

2019年度 生物工学賞 受賞



新規酸化還元系バイオプロセスの 基盤技術開発とその応用

伊藤 伸哉



Research and development of novel biocatalysis focusing on oxidation-reduction reactions

Nobuya Itoh (*Biotechnology Research Center and Department of Biotechnology, Toyama Prefectural University, 5180 Kurokawa, Imizu, Toyama 939-0398*) Seibutsu-kogaku **98**: 2-13, 2020.

はじめに

有用物質生産のバイオプロセス化と脱石油資源化のための糖を含む各種バイオマスの高度利用は、21世紀の化学・化学産業の課題であり、グリーンケミストリー (green chemistry) の主要コンセプトの一つとして知られている。他方、欧米を中心にバイオエコノミー (bioeconomy) 戦略もその勢いを増しており、最近の (マイクロ) プラスチック類の海洋汚染を端に発するプラスチックゴミの削減運動と紙バッグの復活やバイオプラスチックの興隆をみると、新しい時代の潮流を感じざるを得ない。「安価で便利な製品であれば売れる」から、「環境と調和した (生物圏に負荷をかけない) 生産プロセスによる製品でなければ買ってもらえない、投資してもらえない」時代がもうすぐ来るのではないだろうか。奇しくも2019年6月に、10年ぶりにイノベーション推進の観点から「バイオ戦略2019」が政府から発表された。その内容を報じた日経新聞 (2019年7月7日付) の見出しには、やや残念な表現ではあるが「米欧中に後れ、9領域支援」とあり、日本に逆転できる潜在力がある重点9領域が示されており、その中の一つにバイオ生産システムが含まれる。

バイオプロセスを用いる有用物質生産には多くの報告例があるが、大別すると、有機合成における単位反応のバイオプロセス化と各種バイオマスからの汎用化学品やファインケミカルズの微生物・合成生物学的手法によるバイオ生産法に分けられる。いずれの場合も、その生産

性または生産物のプロダクションレベルが非常に重要であり、たとえ精密化学品であっても10 g/L以上、汎用化学品であれば100 g/L (1 M程度) 以上の終濃度が達成できなければ実用化は難しい。また前者の場合は、常に既存の合成プロセスとの競合、いわゆる化学触媒プロセス vs. バイオ触媒プロセスが議論となり、残念ながら主に開発スピードの観点で化学触媒系に軍配が上がる事例がこれまで多かった。しかし、バイオエコノミーの観点からバイオ触媒が利用できるものは、将来見直される可能性は高い。

バイオプロセスに用いられる酵素触媒には、主に加水分解酵素やリアーゼが用いられてきた。一方、酸化還元酵素やリガーゼが工業用プロセスとして利用されている例は多くない。これは他の酵素系と比較すると、反応にNAD(P)H, FADH₂, ATPなどの補酵素再生系を必要とすること、時に酵素の基質特異性が狭く汎用性に劣ること、目的とする基質や生成物が水難溶性のものが多く生体触媒が有機溶媒系で不安定であり十分な生成物濃度が得られないこと、などの要因が考えられる。筆者の研究室では、これらの問題に果敢に取り組み、さまざまな有用酵素触媒の微生物やメタゲノムからの探索、進化分子工学的的手法による酵素触媒の改良、反応場としての (極性) 有機溶媒-水系における酸化還元プロセスの最適化、*Pseudomonas* や *Kocuria* などの有機溶媒耐性菌の宿主・ベクター系開発と利用、メタゲノミクスと進化分子工学的融合技術の開発、さらに、これらの基盤技術を統合す

著者紹介 富山県立大学工学部生物工学科・生物工学研究センター (教授)
E-mail: nbito@pu-toyama.ac.jp/itohnobuya123@gmail.com

ることによる効率的なバイオプロセスの研究開発を行ってきた。以下に紹介するのは、筆者の戦略とその具体例であるが、今後のバイオプロセスの研究開発の一助になれば幸いである。

1. 水素移動型不斉還元反応による 光学活性アルコールの生産

光学活性（キラル）アルコールは、リピトール[®]やベシケア[®]など、多数の医薬品の中間体などとして利用されている。一般的にはケトンの不斉還元により合成されることが多い。不斉化学触媒としては、BINAP-Ruのような不斉金属（野依）触媒を用いる方法がよく知られ、優れた成績を収めているが¹⁾、当該反応については生体触媒反応を用いる方法が、生産性が低いといった欠点を克服し、キラルアルコールの実用的な生産手法となりつつある²⁻⁵⁾。バイオ不斉還元法は、触媒製造コスト、ハンドリングの観点から不斉金属触媒を用いる方法よりも優位な面が多い。ただし、バルキーな置換基を有するケトンや通常のアルケン類の二重結合の不斉還元はエノエート（enoate）類を除けば苦手とする。

筆者らは、ガス状スチレン資化性菌などから不斉還元に適した酵素を探索し、2-プロパノール（IPA）を補酵素再生系に利用できる酵素として、*Rhodococcus* sp. ST-10

由来の phenylacetaldehyde reductase [PAR: アルコール脱水素酵素（ADH）の一種]⁶⁻⁸⁾と *Leifsonia* sp. S-749 由来の ADH (LSADH)⁹⁻¹¹⁾を見いだした。また、その他の不斉還元酵素を共同研究企業と一緒に開発してきた（表1）。PARは亜鉛を含む中鎖ADHファミリーに属し、LSADHは短鎖 dehydrogenase/reductase (SDR) ファミリーに属する酵素である。両酵素は、いずれも NAD⁺/NADH 依存性であり、それぞれ40種類以上のアルキルケトン、アリールケトン、ケトエステルに反応する。また高い立体選択性を有し、PARはアセトフェノンを (*S*)-体 (Prelog型) に、LSADHは (*R*)-体 (anti-Prelog型) アルコールにそれぞれ変換し、多くの場合、得られるアルコールの光学純度は96~>99% e.e.である（図1）^{18,19)}。一般的なADHは、Prelog型の立体選択性を示すものが多い。補酵素の再生については図1に示すように、一つの酵素がIPAを用いてNADHの再生を行うと同時に、基質ケトンを目的とする光学活性アルコールに変換する。すなわち、IPAからNADHを経由して水素をケトンに移し、目的の光学活性アルコールを合成する水素移動型の不斉還元プロセスであり、補酵素再生系を必要としないシンプルな反応系となる。このコンセプトは1980年代に報告されている²⁰⁾。特に、5-20% (v/v) (0.65-2.6 M) 濃度のIPA (log*P*_{ow}:0.28)

表1. 主なバイオ不斉還元用酵素の諸性質

性質	PAR ⁶⁻⁸⁾	LSADH ⁹⁻¹¹⁾	KER ¹²⁻¹⁵⁾	QNR ^{16,17)}
由来	<i>Rhodococcus</i> sp. ST-10	<i>Leifsonia</i> sp. S-749	<i>Penicillium citrinum</i> NBRC4631	<i>Microbacterium luteolum</i> JCM9174
立体選択性	Prelog-type	anti-Prelog type	anti-Prelog type	anti-Prelog type
分子質量	146 kDa	100 kDa	33.0 kDa	94 kDa
サブユニット構造	36.4 kDa (tetramer)	25.0 kDa (tetramer)	36.7 kDa (monomer)	25.7 kDa (tetramer)
pI (計算値)	4.85	4.58	6.21	4.82
補欠分子族	Zn ²⁺ (7.6 mol/mol enzyme)	none	none	none
補酵素選択性	NADH	NADH	NADPH	NADH
<i>K_m</i>				
NADH	0.01 mM	0.048 mM	0.22 mM (NADPH)	0.02 mM
NAD ⁺	0.14 mM	0.12 mM	-	-
主な基質	1.54 mM (acetophenone)	13.6 mM (PTK) ^{a)}	1.20 mM (BAM) ^{b)}	13.8 mM (3-quinuclidinone)
IPA	270 mM (IPA)	57.5 mM (IPA)	-	-
<i>k_{cat}</i> (s ⁻¹ /mol enzyme)	89 s ⁻¹ (acetophenone)	140 s ⁻¹ (PTK)	1,704 s ⁻¹ (BAM)	42 s ⁻¹ (3-quinuclidinone)
	664 s ⁻¹ (IPA)	47 s ⁻¹ (IPA)	-	-
至適 pH (還元)	6.0-6.5	6	6.0-6.5	7.0-8.0

a) phenyl trifluoromethyl ketone, b) methyl 4-bromo-3-oxobutyrates

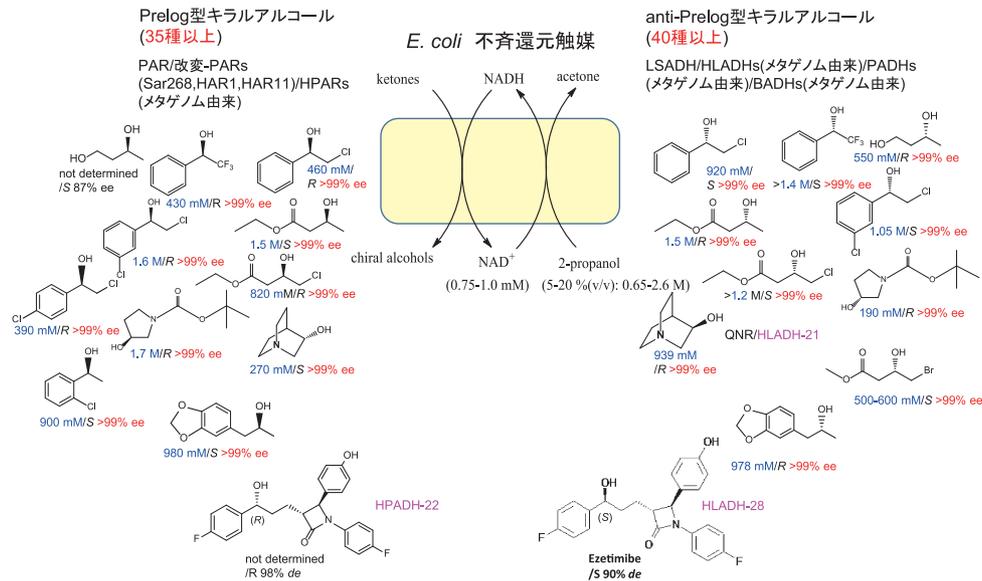


図1. 2-プロパノール (IPA) を水素源とする水素移動型バイオ不斉還元反応

は、補助基質として水難溶性基質の溶解度や組換え *E. coli* 触媒の膜透過性向上にも役立つ。しかし、 $\log P_{ow}$ (各溶媒の水と 1-octanol の 2 相間における分配係数 P_{ow} の常用対数で、溶媒の極性を表す²¹⁾) が 2 以下の極性溶媒は、本質的にはタンパク質の変性剤であり、たとえばエタノールであれば、概ねモル分率が 0.2 (45% (v/v)) 近辺から溶媒のマイクロ構造が大きく変化し、タンパク質の変性を強く誘因すると推定され²²⁾、こうした極性有機溶媒の耐性の上限濃度と考えられる。このように水と混和する極性有機溶媒の場合は、その濃度が重要なファクターとなる。

また、当該反応で高濃度のキラルアルコールを合成するためには、IPA のような極性有機溶媒を含有する反応系で高活性な触媒が必要であるが、進化分子工学的手法による改変酵素の開発により、この問題を克服するとともに、これら酵素の解析を行った。Sar268²³⁾/HAR1²⁴⁾ は 20% (v/v) IPA 存在下、高基質濃度 (*m*-chlorophenacyl chloride) での *E. coli* 触媒の変換率向上を指標に進化分子工学的手法で PAR を改変したものである。その結果、極性有機溶媒-水系における酵素活性低下の顕著な抑制、基質に対する K_m 値の低下、酵素発現量の増大などが認められた。キラルアルコールの生産性は約 10 倍程度向上した^{18,19)}。Sar268 や HAR1 および LSADH を組換え *E. coli* にて高効率に発現し、この菌体または固定化菌体を触媒として休止菌体反応を行っているが、そのプロダクションレベルは反応性の高いものでは、200–350 mg/ml (g/L) となっている^{4,19,25)}。

また、LSADH は高濃度 IPA 反応系 (10–20% (v/v)) での安定性や活性が高く、IPA を水素源とする NADH

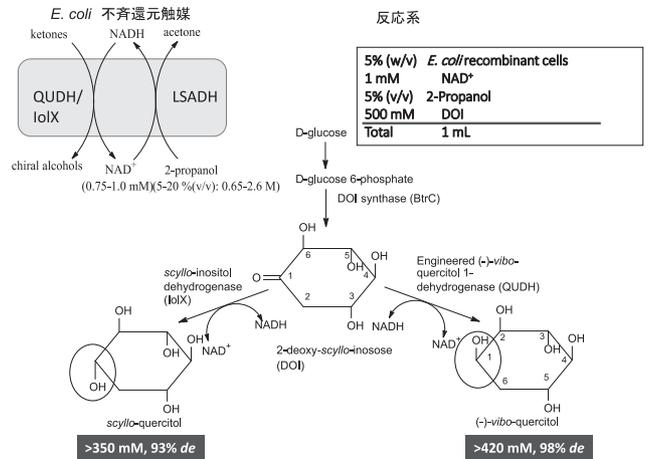


図2. LSADH を NADH 再生系に利用したクエルシトール類の生産

の再生にも利用できる。事実、LSADH は NADH 再生用酵素として次節の光学活性エポキシドの合成にも使用されている。現在、研究室では天然由来シクリトールの一種である (-)-*vibo*-クエルシトール (quercitol) など各種環状キラルポリオールの実用レベルでの合成研究を行っているが、この系にも LSADH を使用している。シクリトールは *myo*-イノシトールを代表とする cyclohexanepolyol の総称であり、D-グルコースを原料として発酵生産される 2-deoxy-scyllo-イノソース (DOI) の不斉還元反応により (-)-*vibo*-クエルシトールと *scyllo*-クエルシトールを合成することができる (図2)²⁶⁾。筆者らは、当該反応に適した酵素として (-)-*vibo*-クエルシトール 1-脱水素酵素 (QUDH)²⁷⁾ および既知の *Bacillus* 由来 *scyllo*-イノシトール脱水素酵素 (IolX) を見いだしており、

LSADHとの共役系を用いて、反応の最適化は行っていないが、500 mMのDOIから400 mM程度の生成物を確認している²⁶⁾。また、立体選択性が向上した改変QUDHも得ている(未発表)。myo-イノシトールの立体異性体であるscyllo-イノシトールはアルツハイマー病の治療薬として一時注目された²⁸⁾。フェーズIIから医薬としての開発は止まっているようであるが、scyllo-イノシトール(他の立体異性体は無効)が可溶性アミロイドβ(Aβ)オリゴマーに結合し、Aβのニューロン原形質膜への結合を抑制するというものである²⁹⁾。このように、今後シクリトール類は高機能化学品や機能性食品、医薬品素材としてさまざまな分野に応用される可能性がある。また、DOIは発酵生産可能で、カテコールなどの芳香族化合物前駆体としても注目されている³⁰⁾。

2. 不斉酸化反応による光学活性エポキシド、インディルビン誘導体の生産

光学活性エポキシ化合物は、各種求核試薬との反応により容易に立体および位置選択的に誘導体化され、光学活性アルコールなどへと変換される。この反応性の高さから、各種医農薬中間体や機能性高分子材料として利用されており、有機合成分野における重要(キラル)中間体である。その化学的合成法としては、Sharpless酸化³¹⁾、史不斉エポキシ化³²⁾、鉄-ポルフィリン錯体やマンガン-サレン錯体を用いたオレフィン類の不斉酸化³³⁾、サレン-コバルト錯体などを用いたラセミ体エポキシドの光学分割などがあげられる³⁴⁾。しかし、これらの手法はその合成過程において重金属や過酸を用いることなど、環境負荷の面で課題が残る。

筆者らはこれまでに、スチレン資化性細菌*Rhodococcus* (旧*Corynebacterium*) sp. ST-10よりRhSMOを見だし³⁵⁾、その遺伝子単離と機能解析を行ってきた^{36,37)}。スチレンモノオキシゲナーゼ(SMO)は芳香族アルケンを(*S*)-体選択的にエポキシ化する酵素であり、StyA (FAD依存性モノオキシゲナーゼ)およびStyB (FAD:NADH酸化還元酵素)の各ユニットから構成されている(図3)。StyAは遊離のFADH₂を補酵素として利用し、FADH₂が容易に分子状酸素と反応してH₂O₂として消失することから、高いStyB活性と強力なNADH再生系が必要となる。同反応系に1-benzyl-1,4-dihydronicotinamide (BNAH)がNADH/StyBの代替として利用できることも報告している³⁸⁾。これまで、主に*Pseudomonas*属細菌を中心いくつかのSMOについて研究・報告がされてきたが³⁹⁾、StyABが融合したものやメタゲノム由来のものも発見されている^{40,41)}。SMOの立体選択性は非常に高く、スチレンを高光学純度(99%以上)の(*S*)-スチレンオキシドへと変換する。RhSMOは他のSMOと同様に広い基質特異性を示し、スチレンおよびその誘導体やインデン、ビニルピリジンなど30種類以上の芳香族アルケン化合物に対してエポキシ化活性を示す⁴²⁾。また、既知のSMOにおける直鎖アルケン化合物のエポキシ化活性については、これまでに報告がなく、RhSMOが1-ヘキセンや1-ヘプテンなどの末端アルケンをはじめ、トランス-2-ヘプテンなど20種類以上の直鎖アルケン化合物からも(*S*)-体のエポキシドを高光学純度で合成できる世界で最初のレポートとなった⁴³⁾。ただしアリアルケンと比較すると、生産性はやや低下し、長い反応時間を必要とする。*(R)*-体立体選択的なSMOは、筆

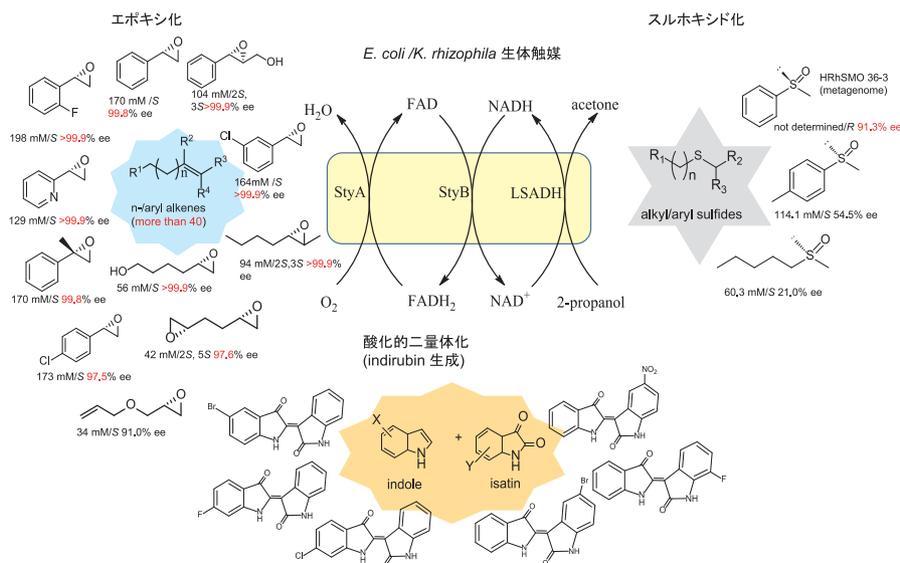


図3. StyAとStyB (RhSMO)系が触媒する不斉エポキシ化反応、スルホキシド化および酸化的二量体化反応

者らも探索を続けているが、これまでのところ報告されていない。反応場としては生成するエポキシドが水に不安定であることから、*E. coli* (RhSMO, LSADH) を生体触媒とする有機溶媒-水二相系反応を採用した^{42,43}。本法の利点として、補助基質としてIPAを添加することにより疎水性基質の水相への溶解性が増すことがあげられる。これにより400 mMのスチレンを基質としたとき、光学純度99.8%、約260 mMの(S)-スチレンオキシドの生産が可能となり、同様の反応系を使用して多数のキラルエポキシドが生産できる(図3)^{42,44}。今後、ターゲット化合物が決まれば、進化分子工学的手法でその生産性を向上させることは容易であろう。またエピクロロヒドリンを使用しないハロゲンフリーのエポキシ樹脂が電子材料として望まれており、こうした展開も考えられる⁴⁵。さらに、多くのキラルエポキシドは、酵素反応によりジオールへの加水分解(epoxide hydrolase)⁴⁶、限定的ではあるがアルデヒドへの異性化(styrene oxide isomerase)⁴⁷、求核試薬との反応による誘導体化(halohydrin epoxidase/dehalogenase)⁴⁸などが可能である。

RhSMOは、エポキシ化反応のみならずスルフィド類のスルホキシドへの不斉酸化やインドールとイサチンの酸化的二量体化反応によるインディルビンや同誘導体の合成反応にも応用できることを見いだしている(図4)。インディルビン(indirubin)はインディゴ(indigo)色素の構造異性体であり、青黛や板藍根などの漢方薬に含まれる天然色素成分である。最近、抗腫瘍性のみならず、青黛(indirubin: 0.16–0.37%, indigo: 1.4–2.7%含有)⁴⁹の経口投与による潰瘍性大腸炎の劇的な治療効果が注目されている⁵⁰。作用機序は、インドール化合物のアリール炭化水素受容体(AhR)結合を介するインターロイキン(IL)-22などの誘導によるものと報告されており、AhRに対する結合能から主にインディルビンが有効成分と推定される。またインディルビンは塗り薬として乾癬の局所的治療にも有効である⁵¹。

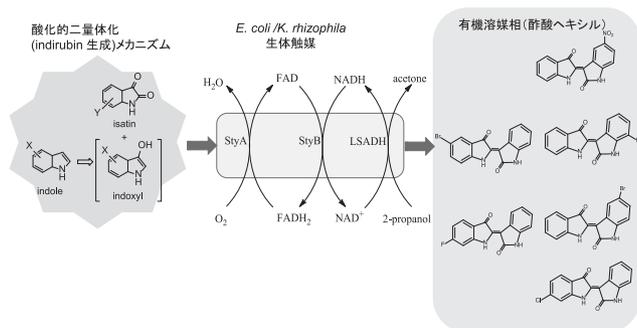


図4. StyAとStyB (RhSMO)系が触媒するインディルビン誘導体生産

3. 有機溶媒耐性菌の新規宿主ベクター系の開発とその評価

*E. coli*は形質転換能の高さ、ベクター系や遺伝子欠失株の豊富さも含め、遺伝子組換え宿主として断然トップの地位にある。しかし、応用微生物学の観点からは、多様な微生物宿主とその利用を推進すべきである。地球環境産業技術研究機構(RITE)における*Corynebacterium*を用いた物質生産系は、この好例に当たる。こうした考えの基、筆者の研究室では*E. coli*以外に、有機溶媒に比較的耐性が高い微生物として、グラム陰性の*Pseudomonas*細菌、グラム陽性の*Rhodococcus*細菌および*Kocuria rhizophila* DC2201 (NBRC103217)を使用している。後者はNEDOプロジェクトにおいて企業研究者が保存菌株から1-pentanolなどに対する溶媒耐性菌として発見したものであり⁵²耐塩性も有する。ベクター系⁵³も開発されているが、ほとんど利用されてこなかった。筆者らは独自に、*Pseudomonas*や*Kocuria*で自己複製できるプラスミドから*E. coli*とのシャトルベクターを各々作製し研究に使用している⁵⁴⁻⁵⁶。*Kocuria*ベクターは特許を申請しているが、material transfer agreement (MTA)締結後、無償で内外の研究機関に提供している。これらの宿主-ベクター系を使用して、先に述べた(S)-エポキシドの生産を評価したものが表2である。酵素活性は*E. coli*系がもっとも高かった。従前のIPAを使用する系では、*E. coli*系と*K. rhizophila*系の(S)-スチレンオキシドの生産性はほぼ同等であった。他方、フタル酸ビス(2-エチルヘキシル)(DEHP)/緩衝液(1:2)系に基質である1-hepteneを溶解し、D-グルコースをエネルギー源・水素源として休止菌体反応を行った場合、宿主自身の代謝系に依存するNADH/FADH₂の供給によるエポキシ化反応が進行したのは*K. rhizophila*が唯一であった⁵⁷。微生物への毒性の高い低沸点アルケンと生成物のエポキシド存在下でも*K. rhizophila*は代謝系が機能しており、長時間の反応が可能であった。直鎖アルケン類のエポキシ化では、当該ホストの利用は有用であり、*E. coli*以外の宿主の選択と使用の有効性を示す一例だと考えている。*K. rhizophila* DC2201は、 $\leq 12\%$ (v/v) DMF, $\leq 5\%$ 2-MeTHF, $\leq 12\%$ DMSOといった極性有機溶媒を含む一般的な培地で増殖することが可能である。同菌の有機溶媒耐性のメカニズムの解明、代謝系の改変などホストの代謝工学的アプローチが今後の課題であるが、脂溶性化合物を中心としたバイオプロセス用の宿主として期待できるのではないだろうか。

表2. RhSMO (StyA, StyB) およびLSADH遺伝子の発現系とエポキシド生産^{42,43,56,57)}

宿主	プラスミド-遺伝子	酵素活性 (mU · mg ⁻¹) StyA/StyB/LSADH	水素源	生成物 (mM)
<i>E. coli</i> BL21	pETDuet-RhSMO/pG-KJE8	18.2/1170/-	D-glucose (内在性補酵素)	(S)-1-heptene oxide (trace)
<i>P. fluorescens</i> JCM5963	pNUK ^{a)} -RhSMO	4.2/30/-	D-glucose (同上)	0
<i>Rhodococcus</i> . sp. ST-10	pK ^{b)} -RhSMO	8.6/240/-	D-glucose (同上)	0
<i>R. rhodochrous</i> ATCC12674	pK-RhSMO	3.2/160/-	D-glucose (同上)	0
<i>K. rhizophila</i>	pCK ^{c)} -RhSMO	7.4/989/-	D-glucose (同上)	(S)-styrene oxide (199)/ (S)-1-heptene oxide (88)/ (S)-6-chloro-1-hexene oxide (245) 他
<i>K. rhizophila</i>	pKITE301P ^{d)} - RhSMO/pKITE 103P-LSADH	-/-/-	2-propanol (15 %)	(S)-styrene oxide (235)
<i>E. coli</i> BL21	pET-RhSMO/ pRSFDuet-LSADH/ pG-KJE8	22.9/1170/78	2-propanol (6 %)	(S)-1-heptene oxide (24)
<i>E. coli</i> BL21	pETDuet- RhSMO-LSADH/ pG-KJE8	15.3/526/273	2-propanol (5 %)	(S)-styrene oxide (172)/ (S)-1-hexene oxide (45)/ (S)-1-heptene oxide (24)

a) pNUK73⁵⁴⁾, b) pK4 (三菱レイヨン (株) より貸与), c) pCK-PSD ((株) ダイセルより貸与)⁵³⁾, d) pKITE301P, pKITE103P^{55,56)}

4. 酸化酵素の二量体化反応による エピテアフラガリン類の生産と機能解析

機能性食品やその素材の研究開発では、糖類、有機酸、アミノ酸・ペプチド、脂質類、ビタミン類など、その研究対象はきわめて広い。最近には特に、食品・植物に含まれる有用二次代謝産物の特定と抽出・分離、その機能性や安全性の薬理的な解明・評価といった分野に研究がシフトしているように思う。こうした二次代謝産物を積極的にバイオプロセスで修飾・合成する反応は、アグリコン (aglycone) の水溶性向上のためのケルセチン配糖体の合成⁵⁸⁾に見られるように、本来生体触媒がもっとも得意とする反応であり、今後積極的に取り組まなければならないフィールドである。ただし、食品や化粧品は化学品の製造とは相当異なり、消費者の自然志向も強く、また法規制も異なることから十分な注意が必要である。

筆者らは、ラッカーゼが没食子酸 (gallic acid) 存在下、緑茶エキスの主要成分であるエピガロカテキン (EGC) やエピガロカテキンガレート (EGCg) を選択的に酸化し、没食子酸との酸化的二量体化反応を経て、紅茶の極微量成分であるエピテアフラガリン (ETFG) やエピテア

フラガリン 3-O-ガレート (ETFGg) を合成できることを発見した (図5)⁵⁹⁾。ある意味では、紅茶の発酵生産の mimic 反応であるが、没食子酸を添加する点が鍵となる。一般の紅茶エキス中の ETFG と ETFGg の濃度は製品によりバラつきが大きいものの、それぞれ 0-0.05 %、0-0.09 % 程度と低く、紅茶の主要色素成分であるテアフラビン (theaflavin) 類から分離することはほぼ不可能である。ETFG と ETFGg はその構造中にベンゾトロ

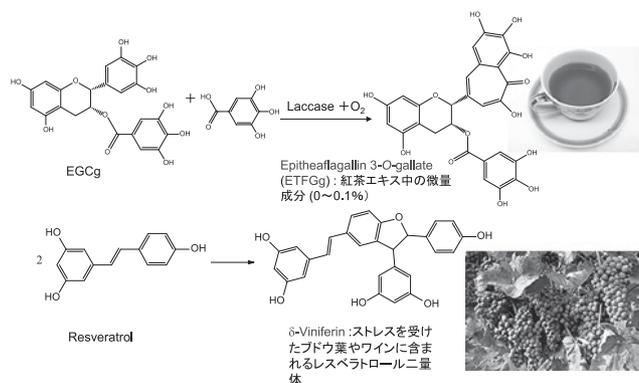


図5. *H. coralloides* 由来 Lcc2 が触媒する効率的な ETFGg と δ -viniferin 生産

ポロン環骨格を有し、テアフラビン類と同様に濃いオレンジ色を呈する。また製造物の味は、ほぼ紅茶であった。ちなみに、日本で市販されている一部のラッカーゼ、没食子酸、緑茶エキスは食品添加物として認可されている。厚生労働省の担当官との協議では、「食品添加物を混合して酵素反応し化合物が変化しても法規制上は問題とはならない。ただし、安全性は製造者で十分担保することが必要」との見解であった。ラッカーゼ・没食子酸処理緑茶エキスのマウスを用いた安全性テストでは、急性および経口反復投与毒性試験において問題はなかった。そこで、共同研究者の協力も得て、当該エキス、ETFGおよびETFGgの機能性を *in vitro*, *in vivo* およびドッキングシミュレーション (docking simulation) で評価した。その結果、ラッカーゼ処理エキスやETFGgが臍臓リパーゼを阻害し、マウスを用いた *in vivo* 系で食後の中性脂肪の吸収を有意に抑制すること、口腔関連では、う蝕の原因である *Streptococcus sorbinus* のグリコシルトランスフェラーゼ (Gtf) および歯周病の原因となるヒト歯肉線維芽細胞からのマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) -1と-3の産生と活性を阻害するなど、肥満や歯周病などを抑制する優れた機能を有する食品素材であることを発見した⁶⁰⁾。ETFGgは、緑茶エキスの健康機能の中心的役割を担っているEGCgと同じように、抗腫瘍性も示し(未発表)、さまざまな酵素や受容体タンパク質と相互作用をすると推定される。実はEGCgや緑茶エキスの機能効用に関する論文は数え切れないほどあり⁶¹⁾、たとえば、その抗腫瘍作用機序についても10種類を超える受容体タンパク質や酵素阻害がその候補にあげられている⁶²⁾。これまでに知られているEGCgが作用するヒト受容体タンパク質中でもっとも結合能の高いものは、おそらくラミニン (laminin) 結合タンパク質であり、その K_d は40 nMと報告されている⁶³⁾。筆者らは、ETFGgの生理機能をその構造類似性からEGCgと比較しながら、研究を実施している。両者はフェノール性の多数の水酸基を持ち、フラボノイド骨格の3位がガラートエステルでフレキシブルなコンフォメーションが可能な分子である。いわゆる可溶性のタンニン的一种であり、元々タンパク質 (特にプロリン-リッチなもの) との相互作用が強いと推察される⁶⁴⁾。特に、*in vitro* のデータとドッキングシミュレーションの結果が良く相関しており、*in silico* で受容体タンパク質や酵素分子との結合を推測することが可能である。こうした一連のデータは、予防医療の観点から重要な各種受容体タンパク質にETFGgがEGCgよりもより強く可逆的に結合することを示しており、ETFGgはEGCgよりも優れた健康機能を有する食品素材であると考えられる。実は、筆者もす

で還暦を過ぎたシニア世代であり、サプリを利用している。それらは、Ca, ビタミンC, EPA・DHAなどの ω -3脂肪酸、乳酸菌そして緑茶カテキンタブレットであるが、できれば緑茶カテキンを早い時期にETFGgに替えたいと考えている(我田引水ではあるが)。筆者らは、当該反応に適したラッカーゼの探索を、担子菌類を対象に、オーソドックスな銅を含む小麦ふすま培地での固体培養、分泌酵素の活性測定、ETFGgへの変換活性の測定により実施し、食用キノコのサンゴハリタケ (*Hericium coralloides*) 由来Lcc2を見いだした⁶⁵⁾。最近、糸状菌 *Aspergillus oryzae* での効率的な酵素分泌生産 (>8000 U/L液体培地) に成功した。同酵素を用い、反応系を最適化することにより、現在、EGCgと没食子酸より45% (w/w) 以上のETFGgを含むエキスの生産が可能となっている。Lcc2は、レスベラトロール (resveratrol) の酸化二量体化による δ -ビニフェリン (viniferin) の生産にも適している(図5)。

5. メタゲノムからの効率的な酵素遺伝子の単離とその解析：進化分子工学との互換性

本誌のバイオメディアに「メタゲノムは宝の山か?」⁶⁶⁾、「もう無視できない天然物資源」⁶⁷⁾、「環境中に眠る有用遺伝子を探せ」⁶⁸⁾と題してメタゲノムからの有用酵素/生合成系遺伝子の単離法やその応用についてのトピックスが紹介されている。文献68は、研究室の戸田講師の執筆によるもので、やや手前みそかも知れないが、「宝の山か?」と聞かれれば、その答えは「イエス」である。しかし、その手法を誤ると労多くして功少なしの典型例となるというのが筆者の感想である。釣りに例えれば、魚のたくさんいる場所で、対象となる魚に適したテクニックを使えば良く釣れるが、そうでないと、悲しいかな坊主の憂き目に会う。メタゲノム情報も相当増えてきており、リスクをあまり取らないのであれば、ゲノムマイニング (genome mining) が一番適切な方法であろう⁴⁵⁾。多くの酵素研究者がこの方法を採用しているのは理にかなっている。しかし、この場合、遺伝子は合成する必要があるため、仮に50個程度必要となれば200万円以上の資金が必要となる。また上手く *E. coli* で発現できる遺伝子は、概ね、この中で2-3割程度と推測される。一般的にメタゲノムより有用遺伝子を分離する手法としては、メタゲノム由来のDNAをBACなどのベクターを使用して長鎖のDNAとしてクローニングし、その配列を網羅的にシーケンスする、配列を基にプローブなどで釣り上げる、その機能 (主に酵素活性) でスクリーニングする、に大別される^{69,70)}。勿論、ターゲット遺伝子により変化するが、後者の活性を利用する場合のヒット率

は相当低く、概ね0.006–0.2%程度である⁷¹⁾。0.01%以下では、なかなか魚は釣れない状況であろう。筆者らは、最初に土壌メタゲノムから、縮重の少ない比較的特異的なプライマーによって*Pseudomonas/Burkholderia* ADHの全長が容易にPCRで増幅し分離できることを見いだした⁷²⁾。また、得られた酵素の基質特異性は大きく変化した。この成功を基に、Screening of Gene-specific Amplicons from Metagenomes (S-GAM) 法と命名したPCRを基本技術とするメタゲノムからの効率的な酵素遺伝子のライブラリー構築技術を開発し(図6)、実用レベルに供し得る各種有用酵素触媒の分離に成功した⁷³⁾。本法は、以前から報告されている遺伝子のカセットクローニング法⁷⁴⁾を原理としているが、酵素活性が容易に検出できるようにさまざまな工夫を凝らしている。

本法の概略は、以下の手順を踏む⁶⁹⁾：①特殊環境も含む各種メタゲノムを調製し、これを直接鋳型DNAとし

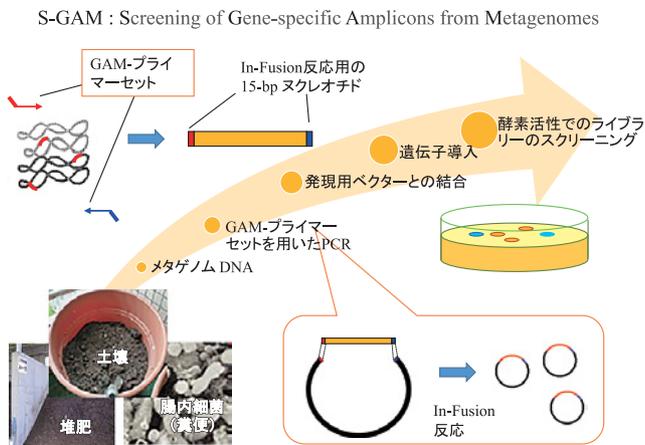


図6. S-GAM法の概要

てPCRを行う。②PCRプライマー (GAM-プライマー) 設計は、アライメントを参考にその保存領域を使用するが、In-Fusion法で基になる遺伝子とN-/C-末端領域で融合させる目的で、あらかじめ15塩基の相同領域を付加した25–30 bpの縮重プライマーを使用する。また、なるべくN-/C-末端領域の保存領域を利用する。③In-Fusion法で融合するベクター遺伝子は、ターゲット類縁酵素でその発現が最適化されているものを直鎖状にして使用する。④得られた*E. coli*などのライブラリーを簡便な酵素活性でスクリーニングする。⑤得られた酵素遺伝子はすべてN-/C-末端領域でキメラ酵素となり、必要に応じてその配列を解析する。特に本法で特徴的なものは②と③であり、サブクローニング・発現などの手間のかかる工程をスキップできるので、上手く行けば安価にターゲット酵素のライブラリーが得られる。本法の欠点は、原理的に遺伝子が重複すること、酵素遺伝子の全長が取得できないこと、相同領域がN-/C-末端領域にないと増幅できるコア遺伝子が短くなり酵素遺伝子の発現に支障が出る、などがあげられる。

さて前述のLSADHでは、同法がもっとも威力を発揮した最初の例となった。この場合、メタゲノムの由来を一般土壌から高温で発酵しているバーク(樹皮)堆肥に変更することにより、LSADHのホモログを含む、さまざまな*adh*遺伝子(既知酵素に対するアミノ酸配列相同性が73–75%, 55–64%, 48–53%, *Hladh*と命名)を効率的に多数取得することができた(表3)。釣りで言えば入れ食い状態だろうか。分析した約2000クローン中、その60%がADHポジティブであった。ただし、一般土壌からは*Leifsonia*属細菌のSDR(相同性98–99%)

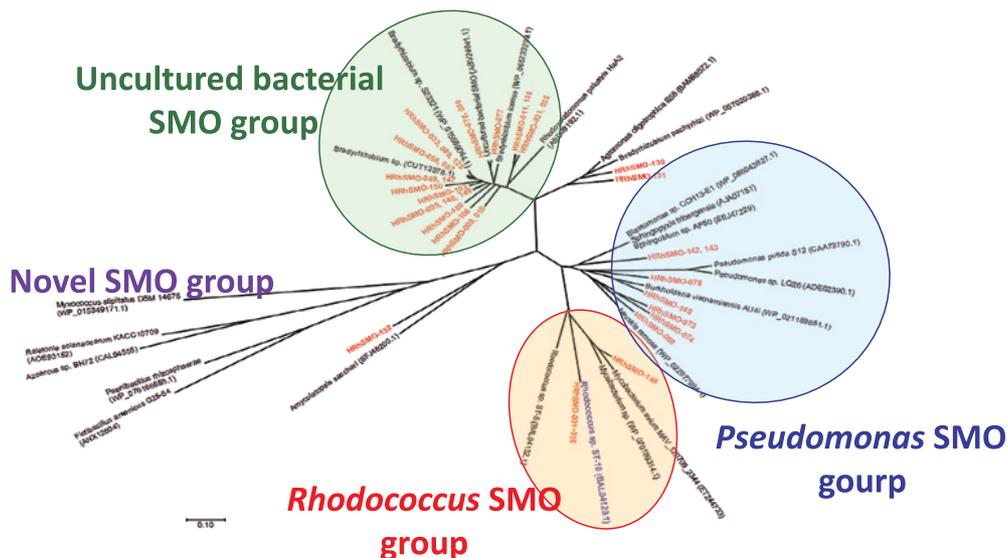


図7. メタゲノム由来HRhsmo (StyA) 遺伝子の系統樹

表3. S-GAM法/改良S-GAM法にて取得した酵素遺伝子

メタゲノム由来	酵素遺伝子	取得酵素遺伝子数 (配列が相違)	既知酵素との相同性 (アミノ酸配列 %)
土壌	<i>padh</i> (<i>Pseudomonas</i> 短鎖アルコール 脱水素酵素)	9	96–98
土壌	<i>badh</i> (<i>Burkholderia</i> 短鎖アルコール 脱水素酵素)	12	97–99
高温堆肥/土壌	<i>lsadh</i> (短鎖アルコール 脱水素酵素)	>100	48–99
土壌/高温堆肥	<i>par</i> (Zn依存- 中鎖アルコール 脱水素酵素)	35	97–99
土壌	<i>smo</i> (スチレンモノ オキシゲナーゼ: <i>styA</i>)	>100	50–99
馴養土壌	<i>hhe</i> (ハロヒドリン エポキシダーゼ)	4 (実施中)	40–98
土壌/ヒト糞便	<i>mco</i> (マルチ銅 オキシダーゼ: ラッカーゼ・ ビリルビン オキシダーゼ他)	18 (実施中)	55–79
ヒト糞便/土壌	<i>gus</i> (β -グルクロニダーゼ)	増幅確認済み (実施中)	84–99

が大半を占めた。その中の40種のHLADHについて、酵素化学的な性質の解析を行った結果、極性有機溶媒中で高い活性を有する酵素、LSADHが反応できない基質を還元できる酵素など多様な機能を示す優れた酵素が取得でき、当該酵素ライブラリーが光学活性アルコール生産用酵素触媒のスクリーニングにきわめて有用であることが明らかとなった。特にHLADH-021酵素 (LSADHとの相同性は55%) は各種ケトンの不斉還元反応に最適であり、LSADHを比活性、基質特異性などで凌駕した⁷³⁾。また、HLADH-028のように酵素反応が困難であるバルキーな置換基を持つケトン類の不斉還元を利用できる還元酵素の発見にも成功している (図1)⁷⁰⁾。

同様に、前述のRhSMO³⁷⁾についてS-GAM法を一部改良して適用したところ、土壌メタゲノムより多くの新規 *smo* 遺伝子 (既知酵素との相同性が50–99%, *HRhsmo* と命名) を取得することができた。図7に一部の系統樹を示すが、メタゲノム由来の既知SMOに近縁のもの、既知の *Pseudomonas* や *Rhodococcus* 細菌酵素に近縁のもの、その他新規なものが得られている。これらのライブラリーの性質を調べると、RhSMOでは十分な立体選択性が得られない基質に対して十分な選択性を示す酵素などが取得できた (未発表)。他方、PARでは97–99%の相同性を有する酵素遺伝子しか増幅できなかったが、こうしたライブラリーが、酵素の機能改変に有用なアミノ酸配列情報を提供できることを発見した⁷⁵⁾。図8aはこれらの酵素の熱安定性を調べたものであり、数アミノ

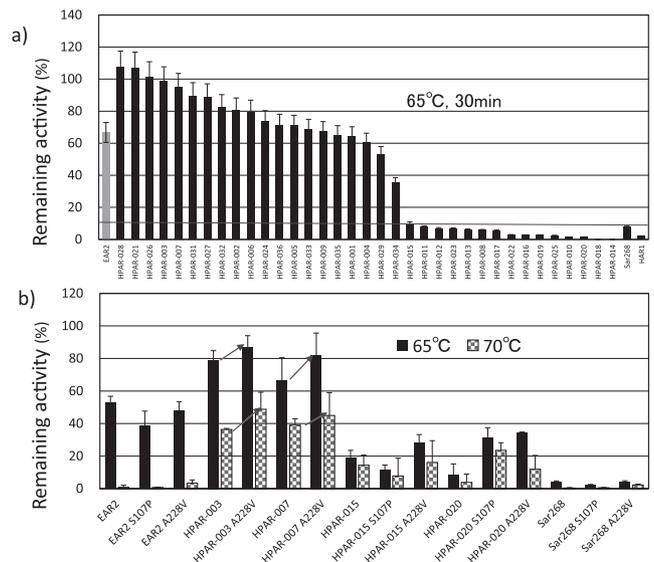


図8. S-GAM法で取得したHPAR酵素の耐熱性 (a) と同配列情報を基に部位特異的変異で改変した酵素の耐熱性変化 (b) (文献75より一部転載)。EAR2が天然型酵素。

酸の置換で熱安定性に著しい差異が確認できた。さらに、この情報を用いて酵素の耐熱性向上が容易に達成された (図8b)。こうしたライブラリーからのアミノ酸配列情報は、勿論、基質特異性などその他の酵素化学的性質の改変にも利用できる。2018年度のノーベル化学賞は、進化分子工学 (指向性進化: directed evolution)⁷⁶⁾ による酵素の改良を可能とした米国 Caltech の Arnold 教授らが受賞された⁷⁷⁾。その有用性は言うまでもないが、実際

に酵素進化分子工学を行ってみると、多くの酵素で1から数アミノ酸置換で酵素の機能が大きく変化することに気付く。アミノ酸配列で3%以下の置換を有する活性なホモログ酵素はまさにこの範囲にあり、天然に存在するホモログのアミノ酸配列やその置換情報を与えてくれる。S-GAM法で良いライブラリーが得られれば、進化分子工学と同等の情報が得られる。換言すれば、進化分子工学を行った際の酵素の一次構造と機能に対して互換性を有する情報が入手できる。筆者は、メタゲノムからスクリーニングされた酵素遺伝子をさらに進化分子工学などの手法で改良するのが、さまざまな場面で酵素を応用するには、もっとも適した方法の一つではないかと考えている。現在、同法の改良と汎用性の検証に取り組んでいるが、その経過をまとめたものが表3である。Halohydrin epoxidase⁴⁸⁾のように馴養培養した土壌からのみターゲット遺伝子の増幅・単離が可能であるレアな酵素遺伝子を除き、概ね多様な酵素遺伝子が取得できている。このようにメタゲノムからの酵素遺伝子の単離は、上手く利用すれば優れた生体触媒開発の重要な武器となる。また特許戦略としてもきわめて有効である。

おわりに

以上、キラルアルコールやキラルエポキシ化合物を中心に精密化学品のバイオプロセス法による生産、シクリトール、インディルペン、ETFGgのような植物・食品に含まれる微量成分の主に天然素材からの酵素合成技術など、バイオプロセスに関するいくつかの基盤研究を紹介してきた。これらの技術や成果はグリーンケミストリーやバイオエコノミーのコンセプトに合致するものであり、今後の産学連携の進展による実用化が期待できる。今世紀中に、石油資源から再生可能資源への転換が化学産業では徐々にではあるが進んでいくものと推察される。有機合成の単位反応では有機合成的手法とバイオ触媒のハイブリッド法や両者の組合せが重要になるものと感じている。筆者は、バイオプロセス生産は、やはりバイオベースマテリアル (bio-based materials) の修飾・変換や植物や食品に含まれる微量成分の合成に一層注力すべきだと考えている。抗マラリア化合物のアルテミシニン (artemisinin) の前駆体アルテミシニン酸のバイオ生産法の開発が合成生物学の成功例として、しばしば取り上げられているが⁷⁸⁾、植物や動物由来の酵素遺伝子は、必ずしも微生物での活性発現が十分ではない。こうした酵素遺伝子を微生物起源またはメタゲノム起源に代替していく、または植物等由来酵素遺伝子を改変して微生物で発現可能とすれば、生産性の向上に大きく貢献できるであろう。前節で紹介したS-GAM法もこうした点で合

成生物学への応用が期待できる技術である。また日本で見いだされた*K. rhizophila*などの宿主系も粘り強く育てていく姿勢が、アカデミアのみならず産官にも求められているのではないだろうか。バイオ戦略2019⁷⁹⁾を絵にかいた餅に終わらせないためにも、日本発のオリジナルな研究を展開し、実用化につなげて行く努力が必要である。

謝 辞

ここに紹介した研究は、恩師、現・旧の研究室スタッフ、ポスドク研究者、卒業生・在学生および内外の企業を含む多くの共同研究者の皆様のご指導やご協力の賜物であり、心より感謝申し上げます。学生時代の恩師である故・福井三郎先生 (京都大学)、田中渥夫先生 (京都大学) には研究の進め方を、また学位の指導を頂いた山田秀明先生 (京都大学) には富山県立大学の初代生物工学研究センター所長として研究室の運営などについて、多くご教授いただきました。また、天野エンザイム (株) および福井大学在籍にも多くの皆様から学ぶことができたことが、今日の私の糧となっています。さらに、富山県立大学の研究室スタッフとして研究を推進していただいた大川徹准教授 (現北海道大学教授)、牧野祥嗣講師、戸田弘講師、黒川純司博士をはじめとする多くのポスドク研究者や学生諸氏の研究への熱い情熱に、心より御礼申し上げます。また本研究成果は、文部科学省、経済産業省、富山県や各種材団および共同研究企業や機関などによる多くの研究支援によるものであり、住友化学 (株)、旭化成 (株)、(株) ダイセル、三菱レイヨン (株) (現三菱ケミカル (株))、(株) カネカ、(株) 日本触媒、(株) クラレ、太陽化学 (株)、クラシエ製薬 (株)、金剛化学 (株)、富山県薬事総合研究開発センター、富山県立大学の関係の皆様にご感謝申し上げます。

文 献

- 1) Noyori, R. and Ohkuma, T.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 40–73 (2001).
- 2) 八十原良彦, 長谷川淳三: キラル医薬品・医薬中間体の開発, pp. 121–130, シーエムシー出版 (2005).
- 3) 片岡道彦, 清水 昌: 酵素利用技術大系, pp. 418–422, エヌ・ティー・エス出版 (2010).
- 4) 伊藤伸哉: 利用技術大系, pp. 423–429, エヌ・ティー・エス出版 (2010).
- 5) Huisman, G. W., Liang, J., and Krebber, A.: *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **14**, 1–8 (2009).
- 6) Itoh, N., Morihama, R., Wang, J.-C., Okada, K., and Mizuguchi, N.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3783–3788 (1997).
- 7) Itoh, N., Mizuguchi, N., and Mabuchi, M.: *J. Mol. Catal. B*, **6**, 41–50 (1999).
- 8) Itoh, N., Matuda, M., Mabuchi, M., Dairi, T., and Wang, J.: *Eur. J. Biochem.*, **269**, 2394–2402 (2002).
- 9) Inoue, K., Makino, Y., and Itoh, N.: *Tetrahedron Asymmetry*, **16**, 2539–2549 (2005).
- 10) Inoue, K., Makino, Y., and Itoh, N.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 3633–3641 (2005).
- 11) Inoue, K., Makino, Y., Dairi, T., and Itoh, N.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 418–426 (2006).

- 12) Itoh, N., Asako, H., Banno, K., Makino, Y., Wakita, R., and Shimizu, M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **66**, 53–62 (2004).
- 13) Asako, H., Wakita, R., Matsumura, K., Shimizu, M., Sakai, J., and Itoh, N.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 1101–1104 (2005).
- 14) Asako, H., Shimizu, M., and Itoh, N.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **80**, 803–812 (2008).
- 15) Asako, H., Shimizu, M., and Itoh, N.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **84**, 397–405 (2009).
- 16) Isotani, K., Kurokawa, J., and Itoh, N.: *Int. J. Mol. Sci.*, **13**, 13542–13553 (2012).
- 17) Isotani, K., Kurokawa, J., Suzuki, F., Nomoto, S., Negishi, T., Matsuda, M., and Itoh, N.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 1378–1384 (2013).
- 18) Itoh, N., Nakamura, M., Inoue, K., and Makino, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 1249–1256 (2007).
- 19) Itoh, N., Isotani, K., Nakamura, M., Inoue, K., Isogai, Y., and Makino, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **93**, 1075–1085 (2012).
- 20) Hummel, W. and Kula, M. -R.: *Eur. J. Biochem.*, **184**, 1–13 (1989).
- 21) Laane, C., Boeren, S., Vos, K., and Veeger, C.: *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 81–87 (1987).
- 22) 山口敏男, 片岡幹雄: 現代化学, **411**, 55–59 (2005).
- 23) Makino, Y., Inoue, K., Dairi, T., and Itoh, N.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 4713–4720 (2005).
- 24) Makino, Y., Dairi, T., and Itoh, N.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **77**, 833–843 (2007).
- 25) Itoh, N. and Makino, Y.: *Synthetic methods for biologically active molecules* (Brenna, E. ed.), pp. 139–185, Wiley-VCH, Germany (2013).
- 26) Itoh, N.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **102**, 4641–4651 (2018).
- 27) Itoh, N., Kurokawa, J., Toda, H., and Konishi, K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **101**, 7545–7555 (2017).
- 28) Folch, J., Ettcheto, M., Petrov, D., Abad, S., Pedrós, I., Marin, M., Olloquequi, J., and Camins, A.: *Neurologia*, **33**, 47–58 (2018).
- 29) Sun, Y., Zhang, G., Hawkes, C. A., Shaw, J. E., McLaurin, J., and Nitz, M.: *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 7177–7184 (2008).
- 30) Kakinuma, K., Nango, E., Kudo, F., Matsushima, Y., and Eguchi, T.: *Tetrahedron Lett.*, **41**, 1935–1938 (2000).
- 31) Katsuki, T. and Sharpless, K. B.: *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5974–5976 (1980).
- 32) Tian, H., She, X., Yu, H., Shu, L., and Shi, Y.: *J. Org. Chem.*, **67**, 2435–2446 (2002).
- 33) Collman, J. P., Wang, Z., Straumanis, A., Quelquejeu, M., and Rose, E.: *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 460–461 (1999).
- 34) Tokunaga, M., Larrow, J. F., Kakiuchi, F., and Jacobsen, E. N.: *Science*, **277**, 936–938 (1997).
- 35) Itoh, N., Yoshida, K., and Okada, K.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 1826–1830 (1996).
- 36) Toda, H. and Itoh, N.: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 12–19 (2012).
- 37) Toda, H., Imae, R., Komio, T., and Itoh, N.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **96**, 407–418 (2012).
- 38) Paul, C. E., Tischer, D., Riedel, A., Thomas, H., Itoh, N., and Hollmann, H.: *ACS Catal.*, **5**, 2961–2965 (2015).
- 39) Panke, S., Witholt, B., Schmid, A., and Wubbolts, M. G.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 2032–2043 (1998).
- 40) Tischler, D., Kermer, R., Gröning, J. A. D., Kaschabek, S. R., van Berkel, W. J. H., and Schlömann, M.: *J. Bacteriol.*, **192**, 5220–5227 (2010).
- 41) van Hellemond, E. W., Janssen, D. B., and Fraaije, M. W.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 5832–5839 (2007).
- 42) Toda, H., Imae, R., and Itoh, N.: *Tetrahedron Asymmetry*, **23**, 1542–1549 (2013).
- 43) Toda, H., Imae, R., and Itoh, N.: *Adv. Synth. Catal.*, **356**, 3443–3450 (2014).
- 44) 戸田 弘, 伊藤伸哉: バイオサイエンスとインダストリー, **121**, 121–125 (2015).
- 45) 松田 豊: 有機合成化学協会誌, **76**, 66–67 (2018).
- 46) van Loo, B., Kingma, J., Arand, M., Wubbolts, M. G., and Janssen, D. B.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 2905–2917 (2006).
- 47) Itoh, N., Hayashi, K., Ito, T., Mizuguchi, N., and Okada, K.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 2058–2062 (1997).
- 48) Schallmey1, A. and Schallmey, M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 7827–7839 (2016).
- 49) Plitzko, I., Mohn, T., Sedlacek, N., and Hamburger, M.: *Planta Med.*, **75**, 860–860 (2009).
- 50) Naganuma, M., Sugimoto, S., Hisamatsu, T. et al.: *Gastroenterology*, **154**, 935–947 (2018).
- 51) Lin, Y. -K., See, L. -C., Huang, Y. -H., Chi, C. -C., and Hui, R. C. -Y.: *Br. J. Dermatol.*, **178**, 124–131 (2018).
- 52) Fujita, K., Hagishita, H., Kurita, S., Kawakura, Y., Kobayashi, Y., Matsuyama, A., and Iwahashi, H.: *Enzym. Microb. Technol.*, **39**, 511–518 (2006).
- 53) 松村栄太郎, 濱 桃子, 松山彰収: 特開2010-161946.
- 54) Itoh, N., Kawanami, T., Nitta, C., Iwata, N., Usami, S., Abe, Y., and Koide, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **61**, 240–246 (2003).
- 55) Toda, H., Koyanagi, T., Enomoto, T., and Itoh, N.: *J. Biosci. Bioeng.*, **124**, 255–264 (2017).
- 56) Toda, H. and Itoh, N.: *Front. Microbiol.*, article2313 (2017).
- 57) Toda, H., Ohuchi, T., Imae, R., and Itoh, N.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 1919–1925 (2015).
- 58) Akiyama T., Washino, T., Yamada T, Koda, T., and Maitani, T.: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **41**, 54–60 (2000).
- 59) Itoh, N., Katsube, Y., Yamamoto, K., Nakajima, N., and Yoshida, K.: *Tetrahedron*, **63**, 9488–9492 (2007).
- 60) Itoh, N., Kurokawa, J., Isogai, Y., Ogasawara, M., Matsunaga, T., and Okubo, T.: *J. Agric. Food Chem.*, **65**, 10473–10481 (2017).
- 61) 伊勢村護 監修・編集: 緑茶と健康のメカニズム・機能効用ナビゲーション2013. 静岡県経済産業部農林業局茶業農産課 (2013).
- 62) Yang, C. S. and Wang, H.: *Mol. Nutr. Food Res.*, **55**, 819–831 (2011).
- 63) Tachibana, H., Koga, K., Fujimura, Y., and Yamada, K.: *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 380–381 (2004).
- 64) Hagerman, A. E. and Butler, L. G.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 4494–4497 (1981).

- 65) Itoh, N., Takagi, S., Miki, A., and Kurokawa, J.: *Enzym. Microb. Technol.*, **82**, 125–132 (2016).
- 66) 永田裕二：生物工学, **84**, 73 (2006).
- 67) 浅水俊平：生物工学, **93**, 489 (2015).
- 68) 戸田 弘：生物工学, **95**, 337 (2017).
- 69) 伊藤伸哉：化学と生物, **53**, 651–653 (2015).
- 70) Itoh, N.: *Future Directions in Biocatalysis 2nd ed.* (Matsuda, T. ed.), pp. 375–383, Elsevier (2017).
- 71) Uchiyama, T. and Miyazaki, K.: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **20**, 616–622 (2009).
- 72) Itoh, N., Isotani, K., Makino, Y., Kato, M., Kitayama, K., and Ishimota, T.: *Enzyme Microb. Technol.*, **55**, 140–150 (2014).
- 73) Itoh, N., Kariya, S., and Kurokawa, J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 6280–6289 (2014). /Erratum **82**, 61 (2016).
- 74) Okuta, A., Ohnishi, K., and Harayama, S.: *Gene*, **212**, 221–228 (1998).
- 75) Itoh, N., Kazama, M., Takeuchi, N., Isotani, K., and Kurokawa, J.: *FEBS Open Bio.*, **6**, 566–575 (2016).
- 76) 伏見 讓 監修：進化分子工学-高速分子進化によるタンパク質・核酸の開発, エヌ・ティー・エス出版 (2013).
- 77) 宮崎健太郎：現代化学, **573**, 21–25 (2018).
- 78) Ro, D. K., Paradise, E. M., Ouellet, M., Fisher, K. J., Newman, K. L., Ndungu, J. M., Ho, K. A., Eachus1, R. A., Ham, T. S., Kirby, J., Chang, M. C. Y., Withers, S. T., Shiba, Y., Sarpong, R., and Keasling, J. D.: *Nature*, **440**, 940–943 (2006).
- 79) バイオ戦略：https://www.kantei.go.jp/jp/singi/tougou-innovation/pdf/biosenryaku2019.pdf (2019/09).