



Directed evolution of an aminoalcohol dehydrogenase for efficient production of double chiral aminoalcohols

2つのキラル中心を有するアミノアルコールの効率的生産のための
アミノアルコール脱水素酵素の進化分子工学的改良

(JBB, Vol. 111, No. 3, 266–271, 2011)

浦野 信行^{1,2}・福井 聡子²・熊代 祥子²・石毛たける²・
北 伸二³・坂本 恵司³・片岡 道彦^{1,2*}・清水 昌^{2a}

酵素など生体触媒を利用した物質生産法は、従来の化学的手法と比較して概して環境に与える負荷が小さく、また、酵素の持つ高い立体選択性などの特徴とも相まって有効な物質生産法のひとつとして広く利用されている。しかしながら、実際の物質生産への利用には汎用性や安定性の低さといった障害も多い。これらの解決には、第一には新しい酵素の探索による高機能な酵素の取得が挙げられるが、別の方法として進化分子工学的手法による酵素の機能改良もまた非常に有効なアプローチであり、得られた酵素を実用化に近づける際などに威力を発揮することが期待される。

光学活性アミノアルコールのひとつである*d*-プソイドエフェドリン (dPE) は気管支拡張作用などの活性を有する有用化合物である。著者らは前駆物質としてラセミ体2-(メチルアミノ)-1-フェニルプロパン-1-オン (MAK) を用い、*Rhodococcus erythropolis* MAK154株由来のアミノアルコール脱水素酵素 (AADH) を「バイオ不斉還元システム」¹⁾に適用することで約180 mMのdPEが高純度で生産できることを示した²⁾。しかし、反応溶液内のdPE濃度が100 mMを超えると急激に反応性が低下した。これは反応溶液中に蓄積した生成物であるdPEがAADHによるMAK不斉還元反応を阻害しているためであることが判明した。

そこで、AADHの酵素遺伝子にランダム変異を導入し、dPEによる生成物阻害の低下した変異酵素の取得を試みた。ランダム変異導入による酵素改変の成功の鍵はいかに簡便なスクリーニング法を構築できるかにかかっていると考えられるが、本研究ではdPE存在下での活性の有無を発色系で検出できるようにした。AADHによる還元反応はNADPH要求性であり、反応が進めば基質と等量のNADPHが消費される。本反応では、反応液にグルコースとグルコース脱水素酵素 (GDH) よりなるNADPH再生系を導入しており、消費されたNADPHはGDHによるグルコースのグルコノラクトンへの酸化

反応を伴って再生される。グルコノラクトンは反応溶液内での自発的加水分解によって酸性物質であるグルコン酸へと変換されるため、結果として反応が進めば進むほど反応溶液のpHは低下する。反応の進行はこのことを利用して反応液にpH指示試薬を添加した際の色の変化によって容易に検出することができた。こうして得られた候補酵素について、各反応溶液中の生成物濃度を別途定量して個々の還元活性を測定したが、高濃度の反応産物であるdPE存在下で新たに生成されたdPEの濃度を正確に定量することは困難であった。そのため、反応基質としてMAKの構造類縁体を用いて還元酵素活性を測定した。用いた構造類縁体はAADHによる還元反応の基質となり、dPE存在下での反応阻害も同様に認められた。

数千株の変異酵素ライブラリーからのスクリーニングの結果、それぞれ1アミノ酸置換が導入された2種類の変異酵素W1とW2の取得に成功し、さらに両者の変異点を併せ持つ変異酵素M1も構築した。これら3種の変異酵素はいずれも、野生型酵素ではまったく活性を示さない400~500 mMのdPE存在下でも活性を示し、特に二重変異酵素であるM1はW1, W2より高い活性を示し、これら変異点が共に有効な変異であることが確認できた。3種の変異酵素を精製し解析した結果、野生型酵素と比べW1では k_{cat} 値が、W2では K_m 値がそれぞれ上昇しており、M1ではW1型の k_{cat} 値とW2型の K_m 値を示し、これらの変異点がそれぞれ酵素活性と基質との親和性に影響を与えていることが示唆された。今後はAADHの立体構造解析を進め、変異点と機能向上の関連を解析していきたい。

- 1) Kataoka, M. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **62**, 437 (2003).
- 2) Kataoka, M. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **80**, 597 (2008).

* 著者紹介 ¹大阪府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻 (教授) E-mail: kataoka@biochem.osakafu-u.ac.jp
²京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻, ³第一ファインケミカル株式会社, ^a現, 京都学園大学