

Geotrichum candidum 由来の高立体選択的アルコール脱水素酵素の構造解析 Structural analysis of *Geotrichum candidum* alcohol dehydrogenase with excellent enantioselectivity

杉山陽祐¹, 千田美紀², 千田俊哉², 松田知子^{1,*}

¹ 東京工業大学, 〒226-8501 横浜市緑区長津田町 4259

² 高エネルギー加速器研究機構, 〒305-0801 つくば市大穂 1-1

Yosuke Sugiyama¹, Miki Senda², Toshiya Senda² and Tomoko Matsuda^{1,*}

¹ Tokyo Institute of Technology, 4259 Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama, 226-8501, Japan

² High Energy Accelerator Research Organization, 1-1 Oho, Tsukuba, 305-0801, Japan

Geotrichum candidum NBRC4597 由来の新規アルコール脱水素酵素によるケトンの不斉還元反応は、立体選択性が非常に高い。本研究では、本酵素を結晶化し、PF の構造生物学ビームラインを用いて X 線回折強度データ収集に成功した。

1 はじめに

創薬研究において、立体選択性の高い合成法の確立は必要不可欠である。触媒としては、化学触媒と酵素は相補的であるため、両方の研究開発が待ち望まれている。酵素を使用する利点は、触媒効率が高いこと、立体選択性が高いこと、酵素は無限に再生可能であり使用後は容易に分解できることである。

有機合成の触媒となる酵素として、*Geotrichum candidum* NBRC4597 由来のアルコール脱水素酵素 (accession number AB774371) は、医薬品の合成中間体となる光学活性化合物の合成に幅広くに用いられている [1]。芳香族ケトンのみならず、脂肪族の不斉還元反応も効率よく触媒し、鏡像体過剰率 ee >99% 以上の光学活性アルコールを与える。また、2-プロパノールのようなアルコールの酸化反応により、還元型補酵素 (NADH) の再生を行うことができる (図 1)。さらに、有機溶媒のような非水系溶媒への耐性が高いという際立った特徴を有している。高濃度の基質や 2-プロパノールを添加することができ、また、ヘキサン/水の二層系や超臨界二酸化炭素/水の二層系の反応での使用が可能である。リパーゼなどの加水分解酵素においては非水系溶媒への耐性が高いものも報告されているが、アルコール脱水素酵素においては非常にめずらしい。このように、本酵素は、1) 立体選択性が高く、2) 基質適応範囲が広く、3) 非水系溶媒耐性が高いために、有機合成反応の触媒として有用性が非常に高い。

これまでに、本酵素の *G. candidum* NBRC4597 からの単離精製、大腸菌内での大量発現および精製を行った [2]。さらに、既知酵素とのアミノ酸配列の比較により、本酵素と相同性が高い酵素の報告はなく、本酵素は非常に新規性が高い酵素であった。立体構造が知られている酵素との相同性は、30% 程度であった。そこで、本研究では、X 線結晶構造解析により、その高い立体選択性の発現機構を解明す

ることを目的とし、本酵素の結晶化を行い、PF の構造生物学ビームライン BL-1A, PF-AR NE3A を用いて X 線回折強度データ収集を行った。

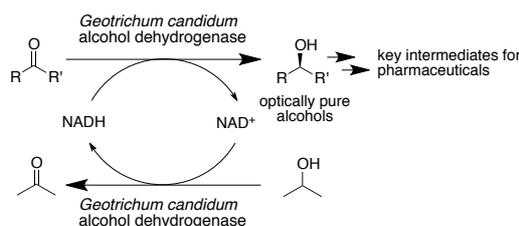


図 1 : *Geotrichum candidum* 由来の高立体選択的アルコール脱水素酵素を用いた不斉還元反応による光学活性医薬品中間体の合成

2 実験

【酵素の大量発現および精製】

Geotrichum candidum NBRC4597 由来のアルコール脱水素酵素は、既知の方法 [2] により得た。本酵素の遺伝子が挿入された pET-21b(+) を持つ大腸菌 Rosetta™(DE3)pLysS を LB 培地で培養し、20°C で IPTG (1 mM) により酵素を誘導した。集菌後、超音波破碎を行い、cell-free extract を得て、ニッケルアフィニティークロマトグラフィーにより精製したものを結晶化に用いた。

【酵素の結晶化】

アルコール脱水素酵素単体で結晶化スクリーニングを行った場合には結晶が得られなかったため、補酵素 NAD⁺、基質 2-pentanol との共結晶化を試みた。構造生物学研究センターの結晶化ロボット PXS を用いて約 500 種類の条件について結晶化スクリーニ

ングを行った結果、沈殿剤として PEG3350 を含むいくつかの条件で結晶を得ることができた。

3 結果および考察

得られた結晶にクライオプロテクト剤処理なしで X 線を当てた結果、3.7 Å 分解能の回折しか生じなかったため、27%(w/v)グリセロールを含む標準母液をクライオプロテクト剤として用いることで、結晶性の改良を試みた。その結果、3.25 Å 分解能の X 線回折強度データを得ることができた(表 1)。また、XAFS 測定の結果から、結晶に Zn が含まれていることが示されたため、Zn の吸収端でデータ収集を行った。

表 1: Crystallographic summary

Data collection	
Crystal form	NAD ⁺ 2-pentanone complex
X-ray source	PF-AR
Beamline	NE3A
Osc. angle (°)	0.5
Exposure time (s)	3
Wavelength (Å)	1.2827
Temperature (K)	95
Space group	<i>P</i> 6 ₁ 22 or <i>P</i> 6 ₅ 22
Unit-cell parameters (Å, °)	<i>a</i> = <i>b</i> =104.95, <i>c</i> =273.33
Resolution (Å)	90.89–3.25 (3.43–3.25)
Observations	304,803 (45,968)
Unique reflections	26,286 (3,887)
Completeness (%)	99.1 (98.6)
Redundancy	11.5 (11.8)
Average <i>I</i> / σ (<i>I</i>)	27.0 (7.4)
Rmerge (%)	0.102 (0.466)
Mosaicity (°)	0.2
B-factor (Å ²)	46.7

括弧内は最外殻分解能の値を示す

4 まとめ

G. candidum 由来の高立体選択的アルコール脱水素酵素を結晶化し、PF の構造生物学ビームライン BL-1A, PF-AR NE3A を用いて X 線回折強度データ収集を行った。今後、Zn の SAD 法または MAD 法で構造決定を行い、得られた構造をもとに、より効率的な部位特異的変異体を作成し、本酵素を創薬研究のために、さらに、工業的利用に向けた研究を行う予定である。

謝辞

本成果は、文部科学省創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業の支援により得られました。

参考文献

- [1] N. Nakamura *et al.*, *J. Org. Chem.* 63, 8957 (1998); T. Matsuda *et al.*, *Tetrahedron: Asymmetry*, 13, 971 (2002); T. Matsuda *et al.*, *Chem. Commun.* 1198 (2003).
- [2] Y. Nakata *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 625 (2010); T. Yamamoto *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 10413 (2013).

成果

- 1 杉山陽祐、横山絵里、松田知子、*Geotrichum candidum* NBRC 4597 由来アセトフェノン還元酵素の構造および機能解析、1PB-098、日本化学会第 94 春季年会、名古屋、2014 年 3 月 27 日。
- 2 横山絵里、杉山陽祐、山本拓郎、松田知子、*Geotrichum candidum* 由来のアセトフェノン還元酵素の基質特異性の検討、1P-07、第 17 回生体触媒化学シンポジウム、岡山、2013 年 12 月 20 日。
- 3 杉山陽祐、山本拓郎、横山絵里、松田知子、*Geotrichum candidum* 由来のアセトフェノン還元酵素の変異体を用いる反応機構の解明、1P-08、第 17 回生体触媒化学シンポジウム、岡山、2013 年 12 月 20 日。

* tmatsuda@bio.titech.ac.jp