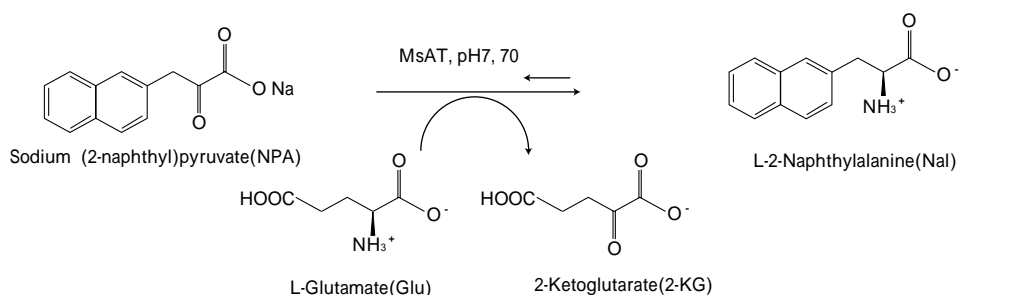
ところで、近年になって100 付近の高温を好んで生育する超好熱菌と呼ばれる微生物群が知られるようになった。こうした微生物の持つ酵素は高い生育温度に適応した結果、様々な物理・化学的ストレスにも抵抗性が高くなっており、産業上の有用性が期待されている⁶⁾。これら超好熱菌の酵素のうち、我々は *Thermococcus profundus* のアミノトランスフェラーゼ (AT) に着目した⁷⁾。ATはScheme 1 に示す2-アミノ酸と2-ケト酸の間での立体選択的なアミノ基交換反応を触媒する酵素である。ATを用いるとグルタミン

酸など調味料や飼料用に大量生産されており安価に入手できる天然型アミノ酸を副原料として、簡単なプロセスで非天然型アミノ酸を得ることができ、しかも目的物はほぼ100% eeの光学純度で得られる。そのため以前から大腸菌などのATを用いて非天然型アミノ酸の合成が試みられてきた^{8,9)}。 *T. profundus* のATは従来のATに比べて耐熱性が高いのはもちろんのこと、より広範な天然型アミノ酸に作用するという特徴が報告されていた⁷⁾。このことから本酵素は非天然型アミノ酸の合成のための汎用的な触媒になるのではないかと考えられた。なお、本酵素は発見者の小林哲夫博士 (理化学研究所、現名古屋大) によってMsAT (Multi substrate amino transferase) と命名されていたので、本稿でも以降はMsATと称する。我々はMsATを用いてNalを効率よく合成する方法を開発し^{8,9)}、また、この方法の適用の範囲を知るため種々の非天然型アミノ酸に対するMsATの基質特異性を解析した。本稿はその結果を報告する。

2. 材料及び方法

(1) 酵素及びその調製方法

MsATの遺伝子は遺伝子配列データベースであるGenBank[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]に受入番号AB027131として公開されている。この遺伝子を小林哲夫博士 (名古屋大学) より譲り受け、酵素生産性を向上させる遺伝子操作を行った後に大腸菌HB101株に形質導入した。この組換え体微生物をTG培地 (1L中の培地組成 ; Trypticase peptone (BBL, USA) 50g, glycerol 35g, Na₂HPO₄ 7g, KH₂PO₄ 3g, NH₄Cl 1g, NaCl 0.5g, MgSO₄ · 7H₂O 0.74g, FeSO₄ · 7H₂O 0.073g, CoCl₂ · 2H₂O 0.044g) に植菌して37 °Cで51時間、通気攪拌培養した。培養終了後、6,000xg、30分間の遠心分離によって大腸菌菌体を集め、0.1M Tris-HCl緩衝液 (pH7.5) にけん濁して超音波破碎処理を行った。細胞破碎残渣を遠心分離で除去し、得られた上清にピリドキサル - 5'-リン酸を1mMになる様



Scheme 1

に加えて、70 °Cで30分間加熱処理した。この処理で凝集する不純物を再度遠心分離により除去し、得られた上清を0.1M Tris-HCl (pH7.5) に一晚透析した。この溶液に等量のアセトンを加えてMsATを沈殿させ、1mM PLPを含む0.1M Tris-HCl (pH7.5) に再度溶解した。Nalの合成にはこの粗酵素溶液を用いた。その他の2-アミノ酸や2-ケト酸に対する酵素活性を評価する場合はさらに80 °Cで30分間の再加熱処理を行ったのちにTSKgel DEAE-トヨパール650Mで精製し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動的に均一であることを確認した酵素標品を用いた。

〔2〕酵素活性の測定

酵素活性は2-ナフチルピルビン酸ナトリウム(NPA)とグルタミン酸(Glu)を基質として1分間あたりに1 μmolのNalを生成させる酵素量を1ユニット(単位U)として表した。すなわち、10mM NPA及び10mM Gluを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.2) 1mlを1.5ml容遠心分離管(エッペンドルフ社製)にとり、70 °Cで5分間加熱を行い、次いで予め緩衝液で適度に希釈した酵素溶液を10 μl加えて70 °Cで正確に5分間加熱した。加熱終了後、反応液に1N酢酸を0.5ml添加し直ちに氷冷して反応を停止させた。生成物のNalは本章第6節で述べる方法で定量した。

〔3〕NPAの有機合成

NPAは2-メチルナフタレンを出発原料としてメチル基の臭素化を経て2-ナフトアルデヒドを合成し(Scheme 2)¹⁰⁾、ついでそれとヒダントインの縮合で得られる5-ナフチリデンヒダントインをNaOHで加水分解することにより得た(Scheme 3)¹¹⁻¹²⁾。詳細を以下に述べる。

(1) 2-ナフトアルデヒドの合成

2,2'-アゾビスイソブチロニトリル(AIBN) 65.7gを

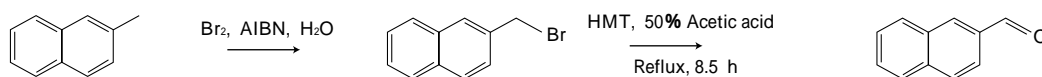
クロロベンゼン1.5Lに溶解してラジカル開始剤溶液1.55Lを調製し、また臭素840gをクロロベンゼン4Lに溶解して臭素溶液を調製した。次いで、2-メチルナフタレン569gをクロロベンゼン2Lに溶解して水600mlを加え、約80 °Cで攪拌しつつ、先に調製したラジカル開始剤溶液750mlを加えた。続いて臭素溶液を7.5時間かけて滴下し、臭素化反応を行った。臭素の滴下開始後2.5時間経過した時点及び5時間経過した時点でラジカル開始剤を補給するため、それぞれ350ml及び450mlの同溶液を滴下漏斗を用いて1時間かけて投入した。臭素溶液の滴下終了後3.5時間加熱を続けた後、反応液を放冷した。以上の操作は全てアルゴン雰囲気で行った。この反応液は冷却すると二層に分離した。その水層を除き、有機層を水1.5Lで2回、飽和食塩水1.5Lで1回洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥して減圧下溶媒を留去すると2-(プロモメチル)ナフタレン74%及び2-(ジプロモメチル)ナフタレン14%を含む混合物が残渣として得られた。この残渣にヘキサメチレンテトラミン(HMT) 113g、酢酸1L及び水1Lを加えて溶解し、攪拌しつつ6時間環流した。その後、18時間放冷し、反応液中に析出した固体を吸引る過により回収した。真空乾燥機で乾燥したところ、2-ナフトアルデヒド524gが純度97%の固形物として得られた。2-メチルナフタレンからの収率は83.7%だった。

(2) 5-(2-ナフチリデン)ヒダントインの合成

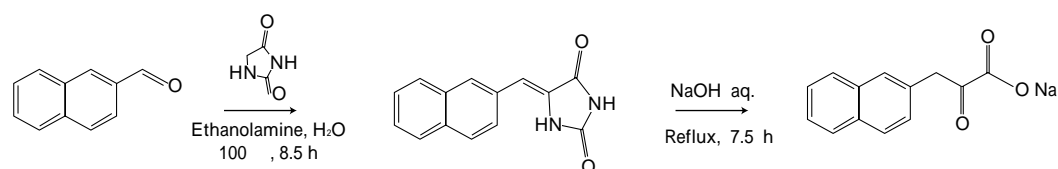
2-ナフトアルデヒド312g (2mol) にヒダントイン300g、エタノールアミン122g、及び純水1.6Lを加えてアルゴン雰囲気下、100 °Cで8時間加熱して5-(2-ナフチリデン)ヒダントイン441gを得た(収率92.6%)。

(3) NPAの合成

5-(2-ナフチリデン)ヒダントイン476g (2mmol) を減



Scheme 2



Scheme 3

圧下超音波処理して脱気した水6L、及びNaOH240gを10Lガラス容器に投入し、アルゴン雰囲気下加熱環流し、100℃で7.5時間撹拌した。反応終了後反応液を熱時濾過し、氷酢酸120gを添加した後、4℃で終夜放置した。析出物をろ取した後、100mlの冷水で2回、100mlのエーテルで2回、さらに2Lのアセトンで洗浄した。30℃で恒量に達するまで真空乾燥を行い、目的物であるNPAを得た。

〔4〕溶解度の測定

NalまたはNPAを純水にけん濁し、所定の温度で30分間撹拌した。この際、Nal又はNPAが溶解しきらずに沈殿物をして残存する様に過剰に添加した。撹拌後、直ちにけん濁液を吸引ろ過して上清を回収し、100倍に希釈してHPLCで溶解したNal及びNPAを定量した。HPLCの条件は後述する(本章第6節)。

〔5〕Nalの酵素合成

グルタミン酸1ナトリウム塩1水和物7.9g(42mmol)を純水85mlに溶解し、70℃とした。この溶液に5N NaOHを滴下してpH8付近としたのち、原料のNPA5g(21mmol)を投入して約5分間撹拌して溶解し、酵素200Uを投入した。反応の追跡のため、経時的に反応液を分取しNPAとGluの消費量及びNalと2-ケトグルタル酸(2-KG)の生成量を定量した。NPA及びNalの定量は本章第5節に述べる方法で、Gluは本章第6節で述べる方法で、また2-KGは本章第7節に述べる方法で定量した。なお、本反応液はスラリーであるため撹拌しつつ採取を行った。反応が停止した後、溶液を室温まで冷却して生成した沈殿物をろ集した。この粗生成物を1N塩酸に溶解して不溶物をろ過して除去し、次いで5N NaOH水溶液を徐々に加えてpH2.0として室温で中和晶析を行った。生成物の光学純度は得られた結晶を1N塩酸に溶解した後、本章第9節に述べる方法で測定した。

〔6〕Nal及びNPAの定量

Nal及びNPAはTSKgel ODS-80TMカラム(4.5mm×15cm)によるHPLCで定量した。溶離液には0.14M酢酸ナトリウム-0.5%トリエチルアミン緩衝液(pH6.35)を用い、アセトニトリルの直線濃度勾配で分離を行った。検出は254nmで行い、流速は0.8ml/minとした。

〔7〕Gluの定量

フェニルイソチオシアネート(PITC)でGluのアミノ基を修飾しフェニルチオカルバモイル(PTC)誘導体とした後にHPLCで定量した¹³⁾。試料溶液に内部標準として1mMのセリン水溶液を等量加えて良く混合し、その10μlを2ml容のガラス製サンプル管に採取し

た。次いでエタノール35μl及びトリエチルアミン5μlを加えて撹拌し、さらにPITCを5μl加えて室温で25~30分間静置して試料中のアミノ酸をPITC化した。PITC化後、溶媒及び過剰のPITCを減圧デシケーター中で1.5~2時間吸引して減圧除去し、PTC-GluをHPLCで定量した。HPLCは本章第6節の条件に準じた。また、一部の実験ではJ.K.International社製グルタミン酸定量キット(商品名F-Kit)を用いて定量した。

〔8〕2-KGの定量

2-KGはo-フェニレンジアミンを用いてキノキサリン誘導体としてHPLCで定量した¹⁴⁾。試薬溶液として5mM o-フェニレンジアミン及び0.7Mメルカプトエタノールを含む0.5N塩酸を、また内部標準溶液として1mMビルビン酸水溶液を調製した。試料溶液50μlに内部標準溶液50μl及び試薬溶液50μlを加え、密栓し遮光して100℃で2.5時間反応を行った。反応後直ちに氷水で冷却し、HPLCで生成物を定量した。HPLCは本章第6節の条件に準じた。

〔9〕光学純度の測定

Nalの光学純度はTSKgel Enantio LIカラムを用いたHPLCで測定した。溶離液には1mM硫酸銅水溶液を用いた。溶離液の流速は1.0mlとし、検出は254nmで行った。標準物質にはSigma社製のL体、D体及びラセミ体のNalを使用した。

〔10〕各種2-ケト酸(ナトリウム塩)の有機合成

MsATの基質特異性を解析するためFig. 2に示す2-ケト酸を合成した。これら是对応するL-アミノ酸が開発中医薬の部分構造として利用されているものである。合成はそれぞれに対応する市販のアルデヒドを出発原料として、本章第3節に述べた方法に準じて行った。なお、4-チアゾリルビルビン酸の原料である4-チアゾリルアルデヒドは市販品としての入手が困難だったため4-メチルチアゾールを出発原料として合成した。すなわち、四塩化炭素中、N-プロモサクシンイミド、酢酸及び2,2'-アゾビスイソプロピロニトリルの存在下、アルゴン雰囲気下で4-メチルチアゾールのメチル基をプロモ化し、次いでアルゴン雰囲気下、10%硫酸水溶液中で加熱環流することにより、4-チアゾリルアルデヒドを得た。

トリメチルビルビン酸は30g(0.3mol)のtert-ブチルメチルケトンを出発原料とし、0.6molのKMnO₄を含む1.3Lの0.6M NaOH中、0℃で4時間の酸化反応によって合成した。さらに反応液をHClでpH1-2とし、エーテル抽出により得られた油状物を-20℃で結晶化し、酵素基質として使用した。

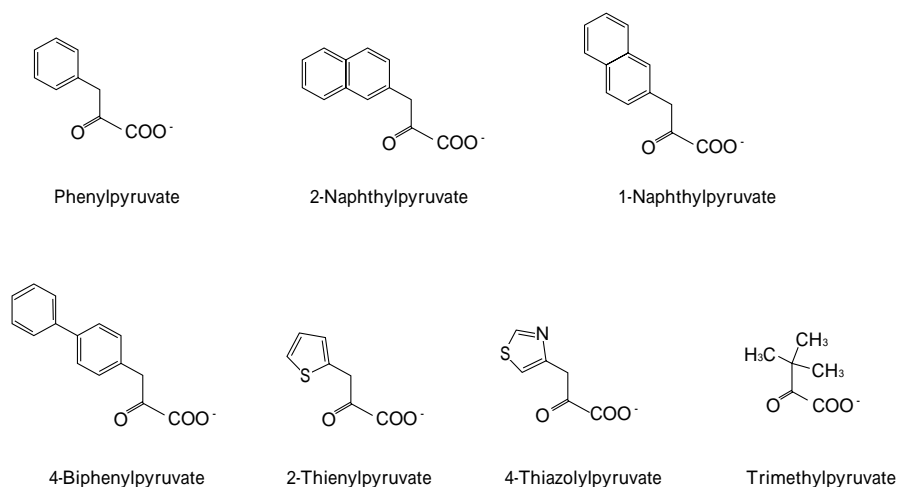


Fig. 2 3-Substituted 2-keto acids examined.

〔11〕各種2-ケト酸に対する酵素活性の測定

芳香族2-ケト酸に対する活性は10mMの目的とする2-ケト酸及び10mM Gluを基質としたほかは、本章第2節にのべた酵素活性測定方法に準じて測定した。酵素反応速度は目的の2-ケト酸に対応する芳香族アミノ酸(Sigma等から購入)を標準物質として、生成物をHPLCで定量して求めた。脂肪族2-ケト酸も同様に酵素反応を行ったが、本章第7節に準じて生成物をPTC誘導體とし、本章第6節に準じた方法で定量した。

3. 実験結果

〔1〕酵素の調製

発現プラスミド12種類及び大腸菌7株(K12株、RB791株、W3110株、MC4100株、C600株、HB101株及びKY1436株)を用いてMsAT発現量を比較し、生産菌株として大腸菌HB101株をプラスミドpATD2(市販プラスミドPUC118から誘導したもの)で形質転換したものを選択した。また培地の炭素源/窒素源

の種類や濃度を検討したところ、前章第1項で述べたTG培地で本菌株を培養した場合に、培養液1mlあたり194Uと最も高い酵素生産性が得られた。以上に述べた生産菌株及び培地を用いて得た2Lの培養液より酵素活性約39万Uの無細胞抽出液を調製した。この溶液にPLPを1mM添加すると酵素活性は約1.5倍に増加した。純粋なTpMsATの比活性を190U/mgとすると、TpMsATの生産量は培養液1Lあたり1.5gと推定された。我々はこの結果をもって当面は十分な発現量を得られたものとした。

次いで70℃、30分間の加熱処理を行い、大腸菌由来の蛋白質の除去を試みたところ酵素の比活性は2倍以上に向上した。この酵素液にアセトンを加えて一度MsATを沈殿として回収し、再度緩衝液に溶解した。以降のNaI合成にはこの酵素液を用いた。

また、詳細な活性評価を行うためにはさらに精製した酵素を用いた。上記の粗酵素液を80℃で30分間加熱処理¹⁵⁾、DEAE-Toyopearlを2回行うことでSDS-ポリ

Table 1 Purification of MsAT

| | Volume (ml) | Activity ^a (U/ml) | Protein (mg/ml) | Specific activity (U/mg) | Total activity (U) | Yield (%) |
|---------------------------------|-------------|------------------------------|-----------------|--------------------------|--------------------|-----------|
| Cell free extract | 380 | 1,020 | 27.5 | 37.1 | 387,100 | 100 |
| PLP addition | 380 | 1,460 | 26.2 | 55.9 | 555,900 | 144 |
| 1st heat treatment ^b | 300 | 1,100 | 9.33 | 118 | 329,100 | 85 |
| Acetone precipitate | 110 | 2,400 | 21.9 | 101 | 263,900 | 68 |
| 2nd heat treatment ^c | 1105 | 2,790 | 22.3 | 125 | 293,000 | 76 |
| DEAE Toyopearl | 1630 | 306 | 2.71 | 113 | 192,600 | 50 |
| Ammonium sulfate | 55 | 1,510 | 28.5 | 51 | 83,000 | 21 |
| DEAE Toyopearl | 120 | 415 | 2.74 | 151 | 49,800 | 13 |

^a Activity was determined by measuring the amount of L-2-Naphthylalanine formed from 10 mM 2-Naphthylpyruvate and 10 mM L-glutamate.

^b Heated at 70℃ for 30 min.

^c Heated at 80℃ for 30 min.

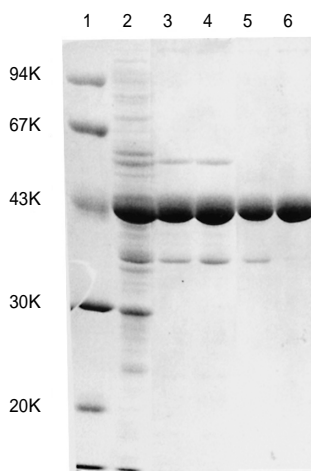


Fig. 3 SDS-PAGE analysis of MsAT preparations in each purification step. Lane 1, marker proteins; lane 2, cell extract of recombinant *E. coli* HB101 harboring plasmid pATD2; Lane 3, supernatant after heating at 70 for 30 min; lane 4, precipitate by adding 50% (V/V) acetone; lane 5, supernatant after heating at 80 for 30 min; lane 6, purified MsAT after DEAE-Toyopearl chromatography.

アクリルアミドゲル電気泳動的に均一なMsAT標品が得られた (Fig. 3)。全精製工程を通しての酵素の回収率は13%だった (Table 1)。

〔2〕 NPA及びNalの水に対する溶解度

Nalは双イオン性の化合物であり、一方NPAは陰イオン性の化合物であるため、ATが高い活性を示す中性付近のpHでは両者の溶解度が大きく異なることが予想された。そこで、Nal合成条件の検討に先立ち、

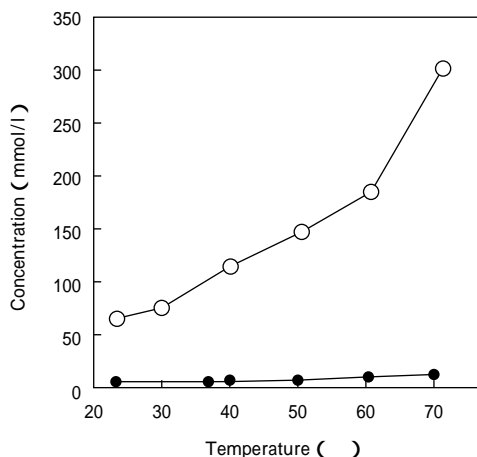


Fig. 4 Solubility of NPA (○) and Nal (●) in aqueous solution at various temperatures. Both compounds were stirred in water at a given temperature for 30 min. Undissolved materials were removed by filtration. NPA and Nal in the filtrate were determined by HPLC.

両者の純水に対する溶解度を比較した (Fig. 4)。NPAの溶解度は温度に大きく依存し、70 °Cでは常温付近の約6倍の溶解度を示した。一方、Nalの溶解度はいずれの温度でもNPAより低く、また温度依存性も顕著には認められなかった。そのため、両者の溶解度の差は高温域では常温付近より広いものとなった。なおNal飽和水溶液はいずれの温度でもpH7であった。NPA飽和水溶液は常温ではpH9付近だったが、温度の上昇とともにpHが低下し、70 °CではpH7となった。

〔3〕 Nal収率に対する原料濃度の影響

両者の溶解特性から、高濃度のNPAを原料としてNal合成反応を行うとNalは沈殿物として生成して反応系から排除され、反応の平衡がNal生成へシフトすることが期待された。そこでNal収率に対するNPA濃度の影響を調べた。ここではアミノ基供与体のGluはNPAと等量 (モル比) とし、酵素の添加量は10,000U/lとした。70 °Cで一晩反応を行い、反応が平衡に達した時点でのNal収率をFig. 5に示した。NPA濃度が50mmol/l以下の場合、収率は約50%だったが、NPA濃度の上昇とともに収率も向上し、180mmol/lでは85%の収率が得られた。次いで、収率をさらに向上させるためNPAに対するGluの濃度比を検討した。NPAに対してGluを二当量用いることで収率は約95%にまで向上した (Fig. 6)。

〔4〕 pH及び温度の影響

NPA濃度を180mmol/lとし、二当量のGluの存在下で反応を行った場合の最適pHと温度を測定した。

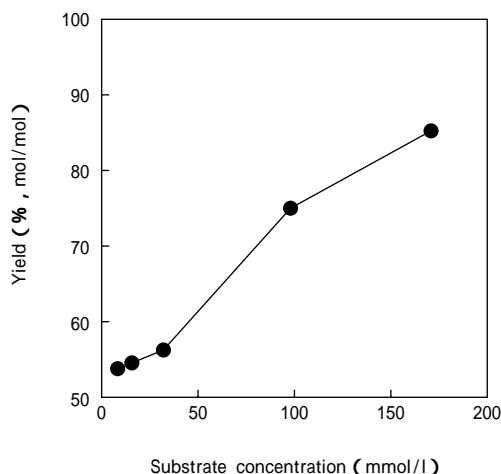


Fig. 5 Effect of the initial concentrations of NPA and Glu on the yield of Nal. Using an equimolar ratio of NPA and Glu, the reaction was carried out at pH 7.2 and 70 °C for 16 h, catalyzed by 100,000 U/l MsAT. The reaction mixture was diluted hundred fold by 0.1N NaOH to dissolve Nal precipitate. Nal and NPA in the solution were determined by HPLC.

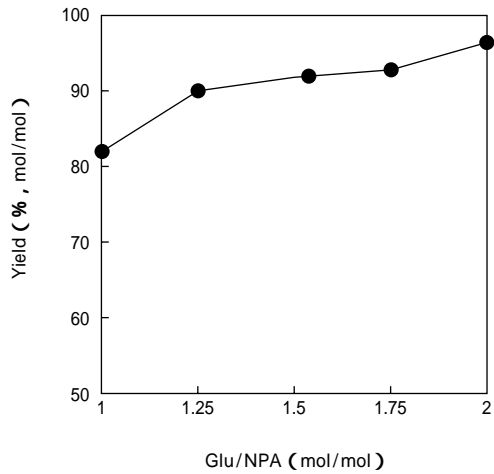


Fig. 6 Effect of the initial concentrations of Glu on the yield of Nal. The reaction was carried out at 180 mol/l NPA and various concentrations of Glu. Other conditions were the same as the legend to Fig.5.

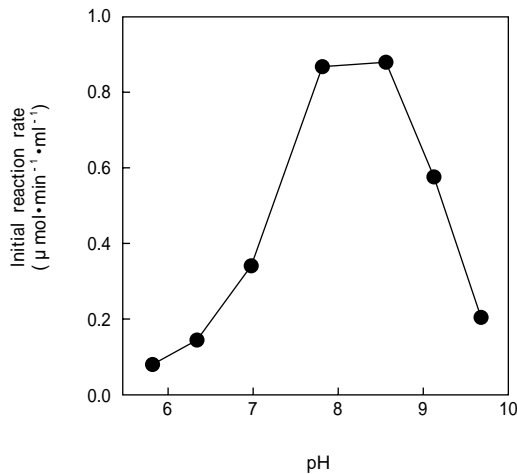


Fig. 7 Effect of pH on the initial reaction rate. The reaction was carried out at 70 °C using 180 mmol/l NPA, 360 mmol/l Glu and 5000 U/l MsAT.

70 °C で反応を行うとpH8付近で反応初速度は最大だった (Fig. 7)。次いでpH8での初速度への反応温度の影響を調べると90 °Cで最大だった (Fig. 8)。ところが、さらに16時間反応を継続した場合の収率は70 °Cで最も高くなり、それ以上の温度では急激に低下した (Fig. 8)。本反応条件下でMsATは90 °Cで最も高い触媒活性を示すものの、70 °Cを超える温度では酵素の失活も進むため反応が終点に至らないものと考えられた。

〔5〕反応の経時変化

180mmol/lのNPAを出発原料として、二当量のGlu及び2000U/lのMsATの存在下、pH8.0、70 °Cにおいて、アルゴン雰囲気下で反応を行った場合の反応の経時変化をFig. 9 Aに示した。一方Fig. 9 Bには好気条件で反応を実施した結果を示す。Fig. 9 Aの条件では93%の収率が得られたが、Fig. 9 Bでは収率は約40%にとど

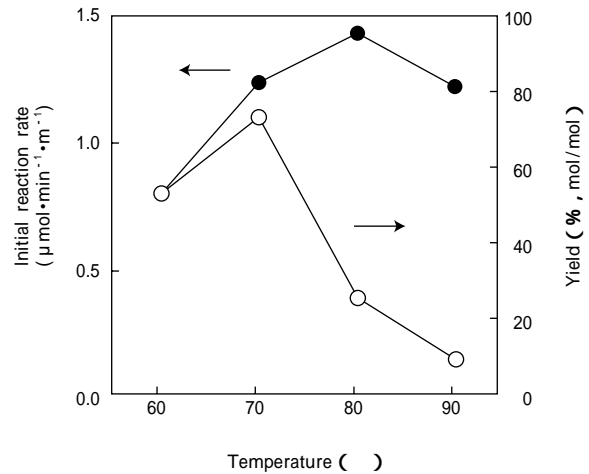


Fig. 8 Effect of temperature on the initial reaction rate (○) and Nal yield (●). The reaction was carried out at pH 8.0 for 10 min (○) or 16 h (●) using 180 mmol/l NPA, 360 mmol/l Glu and 5000 U/l MsAT.

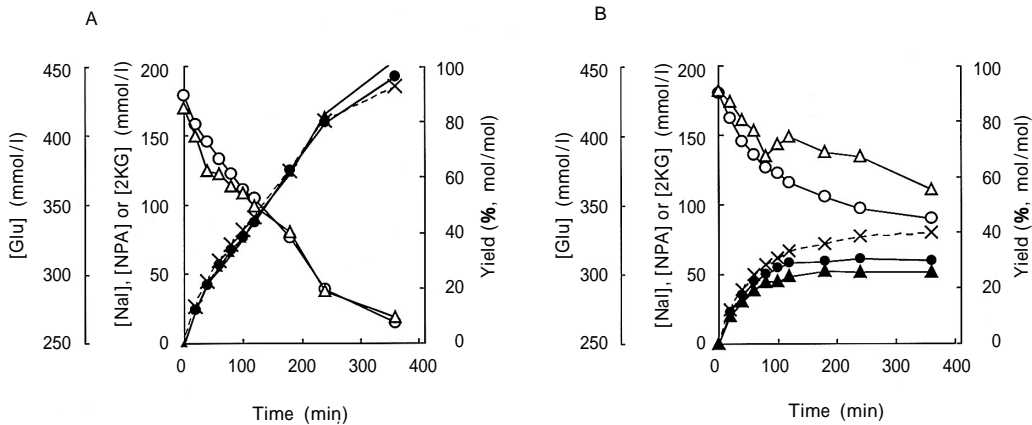


Fig. 9 Time course of Nal synthesis under an argon atmosphere (A) and aerobic conditions (B). Concentrations of NPA (○), Nal (●), 2-ketoglutarate (△) and Glu (○) were monitored throughout the reaction. The conversion yield of this reaction is indicated by (×).

まった。Fig. 9 Bでの収率が低い原因は反応系内の何らかの成分が酸化して触媒毒が生成し、酵素を失活させたことによると推測している。反応系に硫化水素を添加して酸素を除去した場合にもFig. 9 Aと同様の結果が得られた（データは示さず）。

〔6〕生成物の光学純度

反応液をろ過して回収した反応生成物の光学純度を測定した結果をFig.10Aに示した。Fig.10Bは標準物質のD、L-Nalを反応生成物に混合したものである。反応生成物はL-体に相当する単一のピークを示し（Fig.10A）、光学純度は99.5%ee以上だった。

〔7〕種々2-ケト酸及びアミノ酸に対する酵素活性

種々の2-ケト酸及びアミノ酸に対するMsATの活性をTable 2に示した。トリメチルピルビン酸に対しては本酵素は全く活性を示さなかったが、その他の芳香族2-ケト酸にはNPAに対してと同様に高い活性を示した。また、アミノ酸を基質として活性評価した場合にもL-ターシャリロイシンには全く活性を示さなかった

が、その他の芳香族及び脂肪族アミノ酸に対して高い活性を示した。

4. 考 察

本研究で構築したNal合成法はNPAとNalの溶解度の差によってNalを沈殿生成させることが特徴である。これにより反応の平衡はNal生成に偏り、副原料のGluを過剰に用いることなく、かつ単純な反応系でNalを効率良く合成することが可能となった。また、Nalをろ過によって回収すると、副原料のGlu及び副生成物の2-ケトグルタル酸（2KG）及び未反応のNPAは上清に残存し、Nalと分離される。このために比較的純度の高いNalを簡単に得ることができた。酵素反応生成物を沈殿として得ることは当社のアスパルテーム（APM）合成技術と共通するものであり¹⁶⁾、本方法を工業化する場合にはAPM合成技術が活用できるものと期待している。

本方法のもう一つの特徴は耐熱性が極めて高い超好熱菌由来の酵素を用いることにある。原料のNPAの水に対する溶解度は温度によって大きく影響を受けるが、目的物のNalは中性pHではいずれの温度でも溶解性が低い。耐熱性酵素を用いたことで反応温度を高く設定することが可能となり、NPAを5重量%という生産性の面からほぼ十分な濃度に仕込んで反応を行うことができた。さらに条件を検討すればより高濃度で反

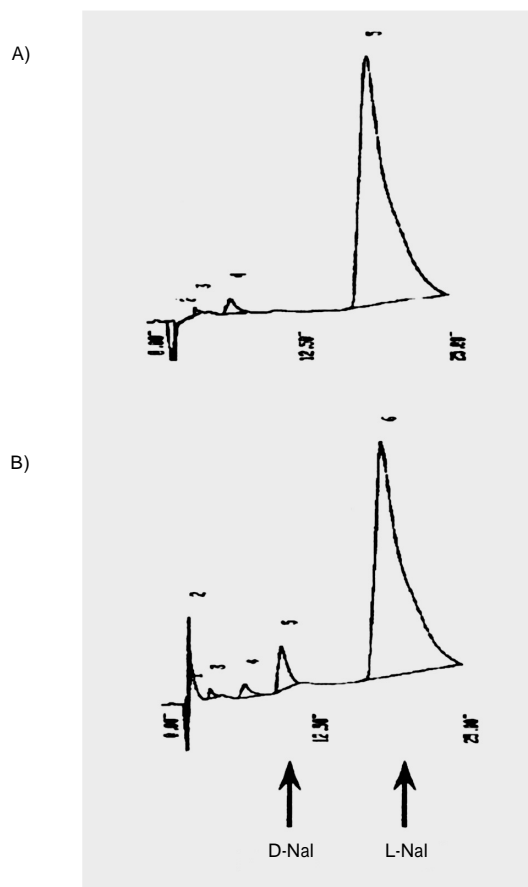


Fig.10 TSKgel Enantio L1 HPLC of the reaction product (A) and the mixture of the product and authentic D,L-Nals (B). Authentic Nal was purchased from Sigma.

Table 2 Activity of purified MsAT toward various amino acids and 2-keto acids

| Substrate | Specific activity μ mol/min/mg |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| Phenylpyruvate ^a | 230 |
| 2-Naphthylpyruvate ^a | 190 |
| 1-Naphthylpyruvate ^a | 69 |
| 4-Biphenylpyruvate ^b | 320 |
| 2-Thienylpyruvate ^a | 107 |
| 4-Thiazolylpyruvate ^a | 174 |
| Trimethylpyruvate ^a | 0 |
| L-Phenylalanine ^c | 230 |
| L-Alanine ^c | 150 |
| L-Norvaline ^c | 240 |
| L-Leucine ^c | 150 |
| L-Isoleucine ^c | 70 |
| L-tert-Leucine ^c | 0 |
| L-Norleucine ^c | 230 |

^aActivity was determined by measuring the amount of L-amino acids formed from 10 mM 2-keto acid and 10 mM L-glutamate.

^bDetermined by measuring the amount of L-4-biphenylalanine formed from 1.25 mM 4-biphenylpyruvate and 10 mM L-glutamate.

^cDetermined by measuring the amount of L-glutamate formed from 10 mM 2-ketoglutarate and 10 mM L-amino acid.

応を行うことも可能と考えている。また、MsATを常温菌である大腸菌で生産したため、本酵素に夾雑する蛋白質には基本的に耐熱性がなく加熱処理を行うと凝集する。そのため加熱処理とアセトン分画を行うだけでMsATは純度の高い標品として得られた¹⁵⁾。そのため本方法では酵素に由来する不純物が反応系に持ち込まれることが最小限にとどめられている。

Nalを不斉合成する先行技術としては、ヒダントイン型前駆体をヒダントイナーゼにより光学分割する方法¹⁷⁾、アズラクトン型前駆体を加水分解してN-アセチル-D,L-2-ナフチルアラニンを得、さらにアシラーゼで光学分割する方法¹⁸⁾、不飽和のアズラクトン型前駆体を一度有機金属触媒で不斉還元して光学活性体とし、これを加水分解してN-アセチル-L-2-ナフチルアラニンを得たのちに、さらにアシラーゼで脱アセチル化する方法¹⁹⁾、フェニルアラニン脱水素酵素によりNPAを還元アミノ化する方法¹⁹⁾などが報告されている。の方法は原料の水溶性の問題から仕込み濃度を高く設定することができず(数mmol/l程度)、またの方法ではラセミ体の一方の異性体は無駄になり、の方法は不斉還元と酵素分割を組み合わせるので工程が複雑であり、で用いられた酵素はNPAに対する活性が非常に低い。我々の方法ではこの様な先行技術における様々な問題点が回避されている。

なお、Fig. 8Aの反応では2,000Uの酵素を用いて約0.2molの目的物が得られたが、精製酵素の比活性を190U/mg、酵素の分子量を45,000として計算すると、ここで使用した酵素量は約10mg(約0.2 μ mol)となる。すなわち酵素一分子が100万分子のNalを合成したことになる。MsATが非常に性能の良い触媒であることをここで改めて強調したい。

ところで本方法の検討している際に、2-ナフトアルデヒドの合成収率の低さと酵素反応の再現性の低さという二つの問題がクローズアップされた。我々は安価な原料である2-メチルナフタレンを出発原料として、そのメチル基の臭素化を経てアルデヒドに誘導することを試みたのだが、検討開始当初は臭素が芳香環に付加する副反応のため十分な収率が得られなかった。この問題は反応系内に7.5時間という長時間をかけて臭素を徐々に添加することで解決することができた⁸⁾。

酵素反応の再現性の低さについては、原料のNPAの精製が十分でない場合に酵素反応が阻害されること、そしてNPA存在下でMsATを加熱するとMsATが何らかの化学修飾をうけて失活することを見出したことが解決の糸口となった。この化学修飾は酸素が存在しない場合は抑制された。このことからNPAの酸化

劣化により触媒毒が発生し、MsATが失活するために反応の再現性が低下しているものと考えられた。残念ながらこの触媒毒の正体は解明できなかったが、NPAをアセトンで十分に洗浄して精製すること、そして酸素非存在下で酵素反応を行うことで触媒毒の生成が防止されるようになり、再現性よく酵素反応をおこなうことができるようになった²⁰⁻²¹⁾。

以上のようにラボレベルではあるものの簡単かつ生産性良くNalを合成する方法を確立できたが、他の非天然型アミノ酸についてはどうであろうか。MsATで合成できる非天然型アミノ酸の範囲はMsATの基質域からある程度推測できると考えている。すなわち、MsATはTable 2に示すように様々な基質に対してNPAに対してと同等の高い活性を示した。これらのうち、1-ナフチル基やピフェニル基などの疎水性が高い置換基を有するアミノ酸はNalと同様に中性pHで等電点沈殿することが期待できるので、対応するケト酸からNalの場合と同様にして効率良く合成できると考えられる。一方トリメチルビルビン酸及びL-ターシャリロイシンの様に炭素から三本に枝分かれた基質にはMsATは作用しなかった。従ってMsATを用いてL-ターシャリロイシンを合成することはできないものと結論される。MsATはイソロイシンには活性を示すので、脂肪族アミノ酸では炭素が二本に分かれたアミノ酸であれば対応可能である。また、4-チアソリルアラニンの様に置換基に正の荷電を持つ2-アミノ酸はpH中性付近で等電点沈殿しないものと予測されるので、Nalを合成する場合と同様には平衡を目的物側に偏らせることはできない。この様なアミノ酸を合成する場合はもう一工夫が必要であると考えられ、それは今後の課題である。

なお、我々はMsATのアミノ酸配列情報を元に、MsATと同様に広範な基質に作用する当社独自のAT二種類を得ていることを付記する。これらは全ゲノム情報が解明された二種類の超好熱性古細菌*Pyrococcus furiosus*²²⁾と*Aeropyrum pernix*²³⁾から分離したものであり、我々は前者から分離した酵素をPfMsAT、後者からの酵素をApMsATと命名した。これに対応して本報告書で用いた*T. profundus*由来のMsATはTpMsATと改名した。両酵素は極めて耐熱性が高く、95 $^{\circ}$ Cで加熱した際の活性の半減期からするとTpMsATの2倍から3倍の熱安定性を示す。両酵素は非天然アミノ酸を合成する上で有用性が高いものと期待している²⁴⁾。

5.まとめ

医薬品中間体として有用なL-2-ナフチルアラニンを

モデル化合物として、超耐熱性アミノトランスフェラーゼを用いた不斉合成法を開発した。本法では目的物は99%ee以上の非常に高い光学純度で得られ、また反応液中に沈殿として系外に排除されるために高収率が達成され、さらに目的物をろ過によって容易に回収することができる。MsATは広範なアミノ酸又はケト酸に作用することから、本稿で述べた方法は疎水性非天然型アミノ酸の合成に広く適用できると考えられる。

6. 参考文献

- 1) Taylor, P. P., Pantaleone, D. P., Senkpeil, R. F. and Fotheringham, I. G. ; *Trends Biotechnol.*, 16, 412 (1998)
- 2) Schulz, A., Taggeselle, R., Tripier, D. and Bartsch, K. ; *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1 (1990)
- 3) Then, J., Barthsch, K., Deger, H., Grabley, S. and Marquardt, R. ; EP 0, 533, 216 A1.
- 4) Kawashima, Y., Fujimura, K., Suhara, H., Miyawaki, N. and Fujita, Y. : WO 96/14293.
- 5) Lesson, P. A., Rabasseda, X., and Castaner, J. ; *Drugs of the Future*, 22, 353 (1997)
- 6) Adams, M. W. W., Perler, F. B. and Kelly, R. M. ; *Bio/Technology*, 13, 662 (1995)
- 7) Kobayashi, T. ; Program and Abstracts of the 5th Anniversary Novo Nordisk Enzyme Symposium, pp21 (1997)
- 8) Hanzawa, S, Oe, S., Tokuhisa, K., Kawano, K., Kobayashi, T., Kudo, T. and Kakidani, H. ; *Biotechnol. Lett.*, 23, 589 (2001)
- 9) 半澤敏、柿谷均、大江正剛、徳久賢治、河野和久 ; 特願平 11-329334
- 10) 徳久賢治、河野和久、柿谷均、半澤敏、大江正剛 ; 特願 2000-13903
- 11) 河野和久、徳久賢治、柿谷均、半澤敏、大江正剛 ; 特願 2000-32770
- 12) 河野和久、徳久賢治、柿谷均、半澤敏、大江正剛 ; 特願 2000-139394
- 13) Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A. and Tarvin, T.L. ; *J. Chromatogr.*, 336, 93 (1984)
- 14) Hayashi, T., Tsuchiya, H. and Naruse, H. ; *J. Chromatogr.*, 273, 245 (1983)
- 15) 大江正剛、柿谷均、半澤敏、河野和久、徳久賢治 ; 特願 2000-357631
- 16) Oyama, K., Irino, S. and Hagi, N. ; *Methods in Enzymol.*, 136, 503 (1987)
- 17) Sylđatk, C., Volkel, D., Bilitewski, U., Krohn, K., Hoke, H. and Wagner, F. ; *Biotechnol. Lett.*, 14, 105 (1992)
- 18) Asymmetric Synthesis Seminar “光学活性体の新展開とカイロテックの技術” 講演要旨集 (1998)
- 19) Asano, A., Yamada, A., Kato, Y., Yamaguchi, K., Hibino, Y., Hirai, K., Kondo, K. ; *J. Org. Chem.*, 55, 5567 (1990)
- 20) 半澤敏、柿谷均、大江正剛、河野和久、徳久賢治 ; 特願 2000-210693
- 21) 河野和久、徳久賢治、柿谷均、半澤敏、大江正剛 ; 特願 2000-178582
- 22) 柿谷均、大江正剛、半澤敏、徳久賢治、河野和久 ; 特願 2000-143404
- 23) 柿谷均、大江正剛、半澤敏、徳久賢治、河野和久 ; 特願 2000-357630
- 24) Hanzawa, S., Oe, S., Tokuhisa, K., Kawano, K., Kakidani, H. ; 論文投稿中

著者
氏名 半澤 敏
Satoshi HANZAWA
入社 昭和60年4月1日
所属 東京研究所
バイオ有機分野
主任研究員

著者
氏名 大江 正剛
Seigo OE
入社 昭和63年4月1日
所属 東京研究所
バイオ有機分野
主任研究員

著者
氏名 徳久 賢治
Kenji TOKUHISA
入社 平成元年4月1日
所属 エフテック株式会社
研究所
主任研究員

著者
氏名 河野 和久
Kazuhiisa KAWANO
入社 平成7年4月1日
所属 東京研究所
新材料分野
副主任研究員

著者
氏名 柿谷 均
Hitoshi KAKIDANI
入社 昭和54年10月16日
所属 東京研究所
バイオ有機分野
主席研究員

著者
氏名 石黒 敬彦
Takahiko ISHIGURO
入社 昭和58年4月1日
所属 東京研究所
バイオ有機分野
主席研究員