

# アリールマロン酸脱炭酸酵素の機能改変

2006 年度

寺 尾 陽 介

# 目次

	ページ
序論	1
本論	
1章 AMDase の有用化合物への応用	7
1 - 1 アリールマロン酸脱炭酸酵素について	8
1 - 2 アリールプロピオン酸類と非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs)について	10
1 - 3 基質合成	15
1 - 4 AMDase による( <i>R</i> )-フルルビプロフェンの合成	16
1 - 5 生成物阻害作用の除去	18
1 - 6 変異型酵素による( <i>S</i> )-フルルビプロフェンの合成	24
1 - 7 まとめ	25
1 - 8 参考文献	26
2章 AMDase の立体選択性の逆転	29
2 - 1 AMDase と部位特異的変異導入	30
2 - 2 二重変異型酵素の作成	36
2 - 3 各二重変異型 AMDase の酵素精製	40
2 - 4 各変異型 AMDase の酵素活性	42
2 - 5 変異型 AMDase の立体選択性の検証	44
2 - 6 変異型 AMDase の速度論的パラメータの測定	48
2 - 7 まとめ	50
2 - 8 参考文献	51
3章 二重変異型酵素に対するランダム変異の導入	53
3 - 1 二重変異型酵素とランダム変異導入	54

3 - 2	ランダム変異導入その 1 (大腸菌 XL1-Red)	56
3 - 3	ランダム変異導入その 2 (Mutazyme)	58
3 - 4	ランダム変異株のスクリーニング	60
3 - 5	S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase の作成と精製	64
3 - 6	S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase の諸性質	66
3 - 7	S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase の活用	72
3 - 8	ランダム変異導入による基質特異性の拡大	74
3 - 9	まとめ	76
3 - 10	参考文献	77
4 章	AMDase のラセマーゼへの改変	79
4 - 1	酵素の”Promiscuity”	80
4 - 2	AMDase と他の酵素との相同性	82
4 - 3	変異導入と酵素精製	84
4 - 4	ラセミ化活性の測定	85
4 - 5	G74C 変異型 AMDase の pH と活性の関係	87
4 - 6	基質特異性測定のための基質合成	88
4 - 7	G74C 変異型 AMDase の基質特異性	91
4 - 8	Kinetics の測定	95
4 - 9	G74C 変異型 AMDase の反応機構の検討	96
4 - 10	G74C 変異型 AMDase の脱炭酸活性	97
4 - 11	G74C 変異型 AMDase の反応機構	98
4 - 12	他の変異型酵素 AMDase でのラセミ化活性	99
4 - 13	まとめ	100
4 - 14	参考文献	101
5 章	AMDase のアルドラーゼ活性	103
5 - 1	AMDase と enolase superfamily の関係	104
5 - 2	基質の設定と合成その 1	106
5 - 3	アルドラーゼ活性の測定その 1	109
5 - 4	基質の設定と合成その 2	110
5 - 5	アルドラーゼ活性の測定その 2	113
5 - 6	基質の設定と合成その 3	116
5 - 7	アルドラーゼ活性の測定その 3	119

5 - 8	まとめ	120
5 - 9	参考文献	122
	総括	125
	実験の部	131
	第一章	134
	第二章	141
	第三章	153
	第四章	166
	第五章	196



# 序論

## 序論

近年「Green Chemistry」といった概念・言葉が注目されている<sup>1,2)</sup>。「グリーンケミストリー」は今まで "Environmental Benign Chemistry", "Environmental Friendly Chemistry", "Clean Chemistry", "Sustainable Chemistry" などと呼ばれてきたものを統合した言葉と概念である。米国の環境保護局 (EPA) によれば、グリーンケミストリーは「化学品の設計・製造から廃棄・リサイクルまで全ライフサイクルにわたって、人間の健康や環境に害を与える原料、反応試薬、反応、溶媒、製品をより安全で環境に影響を与えないものへの変換を進めること。また、変換収率、回収率、選択性の高い触媒やプロセスの開発によって廃棄物の少ないシステムを構築する。」こととされ、近年の環境破壊・地球温暖化・石油資源の枯渇などの諸問題から生まれてきた概念である。

石油化学において金属を含んだ触媒が工業的に良く使用され、有機合成においても不斉を制御する目的などで有機金属触媒が良く使用されている。医薬品や生理活性物質の多くは不斉炭素を有する化合物であり、その一方の鏡像体のみが生理活性を示す、鏡像体間で活性が異なる、一方は有毒であるといったことが知られている。例えば、薬害で有名になったサリドマイド<sup>3)</sup>ではR体には睡眠作用が、S体には胎児に対する強い催奇作用があることが知られている。また、うま味調味料として利用されているL-グルタミン酸ナトリウム、香料などに用いられているL-メントールなどの化合物も単一の鏡像体が利用されている。このような一方の鏡像体の生理活性物質を合成する不斉合成法は、2001年ノーベル化学賞を受賞した野依良治教授によるBINAP触媒<sup>4-7)</sup>やW. S. Knowles博士<sup>8)</sup>、K. B. Sharpless教授<sup>9)</sup>に代表されるように、広く研究が行われ、注目されている。不斉合成においては、金属触媒を用いた方法と微生物や酵素などの生体触媒を用いた方法と大きく二つに分類される。

生体触媒は植物や微生物・菌体・抗体触媒、またはそれらから単離した酵素を総称したものである<sup>10,11)</sup>。日本では古くから醤油や味噌・日本酒などの製造に微生物が使用されており、また世界でもワインやチーズなどの製造に使用されてきた。生体触媒とは、古くから使われてきたこれら微生物を含めた新しい言葉である。古くからある微生物の利用法が、微生物そのものに糖などの簡単な化合物から、多段階を経てアルコールなどを作らせる「発酵」であるのに対して、生体触媒という言葉の持つ意味は若干異なっている。生体触媒は、合成された比較的複雑な基質に対して、一部官能基の変換や物質の変換を行い、比較的短工程の反応を行うものである。発酵法は、微生物そのものが生きていくためにいくつもの酵素を使用し物質を変換

していくのに対して、生体触媒は一つの酵素(2,3種類の酵素の場合もある)が、生きていくために必要な本来の基質でなくとも作用するといった、ある意味酵素の基質特異性のゆるさを利用した方法である。

生体触媒はその名の通り、生体内(微生物の菌体内、植物の細胞内など)で作られた触媒である。人間の体をはじめ生物のタンパク質を構成しているアミノ酸はほとんど光学的に純粋なL体のみであり(バクテリアの細胞壁には一部D-Alaの場合もある)、またタンパク質そのものも複雑な三次元構造をとっている。そのため、反応を触媒する能力のあるタンパク質である酵素も基質となる化合物の立体配置を認識し、光学活性な生成物を与えることができる。また生体触媒は生体によって生合成されることから、元の微生物・菌体・植物を培養すれば限りなく入手することが可能であり、化学的に合成された錯体触媒などとは異なり、再生可能な触媒である。さらに本来生体内で働くため、中性条件、20℃～40℃と温和な条件で反応させることが可能である。このような観点からも生体触媒は Green Chemistry に合致する優れた触媒であるといえる。

一方、生体触媒は、生体内で生合成されるタンパク質であることから、それぞれ対応する遺伝子が存在する。微生物菌体からゲノムを取り出し、遺伝子工学的手法を用いて大腸菌などに目的とする酵素のみを大量発現させることも可能である。さらには近年発達してきているデータベースやモデリングなど情報工学的手法を用いることで、他の類似酵素との相同性を検索することも可能となってきた。また、遺伝子への変異導入などの技術を利用することで酵素の活性・反応性などを改変することも可能となってきた。

最近、欧米を中心として酵素の”promiscuity”が大きな話題となっている<sup>12,13</sup>)。 ”promiscuity”・”promiscuous”とは、乱雑な・広範囲のといった意味であるが、生体触媒・酵素においては酵素自体の基質認識などの”ゆるさ”の性質を指すことが多い。酵素の”promiscuity”には大きく分けて三つの分類がある。第一は、昔から知られている基質特異性の広さである。酵素は自然界における本来の基質の他にも似たような形の化合物を基質として認識・触媒することができ、有機合成・官能基変換などに良く用いられている。第二は、反応溶媒などの環境の変化に対応できる能力である。本来酵素は、水溶液中で反応が行われるが、有機溶媒やイオン性液体中でも反応可能なリパーゼなどの酵素が知られている。最後の”promiscuity”は、ここ数年で提唱されるようになってきたものであり、酵素の触媒する反応自体の多様性である。元来酵素は、一つの活性部位で一つの反応を触媒するものと考えられていた。しかし、近年になって一つの活性部位でも異なった化学反応を触媒する可能性



や、活性部位における小さな変異の導入で新しく別の反応を触媒する可能性・およびその例が報告されている。酵素の X 線結晶構造解析による高次元構造の解明などにより、それまで Black Box であった酵素の活性部位・反応機構が明らかとなり、遺伝子への変異導入など人為的な改変が可能となってきている。



Figure 1 ブラックボックス<sup>14)</sup>と呼ばれていた酵素等の生体触媒 (biocatalyst)

筆者は当研究室で見出され、これまで様々な研究がなされてきたアリアルマロン酸脱炭酸酵素(Arylmalonate Decarboxylase: AMDase)に着目した。AMDase はアリアルマロン酸誘導体のエナンチオ選択的脱炭酸反応を触媒し、高い光学純度・収率でアリアルプロピオン酸類を与える酵素である。本酵素は既にその遺伝子の塩基配列及び酵素のアミノ酸一次配列が明らかとなっている酵素である。筆者は、本論文において情報工学や遺伝子工学的手法を用い、AMDase の機能改変、有用化合物の合成法の開発、酵素の性質”promiscuity”に関する考察を行った。第一章では、AMDase の高いエナンチオ選択性を利用して、医薬品など有益な化合物(生理活性作用が異なるフルルビプロフェンの両鏡像体)の合成法を開発した。第二章では、他の相同性を有する酵素の反応機構との比較から AMDase に部位特異的に二重変異を導入し、酵素の立体選択性の逆転について論じた。第三章では、ランダム変異導入により二重変異型 AMDase の酵素活性を向上させた結果について述べる。第四章では、AMDase の”promiscuity”な性質の一つとして、反応機構の考察から一つ変異を導入し、本酵素が脱炭酸反応に加えてラセミ化反応を触媒することができることを示した。第五章では、同様に反応機構の考察から、本酵素がアルドール反応を触媒することができることを示した。最後に、総括として、変異導入により AMDase の機能改変と、AMDase の”promiscuity”に関する考察・まとめを行った。

以下、本研究の詳細を報告する。

## 参考文献

- 1) 御園生誠、村橋俊一、グリーンケミストリー：持続的社会的のための化学、2001、講談社
- 2) 御園生誠、環境にやさしい化学技術の開発：環境触媒とグリーンケミストリー、2006、シーエムシー出版
- 3) Stephens Trent D., Brynner Rock、本間徳子訳、神と悪魔の薬サリドマイド、2001、日経 BP 社
- 4) 大嶋幸一郎、北村雅人編、ノーベル賞化学者野依良治博士 学問と創造、2002、化学同人
- 5) Kitamura, M.; Tokunaga, M.; Ohkuma, T.; Noyori, R., *Org. Syn.*, **1998**, Coll. 9, 589-595; **1993**, 71, 1-13
- 6) Kitamura, M.; Noyori, R., *Ruthenium in Organic Synthesis*, **2004**, 3
- 7) Noyori R., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2002**, 41, 2008-2022
- 8) Knowles, W. S., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2002**, 41, 1998-2007
- 9) Sharpless, K. B., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2002**, 41, 2024-2032
- 10) Faber, K., *Biotransformations in organic chemistry*, 5<sup>th</sup> Ed., Springer-Verlag, Berlin, **2004**
- 11) Wong, C. -H.; Whitesides, G. M., *Enzymes in synthetic organic chemistry*, Pergamon, Oxford, **1994**
- 12) Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas R. J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 6032-6040
- 13) Kazlauskas R. J., *Curr Opin Chem Biol*, **2005**, 9, 195-201
- 14) 北野正雄 HP(京都大学大学院工学研究科)



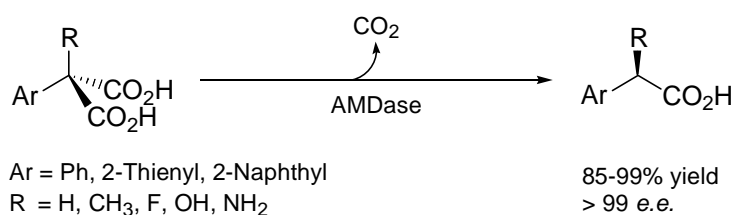
# 本論

## 第一章

### AMDase の有用化合物への応用

## 1-1 アリールマロン酸脱炭酸酵素について

アリールマロン酸脱炭酸酵素(arylmalonate decarboxylase: AMDase、EC. 4.1.1.76) はアリールマロン酸誘導体のエナンチオ選択的な脱炭酸反応を触媒しアリール酢酸類を与える酵素である<sup>1)</sup>。AMDase は宮本らにより発見された酵素であり、フェニルマロン酸資化性菌の *Alcaligenes bronchicepticus* KU1201 より単離、精製された酵素である(Scheme 1-1)<sup>2,3)</sup>。



Scheme 1-1 アリールマロン酸脱炭酸酵素による不斉脱炭酸反応

フェニルマロン酸は本酵素により脱炭酸され、フェニル酢酸へと変換された後、代謝によりエネルギー源となっていくが、自然界には存在しない化合物であることから、AMDase の自然界での本来の基質が何であるかは不明である。 -アリール-メチルマロン酸類のエナンチオ選択的な脱炭酸反応により、高光学純度の -アリールプロピオン酸を得られることから、非常に有益な、また他に類を見ないユニークな酵素である。これまでの研究から、AMDase は分子量 24,734 のモノマー酵素であり、補酵素や補因子として金属を必要としない、SH 試薬により反応が阻害される、といった酵素学的諸性質が明らかにされている。本酵素はすでにクローニングが行われ、塩基配列も解析されている<sup>4)</sup>。阻害剤の研究や、塩基配列から本酵素の活性中心はシステインであることが推定された。本酵素中に存在する 4 つのシステイン残基を、それぞれセリンへと変換した変異型酵素の研究から、活性中心が 188 番目のシステインであることが判明している(Table 1-1)<sup>5-7)</sup>。

Table 1-1 各変異型酵素の速度論的パラメータ

Enzyme	Activity (U / mg)	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat} / K_m$
Wild type	410	14.4	301	21
C101S	548	4.3	248	58
C148S	167	11.5	100	8.7
C171S	371	3.5	182	53
C188S	0.12	23.7	0.11	0.046

また、基質特異性に関する研究から、マロン酸に直接芳香族環が接続していなければならないこと、 $\alpha$ 位の置換基は水素、メチル、アミノ基や水酸基といった比較的大きさの小さな置換基であることなど酵素の反応部位のサイズの制限が明らかとなっている。基質特異性の拡大を目指して、ランダム変異導入により $\beta$ 位がエチルとなった基質でも脱炭酸反応が進行するような変異体の取得が試みられたが失敗に終わっている。活性中心のシステインの働きについていくつかの理論を提唱していたが、最近になり、システインの役割は中間体に対するプロトン供与であることが確認できた<sup>8)</sup>。

本章では、AMDase を用いて光学純度の高いアリールプロピオン酸類の合成法を開発することを目的として検討を行った結果を示す。AMDase の生成物としてアリールプロピオン酸類が得られてくることを利用して、アリールプロピオン酸の一種であり、生理活性物質として有用な光学活性なフルルビプロフェンを対象物質として検討し、以下に詳細にその結果を述べる。

## 1-2 アリールプロピオン酸類と非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)について

AMDase によるアリールマロン酸誘導体の脱炭酸生成物は光学活性なアリールプロピオン酸類である。アリールプロピオン酸類は、非ステロイド性抗炎症薬 (Nonsteroidal anti-inflammatory drugs : NSAIDs) として知られており、ステロイドに代わる抗炎症剤として有用である (Figure 1-1)<sup>9-15</sup>。

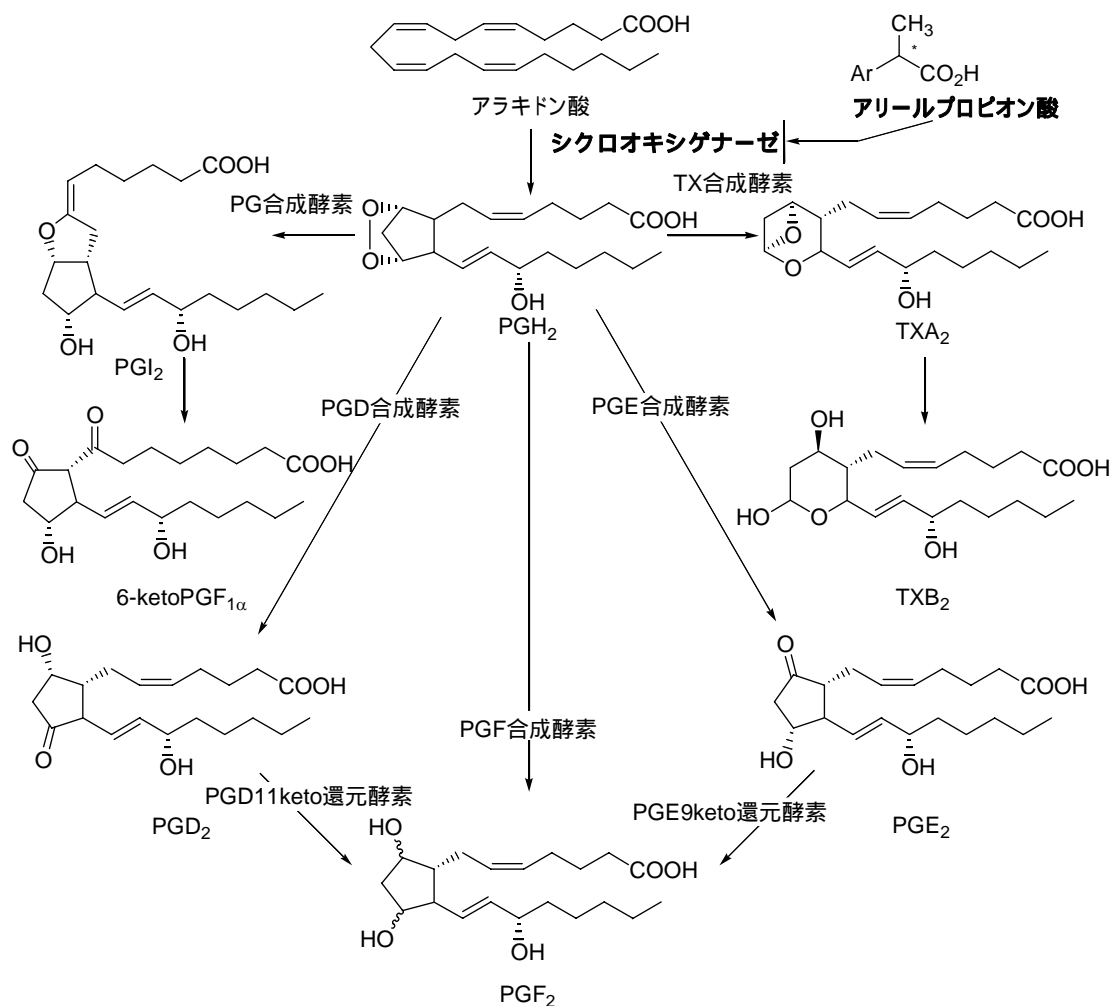


Figure 1-1 プロスタグランジン合成経路におけるシクロオキシゲナーゼとアリールプロピオン酸による阻害

一般的な非ステロイド性抗炎症薬の多くは、シクロオキシゲナーゼ (COX-1、COX-2) 活性を阻害する。シクロオキシゲナーゼはアラキドン酸からプロスタグランジンを合成する酵素であり、COX-1 と COX-2 がよく知られている。シクロオキシゲナーゼ 1 (COX-1) は恒常的に発現しており、胃壁が自ら分泌する酸により溶かされないよう防ぐ作用がある。COX-1 が阻害されると、胃潰瘍や消化管出血の原因

となる。一方 COX-2 は炎症時に誘導されるプロスタグランジン合成酵素であり、NSAIDs の抗炎症作用は COX-2 阻害に基づくと考えられ、COX-2 を選択的に阻害する新しい NSAIDs が創製されている。特に酸性 NSAIDs は強いシクロオキシゲナーゼ活性阻害を有しており、COX によりアラキドン酸からプロスタグランジンが合成されるのを阻害する。(最近では、COX-1、COX-2 共に抑制された場合のみ消化管障害が発現し、いずれかが阻害されずに残っている場合には消化管障害は起きにくいことが明らかとなっている)

プロスタグランジンには、炎症、発熱作用があるため、結果的に NSAIDs は抗炎症作用、鎮痛作用、解熱作用を持つ。

2-アリールプロピオン酸誘導体(ケトプロフェン、フルルビプロフェン、ナプロキセン他：プロフェン)はプロピオン酸部分の 位に不斉炭素を持つため、それ自体に 2 つのそれぞれ異なる生物学的効果および代謝を持つ鏡像体が有り得る(Figure 1-2)<sup>16,17)</sup>。

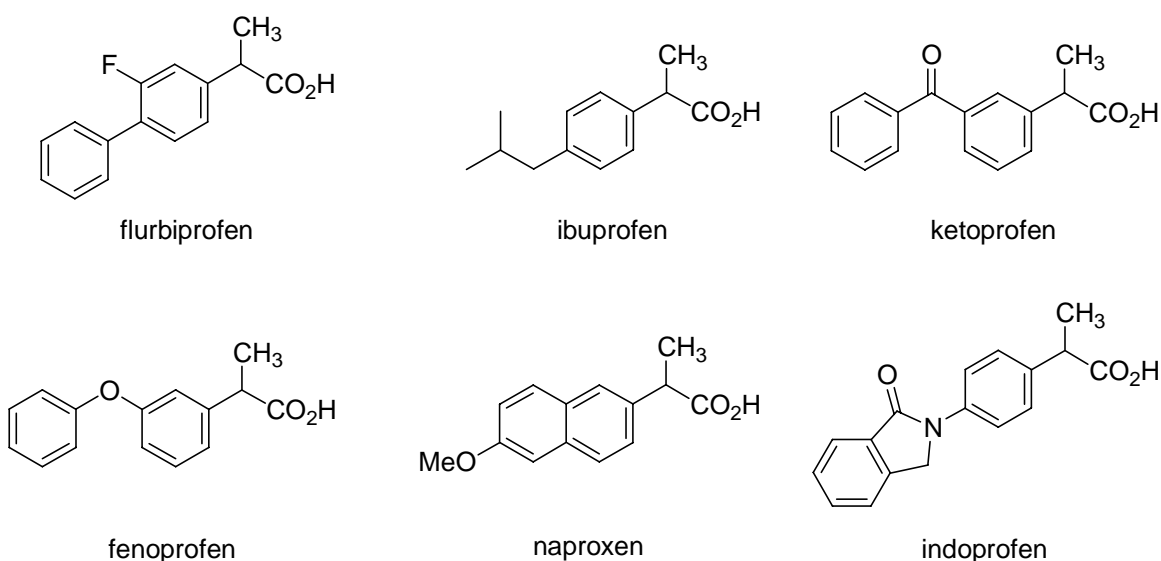


Figure 1-2 アリールプロピオン酸(プロフェン)系 NSAIDs

例えば、イブプロフェンは、*in vitro* および *in vivo* で(S)-イブプロフェンが有効成分であることがわかっている。しかし、これまでの *in vivo* 試験から(R)-イブプロフェンを有効な(S)-鏡像体に変換するラセミ化酵素の存在が明らかになっていることから、市販されているイブプロフェンは両方の鏡像体の混合物(ラセミ体)である。一方、同じ NSAIDs に属するナプロキセンでは、S 体が抗炎症作用を示し、体内にラセミ化酵素が存在しないために、純粋な S 体の鏡像体のみ販売されている(Figure



1-3)<sup>18,19)</sup>。

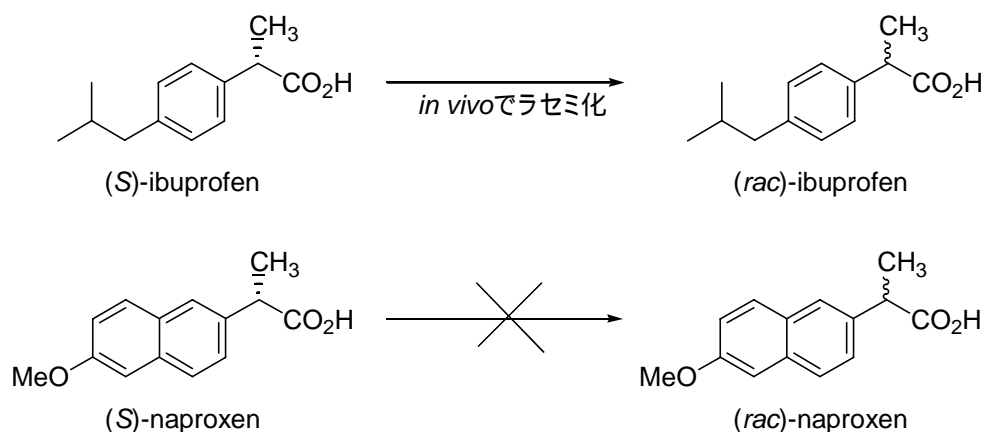


Figure 1-3 生体内におけるプロフェンのラセミ化と非ラセミ化

近年、フルルビプロフェンの R 体には、抗がん作用が存在することが報告されている。S 体には、他の NSAIDs 同様、抗炎症作用があるため、両鏡像体の効率的な作り分けが必要とされている(Figure 1-4)<sup>20,21)</sup>。

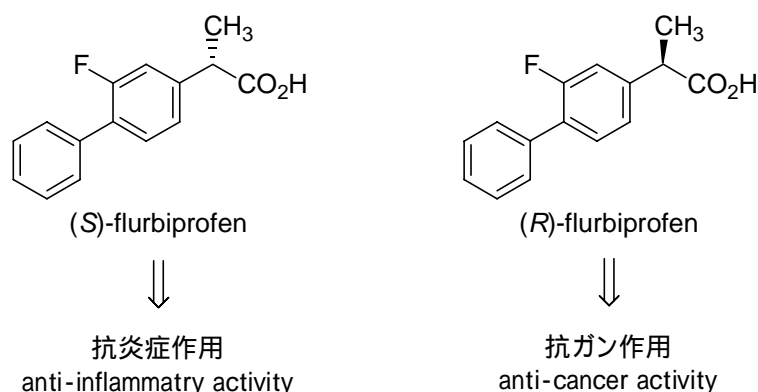
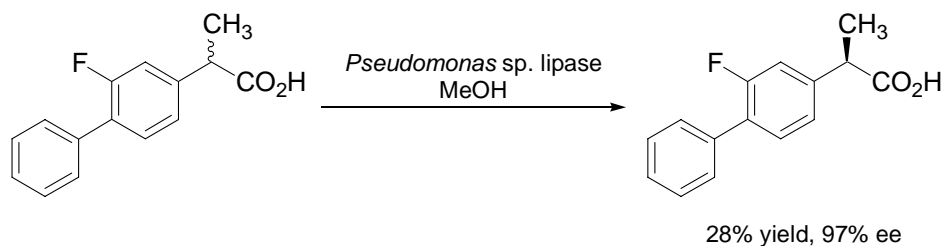


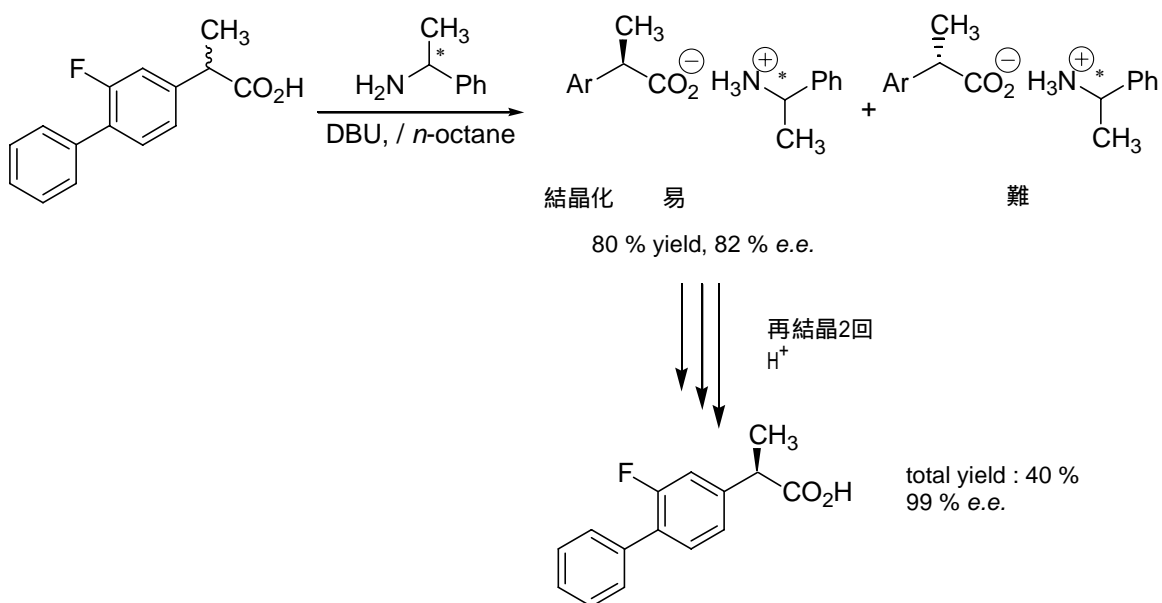
Figure 1-4 フルルビプロフェンの鏡像異性体による生理活性の違い

これまでに、光学活性なフルルビプロフェンは *Pseudomonas* sp.由来リパーゼを用いたラセミ体のカルボン酸のエステル化による速度論的光学分割法(Scheme 1-2)<sup>22)</sup> や、光学活性アミンを用い、塩を形成させ、その結晶性の違いから一方の鏡像体のみを分割する方法(Scheme 1-3)<sup>23)</sup>、などによって合成されてきた。また、キラルな固定相を有する HPLC などにより分割されてきた。ただし、これらの方法にはそれぞれ欠点が存在することが指摘されている。速度論的光学分割法では生成物の理論的な最高収率が 50%に制限され、生成物を精製後エステル加水分解等後処理をする必要がある。また、光学活性なアミンを用いた塩形成による結晶化でも、最高収

率は 50% であり、塩を形成させた後の再結晶操作やその繰り返しなど操作が煩雑である。HPLC による分割も一度に精製できる量がカラム容量に依存する、キラルな固定相を持つカラムが高価格であるなどの欠点がある。また、煩雑な操作が必要でないものは、低収率であったり、得られた生成物の光学純度が低いものであったりと有効な合成方法ではなかった。



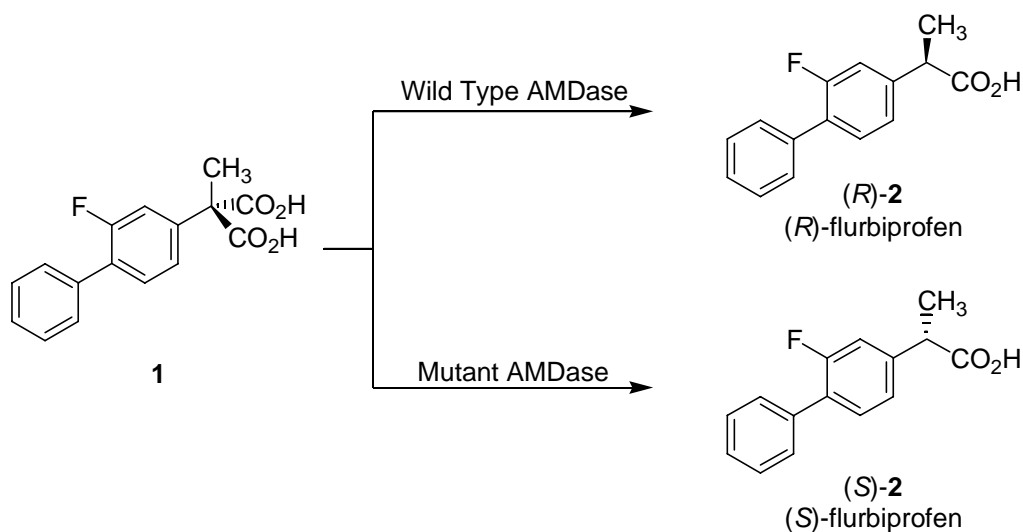
Scheme 1-2 (R)-フルルビプロフェンの合成法1



Scheme 1-3 (R)-フルルビプロフェンの合成法2

そこで、AMDase がマロン酸誘導体から不斉脱炭酸反応にて高光学純度のアリールプロピオン酸を与えることができる性質を利用して、マロン酸誘導体 **1** から (*R*)-フルルビプロフェン ((*R*)-**2**) を高収率、かつ高光学純度で得る新たな合成方法を確立しようと考えた (Scheme 1-4)。

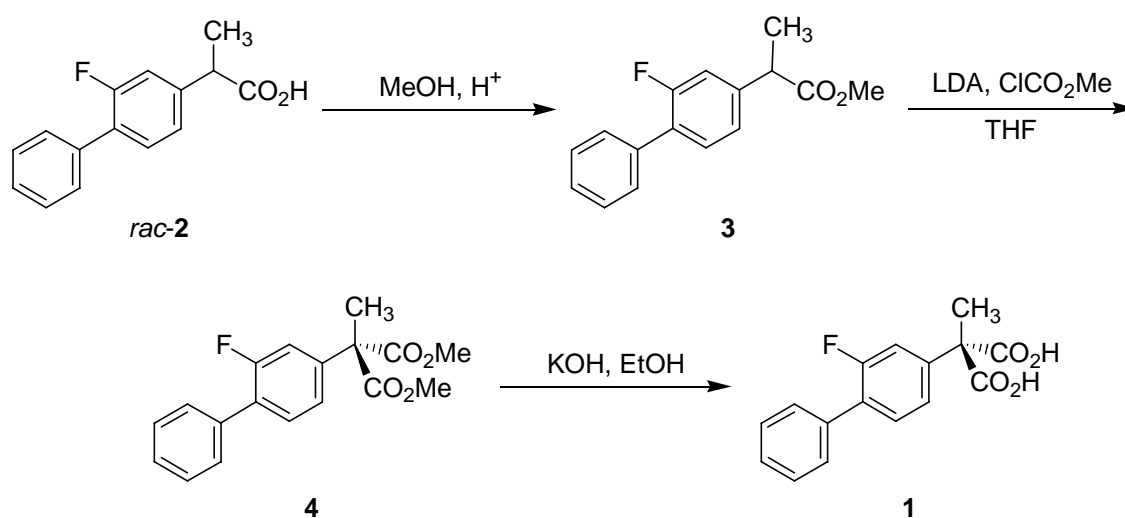
また、第 2・3 章で述べる変異型酵素を用いて、野生型とは逆の鏡像体の *S* 体 **2** を得ることができないかと考えた。変異型酵素は、活性部位中でプロトンを供与するシステイン残基を野生型とは反対側に導入し、野生型 AMDase とは逆の鏡像異性体を生成物として与える酵素である。



Scheme 1-4 野生型・変異型 AMDase によるフルルビプロフェンの両鏡像体の合成

### 1-3 基質合成

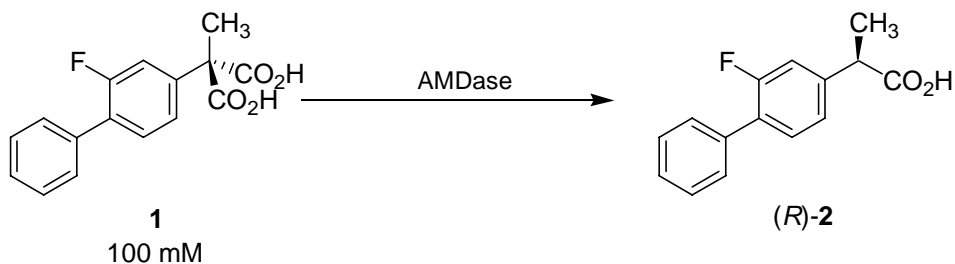
酵素反応の基質の合成は、市販品のラセミ体フルルビプロフェン(*rac*-2)を出発原料とし、以下の Scheme のように 3 段階にて合成した。まず、ラセミ体フルルビプロフェン(2)をメタノール中、酸触媒存在下でメチルエステル化し、続いて、塩基 LDA により 位のプロトンを引き抜き、クロロギ酸メチルによりメトキシカルボニル基の導入、最後に水酸化カリウムによる加水分解反応により、合計収率約 80% にてフルルビプロフェンのマロン酸誘導体 1 を合成した(Scheme 1-5)。



Scheme 1-5 基質合成

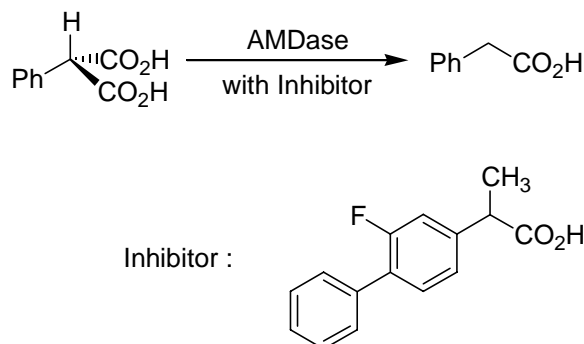
### 1-4 AMDase による(R)-フルルビプロフェンの合成

合成した基質 **1** を用いて AMDase による脱炭酸反応を試みた。pH 8.5 の Tris-HCl 緩衝液中、反応温度 35 °C、基質濃度 100 mM で、若干の反応の進行は確認できるものの、脱炭酸生成物(R)-**2** の収率は 20%と低いものであった。反応時間を 1 時間から 12 時間と延ばしてみても、反応はそれ以上進行することなく、生成物の収率・光学純度ともに変化は見られなかった(Scheme 1-6)。



Scheme 1-6 AMDase による(R)-フルルビプロフェンの合成

また、反応開始一時間後に酵素溶液を 1.5 倍になるようにさらに加えると、止まっていた反応が再び進行し、生成物の収率も約 35%と増加することが判明した。これらの事実から、生成物が低収率にとどまっている原因は生成物による阻害ではないかと考え、Lineweaver-Burk プロットを利用して調べてみた。阻害剤として種々の濃度のフルルビプロフェン存在下、基質としてフェニルマロン酸を用い様々な濃度での脱炭酸反応の反応速度を調べた(Scheme 1-7)。その結果、阻害物質(Inhibitor)の濃度によって阻害の強度・グラフの傾きが変わるため、本反応は生成物フルルビプロフェンにより反応が阻害され、その阻害様式は拮抗阻害であることが判明した(Figure 1-5)。



Scheme 1-7 フルルビプロフェンによる生成物阻害の実験

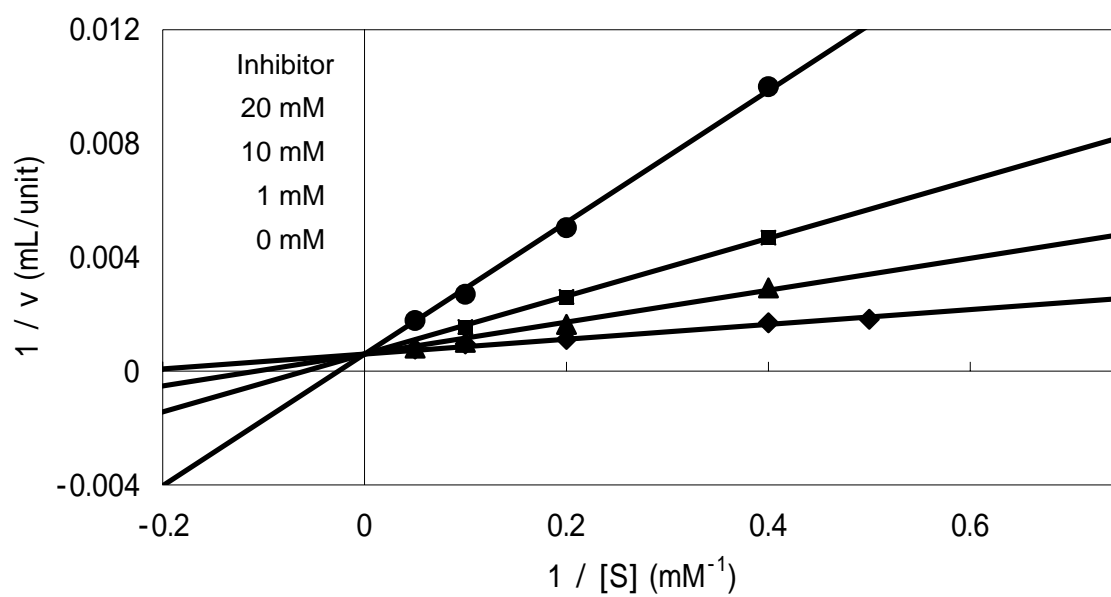


Figure 1-5 フルルビプロフェンによる生成物阻害実験の結果(Lineweaver-Burk plot)

## 1-5 生成物阻害作用の除去

拮抗阻害は、阻害剤が本来酵素と基質の結合すべき部位に結合してしまう様式で酵素反応を阻害する。生成物阻害は酵素反応特有の仕組みである。生体内などで、生成物が出来過ぎないように、ある一定の濃度になるとフィードバックして反応を阻害し、それ以上生成物を合成しないようにする仕組みとして存在している。このような生成物の酵素阻害作用の影響を少なくするには、酵素の濃度を高くする・絶対量を多くする、生成物の効果的な系外への除去など生成物の濃度を低下させる必要がある。そのような方法として次のような方法を試してみることにした。

- ・ 酵素を追加する
- ・ 酵素濃度を上げる
- ・ 有機溶媒を加えて二層系で反応を行なう
- ・ 常温溶融塩中での凍結乾燥酵素を用いた反応
- ・ 吸着剤（Amberlite XAD）を用いて基質濃度を下げる
- ・ 基質濃度を下げる

### 1-5-1 酵素の量・酵素濃度の検討

酵素を追加して加えることは、失活していない酵素が新たに加わるので酵素反応が再び進行し、収率の向上が望める。しかし、多少の収率の向上は認められるものの、多量の酵素を使用するために酵素の追加はあまり好ましくない。また、酵素濃度を上げた反応では、酵素溶液中に存在していた塩などが析出してしまい、取り除くことが必要であったり、収率光学純度ともに変化がないなど良い結果が得られなかった。

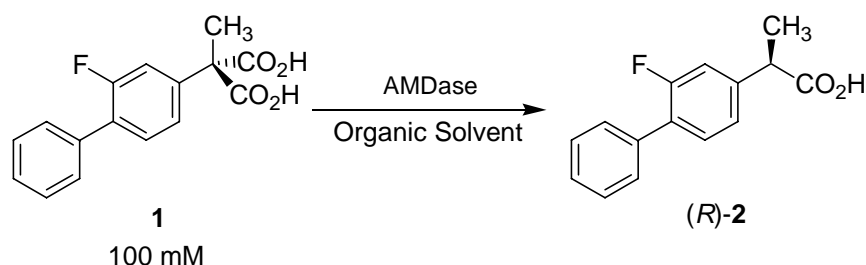
追加酵素なし・・・収率 20%

追加酵素あり・・・収率 35%

## 1-5-2 有機溶媒添加の検討

本来生体触媒である酵素は水溶液中での反応が一般的である。有機溶媒が存在すると、酵素の表面や立体構造が変化し、酵素機能が失活することが知られている。しかし、ある種のリパーゼなどは有機溶媒中でも活性を保持し、水溶液中とは異なる反応や、反応性を示すことがある。

有機溶媒を添加し、生成物を有機層へ移すことで、水溶液中の生成物の濃度を低下させ、生成物阻害を回避することができるのではないかと考えた。種々の有機溶媒を基質溶液 1 mL、酵素溶液 1 mL に対して 0.1 ~ 1 mL 加えた二層系で反応を行った(Scheme 1-8、Table 1-2)。



Scheme 1-8 有機溶媒中での AMDase の脱炭酸反応

Table 1-2 脱炭酸反応における有機溶媒の影響

Entry	Organic Solvent	Reaction
1	<i>n</i> -hexane	
2	<i>n</i> -octane	
3	toluene	
4	DIPE	
5	DMSO	

DIPE : diisopropyl ether, DMSO : dimethyl sulfoxide

使用した有機溶媒は、生成物を取り除く目的から水溶液と二層になるようなヘキサン、オクタン、トルエンやジイソプロピルエーテルを試した。さらに二層にはならないが、しばしば有機溶媒添加に用いられているジメチルスルフォキシドも試した。しかしながら、結果は Table 1-2 に示したように、どの有機溶媒存在下でも酵素反応は進行せず、原料の基質であるマロン酸誘導体の回収にとどまった。有機溶媒を加えることで反応の進行が確認できなかったのは、有機溶媒によって酵素のコンフォメーションがなんらかの影響を受けて立体構造が変化したために、基質が酵素と結合することができなかったため、または、酵素が失活してしまったためだと考



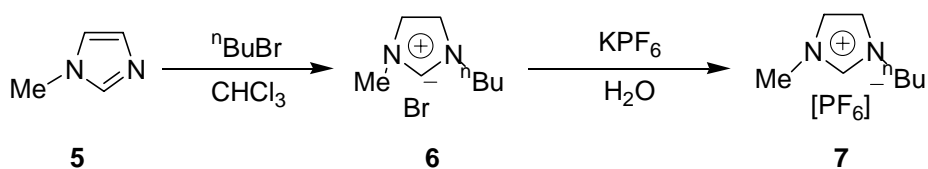
えられる。これまでの研究からも、AMDase は有機溶媒に弱いことが知られており、有機溶媒の添加は良い方法ではないと言える。

### 1-5-3 イオン液体 (Ionic Liquid) 中での凍結乾燥酵素を用いた検討

近年、有機合成化学においても地球環境や資源環境を考慮することが不可欠になっていることから、合成に使用する反応剤や副生成物を少なくすることや、リサイクル可能な反応溶剤を用いることが求められている。そのリサイクル可能な反応溶媒の一つとして、イオン液体を使用することとした<sup>24)</sup>。イオン液体は塩でありながら室温で液体であり、蒸気圧が極めて小さい、化学的・熱的に安定、非腐食性、水やジエチルエーテルなどのいくつかの有機溶媒に不溶などの特徴を有する。これらの特徴から、もし AMDase を用いた酵素反応がイオン液体中で進行するならば、リサイクル可能な反応系を構築できる可能性が出てくる。また、生成物をイオン液体中に移すことで生成物阻害の影響を低下させようと考えた。

### 1-5-4 イオン液体(Ionic Liquid)の合成

1-メチルイミダゾール (5) に *n*-ブチルブロミドをクロロホルム中で反応させ一昼夜加熱還流し精製した後、ヘキサフルオロリン酸カリウム水溶液を加え、イオン液体 1-butyl-3-methyl-1*H*-imidazolium hexafluorophosphate (7) を得た。これには系中に水が残存しているため、長時間減圧下溶媒を留去することで水を取り除いて反応に用いることとした(Scheme 1-9)。



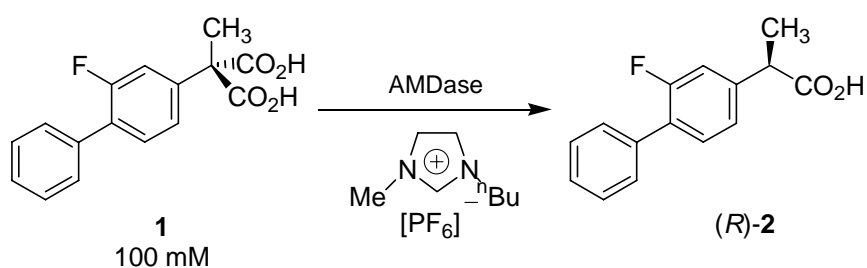
Scheme 1-9 イオン性液体の合成

### 1-5-5 凍結乾燥酵素の作製

イオン液体中で反応を行なうために酵素溶液から水分を取り除き、酵素を取り出すこととした。大腸菌から大量培養・精製した酵素溶液を凍結乾燥し、凍結乾燥酵素を作製した。

### 1-5-6 イオン液体 (Ionic Liquid) 中での凍結乾燥酵素反応

作成したイオン性液体中で乾燥酵素を用いて同様に酵素反応を行なった。イオン性液体 1 mL に乾燥酵素と基質を加え、一晚攪拌し酵素反応が進行するかどうか確かめた(Scheme 1-10)。

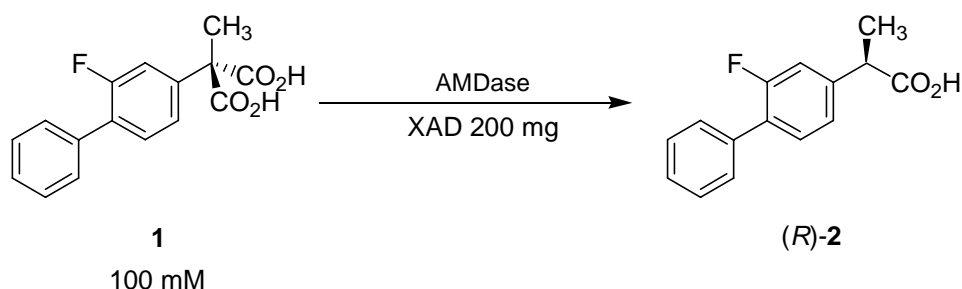


Scheme 1-10 イオン性液体中での AMDase による脱炭酸反応

しかし、反応の進行は確認することはできなかった。イオン液体中では、基質・酵素ともに溶けにくく、うまく均一系にならなかったためではないかと考えられる。

### 1-5-7 吸着剤 (Amberlite XAD) を用いた検討

微生物反応において吸着剤を添加し、基質・生成物を吸着させることで収率を向上させた例が報告されている<sup>25)</sup>。そこで、吸着剤を反応系中に添加し、生成物を吸着させることで濃度を下げることと試してみることにした。濃度を下げることによって阻害作用の影響を減らし、収率の向上を試みた。吸着剤としては、ベンゼン環との相互作用を期待して疎水性のアクリル系・スチレン系合成吸着剤であるアンバーライト XAD-2, -4, -7 を用いた(Scheme 1-11)。

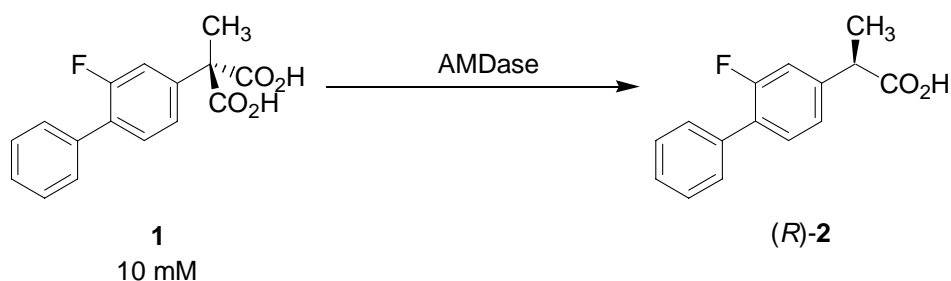


Scheme 1-11 脱炭酸反応における吸着剤 XAD の影響

吸着剤の種類を 3 種類試してみた結果、どれも吸着剤を使用しない時と同様の収率であった。フルルビプロフェンと AMDase の反応においては吸着剤 Amberlite XAD の効果は薄いようである。

### 1-5-8 基質濃度の検討

基質濃度が高いことから、酵素の活性を阻害していたと考えることができるため、基質濃度を下げて反応を行なうこととした(Scheme 1-12)。



Scheme 1-12 脱炭酸反応における基質濃度の影響

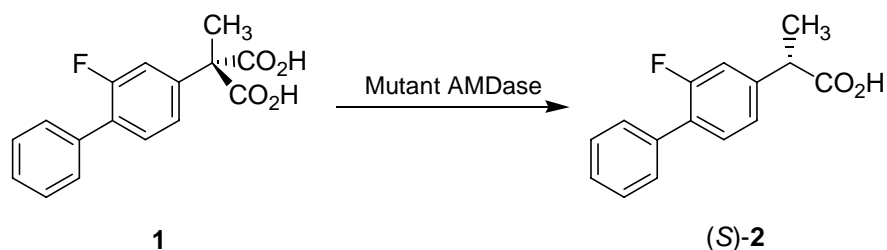
基質濃度を当初の 100 mM から十分の一の 10 mM にした結果、収率が 90% に上昇したことを確認できた。光学純度も 92% と高いものであった。

基質濃度 100 mM では生成物濃度も高くなることから、生成物が酵素と競争阻害的に結合し、それ以上基質が反応できなくなってしまい、収率が低くなったのではないかと推定できる。基質濃度を低くすることで生成物の酵素に対する影響を少なくすることができたと考えられる。

以上のように、拮抗阻害による低収率を解決するため種々の検討を行った結果、基質濃度を 10 mM にすることにより、収率 90%にて目的とする(*R*)-フルルビプロフェンを効率良く合成することに成功した。

## 1-6 変異型酵素による(S)-フルルビプロフェンの合成

次に、次章以降で述べるように逆の立体選択性を示すよう創製し、酵素活性を向上させた S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase を用いて(S)-フルルビプロフェンを合成できるか試してみることにした(Scheme 1-13)。

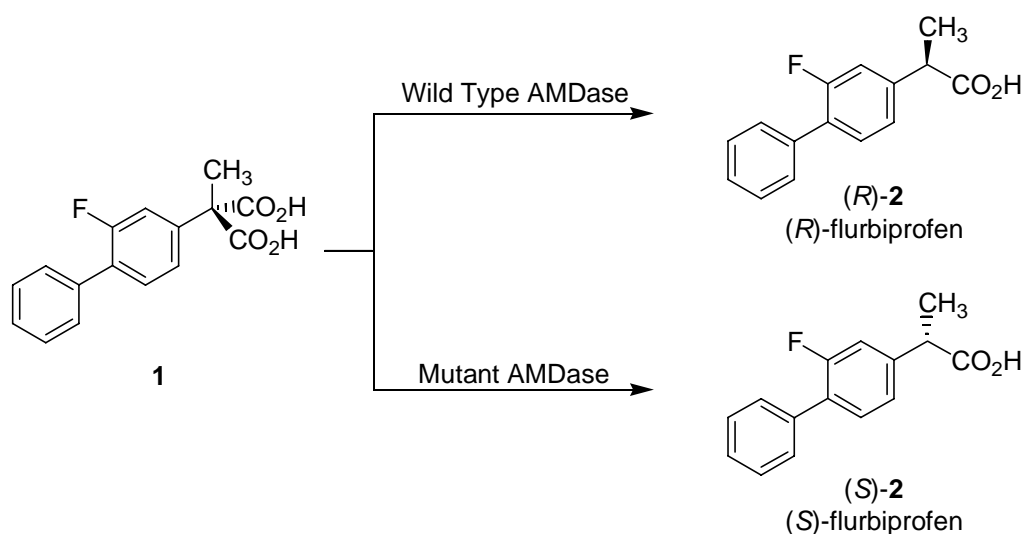


Scheme 1-13 三重変異型 AMDase による(S)-フルルビプロフェンの合成

同様にして合成した基質を用いて野生型 AMDase と同様の条件にて脱炭酸反応を行ったところ、(S)-フルルビプロフェンを収率 30%、光学純度 90%にて得ることができた。収率は変異型酵素の活性が野生型と比べて大きく低下していることから、野生型 AMDase が 90%なのに対して 30%と低いものであった。また、立体選択性・光学純度に関しては、目的どおりの野生型とは逆の S 体である事が確認できた。

## 1-7 まとめ

以上のように、AMDase がマロン酸誘導体からエナンチオ選択的な脱炭酸反応を触媒する性質を利用し、アリアルプロピオン酸系有用化合物の両鏡像体を合成することに成功した。非ステロイド系抗炎症薬(NSAIDs)の一種であるフルルビプロフェンはR体S体の両鏡像体間で薬理活性が異なり、作り分けることが重要である。抗がん作用を有する(R)-フルルビプロフェンは野生型 AMDase により、また、抗炎症作用を有する(S)-フルルビプロフェンは変異型酵素により、それぞれ高いエナンチオ選択性で合成する方法を開発することができた。脱炭酸後の生成物(フルルビプロフェン)が AMDase に対して競争阻害剤として働くことが判明し、種々検討し基質濃度を減少させることで、その阻害を解消することができた。他の非ステロイド系抗炎症薬(NSAIDs)であるイブプロフェンやナプロキセンなども、AMDase の生成物であるアリアルプロピオン酸に分類されるので、同じような方法論にて両鏡像体を効率的に合成することができると期待できる。



## 1-8 参考文献

- 1) Miyamoto, K.; Ohta, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 4077-4078
- 2) Miyamoto, K.; Ohta, H., *Biocatalysis*, **1991**, *5*, 49-60
- 3) Miyamoto, K.; Ohta, H., *Eur. J. Biochem.*, **1992**, *210*, 475-481
- 4) Miyamoto, K.; Ohta, H., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1992**, *38*, 234-238
- 5) Kawasaki, T.; Watanabe, M.; Ohta, H., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1995**, *68*, 2017-2020
- 6) Kawasaki, T.; Horimai, E.; Ohta, H., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1996**, *69*, 3591-3594
- 7) Miyazaki, M.; Kakidani, H.; Hanzawa, S.; Ohta, H., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1997**, *70*, 2765-2769
- 8) Matoishi, M.; Ueda, M.; Miyamoto, K.; Ohta H., *J. Mol. Catal. B:Enzymatic*, **2004**, *27*, 161-168
- 9) Wechter, W. J., Leipold, D. D., Murray, Jr., E. D., Quiggle, D., McCracken, J. D., Barrios, R. S., and Greenberg, N. M., *Cancer Res.*, **2000**, *60*, 2203-2208.
- 10) Wechter, W. J., Leipold, D. D., Quiggle D. D., McCracken, J. D., Murray, Jr., E. D. and Loughman, B. E., *Inflammopharmacology*, **2000**, *8*, 189-206.
- 11) Wechter, W. J., Murray, Jr., E. D., Kantoci, D., Quiggle D. D., Leipold, D. D., Gibson, K. M. and McCracken, J. D., *Life Sciences*, **2000**, *66*, 745-753.
- 12) Keegan P, Loughman B.E., *Urology*, **2001**, *57*, 216-219.
- 13) Myers C, Koki A, Pamuckcu R, Wechter W, Padley RJ., *Urology*, **2001**, *57*, 73-6.
- 14) Wechter, W. J., Kantoci, D., Murray, Jr., E. D., Quiggle D. D., Leipold, D. D., Gibson, K. M. and McCracken, J. D., *Cancer Res.*, **1997**, *57*, 4316-4324.
- 15) McCracken, J. D., Liu, Y., Chase, R. L., Kantoci, D., Murray, Jr., E. D., Quiggle, D. D., Mineyama, Y., and Wechter, W.J., *J. Clin. Pharm.*, **1996**, *36*, 540-545.
- 16) Landoni, M. F.; Soraci, A., *Curr. Drug Metab.*, **2001**, *2*, 37-51
- 17) Green, G. A., *Clin Cornerstone.*, **2001**, *3*, 50-60
- 18) Caldwell, J.; Hutt, A.J.; Fournel-Gigleux, S., *Biochem Pharmacol.*, **1988**, *37*, 105-114
- 19) Mayer, J. M., *Acta Pharm Nord.*, **1990**, *2*, 197-216
- 20) Igarza, L.; Soraci, A.; Auza, N.; Zeballos, H., *Vet. Res. Commun.*, **2006**, *30*, 513-522
- 21) Tegeder, I.; Niederberger, E.; Israr, E.; Guhring, H.; Brune, K.; Euchenhofer, C.; Grosch, S.; Geisslinger, G., *FASEB J.*, **2001**, *15*, 595-597
- 22) Bhandarkar, S. J.; Neau, S. H., *Elec. J. Biotech.*, **2000**, *3*, 195-201
- 23) Takahashi, K.; Takeda, T., *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, JP 2000-143580 (*Chem. Abstr.*,

**2000**, *132*, 334283)

- 24) Huddleston, J. G.; Visser, A. E.; Reichert, W. M.; Willauer, H. D.; Broker, G. A.; Rogers, R. D., *Green Chem.*, **2001**, *3*, 156-164
- 25) Nakamura, K.; Fujii, M.; Ida, Y., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2000**, 3205-3211





# 本論

## 第二章

### AMDase の立体選択性の逆転

## 2-1 AMDase と部位特異的変異導入

AMDase の遺伝子はクローニングが成され、核酸塩基配列およびアミノ酸配列が解明されている<sup>1-4)</sup>。ヨード酢酸、*p*-クロロ安息香酸第二水銀などの SH 試薬や塩化水銀によって本酵素は強力に阻害されること、またセリン試薬、カルボニル試薬、金属キレート剤の影響を受けないことから、本酵素の活性部位には遊離のシステイン残基が関与していること、補因子として金属イオンを必要としないことが判明している。宮崎らは、触媒活性部位に存在するシステイン残基を特定することを目的とし、AMDase に含まれる 4 つのシステイン残基(Cys101, Cys148, Cys171, Cys188)のうち、いずれか一つをセリンに置換した 4 種類の変異体を、部位特異的変異導入技術を用いて作成した。各変異型酵素を精製し、速度論的パラメータおよび比活性を測定し、188 番目のシステインをセリンへと変換した C188S 変異型酵素においてのみ大きく活性が低下することを明らかにした。この事実から 188 番目のシステインが反応の中心となる活性中心を担っているアミノ酸残基であると決定した(Table 2-1)<sup>5)</sup>。

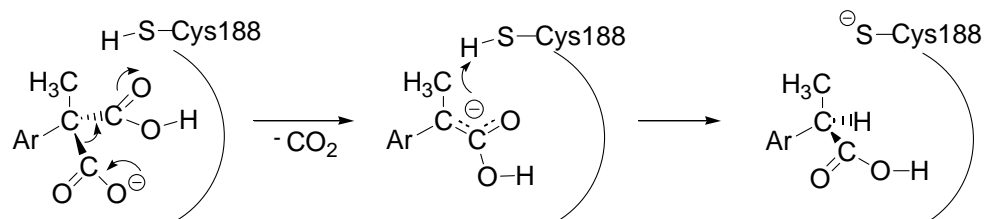
Table 2-1 野生型および変異型 AMDase の速度論的パラメータ

Enzyme	Activity (U / mg)	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat} / K_m$
Wild type	410	14.4	301	21
C101S	548	4.3	248	58
C148S	167	11.5	100	8.7
C171S	371	3.5	182	53
C188S	0.12	23.7	0.11	0.046

続いて、川崎らは 188 番目のシステインの SH 基がどのように反応に関わっているか、AMDase の反応機構に関する検討を行った。SH 基の役割は、一般的な脱炭酸酵素の CoA のチオエステル結合のように、SH 基が働きカルボン酸部分と SH が結合して活性化、脱炭酸を誘発していると考えた。しかし、その後の研究から川崎らが提唱していた反応機構ではないことが判明し、別の反応機構が提唱されている<sup>6-8)</sup>。

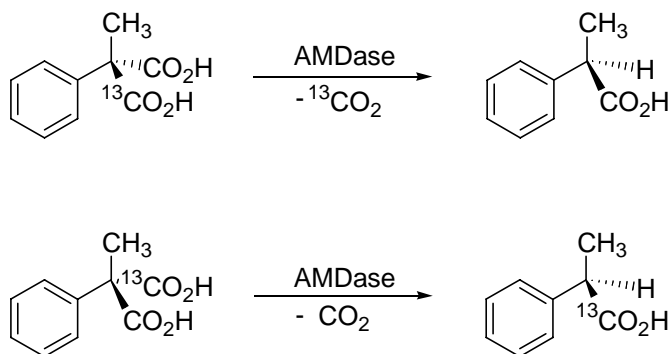
的石らは本酵素の反応機構に関する研究を行い、安定同位体、阻害剤、活性部位変異酵素を用いた検討により、活性中心である 188Cys の触媒機能を明らかにした。

この 188Cys - SH プロトンが、それまで考えられていたチオエステルを形成しているのではなく、エノラート中間体に対し、エナンチオ面選択的なプロトン供与を行っているのではないかと結論付けた(Scheme 2-1)<sup>9)</sup>。



Scheme 2-1 Cys188 のプロトン供与による AMDase の推定反応機構

また、安定同位体である  $^{13}\text{C}$  導入した化合物を基質に用いた研究から、本酵素の触媒する反応は、エナンチオ面選択的な脱炭酸反応であり、二酸化炭素として脱離するカルキシル基が特定された。しかも、脱炭酸反応は立体反転で進行し、得られてくる R 体の生成物のカルボキシル基は、元のマロン酸誘導体では反対側の位置に存在していたカルボキシル基であることが判明した(Scheme 2-2)<sup>10)</sup>。



Scheme 2-2 AMDase におけるカルボキシル基の立体認識

近年、インターネット、データベースや情報工学の技術が向上したことから、タンパク質の構造の推定や相同性の検索などを行うことが容易に、また、有効な手段として利用できるようになってきた。タンパク質は一次構造のアミノ酸配列として登録されているが、そのパターンはタンパク質の数だけ数多く存在している。しかし、3次元構造となると、実際にとりうる立体的な構造は 1,000 種程度と予測されているため<sup>11)</sup>、一次構造のアミノ酸配列が似ているタンパク質同士では、その立体構造の基本骨格は同じような形を取ることが予想される。酵素の立体構造と酵素が触媒する反応や活性などの諸性質は密接に関連していると考えられているため、相同性が高いタンパク質同士は同じ反応を触媒することができると考えられている。

このような高い相同性を有する酵素同士はファミリー(family)と呼ばれており、所属する酵素群を比較することで立体構造や反応機構の推定がなされている<sup>12)</sup>。一方、相同性がそれほど高くない酵素群でも、反応の中間体や遷移状態の形状や安定化、反応機構が同じようなものが存在しており、スーパーファミリー(superfamily)と呼ばれている<sup>13)</sup>。相同性を検索することで、反応機構が未知の AMDase が他の酵素とファミリーを形成しているのか、反応機構を解明することの参考になるのではないかと考え、様々な形で公開されているデータベースを利用して、実際に相同性の検索を行った。するとその結果、以下に示すようなグルタミン酸ラセマーゼ<sup>14)</sup>、アスパラギン酸ラセマーゼ<sup>15)</sup>、ヒダントインラセマーゼ<sup>16)</sup>などのラセマーゼやマレイン酸イソメラーゼ<sup>17)</sup>が、個々の相同性は30%程度と低いながらも相同性を有することが判明した(Figure 2-1, 2-2)。

Glu racemase	-MQNDPI~~IKALVIA <b>C</b> NTATAAA~~IDTLVMG <b>C</b> THFPLLRS~~.
Asp racemase	MENFFSI~~ADFIIMP <b>C</b> NTAHFFA~~CEKVILG <b>C</b> TELSLMNE~~.
Hydantoin racemase	MKIKVIN~~VDAFVIA <b>C</b> WGDPGLH~~AEAILLG <b>C</b> AGMAEFAD~~.
Maleate isomerase	-----MK~~MSVMAYA <b>C</b> LVAIMAQ~~AVILSA- <b>C</b> VQMPSLPA~~.
AMDase	--MQQAS~~AAV <b>S</b> LM <b>G</b> TSLSFYR~~SDGILL <b>S</b> CGLLTLDA~~.

74 188

グルタミン酸ラセマーゼ: *Lactobacillus ferment*由来, アスパラギン酸ラセマーゼ: *Streptococcus thermophils*由来, ヒダントインラセマーゼ: *Pseudomonas* sp. Strein NS671由来, マレイン酸イソメラーゼ: *Alcaligenes faecalis*由来, AMDase: *Alcaligenes bronchisepticus*由来

Figure 2-1 AMDase とラセマーゼ・イソメラーゼとの相同性

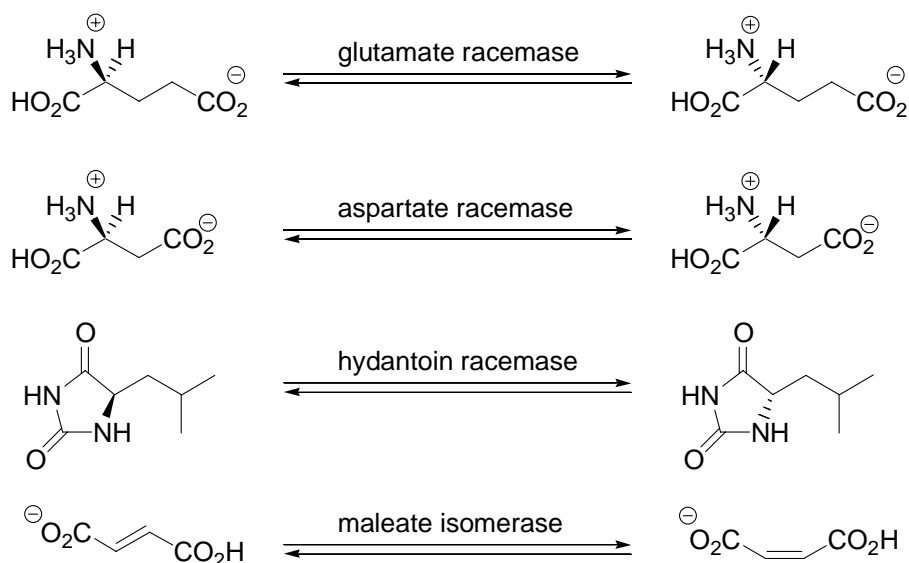
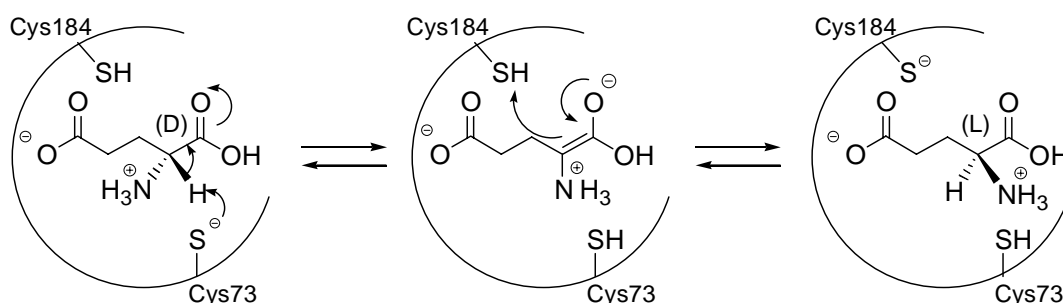


Figure 2-2 各種ラセマーゼ・イソメラーゼの反応

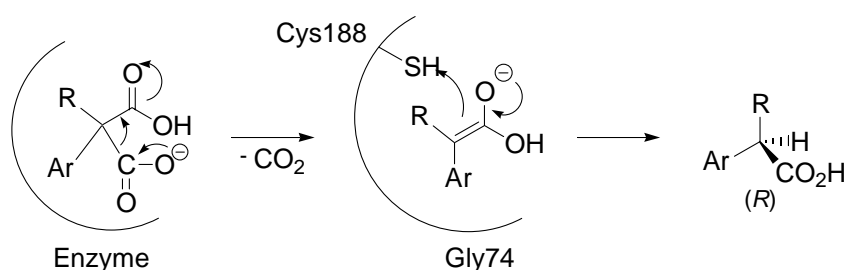
相同性を有する AMDase を含めたこれらの酵素は、補酵素や金属を反応に必要と

しないこと、また、活性中心のアミノ酸残基がシステインと同じことから、反応機構にも共通点を持っている可能性が示唆される。触媒する反応はまったく異なるものだが、反応が起こっている中心点に着目してみると、どれもカルボンキシル基の位のプロトンの立体位置が変化していることから、AMDase も同じ様な中間体を經由しているのではないかと推定できる。これらの酵素はグルタミン酸・アスパラギン酸ラセマーゼファミリーとして分類されていることから、AMDase もこのファミリーに属していると考えられる<sup>18)</sup>。実際にデータベースを検索してみると、AMDase がこのファミリーに属していると表示するものも存在する。AMDase と相同性を有するこれらの酵素のうち、グルタミン酸ラセマーゼについては、すでに X 線結晶構造解析がなされており、Tanner らによって詳細な反応機構が次の報告されている<sup>19-21)</sup>。活性中心に存在するアミノ酸残基である二つのシステインのうち、184 番目のシステイン Cys184 が L 体、73 番目のシステイン Cys73 が D 体のグルタミン酸の位のプロトンをそれぞれ選択的に引き抜き、残りの他方のシステインが反対側からプロトン供与を行うというものである。この反応機構は 2 つの触媒残基が、お互いに役目を入れ替えながら関与していくことから、二塩基機構と呼ばれている (Scheme 2-3)。



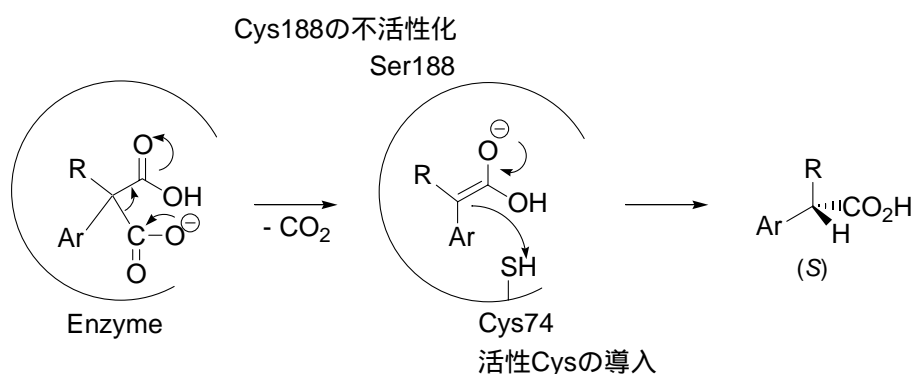
Scheme 2-3 グルタミン酸ラセマーゼの反応機構

ここで、グルタミン酸ラセマーゼと相同性を有していることから、グルタミン酸ラセマーゼを基にして AMDase の反応機構を考えてみることにした。グルタミン酸ラセマーゼの活性中心の二つのシステインのうち、AMDase では対応するアミノ酸残基の一方がグリシンである為、プロトン源となるアミノ酸残基は一方の面にしか存在しないことになる。そのため、AMDase では酵素内で脱炭酸され生成した中間体のエノラートに対して、一方の面に存在するシステイン残基のみからプロトン供与が面選択的に進行し、生成物が光学活性体になると推定することができる (Scheme 2-4)。



Scheme 2-4 AMDase の推定反応機構

このように相同性を有する酵素の反応機構から、AMDase の反応機構を推定しモデルを提唱することができた。居島らはこの推定されている二塩基機構を基に、AMDase に変異を導入し、酵素機能を改変することができないだろうか考えた。居島らは、活性中心の 188 番目のシステイン残基をプロトン供与能の低いセリンへと改変した C188S 変異型 AMDase が、その選択性は弱いながらも野生型とは逆の立体選択性を示すことから活性中心の Cys188 の反対側からもプロトン供与が行われているのではないかと考えた。新たにプロトン供与製のシステインを反対側に導入し、より効率的にプロトン供与が行われ、AMDase の立体選択性を逆転させることはできないだろうかと期待した。アミノ酸配列の相同性から、74 番目付近のアミノ酸残基を変異を導入する候補として設定した (Scheme 2-5)<sup>22)</sup>。



Scheme 2-5 変異導入によりエナンチオ選択性の逆転

また、近年のゲノム・タンパク質データベースの充実およびコンピューターの発達により、ある程度の相同性を有するタンパク質の既に明らかになっている立体構造を参考にして、未知タンパク質の立体構造を推定することが可能となっている。そこで、*Lactobacillus fermenti* 由来のグルタミン酸ラセマーゼの立体構造とアミノ酸の一次配列を基に、AMDase の立体構造の推定を行った (Figure 2-3)。

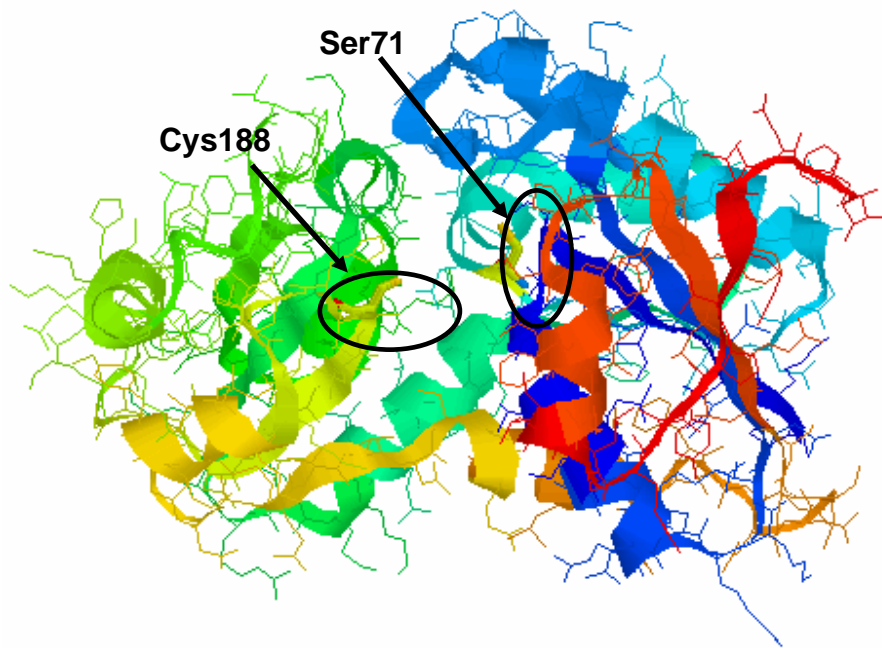


Figure 2-3 グルタミン酸ラセマーゼをもとにした AMDase の推定立体構造

一次構造のアミノ酸配列では 74 番目のグリシンが対応するグルタミン酸ラセマーゼの 73 番目のシステインと一致する結果であったが、立体構造の推定では、71 番目のセリンが 74 番目のグリシンとともに、活性部位である 188 番目のシステインの反対側に存在していることが示唆された。タンパク質の二次構造のヘリックスは約 3.6 アミノ酸残基でその螺旋が一周することが知られている。71 番目のグリシンと 74 番目のシステインはヘリックス上に存在していることから、活性部位中の活性中心の 188 番目のシステインの反対側に同じような向きにて存在しているのではないかと推定できる。そこで 74 番目のほかに 71 番目のセリンをシステインへと変換する候補として設定した。さらに 71,74 番目のアミノ酸残基の周辺のアミノ酸残基も活性中心の反対側に存在し、反対側から効率よくプロトン供与を行う可能性があるため、71,74 番目のアミノ酸残基を中心とした、68 番目のアラニン、69 番目のバリン、70 番目のバリン、72 番目のロイシン、73 番目のメチオニン、75 番目のトレオニン、76 番目のセリン、77 番目のロイシンをそれぞれシステインへと変換した二重変異型 AMDase 8 種類も作成し、68 番目から 77 番目のアミノ酸残基を変換した二重変異型 AMDase 計 10 種類の性質を調べることにした。以下、前任者の居島と分担して行った結果の詳細を報告する。



## 2-2 二重変異型酵素の作成

AMDase の遺伝子は宮本らによってクローニングがなされ、大腸菌を用いた大量発現が可能となっている<sup>4)</sup>。AMDase の遺伝子をコードした核酸塩基配列は、上流下流合計約 500 bp を含んだ 1,200 bp がベクター-pUC19 の制限酵素サイト *Hind* III と *Pst* I 間に組み込まれ、発現プラスミド pAMD101 が構築されている。また 188 番目のシステインをセリンへ改変した、C188S 変異型 AMDase はすでに宮崎らによって作成され<sup>7)</sup>、プラスミド pAMD101-C188S はすでに構築されているのでこのプラスミドを鋳型として用いた。部位特異的な変異の導入は、変異を含む合成プライマーを用いた PCR 法によった。以下に今回用いた合成プライマーと、変異を導入する pAMD101-C188S 中の AMDase サイトの核酸塩基配列を示した(Figure 2-4)。

## AMDase Site of pAMD101-C188S

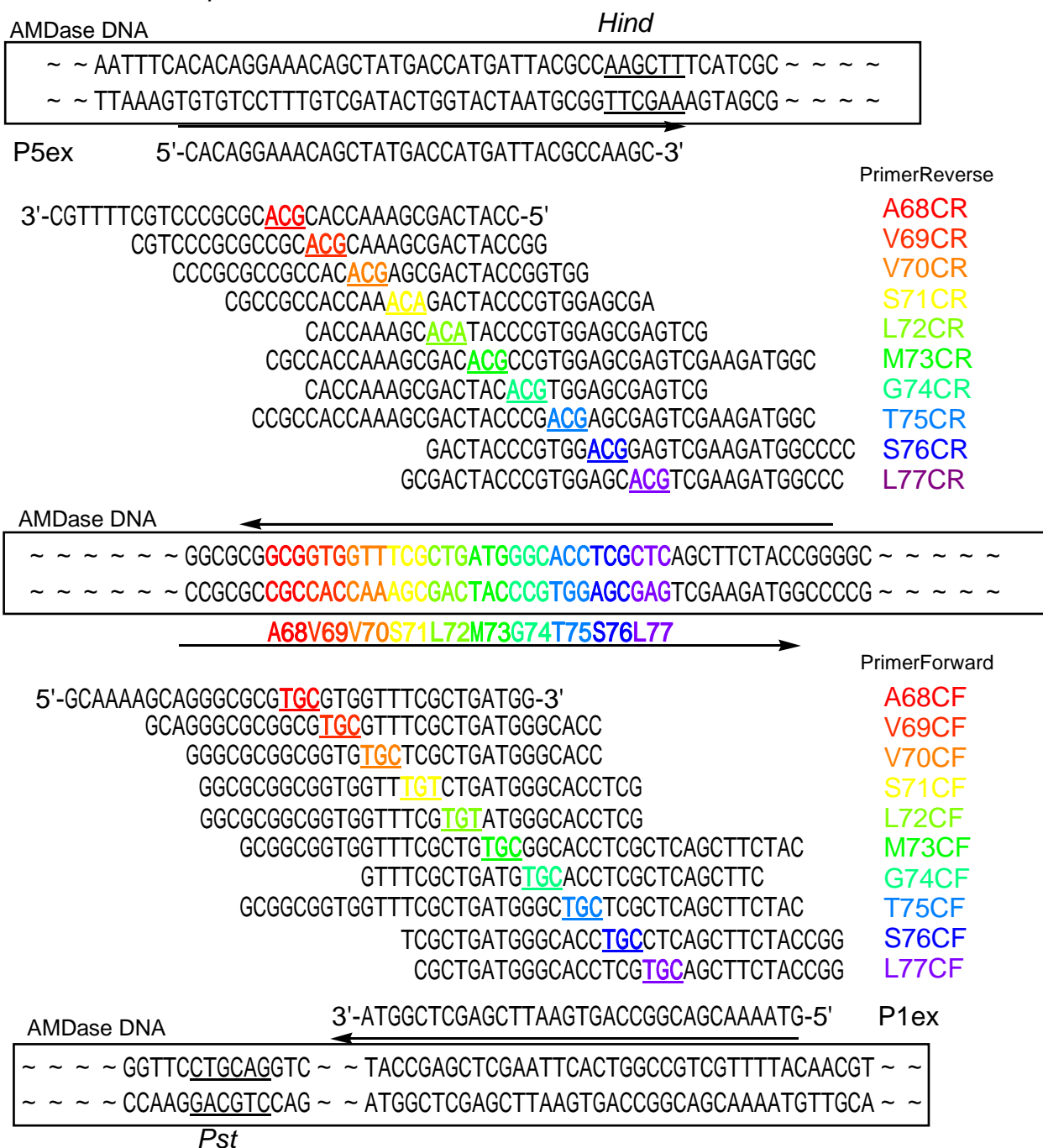


Figure 2-4 AMDase の塩基配列と変異導入用プライマー

ここで下線部は制限酵素サイトを、目的とする変異導入部分は色付き太字でそれぞれ示した。それぞれ 68 番目のアラニンをシステインへと変換する変異部(赤)を含んだ Reverse 側のプライマーA68CR と Forward 側のプライマーA68CF、69 番目のバリン(赤橙)、70 番目のバリン(橙)、71 番目のセリン(黄)、72 番目のロイシン(黄緑)、73 番目のメチオニン(緑)、74 番目のグリシン(青緑)、75 番目のスレオニン(青)、76 番目のセリン(深青)、77 番目のロイシンをシステイン(紫)へと変換する各プライマ

一を色付きで表した。

具体的な変異導入は以下のような方法を用いた(Figure 2-5)。

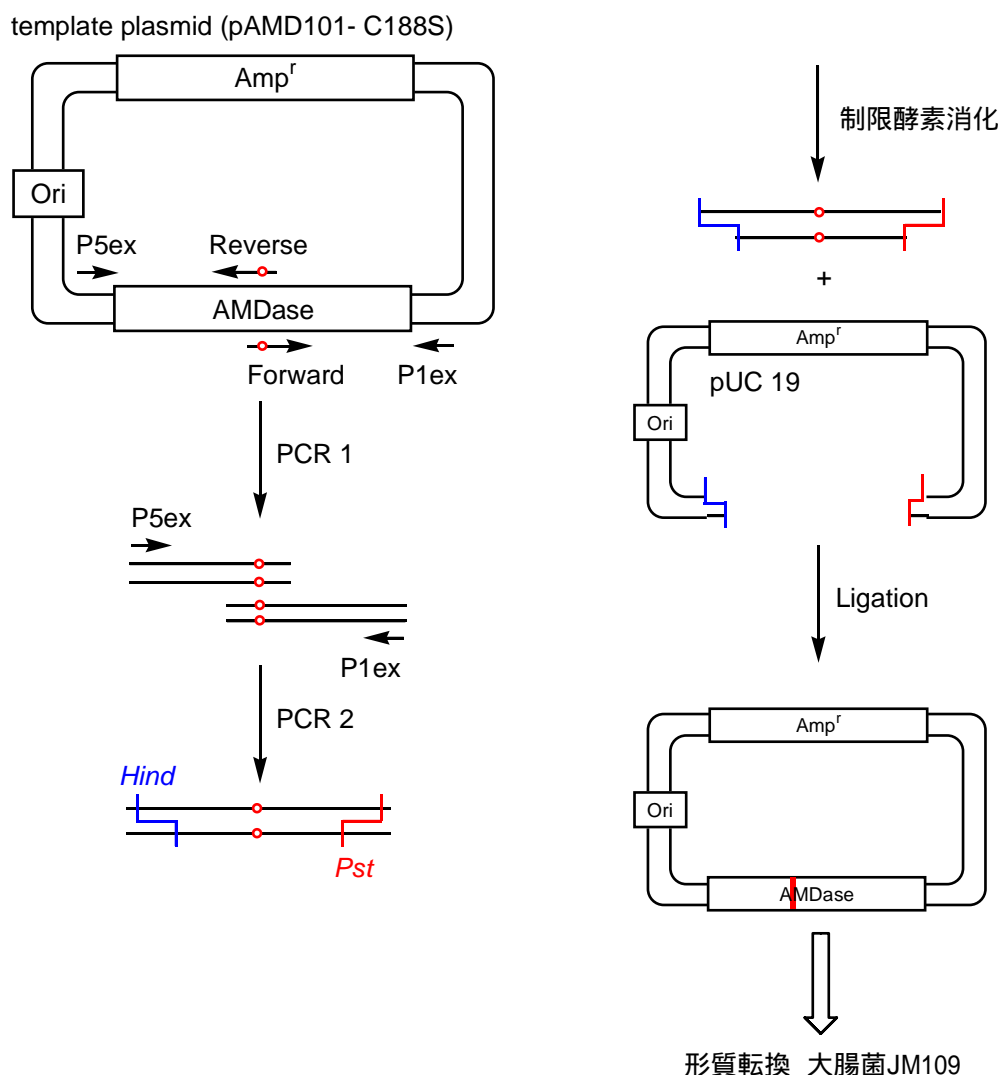


Figure 2-5 PCR による部位特異的変異導入

宮本・宮崎らによって作成されたプラスミド pAMD101-C188S をテンプレートプラスミドとして用いた。プラスミド中のマルチクローニングサイトの上流部分・下流部分と一致する合成プライマー-P5ex 及び P1ex と、目的の変異を含んだ合成プライマー-A68C ~ V77C 各 Forward 及び A68C ~ V77C 各 Reverse を用いて DNA 断片の増幅を行った。それぞれ P5ex と Reverse 側プライマー、P1ex と Forward 側プライマーの組み合わせで 1 回目の PCR を行い、目的の変異を含んだ 2 つの DNA 断片(約 400 bp と約 900 bp)を増幅した。これら 2 つの増幅した DNA 断片を 2 回目の PCR の鋳型として、断片の両端である P5ex 及び P1ex の両プライマーを用いて再度 PCR を行い、目的の変異を含んだ完全長の AMDase 断片(約 1300 bp)を増幅した。この断

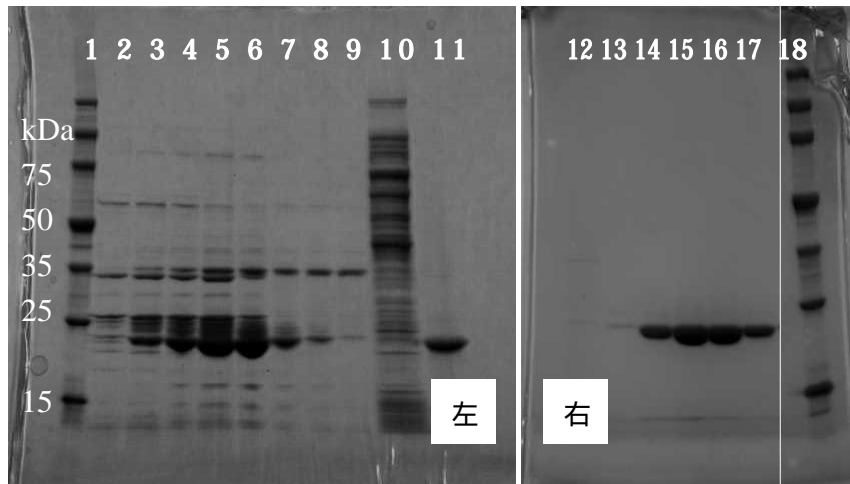
片はその両端に *Hind* (AAGCTT) と *Pst* (CTGCAG) の2つの制限酵素サイトを有するので得られた断片をそれらの制限酵素によって切断した。また、あらかじめプラスミドベクター pUC19 を同じ制限酵素 *Hind* と *Pst* によって切断しておいた。これら DNA 断片とプラスミドを混合し、Ligation を行い、pAMD101 の各二重変異体プラスミド(A68C/C188S、L69C/C188S、L70C/C188S、S71C/C188S、L72C/C188S、M73C/C188S、G74C/C188S、T75C/C188S、S76C/C188S、L77C/C188S)を得た。このように作成したこれらの各プラスミドを用いて大腸菌 JM109 を形質転換した。各プラスミドを単離後、DNA シーケンサーにて核酸塩基配列を分析することで、目的の変異が導入されていることを確認した。

次に目的の変異が導入された大腸菌を培養し、各二重変異型酵素をそれぞれ大量発現させ、酵素の精製を行った。

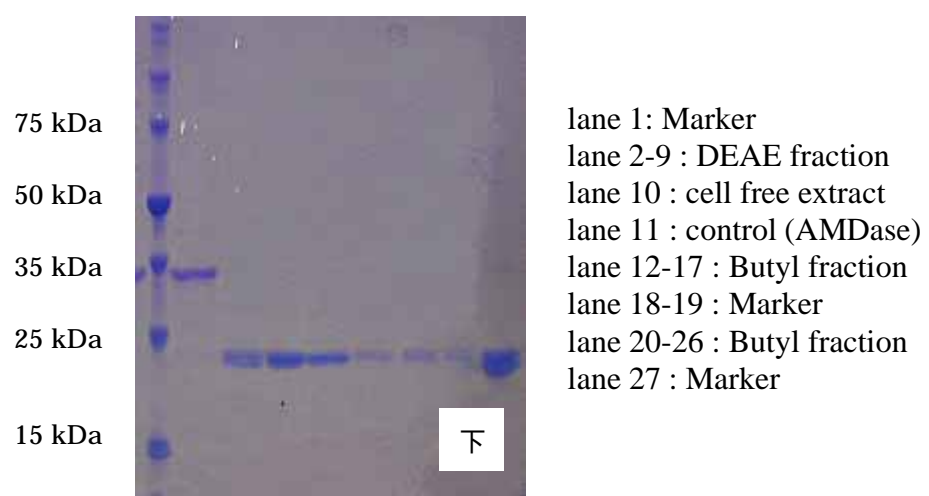
### 2-3 各二重変異型 AMDase の酵素精製

大腸菌にて大量発現させた各変異型酵素は、それぞれこれまでに報告されている野生型酵素と同様の方法にて精製した<sup>3)</sup>。

1.5 L の LB 培地を用いて組換え大腸菌を 30 °C、16 時間培養し、得られた増殖菌体を集菌、フレンチプレスまたは超音波破砕機により破砕した。得られた無細胞抽出液に対し、核酸成分を取り除くためプロタミン処理を行い、60%飽和の硫酸分画にて目的とするタンパク質を共沈殿させ、透析操作により余分な塩を取り除いた。その後、イオン交換樹脂の DEAE-Toyopearl、疎水性の Butyl-Toyopearl の 2 種類のカラムを用いるクロマトグラフィーにて目的タンパクを精製分離した。このようにして無細胞抽出液から計 4 段階にて簡便に目的タンパクを単一に精製することができた。カラムクロマトグラフィーの際の酵素活性画分の分取方法については、野生型 AMDase では、BTB にて着色されたフェニルマロン酸水溶液を用いて、フェニルマロン酸の脱炭酸により pH が変化し、青色に変色させる活性を有するフラクションを回収する。しかし、変異型 AMDase はその酵素活性が弱く、肉眼で色の変化の確認が難しいため、SDS-PAGE により野生型酵素と同程度の分子量を有するタンパク質を検出し、このものを変異型酵素タンパクと判断、回収した(Figure 2-6)。



19 20 21 22 23 24 25 26 27

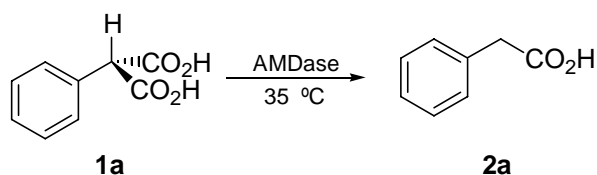


lane 1: Marker  
 lane 2-9 : DEAE fraction  
 lane 10 : cell free extract  
 lane 11 : control (AMDase)  
 lane 12-17 : Butyl fraction  
 lane 18-19 : Marker  
 lane 20-26 : Butyl fraction  
 lane 27 : Marker

Figure 2-6 DEAE-Toyopearl(左)と Butyl-Toyopearl(右)によるカラムクロマトグラフィー後の SDS-PAGE

## 2-4 各変異型 AMDase の酵素活性

精製した各種変異型酵素の発現量および酵素活性を測定した。酵素活性の測定には本酵素の標準基質であるフェニルマロン酸を用い、35 °C で 1 分間に 1  $\mu\text{mol}$  の基質を脱炭酸する酵素活性を 1 unit と定義した(Scheme 2-6)。HPLC を用いて、単位時間内に変換されるフェニルマロン酸の量を測定した。



Scheme 2-6 AMDase の酵素活性測定

その結果、変異の導入に伴い、酵素活性が低下していることが判明した(Table 2-2)。二重変異型酵素での酵素活性の最も高いものは S71C/G188S であったが、野生型の AMDase と比較すると数千分の一にまで低下してしまっていることが判明した。また、同様に G74C/C188S もその活性は低いながらも、脱炭酸活性を示した。こちらは S71C/C188S と比較しても約半分の活性しか示さず、さらに低いものであった。他の二重変異型酵素においては、まったく反応の進行は確認されず、変異の導入により脱炭酸活性は失われてしまったようである。一般的には、活性部位に変異が導入されることにより、酵素の立体構造の変化が起こり、野生型の酵素と異なった立体構造を示すと考えられる。また、居島らの研究から、188 番目のシステインをアラニンへと改変した C188A 変異型 AMDase では、精製途中で酵素自体が分解してしまう現象が確認されたため、活性を示さなかった二重変異体においてもタンパク質の分解が起こっているのではないかと考えた。しかし、精製後の SDS-PAGE の結果からもタンパク質の分解は観測されず、また、CD スペクトルによる解析の結果からも分解されたような形跡は見られず、どの二重変異型酵素も元の野生型の酵素と同じようなスペクトル結果を与えた。このことから、変異の導入によって酵素に対して致命的な立体構造の変化や、酵素タンパク質自体の分解といった影響は与えなかったものと考えた。各二重変異を導入しても、立体構造に大きな変化が見られないことから、活性の見られなかった各変異型酵素は、導入した変異の場所、種類によってその酵素活性が失われていると考えることができる。同様にして、71 番目および 74 番目に変異を導入した各二重変異体でも、CD スペクトルによる立体構造の変化が見られないにも関わらず、酵素活性を示すということは、71 番目と 74 番

目に変異を導入したことが効果的であったと考えることができる。

続いて、二重変異型酵素を作成する狙いとして、AMDase の立体選択性の逆転を目的としているため、基質を不斉炭素を持たないフェニルマロン酸ではなく、脱炭酸後に立体選択性を示すような基質を用いて、二重変異型酵素の立体選択性を調べてみることにした。

Table 2-2 野生型および各変異型酵素の収量と活性

entry	enzyme	conc. (mg/ml)	specific activity (Unit/mg)
1	wild type	1.74	467
2	A68C/C188S	1.05	-
3	V69C/C188S	1.11	-
4	V70C/C188S	1.08	-
5	S71C/C188S	3.33	0.07
6	L72C/C188S	1.73	-
7	M73C/C188S	0.80	-
8	G74C/C188S	1.04	0.05
9	T75C/C188S	0.78	-
10	S76C/C188S	1.57	-
11	L77C/C188S	1.23	- -



## 2-5 変異型 AMDase の立体選択性の検証

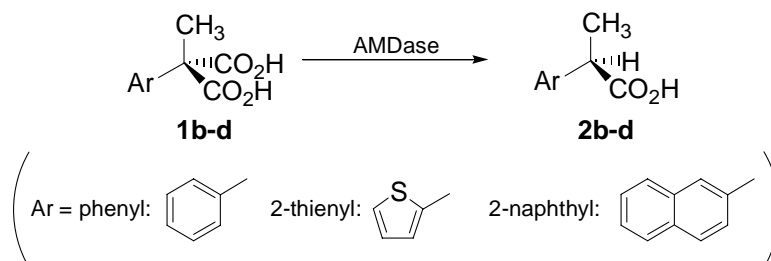
精製した各変異型酵素 AMDase を用いて、本変異酵素による不斉脱炭酸反応の立体選択性について検討した。基質としてはまず、活性測定に利用したフェニルマロン酸に類似した構造を持ち、本酵素の基質として最も一般的な構造を有し、簡便に調製可能な、また立体選択性を測定することができる $\alpha$ -メチル- $\alpha$ -フェニルマロン酸を用いた(Table 2-3)。

Table 2-3 各種変異型 AMDase による脱炭酸反応

entry	mutant	Yield (%)	selectivity, ee%
1	wild type	99	( <i>R</i> ) 99
2	A68C/C188S	-	-
3	V69C/C188S	-	-
4	V70C/C188S	-	-
5	S71C/C188S	0	-
6	L72C/C188S	-	-
7	M73C/C188S	-	-
8	G74C/C188S	0	-
9	T75C/C188S	-	-
10	S76C/C188S	-	-
11	L77C/C188S	-	-

野生型 AMDase を用いた場合には、(*R*)-2-フェニルプロピオン酸(*R*-2b)が不斉脱炭酸により光学純度 99% ee にて得られことが知られている。各二重変異型酵素の立体選択性を測定してみたが、フェニルマロン酸を基質に用いた際には弱いながらも活性を示した S71C/C188S、G74C/C188S 両二重変異型酵素の場合でも、脱炭酸生成物を得ることはできなかった。他の二重変異型酵素も基質が変われば活性を示す可能性があると考え、脱炭酸反応を試みてみたが、やはりフェニルマロン酸を基質に用いた時と同様に、活性を示す二重変異型酵素は存在しなかった。そこで、これまでに宮本らによって、野生型 AMDase において基質特異性とその相対活性が調べられているのを利用して、 $\alpha$ -メチル- $\alpha$ -フェニルマロン酸 (1b)よりも反応性の良い基質として、 $\alpha$ -メチル- $\alpha$ -(2-チエニル)マロン酸 (1c)および $\alpha$ -メチル- $\alpha$ -(2-ナフチル)

マロン酸 (**1d**)を立体選択性を測定する基質として利用することとした。これら2つの基質は、フェニルメチルマロン酸よりも数十倍高い反応性を示すことが知られている (Scheme 2-7、Table 2-4)。



Scheme 2-7 野生型 AMDase の基質特異性

Table 2-4 野生型 AMDase の基質特異性

Substrate		$k_{\text{cat}}$	$K_{\text{m}}$	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$	Relative activity
Ar	R	( $\text{s}^{-1}$ )	(mM)	( $\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ )	(%)
Ph	H	353	13.9	25.4	100
2-thienyl	H	5321	87.4	60.9	240
2-naphthyl	H	1728	19.4	89.1	350
Ph	Me	29.8	25.5	1.16	4.6
2-thienyl	Me	200	12.5	16.0	63
2-naphthyl	Me	30.9	0.43	71.9	283

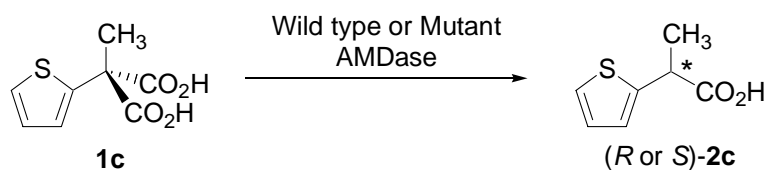
野生型 AMDase、および作成した各二重変異型 AMDase について、再度、立体選択性の検討を行った (Table 2-5)。

まず  $\alpha$ -メチル- $\alpha$ -(2-チエニル)マロン酸 (**1c**)を基質とした場合、これまでの研究から、野生型酵素では定量的に 99% ee の (*S*)-体の生成物が得られることが明らかとなっている。(AMDase は一般的に *R* 体の生成物を与える。本基質では、化合物の命名法における官能基の優先順位のルールから *S* 体であるが、得られる化合物の実際の立体配値は同じである)。68 番目から 77 番目のアミノ酸残基をシステインへと変換した 10 種類の二重変異型 AMDase のうち S71C/C188S および G74C/C188S 両二重変異型酵素以外の 8 種類の変異型酵素では、基質をより反応性の高い  $\alpha$ -メチル- $\alpha$ -(2-チエニル)マロン酸 (**1c**)へ変更しても脱炭酸生成物を得ることはできなかった。一方、S71C/C188S 二重変異型 AMDase を用いた場合、収率 97%、光学純度 58% ee にて、野生型とは逆の立体の *R* 体を得ることができた。また、G74C/C188S AMDase を用いた場合、収率 60%、光学純度 84% ee にて、*R* 体の生成物が得られた。

同様に $\alpha$ -メチル- $\alpha$ -(2-ナフチル)マロン酸 (**1d**)を基質として用いた場合でも、野生型 AMDase ではほぼ定量的(96%)に高光学純度(99%ee)の *R* 体得られること、また、C188S 変異型 AMDase においては、低収率(6%)ながらも光学純度 70%ee で野生型とは逆の立体の *S* 体得られることが明らかとなっている。今回作成した G74C/C188S 二重変異型 AMDase を用いると、98%(収率 17%)という高い鏡像体過剰率で、野生型とは反対の立体配置(*S* 体)を有する生成物を与えること結果となった。同様に S71C/C188S 二重変異型 AMDase においても、収率 22%、光学純度 80%ee となり、野生型とは逆の立体である *S* 体の生成物が得られることが判明した。

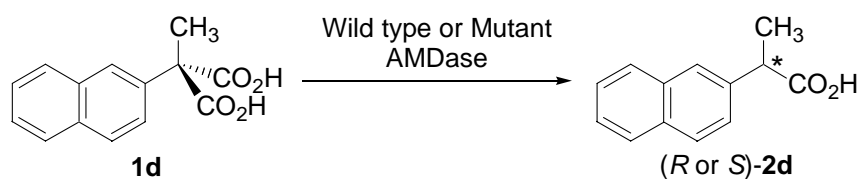
なお、基質であるマロン酸誘導体は、反応系中で酵素の存在とは関係なく非酵素的に脱炭酸反応が進行する可能性があることが知られている。しかし、本基質でも酵素なしのブランク反応を行って見たところ、非酵素的な脱炭酸反応による生成物は極く僅かであり、本反応の立体選択性などに影響がないことが確認できた。

Table 2-5-1 チエニルタイプの基質に対する各種 AMDase の収率と光学純度



Enzyme	Yield (%)	ee (%)	Configuration
Wild Type	99	99	<i>S</i>
C188S	17	50	<i>R</i>
A68C/C188S	0		
V69C/C188S	0		
V70C/C188S	0		
S71C/C188S	97	58	<i>R</i>
L72C/C188S	0		
M73C/C188S	0		
G74C/C188S	60	84	<i>R</i>
T75C/C188S	0		
S76C/C188S	0		
L77C/C188S	0		

Table 2-5-2 ナフチルタイプの基質に対する各種 AMDase の収率と光学純度



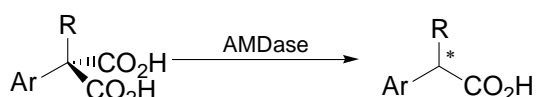
Enzyme	Yield (%)	ee (%)	Configuration
Wild Type	96	99	R
C188S	6	70	S
A68C/C188S	0		
V69C/C188S	0		
V70C/C188S	0		
S71C/C188S	22	80	S
L72C/C188S	0		
M73C/C188S	0		
G74C/C188S	17	98	S
T75C/C188S	0		
S76C/C188S	0		
L77C/C188S	0		

以上のように、活性中心である 188 番目のアミノ酸残基であるシステインをプロトン供与能の小さいセリンへと変換し、さらに反応部位の反対側に位置するであろう 71 番目のセリン、および 74 番目のグリシンの周辺をそれぞれプロトン供与を行えるようシステインへと変換した二重変異型酵素を作成した。これらの二重変異型酵素のうち 2 つの二重変異型酵素が、野生型 AMDase とは逆の立体選択性を示すことを見出すことができた。これらの結果から、71 番目および 74 番目のアミノ酸残基が、中間体のエノラートを挟んで 188 番目のシステインとちょうど反対側に存在するであろうという推定が正しかったと結論付けることができる。タンパク質のヘリックス上のアミノ酸残基は約 3.6 アミノ酸残基で一回転することから、71 番目と、3 つ目の 74 番目のアミノ酸残基はともにエノラート中間体の方向を向いているのではないかと推定できる。一方、他の 8 種類の二重変異型酵素は脱炭酸反応を示すことはなかった。他のアミノ酸残基では、ヘリックス上で他の方向を向いてしまっているために、プロトンを供与することができず、活性を示さないのではないかと推定できる。

立体選択性の反転した二重変異型 AMDase を得ることはできたが、その酵素活性は野生型酵素と比べて極めて低いものであった。そこで変異型酵素の酵素活性について、より詳細な知見を得るために、速度論的パラメータの測定を行うこととした。

## 2-6 変異型 AMDase の速度論的パラメータの測定

各二重変異型 AMDase の反応性に関して詳細な知見を得るために、これまで用いた各基質について Lineweaver-Burk プロットを用いて速度論的パラメータの測定を行い、野生型・変異型 AMDase の比較を行った(Scheme 2-8、Table 2-6)。



Scheme 2-8 各種 AMDase の速度論的パラメータの測定

Table 2-6 野生型・変異型 AMDase の速度論的パラメータ

Enzyme type	Substrate		Km (mM)	Vmax (unit/mg)	k <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> / Km (s <sup>-1</sup> /mM)	Relative activity (%)
	Ar	R					
wild	Ph	H	13.9	882.7	353	25.4	100
	Ph	Me	25.5	74.4	29.8	1.17	4.60
	2-thienyl	Me	12.5	499.8	200	16.0	63
	2-naphthyl	Me	0.43	53.7	30.9	71.8	283
S71C,C188S	2-thienyl	Me	1.01	0.25	0.08	0.07	0.29
	2-naphthyl	Me	0.51	0.17	0.05	0.10	0.39
G74C,C188S	2-thienyl	Me	5.03	0.35	0.34	0.07	0.26
	2-naphthyl	Me	1.25	0.12	0.12	0.09	0.37

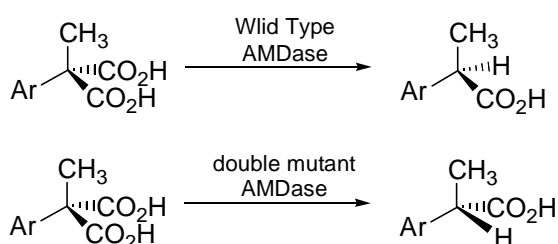
その結果、S71C/C188S、G74C/C188S 両二重変異型 AMDase について、いずれの基質においても野生型酵素と比較して反応活性が著しく低下していることが確認された。フェニルマロン酸の脱炭酸反応の比活性  $k_{cat}/K_m$  は  $25.4 \text{ (s}^{-1}\text{mM}^{-1}\text{)}$  でありこれを 100 とすると、野生型 AMDase は  $\alpha$ -メチル- $\alpha$ -(2-チエニル)マロン酸については、 $16.0 \text{ (s}^{-1}\text{mM}^{-1}\text{)}$  で約 6 割、 $\alpha$ -メチル- $\alpha$ -(2-ナフチル)マロン酸では、 $71.8 \text{ (s}^{-1}\text{mM}^{-1}\text{)}$  と 2.8 倍の活性を示すことが判明している。一方、S71C/C188S 二重変異型 AMDase の反応性は、チエニルタイプの基質では  $0.07 \text{ (s}^{-1}\text{mM}^{-1}\text{)}$  と野生型 AMDase の  $1/200$ 、ナフチルタイプの基質でも  $0.10 \text{ (s}^{-1}\text{mM}^{-1}\text{)}$  と  $1/700$  であった。同様に G74C/C188S 変異型酵素でも  $0.07 \text{ (s}^{-1}\text{mM}^{-1}\text{)}$ 、 $0.09 \text{ (s}^{-1}\text{mM}^{-1}\text{)}$  と野生型の数百分の一の比活性であり、2つの変異導入により大きく活性が低下していることが速度論的パラメータの値からも判明した。

速度論的パラメータの内容を詳しく見てみると、チエニルタイプの基質では、酵

素と基質の親和性を表す  $K_m$  の値の向上が見られるが、酵素の回転数  $k_{cat}$  は  $1 / 2500$  の大幅な低下が見て取れる。同様に、ナフチルタイプの基質でも、 $K_m$  の値はそれほど変化がないのに対して、 $k_{cat}$  の値が  $1 / 700$  と大きく低下している。これらの結果から、変異の導入により、酵素分子全体の形が酵素と基質が若干結合しやすくなったが、活性中心のプロトンと中間体の位との距離が離れてしまったためか、酵素自体の効率・基質を触媒することのできる能力が大幅に低下し、全体として比活性  $k_{cat}/K_m$  が低下していることが判明した。

## 2-7 まとめ

相同性を有する既知酵素とのアライメントや立体構造の比較や、反応機構の考察から AMDase の活性部位に部位特異的な変異を導入し、酵素の立体選択性の逆転を試みた。すでに詳細な反応機構や立体構造が明らかになっているグルタミン酸ラセマーゼを参考に、活性中心のアミノ酸残基でありエノラート中間体へのプロトン化を行っている 188 番目のシステインをプロトン供与能の小さいセリンへと変換し、基質を挟んで反対側に位置するであろう 68 から 77 番目のアミノ酸残基のうち一箇所に新たにシステインを導入した二重変異型 AMDase を作成した。作成した 10 種類の二重変異型酵素のうち、S71C/C188S および G74C/C188S 両二重変異型酵素が、立体選択性の逆転を示した一方で、他の二重変異型酵素は脱炭酸活性自体を示さないことが判明した。これら 2 つの二重変異型酵素は、野生型が与える鏡像体の逆の立体異性体を与えることができた。しかし、変異を導入したことでその酵素活性は大きく損なわれ、フェニルマロン酸を指標とすると野生型 AMDase の約一万分の一にまで低下していた。一方、71 と 74 番目のアミノ酸残基の距離は、ヘリックス上のアミノ酸残基一回転分であるので、活性をまったく示さなかった他の二重変異型酵素では、活性部位の反対側に位置するヘリックス上のアミノ酸残基の向きが問題となっている可能性がある。



Scheme 2-9 まとめ

## 2-8 参考文献

- 1) Miyamoto, K.; Ohta, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 4077-4078
- 2) Miyamoto, K.; Ohta, H., *Biocatalysis*, **1991**, *5*, 49-60
- 3) Miyamoto, K.; Ohta, H., *Eur. J. Biochem.*, **1992**, *210*, 475-481
- 4) Miyamoto, K.; Ohta, H., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1992**, *38*, 234-238
- 5) Miyazaki, M.; Kakidani, H.; Hanzawa, S.; Ohta, H., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1997**, *70*, 2765-2769
- 6) Kawasaki, T.; Watanabe, M.; Ohta, H., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1995**, *68*, 2017-2020
- 7) Kawasaki, T.; Horimai, E.; Ohta, H., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1996**, *69*, 3591-3594
- 8) Kawasaki, T.; Saito, K.; Ohta, H., *Chem. Lett.*, **1997**, *26*, 351-352
- 9) Matoishi, M.; Ueda, M.; Miyamoto, K.; Ohta H., *J. Mol. Catal. B:Enzymatic*, **2004**, *27*, 161-168
- 10) Miyamoto, K.; Tsuchiya, S.; Ohta, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 6256-6257
- 11) Chothia, C., *Nature*, **1992**, *357*, 543-544
- 12) Funeriu, D. P.; Eppinger, J.; Denizot, L.; Miyake M.; Miyake J., *Nature Biotechnol.*, **2005**, *23*, 622-627
- 13) Babbitt, P. C.; Gerlt, J. A., *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 30591-30594
- 14) Gallo, K. A.; Knowles, J. R., *Biochemistry* **1993**, *32*, 3981-3990
- 15) Yohda, M.; Okada, H.; Kumagai, H.; *Biochim. Biophys. Acta.* **1991**, *1089*, 234-240
- 16) Watabe, K.; Ishikawa, T.; Mukohara, Y.; Nakamura, H., *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 3461-3466
- 17) Hatakeyama, K.; Asai, Y.; Uchida, Y.; Kobayashi, M.; Terasawa, M.; Yukawa, H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *239*, 74-79
- 18) Pillai, B.; Cherney, M. M.; Diaper, C. M.; Sutherland, A.; Blanchard, J. S.; Vederas, J. C.; James, M. N.G., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2006**, *103*, 8668-8673
- 19) Gallo, K. A.; Tanner M. E.; Knowles, J. R., *Biochemistry* **1993**, *32*, 3991-3997
- 20) Glavas, S.; Tanner, M. E., *Biochemistry* **1999**, *38*, 4106-4113
- 21) Glavas, S.; Tanner, M. E., *Biochemistry* **2001**, *40*, 6199-6204
- 22) Ijima, Y.; Matoishi, K.; Terao, Y.; Doi, N.; Yanagawa, H.; Ohta, H., *Chem. Commun.* **2005**, *21*, 877-879





# 本論

## 第三章

### 二重変異型酵素に対する ランダム変異の導入

### 3-1 二重変異型酵素とランダム変異導入

第2章で述べたように、野生型の AMDase と逆の立体選択性を示す二種類の二重変異型 AMDase を作成することができた。しかし、両二重変異型酵素ともに、野生型と比較すると大きく酵素活性が低下してしまっている。フェニルマロン酸を基準物質とすると約一万分の一、チエニルやナフチルタイプの基質でも数百分の一と、主に酵素の回転数の減少が原因で触媒作用が低下していることが判明した。

そこで、二重変異型酵素の活性の向上を目指して、ランダム変異導入法による検討を行うこととした。

変異を導入するには、大きく分けて二つの方法がある。部位特異的な変異導入法と、ランダム変異導入法である。部位特異的な変異導入法は点変異導入法とも呼ばれ、近年発達してきたデータベースやモデリングソフト等を用いた相同性の検索や、立体構造のモデリングなどの技術を用いて、活性部位や基質との結合部位を特定し、特定の領域に特定のアミノ酸残基を導入する、変換する方法論である。ランダム変異導入法は、変異を導入する部位を特定せず網羅的に変異を導入することで、様々な変異置換体を得ることができる方法論である。前章では、相同性と立体構造・反応機構の比較から、前者の部位特異的な変異導入法を用いた酵素の機能改変について述べた。本章では、低下した酵素活性を取り戻すため変異導入を行った結果について述べるが、対象とするアミノ酸残基が特定できないため、網羅的に変異を導入できるランダム変異導入法を採用することとした。

ランダム変異導入には以下のようにいくつかの方法が知られている<sup>1-5)</sup>。

- ・ 化学試薬による変異導入
- ・ UV 照射による導入
- ・ PCR による導入(Mn 添加による error-prone PCR 法や Taq ポリメラーゼや市販されているポリメラーゼ Mutazyme を用いたミスマッチ核酸の取り込みによる突然変異導入)<sup>6)</sup>
- ・ Saturated mutagenesis
- ・ DNA シャッフリングによる遺伝子の組み換え<sup>7)</sup>
- ・ 市販されている大腸菌 *E.coli* XL1-Red を用いた変異導入<sup>8,9)</sup>

化学試薬による変異導入法は、亜硝酸やギ酸などを用いる方法が一般的に知られている。亜硝酸法は、DNA の塩基部分を化学的に脱アミノ化し、塩基配列を GC AT、AT GC に変換する方法である。UV 照射法は、DNA に UV を照射し、人為的

に損傷を与え変異を導入する方法である。これら 2 つの方法では、変異の導入される部位がプラスミドの全範囲に渡るため、目的の範囲のみに変異を入れることが難しいなど難点がある。PCR による変異導入では、ポリメラーゼによる増幅を行う際に Mn イオンを存在させることで複製にエラーを起こさせる error-prone PCR 法が有名である。また、Taq ポリメラーゼなど複製時に一定の割合で複製ミスを起こすものも知られている。Stratagene 社から販売されているポリメラーゼ Mutazyme はこの複製ミスを積極的に利用したランダム変異導入用のポリメラーゼである。他にも古典的なもので、ギャップ二本鎖法、Kunkel 法、Eskstein 法、Inouye 法などが知られている。DNA シャッフリング法は、自分自身の DNA または、種が似たもの同士の DNA を一旦切断し、混ぜ合わせた上で再びつなぎ合わせ、DNA のシャッフリングを行い変異を導入する方法である。大腸菌 XL1-Red を用いる方法は、DNA の複製の際に生ずるエラーを修復する遺伝子が欠損した特殊な大腸菌を用いたランダム変異導入法である。いずれの変異導入においても、作成した変異体のスクリーニングにより目的の活性を有するものを選別する必要があり、その方法や、処理能力によりランダム変異導入による機能改変の効率が決まってくる。本章では、ランダム変異導入と効率的なスクリーニングにより、酵素活性の向上した変異型酵素を取得し、立体選択性などの性質を野生型および二重変異型と比較した結果について報告する。

ランダム変異導入の対象としては、得られてくる生成物の光学純度が高い(チエンルで 80% ee、ナフチルで 96% ee)G74C/C188S 二重変異型 AMDase を用いることとした。

### 3-2 ランダム変異導入その1 (大腸菌 XL1-Red)

ランダム変異導入法として、第一に Stratagene 社より販売されている大腸菌 XL1-Red 株を用いることとした<sup>10)</sup>。XL1-Red 株は大腸菌内でプラスミドを複製する際にミスマッチを修復する遺伝子・酵素群を欠損した株(*mutS*, *mutD mutT*)であり、その変異導入効率は野生株と比較して約 5,000 倍、一回のサイクルで約 2,000 bp に一個の割合でプラスミドに変異が導入される。ランダム変異の導入方法は、目的とする遺伝子配列を含んだプラスミドを用いて XL1-Red を形質転換し、プレート上で成育させることで、大腸菌の育成途中で変異が導入されるというものである。

XL1-Red strain の遺伝子型: *endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac mutD5*  
*mutS mutT Tn10 (Tet<sup>r</sup>)*

実際のランダム変異導入は以下のように行った。

ランダム変異導入の元となるプラスミドは、立体選択性が野生型 AMDase の逆転しているが、活性が大きく低下してしまった G74C/C188S 二重変異型を用いた。二重変異が導入されたプラスミド pAMD-G74CC188S を用いて大腸菌 XL1-Red を形質転換し、抗生物質を含んだ LB プレート上で 37 °C、24 時間静置培養した。成育してきた大腸菌の各コロニーは、それぞれ異なる変異を含んだコロニーである。それぞれのコロニーをピックアップし一つの液体 LB 培地へ集約し、変異体のプールを作成した。または、LB プレート上に液体 LB 培地を流し込み、元のプレート上に成育してきた変異株を懸濁させ変異株プールとした。これらのプールを一晩培養し、プラスミド抽出することでランダム変異導入されたプラスミドを取得した。これらの操作を一サイクルとして、複数回繰り返すことで様々な頻度で変異が導入されたランダム変異体を取得し、使用することとした。また、改良法としてプレート上で大腸菌を成育させずに、直接液体培地へ植菌し一日培養後、新しい LB 液体培地へ植え継ぐことで変異株の作成をした。この操作を複数サイクル繰り返すことで、数世代混合変異体プールを作成した。大腸菌 XL1-Red に導入されたままのプラスミドでは、スクリーニング段階の途中でも変異が導入され続けてしまうので、各変異体プールからプラスミドを抽出し、変異が導入されにくいノーマルな大腸菌 JM109 を形質転換することでスクリーニングを行うこととした(Figure 3-1)。

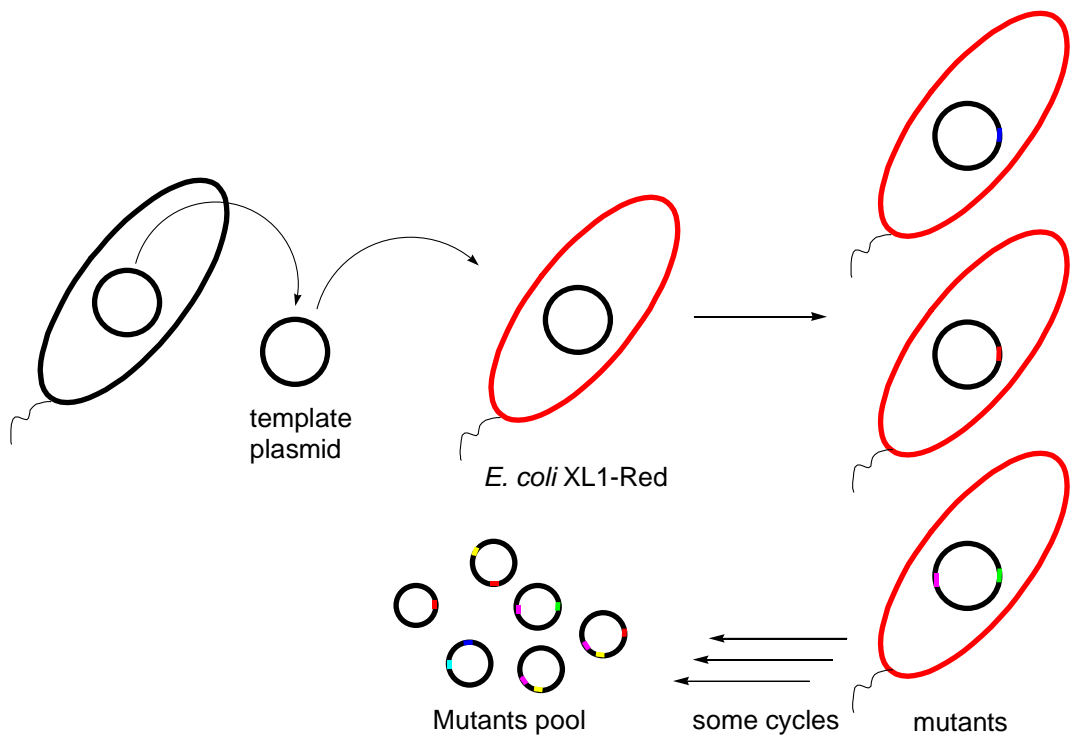


Figure 3-1 大腸菌 XL1-Red 株によるランダム変異導入

### 3-3 ランダム変異導入その2 (Mutazyme)

第二のランダム変異導入法として、Stratagene 社製の変異導入用ポリメラーゼ Mutazyme、および Taq ポリメラーゼを使用することとした。Taq ポリメラーゼは、PCR 条件の下で変異が導入されることが知られている。なお、一般的な PCR では、改良され変異が導入されにくくした Taq ポリメラーゼが使用されている。Taq ポリメラーゼは主に塩基配列 A・T をターゲットとして変異を導入するのに対して、Mutazyme は主に G・C をターゲットとするので、2つのポリメラーゼを組み合わせることで、様々な変異が導入された DNA が増幅できる。その変異導入効率は、一回の PCR で 1~16bp の割合で設定することができ、1、3、5、10bp の割合で変異が導入されるよう調節した。

PCR を行う際の鋳型プラスミドは G74C/C188S 二重変異型をテンプレートとして使用し、AMDase に対応する領域を増幅後、制限酵素にて切断、プラスミド pUC 19 に戻し、大腸菌 JM109 を形質転換することで、スクリーニングを行うこととした (Figure 3-2)。

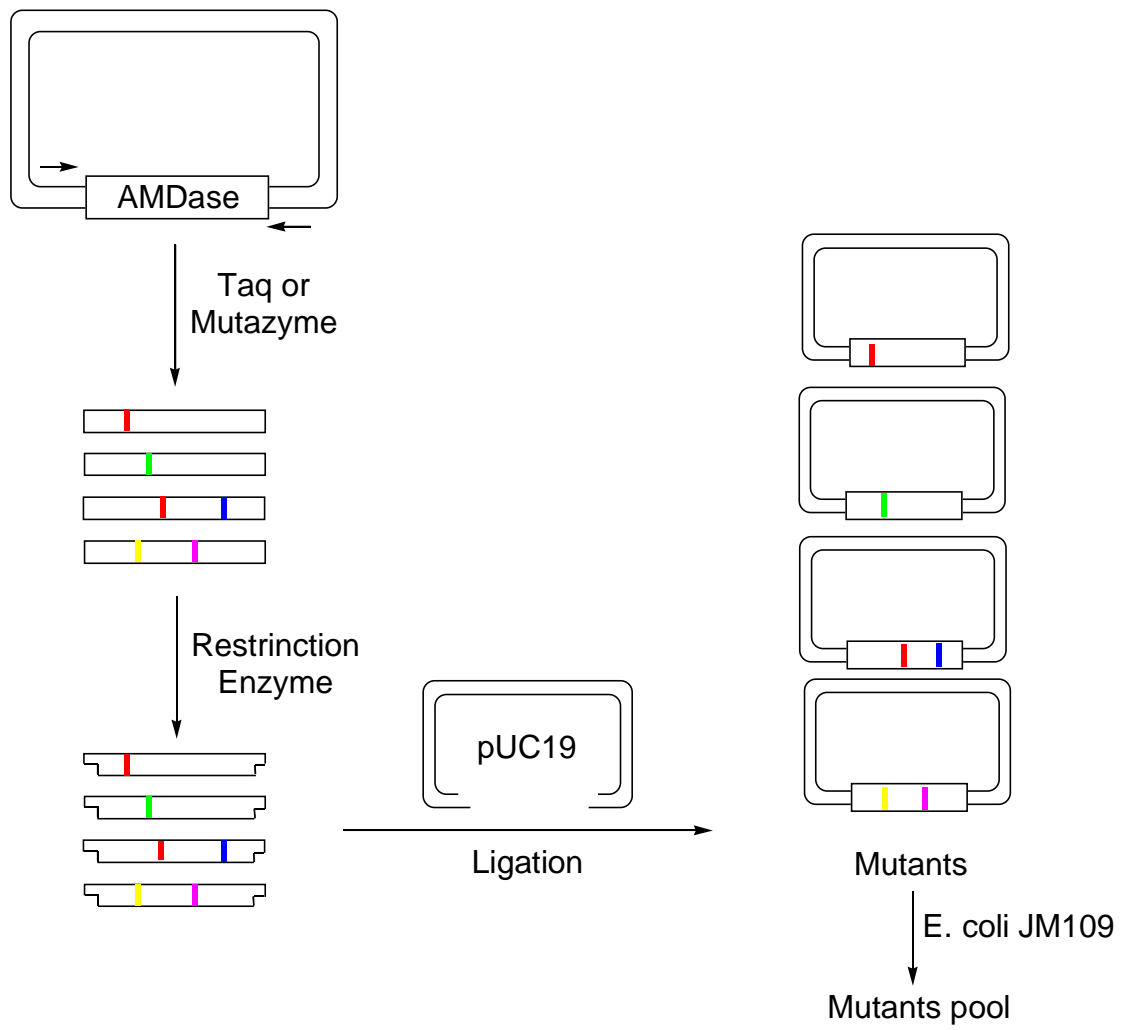


Figure 3-2 ポリメラーゼ Mutazyme によるランダム変異導入

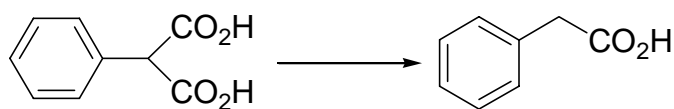


### 3-4 ランダム変異株のスクリーニング

作成したランダム変異 AMDase の中から活性の向上した株を選別するために、BTB によるカラーアッセイ法を用いてスクリーニングを行った。AMDase は脱炭酸反応を触媒するので、基質としてフェニルマロン酸を使用すると、一塩基酸であるフェニル酢酸が生成し、これに伴い系中の pH が上昇し、BTB の色が黄色から青色へと変化するのを利用してアッセイを行った(Scheme 1)<sup>11)</sup>。効率良くアッセイを行うために、プレート上での大腸菌の成育と同時に色の変換によるアッセイを行った。使用したプレートの組成は次のようなものである(Table 3-1)。

Table 3-1 スクリーニング用プレート

Yeast extract	0.2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.12 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.08 g
NaCl	0.4 g
Glucose	0.05 g
Phenylmalonic acid	20 mM
BTB	5 mg
agar	4 g
water	(pH 6) 200 mL



BTB color : 黄色 青

Scheme 3-1 BTB によるカラーアッセイ

変異型プラスミドの混合物を用いて大腸菌を形質転換し、スクリーニング用のプレートで培養し色の变化を観察した。しかし、当初の条件では、なかなか青く変色するものが得られてこなかったために(Figure 3-3)、プレートの組成を検討し、若干変更することとした。培地中の緩衝液成分の作用をより弱いものへと変更するため、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  と  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  の濃度を十分の一としてスクリーニングを行うこととした。数万コロニーのスクリーニングを行った結果、プレートが青く変色するものが得られてきた。一次スクリーニングではプレート上に直接培養し、青色に変色してきたコロニーを再度新しいプレートにて培養することで、変色する速度と強度を観測、比較した(Figure 3-4)。

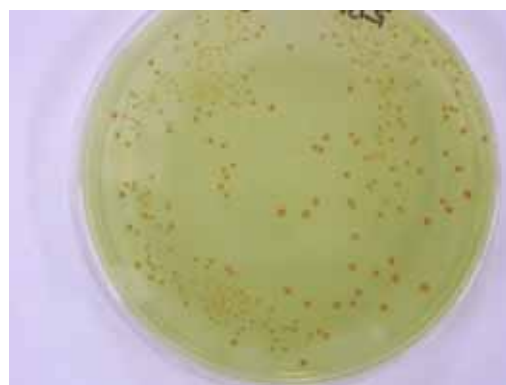


Figure 3-3 ランダム変異株のスクリーニング(変化なし)



Figure 3-4 ランダム変異株のスクリーニング  
(左)一次スクリーニング(右)二次スクリーニング

また、プレート上では BTB が水溶性のため、色の变化の観測が困難になることがあったため、代替法として液体培地を用いたスクリーニング法も検討することとした(Figure 3-5)。両方法を並立して利用することで一次、二次とスクリーニングを行い、数万コロニーから約 150 コロニーを選別し、さらにスクリーニングを続け、より早い段階で青く変色するもの、より強く変色するものを選別し約 50 変異株へと絞った。得られてきた変異株に導入されている変異箇所を特定するために、プラス

ミドを抽出し、DNA シーケンサーにて塩基配列の確認を行った。その結果、テンプレートとして使用した元のプラスミド G74C/C188S のままのものや、活性中心の188番目が元のシステインへ戻ってしまったもの、さらに野生型まで戻ってしまったものが大多数を占めることが判明した。しかし、一方で元の二重変異に加え、36番目のセリンがアスパラギンへと変換されている三重変異体 S36N/G74C/C188S を得ることができた。この変異株をプレート上で培養し色の変化を確認すると、元の二重変異株よりも青く変色したことから、より強い脱炭酸活性を確認することができた(Figure 3-6)。

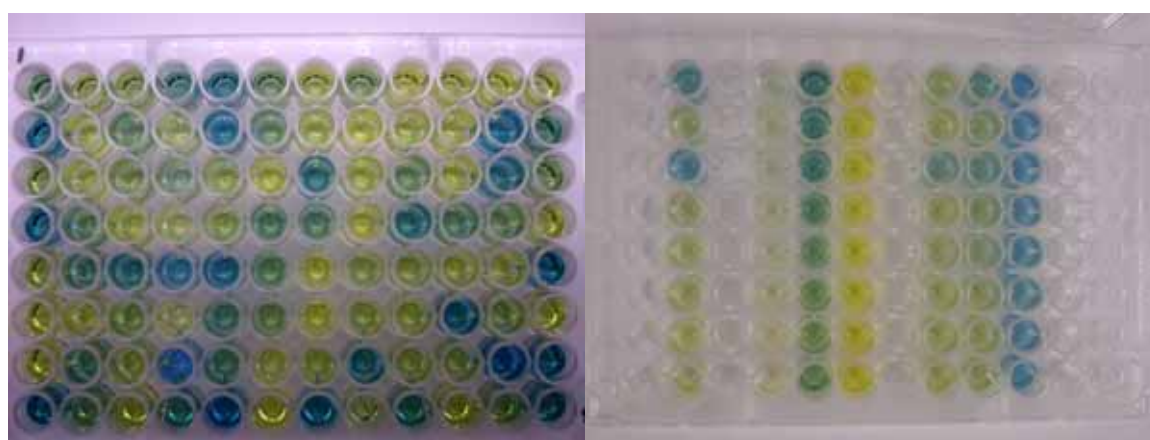


Figure 3-5 液体培地によるスクリーニング(左)とコントロール(右)

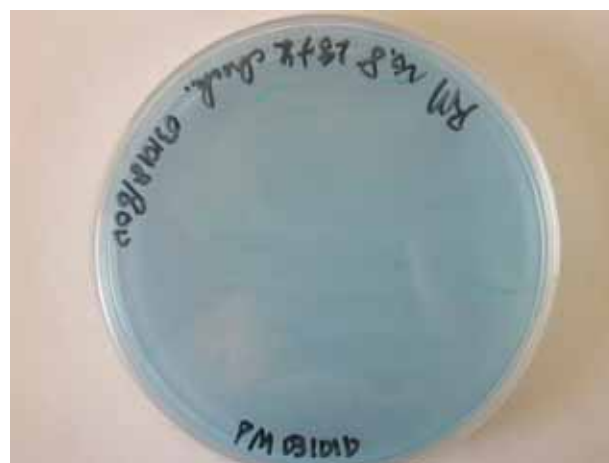


Figure 3-6 三重変異株のスクリーニング結果

ところで、得られた三重変異株の作成の際には、大腸菌 XL1-Red を用いてランダム変異株を作成した。この大腸菌を用いると全プラスミド中に変異が入る可能性があるため、AMDase をコードしている領域以外に変異が導入され、AMDase のアミノ酸配列の改変以外の要因、例えば、タンパク質の転写・翻訳の効率化により脱炭

酸活性を示している可能性がある。そこで、36 番目の変異導入のみにより脱炭酸活性が向上したことを示すために、元の二重変異体(G74C/C188S)をテンプレートとして部位特異的な変異導入により、S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase を再作成することとした。

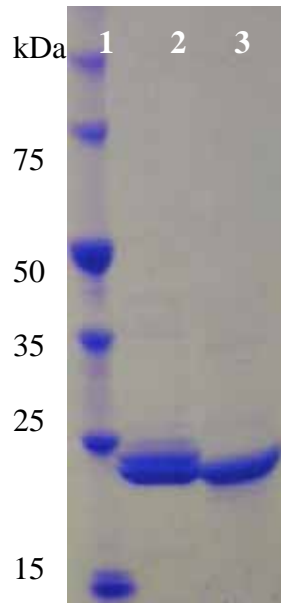
### 3-5 S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase の作成と精製

三重変異型 AMDase の作成には、簡便な方法にて部位特異的な変異導入が可能であり次章で詳細に述べる Stratagene 社製 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit を用いた<sup>12)</sup>。変異導入用のプライマー一組 S36NF、S36NR を用い(下線部が変異導入部)、三重変異型 AMDase を作成した。DNA シーケンサーにて、目的の変異のみを含んだ S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase であることを確認した。

S36NF : GCCCTTCATTGCCAACGGGCTGGGGCTG

S36NR : CAGCCCCAGCCCCGTTGGCAATGAAGGGC

作成した変異型プラスミドを利用して大腸菌を形質転換し、変異型酵素の大量発現、精製を行った。精製は以下のように、これまでの野生型及び二重変異型と同様に行った。1.5 L の LB 培地で大量培養した大腸菌を集菌後、緩衝液に懸濁させフレンチプレスにて破碎した。核酸成分を取り除くため、硫酸プロタミン処理を行い沈殿物を取り除いた。続いて、60%飽和硫酸アンモニウムで処理することでタンパク質を共沈殿物として回収した。次にカラムクロマトグラフィーにて精製を行うために、過剰の硫酸アンモニウムを透析することで取り除いた。カラムクロマトグラフィーの第一段階として、陰イオン交換クロマトグラフィーである DEAE-Toyopearl を使用し、塩濃度 0-50 mM の勾配で溶出した。各溶出フラクションから SDS-PAGE により AMDase のサイズである 24.7 kDa のバンドを含むフラクションを回収した。第二段階目のカラムクロマトグラフィーとして疎水クロマトグラフィーである Butyl-Toyopearl を使用し、硫酸アンモニウム濃度 25%から 10%の勾配で溶出した。一本目の DEAE 同様 SDS-PAGE により目的とするサイズのバンドを含むフラクションを回収した。最後に限外濾過膜を利用し、酵素溶液を濃縮することで、タンパク質濃度 0.722 mg / mL(OD<sub>280</sub> の Abs1 を 1 mg / mL とした)の S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase の精製酵素溶液約 15 mL を得ることができた。新たな変異が導入されることで、タンパク質の分解や立体構造の変化が起こることがあるが、SDS-PAGE や CD スペクトルの結果から(Figure 3-7、3-8)、野生型と同様の構造を持つことが確認され、また、分子量の大きな変化も見られないなど、分解や大きな立体構造の変化は見られなかった。



lane 1: Marker  
2,3: Purified mutant AMDase

Figure 3-7 精製後の S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase

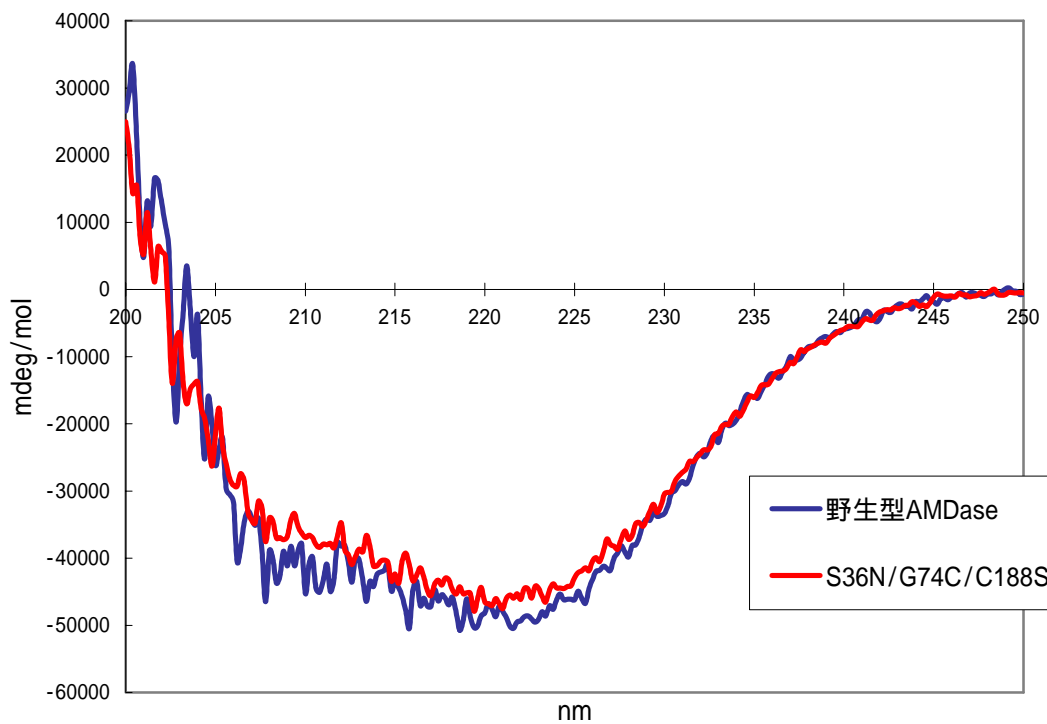


Figure 3-8 野生型と S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase の CD スペクトル

### 3-6 S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase の諸性質

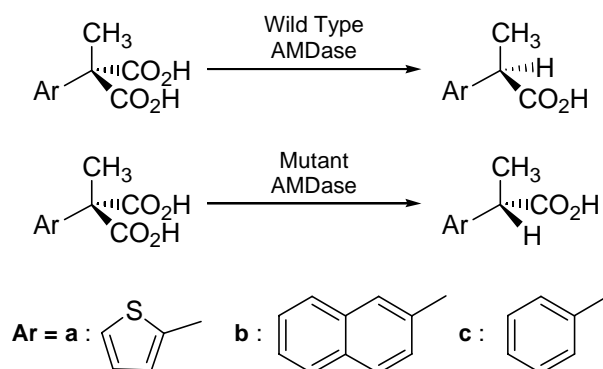
HPLC を用いてフェニルマロン酸に対する酵素活性の測定を行った。野生型 AMDase の比活性が  $4.67 \times 10^2$  Unit / mg、元の G74C/C188S 二重変異型が  $5.05 \times 10^{-2}$  Unit / mg であったのに対して、得られてきた三重変異型 AMDase では、 $4.99 \times 10^{-1}$  Unit / mg であった。この値は、野生型の比活性と比較すると約 1/1,000 と非常に弱い活性であるが、元の二重変異型(野生型の約 1/10,000)と比較すると、約 10 倍酵素活性が回復したことが判明した(Table 3-2)。

Table 3-2 S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase の酵素活性

Reaction: C1=CC=C(C=C1)C(C(=O)O)C(=O)O >> C1=CC=C(C=C1)CC(=O)O

entry	mutant	conc. (mg/ml)	specific activity (Unit/mg)
1	wild type	1.74	467
2	G74C/C188S	1.04	0.0505
3	S36N/G74C/C188S	1.07	0.499

次に、得られた三重変異型 AMDase の立体選択性の確認を行った。今回ランダム変異導入により二重変異型酵素の活性を回復させるのが目的であったため、三重変異型酵素の立体選択性が、元の G74C/C188S 二重変異型 AMDase の立体選択性を保持しているかどうか確認することとした。立体選択性の測定には、第 2 章でも使用したチエニルタイプ、ナフチルタイプおよびフェニルタイプの基質を選択し、野生型 AMDase、元の G74C/C188S 二重変異型 AMDase と比較した(Scheme 3-2)。



Scheme 3-2 野生型・変異型 AMDase による立体選択性

その結果、フェニルタイプの基質を用いた場合は、元の二重変異型 AMDase 同様三重変異型 AMDase においても脱炭酸活性は見られなかった。チエニルタイプの基質を用いた場合は、野生型が *S* 体を与えるのに対し、三重変異型は元の二重変異型同様、野生型の逆の立体選択性である *R* 体を与えることが判明した。また、収率・光学純度ともに若干向上し、それぞれ 75%、88%ee であった(Table 3-3)。

Table 3-3 チエニルタイプの基質に対する S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase の収率と光学純度

Enzyme	Yield (%)	ee (%)	Configuration
Wild Type	99	99	<i>S</i>
G74C/C188S	60	84	<i>R</i>
S36N/G74C/C188S	75	88	<i>R</i>

基質にナフチルタイプを使用した場合にも同様の結果が得られた。野生型 AMDase が *R* 体、元の二重変異型が逆の立体選択性の *S* 体の生成物を与えるのに対して、今回得られた三重変異型の立体選択性は、二重変異型同様 *S* 体であった。収率は若干上昇し 30%であったものの、光学純度は 98%と変化が見られなかった (Table 3-4)。

Table 3-4 ナフチルタイプの基質に対する S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase の収率と光学純度

Enzyme	Yield (%)	ee (%)	Configuration
Wild Type	96	99	<i>R</i>
G74C/C188S	17	98	<i>S</i>
S36N/G74C/C188S	30	98	<i>S</i>



ランダム変異導入により活性が向上した S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase を得ることができたが、チエニル・ナフチルタイプの二種類の基質に対する詳しい活性を比較するには、用いた酵素の量や反応時間が異なるため困難である。そこで、各基質に対する速度論的パラメータを測定し、得られてきた三重変異型 AMDase の比活性を測定することとした。

速度論的パラメータの測定は、1 M Tris-HCl 塩酸緩衝液(pH 8.5) 50  $\mu$ l と蒸留水 350  $\mu$ l、各基質濃度の(5 mM, 6.7 mM, 10 mM, 20 mM, 50 mM, 100mM)基質溶液 50  $\mu$ l、酵素溶液 50  $\mu$ l を 35  $^{\circ}$ C にて 10 分間反応させた。生成するモノカルボン酸の生成量から unit 数を求め、Lineweaver-Burk Plot を描いた。Lineweaver-Burk Plot は各基質濃度の逆数と反応速度の逆数のプロットであり、そのグラフの式から各パラメータを求めることができる。ここで、酵素反応の速度論的パラメータを測定するには、反応開始後、比較的早い段階の直線的な反応段階である必要があるため、反応が半分以上完了してしまっていないことを確認して、時間等を設定した。

まず、チエニルタイプの基質を用いて、S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase の速度論的パラメータを求めた。 $k_{cat}$  が  $3.09 \text{ s}^{-1}$  と、元の G74C/C188S 二重変異型( $0.34 \text{ s}^{-1}$ )の約 10 倍に上昇したが、野生型の AMDase( $200 \text{ s}^{-1}$ )と比較すると約七十分の一であった。 $K_m$  の値は 3.51 mM であり、元の二重変異型(5.03 mM)・野生型(12.5 mM)より、ともに酵素と基質の親和性が向上していた。酵素のその基質に対する相対的な反応性を表す比活性  $k_{cat} / K_m$  の値は、S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase では  $0.88 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$  であり、元の二重変異型( $0.067 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ )の約 10 倍と活性は向上していることが確認できた。しかし、野生型 AMDase( $16 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ )と比較すると約二十分の一であり、またまた野生型 AMDase の反応性には及ばないことが判明した(Figure 3-9、Table 3-5)。

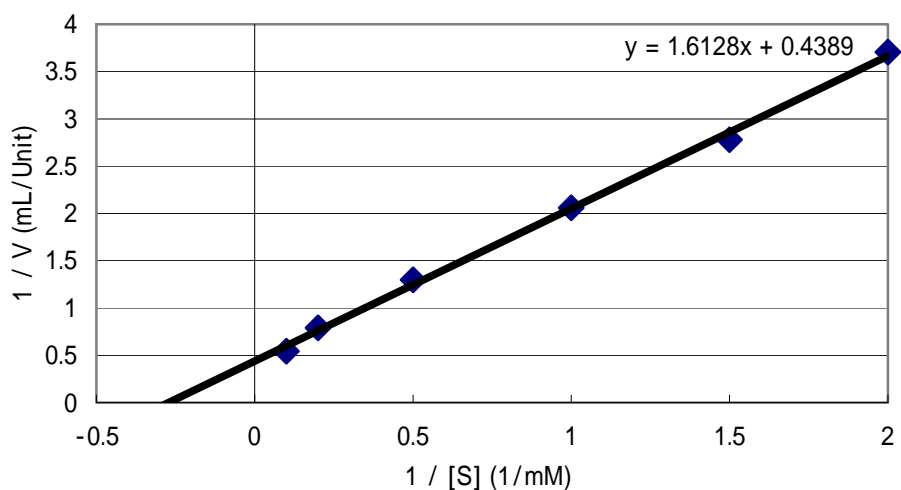


Figure 3-9 チェニルタイプの基質に対する S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase の Lineweaver-Burk plot

Table 3-5 チェニルタイプの基質に対する S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase の速度論的パラメータ

Enzyme	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	$k_{\text{cat}} / K_m$ ( $\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ )	Relative Activity
Wild Type	200	12.5	16	100
G74C/C188S	0.34	5.03	0.067	0.42
S36N/G74C/C188S	3.09	3.51	0.88	5.50

続いて、ナフチル対応の化合物を用いて速度論的パラメータを求めた。こちらの基質を用いた場合でも、 $k_{cat}$  が  $1.14 \text{ s}^{-1}$  と、元の G74C/C188S 二重変異型 ( $0.12 \text{ s}^{-1}$ ) の 10 倍程度に上昇したが、野生型の AMDase ( $30.9 \text{ s}^{-1}$ ) と比較すると約三十分の一であった。また  $K_m$  の値は  $1.11 \text{ mM}$  と元の二重変異型 ( $1.25 \text{ mM}$ ) とほとんど変わらない値であった。野生型 ( $0.43 \text{ mM}$ ) と比較すると、こちらの基質の場合はむしろ親和性については低下していることが判明した。 $k_{cat} / K_m$  の値は、S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase ( $1.03 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ) は、元の G74C/C188S 二重変異型 ( $0.096 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ) の約 10 倍と活性は向上していることが確認できたが、野生型 ( $71.9 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ) と比較すると約 1/8 であり、野生型 AMDase の反応性には及ばないことが判明した (Figure 3-10、Table 3-6)。

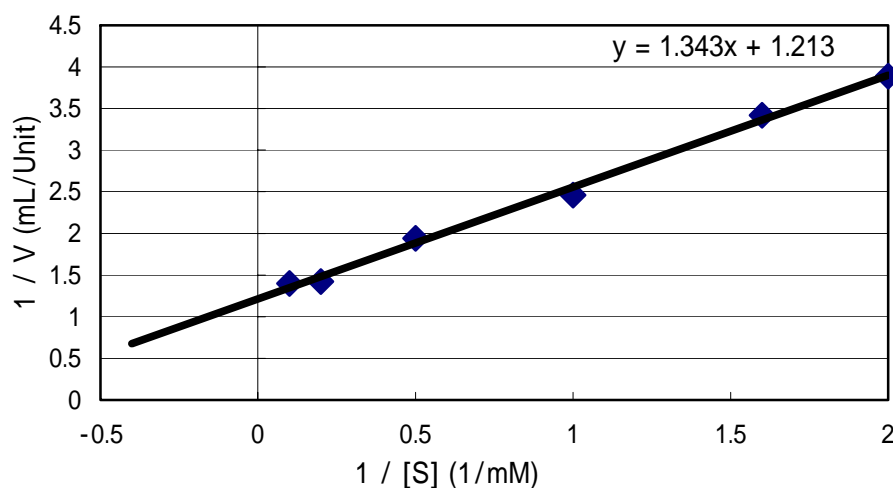


Figure 3-10 ナフチルタイプの基質に対する S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase の Lineweaver-Burk plot

Table 3-6 ナフチルタイプの基質に対する S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase の速度論的パラメータ

Enzyme	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	$k_{cat} / K_m$ ( $\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ )	Relative Activity
Wild Type	30.9	0.43	71.9	100
G74C/C188S	0.12	1.25	0.096	0.13
S36N/G74C/C188S	1.14	1.11	1.03	1.43

以上のように、ランダム変異導入により得られてきた S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase は、元の G74C/C188S 二重変異型 AMDase の約 10 倍の酵素活性を有していることが判明した。すなわち、変異を 2 ヶ所導入することで酵素の立体選択性の逆転に成功したが、その酵素活性が大きく低下してしまった変異型 AMDase の酵素活性を一桁回復することに成功した。36 番目のアミノ酸残基であるセリンがアスパラギンへと変換されたことで、AMDase の立体構造にどのような変化を与え、どのように活性が向上したかに興味を持てるが、本酵素の X 線結晶構造解析による立体構造の解明は未だ成されておらず、詳細は不明である。推測に過ぎないが、酵素の表面構造の改良、立体構造の改良、電子・プロトン移動の迅速化など考えられる。今後、反応機構などを解明する上でも、本酵素の立体構造の解明が望まれる。

一方、今回得られてきた 3 番目の変異が、野生型 AMDase に対してどのような効果を示すのか、活性の向上を期待して、野生型 AMDase の 36 番目のセリンをアスパラギンへと変換した S36N 変異型酵素を同様の方法にて作成し、その効果を調べてみることにした。S36N 変異型を実際に作成し酵素活性等調べてみたが、残念ながら野生型への S36N 変異導入は効果がないことが判明した。

#### Saturated Mutagenesis

36 番目のセリンに変異が導入されたことで酵素活性に変化が見られたことから、この場所に狙いを定め、全アミノ酸残基による変異(Site-directed saturated mutation)を導入することを試してみた。アミノ酸をランダムに変更するために、塩基配列を ACGT の 4 種類が混ざったプライマーを用いて、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit により 36 番目のアミノ酸にランダムな変異を導入した。ランダム変異導入用に使用したプライマーは以下の通りである。

S36XF : CGATCTGCCCTTCATTGCCNNKGGGCTGGGGCTGGGCTCCG

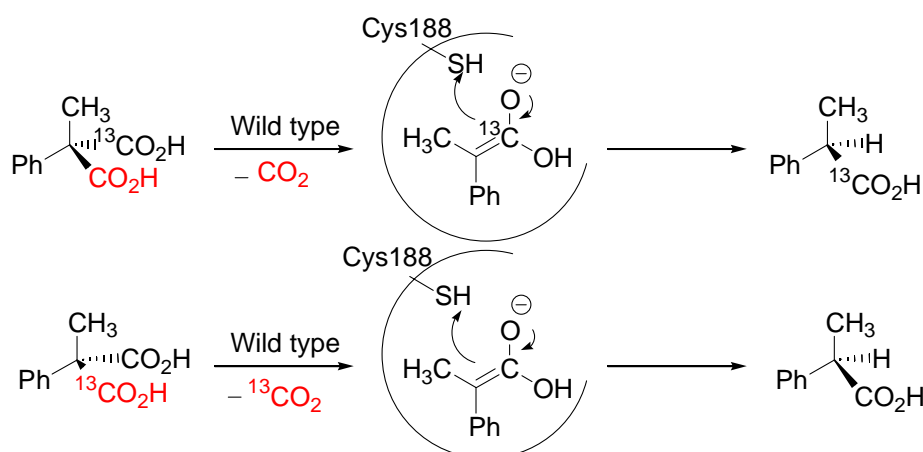
S36XR : CGGAGCCCAGCCCCAGCCCMNNGGCAATGAAGGGCAGATCG

作成した変異株の塩基配列を解析したところ、いくつかのアミノ酸残基は作成されにくかったため、点変異導入により別個作成した。全アミノ酸のバリエーションが揃ったところで、全変異株の酵素活性の測定を行った。それぞれの無細胞抽出液を調製し、HPLC により、それぞれの酵素の比活性を測定、比較した。その結果、36 番目がアスパラギンの S36N/G74C/C188S より酵素活性の高い変異株を見出すことはできなかった。

### 3-7 S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase の活用

三重変異型 AMDase を利用し、以下のように光学活性な医薬品の合成法の開発や、AMDase の立体選択的な反応機構の解明を行うこととした。第一章で述べたように、NSAIDs の一種であるフルルビプロフェンの S 体を三重変異型酵素を用いて効率よく合成することができた。野生型 AMDase が R 体のフルルビプロフェンを与えることから、本変異型酵素を作り出したことで両鏡像体を与える酵素を得ることができたと言える。

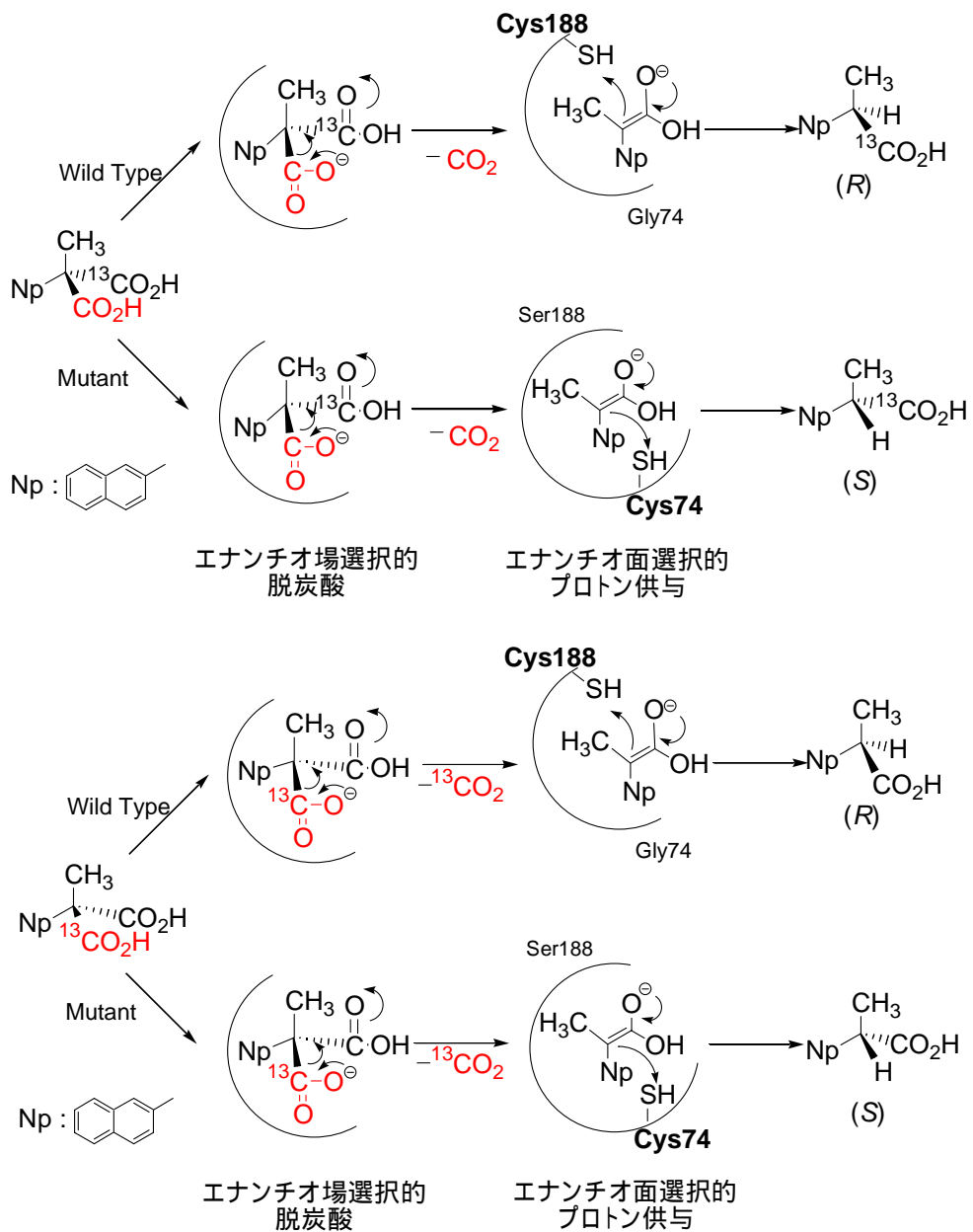
また、以前の研究から、野生型の AMDase 脱炭酸反応において脱炭酸されるカルボキシル基の選択性がエナンチオ場選択的であること、つまり脱炭酸するカルボキシル基は常に決まっていること(Scheme 3-3 では赤い CO<sub>2</sub>H 基)が <sup>13</sup>C を導入した基質を用いた反応から判明している。エナンチオ場選択的な脱炭酸後、エノラート中間体に対して、エナンチオ面選択的にプロトン供与が行われ、光学活性な生成物が得られてくるという反応機構であった(Scheme 3-3)<sup>13)</sup>。



Scheme 3-3 <sup>13</sup>C を使用した野生型 AMDase の脱炭酸反応解析

そこで、変異型 AMDase においては、どのような反応機構でエナンチオ選択性が発現されているのか興味を持たれ、作成した三重変異型酵素を用いて測定が行われた<sup>14)</sup>。その結果、変異型酵素においても野生型同様に、一段階目の脱炭酸反応はエナンチオ場選択的に、決まった方向を向いているカルボキシル基が選択的に脱炭酸されていることが判明した。その後形成される反応中間体のエノラートに対するプロトンの付加は、変異型では野生型とは逆の向きから起こり、逆の立体選択性となることが判明した。つまり、野生型、変異型両 AMDase とも、一段階目の脱炭酸反応は同じカルボキシル基がエナンチオ場選択的に脱炭酸され、二段階目のプロトン

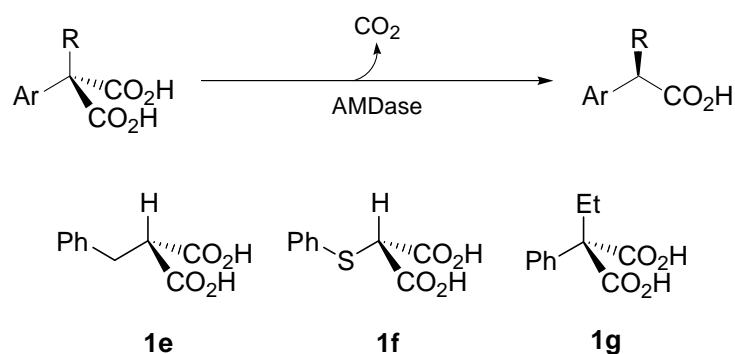
化の段階がエナンチオ面選択的であり、その結果、立体選択性の逆転した生成物が得られてくることが判明した(Scheme 3-4)。二段階目のプロトン化を行っているアミノ酸残基は 188 番目のシステインおよび変異を導入した 74 番目のシステインであることが判明したが、一段階目の脱炭酸反応を触媒または制御しているアミノ酸残基は今のところ不明である。しかし、エナンチオ場選択的にカルボキシル基が脱炭酸されていることから、なにかしらのアミノ酸残基が立体配置を認識・制御しているのではないかと推定できる。X線結晶構造解析などによる本酵素の立体構造の解明がなされ、詳細な反応機構が解明されることが望まれる。



Scheme 3-4  $^{13}\text{C}$  を使用した三重変異型 AMDase の脱炭酸反応解析

### 3-8 ランダム変異導入による基質特異性の拡大

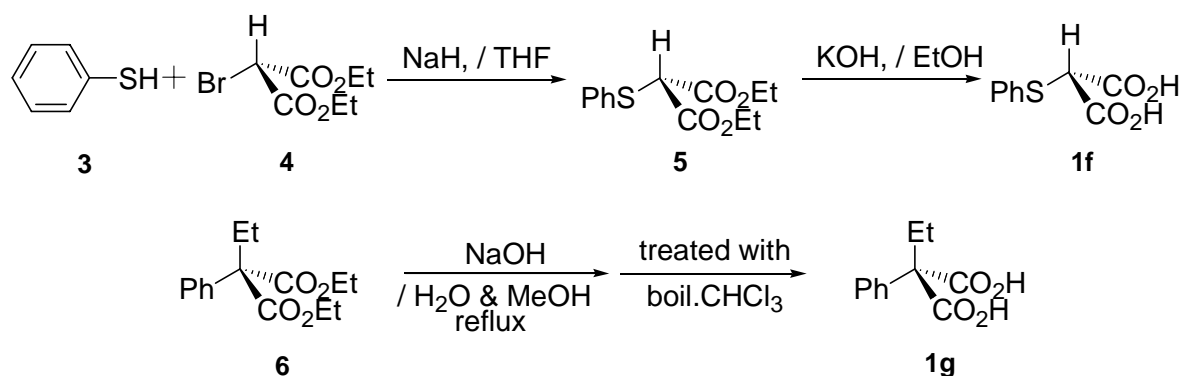
ここまで示してきたように、ランダム変異導入により酵素活性の向上に成功してきた。一方、AMDase には基質特異性に制限があるという欠点が存在している。例えば、AMDase の基質として認識されるには、マロン酸の 位の置換基 Ar には直接アリール基(芳香環)が結合していなければならない。また、他方の 位の置換基 R は水素、フッ素、メチルなどの比較的立体的に小さい置換基でなければならないといった制限があった。例えば、Ar としてフェニル基の間に炭素原子や硫黄原子が一つ挿入されたベンジルやフェニルチオ、R がメチルより一つ炭素数の多いエチルでは反応が進行しないことが、確認されている。これらの化合物と基質と成り得る化合物では、 位の立体障害、アリール基からの反応中間体への電子的寄与が異なることが反応性の違いの原因であると考えられる(Scheme 3-5)。



Scheme 3-5 AMDase の基質特異性と基質特異性の拡大

これまでの基質に加え、ベンジルマロン酸 (1e)、フェニルチオマロン酸 (1f) や位がエチル基になったエチルフェニルマロン酸 (1g) を新たに基質とすることができないだろうかと考え、野生型 AMDase に対してランダム変異導入を行い、基質特異性の拡大を試みた。

基質として用いるベンジルマロン酸は市販品を使用し、フェニルチオマロン酸 (1f) はチオフェノール (3) とプロモマロン酸ジエチル (4) を塩基で処理した生成物 (5) を加水分解することで作成、使用した。エチルマロン酸 (1g) は対応するジエステル (6) の加水分解により合成した(Scheme 3-6)。



Scheme 3-6 基質合成

ランダム変異導入はこれまで同様、大腸菌 XL1-Red と変異導入ポリメラーゼ Mutazyme を用いた。変異を導入する元のプラスミドとして野生型 AMDase を用いた。スクリーニングの際のプレートにフェニルマロン酸の代わりに、ベンジルマロン酸 (1e)、フェニルチオマロン酸 (1f)、エチルフェニルマロン酸 (1g)をそれぞれ使用したプレートを作成した。それぞれのプレート上にて、ランダム変異導入を行ったプラスミドを含む大腸菌を培養し、大腸菌の成育とプレートの色の変化を観察した。

しかし、大腸菌の成育は確認できたが、プレートの色の変化は確認することができなかった。また、プレート中の基質濃度を変化させてみても結果は同じであった。このような方法で数万株のランダム変異株のスクリーニングを行ったが、残念ながら新しい三つの基質( $\alpha$ -ベンジルマロン酸 (1e)、 $\alpha$ -フェニルチオマロン酸 (1f)、 $\alpha$ -エチル- $\alpha$ -フェニルマロン酸 (1g))では、活性を有する株を見出すに至っていない。



### 3-9 まとめ

前章で得た G74C/C188S 二重変異型 AMDase は、立体選択性を逆転させることには成功したものの、その酵素活性が大きく低下してしまった。この変異型 AMDase の低下してしまった酵素活性をランダム変異導入法にて向上させることを試みた。ランダム変異導入には、大腸菌の修復遺伝子欠損株の XL1-Red や、変異が導入されやすいポリメラーゼ Mutazyme を用い、変異株数万株の中からスクリーニングを行った。(セミ)ハイスループットな方法として、反応の進行とともに pH が変化することを利用して、プレート上で色の変化を指標にスクリーニングを行った。その結果、活性が元の G74C/C188S 二重変異型 AMDase より向上した、36 番目のセリンがアスパラギンへと変換された S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase を得ることができた。フェニルマロン酸を指標とした酵素活性の測定では、本変異型が野生型 AMDase の千分の一の活性ながらも、元の二重変異型よりも一桁活性が向上していることが判明した。また、チエニルタイプ、ナフチルタイプのマロン酸を基質に用いて立体選択性、反応性を調べたところ、この三重変異型は元の二重変異型と同様、野生型 AMDase とは逆の立体選択性と高い光学純度を保持したままの一方で、低下した酵素活性が回復していることが判明した。チエニルタイプ、ナフチルタイプの基質に対する本変異型酵素の比活性も、野生型と比較すると小さいものではあるが、元の二重変異型酵素より一桁向上していることが判明した。

また、ランダム変異導入により酵素機能が向上した変異型酵素を用いて、有用化合物の合成と、本酵素の反応機構に関する研究を行うことができた。

酵素機能の向上をランダム変異導入により行うことができたので、同様の手法により酵素の基質特異性の拡大を狙って、ベンジルマロン酸、エチルフェニルマロン酸を脱炭酸できるような変異株のスクリーニングを行ったが、そのような変異株を得ることはできなかった。

### 3-10 参考文献

- 1) Deshler, J. O., *Genet. Anal. Tech. Appl.*, **1992**, 9, 103-106
- 2) Kuckner, O., Arnold, F. H., *Trends Biotechnol.*, **1997**, 15, 523-530
- 3) Lutz, S.; Patrick W. M., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2004**, 15, 291-297
- 4) Johannes, T. W.; Zhao, H., *Curr. Opin. Microbiol.*, **2006**, 9, 261-267
- 5) Jaeger, K. E.; Eggert, T.; Eipper, A.; Reetz, M. T., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2001**, 55, 519-530
- 6) van der Veen, B. A., Potocki-Veronese, G.; Albenne, C.; Joucla, G.; Monsan, P.; Remaud-Simeon, M., *FEBS Lett.*, **2004**, 560, 91-97
- 7) Kaur J.; Sharma, R., *Crit. Rev. Biotechnol.*, **2006**, 26, 165-199
- 8) Amara, A. A.; Steinbuchel, A.; Rehm, B. H. A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2002**, 59, 477-482
- 9) Reyes-Duarte, D.; Polaina, J.; Lopez-Cortes, N.; Alcalde, M.; Plou, F. J.; Elborough, K.; Ballesteros, A.; Timmis, K. N.; Golyshin, P. N.; Ferrer, M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 7553-7557
- 10) Greener, A.; Callahan, M.; Jerpseth, B., *Methods Mol. Biol.*, **1996**, 57, 375-385
- 11) Miyamoto, K.; Ohta, H., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1992**, 38, 234-238
- 12) Wang, W.; Malcolm, B. A., *Biotechniques*, **1999**, 26, 680-682
- 13) Miyamoto, K.; Tsuchiya, S.; Ohta, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 6256-6257
- 14) 堤智美、卒業論文、2003年、慶應義塾大学
- 15) Verbit, L.; Halbert, T. R.; Patterson, R. B., *J. Org. Chem.*, **1975**, 40, 1649-1650



# 本論

## 第四章

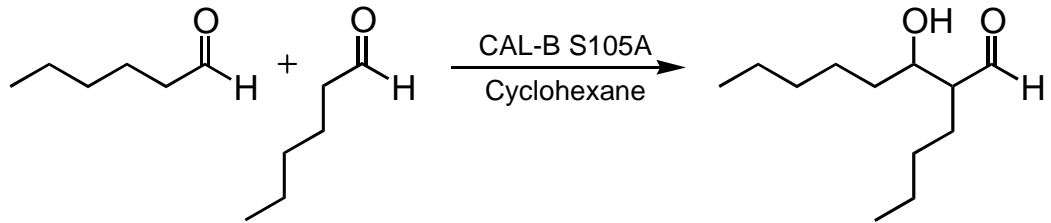
### AMDase のラセマーゼへの改変

#### 4-1 酵素の”Promiscuity”

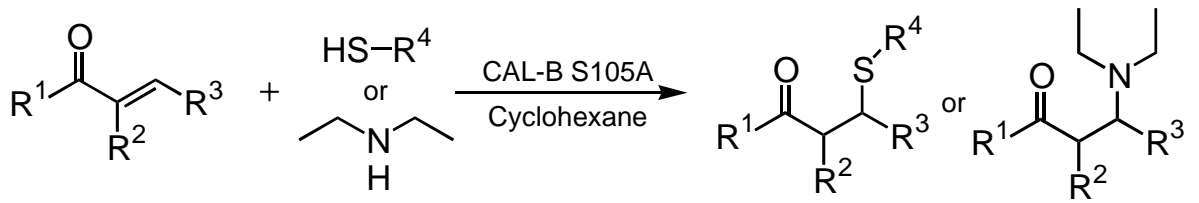
近年、世界の生体触媒の分野で話題になっていることの一つに”酵素の promiscuity”、”promiscuous な酵素”が挙げられる<sup>1,2)</sup>。 ”promiscuous”とは広範囲な、乱雑な、幅広いといった意味であり、酵素の様々な性質に関してのある程度の許容性・幅広さのことを指している。酵素は、古くはノーベル賞受賞者のフィッシャーが 19 世紀初頭に「鍵と鍵穴」説を唱えたように、ある一つの酵素はある一つの決まった化合物のある決まった反応しか触媒しないとされていた。しかし、酵素本来の基質と似た形や性質を示す化合物を触媒できることが判明してくると、酵素特有の位置選択性・官能基選択性・立体選択性などの性質を利用して、有機合成における官能基変換や不斉合成などにも利用されてきた。これは、酵素の基質認識に関する”ゆるさ”、つまり”promiscuous な酵素”の性質を利用した例であり、基質特異性・基質認識能などと呼ばれてきた<sup>3-5)</sup>。また、本来水溶液中で反応が進行する酵素反応を、有機溶媒中（最近ではイオン性液体や超臨界二酸化炭素なども）で行うなど、酵素の環境に順応する能力を二つ目の”酵素の promiscuity”として利用した例もある。近年では、これまで black box に例えられていたように酵素内での反応様式は長い間不明であったものが、様々な酵素において明らかになってきている。最も有名な酵素の一つに脂質を加水分解するリパーゼがある。X 線による酵素の結晶構造解析や変異導入による活性部位の特定など、技術の発展とともに酵素の触媒中心のアミノ酸残基の解明や反応機構の解明が行われてきた。酵素の詳細な反応様式が明らかになることで、酵素機能の拡大・異なる反応を触媒する酵素の開発が可能となってきた。例えば、リパーゼは加水分解酵素であるが、活性中心のアミノ酸残基の一つを改変することでアルドール反応やマイケル付加反応を触媒することのできる酵素へと機能の改変が行われた例や<sup>6-10)</sup>、酵素の活性ポケット内部に金属触媒を結合させ、酵素をキラルな反応場として利用した新しい反応例などが報告されている<sup>11)</sup>。これらの例は三つ目の”catalytic promiscuity”に関するものである。酵素の反応機構を考察することで、本来触媒する反応以外の反応を触媒することのできる酵素を作り出すことや見つけ出すことができるようになってきている。

AMDase は、X 線結晶構造による詳細な構造は未だ解明されていないものの、これまでの研究から反応機構の推定がされてきた。本章では、他の酵素との相同性や推定反応機構を基に、AMDase の活性部位付近に変異を導入した結果について述べる。本酵素の promiscuity の可能性を示すべく、AMDase の元来の反応である脱炭酸反応に加え、反応としてはまったく異なるラセミ化反応を触媒する機能を付与する

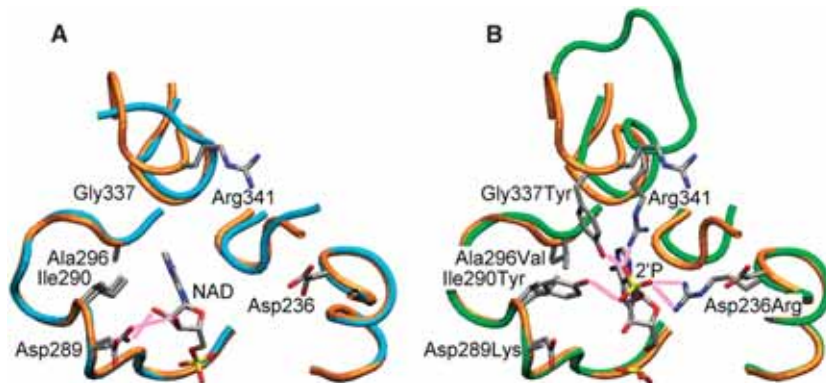
ことはできないかと試みた。



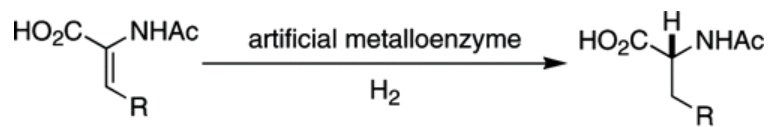
リパーゼCAL-B(加水分解)によるアルドール反応(C-C結合)



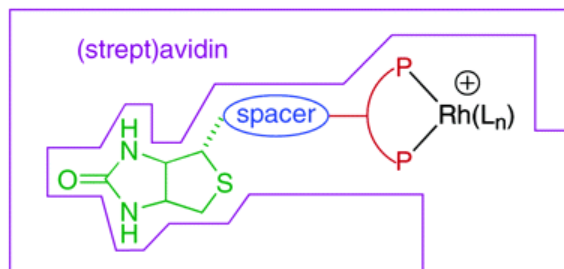
リパーゼ CAL-B によるマイケル付加型反応



補酵素特異性の変換: NAD依存からNADP依存へ



artificial metalloenzyme



タンパク質に金属を結合し不斉水素化

Figure 4-0 promiscuity な酵素の例

## 4-2 AMDase と他の酵素との相同性

AMDase と他の酵素との相同性をデータベースを用いて検索すると、グルタミン酸ラセマーゼやアスパラギン酸ラセマーゼなどのラセマーゼやイソメラーゼと相同性を有することが判明している(Figure 4-1)。これらの一群の酵素は、補酵素独立型ラセミ化酵素及び異性化酵素(cofactor-independent racemase and isomerase)に、また、その反応機構の途中に 位のプロトンの引き抜き、及びエノラートを經由することなどからエノラーゼスーパーファミリー(enolase superfamily)に属している。AMDase も同様の反応機構を示すことから、同じようにエノラーゼスーパーファミリーに属していると考えられる<sup>12-15)</sup>。

```

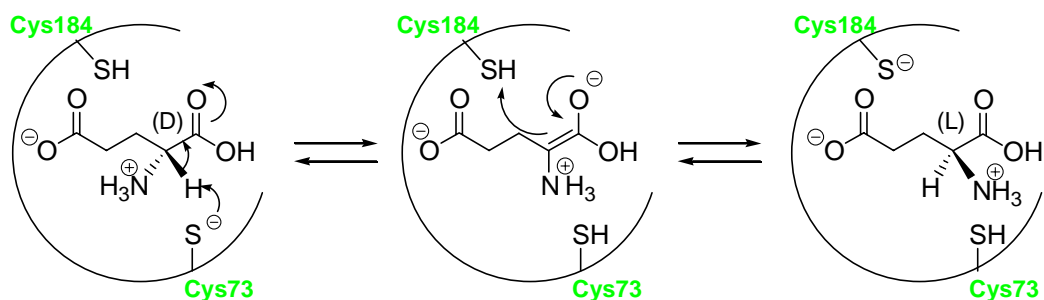
Glu racemase      -MQNDPI~~IKALVIACNTATAAA~~IDTLVMGCTHFPLLRS~~.
Asp racemase      MENFFSI~~ADFIIMPCNTAHFFA~~CEKVILGCTELSLMNE~~.
Hydantoin racemase MKIKVIN~~VDAFVIACCWGDPGLH~~AEAILLGCAGMAEFAD~~.
Maleate isomerase  ----MK~~MSVMAYACCLVAIMAQ~~AVILSA-CVQMPSLPA~~.
AMDase            --MQQAS~~AAVVSLMGTSLSFYR~~SDGILLSCGGLLTLDA~~.

```

グルタミン酸ラセマーゼ: Lactobacillus fermenti由来, アスパラギン酸ラセマーゼ: Streptococcus thermophils由来,  
ヒダントインラセマーゼ: Pseudomonas sp. Strein NS671由来, マレイン酸イソメラーゼ: Alcaligenes faecalis由来,  
AMDase: Alcaligenes bronchisepticus由来

Figure 4-1 AMDase と他の既知酵素との相同性

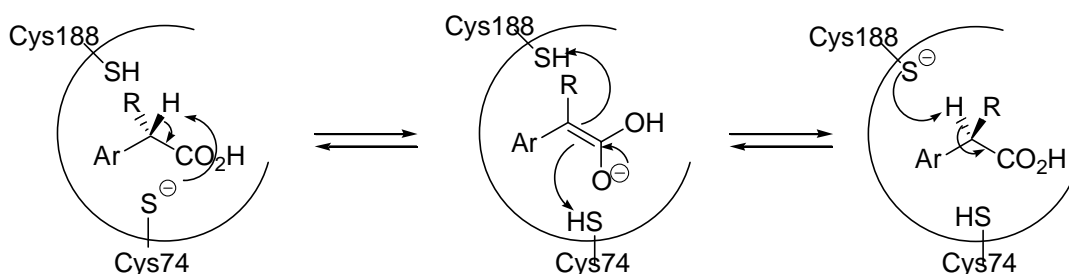
AMDase とある程度の相同性を有しているグルタミン酸ラセマーゼは、すでに X 線結晶構造解析がなされ、変異導入解析などにより詳細な反応機構が提唱されている。活性中心には 73 番目と 184 番目に二つのシステイン残基が存在している。73 番目のシステイン残基が D 体のグルタミン酸の 位のプロトンを引き抜き、活性部位の反対側に存在する 184 番目のシステインからグルタミン酸のエノラートへのプロトン供与がなされる(またはその反対の反応)、という二塩基機構と呼ばれる反応機構にてラセミ化は進行する(Scheme 4-1)<sup>16-18)</sup>。



Scheme 4-1 グルタミン酸ラセマーゼの反応機構

アスパラギン酸ラセマーゼの反応機構においても、同様に活性中心に存在する二つのシステイン残基による 位のプロトンの引き抜きとプロトン付与によりラセミ化が進行する二塩基機構が提唱されている。

ここで、AMDase に着目してみると、未だ X 線結晶解析による酵素の三次元構造は明らかになっていないが、ラセマーゼとの相同性を比較から、活性中心の 188 番目のシステインが一致し、ラセマーゼのもう一つの活性部位であるシステインは 74 番目のグリシンであることが見て取れる。これまでの AMDase の反応機構に関する研究から、AMDase においても活性中心の 188 番目のシステイン残基は、脱炭酸された後のエノレート中間体に対して、プロトン供与を行っていることが示唆されている。以上のような反応機構の比較から、AMDase の 74 番目のグリシンをシステインへと改変し、新たなプロトン供与体を活性中心の反対側に導入することとした。グルタミン酸ラセマーゼ同様、システイン残基を活性部位の両側に配置することができ、AMDase がラセミ化を触媒することができるのではないかと期待した。すなわち、変異型酵素(Gyl74Cys)を作成し、光学活性なアリアルカルボン酸をラセミ化することができるかどうかを試してみることにした(Scheme 4-2)。



Scheme 4-2 変異導入による AMDase のアルドラーゼへの改変



### 4-3 変異導入と酵素精製

G74C 変異型 AMDase の作成は、Stratagene 社製の変異導入キット (QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit) を用いた。変異導入箇所が中心になるように設計したプライマー一組を用いて、野生型の AMDase の遺伝子を組み込んであるプラスミドをテンプレートに伸張反応を行い、変異を組み込んだプラスミドを合成した。続いて、変異が入っていないテンプレートプラスミドを制限酵素 *Dpn* (制限酵素 *Dpn* はメチル化されたプラスミドを切断することができる。一般的な大腸菌で増幅したプラスミドは大腸菌内のメチル化酵素によりメチル化されているので切断される。一方、ポリメラーゼを用いた伸張反応で作成したプラスミドはメチル化されていないため、切断されない) を用いて切断し、残った変異の導入されたプラスミドを用いて大腸菌を形質転換した。育成してきた大腸菌内のプラスミドに目的の変異が導入されたことを塩基配列の解析をすることで確認した (Figure 4-2)。

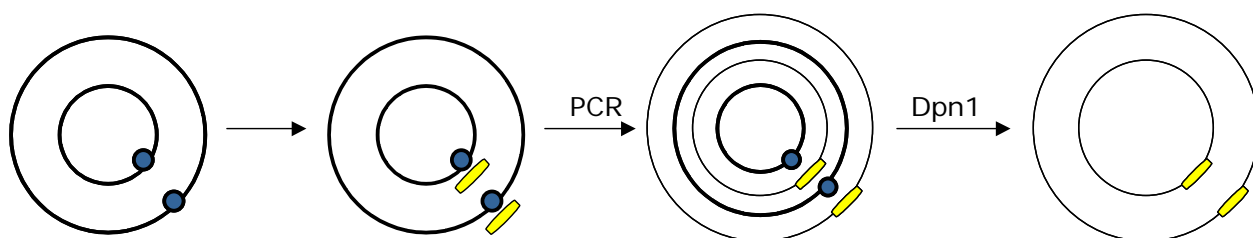


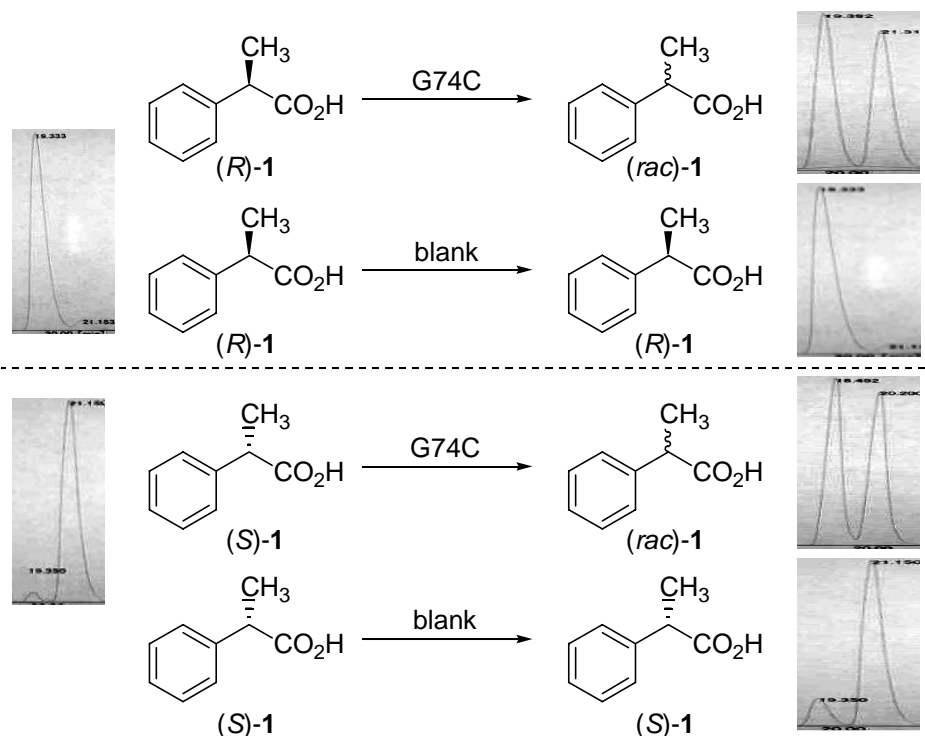
Figure 4-2 Quik Change Site-Directed Mutagenesis

G74C 変異型 AMDase を大腸菌にて大量発現し、集菌後、野生型 AMDase と同様に、フレンチプレスにて破碎、硫酸プロタミン処理、硫酸分画、DEAE-Toyopearl カラムクロマトグラフィー、Butyl-Toyopearl カラムクロマトグラフィーにて精製した。カラムクロマトグラフィーにおいては、BTB カラーアッセイおよび SDS-PAGE の両方のアッセイ方法を用いて変異型酵素を含んだフラクションを回収した。

#### 4-4 ラセミ化活性の測定

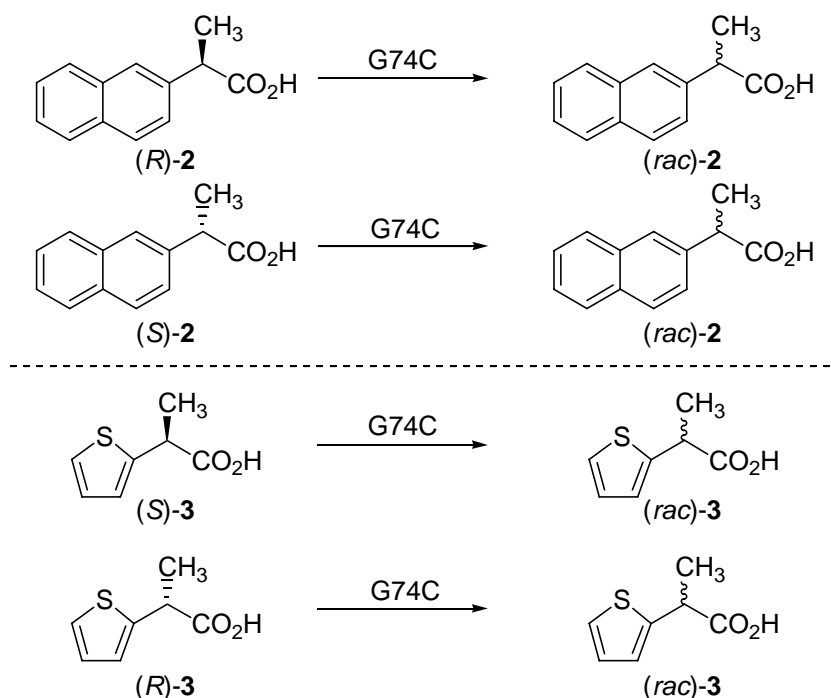
G74C 変異型 AMDase のラセミ化活性の測定は、以下のように行った。

基質として光学的に純粋な *R* 体の 2-フェニルプロピオン酸(または *S* 体)を 100 mM Tris-HCl 緩衝液に溶解し、G74C 変異型 AMDase 溶液を加え、37 °C で一晩インキュベートした。塩酸でクエンチした後、エーテルで抽出し、HPLC にて光学純度を確認し、基質がラセミ化されているかを確認した。酵素溶液を含まないブランク反応では、*R* 体は *R* 体のまま、*S* 体は *S* 体のまま回収された。また、変異が導入されていない野生型 AMDase を加えてもラセミ化の進行は確認できなかった。それに対し、作成した変異型酵素を入れると、光学純度が 99% からほぼ 0% のラセミ体へと変換された、すなわち G74C 変異型 AMDase がラセミ化反応を触媒していることが判明した。Scheme は光学活性体とラセミ体およびラセミ化反応後の HPLC の図である。*R* 体を出発物質としても *S* 体を出発物質としても、ともに同じようにラセミ体へと変換されることが判明した(Scheme 4-3)。



Scheme 4-3 G74C 変異型 AMDase のフェニルプロピオン酸に対するラセミ化活性

次に同じ  $\alpha$ -アリールプロピオン酸の一種である 2-ナフチルプロピオン酸 (2) および 2-チエニルプロピオン酸 (3) を基質としてラセミ化が進行するか確かめることとした (Scheme 4-4)。



Scheme 4-4 G74C AMDase のナフチル・チエニルプロピオン酸に対するラセミ化活性

2-フェニルプロピオン酸 (1) は R 体 S 体ともに市販品より入手可能であったが、光学活性な 2-ナフチルプロピオン酸 (2) および 2-チエニルプロピオン酸 (3) は、対応するマロン酸誘導体から野生型 AMDase および三重変異型 AMDase を用いた不斉脱炭酸反応を利用して調製した光学活性体を用いた。実際に先ほどと同じ条件でラセミ化反応を行ったところ、どちらの基質も R 体 S 体ともに完全にラセミ体へと変換されたことが確認できた。アリール基の部分フェニル以外の 2-ナフチルや 2-チエニルにした  $\alpha$ -アリールプロピオン酸類でも野生型 AMDase の脱炭酸反応同様、速やかにラセミ化されることが確認できた。

#### 4-5 G74C 変異型 AMDase の pH と活性の関係

ラセミ化反応の pH による活性の変化を調べてみたところ、野生型の脱炭酸反応と同様に pH8.5 が至適 pH であることが判明した(Figure 4-3)。

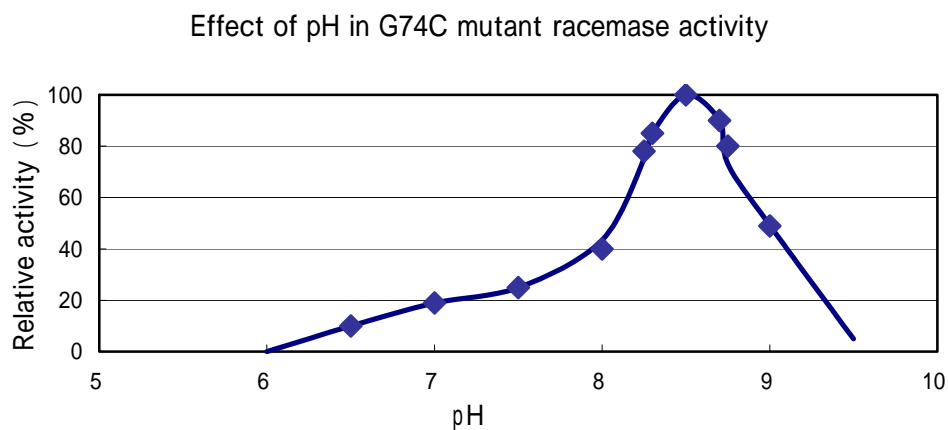


Figure 4-3 G74C 変異型 AMDase の pH と活性の関係

続いて、 $\alpha$ -アリアルプロピオン酸に似た構造を持つ化合物を基質として認識するかどうか確かめることとした。化合物として 位の置換基 R がプロトン性のアミノ基、水酸基のもの、サイズが大きくなったエチル基、*n*-または*i*-プロピル基、また X がアルコールやカルボン酸誘導体のアミド、ニトリル、エステル各基質でラセミ化反応が進行するか試してみることにした(Table 4-1)。

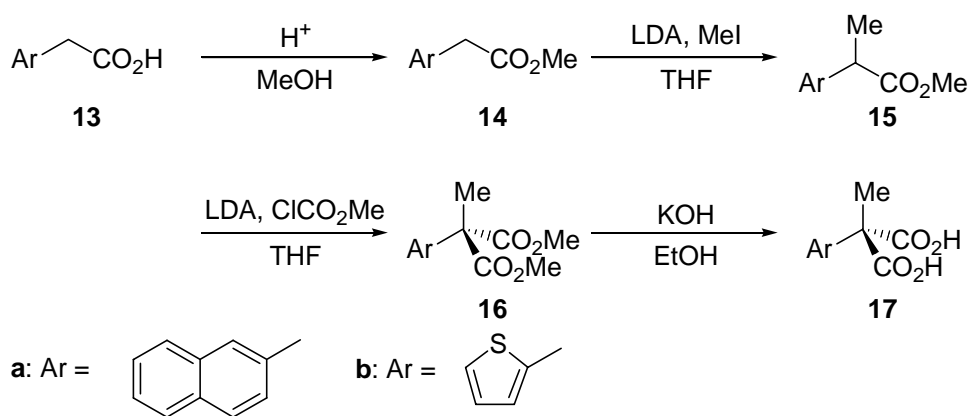
Table 4-1 G74C 変異型 AMDase によるラセミ化反応の基質特異性の検討

$$\text{Ar}-\overset{\text{R}}{\underset{\text{X}}{\text{C}}}\longrightarrow\text{Ar}-\overset{\text{R}}{\underset{\text{X}}{\text{C}}}$$

Sub.	Ar	R	X
1	Ph	Me	CO <sub>2</sub> H
2	2-Np	Me	CO <sub>2</sub> H
3	2-Th	Me	CO <sub>2</sub> H
4	Ph	NH <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> H
5	Ph	OH	CO <sub>2</sub> H
6	Ph	Et	CO <sub>2</sub> H
7	Ph	<i>i</i> -Pr	CO <sub>2</sub> H
8	Ph	<i>n</i> -Pr	CO <sub>2</sub> H
9	Ph	Me	CH <sub>2</sub> OH
10	Ph	Me	CONH <sub>2</sub>
11	Ph	Me	CN
12	Ph	Me	CO <sub>2</sub> Me

#### 4-6 基質特異性測定のための基質合成

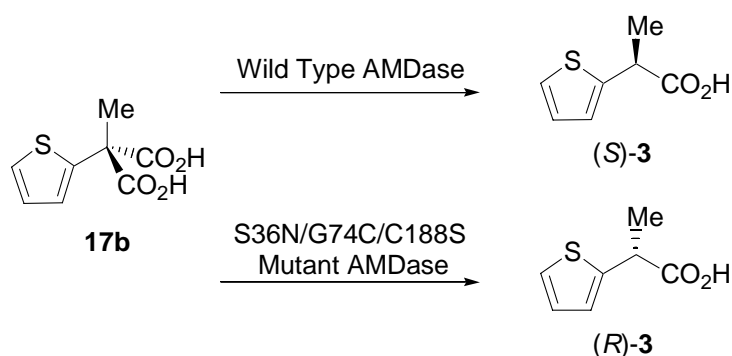
2-フェニルプロピオン酸(1)、フェニルグリシン(4)、マンデル酸(5)、2-フェニルブタン酸(8)および 2-フェニルプロパノール(9)は市販品から光学活性体を容易に入手できた。2-ナフチルプロピオン酸(2)、2-チエニルプロピオン酸(3)は、以下に示すようにマロン酸誘導体 16a, 16b を合成し、続いて野生型の AMDase による不斉脱炭酸反応にて *R* 体の 2-ナフチルプロピオン酸 ((*R*)-2)および *S* 体の 2-チエニルプロピオン酸(*S*)-3を得た。同様にして前章で得られた S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase を利用した不斉脱炭酸反応にて、*S* 体の 2-ナフチルプロピオン酸 ((*S*)-2)および *R* 体の 2-チエニルプロピオン酸 ((*R*)-3)を得た(Scheme 4-5、4-6、4-7)。



Scheme 4-5 アリールメチルマロン酸の合成

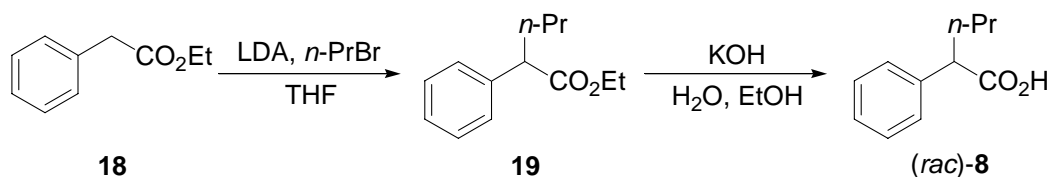


Scheme 4-6 野生型・変異型 AMDase によるナフチルプロピオン酸の両鏡像体の合成



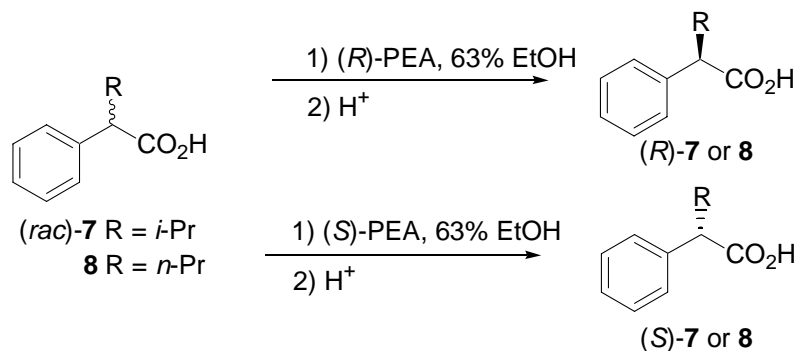
Scheme 4-7 野生型・変異型 AMDase によるチエニルプロピオン酸の両鏡像体の合成

2-フェニルペンタン酸(*rac*)-8は、以下 Scheme 4-8 に示すようにフェニル酢酸エステル(18)に 位の置換基を導入し、加水分解することで得た(Scheme 4-8)。必要とするのは光学活性体であるためこのラセミ体を光学分割することとした。光学分割の方法として、フェネチルアミンによる塩形成能の違いを利用して光学活性体を得ることとした。



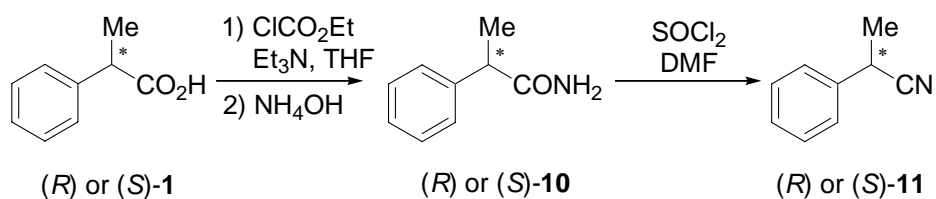
Scheme 4-8 フェニルペンタン酸の合成

ラセミ体のカルボン酸と光学活性なフェニルエチルアミンをエタノール水溶液中で混合、温めて溶解させ、徐々に冷やすことでジアステレオマーの塩の結晶性の違いから一方の鏡像体を取り出した<sup>19,20</sup>。(R)-フェニルエチルアミンからは R 体のカルボン酸が、(S)-フェニルエチルアミンからは S 体のカルボン酸が高い光学純度で得られた(Scheme 4-9)。



Scheme 4-9 フェネチルアミンによる光学分割

光学活性なアミド **10** およびニトリル **11** は対応するカルボン酸の光学活性体からクロロギ酸エチル、トリエチルアミンとアンモニア水を用いてアミドへと変換し光学活性なアミドを得た<sup>21)</sup>。続いてアミドを塩化チオニル、DMF で処理することで光学活性なニトリルへと変換した(Scheme 4-10)<sup>22)</sup>。



Scheme 4-10 カルボン酸誘導体の合成

#### 4-7 G74C 変異型 AMDase の基質特異性

作成した光学活性な化合物を基質として用いて、G74C 変異型酵素によるラセミ化反応の基質として認識されるかどうか反応を試みた(Table 4-2)。

Table 4-2 G74C 変異型 AMDase によるラセミ化反応の基質特異性

Sub.	Ar	R	X	Activity
1	Ph	Me	CO <sub>2</sub> H	++
2	2-Np	Me	CO <sub>2</sub> H	+++
3	2-Th	Me	CO <sub>2</sub> H	+++
4	Ph	NH <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> H	+
5	Ph	OH	CO <sub>2</sub> H	+
6	Ph	Et	CO <sub>2</sub> H	+
7	Ph	<i>i</i> -Pr	CO <sub>2</sub> H	-
8	Ph	<i>n</i> -Pr	CO <sub>2</sub> H	-
9	Ph	Me	CH <sub>2</sub> OH	-
10	Ph	Me	CONH <sub>2</sub>	-
11	Ph	Me	CN	-
12	Ph	Me	CO <sub>2</sub> Me	-

その結果、マロン酸誘導体の脱炭酸反応においても良好な基質となる Ar が 2-フェニル 1、2-ナフチル 2、2-チエニル 3 の化合物が高いラセミ化の反応性を示した。2-フェニルプロピオン酸(1)のラセミ化の反応性を基準にすると、2-ナフチルプロピオン酸(2)、2-チエニルプロピオン酸(3)では数倍の反応性であった。また、フェニルグリシン(4)やマンデル酸(5)においてもラセミ化が観測されたが、その比活性は 2-フェニルプロピオン酸(1)と比べて小さいものであった。これらの化合物はマロン酸誘導体の脱炭酸反応でも活性が弱いものであった。一方、位の置換基がメチルより炭素一つ分大きいエチルである 2-フェニルブタン酸(6)では、対応するマロン酸誘導体の脱炭酸反応は進行しないのに対し、G74C 変異型 AMDase を用いたラセミ化反応は進行することが確認できた。この基質のみに関しては、これまでの脱炭酸反応とラセミ化反応の基質特異性の類似性から外れていることになる。置換基がエチ



ルより大きくプロピルとなるとラセミ化反応はまったく観測されないことから、位の置換基の大きさが基質認識に大きく関与していることは間違いないと考えることができる。同様に、置換基 X のカルボン酸部分をアルコール 9 やアミド 10、ニトリル 11、エステル 12 に変換した化合物でもラセミ化の反応が全く進行しないことから、ラセミ化反応の基質認識にはカルボン酸部分も必須であることが判明した。また、AMDase と相同性を有していることから、グルタミン酸、アスパラギン酸をラセミ化させる能力がないかと期待して D-グルタミン酸、D-アスパラギン酸を基質として試してみたが、基質として認識されないことが判明した。AMDase の基質には、上記の位の置換基の大きさと、カルボン酸部分の必要性の他に、芳香族環が直接位についていることが必要なため、これらのアミノ酸はラセミ化されないのではないかと推定できる。

ところで、位の置換基 R がエチルの場合、これまでの AMDase の脱炭酸反応では反応の進行が確認できなかった。これは、中間体での置換基 R と芳香環上の水素が同一平面状に存在できないからではないかと考えることができる。同様の理由で、芳香環上のオルト位の置換基がクロロの場合でも、位のメチル基との立体障害で脱炭酸反応が進行しないことが知られている (Figure 4-4)<sup>23)</sup>。

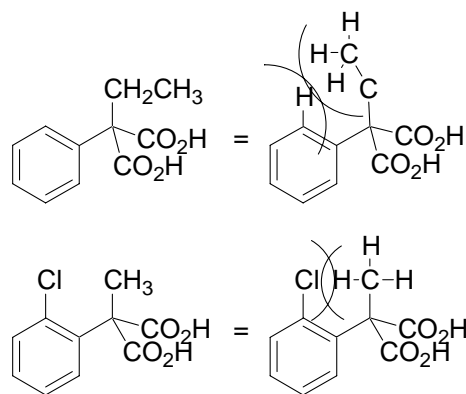


Figure 4-4 オルト位に置換基を含んだマロン酸誘導体

そこで、位の置換基がエチルの場合でもラセミ化反応の進行が確認されたことから、同じようにベンゼン環上のオルト位の置換基と位のエチル基との立体障害が存在するような化合物 13,14 を設定し、ラセミ化反応が進行するか確認した (Figure 4-5)。

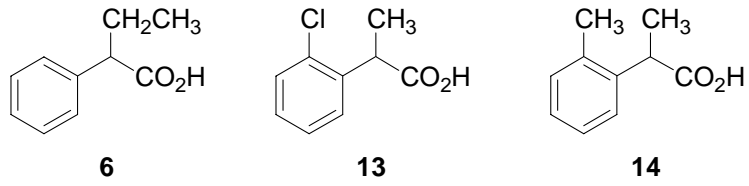
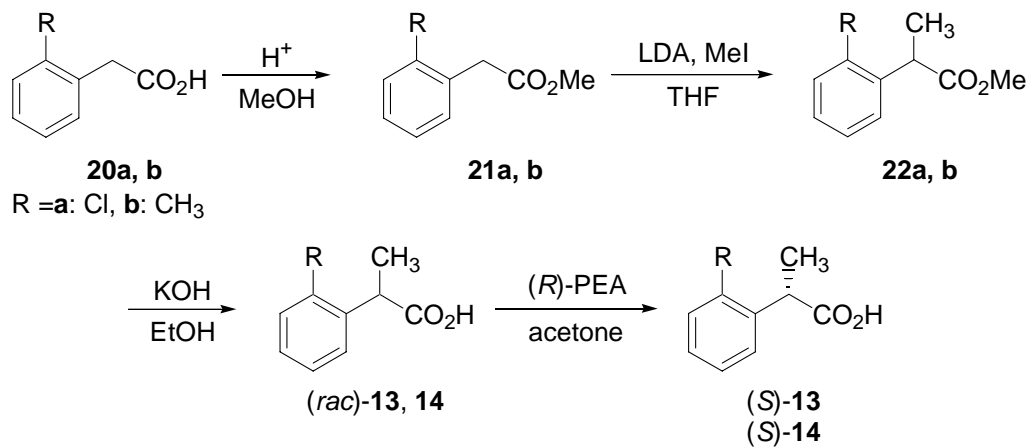


Figure 4-5 ラセミ化反応の新たな基質候補

それぞれの基質は、一般的な方法にてラセミ体を合成した後、フェネチルアミンによる光学分割により光学活性な基質(*S*)-13、(*S*)-14 を合成した(Scheme 4-11)。



Scheme 4-11 基質合成

合成した光学活性な基質を利用して、G74C 変異型 AMDase によるラセミ化反応を行ったところ、R がエチルの場合と同様にオルト位に置換基としてメチル、クロロが存在していてもラセミ化反応が進行することが確認できた。この結果から、本ラセミ化反応では、位の置換基とベンゼン環上のオルト位の置換基の立体的な障害は、野生型 AMDase の脱炭酸反応と比較して緩やかであることが推定できる。しかし、そのラセミ化反応の速度は、オルト位に置換基にないものと比較して低下していたことから、立体障害が影響しているのではないかと推測できる。

Table 4-3 G74C 変異型 AMDase によるラセミ化反応の基質特異性

Sub.	Ar	R	X	Activity
<b>1</b>	Ph	Me	CO <sub>2</sub> H	++
<b>6</b>	Ph	Et	CO <sub>2</sub> H	+
<b>13</b>	2-ClPh	Me	CO <sub>2</sub> H	+
<b>14</b>	2-MePh	Me	CO <sub>2</sub> H	+

#### 4-8 Kinetics の測定

*R* 体 *S* 体それぞれの反応性の違いを調べるため、また、基質間での反応性の違いを確かめるため、速度論的パラメータを測定した。数種類の基質の濃度で反応速度を測定し Lineweaver-Burk プロットを作成、 $k_{cat}$ 、 $K_m$  の値を求めた。

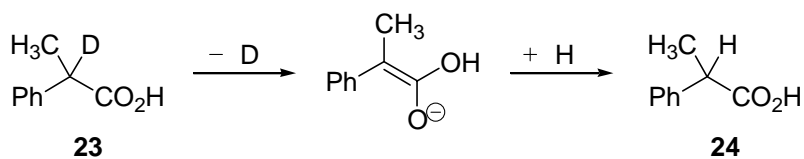
まず、*R* 体および *S* 体の 2-フェニルプロピオン酸(1)の  $k_{cat}$ 、 $K_m$  を求めたところ、酵素の効率を表す  $k_{cat}/K_m$  は *R* 体 *S* 体ともに同程度であったことから、G74C 変異型 AMDase は *R* 体も *S* 体も同程度にラセミ化する能力があることが判明した。続いて、様々な基質を用いて比活性の測定を行った。Ar がナフチル(化合物 2)やチエニル(化合物 3)では、2-フェニルプロピオン酸(1)の反応性を 100 とすると、それぞれ 720,350 の活性を示した。また、R がエチル(化合物 8)では約 1/5 の活性、マンデル酸(5)では 1/8、フェニルグリシン(4)では 1/20 の活性であった。野生型 AMDase による対応するマロン酸類の脱炭酸反応の比活性においても、今回のラセミ化反応と同様の傾向が見られたことから、脱炭酸とラセミ化は同じ活性部位で反応しており、置換基による同様の影響を比活性に与えていると推定できる(Table 4-4)。

Table 4-4 G74C 変異型 AMDase の各基質に対するラセミ化反応の速度論的パラメータ

Sub	Ar	R	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $mM^{-1}s^{-1}$ )	Relative Activity
1	Ph	CH <sub>3</sub>	17.4	1.34	0.077	100
2	Naphthyl	CH <sub>3</sub>	31.4	18.8	0.60	720
3	Thienyl	CH <sub>3</sub>	75.4	20.7	0.27	350
4	Ph	NH <sub>2</sub>	3.90	0.015	0.0038	14
5	Ph	OH	55.6	0.59	0.011	5
6	Ph	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	4.63	0.032	0.0070	23
13	2-MePh	CH <sub>3</sub>	48.47	0.028	0.00058	0.75
14	2-ClPh	CH <sub>3</sub>	51.17	0.0062	0.00012	0.15

#### 4-9 G74C 変異型 AMDase の反応機構の検討

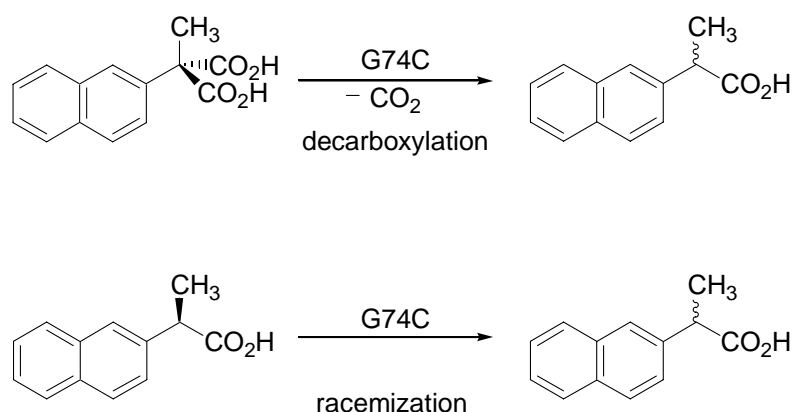
G74C 変異型 AMDase の反応機構として、基質の 位のプロトン H が引き抜かれてエノラートを経由し、反対側からプロトン化されることでラセミ化が進行していると推定した。それを確かめるために 位の水素を重水素 D で置換した基質を作成し、ラセミ化の過程で普通の水素 H と入れ替わるかを  $^1\text{H}$  NMR を用いて測定してみることとした。普通の水溶液中(重水でなく)で反応を行えば、反応の進行(G74C 変異型 AMDase による反応はラセミ化反応だが、重水を含んだこの基質はラセミ体であるため、厳密にはラセミ化反応ではない)に伴い 位の D が引き抜かれ、系中に大過剰に存在する H と交換が進行し、最終的には D 化率の減少した生成物が得られるのではないかと考えた。実際に反応を行ってみると、D 化率 99%の基質 23 が D 化率 10%以下へと変換されていること(24)が確認でき、反応中間体としてエノール型中間体を経由していることが確かめられた(Scheme 4-12)。



Scheme 4-12 D 化基質を用いたラセミ化の反応機構

#### 4-10 G74C 変異型 AMDase の脱炭酸活性

AMDase の元々の活性は脱炭酸反応を触媒するものである。変異を導入した G74C AMDase の脱炭酸活性を調べてみると、変異を導入したにも関わらず、脱炭活性が残存していることが以前の研究から判明している<sup>24)</sup>。その脱炭酸生成物の立体選択性のないラセミ体であった。つまり、G74C 変異型酵素は元々の脱炭酸反応を保持しているのみならず、変異導入によってラセミ化反応を触媒する能力を付加され、一つの酵素で同時に二つの反応を触媒することができる。ここで、一つの疑問が沸いてくる。G74C 変異型酵素の脱炭酸生成物にラセミ体を与えるのは、ラセミ化の作用によるものなのかということである。つまり、脱炭酸により光学活性体が生成し、同時に保持しているラセミ化活性によりラセミ化を受け、結果的にラセミ体が観測されているのか、または、脱炭酸生成物自体がラセミ体であるのか、ということである。これら二つの可能性を調べてみることにした(Scheme 4-13)。

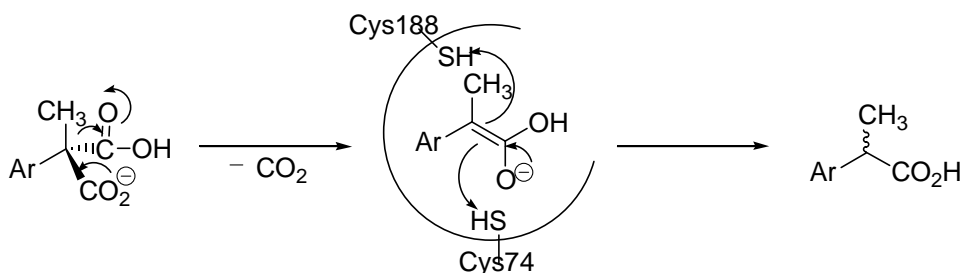


Scheme 4-13 G74C 変異型 AMDase による脱炭酸活性とラセミ化活性

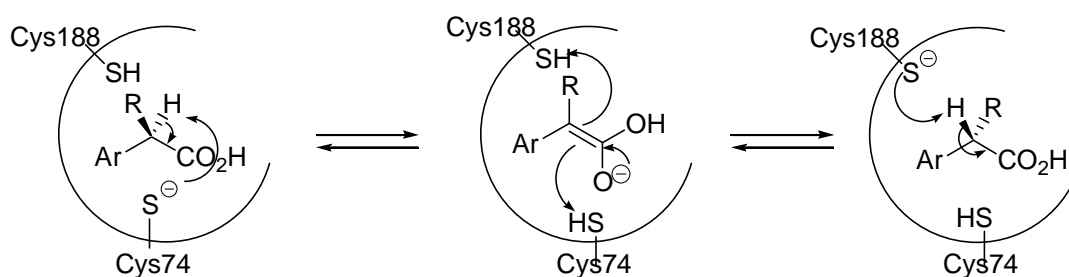
各反応の Kinetics を測定したところ、それぞれの比活性は脱炭酸反応が 0.96 ( $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ )、ラセミ化反応が 0.56 ( $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ )と脱炭酸反応のほうが値が大きいことが判明した。これは、反応系中でラセミ化反応の速度よりも脱炭酸反応の速度のほうが速いことを示しており、脱炭酸反応が反応全体の立体選択性を制御しているということを示している。つまり、脱炭酸反応生成物自体がラセミ体であり、脱炭酸反応後にラセミ化反応を受けてラセミ体になった訳ではないことが判明した。また、反応の極く初期の段階の生成物の光学純度を測定したところ、ラセミ体であったことから脱炭酸反応自体がラセミ体を与えていることが確認できた。

#### 4-11 G74C 変異型 AMDase の反応機構

以上の結果から、G74C 変異型 AMDase の脱炭酸反応での中間体エノレートに対するプロトンの付加は、新たに導入したシステイン残基と元からあるシステイン残基による両面から行われていること、その結果、生成物もラセミ体となることが確かめられた(Scheme 4-14)。また、ラセミ化においても両側に存在するシステイン残基の働きにより、グルタミン酸ラセマーゼ同様、位のプロトンの引き抜き、エノレート中間体を経て、反対側からのプロトン供与という機構にてラセミ化が進行していると確認できた(Scheme 4-15)。



Scheme 4-14 G74C 変異型 AMDase による脱炭酸反応の機構



Scheme 4-15 G74C 変異型 AMDase によるラセミ化反応の機構

#### 4-12 他の変異型酵素 AMDase でのラセミ化活性

これまで 74 番目に変異を導入した AMDase によるラセミ化反応を調べてきたが、他の場所に変異を導入した AMDase ではどうであろうか。74 番目と 188 番目に変異を導入した G74C/C188S 二重変異型 AMDase は立体選択性が逆転することが判明しているが、同様に 71 番目と 188 番目に変異を導入した S71C/C188S でもその選択性は低いものの立体選択性が逆転した。そこで、74 番目の代わりに 71 番目にシステインを導入した S71C 変異型 AMDase でも同じようなラセミ化反応を触媒する能力があるのではないかと考えた。実際に S71C 変異型酵素を作成し、活性を測定してみたところ、予想に反して残念ながらラセミ化活性は確認できなかった。また、対応するマロン酸の脱炭酸反応においてもラセミ体を与えることなく野生型と同様 *R* 体の生成物を与えることが確認できた。

また、74 番目のシステインの代わりに塩基性のアミノ酸残基を導入することで、プロトンの引抜のみを行い、反対側の 188 番目のシステインからプロトン供与を行い、ラセミ体から一方の鏡像体への変換(デラセミ化反応)が可能かどうか試みた。塩基性のアミノ酸残基としてヒスチジン、アルギニンを導入してみたが、どちらもラセミ化反応もデラセミ化反応も促進することはなかった。



#### 4-13 まとめ

相同性を有するラセマーゼ・イソメラーゼとの反応機構の比較から、グルタミン酸ラセマーゼをモデルに、新たに AMDase にラセマーゼの活性を付与することを試みた。すなわち、AMDase の活性中心の 188 番目のシステインと反応中間体を挟んで反対側に位置するであろう 74 番目のグリシンをシステインへ改変した。期待通り、作成した G74C 変異型 AMDase は種々の基質に対してラセミ化活性を有しており、また、元の脱炭酸活性をも有していた。

反応機構に関する実験から、予想通り中間体としてエノール型反応中間体を経由し、中間体の両側に存在すると予想しているシステイン残基によるプロトン化、引き抜きによりラセミ化が進行していることが確かめられた。

本変異体はマロン酸誘導体の脱炭酸活性も保持していた。両側に存在するシステインの働きによって G74C 変異型酵素ではラセミ体を与えることが予想されたが、実際に実験によって確かめることができた。脱炭酸反応はエノラート中間体の生成と、それに対するプロトン化であると提唱している反応機構が支持されたことになる。

#### 4-14 参考文献

- 1) Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas R. J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 6032-6040
- 2) Kazlauskas R. J., *Curr Opin Chem Biol*, **2005**, *9*, 195-201
- 3) Rotticci, D.; Rotticci-Mulder, J. C.; Denman, S.; Norin, T.; Hult, K., *CheoBioChem*, **2001**, *2*, 766-770
- 4) Magnusson, A. O.; Rotticci-Mulder, J. C.; Santagostino, A.; Hult, K., *ChemBioChem*, **2005**, *6*, 1051-1056
- 5) Schmidt, M.; Hasenpusch, D.; Kahler, M.; Kirchner, U.; Wiggenghorn, K.; Langel W.; Bornscheuer, U. T., *CheoBioChem*, **2006**, *7*, 805-809
- 6) Yow, G-Y.; Watanabe, A.; Yoshimura, T.; Esaki, N., *J. Mol. Catal. B:Enzymatic*, **2003**, *23*, 311-319
- 7) Branneby, C.; Carlqvist, P.; Magnusson, A.; Hult, K.; Brinck, T.; Berglund, P., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 874-875
- 8) Branneby, C.; Carlqvist, P.; Hult, K.; Brinck, T.; Berglund, P., *J. Mol. Catal. B:Enzymatic*, **2004**, *31*, 123-128
- 9) Asano, Y.; Kira, I.; Yokozeki, K., *Biomol., Eng.*, **2005**, *22*, 95-101
- 10) Carlqvist, P.; Svedendahl, M.; Branneby, C.; Hult, K.; Brinck, T.; Berglund, P., *ChemBioChem*, **2005**, *6*, 331-336
- 11) Skander, M.; Humbert, N.; Collot, J.; Gradibaru, J.; Klein, G.; Loosli, A.; Sauser, J.; Zocchi, A.; Gilardoni, F.; Ward T. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 14411-14418
- 12) Babbitt, P.; Gerlt, J. A., *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 30591-30594
- 13) Babbitt, P. C.; Hasson, M. S.; Wedekind, J. E.; Palmer, D. R.; Barrett, W. C.; Reed, G. H.; Rayment, I.; Ringe, D.; Kenyon, G. L.; Gerlt, J. A., *Biochemistry*, **1996**, *35*, 16489-16501
- 14) Gulick, A. M.; Palmer, D. R. J.; Babbitt, P. C.; Gerlt, J. A.; Rayment, I., *Biochemistry*, **1998**, *37*, 14358-14368
- 15) Gerlt, J. A.; Babbitt, P. C.; Rayment, I., *Arch. Biochem. Biophys.*, **2005**, *433*, 59-70
- 16) Gallo, K. A.; Tanner M. E.; Knowles, J. R., *Biochemistry* **1993**, *32*, 3991-3997
- 17) Glavas, S.; Tanner, M. E., *Biochemistry* **1999**, *38*, 4106-4113
- 18) Glavas, S.; Tanner, M. E., *Biochemistry* **2001**, *40*, 6199-6204
- 19) Fogassy, E.; Nogradi, M.; Kozma, D.; Egri, G.; Palovics, E.; Kiss, V., *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, *4*, 3011-3030

- 20) Yamaye, M.; Okano, H.; Motoyanagi, Y.; Cho N., Yoshinaga, T.; Tsuru, T.; Mukae, K., *Synthesis*, **2004**, 341-344
- 21) Kawamoto, S.; Endo, R.; Ishikawa, K.; Kojima, K.; Miyauchi, M.; Nakayama, E., *Synlett*, **1995**, 575-577
- 22) Gore, P. H.; Kamounah, F. S., *Synth. Commun.*, **1980**, *10*, 319-323
- 23) Miyamoto, K.; Ohta, H.; Osamura, Y., *Bioorg. Med. Chem.*, **1994**, *2*, 469-475
- 24) Ijima, Y.; Matoishi, K.; Terao, Y.; Doi, N.; Yanagawa, H.; Ohta, H., *Chem. Commun.* **2005**, *21*, 877-8779

# 本論

## 第五章

### AMDase のアルドラーゼ活性

## 5-1 AMDase と enolase superfamily の関係

第4章で示したように、反応機構を考察し、部位特異的な変異を導入することで、AMDaseが脱炭酸反応に加えて、ラセミ化反応を触媒できることが判明した。これは、エノール型中間体を經由してプロトン供与を受けるというAMDaseの反応機構と、相同性を有するラセマーゼとの反応機構の比較から達成された酵素(AMDase)のpromiscuityの一例であると言える。脱炭酸反応を触媒する酵素からラセミ化酵素への変換は、エノラート中間体がキーワードとなっている。エノラートは、有機反応においても、生体内の反応においても重要な役割を果たしている化学種であり、様々な反応の中間体として知られている。このようなエノラートを經由する酵素群はエノラーゼスーパーファミリーとして知られている<sup>1-3)</sup>。エノラーゼスーパーファミリーにはマンデル酸をラセミ化する酵素マンデル酸ラセマーゼ<sup>4)</sup>や脱水反応でエノールを作るエノラーゼ<sup>5)</sup>などが分類されている。エノラーゼスーパーファミリーの酵素群は一般的にはMg<sup>2+</sup>などの二価金属イオンを補因子として含むなどAMDaseと若干異なった性質を示すことが知られているが<sup>6)</sup>、位のプロトンの引き抜き、エノラート反応中間体を經由するといった共通点からAMDaseもエノラーゼスーパーファミリーに属していると分類することができる。エノラート中間体を經由した反応としては、アルドール反応<sup>7)</sup>、マイケル付加反応<sup>8)</sup>やマンニッヒ反応<sup>9)</sup>などが知られている。生体内においても、アルドール縮合やクライゼン縮合<sup>10)</sup>などエノラートを利用した重要な反応が存在している。

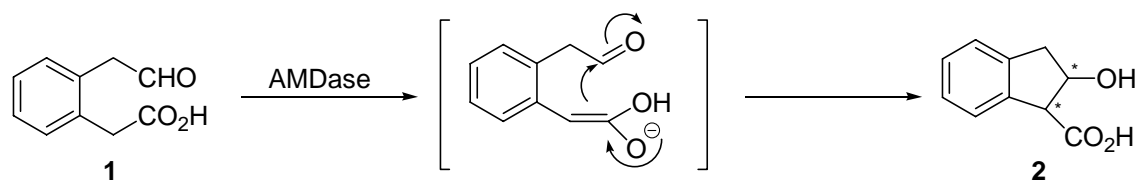
生体触媒の中でも最もよく研究されている酵素の一つにリパーゼが挙げられる。リパーゼは脂質を加水分解する酵素であり、数々の微生物由来のリパーゼに関して特異性の測定や機能改変、X線結晶構造解析、詳細な反応機構の解析など多くの研究が行われている。近年、リパーゼの反応機構の考察とそれに基づく変異の導入により、反応中間体としてエノラートを作成し、リパーゼの反応部位においてアルドール型の反応を起こすような改変型リパーゼを作成した例が報告されている<sup>11,12)</sup>。また、同様のエノラートを利用した反応として、リパーゼの活性部位でマイケル付加を行った例も報告されている<sup>13)</sup>。これらリパーゼにおけるアルドール反応・マイケル付加反応の報告例は、本来のリパーゼの触媒する反応とは異なったものであり、リパーゼの”promiscuity”の一つだと言える。

本章では、AMDaseにも”promiscuity”が存在するのではないかと考え、第4章のラセミ化活性に加え、AMDaseが他の触媒反応を示す可能性について検討を行った結果について述べる。対象とする反応は、脱炭酸反応の中間体のエノラートを利用し

たアルドール反応である。アルドール反応は、エノラートがカルボニル炭素を求核的に攻撃することで新たな炭素-炭素結合を作る反応である。反応中間体のエノラートの近傍に、求核攻撃を受けやすいアルデヒド基を導入し、AMDaseによるアルドール反応が起こるかどうか調べることにした。

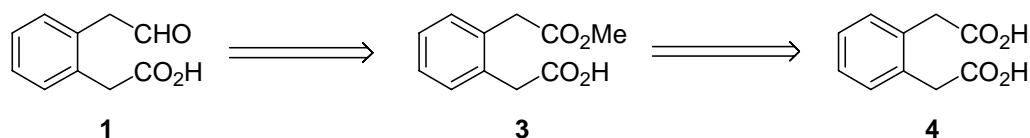
## 5-2 基質の設定と合成その1

第4章で述べたラセミ化酵素による反応では、プロトンの引き抜きの後、反応中間体としてエノラートを経由し、最後にプロトン化が起こるといった機構であった。ここで、中間体のエノラートに着目し、ベンゼン環のオルト位にアルデヒド基を導入することにより、分子内でアルドール縮合が起こるのではないかと期待した。すなわち、AMDaseにより 位のプロトンが引き抜かれ、生成したエノラート中間体が、酵素の活性残基からプロトン化されるのではなく、分子内の近傍アルデヒド基と反応しうるのではないかと考えた。生成物は5員環の縮合生成物が得られ、2つの不斉点が存在していることから、酵素内での反応の利点を生かした選択性が生じるのではないかと期待した(Scheme 5-1)。



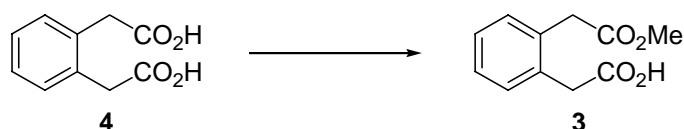
Scheme 5-1 AMDase のラセミ化反応によるアルドール型反応

アルドール反応に使用する基質 1 は、市販品のジカルボン酸 4 から出発し、中間体ハーフエステル 3 を合成し、さらに官能基変換を行うことにより合成することとした(Scheme 5-2)。



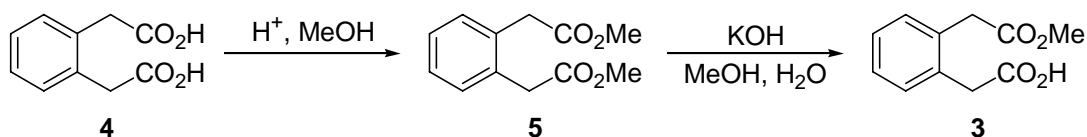
Scheme 5-2 基質の合成計画

まず、中間体のハーフエステル 3 を得るため、種々ジカルボン酸 4 から直接モノエステル化を試みたが、良い結果は得られなかった(Scheme 5-3)。そこで、一旦ジエステル 5 を経由した後、一方のエステルのみを加水分解することとした。



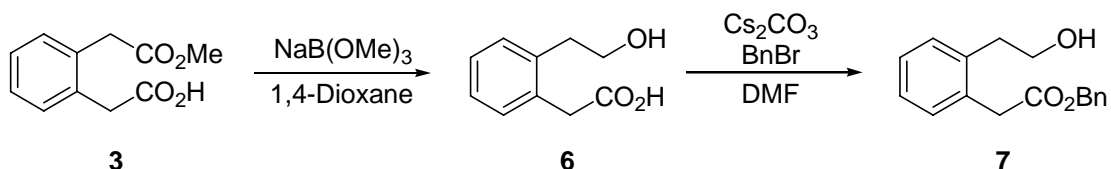
Scheme 5-3 ハーフメチルエステル化

市販品のジカルボン酸 **4** を、酸触媒の存在下メタノールと加熱還流することでジエステル **5** を得た。続いて、一等量の水酸化カリウムを用いて加水分解することで合成中間体ハーフエステル **3** を得た。この段階では、加水分解がさらに進行したジカルボン酸が生成してきてしまうために、収率は高いものではなかった。しかし、一段階で変換する方法より効率が高かったためこのルートを採用することとした (Scheme 5-4)<sup>14)</sup>。



Scheme 5-4 メチルエステル化と加水分解によるハーフエステルの合成

ハーフエステル **3** を 1,4-ジオキサン中水素化トリメトキシホウ素ナトリウムにて還元し、アルコール **6** を得た<sup>15)</sup>。続いて、アルコールをアルデヒドへと酸化する際に障害となるであろうカルボン酸部分に保護基を導入することとした。保護基としてまず *t*-ブチル基を検討したが、脱保護の段階で不具合が生じたために断念した。脱保護の容易さからベンジルエステルによる保護をすることとした。炭酸セシウムとベンジルブロミドによりカルボキシル基をベンジル保護したアルコール **7** を得た (Scheme 5-5)<sup>16)</sup>。

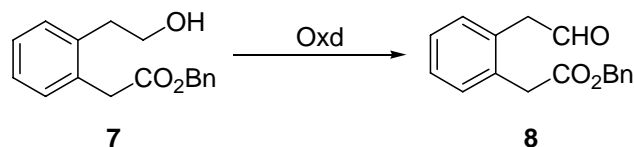


Scheme 5-5 還元とベンジル保護

続いて、アルコール **7** のアルデヒドへの酸化を種々検討した。PCC 酸化<sup>17)</sup>、Dess-Martin 酸化<sup>18)</sup>などいくつかの酸化剤を試したが、どれも収率が悪い、副生成

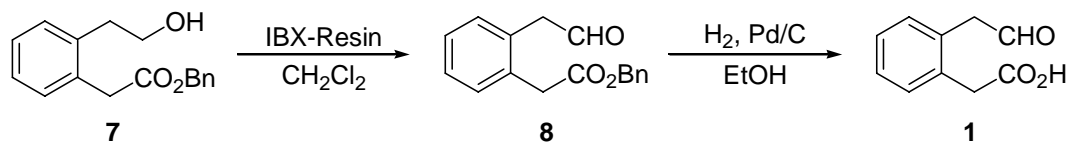


物が生成してしまうなど問題があった(Scheme 5-6)。



Scheme 5-6 酸化剤の検討

種々検討した結果、Dess-Martin 試薬の一段階前の中間体である IBX(o-ヨードキシ安息香酸)を樹脂に固定化した IBX-Resin<sup>19)</sup>を用いることで、収率の改善、単一生成物の取得が可能となり、簡便な酸化方法により目的とするアルデヒド(8)へと変換することができた(Scheme 5-7)。

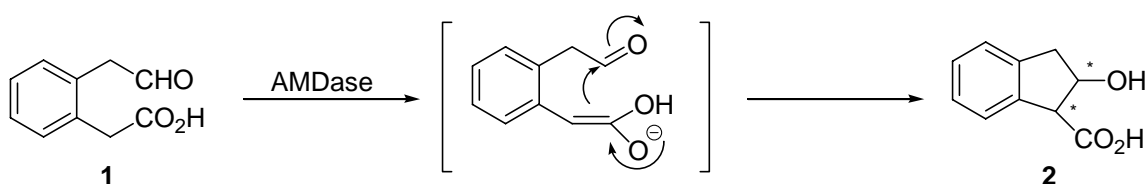


Scheme 5-7 IBX による参加と水素添加

最終段階は、パラジウム炭素触媒存在下、水素添加によりベンジル基の脱保護を行い、化合物 1 を得た。合計 6 段階にて、市販品のジカルボン酸から目的とするアルデヒド基を近傍に含んだ化合物 1 を合成した。

### 5-3 アルドラーゼ活性の測定その1

合成した化合物 **1** を基質として用い、AMDase によるラセミ化反応の中間体を利用したアルドール反応を試みた。酵素はラセミ化活性を有している G74C 変異型 AMDase を用い、これまでのラセミ化反応の際と同じ条件にて反応を行ってみたが、目的とする反応の進行は確認できなかった。反応温度、pH など条件をいくつか検討してみたが、反応の進行は確認できず、出発物質が回収されるにとどまった (Scheme 5-8)。

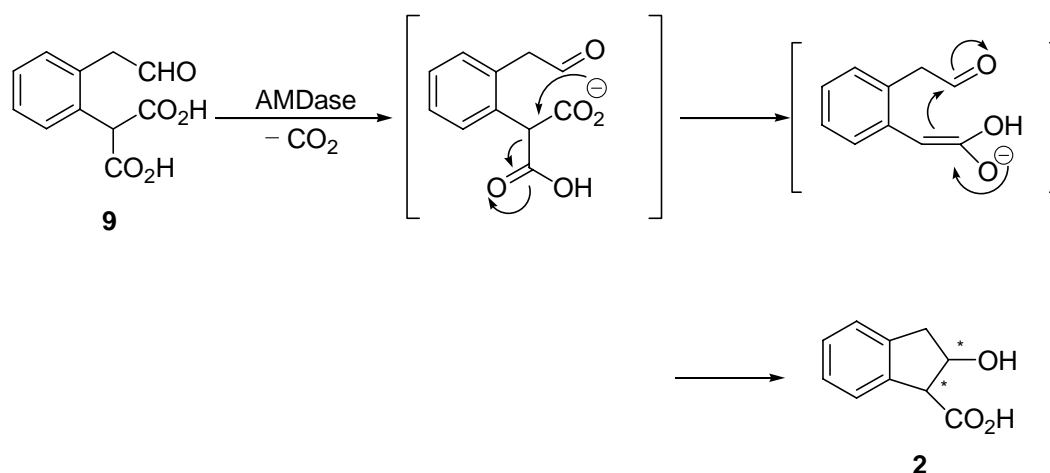


Scheme 5-8 AMDase のラセミ化能によるアルドール型反応の測定

反応が進行しなかった理由として、基質のオルト位の置換基の立体的大きさが大きいことから酵素の活性部位に入り込まなかったことや、エノラート中間体が生成されなかった、また生成されてもうまくアルデヒド基と反応しなかったなどの可能性が挙げられる。しかし、詳細を検討することなく次の可能性を試してみることとした。

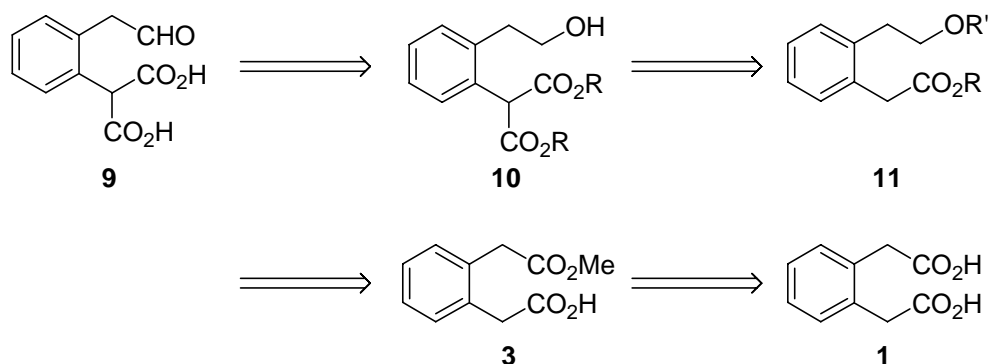
### 5-4 基質の設定と合成その2

続いて、ラセミ化反応の中間体であるエノラートを利用するのではなく、AMDase の元々の反応である脱炭酸反応のエノラート反応中間体を利用すれば、アルドール反応が進行するのではないかと考えた。すなわち、基質としてマロン酸タイプの化合物 **9** を設定し、AMDase による脱炭酸反応後エノール型中間体を經由し、その際にアルドール反応が起こるのではないかと期待した(Scheme 5-9)。



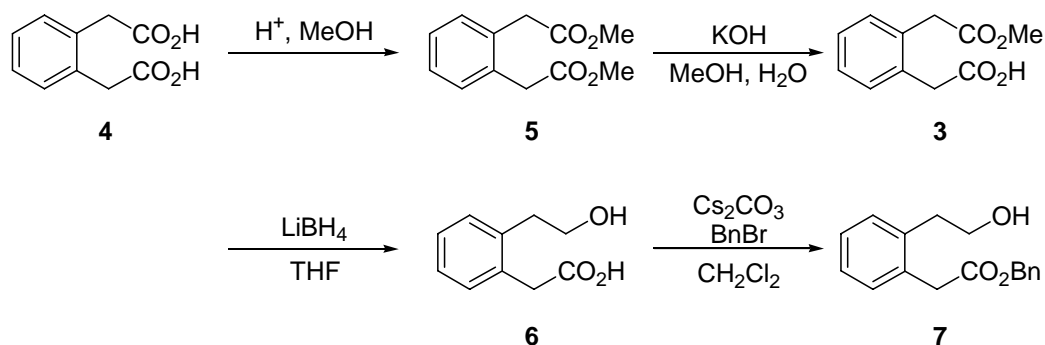
Scheme 5-9 AMDase の脱炭酸活性によるアルドール型反応

基質の合成は、市販品のジカルボン酸 **1** を出発物質とし、モノカルボン酸化(3)した後、官能基変換、アルコール部の保護(11)、マロン酸誘導体へ変換し、最後にアルコール(10)を酸化しアルデヒド基に変換し、脱保護を行い **9** を合成するというルートで行うこととした(Scheme 5-10)。



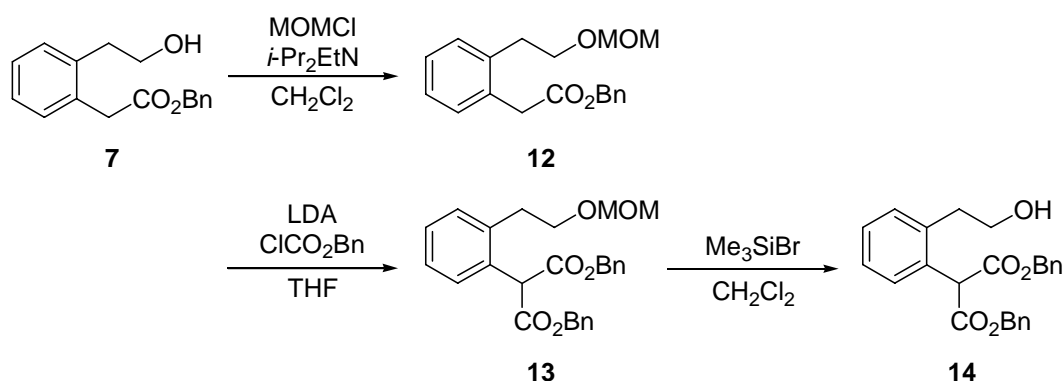
Scheme 5-10 基質の合成計画

先と同様の方法にて、ジカルボン酸 **4** からジメチルエステル **5** を経て、加水分解することでハーフエステル **3** を得た。続いて、水素化ホウ素リチウムを用いてアルコールへ **6** と還元した後、ベンジル保護体 **7** を得た(Scheme 5-11)。



Scheme 5-11 ベンジル保護体アルコールの合成

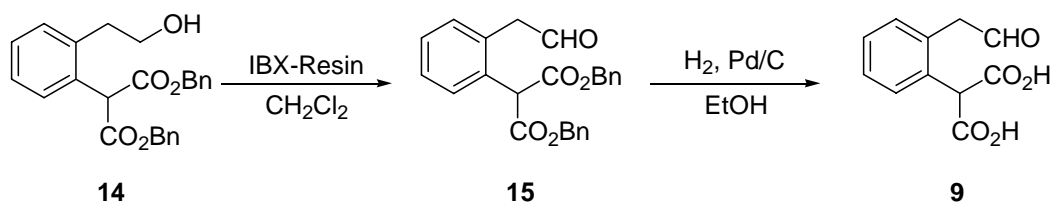
次に、アルコール部分の保護と脱保護の検討を行った。アセチル(Ac)基、ピバモイル(Pv)基やメトキシメチル(MOM)基などのアルコール保護基を試してみたところ、保護脱保護の容易性・効率性の面から MOM 基を採用することとし、ジイソプロピルエチルアミン存在下、クロロメチルメチルエーテル(MOMCl)を作用させることで<sup>20)</sup>、アルコール部分の MOM 保護体 **12** を得た。次に、塩基 LDA とクロロギ酸ベンジルによりベンジルオキシカルボニル基を導入し(化合物 **13**)、続いて、トリメチルシリルプロミドにより MOM 基の脱保護を行った (化合物 **14**) (Scheme 5-12)<sup>21)</sup>。



Scheme 5-12 アルコールの保護脱保護とベンジルオキシカルボニル基の導入

アルコール **14** の酸化は、前述の化合物 **1** の場合と同様、PCC・Dess-Martin 酸化などを試してみたが、IBX-Resin による酸化が最も効率的であった。最後にパラジウム炭素触媒下水素添加によりベンジルの脱保護を行い、アルデヒド基を含んだマ

ロン酸タイプの基質 **9** を合計 9 段階にて合成することに成功した(Scheme 5-13)。

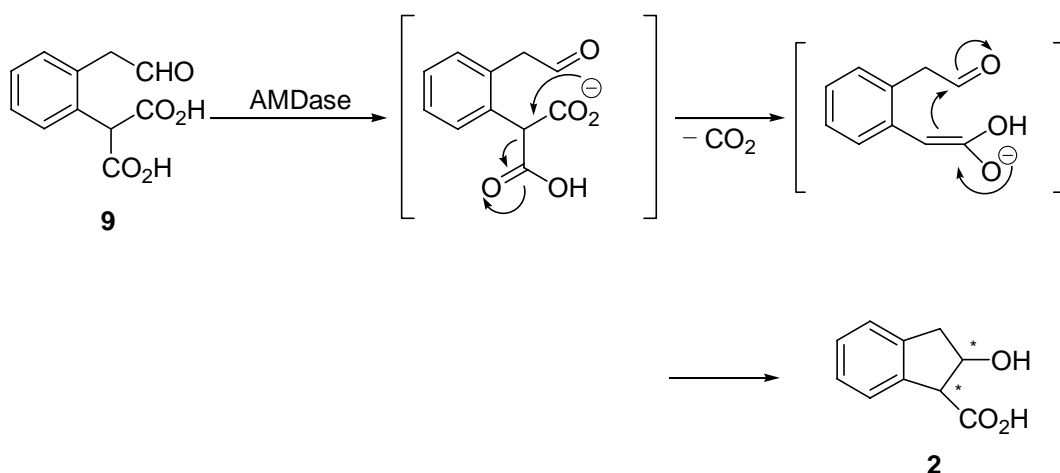


Scheme 5-13 IBX による参加と水素添加による基質の合成

合成した基質を用いて AMDase の脱炭酸反応によるアルドール反応を試してみることとした。

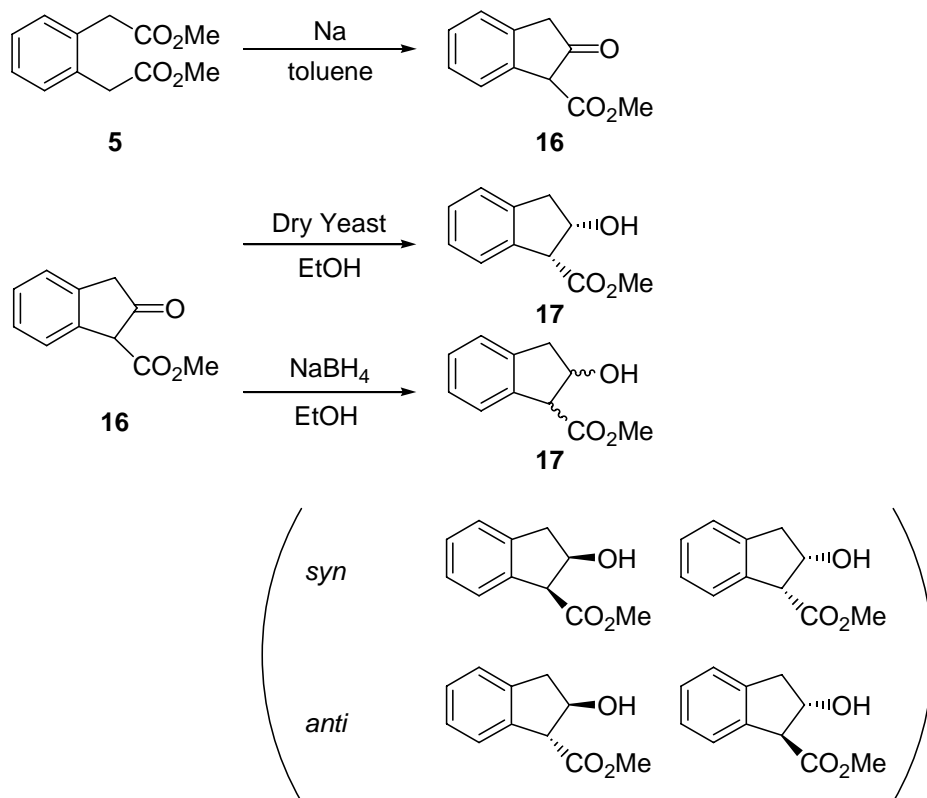
## 5-5 アルドラーゼ活性の測定その2

これまでと同じ反応条件にて脱炭酸反応の検討を行った。使用した酵素は脱炭酸反応であることから、変異の導入されていない野生型の AMDase を使用した。緩衝液中、35 °C で 12 時間反応させた後、塩酸により反応を停止した。エーテルで抽出、精製したところ生成物が得られた(Scheme 5-14)。得られた生成物を同定するために、他の合成法で予想される化合物を合成し、物性値などを比較することとした。



Scheme 5-14 AMDase の脱炭酸反応によるアルドール反応測定

アルドール縮合生成物をこれまでの合成例に従い、以下のように合成した。また、アルドール縮合生成物には不斉点が2つあることから、4つの立体異性体が存在する。生成物の立体異性体を識別するために、各異性体を別途合成することにした。ジエステル化合物を塩基存在下、Dieckmann 縮合させることで環化生成物 **16** を得た<sup>22)</sup>。続いて、水素化ホウ素ナトリウムで還元することで4種の立体異性体の syn 体、anti 体をそれぞれ混合物 **17** として得た。また、ドライイーストを用いて還元することで、syn 体の光学活性体である **17** の(1*S*, 2*R*)体を得た<sup>23)</sup>。AMDase による生成物を解析する際には、メチルエステルへと変換し既知化合物の物性値と比較した(Scheme 5-15)。

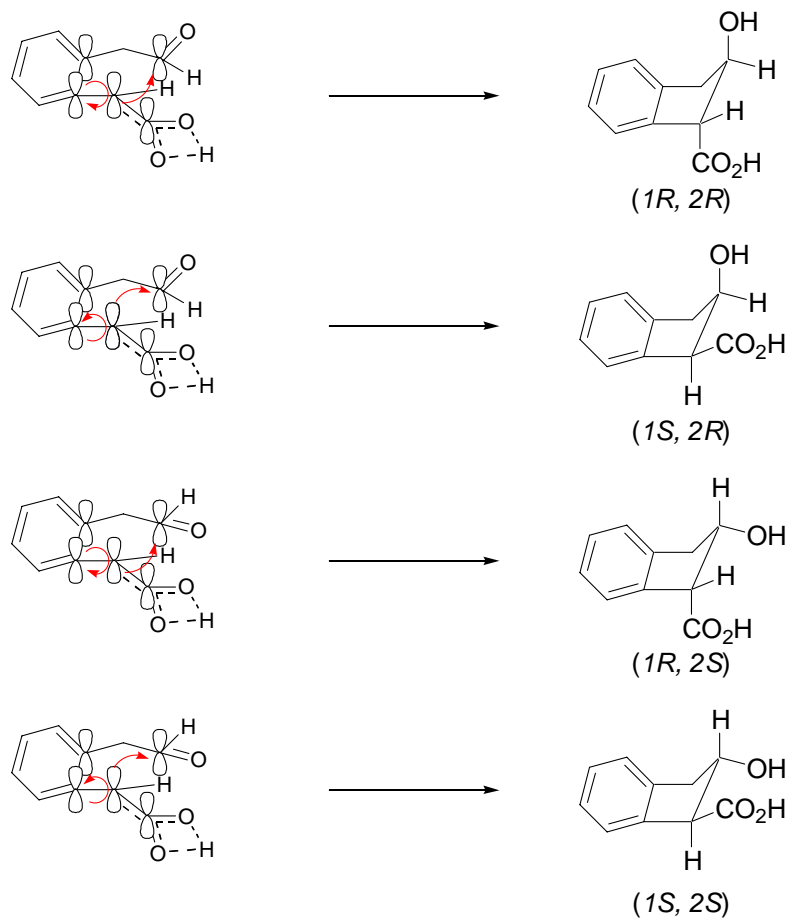


Scheme 5-15 パン酵母を用いた各立体異性体の合成

標品との NMR データの比較から、脱炭酸により得られた生成物は、目的とするアルドール縮合反応が進行したものであることが確認できた。また、アルドール縮合生成物の立体化学を標品と比較し確認したところ、残念ながら反応に立体選択性はないことが明らかになった。酵素内で反応が進行するアルドール反応であるため、生成物に立体選択性が出現することを期待したが、残念ながら本反応では見られなかった。

エノール中間体へのプロトン化は、基質と酵素の触媒残基間の立体的配置で生成物の立体配置が決まる。しかし、アルドール反応の立体配置は酵素と基質とのインタラクションで決まるわけではなく、分子内での反応であるため分子内でのコンフォーメーションの関係で決まる(Scheme 5-16)。そのため、アルドール反応に立体選択性が見られなかったのではないかと推定できる。

しかし、アルドール縮合した環化化合物が得られたことから、予想通り脱炭酸後エノラート中間体を經由し、近傍のアルデヒド基とアルドール反応することを確認できた。

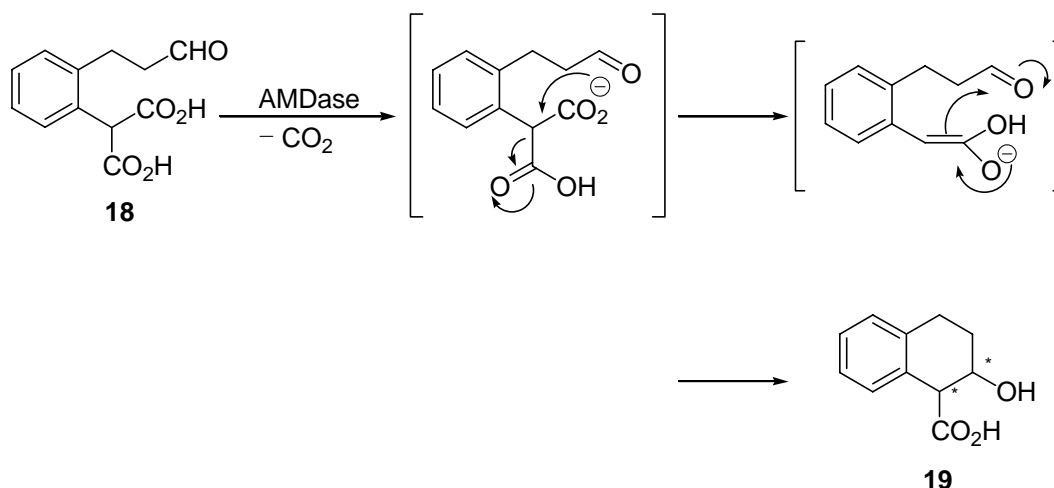


Scheme 5-16 アルドール反応の立体選択性



### 5-6 基質の設定と合成その3

次に、アルドール生成物が5員環ではなく6員環ではどうであろうかと、以下のような基質を設定し、試すこととした(Scheme 5-17)。



Scheme 5-17 AMDase の脱炭酸反応を利用したアルドール型反応2

6員環のアルドール生成物を得るためには、アルデヒド基側の炭素数を一つ増やす必要(化合物 18)かマロン酸側の炭素を増やす必要(化合物 20)がある(Figure 5-1)。

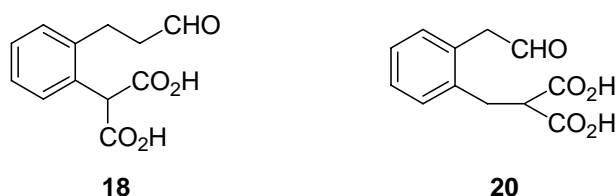
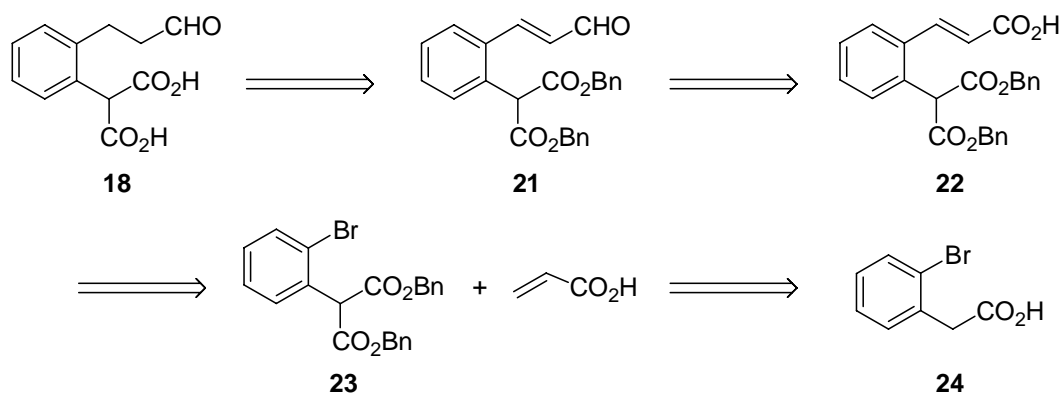


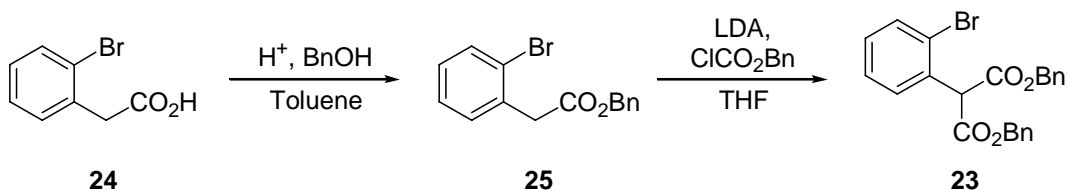
Figure 5-1 アルドール型反応のための基質の設定

しかし、マロン酸側に一つ炭素を挿入すると AMDase の基質特異性の制限である芳香族環がマロン酸の 位に直接付いていなければならないという規則に反するため、アルデヒド基側の炭素数を一つ増やした化合物 18 を使用する基質として設定した。具体的には、ハロゲン化アリールとオレフィンのクロスカップリングによる Mizoroki-Heck 反応により合成することとした<sup>24,25)</sup>。容易に入手可能な 2-ブロモフェニル酢酸 24 から、マロン酸誘導体 23 へ変換後、アクリル酸との Mizoroki-Heck 反応により基質の炭素骨格を構築した(化合物 22)。続いて、酸化還元などの官能基変換、脱保護を経て目的とする基質 18 を合成しようと計画した(Scheme 5-18)<sup>26)</sup>。



Scheme 5-18 基質の合成計画

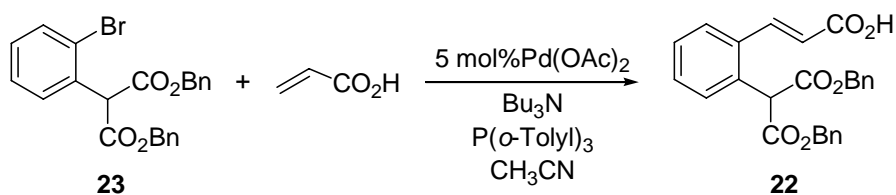
市販品の 2-ブロモフェニル酢酸(24)をトルエン中、酸触媒とベンジルアルコールによりベンジルエステル化(化合物 25)した後、塩基 LDA とクロロギ酸ベンジルによりマロン酸誘導体 23 を得た(Scheme 5-19)。



Scheme 5-19 ベンジルエステル化とベンジルオキシカルボニル基の導入

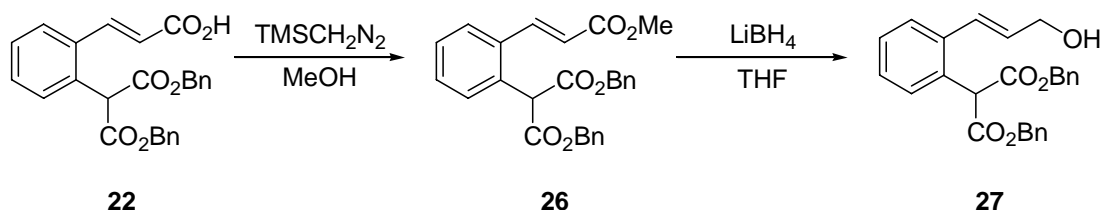
続いて、クロスカップリングさせるための Mizoroki-Heck 反応の条件検討を行った<sup>25-27)</sup>。カップリングさせるオレフィンとして、アクリル酸、アクリル酸メチルエステルを試してみたところ、メチルエステルでは目的とする生成物と副生成物との混合物になってしまったため、アクリル酸をカップリングする相手として選定した。触媒となるパラジウムは酢酸パラジウム、Pd(dba)<sub>2</sub> の二種類を検討し、酢酸パラジウムを用いることとした。塩基として炭酸カリウム、トリエチルアミン、トリブチルアミンなどの中から検討の結果、トリブチルアミンを用いることとした。リン化合物としてトリフェニルホスフィン、トリ *o*-トリルホスフィンなどの中からトリ *o*-トリルホスフィンを用いることが効果的であることが判明した。溶媒として種々検討の結果アセトニトリルを利用することとした。最終的な反応条件としては、アセトニトリル中 5 mol% の酢酸パラジウム触媒、トリブチルアミン、トリ *o*-トリルホスフィンとアクリル酸、原料化合物を混合し加熱還流下撹拌することで、Mizoroki-Heck 反応により目的とするカップリング化合物 22 を効率よく合成するこ

とができた(Scheme 5-20)。



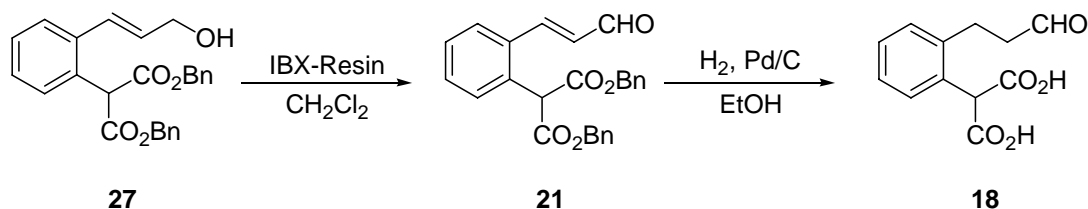
Scheme 5-20 Mizoroki-Heck 反応による基質骨格の合成

基質となる炭素骨格を構築できたので、官能基の変換により目的物へと誘導することとした。得られたカルボン酸部分をジアゾメタンによりメチルエステル **26** とし、続いて水素化ホウ素リチウムにより還元を行い、アルコール化合物 **27** を得た (Scheme 5-21)。



Scheme 5-21 還元によるアルコールの合成

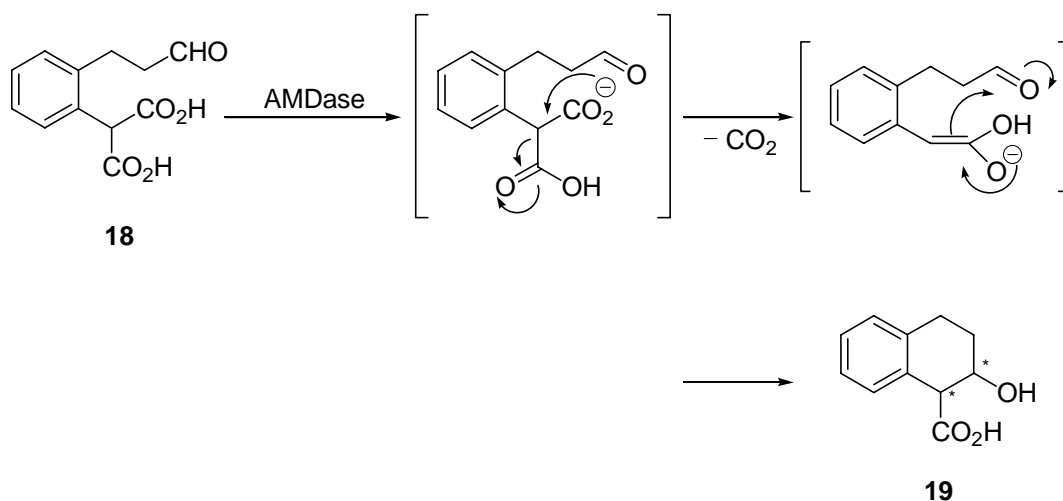
アルコール **27** からアルデヒド **21** への変換反応は、これまで同様 IBX-Resin による酸化が最も適していた。最終段階は、パラジウム-炭素触媒存在下、水素添加によりカルボン酸の保護基であるベンジルの脱保護と同時に、アルデヒドの  $\alpha,\beta$  の二重結合を還元することにより、最終目的物であるアルデヒド基を含んだマロン酸誘導体 **18** を合計 7 段階にて合成を達成した(Scheme 5-22)。



Scheme 5-22 IBX による酸化と水素添加による基質合成

### 5-7 アルドラーゼ活性の測定その3

アルドール型化合物の合成を目的として、これまでと同じ反応条件にて脱炭酸反応を行った。緩衝液中、35 °C で野生型 AMDase と 12 時間インキュベートしたのち、TLC により反応が進行したかどうか調べた。しかし、反応の進行はまったく確認されず、6 員環を形成させるような本基質では脱炭酸反応が進行しないことが判明した。AMDase による脱炭酸反応では、位の置換基の大きさや、ベンゼン環上のオルト位の置換基の大きさなどが、基質認識・反応性に影響を与えることが知られていることから、本化合物でも基質として認識できなかったのではないだろうか (Scheme 5-23)。



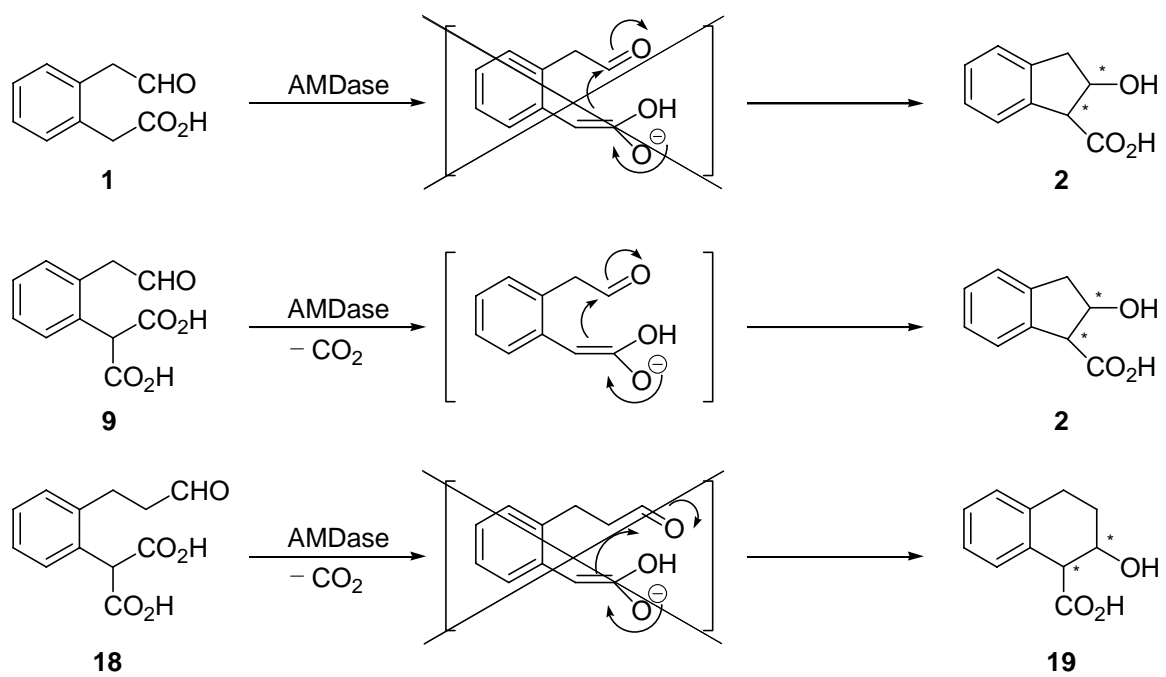
Scheme 5-23 AMDase の脱炭酸反応によるアルドール型反応2の測定

## 5-8 まとめ

以上本章をまとめると、AMDase の promiscuous な酵素活性の一つとして、前章で認められたラセマーゼ活性に加えて、アルドール反応を触媒する能力があることが判明した。ラセマーゼ活性は、相同性のある酵素の立体構造、反応機構の比較から変異を導入することで達成した。一方、本章では反応機構の考察から、反応させる基質を設定し AMDase の脱炭酸反応による反応中間体エノラートを利用したアルドール反応を達成することができた。

アルドール反応を起こさせるために、基質を 3 種類検討した。変異型酵素のラセミ化活性を利用してアルドール反応を起こさせようと考えたが、プロトンの引き抜がうまくいかなかったためか、アルドール反応の進行は確認できなかった。次に、AMDase の脱炭酸反応を利用し、反応中間体のエノラートの近傍にアルデヒド基を有するような基質を設定した。アルドール反応が起こると 5 員環が生成するような基質の脱炭酸反応を試みたところ、期待通りアルドール縮合生成物が得られてきた。しかし一方で、酵素内で起こる反応であることから立体選択性の発現を期待したが、得られてきた生成物は異性体の混合物であった。酵素内の反応とはいえ、アルドール反応自体には AMDase は酵素として関与していないのではないかと考えられる。また、6 員環が生成するような基質では、酵素内の反応ポケットに基質が入り込むことができなかったためか、反応の進行は確認できなかった(Scheme 5-24)。

アルドール型反応により、5 員環のアルドール縮合生成物が得られてきたことから、AMDase にはエノラート中間体を經由するような他の反応、例えばマイケル付加やクライゼン縮合、エノラートに対するアルキル付加といった反応も触媒できる可能性が存在していると言える。



Scheme 5-24 まとめ

## 5-9 参考文献

- 1) Babbitt, P.; Gerlt, J. A., *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 30591-30594
- 2) Babbitt, P. C.; Hasson, M. S.; Wedekind, J. E.; Palmer, D. R.; Barrett, W. C.; Reed, G. H.; Rayment, I.; Ringe, D.; Kenyon, G. L.; Gerlt, J. A., *Biochemistry*, **1996**, 35, 16489-16501
- 3) Gulick, A. M.; Palmer, D. R. J.; Babbitt, P. C.; Gerlt, J. A.; Rayment, I., *Biochemistry*, **1998**, 37, 14358-14368
- 4) Ransom, S. C.; Gerlt, J. A.; Powers, V. M.; Kenyon, G.L., *Biochemistry*, **1988**, 27, 540-505
- 5) Holland, M. J.; Holland, J. P.; Thill, G. P.; Jackson, K. A., *J. Biol. Chem.*, **1981**, 256, 1385-1395
- 6) Reed, G. H.; Poyner, R. R.; Larsen, T. M.; Wedekind, J. E.; Rayment, I., *Curr Opin Struct Biol.*, **1996**, 6, 736-743
- 7) Zimmerman, H. E.; Traxler, M. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 1920-1923
- 8) Michael, A., *J. Prakt. Chem.*, **1887**, 35, 379-
- 9) Mannich, C.; Krosche, W., *Arch. Pharm.*, **1913**, 250, 647-667
- 10) Claisen, L., *Ber.* **1887**, 20, 655-657
- 11) Branneby, C.; Carlqvist, P.; Magnusson, A.; Hult, K.; Brinck, T.; Berglund, P., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 874-875
- 12) Branneby, C.; Carlqvist, P.; Hult, K.; Brinck, T.; Berglund, P., *J. Mol. Catal. B:Enzymatic*, **2004**, 31, 123-128
- 13) Carlqvist, P.; Svedendahl, M.; Branneby, C.; Hult, K.; Brinck, T.; Berglund, P., *CheoBioChem*, **2005**, 6, 331-336
- 14) Sanna, F., *J. Heterocyclic Chem.*, **1984**, 21, 297
- 15) Arth, C.; Clemens, M.; Meise, W., *Liebigs Ann. Chem.*, **1994**, 259
- 16) Jia, Y.; Yuan, W.; Wodzinska, J.; Park, C.; Sinskey, A. J.; Stubbe, J., *Biochemistry*, **2001**, 40, 1011-1019
- 17) Corey, E. J.; Suggs, J. W., *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 2647-2650
- 18) Dess, D.B.; Martin, J. C., *J. Org. Chem.*, **1983**, 48, 4155-4156
- 19) Reed, N. N.; Delgado, M.; Hereford, K.; Clapham, B.; Janda, K. D., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, 12, 2047-2049
- 20) Marzi, E.; Spitaleri, A.; Mongin, F.; Schlosser, M., *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**, 2508-2517

- 21) Hanessian, S.; Delorme, D.; Dufresne, Y., *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25, 2515-22518
- 22) Carrick, W. L.; Fry, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, 77, 4381-4387
- 23) Didier, E.; Loubinoux, B.; Romas Tombo, G. M.; Rihs, G., *Tetrahedron*, **1991**, 47, 4941-4958
- 24) Mori, K.; Mizoroki, T.; Ozaki, A., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1973**, 46, 1505-1508
- 25) Plevyak, J. E.; Heck, R. F., *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 2454-2456
- 26) Pratt, J.; Jimonet, P.; Bohme, G. A.; Boireau, A.; Damour, D.; Debono, M. W.; Genevois-Borella, A.; Randle, J. C.; Ribeill, Y.; Stutzmann, J. M.; Vuilhorgne, M.; Mignani, S., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, 10, 2749-2754



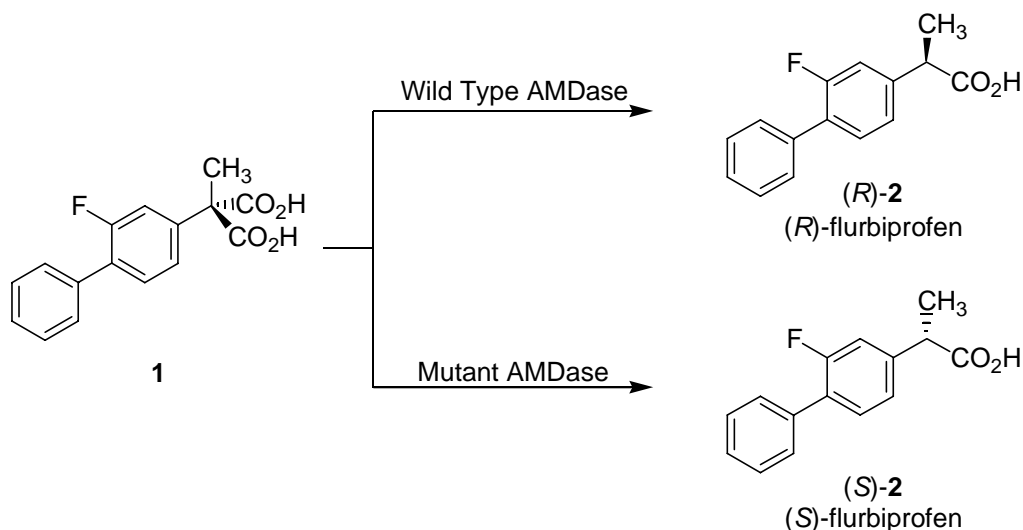


# 総括

## 総括

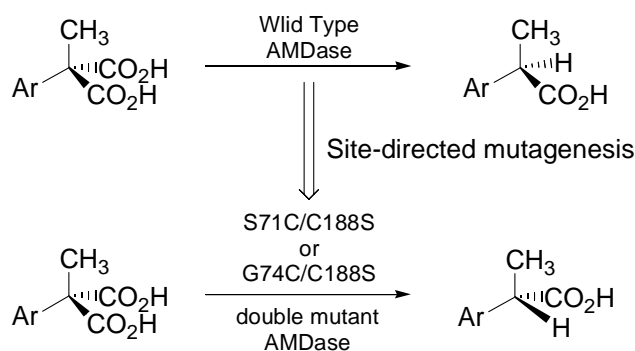
以上、5章に分けて AMDase に関する研究を詳述した。

第一章では、AMDase の高収率・高エナンチオ選択性を利用し、抗がん剤として有用な(*R*)-フルルビプロフェンの効果的な合成法の確立できたことを示した。また、不斉脱炭酸反応の立体選択性が逆転した三重変異型 AMDase を利用し、野生型が与える *R* 体とは逆の *S* 体のフルルビプロフェンを得ることに成功した。フルルビプロフェンの *S* 体は非ステロイド系抗炎症剤(NSAIDs)の一種として、抗炎症作用を有している。他の NSAIDs であるイブプロフェンやナプロキセンなどのプロフェン類もフルルビプロフェンと同様の骨格を持っていることから、同様の反応にて効率よく合成することができる可能性を持っていると言える。



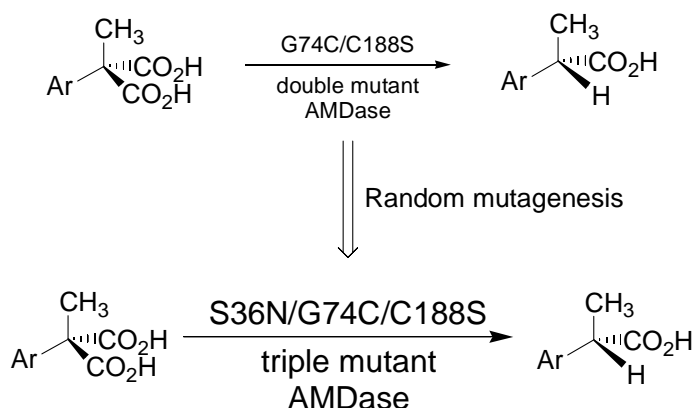
第二章では、既知酵素との相同性や立体構造、反応機構の比較から、部位特異的な変異導入を行い、2つの二重変異型酵素、G74C/C188S および S71C/C188S 二重変異型 AMDase が、野生型と比較して逆の立体選択性を示すことを明らかにした。活性部位のポケットの中で、71番目、74番目のアミノ酸残基が、活性中心188番目のアミノ酸残基と基質を挟んで反対側に存在しているのではないかと、という仮定が強く支持された結果であった。71、74番目以外の周辺の他のアミノ酸残基に変異を導入した変異型では、ヘリックスが3.6アミノ酸で一周することから、基質方向にうまくSH基が向いていなかったのではないかと推定できる。一方、立体選択性の逆転には成功したものの、二重変異型酵素の活性は大きく低下していることが判明し、解決すべき問題点として残っている。2つの変異導入により、酵素の基質が

ケットにおける活性中心のアミノ酸残基の位置が反対側に移り、活性部位の構造が変化しても、本酵素が柔軟性を持ち、逆の立体選択性を示すといった新しい酵素機能を発現することができたことから、本酵素の”promiscuity”の一端を示すことができたものとする。



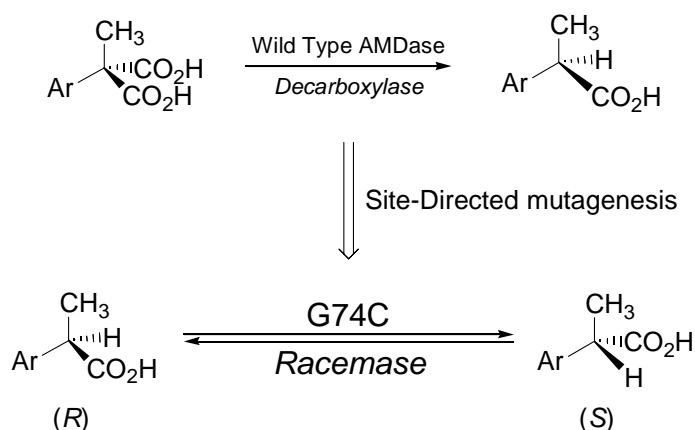
第三章では、低下した G74C/C188S 二重変異型酵素の反応性を、ランダム変異導入法により向上させることに成功した例を示した。ランダム変異導入法は、部位特異的な変異導入法と比較すると、狙った酵素機能を改変することや酵素機能の向上を一気に望むことは難しい。部位特異的な変異導入が、立体構造や反応機構に基づいて変異を導入すべきアミノ酸残基を決定し、実際に改変を行っていくという理論的な設計(rational design)なのに対し、ランダム変異導入法は遺伝子に対する変異導入とスクリーニングによる選択から、目的とする性質・機能を有した酵素を探し出すといった進化分子工学に有効な手段である。定向進化(directed evolution)とも呼ばれ、立体構造未知の酵素で理論的な設計ができない場合に、効果的な方法である。理論設計と定向進化を比較すると、理論設計のほうが有効であるように思えるが、自然界において母なる自然の手により造られた酵素に対して、人智の及ぶ「答え」が常に見つかるとは限らず、自然界における生物の進化が発達したように、酵素の定向進化が有効であることも多い。自然界に存在し高効率で物質を変換し、生命現象に深い関わりのある酵素(タンパク質)は、すでに完成された精密機械のように思えるが、これも設計されたものではなく、自然界で何億年もの時間を掛けて進化してきたものである。理論的な設計でないアプローチとしても、生物の進化がこういった変異の導入とスクリーニングの歴史であったことから、定向進化が間違った方法ではないことは明らかである。しかし、実際問題として長い時間掛けて選択することは不可能なので効率的なスクリーニング方法の開発が鍵段階となる。BTB を含んだプレート上での培養によるカラーアッセイ法にてスクリーニングを行い、酵素

機能の向上した三重変異型 AMDase を得ることができた。得られた活性の向上した変異株は、元の二重変異に加え、36 番目セリンがアスパラギンへと変換された S36N/G74C/C188S 三重変異型であることが判明した。この変異型酵素は、元の二重変異型酵素と比較して約 10 倍の酵素活性を示すことが判明した。しかし、野生型と比較すると十分に活性が回復したとは言えず、さらなる酵素活性の向上が望まれる。



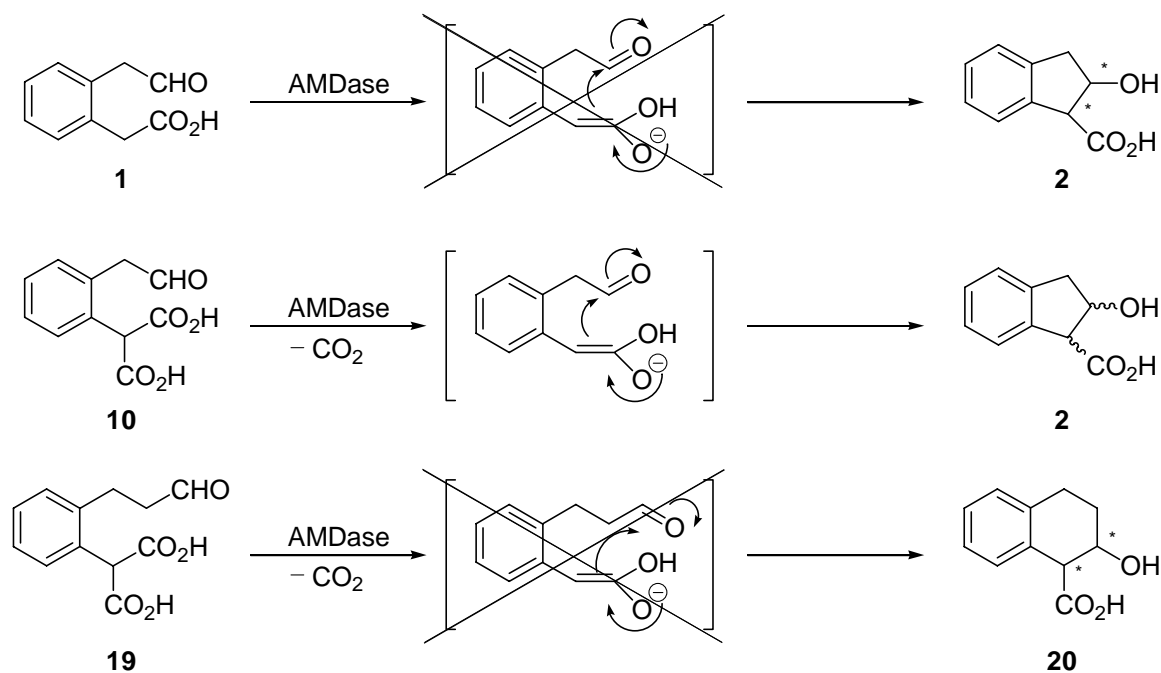
第四章では、AMDase の”promiscuity”、すなわち、柔軟な反応性・機能として、変異型酵素にラセマーゼ機能を付与することに成功した例を述べた。AMDase の元々の酵素機能は不斉脱炭酸反応であり、ラセミ化反応とは全く異なる反応であった。しかし、反応中間体を推定することや、相同性を有する既知酵素との比較、反応機構を考察することにより、部位特異的に変異を導入し、ラセミ化反応を触媒させることができた。基質が結合する活性部位の本来の活性中心である 188 番目のシステイン残基とは反対側に、新たな活性部位(G74C)を導入した。これは、同じファミリーに属し、ある程度の相同性を有し、同じようなエノラート中間体を經由するグルタミン酸ラセマーゼの反応機構に基づいて、rational なデザインを行った結果によるものと言える。第三章で述べたように、人智の及ばない領域に対してランダム変異導入を行ったが、第四章で述べたのは、*Mother Nature* の造り出してきた酵素に対して、人間の知恵をもって変異を導入、目的とするものを創り出すことができるかどうかの試みであった。言わば、*Mother Nature* に挑戦することになる。反応機構に基づく論理的な設計から変異導入の結果、期待通りにラセマーゼ活性を有した G74C 変異型 AMDase が得られた。設計した通りの成果が得られたことから、*Mother Nature* に対して人智が及んだと思えるが、自然界に存在するラセマーゼと比較すると、そのラセマーゼ活性はまったく比べものにならないほど低いものであり、やは

り母なる自然の偉大さを再認識するものであった。しかし、AMDase の promiscuous な性質として、変異導入によりラセミ化反応を触媒することのできるようになることが明らかになり、AMDase の更なる可能性が広がってきた。一方、AMDase の相同性を検索すると、脱炭酸酵素とはほとんど相同性を示さず、ラセミ化酵素や異性化酵素と相同性を示すことが多い。また、AMDase の基質となるフェニルマロン酸が自然界で存在しないことから、自然界における菌体内に存在する AMDase の役割は不明であり、また、その由来も不明である。今回、AMDase がラセミ化反応の能力を示したことから、AMDase の起源がラセマーゼ・イソメラーゼである可能性を考えることができる。まったくの推量であるが、元来はラセミ化異性化酵素だったものが、divergent evolution(分岐進化)により脱炭酸酵素機能を獲得し、特化していったのではないかと AMDase の進化の歴史に思いを馳せることも可能である。



第五章では、反応機構の考察から経由する中間体を利用したアルドール反応の可能性を模索し、AMDase の promiscuous な性質を示した。AMDase の反応が、エノラート中間体を経由し、それに引き続きプロトン化が起こっていると推定できることから、中間体のエノラートを利用し、アルドール型反応を起こさせることができるのではないかと期待した。アルドール反応は、脱炭酸反応、ラセミ化反応とはまったく異なる反応であるが、中間体にエノラートを経由するといった意味では、同じ反応様式であると言える。エノラートは種々の化学反応や、生体内での生合成経路中でもキーワードとなる重要な中間体である。このエノラートと反応するよう、近傍にアルデヒド基を導入した基質を rational にデザインした。ラセミ化の中間体エノラートを利用した系では、アルドール生成物を得ることができなかったが、脱炭酸を利用した系では、アルドール型反応を経た後、環化した生成物を

得ることができた。しかし、炭素数を一つ伸張すると反応は進行しないことが判明した。酵素は光学活性なアミノ酸から構成されており、しかもヘリックスシートなどの二次構造に加え複雑な三次元構造をとっていることから、酵素の反応場は立体異性体の認識能があることが多い。本反応も、酵素内で起こる反応であるために、生成物に立体選択性が発現されることを期待したが、得られてきた生成物は複数の立体異性体が混合したものであった。



上記のように、AMDase と相同性を有するグルタミン酸ラセマーゼの反応機構と立体構造に基づいて変異導入を行い、AMDase の機能改変を行った。機能改変の方法としては、rational design による部位特異的な変異導入法と網羅的なランダム変異導入法と効果的なスクリーニングを組み合わせた定向進化(directed evolution)の両方法にて行い、いくつか AMDase の機能改変を行うことで、AMDase の promiscuous な性質の可能性を示すことができたと考える。

## 実験の部



## 使用機器・試薬一覧

核磁気共鳴スペクトルは、日本電子 JEOL JNM GX-270 ( $^1\text{H}$  NMR, 270 MHz)、および日本電子 JEOL JNM AL-300 ( $^1\text{H}$  NMR, 300 MHz)を用いた。

赤外吸収(IR)スペクトルは、日本分光 JASCO FT/IR-410 を用いて測定した。

DNA シーケンサーは、ABI PRIZM DNA Sequencer Model 3100 を用いた。

タンパク質、核酸の吸光度測定には島津 UV-2100S UV-Visible Recording Spectrophotometer もしくは島津 BIOSPEC-MINI 100V を使用し、光路長 1 cm のセルを用いた。

サーマルサイクラーは MJ Research PTC-200 を用いた。

アガロース電気泳動は ADVANCE Co.Ltd. Mupid を用いた。

UV トランスイルミネーターは Upland UV transiluminator NM-20 を用いた。

高速液体クロマトグラフィーには、島津 LC-5A、センシュー科学社製 SSC-3461、SSC-5410、TSK-GEL ODS-80TM、HITACHI 社製 UV Detector L-7405、L-7110、ダイセル科学社製 CHIRALCEL-OJ、CHIRALCEL-OD、CHIRALCEL-OB、CROWNPAK CR(+)、ナカライテスク社製 Cosmosil 5C<sub>18</sub>-MS- を使用した。

シリカゲルカラムクロマトグラフィーには、関東化学 シリカゲル 60N (63-210 mesh) を用いた。

分析用薄層クロマトグラフィー(TLC 板)は Merck 1.05715 を用いた。

分取用薄層クロマトグラフィーは Merck 1.05744、および Merck 1.05717 を用いた。

融点測定は、柳本製作社製微量融点測定装置 Yanaco MP-S3 を用いた。融点の補正は行っていない。

旋光度測定には、日本分光 JASCO DIP-360 Digital Polarimeter を用いた。

細胞破碎は大岳製作所製、フレンチプレスを用いて行った。

超音波破碎機は TOMY 社製 UD-201 を用いた。

DNA のライゲーションは、TOYOBO 社製 Ligation High を使用した。

アガロースゲルからの DNA の回収には、TAKARA RECOCHIP を使用した。

タンパク濃度の測定には、BIO-RAD PROTEINASSAY を使用した。

宿主大腸菌、制限酵素、修飾酵素、ベクター、XL1-Red その他分子生物学関連試薬は宝酒造、東洋紡、Stratagene、Invitrogen、Promega、日本ジーンより購入した。

DNA シーケンス用の試薬は Applied Biosystems 社製 Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing を用いた。

酵素精製用ゲルは、TSKgel DEAE-Toyopearl、Butyl-Toyopearl を東ソーより購入した。

酵素精製には BIO-RAD 社製グラジエントポンプ ECONO GRAGIENT PUMP EGP、ADVANTEC 社製フラクションコレクターSF-2120 を用いた。

SDS-PAGE 用の電気泳動は、アトー ラビダス二連ミニスラブ電気泳動装置 AE-6500W、クロスパワー1000 AE-8400 を用いた。

高速冷却遠心機には、日立 CR22、または himac CR 20GII を用いた。

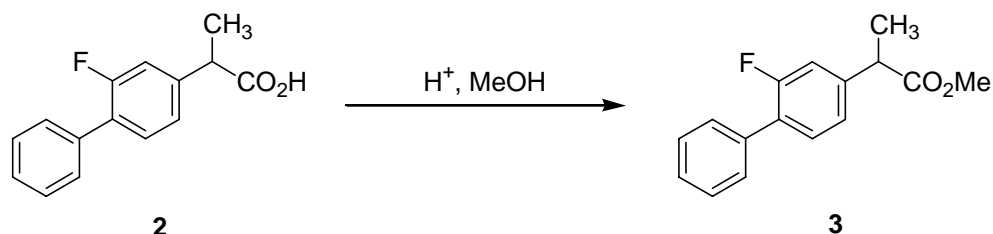
限外ろ過には、Amicon Cell 8200 を用いた。

真空凍結乾燥機は共和真空技術株式会社製 RLS-10NA を用いた。

その他有機化学試薬は Aldrich、和光純薬、ナカライテスク、関東化学、東京化成、メルクから購入し、必要なものは適宜精製して利用した。

## 実験の部

## 第一章

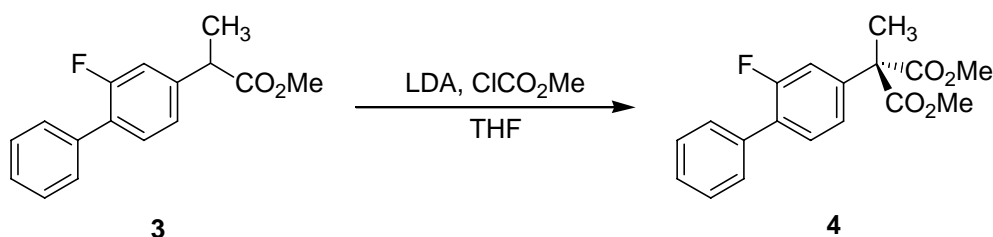


## Methyl 2-(2-fluoro-4-biphenyl)propanoate (3)

市販品の(*rac*)-flurbiprofen [2-(2-fluoro-4-biphenyl)propionic acid] (2) (3.00 g, 12.1 mmol)と触媒量の *p*-トルエンスルホン酸一水和物をメタノール 20 mL に加え、加熱還流下 3 時間撹拌した。メタノールを減圧下留去し、酢酸エチルを用いて抽出した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。硫酸マグネシウムを濾過した後、減圧下溶媒を留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル = 3 / 1)で精製し目的物 3 (3.12 g, 99%)を無色液体として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.52 (3H, d,  $J=7.3$  Hz), 3.68 (3H, s), 3.75 (1H, q,  $J=7.1$  Hz), 7.07-7.52 (8H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$ : 2982, 2951, 1737, 1642, 1582, 1563, 1515, 1484, 1418, 1376, 1333, 1198, 1132, 1073, 1010, 974, 920, 875, 834, 767, 725, 699, 577  $\text{cm}^{-1}$

Dimethyl  $\alpha$ -(2-fluoro-4-biphenyl)- $\alpha$ -methylmalonate (4)

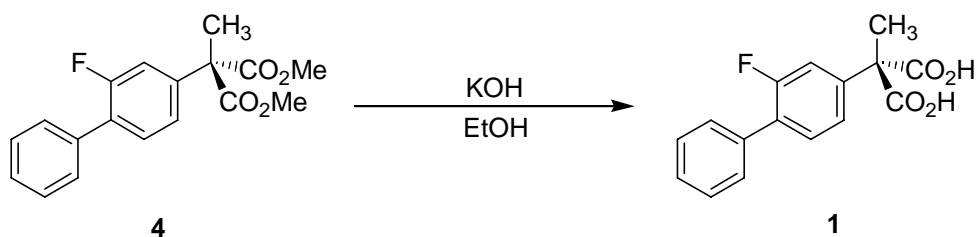
アルゴン雰囲気下、 $-78^\circ\text{C}$  にて diisopropylamine(3.40 mL, 24.2 mmol) / THF (20 mL) に、*n*-butyl lithium のヘキサン溶液(15.6 mL, 24.2 mmol)を滴下して LDA を調製した。滴下終了後 30 分間その温度で撹拌した。この溶液に Methyl 2-(2-fluoro-4-biphenyl)propanoate (3) (3.12 g, 12.1 mmol) の THF 溶液 (20 mL) を加え、30 分間 $-78^\circ\text{C}$  で撹拌した。次に、クロロギ酸メチル(2.10 mL, 24.2 mmol)を加え、温度を $-78^\circ\text{C}$  から室温(約  $22^\circ\text{C}$ )へと自然昇温させ、2 時間撹拌した。2 M 塩酸 (10 mL)を加えてクエン

チした後、酢酸エチルを用いて抽出、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、濾過、減圧下溶媒を留去した。ヘキサン/酢酸エチルから再結晶することにより目的物 **4** (1.73 g, 95%) を無色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.89 (3H, s), 3.78 (6H, s), 7.07-7.52 (8H, m)

IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 3465, 2958, 1707, 1583, 1485, 1408, 1267, 1176, 1128, 940, 764, 724, 697, 578  $\text{cm}^{-1}$

mp: 116-117 °C



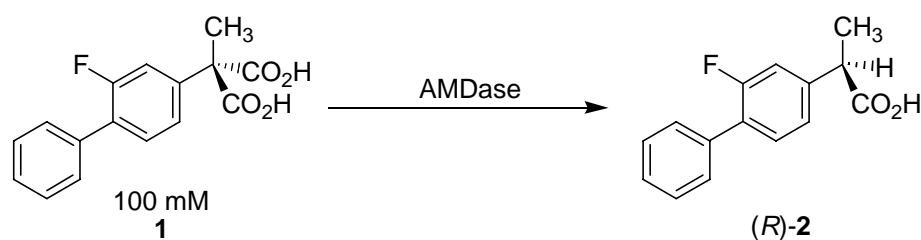
#### 2-(2-fluoro-4-biphenyl)-2-methylmalonic acid (**1**)

50 mL ナスフラスコに Dimethyl 2-(2-fluoro-4-biphenyl)-2-methylmalonate (**4**) (3.44 g, 10.9 mmol) のエタノール溶液 (100 mL) と、水酸化カリウム (6.10 g, 109 mmol) 水溶液 (20 mL) を混合し、氷水浴中で 1 時間攪拌した。濃塩酸 (10 mL) を加えた後、減圧下エタノールを留去しエーテルを用いて抽出した。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、濾過、減圧下溶媒を留去した。得た残留物をヘキサン/酢酸エチルから再結晶することにより、目的物 **1** (2.68 g, 85%) を白色結晶として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 1.76 (3H, s), 7.16-7.47 (8H, m)

IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 3442, 1707, 1409, 1128, 937, 767, 751, 722, 697, 579, 457  $\text{cm}^{-1}$

mp: 155-156 °C



(R)-2-(2-fluoro-4-biphenyl)-2-methylpropionic acid ((R)-2)

2-(2-fluoro-4-biphenyl)-2-methylmalonic acid (**1**) (576 mg, 2 mmol) を 1 M Tris-HCl(pH 8.5)緩衝液 2 mL に溶解させ、蒸留水を加えて 10 mL とした。20 mL ナスフラスコに、基質水溶液 2 mL (400 μmol)と精製野生型 AMDase 酵素溶液 2 mL (2 mg protein)を加え、30 °C で 40 分間攪拌した。2 M 塩酸水溶液 1 mL を加えて反応を終了した後、エーテルを用いて抽出を行った。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル / 酢酸 = 33 / 66 / 1)により精製し、目的物 (R)-2 (19.5 mg, 20%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (270MHz, CD<sub>3</sub>OD) : 1.49 (3H, d, *J*=7.0 Hz), 3.72 (1H, q, *J*=7.0 Hz), 7.16-7.47 (8H, m)

IR (KBr)  $\nu_{\max}$  : 2935, 1700, 1622, 1580, 1482, 1461, 1417, 1324, 1257, 1216, 1129, 1075, 1012, 959, 925, 874, 802, 766, 725, 698, 625, 574 cm<sup>-1</sup>

mp : 114 °C [α]<sub>D</sub><sup>21</sup> = 30.5 ° (*c* = 0.10, CHCl<sub>3</sub>)

以下の条件の HPLC により光学純度の測定を行った。

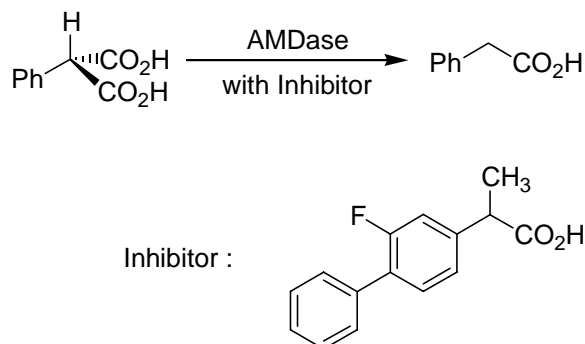
HPLC 条件

カラム : Chiralcel OD-H

移動層 : Hexane / 2-Propanol / TFA = 98 / 2 / 0.1 (v / v / v)

流速 : 1 mL / min

Retention time : R 体 13.0 min、S 体 14.2 min



フルルビプロフェンによる阻害実験

蒸留水 290 μL、1 M Tris-HCl (pH 8.5)緩衝液 50 μL、各種濃度(20 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM, 200mM)のフェニルマロン酸 50 μL、阻害剤として種々の濃度(終濃度 0 mM,

1 mM, 10 mM, 20 mM)のフルルビプロフェン 100  $\mu$ L を混合し、35  $^{\circ}$ C で 10 分間保温した後、適宜希釈した AMDase 溶液 10  $\mu$ L を加え 5 分間酵素反応を行った。HPLC 解析のための内部標準物質として 10 mM のフェニルプロピオン酸を含んだ 1 M HCl により反応をクエンチし、以下の条件の HPLC 解析により反応速度を求めた。

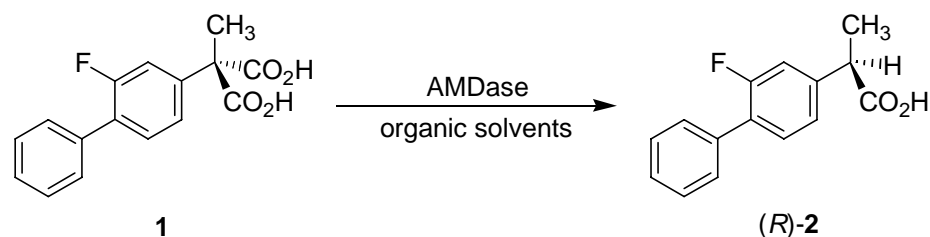
HPLC 条件

カラム：PEGASIL-ODS

移動層：CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O / TFA = 2 / 1 / 0.05 (v / v / v)

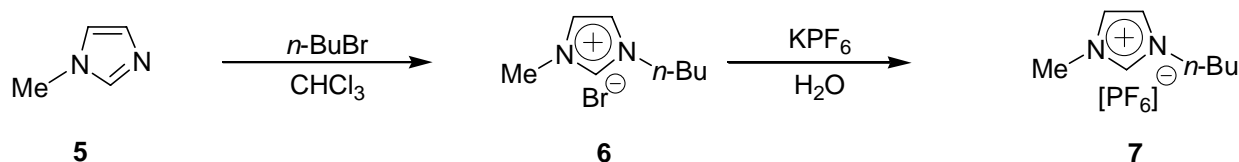
流速：0.5 mL / min

各基質濃度の逆数と反応速度の逆数から Lineweaver-Burk プロットを描き、阻害剤フルルビプロフェンの影響を調べた。



#### 有機溶媒添加の検討

基質溶液 500  $\mu$ L (100  $\mu$ mol)と精製野生型 AMDase 酵素溶液 500  $\mu$ L (0.5 mg protein) を混合し、さらに有機溶媒を 100  $\mu$ L から 1000  $\mu$ L 加え、30  $^{\circ}$ C で 2 時間攪拌した。2 M 塩酸水溶液 1 mL を加えて反応を終了した後、エーテルを用いて抽出を行った。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル / 酢酸 = 33 / 66 / 1)により精製し、目的物(R)-2 の確認を行った。



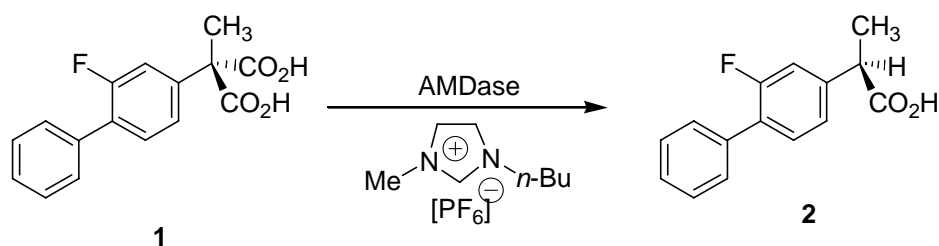
#### 1-butyl-3-methyl-1H-imidazolium hexafluorophosphate (7)の合成

200 mL ナスフラスコに、1-メチルイミダゾール (5) (10 g, 122 mmol)、*n*-ブチルプロミド(20 g, 146 mmol)とクロロホルム 20 mL を加え、80  $^{\circ}$ C に加熱して一昼夜、還流しながら攪拌した。<sup>1</sup>H NMR の分析により、イミダゾール環上の 3 つのプロトン

が低磁場側にシフトしていること(  $\delta$  : 7.40 10.5, 7.02 7.43, 6.85 7.33)を確認した後加熱を止め、70 °C の湯浴で加熱しながら、ロータリーエバポレーターで 1 時間濃縮し溶媒を留去した。エーテルでよく洗浄した後、ヘキサフルオロリン酸カリウム水溶液(29 g, 159 mmol / 50 mL)を加え、室温で 1 時間半攪拌した。 $^1\text{H}$  NMR によりイミダゾール環上の 3 つのプロトンが高磁場側にシフトしていること(  $\delta$  : 10.5 8.97, 7.43,7.33 7.61-7.76)を確認し、反応終了とした。水でよく洗浄した後、70 °C の湯浴で加熱しながらロータリーエバポレーターで 1 時間濃縮し、生成物の精製を行った。

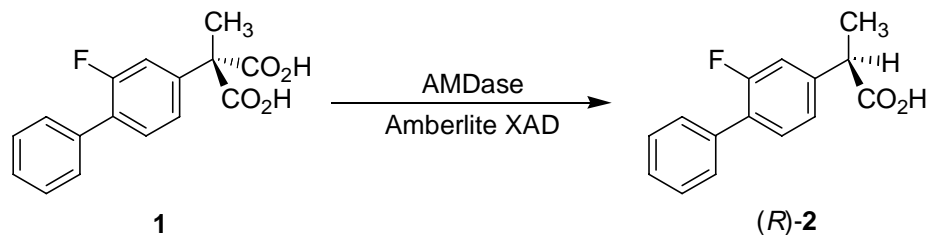
$^1\text{H}$ -NMR (270 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$  : 0.86-0.95 (3H, m), 1.30-1.38 (2H, m), 1.84-1.92 (2H, m), 4.03 (3H, s), 4.30-4.38 (2H, m), 7.61-7.76 (2H,m), 8.97 (1H, s).

IR (neat)  $\nu_{\text{max}}$  : 3171, 3125, 2965, 2939, 2878, 1575, 1468, 1170, 843, 740, 624, 558  $\text{cm}^{-1}$



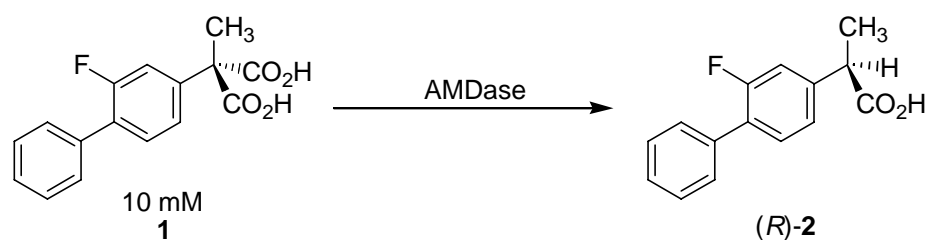
### イオン液体中での反応

基質 **1** 28.8 mg (100  $\mu\text{mol}$ )と凍結乾燥した野生型 AMDase 酵素 2 mg をイオン液体 **7** 中に混合し、30 °C で 12 時間攪拌した。エーテルを用いて抽出し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル / 酢酸 = 33 / 66 / 1)により精製し、目的物(*R*)-**2** の確認を行った。



### 合成吸着剤アンバーライト XAD 添加の検討

20 mL ナスフラスコに、基質溶液 1 mL (200  $\mu\text{mol}$ )と精製野生型 AMDase 酵素溶液 1 mL (1 mg protein)を加え、合成吸着剤アンバーライト XAD-7 または XAD-2、XAD-4 を 200 mg 加えて 30  $^{\circ}\text{C}$  で 40 分間攪拌した。2 M 塩酸水溶液 1 mL を加えて反応を終了した後、エーテルを用いて抽出を行った。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル / 酢酸 = 33 / 66 / 1)により精製し、目的物(R)-2 の確認を行った。



### 低基質濃度での反応

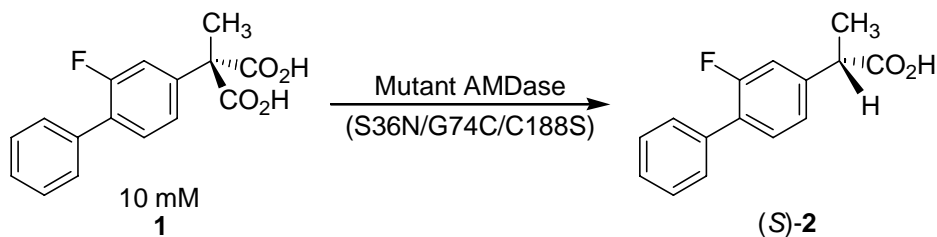
#### (R)-2-(2-fluoro-4-biphenyl)propionic acid ((R)-2)

2-(2-fluoro-4-biphenyl)-2-methylmalonic acid (**1**) (576 mg, 2 mmol)を 1 M Tris-HCl(pH 8.5)緩衝液 2 mL に溶解させ、蒸留水を加えて 10 mL としたものを 10 倍希釈した。20 mL ナスフラスコに、希釈した基質溶液 2 mL (40  $\mu\text{mol}$ )と精製野生型 AMDase 酵素溶液 2 mL (2 mg protein)を加え、30  $^{\circ}\text{C}$  で 40 分間攪拌した。2 M 塩酸水溶液 1 mL を加えて反応を終了した後、エーテルを用いて抽出を行った。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル / 酢酸 = 33 / 66 / 1)により精製し、目的物(R)-2 (8.8 mg, 90%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (270MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.54 (3H, d,  $J=7.0$  Hz), 3.77 (1H, q,  $J=7.0$  Hz), 7.15-7.52 (8H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$  : 2935, 1700, 1622, 1580, 1482, 1461, 1417, 1324, 1257, 1216, 1129, 1075, 1012, 959, 925, 874, 802, 766, 725, 698, 625, 574  $\text{cm}^{-1}$





(S)-2-(2-fluoro-4-biphenyl)propionic acid ((S)-2)

2-(2-fluoro-4-biphenyl)-2-methylmalonic acid (**1**) (576 mg, 2 mmol) を 1 M Tris-HCl(pH 8.5)緩衝液 2 mL に溶解させ、蒸留水を加えて 10 mL としたものを 10 倍希釈した。20 mL ナスフラスコに、希釈した基質溶液 2 mL (40 μmol)と精製 S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase 酵素溶液 2 mL (2 mg protein)を加え、30 °C で 40 分間攪拌した。2 M 塩酸水溶液 1 mL を加えて反応を終了した後、エーテルを用いて抽出を行った。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル / 酢酸 = 33 / 66 / 1)により精製し、目的物(S)-2 (2.9 mg, 30%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR (270MHz, CD<sub>3</sub>OD) : 1.49 (3H, d, *J*=7.0 Hz), 3.72 (1H, q, *J*=7.0 Hz), 7.16-7.47 (8H, m)

IR (KBr)  $\nu_{\max}$  : 2935, 1700, 1622, 1580, 1482, 1461, 1417, 1324, 1257, 1216, 1129, 1075, 1012, 959, 925, 874, 802, 766, 725, 698, 625, 574 cm<sup>-1</sup>

mp : 114 °C [α]<sub>D</sub><sup>21</sup> = +32.5 ° (*c* = 0.13, CHCl<sub>3</sub>)

以下の条件の HPLC により光学純度の測定を行った。

HPLC 条件

カラム : Chiralcel OD-H

移動層 : Hexane / 2-Propanol / TFA = 98 / 2 / 0.1 (v / v / v)

流速 : 1 mL / min

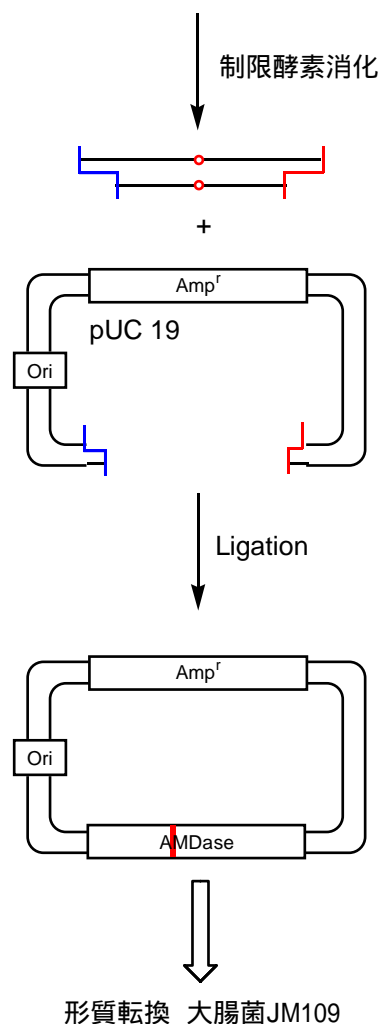
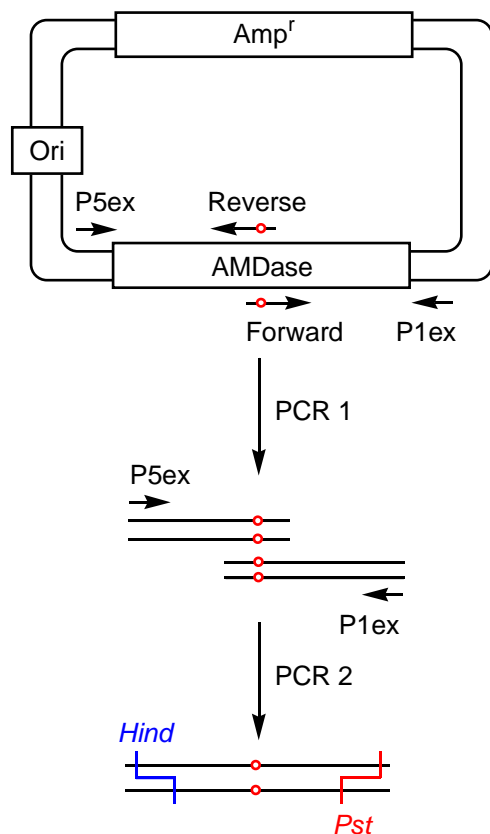
Retention time : R 体 13.0 min、S 体 14.2 min

## 実験の部

### 第二章

#### 各種二重変異型 AMDase の作成

template plasmid (pAMD101- C188S)



鋳型 DNA に pAMD101-C188S を用い、以下の各溶液を混合し、サーマルサイクルにかけた。

テンプレート DNA(pAMD101-C188S)	1 $\mu$ L (10 ng)
プライマー-Forward	0.5 $\mu$ L
プライマー-Reverse	0.5 $\mu$ L
10 $\times$ buffer for KOD-plus	5 $\mu$ L
dNTP mixture	5 $\mu$ L
MgSO <sub>4</sub>	2 $\mu$ L
KOD-plus	1 $\mu$ L
滅菌水	36 $\mu$ L

サーマルサイクル

1	94 °C	2 min
2	94 °C	10 sec
3	60 °C	30 sec
4	68 °C	60 sec
5	(2-4) × 29	
6	68 °C	4 min

使用したプライマーは以下の配列のものである(下線部が変異を導入したサイト)。AMDase の変異導入箇所より上流側(5'末端側)をプライマー-P5ex とプライマー-R(X CR)の組み合わせで増幅し、下流側(3'末端側)をプライマー-P1ex とプライマー-F(X CF)の組み合わせで増幅した。

P5ex	CACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGC
P1ex	GTAAAACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTA
A68CR	CCATCAGCGAAACCAC <u>GCAC</u> CGCGCCCTGCTTTTGC
A68CF	GCAAAAGCAGGGCGCGT <u>GC</u> GTGGTTTCGCTGATGG
V69CR	GGCCATCAGCGAAAC <u>GCAC</u> CGCCGCGCCCTGC
V69CF	GCAGGGCGCGGGCGT <u>GC</u> GTTCGCTGGATGGGC
V70CR	GGTGCCCATCAGCGAG <u>CAC</u> ACCCGCGCGCCC
V70CF	GGGCGCGGGCGGTG <u>GC</u> TCGCTGATGGGCACC
S71CR	AGCGAGGTGCCCATCAG <u>ACA</u> AACCACCGCCGC
S71CF	GGCGCGGGCGGTGGTTT <u>GCT</u> CTGATGGGCACCTCG
L72CR	GCTGAGCGAGGTGCCCAT <u>ACAC</u> GAAACCAC
L72CF	GGCGCGGGCGGTGGTTTCG <u>TGT</u> ATGGGCACCTCG
M73CR	CGGTAGAAGCTGAGCGAGGTGCC <u>GAC</u> AGCGAAACCACCGC
M73CF	GCGGCGGTGGGTTCGCTG <u>TGC</u> GGCACCTCGCTCAGCTTCTAC
G74CR	GCTGAGCGAGGT <u>GAC</u> ATCAGCGAAACCAC
G74CF	GTTTCGCTGATG <u>TGC</u> ACCTCGCTCAGCTTC
T75CR	CGGTAGAAGCTGAGCGAG <u>CAG</u> CCCATCAGCGAAACCACCGCC
T75CF	GCGGCGGTGGGTTCGCTGATGGGCT <u>GCT</u> CGCTCAGCTTCTAC
S76CR	CCCCGGTAGAAGCTGAG <u>GCA</u> GGTGCCCATCAG
S76CF	TCGCTGATGGGCACCT <u>GCT</u> CTCAGCTTCTACCGG
L77CR	CCCCGGTAGAAGCT <u>GAC</u> AGGTGCCCATCAGCG
L77CF	CGCTGATGGGCACCTCG <u>TGC</u> AGCTTCTACCGGG

増幅した DNA をアガロース電気泳動し、サイズの確認・バンドの切り出しを行った。ゲルからの切り出しには、Promega 社製 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System、または、TaKaRa 社製 RECOCHIP を用いて精製した。

続いて、上流側 DNA と下流側 DNA を結合するために、それぞれの DNA をテンプレートに用いた二回目の PCR を行った。

テンプレート DNA(5'末端側)	10 $\mu$ L
テンプレート DNA(3'末端側)	10 $\mu$ L
プライマー(P5ex)	0.5 $\mu$ L
プライマー(P1ex)	0.5 $\mu$ L
10 $\times$ buffer for KOD-plus	5 $\mu$ L
dNTP mixture	5 $\mu$ L
MgSO <sub>4</sub>	2 $\mu$ L
KOD-plus	1 $\mu$ L
滅菌水	16 $\mu$ L

#### サーマルサイクル

1	94 °C	2 min
2	94 °C	10 sec
3	60 °C	30 sec
4	68 °C	90 sec
5	(2-4) $\times$ 29	
6	68 °C	4 min

増幅した DNA をアガロース電気泳動にかけ、サイズの確認・バンドの切り出しを行った。

続いて、得られた DNA を二種類の制限酵素を用いて切断した。下記の反応液を調製し、37 °C で 2 時間反応させた。

増幅 DNA	10 $\mu$ L
10 $\times$ M buffer	5 $\mu$ L
滅菌水	33 $\mu$ L
<i>Hind</i> III	2 $\mu$ L

切断した DNA をアガロース電気泳動し、バンドの切り出し精製を行った。二種類目の制限酵素によって同様に切断し、増幅 DNA の両末端を *Hind* III、*Pst* I サイトとした。

増幅 DNA	10 $\mu$ L
10 $\times$ H buffer	5 $\mu$ L
滅菌水	33 $\mu$ L
<i>Pst</i> I	2 $\mu$ L

切断した DNA をアガロース電気泳動により精製した。同様の方法にて、ベクター-pUC 19 を *Hind* III、*Pst* I 両制限酵素で消化し、精製した。

得られたベクター-pUC 19 と変異の導入された AMDase の DNA 配列のモル比が最適となるよう調製しライゲーションを行った。

AMDase の挿入 DNA 断片	5 $\mu$ L
ベクター-pUC 19	5 $\mu$ L
Ligation Kit solution I	10 $\mu$ L

16  $^{\circ}$ C にて 2 時間ライゲーションを行い、反応液を次の大腸菌の形質転換にそのまま用いた。

ライゲーション後の DNA 溶液 3  $\mu$ L を大腸菌 JM109 Competent Cell 100  $\mu$ L に加え、氷上で 30 分静置した。42  $^{\circ}$ C にて 30 秒間 heat-shock を与えることによりプラスミドを大腸菌に導入し、再び氷上で 2 分間静置した。これに SOC 培地を 900  $\mu$ L 加え、37  $^{\circ}$ C で 1 時間培養した。この培養液 100  $\mu$ L をアンピシリン(50  $\mu$ g/mL)を含有した LB プレートに接種し、37  $^{\circ}$ C で一晩培養を行った。生じたコロニーよりプラスミドを精製し、シーケンサーにより変異の導入を確認した。

また、別の形質転換の方法として、ライゲーション後の DNA 溶液をエタノール沈殿にて精製し、大腸菌 JM109 Electro-Cell 50  $\mu$ L に DNA を 1 ng 加え Electroporation 用セルに移し、パルス電圧をかけて形質変換を行った。950  $\mu$ L の SOC 培地を加え、37  $^{\circ}$ C で 1 時間培養した。この培養液 100  $\mu$ L をアンピシリン(50  $\mu$ g/mL)を含有した LB プレートに接種し、37  $^{\circ}$ C で一晩静置培養した。生じたコロニーよりプラスミドを精製し、変異の導入を確認した。

### プラスミド DNA の単離

プラスミド DNA は、MACHEREY-NAGEL 社製のプラスミド抽出キット NucleoSpin Plasmid Quick Pure、または、Promega 社製 Wizard SV Minipreps DNA Purification System を用いて単離した。

LB 培地(アンピシリン 50  $\mu$ g/mL) 4 mL に組換え大腸菌を植菌し、37  $^{\circ}$ C にて一晩振盪培養を行った。エッペンドルフチューブに 1.6 mL の培養液を移し、遠心分離により菌体を集菌した。上清を除き、大腸菌のペレットに 250  $\mu$ L の氷冷した Buffer

A1 を加えて、ボルテックスミキサーでよく混合した。250  $\mu\text{L}$  の Buffer A2 を加え、よく混合した。常温にて 5 分間静置した後、300  $\mu\text{L}$  の Buffer A3 を加え、よく混合した後、室温で 5 分間遠心分離を行った。上清を spin column に移し、1 分間遠心分離した。更に spin column に洗浄バッファ Buffer AQ を 450  $\mu\text{L}$  加えて、4 分間遠心分離することによって洗浄、乾燥した。これに TE buffer 50  $\mu\text{L}$  を加えて常温にて 1 分間静置し、1 分間遠心分離することによって目的の plasmid を得た。

#### DNA シーケンサーでの塩基配列解析のためのシーケンス反応

Applied Biosystems 社製 Big Dye Terminator Ready Reaction Mix を用いた。

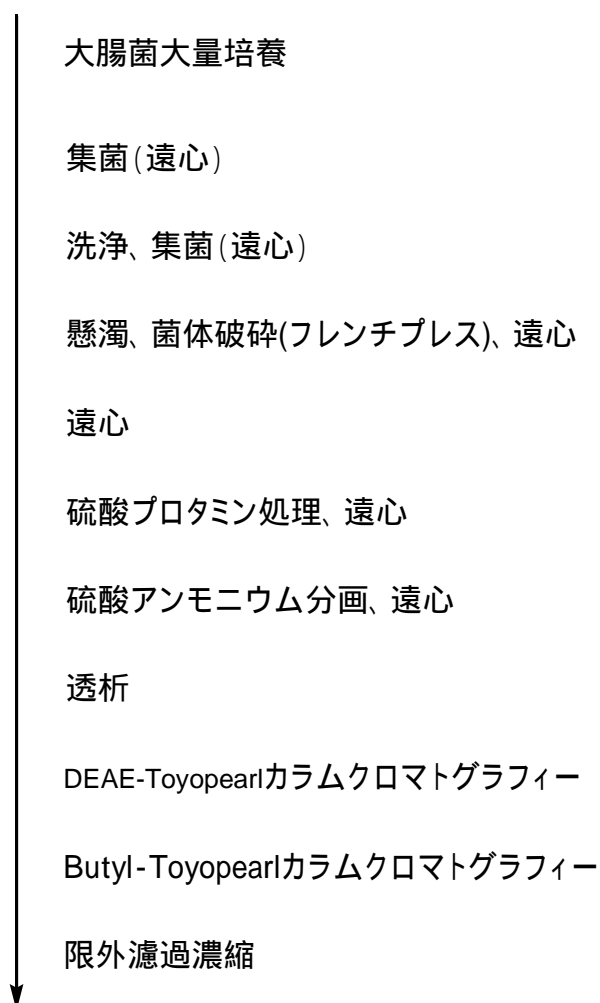
Big Dye Terminator Ready Reaction Mix	4 $\mu\text{L}$
1 $\times$ Sequencing Buffer	4 $\mu\text{L}$
プラスミド溶液	1 $\mu\text{L}$ (20 ng)
プライマー(P5ex または P1ex)	1 $\mu\text{L}$ (3.2 pmol)
滅菌水	10 $\mu\text{L}$

上記のように反応液を調製し、以下のサーマルサイクルを行った。

- 1 96 °C 1 min
- 2 96 °C 10 sec
- 3 50 °C 5 sec
- 4 60 °C 4 min
- 5 2-4 を 25 サイクル
- 6 4 °C

反応終了後、エタノール沈殿により精製を行った。反応液 20  $\mu\text{L}$  に 125 mM EDTA 2  $\mu\text{L}$ 、3 M 酢酸ナトリウム 2  $\mu\text{L}$ 、100%エタノール 50  $\mu\text{L}$  を加えて混合し、室温で 15 分放置した。15,000 rpm にて 20 分間遠心を行い、DNA フラグメントを沈殿させた。上清を捨て、75%エタノール 70  $\mu\text{L}$  を加え、再度 15,000 rpm にて 20 分間遠心を行った。上清を完全に捨て、真空遠心乾燥機にて 20 分間十分に乾燥した。Hi Di Formamide 25  $\mu\text{L}$  を加え、DNA フラグメントを溶解し、熱変性を行った。シーケンサー用の 96-well プレートに移し込み、DNA シーケンサーにて塩基配列を解析し、変異の導入を確認した。

各種二重変異型 AMDase の精製



AMDase の変異酵素の遺伝子を組み込んだプラスミドを含んだ大腸菌の大量培養を以下のように行った。大腸菌を LB 培地(アンピシリン 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )20 mL に接種し、前培養として 30  $^{\circ}\text{C}$  で一晩振盪培養を行った。次に、1.5 L の同培地に前培養液 15 mL を植え継ぎ、2 時間培養を行った。この培養液に誘導剤 IPTG を 0.1 mM になるよう添加し、30  $^{\circ}\text{C}$  で 16 時間振盪培養した。培養菌体を遠心分離(6,000  $\times$  g, 20 min)により集菌した。

以下の精製は 4  $^{\circ}\text{C}$  の低温下で行った。pH 7.0、100 mM リン酸緩衝液で洗浄し、遠心分離(12,000  $\times$  g, 20 min)により集菌した。(ただし、酵素精製に用いた緩衝液には、全て EDTA 0.5 mM、 $\beta$ -メルカプトエタノール 5 mM が含まれている)。菌体を再度 pH 7.0、100 mM リン酸緩衝液に懸濁し、フレンチプレスにより 3 回破碎した(1,500  $\text{kg}/\text{cm}^2$ )。得られた破碎液を遠心分離(12,000  $\times$  g, 20 min)し、沈殿を除くことにより無細胞抽出液(cell free extract)を調製した。この酵素液に 2%硫酸プロタミン水溶液を終濃度 1%となるよう加え、30 分攪拌した。生じた沈殿を遠心分離(12,000  $\times$

g, 20 min)により除去した。得られた酵素液に硫酸アンモニウムを 60%飽和になるように添加し、1 時間攪拌した。遠心分離(12,000 × g, 20 min)によって得られた沈渣を 10 mM (pH 8.0) Tris-HCl 緩衝液に溶解し、同緩衝液に対して透析を行った。2 時間後に緩衝液を交換し、さらに一晩透析を続けた。

透析後の酵素液を 10 mM pH 8.0 Tris-HCl 緩衝液で平衡化した DEAE-Toyopearl カラムクロマトグラフィーにチャージした。同緩衝液で洗浄した後、NaCl 0 mM から 50 mM の直線的濃度勾配で溶出した。DEAE-Toyopearl カラムの溶出画分を SDS-PAGE にて解析し、AMDase に対応するサイズ 24.7 kDa のバンドを含む画分を集めた。これらの画分に 25%飽和になるよう硫酸アンモニウムを徐々に加え 1 時間攪拌した。あらかじめ 25%硫酸アンモニウム飽和の 10 mM (pH 8.0) Tris-HCl 緩衝液で平衡化した Butyl-Toyopearl カラムクロマトグラフィーにチャージした。同緩衝液で洗浄した後、25%硫酸アンモニウム飽和から 15%硫酸アンモニウム飽和の直線的濃度勾配で溶出した。Butyl-Toyopearl カラムの溶出画分から目的のバンドを含む画分を集め、限外ろ過により濃縮し、精製各種二重変異型 AMDase 液を得た。

精製した酵素の活性を以下の要領で測定した。

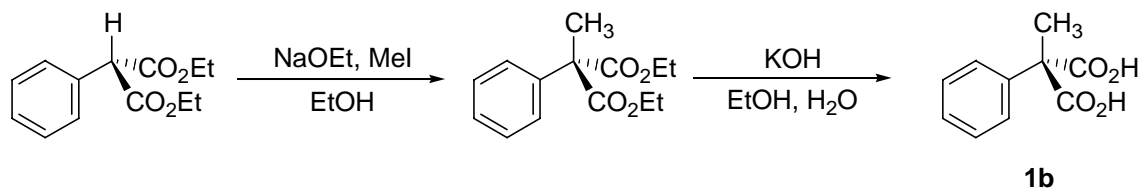
200 mM pH 7 のフェニルマロン酸水溶液 50  $\mu$ L(final conc. 20 mM)、1 M pH 8.5 Tris-HCl 緩衝液 50  $\mu$ L に適当量の酵素溶液を加え、脱イオン水で 500  $\mu$ L とし、酵素溶液を加える前に 10 分間 35 °C で保温をした後、35 °C で 5 から 30 分間酵素反応を行った。1 M 塩酸 125  $\mu$ L を加えて反応を停止した。生成したフェニル酢酸を高速液体クロマトグラフィーにて分析し、あらかじめ作成した検量線を用いて生成量を算出した。35 °C において 1 分間に 1  $\mu$ mol のフェニルマロン酸をフェニル酢酸に変換する酵素活性を 1 unit と定義した。

また、AMDase の濃度を波長 280 nm の吸光度における 1.0(ABS)を 1.0(mg / mL) と近似して算出した。各精製二重変異型酵素のタンパク質濃度と酵素活性は以下の通りであった。

変異株	酵素濃度	比活性
A68C/C188S	1.05 mg / mL	0
V69C/C188S	1.11 mg / mL	0
V70C/C188S	1.08 mg / mL	0
S71C/C188S	3.33 mg / mL	0.07 unit / mg
L72C/C188S	1.73 mg / mL	0



M73C/C188S	0.80 mg / mL	0
G74C/C188S	1.04 mg / mL	0.05 unit / mg
T75C/C188S	0.78 mg / mL	0
S76C/C188S	1.57 mg / mL	0
L77C/C188S	1.23 mg / mL	0
(Wild type)		(467 unit / mg)



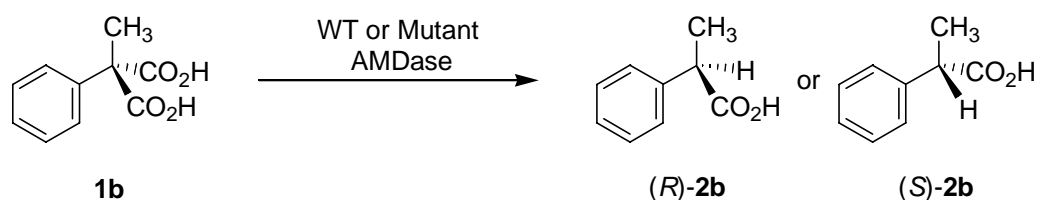
### $\alpha$ -Methyl- $\alpha$ -phenylmalonic acid (**1b**)の合成

0 °C にて、ナトリウムエトキシド (5.7 g, 82.5 mmol)のエタノール溶液(50 mL)に市販品の Diethyl phenylmalonate (16.5 g, 69.8 mmol)エタノール溶液(20 mL)を滴下し、30 分間攪拌した。ヨウ化メチル(15.0 g, 107 mmol)を滴下した後、攪拌しながら 0 °C から室温まで自然昇温させた。2 M HCl により反応をクエンチし、酢酸エチルにて抽出した。飽和塩化アンモニウム水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、10%亜硫酸ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル= 9 / 1)で精製し、無色の液体の Diethyl  $\alpha$ -methyl- $\alpha$ -phenylmalonate (15.9 g, 91%)を得た。

続いて、0 °C にて、Diethyl  $\alpha$ -methyl- $\alpha$ -phenylmalonate (15.9 g, 63.5mmol)のエタノール溶液(100 mL)に水酸化カリウム(48.9 g, 87.1 mmol)水溶液(100 mL)を滴下し、室温へと自然昇温させ、一晩攪拌した。減圧下エタノールを留去し、6 M HCl にて酸性にした後、エーテルを用いて抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過し減圧下溶媒を留去した。ヘキサン 酢酸エチルより再結晶することにより、目的物 **1b** (12.1 g, 98%)を無色結晶として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 1.93 (3H, s), 7.17-7.60 (5H, m)

IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  : 2870, 2648, 1700, 1500, 1418, 1279, 1130, 1075, 1030, 920, 785, 745, 700  $\text{cm}^{-1}$



### $\alpha$ -Methyl- $\alpha$ -phenylmalonic acid (**1b**)に対する各種酵素の立体選択性の測定

$\alpha$ -Methyl- $\alpha$ -phenylmalonic acid (**1b**) (38.8 mg, 0.20 mmol)を 1 M Tris-HCl(pH 8.5)緩衝液 100  $\mu$ L に溶解し、蒸留水を加えて 1 mL とした。精製野生型および各種変異型 AMDase 酵素溶液 1 mL (1mg protein)を加え、30  $^{\circ}$ C にて反応を行った。2 M HCl を加えて反応を終了した後、エーテルを用いて抽出を行った。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル / 酢酸 = 40 / 1 / 1)により精製し、生成物 **2b** を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (270MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.50 (3H, d,  $J=7.2$  Hz), 3.72 (1H, q,  $J=7.2$  Hz), 7.19-7.35 (5H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$  : 3030, 2983, 2930, 2882, 2634, 2546, 1704, 1600, 1499, 1454, 1413, 1379, 1264, 1232, 1183, 1064, 1031, 910, 860, 560, 729, 700  $\text{cm}^{-1}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -72.0^{\circ}$  ( $c = 0.11$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

HPLC 条件

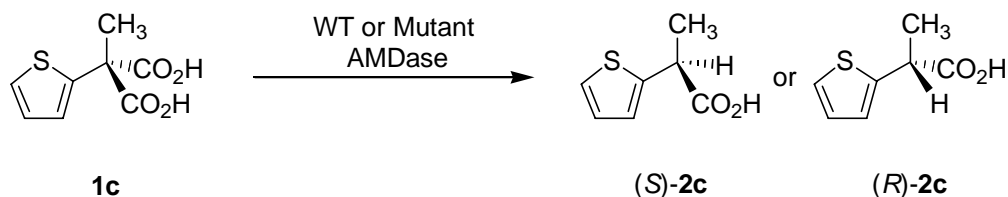
カラム : Chiralcel OD-H

移動層 : Hexane / 2-Propanol / TFA = 98 / 2 / 0.1 (v / v / v)

流速 : 0.5 mL / min

Retention time : R 体 24.4 min、S 体 28.5 min

entry	mutant	Yield (%)	selectivity, ee%
1	wild type	99	(R) 99
2	A68C/C188S	-	-
3	V69C/C188S	-	-
4	V70C/C188S	-	-
5	S71C/C188S	0	-
6	L72C/C188S	-	-
7	M73C/C188S	-	-
8	G74C/C188S	0	-
9	T75C/C188S	-	-
10	S76C/C188S	-	-
11	L77C/C188S	-	-



$\alpha$ -Methyl- $\alpha$ -(2-thienyl)malonic acid (**1c**)に対する各種酵素の立体選択性の測定

基質 $\alpha$ -Methyl- $\alpha$ -(2-thienyl)malonic acid (**1c**)は第 4 章に示した方法にて作成した。

$\alpha$ -Methyl- $\alpha$ -(2-thienyl)malonic acid (**1c**) (40.0 mg, 0.20 mmol)を 1 M Tris-HCl(pH 8.5)緩衝液 100  $\mu$ L に溶解し、蒸留水を加えて 1 mL とした。精製野生型および各種変異型 AMDase 酵素溶液 1 mL (1 mg protein)を加え、30  $^{\circ}$ C にて反応を行った。2 M HCl を加えて反応を終了した後、エーテルを用いて抽出を行った。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル / 酢酸 = 70 / 30 / 1)により精製し、生成物 **2c** を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.61 (3H, d,  $J=7.3$  Hz), 4.04 (1H, q,  $J=7.3$  Hz), 6.95-7.23 (3H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$  : 2982, 1715, 1457, 1417, 1236, 699  $\text{cm}^{-1}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -24.0^{\circ}$  ( $c = 0.10$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

以下の条件の HPLC により光学純度の測定を行った。

HPLC 条件

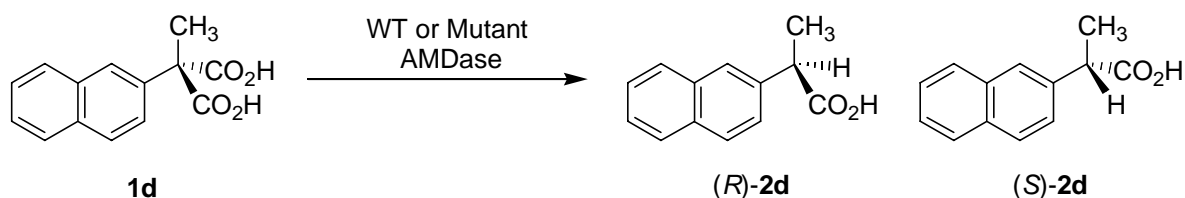
カラム : Chiralcel OD-H

移動層 : Hexane / 2-Propanol / TFA = 98 / 2 / 0.1 (v / v / v)

流速 : 0.5 mL / min

Retention time : S 体 30.0 min、R 体 38.0 min

Enzyme	Yield (%)	e.e. (%)	Configuration
Wild Type	99	99	S
C188S	17	50	R
A68C/C188S	0		
V69C/C188S	0		
V70C/C188S	0		
S71C/C188S	97	58	R
L72C/C188S	0		
M73C/C188S	0		
G74C/C188S	60	84	R
T75C/C188S	0		
S76C/C188S	0		
L77C/C188S	0		



#### $\alpha$ -Methyl- $\alpha$ -(2-naphthyl)malonic acid (**1d**)に対する各種酵素の立体選択性の測定

基質 $\alpha$ -Methyl- $\alpha$ -(2-naphthyl)malonic acid (**1d**)は第4章に示した方法にて作成した。

$\alpha$ -Methyl- $\alpha$ -(2-naphthyl)malonic acid (**1d**) (48.8 mg, 0.20 mmol)を1 M Tris-HCl(pH 8.5)緩衝液 100  $\mu$ L に溶解し、蒸留水を加えて1 mL とした。精製野生型および各種変異型 AMDase 酵素溶液 1 mL (1mg protein)を加え、30  $^{\circ}$ Cにて反応を行った。2 M HCl を加えて反応を終了した後、エーテルを用いて抽出を行った。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル / 酢酸 = 50 / 50 / 1)により精製し、生成物 **2d** を得た。

$^1$ H-NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.61 (3H, d,  $J=7.1$  Hz), 3.93 (1H, q,  $J=6.9$  Hz), 7.44-7.83 (7H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$  : 2980, 1698, 1419, 1273, 1225, 963, 747  $\text{cm}^{-1}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -73.2^{\circ}$  ( $c = 0.10$ , EtOH)

HPLC 条件

カラム : Chiralcel OD-H

移動層 : Hexane / 2-Propanol / TFA = 98 / 2 / 0.1 (v / v / v)

流速 : 0.5 mL / min      Retention time : R 体 41.4 min、S 体 47.8 min

Enzyme	Yield (%)	e.e. (%)	Configuration
Wild Type	96	99	R
C188S	6	70	S
A68C/C188S	0		
V69C/C188S	0		
V70C/C188S	0		
S71C/C188S	22	80	S
L72C/C188S	0		
M73C/C188S	0		
G74C/C188S	17	96	S
T75C/C188S	0		
S76C/C188S	0		
L77C/C188S	0		

#### 各基質に対する速度論的パラメータの測定

蒸留水 300  $\mu$ L、1 M Tris-HCl (pH 8.5) 緩衝液 50  $\mu$ L、各種濃度(20 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM, 200mM)の各基質溶液 50  $\mu$ L を混合し、35  $^{\circ}$ C で 10 分間保温した後、適宜濃度を調整した AMDase 溶液 100  $\mu$ L を加え 5-30 分間酵素反応を行った。HPLC 解析のための内部標準物質として 10 mM の 2-チエニル酢酸、または、2-ナフチル酢酸を含んだ 1 M HCl により反応をクエンチし、以下の条件の HPLC 解析により反応速度を求めた。

HPLC 条件

カラム：PEGASIL-ODS

移動層：MeOH / H<sub>2</sub>O / TFA = 2 / 1 / 0.05 (v / v / v)

流速：1.0 mL / min

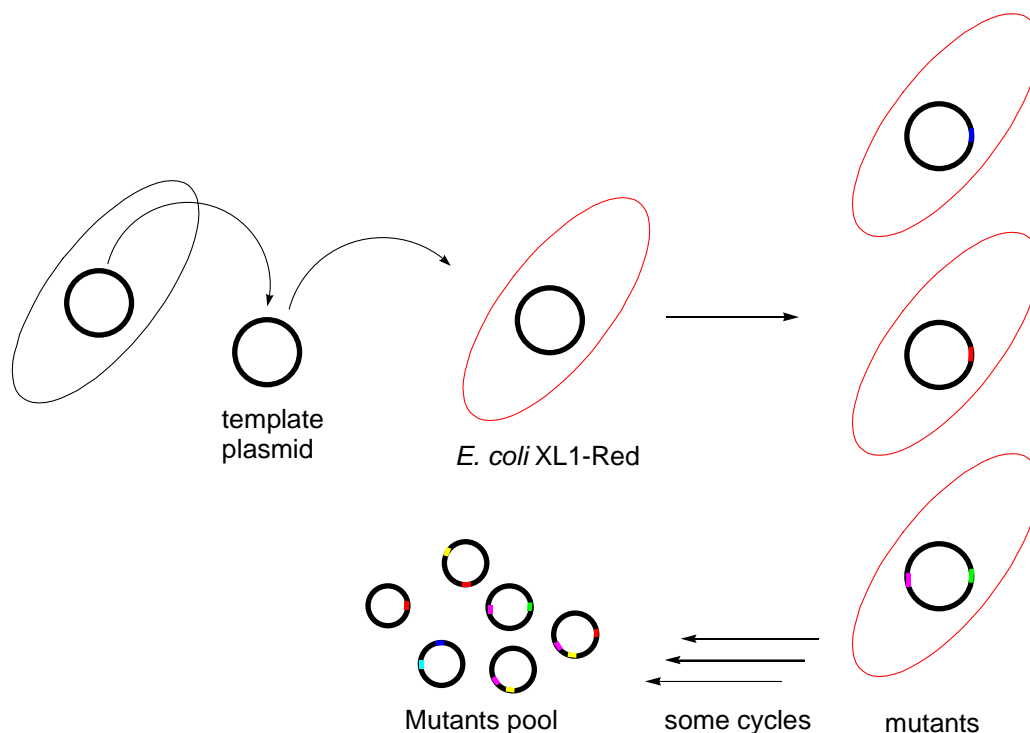
各基質濃度の逆数と反応速度の逆数から Lineweaver-Burk プロットを描き、各速度論的パラメータを算出した。

Enzyme type	Substrate		K <sub>m</sub> (mM)	V <sub>max</sub> (unit/mg)	k <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> / K <sub>m</sub> (s <sup>-1</sup> /mM)
	Ar	R				
S71C,C188S	2-thienyl	Me	1.01	0.25	0.08	0.07
	2-naphthyl	Me	0.51	0.17	0.05	0.10
G74C,C188S	2-thienyl	Me	5.03	0.35	0.34	0.07
	2-naphthyl	Me	1.25	0.12	0.12	0.09

## 実験の部

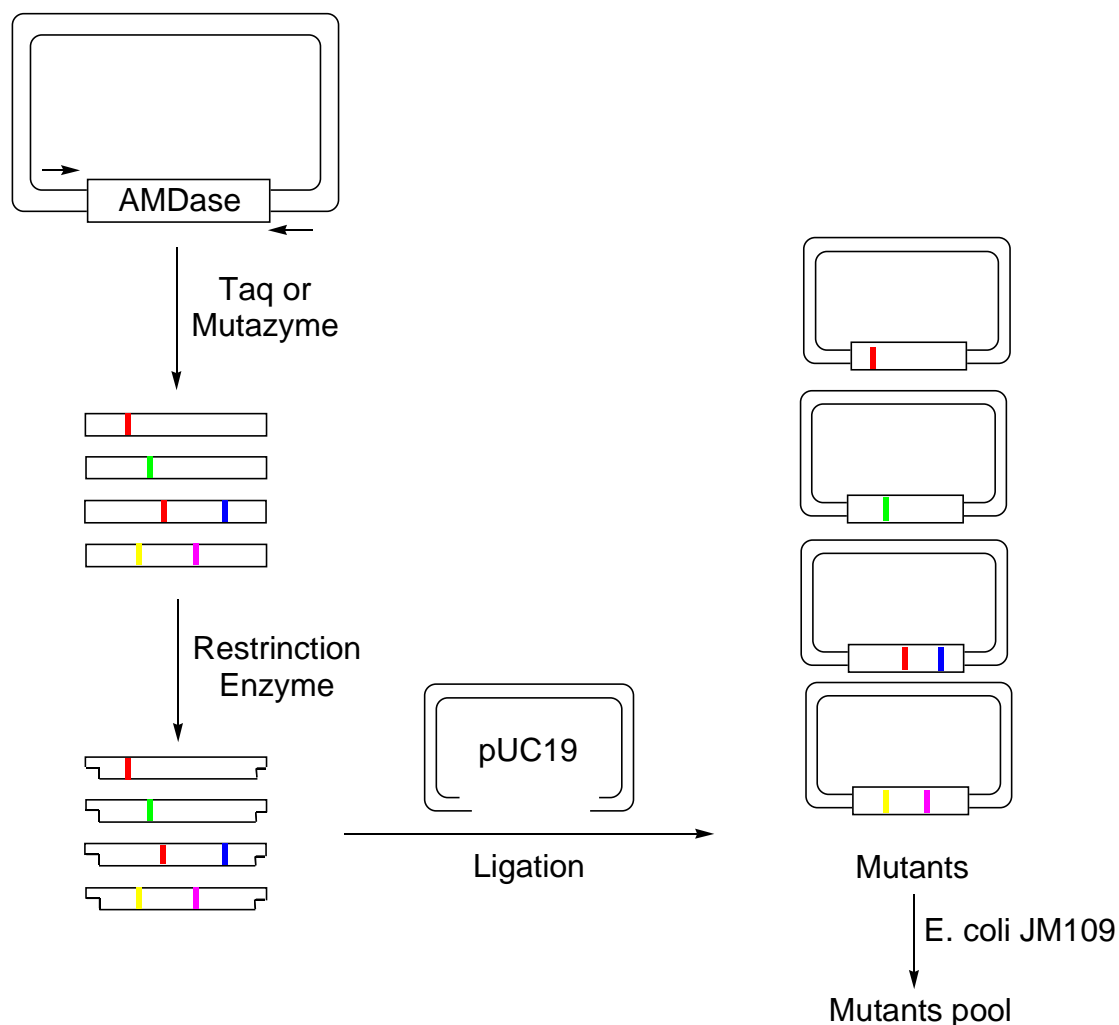
### 第三章

#### 大腸菌 XL1-Red を用いたランダム変異導入



市販品の*E. coli* XL1-Red コンピテントセル(100  $\mu$ L)に2-メルカプトメタノールを1.7  $\mu$ L 加え、氷浴上で2分毎にかき混ぜ10分間インキュベートした。G74C/C188S 二重変異を含んだプラスミド pAMD-G74CC188S を1  $\mu$ L (20 ng)加え、氷浴上で30分間インキュベートした。42  $^{\circ}$ Cで45秒間ヒートショックを与え、形質転換を行った。900  $\mu$ LのSOC培地を加え、37  $^{\circ}$ Cで1時間振盪培養した。LB(アンピシリン含有)プレートに100  $\mu$ Lまき、37  $^{\circ}$ Cで24時間静置培養した。生育してきた各コロニーをピックアップし、液体LB培地(3 mL)に植菌し一本にまとめた。または、LBプレート上に直接LB培地(2 mL)を流し込み、プレート上に生育してきた大腸菌を懸濁し、チューブへ戻した。37  $^{\circ}$ Cで24時間振盪培養しプラスミドを抽出した。これらの過程を一サイクルとして、数サイクル繰り返し、各段階でのランダム変異体を取得した。また、効率的な方法として、プレート上で培養せずに液体LB培地(3 mL)で培養し、数回植え継ぐことでランダム変異導入を行った。最後にプラスミドを抽出しランダム変異体を取得した。続いて、大腸菌 JM109 を形質転換し、ランダム変異株のプールを作成した。

Mutazyme を用いたランダム変異導入



鋳型 DNA である pAMD-G74CC188S に用い、以下の各溶液を混合し、サーマルサイクルにかけた。使用したプライマーは以下の配列のものである(下線部は制限酵素サイト)。

AMD-F-*Hind*3 : CGCCAAAGCTTTCATCGCGCAGGGTTCGC

AMD-R-*Sac*1 : TAATGAGCTCTCGTCCAGGACTCGTCGAACAGCC

テンプレート DNA(pAMD-G74CC188S)	1 $\mu$ L (10 ng)
プライマーForward(AMD-F- <i>Hind</i> III)	0.5 $\mu$ L
プライマーReverse(AMD-R- <i>Sac</i> I)	0.5 $\mu$ L
10 $\times$ Mutazyme reaction buffer	5 $\mu$ L
dNTP mixture	1 $\mu$ L

Mutazyme 1  $\mu$ L

滅菌水 41  $\mu$ L

#### サーマルサイクル

1 95 °C 1 min

2 95 °C 1 min

3 60 °C 1 min

4 72 °C 1 min

5 (2-4)  $\times$  29

6 72 °C 10 min

切断した DNA をアガロース電気泳動により、バンドの切り出し精製を行った。二種類の制限酵素によって切断し、増幅 DNA の両末端を *Hind* III、*Sac* I サイトとした。

反応液を下記のように調製し、37 °C で 2 時間反応させた。

増幅 DNA 10  $\mu$ L

10  $\times$  M buffer 5  $\mu$ L

滅菌水 33  $\mu$ L

*Hind* III 2  $\mu$ L

切断した DNA をアガロース電気泳動により、バンドの切り出しを行った。二種類目の制限酵素によって同様に切断した。

増幅 DNA 10  $\mu$ L

10  $\times$  L buffer 5  $\mu$ L

滅菌水 33  $\mu$ L

*Sac* I 2  $\mu$ L

切断した DNA をアガロース電気泳動により精製し、バンドの切り出しを行った。同様の方法にて、ベクター-pUC 19 を *Hind* III、*Sac* I 両制限酵素で消化し、精製した。

得られたベクター-pUC 19 と変異の導入された AMDase の DNA 配列のモル比が最適となるよう調製しライゲーションを行った。

AMDase の挿入 DNA 断片 5  $\mu$ L

ベクター-pUC 19 5  $\mu$ L

Ligation Kit I 液 10  $\mu$ L

16 °C にて 2 時間ライゲーションを行い、反応液を次の大腸菌の形質転換にそのまま用いた。

各段階で得られたランダム変異 DNA の混合液 1  $\mu$ L を用いて、大腸菌 JM109 を



形質転換し、ランダム変異株プールを作成した。

また、より効率的な方法として以下の PCR-Script Cloning Kit を用いた系も試みた。PCR 後の DNA 断片を制限酵素によって消化する必要がなく、直接ベクターに結合させる方法である。

滅菌水	1.5 $\mu$ L
PCR-Script 10 $\times$ reaction buffer	1 $\mu$ L
pPCR-Script Amp SK(+) cloning vector	1 $\mu$ L
Srf I restriction enzyme	1 $\mu$ L
T4 DNA ligase	1 $\mu$ L
PCR product	4 $\mu$ L
10 mM rATP	0.5 $\mu$ L

上記のように混合し、室温で一時間反応(ライゲーション)させた後、制限酵素を失活させるために 65  $^{\circ}$ C で 10 分間熱を加え、続いて氷上で冷却した。

大腸菌 JM109 をライゲーション反応液 2  $\mu$ L を用いて形質転換し、ランダム変異株プールを作成した。

## スクリーニング

以下の組成のスクリーニング用プレートを作成した。グルコースとフェニルマロン酸以外の試薬を量り取り、蒸留水 180 mL に溶かしオートクレーブを用いて滅菌した。フィルター濾過滅菌したグルコースとフェニルマロン酸溶液(20 mL)を加え、プレートを作成した。その際、pH を約 6 に調製し BTB の色が黄色くなるようにした。

また、スクリーニングしやすいよう緩衝作用の濃度を最適化したプレートを右の表の組成のように作成した。

Yeast extract	0.2 g	Yeast extract	0.2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.4 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.12 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.012 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.08 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.008 g
NaCl	0.4 g	NaCl	0.4 g
Glucose	0.05 g	Glucose	0.05 g
Phenylmalonic acid	20 mM	Phenylmalonic acid	20 mM
BTB	5 mg	BTB	5 mg
agar	4 g	agar	4 g
water	(pH 6) 200 mL	water	(pH 6) 200 mL

プレート上に形質転換した大腸菌 100 μL を直接撒き、37 °C で一晩静置培養した。青く変色してきたものをピックアップし、新しいスクリーニング用プレートにストリークした。また、並行して液体培地を利用したスクリーニングも行った。上記の最適化した組成培地(寒天抜き)を 96-well プレートへ 100 μL ずつ分注、変異株を植菌し、37 °C で静置培養し、変色の具合を観察した。

#### プラスミド DNA の単離

プラスミド DNA は、MACHEREY-NAGEL 社製のプラスミド抽出キット NucleoSpin Plasmid Quick Pure を用いて単離した。

LB 培地(アンピシリン 50 μg/mL) 4 mL に組換え大腸菌を植菌し、37 °C にて一晩振盪培養を行った。エペンドルフチューブに 1.6 mL の培養液を移し、遠心分離により菌体を集菌した。上清を除き、再度 1.6 mL の培養液を遠心し、大腸菌のペレットを得た。250 μL の Buffer A1 を加えて、ボルテックスミキサーでよく混合した。250 μL の Buffer A2 を加え、6 回転倒混合した。常温にて 5 分間静置した後、300 μL の Buffer A3 を加え、転倒混合した後、5 分間遠心分離を行った。上清を spin column に移し、1 分間遠心した。更に spin column に洗浄バッファー Buffer AQ を 450 μL 加えて、3 分間遠心することで洗浄、乾燥した。これに TE buffer 40 μL を加えて常温にて 1 分間静置し、1 分間遠心することによって目的の plasmid を得た。

#### DNA シーケンサーでの塩基配列解析のためのシーケンス反応

Applied Biosystems 社製 Big Dye Terminator Ready Reaction Mix を用いた。

Big Dye Terminator Ready Reaction Mix	4 μL
1 × Sequencing Buffer	4 μL
プラスミド溶液	1 μL (20 ng)
プライマー(P5ex または P1ex)	1 μL (3.2 pmol)

滅菌水 10  $\mu$ L

次に以下のサーマルサイクルにてシーケンス反応を行った。

- 1 96 °C 1 min
- 2 96 °C 10 sec
- 3 50 °C 5 sec
- 4 60 °C 4 min
- 5 2-4 を 25 サイクル
- 6 4 °C

反応終了後、エタノール沈殿により精製を行った。反応液 20  $\mu$ L に 125 mM EDTA 2  $\mu$ L、3 M 酢酸ナトリウム 2  $\mu$ L、100%エタノール 50  $\mu$ L を加えて混合し、室温で 15 分放置した。15,000 rpm にて 20 分間遠心を行い、DNA フラグメントを沈殿させた。上清を捨て、75%エタノール 70  $\mu$ L を加え、再度 15,000 rpm にて 20 分間遠心を行った。上清を完全に捨て、真空遠心乾燥機にて 20 分間十分に乾燥した。Hi Di Formamide 25  $\mu$ L を加え、DNA フラグメントを溶解させ、シーケンサー用の 96-well プレートに移しこんだ。DNA シーケンサーにて塩基配列を解析し、変異の導入を確認した。

#### S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase の作成

Stratagene 社製の変異導入キット Quik Change Site-directed Mutagenesis Kit を用いて S36N の変異を導入した。鋳型プラスミドとして pAMD-G74CC188S を用いた。使用したプライマーは以下のような、S36NF および S36NR である。マニュアルに従い、中心付近に変異を導入する部分(下線部)が来るようにデザインした。

S36NF : GCCCTTCATTGCCAACGGGCTGGGGCTG

S36NR : CAGCCCCAGCCCCGTTGGCAATGAAGGGC

以下の各溶液を混合し、サーマルサイクルにかけた。

テンプレート DNA(pAMD-G74CC188S)	1 $\mu$ L (10 ng)
プライマー-F(S36NF)	1.25 $\mu$ L (125 ng)
プライマー-R(S36NR)	1.25 $\mu$ L (125 ng)
10 $\times$ Reaction buffer	5 $\mu$ L
dNTP mixture	1 $\mu$ L
滅菌水	40.5 $\mu$ L
Pfu Turbo	1 $\mu$ L

サーマルサイクル

1	95 °C	1 min
2	95 °C	50 sec
3	60 °C	50 sec
4	68 °C	4 min
5	(2-4) × 18	
6	68 °C	7 min

続いて、制限酵素 *Dpn* I を 1  $\mu$ L 加え 37 °C で一時間保温することで、大腸菌の *dam*<sup>+</sup> によりメチル化されている元の鋳型プラスミドのみを選択的に分解した。酵素消化後、変異の導入されたプラスミドを含む反応溶液 1  $\mu$ L を使用し、大腸菌 XL10-Gold を形質転換した。形質転換は、45  $\mu$ L のコンピテントセルに 2  $\mu$ L の  $\beta$ -メルカプトエタノールを加え、10 分間氷中で 2 分ごとにかき混ぜた後、DNA を加え氷中で 30 分インキュベートした。42 °C で 30 秒ヒートショックを与え、2 分間氷中で冷やした後、NZY<sup>+</sup>培地を 500  $\mu$ L 加えて 37 °C で一時間振盪培養した。アンピシリンを含んだ LB 培地プレートに 100  $\mu$ L 塗布し、37 °C で一晩静置培養した。

AMDase の変異酵素の遺伝子を組み込んだプラスミドを含んだ大腸菌の培養を以下のように行った。大腸菌を LB 培地(アンピシリン 50  $\mu$ g/mL)20 mL に接種し、30 °C で一晩振盪培養を行った。1.5 L の同培地に前培養液 15 mL を植え継ぎ、3 時間培養を行った。この培養液に誘導剤 IPTG を 0.1 mM になるよう添加し、30 °C で 16 時間振盪培養した。培養菌体を遠心分離(6,000  $\times$  g, 20 min)により集菌した。

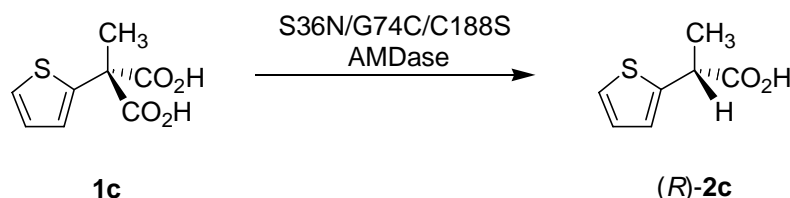
以下の精製は 4 °C の低温下で行った。pH 7.0、100 mM リン酸緩衝液で洗浄し、遠心分離(12,000  $\times$  g, 20 min)により集菌した。(ただし、酵素精製に用いた緩衝液には、全て EDTA 0.5 mM、 $\beta$ -メルカプトエタノール 5 mM が含まれている)。菌体を再度 pH 7.0、100 mM リン酸緩衝液に懸濁し、フレンチプレスにより 3 回破碎した (1,500 kg/cm<sup>2</sup>)。得られた菌体破碎液を遠心分離(12,000  $\times$  g, 20 min)し、沈殿を除くことにより無細胞抽出液(cell free extract)を調製した。この酵素液に 2%硫酸プロタミン水溶液を終濃度 1%となるよう加え、30 分間攪拌した。生じた沈殿を遠心分離 (12,000 g, 20 min)により除去した。得られた粗酵素液に硫酸アンモニウムを 60%飽和になるように添加し、1 時間攪拌した。遠心分離(12,000  $\times$  g, 20 min)によって得られた沈殿を 10 mM (pH 8.0) Tris-HCl 緩衝液に溶解し、同緩衝液に対して透析を行った。2 時間後に緩衝液を交換し、さらに一晩透析を続けた。

透析後の酵素液を 10 mM pH 8.0 Tris-HCl 緩衝液で平衡化した DEAE-Toyopearl カラムクロマトグラフィーにアプライした。同 Tris-HCl 緩衝液で洗浄した後、NaCl 0

から 50 mM の直線的濃度勾配で溶出した。DEAE-Toyopearl カラムの溶出画分を SDS-PAGE にて解析し AMDase に対応するサイズ 24.7 kDa のバンドを含む画分を集めた。これらの画分に 25%飽和になるよう硫酸アンモニウムを徐々に加え 1 時間攪拌した。あらかじめ 25%硫酸アンモニウム飽和の 10 mM pH 8.0 Tris-HCl 緩衝液で平衡化した Butyl-Toyopearl カラムクロマトグラフィーにアプライした。同緩衝液で洗浄した後、25%硫酸アンモニウム飽和から 10%硫酸アンモニウム飽和の直線的濃度勾配で溶出した。Butyl-Toyopearl カラムの溶出画分から目的のバンドを含む画分を集め、限外ろ過により濃縮し、精製 S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase 溶液を得た。

### 酵素活性の測定

200 mM pH 7 のフェニルマロン酸水溶液 50  $\mu$ L(final conc. 20 mM)、1 M pH 8.5 Tris-HCl 緩衝液 50  $\mu$ L に酵素溶液(100  $\mu$ L)を加え、脱イオン水で 500  $\mu$ L とし、酵素溶液を加える前に 10 分間 35  $^{\circ}$ C で保温をした後、35  $^{\circ}$ C で 30 分間反応を行った。1 M 塩酸 125  $\mu$ L を加えて反応を停止した。生成したフェニル酢酸は高速液体クロマトグラフィーにて分析を行い、あらかじめ作成した検量線を用いて生成量を算出した。



$\alpha$ -Methyl- $\alpha$ -(2-thienyl)malonic acid (**1c**)に対する S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase の立体選択性の測定

基質 $\alpha$ -Methyl- $\alpha$ -(2-thienyl)malonic acid (**1c**)は第 4 章に示した方法にて作成した。

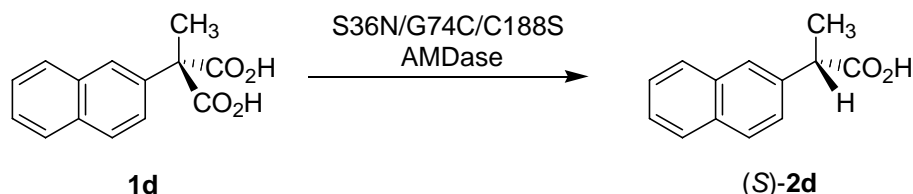
$\alpha$ -Methyl- $\alpha$ -(2-thienyl)malonic acid (**1c**) (40.0 mg, 0.20 mmol)を 1 M Tris-HCl(pH 8.5) 緩衝液 100  $\mu$ L に溶解し、蒸留水を加えて 1 mL とした。精製野生型および各種変異型 AMDase 酵素溶液 1 mL (1 mg protein)を加え、30  $^{\circ}$ C にて反応を行った。2 M HCl を加えて反応を終了した後、エーテルを用いて抽出を行った。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル / 酢酸 = 70 / 30 / 1)により精製し、生成物 **2c** (23.4 mg, 75%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.61 (3H, d,  $J=7.3$  Hz), 4.04 (1H, q,  $J=7.3$  Hz), 6.95-7.23

(3H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\max}$  = 2982, 1715, 1457, 1417, 1236, 699  $\text{cm}^{-1}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +23.0^{\circ}$  (c = 0.10,  $\text{CHCl}_3$ )



$\alpha$ -Methyl- $\alpha$ -(2-naphthyl)malonic acid (**1d**) に対する S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase の立体選択性の測定

基質  $\alpha$ -Methyl- $\alpha$ -(2-naphthyl)malonic acid (**1d**) は第 4 章に示した方法にて作成した。

$\alpha$ -Methyl- $\alpha$ -(2-naphthyl)malonic acid (**1d**) (48.8 mg, 0.20 mmol) を 1 M Tris-HCl (pH 8.5) 緩衝液 100  $\mu\text{L}$  に溶解し、蒸留水を加えて 1 mL とした。精製野生型および各種変異型 AMDase 酵素溶液 1 mL (1mg protein) を加え、30  $^{\circ}\text{C}$  にて反応を行った。2 M HCl を加えて反応を終了した後、エーテルを用いて抽出を行った。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル / 酢酸 = 50 / 50 / 1) により精製し、生成物 **2d** (12.0 mg, 30%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.61 (3H, d,  $J=7.1$  Hz), 3.93 (1H, q,  $J=6.9$  Hz), 7.44-7.83 (7H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\max}$  = 2980, 1698, 1419, 1273, 1225, 963, 747  $\text{cm}^{-1}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +69.3^{\circ}$  (c = 0.10, EtOH)

各基質に対する速度論的パラメータの測定

蒸留水 300  $\mu\text{L}$ 、1 M Tris-HCl (pH 8.5) 緩衝液 50  $\mu\text{L}$ 、各種濃度(20 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM, 200mM)の各基質溶液 50  $\mu\text{L}$  を混合し、35  $^{\circ}\text{C}$  で 10 分間保温した後、S36N/G74C/C188S 三重変異型 AMDase 溶液 100  $\mu\text{L}$  を加え 30 分間酵素反応を行った。HPLC 解析のための内部標準物質として 10 mM の 2-チエニルプロピオン酸、または、2-ナフチルプロピオン酸を含んだ 1 M HCl により反応をクエンチし、以下の条件の HPLC 解析により反応速度を求めた。

HPLC 条件

カラム：PEGASIL-ODS

移動層：CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O / TFA = 2 / 1 / 0.05 (v / v / v)

流速：1.0 mL / min

各基質濃度の逆数と反応速度の逆数から Lineweaver-Burk プロットを描き、各速度論的パラメータを算出した。

### 36 番目のアミノ酸残基に対する Saturated Mutagenesis

Stratagene 社製の変異導入キット Quik Change Site-directed Mutagenesis Kit を用いて部位特異的な変異導入と同じような方法で S36X の変異を導入した。ただし、鋳型プラスミドとして pAMD-S36NG74CC188S を用い、使用したプライマーは以下のような N を含んだ S36XF および S36XR である。N は A, C, G, T の 4 種の混合、K は G or T、M は A or C である。

S36NF : CGATCTGCCCTTCATTGCCNNKGGGCTGGGGCTGGGCTCCG

S36NR : CGGAGCCCAGCCCCAGCCMNNGGCAATGAAGGGCAGATCG

以下の各溶液を混合し、サーマルサイクルにかけた。

pAMD-S36NG74CC188S	1 μL (10 ng)
S36XF	1.25 μL (125 ng)
S36XR	1.25 μL (125 ng)
10 × Reaction buffer	5 μL
dNTP mixture	1 μL
滅菌水	40.5 μL
Pfu Turbo	1 μL

#### サーマルサイクル

1	95 °C	1 min
2	95 °C	50 sec
3	60 °C	50 sec
4	68 °C	4 min
5	(2-4) × 18	
6	68 °C	7 min

続いて、制限酵素 Dpn I を 1 μL 加え 37 °C で一時間保温した。反応溶液 1 μL を使用して大腸菌 XL10-Gold を形質転換した。アンピシリンを含んだ LB 培地プレートに 100 μL 塗布し、37 °C で一晩静置培養し、部位特異的 saturated 変異株を作成した。

36番目がイソロイシン、ヒスチジン、チロシンに変換された変異株は作成されなかったため、以下の点変異導入用プライマーを用いて別個同キットを用いて作成した

S36I\_F : CGATCTGCCCTTCATTGCCATTGGGCTGGGGCTGGGGCTCCG

S36I\_R : CGGAGCCCAGCCCCAGCCCTTAGGCAATGAAGGGCAGATCG

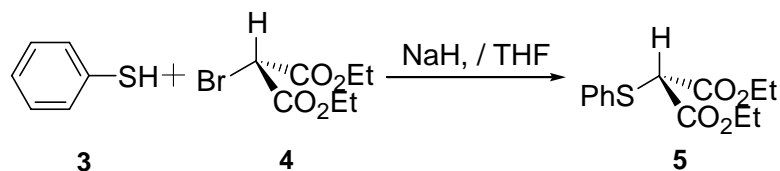
S36H\_F : CGATCTGCCCTTCATTGCCCATGGGCTGGGGCTGGGGCTCCG

S36H\_R : CGGAGCCCAGCCCCAGCCATGGGCAATGAAGGGCAGATCG

S36Y\_F : CGATCTGCCCTTCATTGCCTATGGGCTGGGGCTGGGGCTCCG

S36Y\_R : CGAGCCCAGCCCCAGCCCATAGGCAATGAAGGGCAGATCG

### スクリーニングのための基質合成

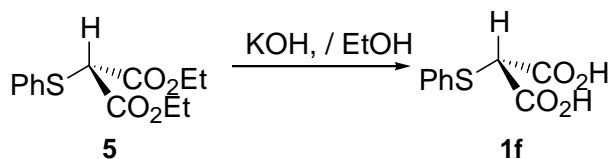


#### Diethyl phenylthiomalonate (5)

水素化ナトリウム(3.36 g, 68.7 mmol)を、無水ヘキサン 10 mL を用いてにて計 3 回洗浄した。ヘキサンを取り除き THF 40 mL を加え、温度を 0 °C に保ちながら、thiophenol (3) (5.15 g, 46.7 mmol)の THF 溶液(10 mL)を加えた。20 分間強く攪拌し続け、diethyl bromomalonate (4) (10.9 g, 45.8 mmol)の THF 溶液(10 mL)を加え 0 °C で 3 時間攪拌した。2 M HCl にて反応をクエンチした後、酢酸エチルを用いて抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過後、減圧下溶媒を留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル=7 / 1)で精製して目的物 5 (9.15 g, 70%)を無色液体として得た。

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 1.16 (6H, t, *J*=7.0 Hz), 4.14(4H, q, *J*=7.1 Hz), 4.46(1H, s), 7.19-7.47 (5H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\max}$  : 2983, 1734, 1441, 1367, 1259, 1146, 1026, 750, 692 cm<sup>-1</sup>



#### Phenylthiomalonic acid (1f)

Diethyl phenylthiomalonate (5) (1.00 g, 3.51 mmol)のエタノール溶液(5 mL)に、水酸化カリウム(1.96 g, 35.1 mmol)エタノール溶液(5 mL)を加え、氷水浴中で 2 時間攪

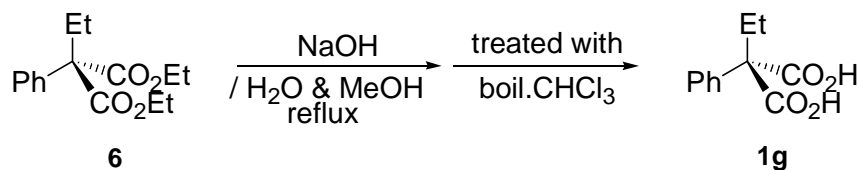


拌した。生じた目的物 **1f** (カリウム塩) (0.33 g, 52%)を濾過により白色結晶として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 4.43 (1H, s), 7.14-7.33 (5H, m)

IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  : 3384, 2981, 1651, 1581, 1554, 1531, 1477, 1369, 1311, 1234, 1165, 1065, 787, 739, 690, 519  $\text{cm}^{-1}$

mp : 113-115  $^{\circ}\text{C}$



$\alpha$ -Ethyl- $\alpha$ -phenylmalonic acid (**1g**)

市販の Diethyl  $\alpha$ -ethyl- $\alpha$ -phenylmalonate (**6**) (2.60 g, 9.84 mmol)のメタノール溶液(5 mL)に、水酸化ナトリウム(3.00 g, 73.8 mmol)水溶液(2 mL)を加え、100  $^{\circ}\text{C}$  にて加熱還流下 10 時間攪拌した。希硫酸にて中和した後ジエチルエーテルを用いて抽出を行い飽和食塩水にて有機層を洗浄した。無水硫酸ナトリウムにて乾燥した後、減圧下溶媒を留去した。生じた残渣に沸騰したクロロホルムを加えることにより、加水分解にて生じた副生成物(2-phenylbutanoic acid)を溶解させて取り除き、濾紙上の残留物をヘキサン / 酢酸エチルより再結晶することで目的物(1.44 g, 70%)を白色結晶として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 0.82 (3H, t,  $J=7.3$  Hz), 2.24 (2H, q,  $J=7.3$  Hz), 7.15-7.40 (5H, m)

IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  : 3100, 2978, 2881, 2630, 1693, 1396, 1271, 914, 725, 700  $\text{cm}^{-1}$

mp : 166  $^{\circ}\text{C}$

合成した各基質を用いて、以下の組成のスクリーニング用プレートを作成した。変異株を直接プレート上に撒き、37  $^{\circ}\text{C}$  で一晩から二晩静置培養することで色の変化を観察した。

---

Yeast extract		0.2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		0.4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0.012 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		0.008 g
NaCl		0.4 g
Glucose		0.05 g
Substrate		20 mM
BTB		5 mg
agar		4 g

---

water	(pH 6)	200 mL
-------	--------	--------

## 実験の部

## 第四章

## G74C 変異型 AMDase の作成

Stratagene 社製の変異導入キット Quik Change Site-directed Mutagenesis Kit を用いて 74 番目のグリシンをシステインへと改変した G74C 変異型 AMDase を作成した。野生型の AMDase 遺伝子を含むプラスミド pAMD101 を鋳型として用いた。使用したプライマーは以下のような、G74CF および G74CR である。マニュアルに従い、中心付近に変異を導入する部分(下線部)が来るようにデザインした。

G74CF: 5'-GTTTCGCTGATGTGCACCTCGCTCAGCTTC-3', 30 mer

G74CR: 5'-GCTGAGCGAGGTGCACATCAGCGAAACCAC-3', 30 mer

以下の各溶液を混合し、サーマルサイクルにかけた。

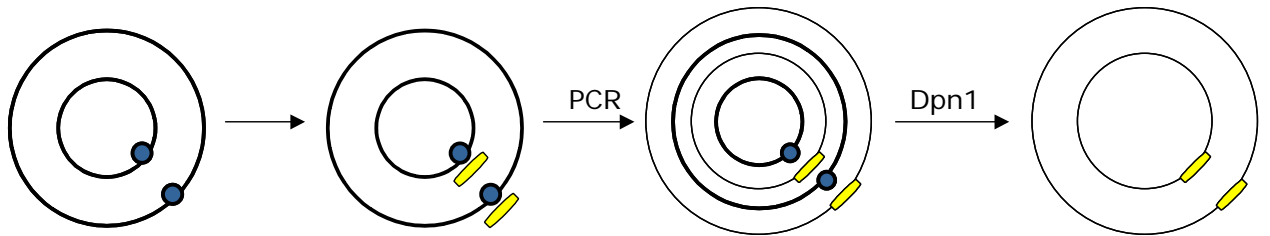
テンプレート DNA(pAMD101)	1 $\mu$ L (10 ng)
プライマー-F(G74CF)	1.25 $\mu$ L (125 ng)
プライマー-R(G74CR)	1.25 $\mu$ L (125 ng)
10 $\times$ Reaction buffer	5 $\mu$ L
dNTP mixture	1 $\mu$ L
滅菌水	40.5 $\mu$ L
Pfu Turbo	1 $\mu$ L

## サーマルサイクル

1	95 $^{\circ}$ C	1 min
2	95 $^{\circ}$ C	50 sec
3	60 $^{\circ}$ C	50 sec
4	68 $^{\circ}$ C	4 min
5	(2-4) $\times$ 18	
6	68 $^{\circ}$ C	7 min

続いて、制限酵素 *Dpn* I を 1  $\mu$ L 加え 37  $^{\circ}$ C で一時間インキュベートすることで、大腸菌の *dam*<sup>+</sup>によりメチル化されている元の鋳型プラスミド pAMD101 のみを選択的に消化した。消化後、変異の導入されたプラスミドを含む反応溶液 1  $\mu$ L を使用し、大腸菌 XL10-Gold を形質転換した。形質転換は、45  $\mu$ L のコンピテントセルに 2  $\mu$ L の  $\beta$ -メルカプトエタノールを加え、10 分間氷中で 2 分ごとにかき混ぜた後、DNA を加え氷中で 30 分インキュベートした。42  $^{\circ}$ C で 30 秒ヒートショックを与え、2 分間氷中で冷やした後、NZY<sup>+</sup>培地を 500  $\mu$ L 加えて 37  $^{\circ}$ C で一時間振盪培養した。

アンピシリンを含んだ LB 培地プレートに 100  $\mu\text{L}$  塗布し、37  $^{\circ}\text{C}$  で一晩静置培養した。



得られてきたコロニーを解析し、目的の変異が導入されたことを確認した。プレート上のコロニーをピックアップし 30  $\mu\text{L}$  の滅菌水に懸濁し、98  $^{\circ}\text{C}$  で 5 分間ボイルした後、遠心した上清をコロニー-PCR 用のテンプレートとした。

以下の各溶液を混合し、サーマルサイクルにかけコロニー-PCR を行った。

テンプレート DNA	10 $\mu\text{L}$
プライマー-F(P5ex)	0.50 $\mu\text{L}$
プライマー-R(P1ex)	0.50 $\mu\text{L}$
10 $\times$ KOD Reaction buffer	5 $\mu\text{L}$
dNTP mixture	5 $\mu\text{L}$
MgSO <sub>4</sub>	3 $\mu\text{L}$
滅菌水	25 $\mu\text{L}$
KOD-plus	1 $\mu\text{L}$

#### サーマルサイクル

1	94 $^{\circ}\text{C}$	2 min
2	94 $^{\circ}\text{C}$	15 sec
3	60 $^{\circ}\text{C}$	50 sec
4	68 $^{\circ}\text{C}$	1 min
5	(2-4) $\times$ 25	
6	68 $^{\circ}\text{C}$	4 min

PCR 生成物をアガロース電気泳動にて対応するバンドを Promega 社製 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System を用いて切り出し精製した。精製した DNA をテンプレートに後ほど述べるように塩基配列の確認を行った。また、並行して育成してきたコロニーを LB 培地へ植菌し、37  $^{\circ}\text{C}$  で一時間振盪培養したのち、Promega 社製 Wizard SV Minipreps DNA Purification System を用いてプラスミド精製を行った。得

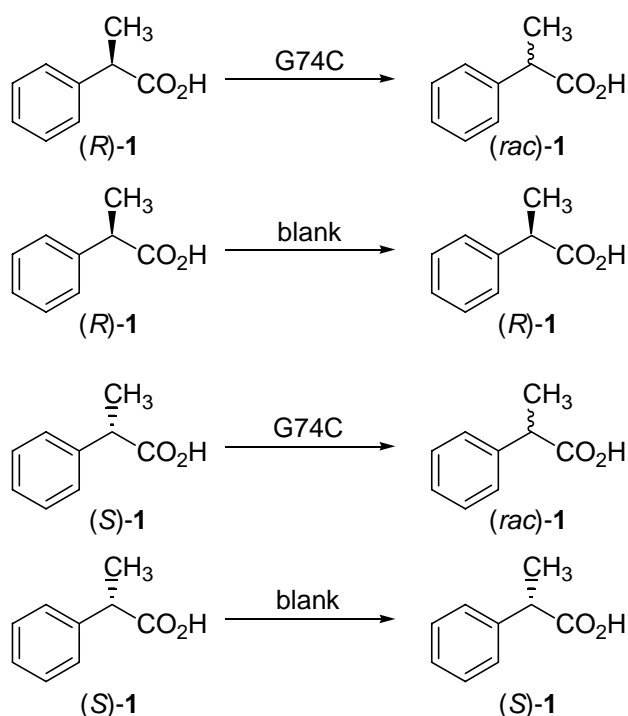
られてきたプラスミドの塩基配列を DNA シーケンサーにて解析し、目的とする G74C 変異型であることを確認した。

#### G74C 変異型 AMDase の酵素精製

G74C 変異導入されたプラスミドを用いて、大腸菌 JM109 を形質転換し、LB 培地で 10 mL × 2 本前培養後、LB 培地 1.5 L で変異型 AMDase を大量培養した。前培養液から 1% となるよう本培養液へと植菌し、30 °C で 2 時間振盪培養した後、酵素誘導剤として IPTG を終濃度 0.1 mM になるように加え、さらに 30 °C で 16 時間振盪培養した。得られてきた大腸菌を遠心分離(12,000 × g, 20 min)により集菌した。以下、4 °C の低温下で酵素精製を行った。pH 7.0、100 mM リン酸緩衝液で洗浄し、遠心分離(12,000 × g, 20 min)により集菌した。ただし、酵素精製に用いた緩衝液には、全て EDTA 0.5 mM、β-メルカプトエタノール 5 mM が含まれている。菌体を再度 pH 7.0、100 mM リン酸緩衝液に懸濁し、フレンチプレスにより 3 回破碎した(1,500 kg/cm<sup>2</sup>)。得られた破碎液を遠心分離(12000 x g, 20 min)し、沈殿を除くことにより無細胞抽出液(cell free extract)を調製した。この酵素液に硫酸プロタミン 2%水溶液を終濃度 1%となるよう加え、30 分攪拌した。生じた沈殿を遠心分離(12,000 × g, 20 min)により除去した。得られた酵素液に硫酸アンモニウムを 60%飽和になるように添加し、1 時間攪拌した。遠心分離(12,000 × g, 20 min)によって得られた沈渣を 10 mM pH 8.0 Tris-HCl 緩衝液に溶解し、同緩衝液に対して透析を行った。2 時間後に緩衝液を交換し、さらに一晚透析を続けた。

透析後の酵素液を 10 mM pH 8.0 Tris-HCl 緩衝液で平衡化した DEAE-Toyopearl カラムクロマトグラフィーにチャージした。同緩衝液で洗浄した後、NaCl 0 mM から 50 mM の直線的濃度勾配で溶出した。DEAE-Toyopearl カラムの溶出画分を SDS-PAGE にて解析し AMDase に対応するサイズ 24.7 kDa のバンドを含む画分を集めた。また、同時に BTB を含んだ 100 mM フェニルマロン酸(pH 6.0)をアッセイ溶液とし、AMDase が含まれると脱炭酸により色が黄色から青色に変色することから、35 °C でインキュベートし、変色した画分を活性化区分とした。これらの画分に 25% 飽和になるよう硫酸アンモニウムを徐々に加え 1 時間攪拌した。あらかじめ 25%硫酸アンモニウム飽和の 10 mM pH 8.0 Tris-HCl 緩衝液で平衡化した Butyl-Toyopearl カラムクロマトグラフィーにチャージした。同緩衝液で洗浄した後、25%硫酸アンモニウム飽和から 10%硫酸アンモニウム飽和の直線的濃度勾配で溶出した。Butyl-Toyopearl カラムの溶出画分から目的のバンドを含む画分を集め、限外ろ過により濃縮し、精製 G74C 変異型 AMDase 液を得た。

AMDase の濃度は、波長 280 nm の吸光度において 1.0(ABS) を 1.0(mg / mL)と近似して算出した。タンパク質濃度は 1.21 mg/mL であった。



### ラセミ化活性の測定

1.5 mL のエッペンドルフチューブに、(R or S)-フェニルプロピオン酸 2.0 mg を 100 mM Tris-HCl (pH 8.5) 緩衝液を 50  $\mu$ L に溶かした。精製した G74C 変異型 AMDase 液 200  $\mu$ L と蒸留水 250  $\mu$ L 加え全体量を 500  $\mu$ L として、37  $^{\circ}$ C で一晩反応させた。2 M HCl を 200  $\mu$ L 加え反応をクエンチした後、エーテルを用いて生成物を定法にて抽出した。エバポレーターを用いて溶媒を留去した後、HPLC により光学純度を確認した。

HPLC 条件

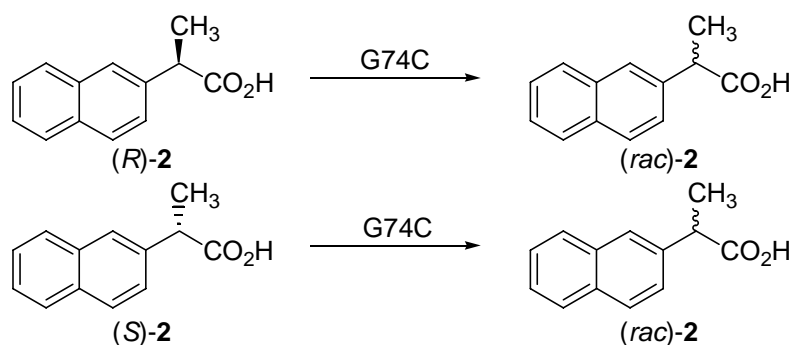
カラム：Chiralcel OD-H

移動層：Hexane / 2-Propanol / TFA = 98 / 2 / 0.1 (v / v / v)

流速：0.5 mL / min

Retention time：R 体 24.4 min、S 体 28.5 min

ブランク実験として、変異型 AMDase の代わりに緩衝液のみを加えたものは、光学純度に変化が見られなかったのに対して、酵素を用いた場合には光学純度が 0% のラセミ体が得られてきた。出発原料が R 体でも S 体でも同様にラセミ化の進行が確認できた。



### 2-ナフチルプロピオン酸のラセミ化

フェニルプロピオン酸と同様、1.5 mLのエッペンドルフチューブに、(R or S)-2-ナフチルプロピオン酸 2.0 mg を 100 mM Tris-HCl (pH 8.5) 緩衝液を 50  $\mu$ L に溶かした。精製した G74C 変異型 AMDase 液 200  $\mu$ L と蒸留水 200  $\mu$ L 加え全体量を 500  $\mu$ L として、37  $^{\circ}$ C で一晩反応させた。2 M HCl を 200  $\mu$ L 加え反応をクエンチした後、エーテルを用いて生成物を定法にて抽出した。エバポレーターを用いて溶媒を留去した後、HPLC により光学純度を確認した。

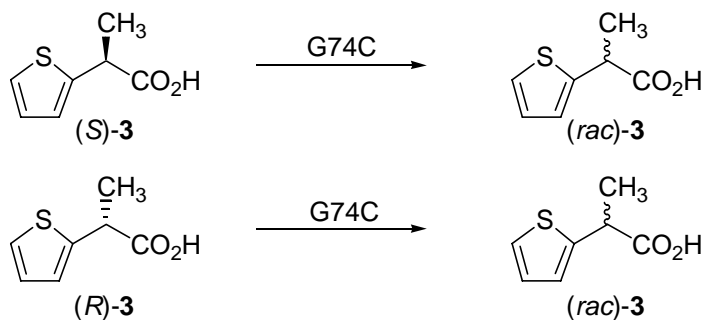
HPLC 条件

カラム：Chiralcel OD-H

移動層：Hexane / 2-Propanol / TFA = 98 / 2 / 0.1 (v / v / v)

流速：0.5 mL / min

Retention time：R 体 41.4 min、S 体 47.8 min



### 2-チエニルプロピオン酸のラセミ化

フェニルプロピオン酸と同様、1.5 mLのエッペンドルフチューブに、(S or R)-2-チエニルプロピオン酸 2.0 mg を 100 mM Tris-HCl (pH 8.5) 緩衝液を 50  $\mu$ L に溶かした。精製した G74C 変異型 AMDase 液 200  $\mu$ L と蒸留水 200  $\mu$ L 加え全体量を 500  $\mu$ L

として、37 °C で一晩反応させた。2 M HCl を 200  $\mu$ L 加え反応をクエンチした後、エーテルを用いて生成物を定法にて抽出した。エバポレーターを用いて溶媒を留去した後、HPLC により光学純度を確認した。

HPLC 条件

カラム : Chiralcel OD-H

移動層 : Hexane / 2-Propanol / TFA = 98 / 2 / 0.1 (v / v / v)

流速 : 0.5 mL / min

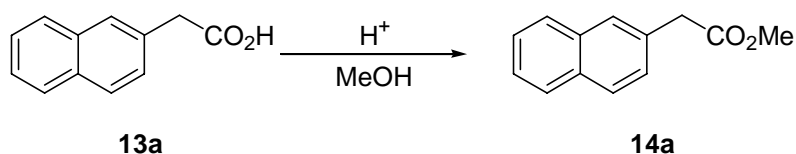
Retention time : S 体 30.0 min、R 体 38.0 min

### pH による反応性の比較

様々な pH の緩衝液中で、ラセミ化反応の速度を測定した。使用した緩衝液は以下の通りである。緩衝液の種類と pH を変化させ、前述したのと同じ条件にて pH による活性の変化を測定した。

100 mM MES-NaOH 緩衝液	pH 5.5-6.5
100 mM リン酸緩衝液	pH 6.5-7.5
100 mM Tris-HCl 緩衝液	pH 7.5-9.0
100 mM Glycine-NaOH 緩衝液	pH 9.0-10.0

### 基質合成



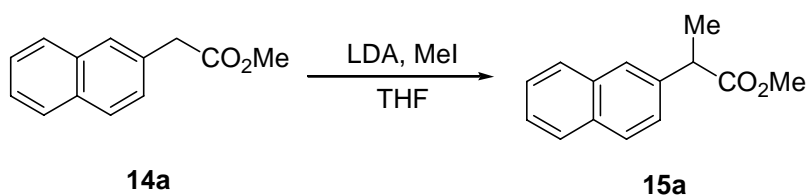
### Methyl 2-naphthylacetate (14a)

市販品の 2-naphthylacetic acid (13a) (5.00 g, 26.9 mmol) と触媒量の p-トルエンスルホン酸一水和物をメタノール 40 mL に加え、加熱還流下 3 時間攪拌した。メタノールを減圧下留去し、酢酸エチルを用いて抽出した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。硫酸マグネシウムを濾過した後、減圧下溶媒を留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル = 3 / 1) で精製し目的物 14a (5.35 g, 99%) を無色液体として得た。

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 3.69 (3H, s), 3.78 (2H, s), 7.38-7.81 (7H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\max}$  : 3456, 3054, 2951, 2842, 1736, 1601, 1509, 1435, 1263, 1161, 1016, 819,

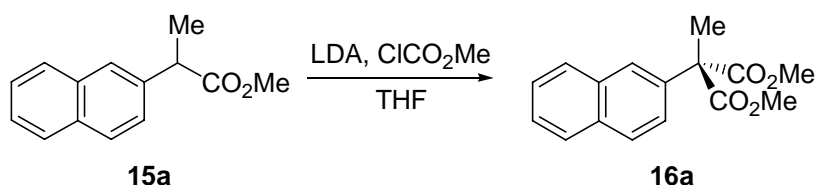


759, 705, 637  $\text{cm}^{-1}$ Methyl 2-(2-naphthyl)propionate (**15a**)

アルゴン雰囲気下、 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  にて diisopropylamine(2.10 mL, 15.0 mmol) / THF (20 mL)を 200 mL ナスフラスコにとり、*n*-butyl lithium のヘキサン溶液(8.22 mL, 15.0 mmol)を滴下して LDA を調製した。滴下終了後 30 分間その温度で撹拌した。この溶液に Methyl  $\alpha$ -(2-naphthyl)acetate (**14a**) (2.00 g, 10.0 mmol)の THF 溶液(20 mL)を加え、30 分間 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  で撹拌した。次に、よう化メチル (0.93 mL, 15.0 mmol)を加え、温度を $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  から室温(約  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ )へと自然昇温させ、2 時間撹拌した。2 M 塩酸 (20 mL)を加えてクエンチした後、酢酸エチルを用いて抽出、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水、10%亜硫酸ナトリウム水溶液で洗浄した。無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、濾過、減圧下溶媒を留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル=4 / 1)で精製して目的物 **15a** (2.08 g, 97%)を無色液体として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.58 (3H, d,  $J=7.1$  Hz), 3.65 (3H, s), 3.88 (1H, q,  $J=7.1$  Hz), 7.40-7.81 (7H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$  : 3449, 3056, 2979, 2951, 1919, 1732, 1601, 1508, 1455, 1434, 1378, 1331, 1198, 1093, 1066, 949, 859, 822, 795, 748, 709  $\text{cm}^{-1}$

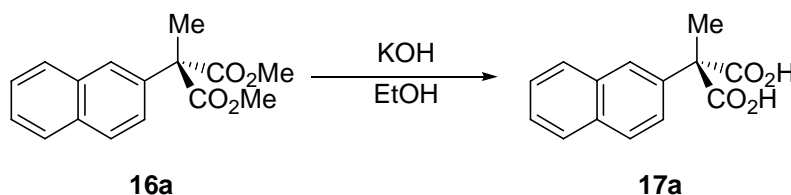
Dimethyl  $\alpha$ -methyl- $\alpha$ -(2-naphthyl)malonate (**16a**)

アルゴン雰囲気下、 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  にて diisopropylamine(1.47 mL, 11.5 mmol) / THF (10 mL)を 200 mL ナスフラスコにとり、*n*-butyl lithium のヘキサン溶液(5.76 mL, 11.5 mmol)を滴下して LDA を調製した。滴下終了後 30 分間その温度で撹拌した。この溶液に

Methyl 2-(2-naphthyl)propionate (**15a**) (1.50 g, 7.0 mmol) の THF 溶液 (10 mL) を加え、30 分間 $-78^{\circ}\text{C}$  で攪拌した。次に、クロロギ酸メチル(0.90 mL, 11.5 mmol)を加え、温度を $-78^{\circ}\text{C}$  から室温(約  $22^{\circ}\text{C}$ )へと自然昇温させ、2 時間攪拌した。2 M 塩酸 (10 mL) を加えてクエンチした後、酢酸エチルを用いて抽出、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、濾過、減圧下溶媒を留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル=6 / 1)で精製して目的物(1.73 g, 95%)を無色液体として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.97 (3H, s), 3.77 (6H, s), 7.45-7.82 (7H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$  : 3458, 3000, 2952, 1733, 1434, 1378, 1255, 1113, 820, 750  $\text{cm}^{-1}$



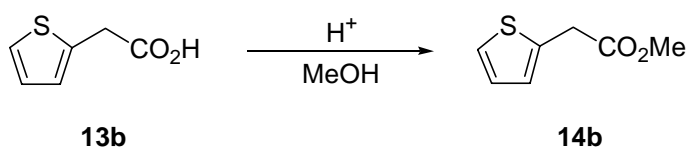
#### $\alpha$ -Methyl- $\alpha$ -(2-naphthyl)malonic acid (**17a**)

100 mL ナスフラスコに Dimethyl  $\alpha$ -methyl- $\alpha$ -(2-naphthyl)malonate (**16a**) (0.67 g, 2.46 mmol)のメタノール溶液(20 mL)と、水酸化カリウム(2.24 g, 24.6 mmol)水溶液 (20 mL)を混合し、氷水浴中で 1 時間攪拌して加水分解を行った。濃塩酸(10 mL)を加えた後、減圧下溶媒を留去しエーテルを用いて抽出した。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、濾過、減圧下溶媒を留去した。得た残留物をヘキサン / 酢酸エチルから再結晶することにより、目的物 **17a** (0.48 g, 80 %)を白色結晶として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 1.97 (3H, s), 7.48-7.97 (7H, m)

IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  : 3529, 3060, 2629, 1715, 1455, 1388, 1287, 1129, 815, 751, 707  $\text{cm}^{-1}$

mp : 170-172  $^{\circ}\text{C}$



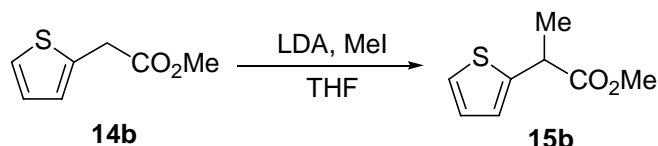
#### Methyl 2-thienylacetate (**14b**)

市販品の 2-thienylacetic acid (**13b**) (5.00 g, 40.0 mmol)と触媒量の p-トルエンスルホン酸一水和物をメタノール 40 mL に加え、加熱還流下 3 時間攪拌した。メタノール

を減圧下留去し、酢酸エチルを用いて抽出した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。硫酸マグネシウムを濾過した後、減圧下溶媒を留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル = 5 / 1)で精製し目的物 **14b** (5.49 g, 99%)を無色液体として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 3.73 (3H, s), 3.85 (2H, s), 6.95-7.23 (3H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$  : 3108, 3002, 2950, 1730, 1440, 1329, 1172, 1011, 850, 706  $\text{cm}^{-1}$

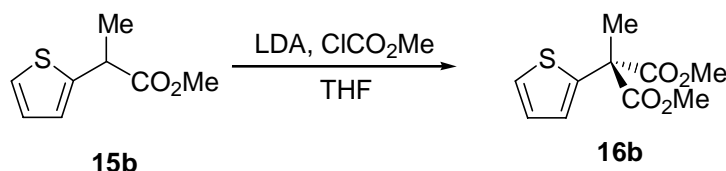


#### Methyl 2-(2-thienyl)propionate (**15b**)

アルゴン雰囲気下、 $-78\text{ }^\circ\text{C}$  にて diisopropylamine(2.53 mL, 18.0 mmol) / THF (20 mL)を 200 mL ナスフラスコにとり、*n*-butyl lithium のヘキサン溶液(9.87 mL, 18.0 mmol)を滴下して LDA を調製した。滴下終了後 30 分間その温度で撹拌した。この溶液に Methyl 2-(2-thienyl)acetate (**14b**) (2.34 g, 12.0 mmol)の THF 溶液(20 mL)を加え、30 分間 $-78\text{ }^\circ\text{C}$  で撹拌した。次に、よう化メチル(1.40 mL, 18.0 mmol)を加え、温度を $-78\text{ }^\circ\text{C}$  から室温へと自然昇温させ、2 時間撹拌した。2 M 塩酸 (20 mL)を加えてクエンチした後、酢酸エチルを用いて抽出、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水、10%亜硫酸ナトリウム水溶液で洗浄した。無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、濾過、減圧下溶媒を留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル=5 / 1)で精製して目的物 **15b** (2.19 g, 86%)を無色液体として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.57 (3H, d,  $J=7.3$  Hz), 3.69 (3H, s), 4.00 (1H, q,  $J=7.2$  Hz), 6.93 (2H, d,  $J=3.2$  Hz), 7.18 (1H, t,  $J=3.2$  Hz)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$  : 3108, 2981, 2950, 1742, 1530, 1439, 1370, 1330, 1200, 1060, 853, 701  $\text{cm}^{-1}$



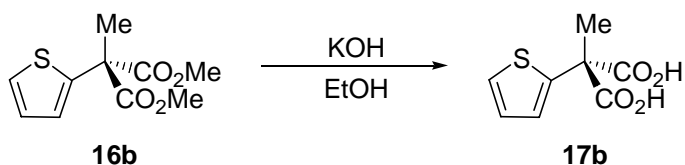
#### Dimethyl $\alpha$ -methyl- $\alpha$ -(2-thienyl)malonate (**16b**)

アルゴン雰囲気下、 $-78\text{ }^\circ\text{C}$  にて diisopropylamine(1.05 mL, 7.5 mmol) / THF (10 mL)を 200 mL ナスフラスコにとり、*n*-butyl lithium のヘキサン溶液(4.11 mL, 7.5 mmol)を滴下して LDA を調製した。滴下終了後 30 分間その温度で撹拌した。この溶液に

Methyl 2-(2-thienyl)propionate (**15b**) (0.85 g, 5.0 mmol) の THF 溶液 (10 mL) を加え、30 分間 $-78^{\circ}\text{C}$  で攪拌した。次に、クロロギ酸メチル(0.58 mL, 7.5 mmol)を加え、温度を $-78^{\circ}\text{C}$  から室温へと自然昇温させ、2 時間攪拌した。2 M 塩酸 (10 mL)を加えてクエンチした後、酢酸エチルを用いて抽出、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、濾過、減圧下溶媒を留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル=9 / 1)で精製して目的物 **16b** (1.10 g, 97%)を無色液体として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.97 (3H, s), 3.77 (6H, s), 7.45-7.82 (7H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$  : 3458, 3000, 2952, 1733, 1434, 1378, 1255, 1113, 820, 750  $\text{cm}^{-1}$



#### $\alpha$ -Methyl- $\alpha$ -(2-thienyl)malonic acid (**17b**)

100 mL ナスフラスコに Dimethyl  $\alpha$ -methyl- $\alpha$ -(2-thienyl)malonate (**16b**) (0.99 g, 4.38 mmol)のメタノール溶液(20 mL)と、水酸化カリウム(3.18 g, 43.8 mmol)水溶液(20 mL)を混合し、氷水浴中で 1 時間攪拌して加水分解を行った。濃塩酸(10 mL)を加えた後、減圧下溶媒を留去しエーテルを用いて抽出した。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、濾過、減圧下溶媒を留去した。得た残留物をヘキサン / 酢酸エチルから再結晶することにより、目的物 **17b** (0.73 g, 82 %)を白色結晶として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 1.91 (3H, s), 6.95-7.40 (3H, m)

IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  : 3000, 2648, 1700, 1455, 1418, 1346, 1279, 1202, 1130, 1100, 1050, 1020, 910, 850, 785, 745, 700  $\text{cm}^{-1}$

mp : 157-159  $^{\circ}\text{C}$



(R)-2-(2-naphthyl)propionic acid ((R)-2)

$\alpha$ -methyl- $\alpha$ -(2-naphthyl)malonic acid (**17a**) (544 mg, 2 mmol)を 1 M Tris-HCl(pH 8.5)緩衝液 2 mL に溶解させ、蒸留水を加えて 10 mL とした。20 mL ナスフラスコに、基質水溶液 1 mL (200  $\mu$ mol)と精製野生型 AMDase 酵素溶液 1 mL (1 mg protein)を加え、30  $^{\circ}$ C で 3 時間攪拌した。2 M 塩酸水溶液 1 mL を加えて反応を終了した後、エーテルを用いて抽出を行った。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル / 酢酸 = 50 / 50 / 1)により精製し、目的物(R)-2 (44.1 mg, 99%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.61 (3H, d,  $J=7.1$  Hz), 3.93 (1H, q,  $J=6.9$  Hz), 7.44-7.83 (7H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$  : 2980, 1698, 1419, 1273, 1225, 963, 747  $\text{cm}^{-1}$

以下の条件の HPLC により光学純度の測定を行った。

HPLC 条件

カラム : Chiralcel OD-H

移動層 : Hexane / 2-Propanol / TFA = 98 / 2 / 0.1 (v / v / v)

流速 : 0.5 mL / min

Retention time : R 体 41.4 min、S 体 47.8 min

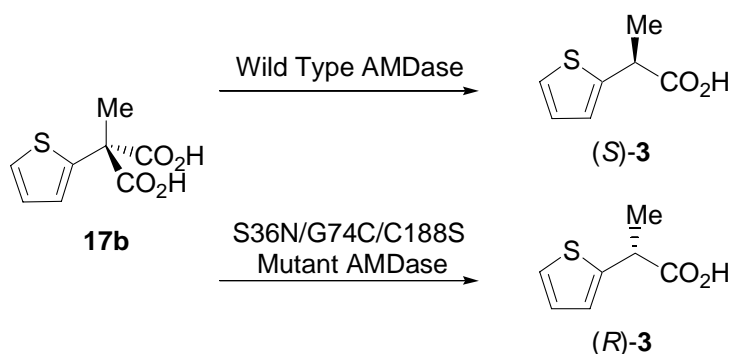
(S)-2-(2-naphthyl)propionic acid ((S)-2)

$\alpha$ -methyl- $\alpha$ -(2-naphthyl)malonic acid (**17a**) (544 mg, 2 mmol)を 1 M Tris-HCl(pH 8.5)緩衝液 2 mL に溶解させ、蒸留水を加えて 10 mL とした。20 mL ナスフラスコに、基質水溶液 1 mL (200  $\mu$ mol)と精製 S36N/G74C/C188S 変異型 AMDase 酵素溶液 1 mL (1 mg protein)を加え、30  $^{\circ}$ C で 24 時間攪拌した。2 M 塩酸水溶液 1 mL を加えて反応

を終了した後、エーテルを用いて抽出を行った。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル/酢酸 = 50 / 50 / 1)により精製し、目的物(S)-2 (13.1 mg, 30%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.61 (3H, d,  $J=7.1$  Hz), 3.93 (1H, q,  $J=6.9$  Hz), 7.44-7.83 (7H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$  : 2980, 1698, 1419, 1273, 1225, 963, 747  $\text{cm}^{-1}$



#### (S)-2-(2-thienyl)propionic acid ((S)-3)

$\alpha$ -methyl- $\alpha$ -(2-thienyl)malonic acid (**17b**) (456 mg, 2 mmol)を 1 M Tris-HCl(pH 8.5)緩衝液 2 mL に溶解させ、蒸留水を加えて 10 mL とした。20 mL ナスフラスコに、基質水溶液 1 mL (200  $\mu\text{mol}$ )と精製野生型 AMDase 酵素溶液 1 mL (1 mg protein)を加え、30  $^{\circ}\text{C}$  で 3 時間攪拌した。2 M 塩酸水溶液 1 mL を加えて反応を終了した後、エーテルを用いて抽出を行った。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル/酢酸 = 70 / 30 / 1)により精製し、目的物(S)-3 (35.5 mg, 99%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.61 (3H, d,  $J=7.3$  Hz), 4.04 (1H, q,  $J=7.3$  Hz), 6.95-7.23 (3H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$  : 2982, 1715, 1457, 1417, 1236, 699  $\text{cm}^{-1}$

以下の条件の HPLC により光学純度の測定を行った。

HPLC 条件

カラム : Chiralcel OD-H

移動層 : Hexane / 2-Propanol / TFA = 98 / 2 / 0.1 (v / v / v)

流速 : 0.5 mL / min

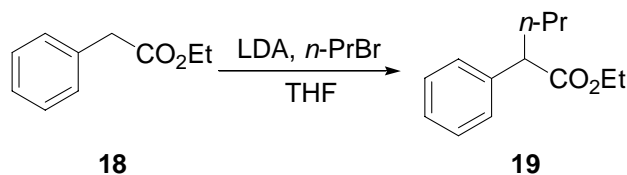
Retention time : S 体 30.0 min、R 体 38.0 min

(*R*)-2-(2-thienyl)propionic acid ((*R*)-**3**)

$\alpha$ -methyl- $\alpha$ -(2-thienyl)malonic acid (**17b**) (456 mg, 2 mmol)を 1 M Tris-HCl(pH 8.5)緩衝液 2 mL に溶解させ、蒸留水を加えて 10 mL とした。20 mL ナスフラスコに、基質水溶液 1 mL (200  $\mu$ mol)と精製 S36N/G74C/C188S 変異型 AMDase 酵素溶液 1 mL (1 mg protein)を加え、30 °C で 3 時間攪拌した。2 M 塩酸水溶液 1 mL を加えて反応を終了した後、エーテルを用いて抽出を行った。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル / 酢酸 = 70 / 30 / 1)により精製し、目的物 (*R*)-**3** (27.7 mg, 78%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 1.61 (3H, d, *J*=7.3 Hz), 4.04 (1H, q, *J*=7.3 Hz), 6.95-7.23 (3H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\max}$  : 2982, 1715, 1457, 1417, 1236, 699 cm<sup>-1</sup>

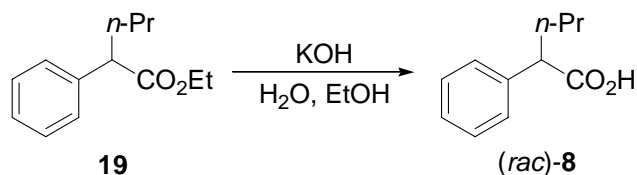


Ethyl 2-phenylpentanoate (**19**)

アルゴン雰囲気下、-78 °C にて diisopropylamine (0.94 mL, 6.7 mmol) の THF (10 mL)溶液に *n*-BuLi in hexane (4.21 mL, 6.7 mmol)を滴下し、30 分間攪拌することで LDA を作成した。市販品の ethyl phenylacetate (**18**) (1.00 g, 6.1 mmol) の THF (10 mL)溶液を滴下し、さらに 30 分間攪拌した。続いて、1-bromopropane (0.61 mL, 6.7 mmol)を加え、-78 °C から室温まで自然昇温させた。2 M HCl を用いて反応をクエンチし、酢酸エチルを用いて抽出した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、10%亜硫酸ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル = 9 / 1)により精製し、目的物 **19** (1.09 g, 87%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.91 (3H, t, *J*= 7.4 Hz), 1.20 (3H, t, *J*= 7.2 Hz), 1.26-1.34 (2H, m), 1.69-1.81 (1H, m), 1.98-2.11 (1H, m), 3.53 (1H, t, *J*= 7.7 Hz), 4.13 (2H, m), 7.22-7.31 (5H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\max}$ : 2960, 2873, 1733, 1454, 1369, 1265, 1162, 1031, 732, 698  $\text{cm}^{-1}$



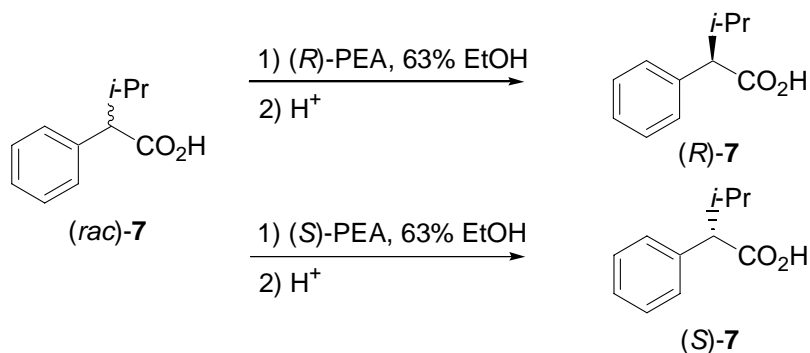
## 2-Phenylpentanoic acid (**8**)

ethyl 2-phenylpentanoate (**19**) (0.90 g, 4.3 mmol)のエタノール溶液(10 mL)に水酸化カリウム (2.41 g, 43 mmol)水溶液(10 mL)を加え、室温で16時間攪拌した。6 M HClでクエンチ後、減圧下エタノールを留去し、エーテルで抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル/酢酸 = 30/10/1)により精製し、目的物 **8** (0.70 g, 90%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.91 (3H, t,  $J$  = 7.3 Hz), 1.24-1.36 (2H, m), 1.73-1.80 (1H, m), 1.98-2.08 (1H, m), 3.56 (1H, t,  $J$  = 7.1 Hz), 7.22-7.31 (5H, m);

IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 2956, 2659, 1697, 1455, 1413, 1249, 1214, 1186, 1070, 952, 727, 698  $\text{cm}^{-1}$

mp : 51-52 °C



## 2-isopropyl-2-phenylacetic acid (**7**)の光学分割

市販品の (rac)-2-isopropyl-2-phenylacetic acid (**7**) (115.3 mg, 0.65 mmol) と (R)-(+)-phenylethylamine (78.3 mg, 0.65 mmol)を63%エタノール水溶液(2.5 mL)に加え、熱を加えることで一旦溶解させ、徐々に冷却した。生成した沈殿の塩を濾過することで母液と分離し回収した(87.3 mg)。同様に63%エタノール水溶液(2.0, 1.5, 1.0 mL)から再結晶を計4回繰り返し、アンモニウム塩 58.3 mg を得た。0 °C にて10%



硫酸で処理し、エーテルで抽出、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル / 酢酸 = 40 / 10 / 1)により精製し、目的物(*R*)-7 (31.2 mg, 27%)を得た。

得られた母液から、(*S*)-(+)-phenylethylamine を用いて同様の方法にて、目的物(*S*)-7 (20.5 mg, 18%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.14 (3H, d, *J* = 7.2 Hz), 2.8 (1H, q, *J* = 7.2 Hz), 7.24-7.36 (5H, m)

IR (KBr) ν<sub>max</sub>: 3361, 3185, 1658, 1496, 1452, 1405, 1288, 1133, 696 cm<sup>-1</sup>

mp: 86-88 °C

[α]<sub>D</sub><sup>22</sup> = - 58.2 ° (c = 1.1, CHCl<sub>3</sub>, *R*-form), + 57.8 ° (c = 1.10, CHCl<sub>3</sub>, *S*-form)

以下の条件の HPLC により光学純度の測定を行った。

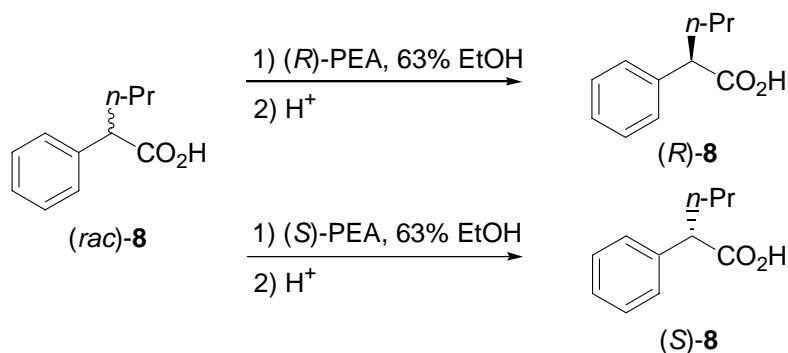
HPLC 条件

カラム : Chiralcel OD-H

移動層 : Hexane / 2-Propanol / TFA = 95 / 5 / 0.05 (v / v / v)

流速 : 0.5 mL / min

Retention time : R 体 11.8 min、S 体 14.4 min



### 2-phenylpentanoic acid (8)の光学分割

(*rac*)-2-Phenylpentanoic acid (8) (115.3 mg, 0.65 mmol)と(*R*)-(+)-phenylethylamine (78.3 mg, 0.65 mmol)を 63% エタノール水溶液(2.5 mL)に加え、熱を加えることで一旦溶解させた。徐々に冷却することで塩の沈殿物(77.7 mg)を得た。濾過することで母液と分離し回収した。同様に 63%エタノール水溶液(2.0, 1.5, 1.0 mL)から再結晶を計 4 回繰り返し、アンモニウム塩 58.3 mg を得た。0 °C にて 10%硫酸で処理し、エ

ーテルで抽出、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル/酢酸 = 30 / 10 / 1)により精製し、目的物(*R*)-**8**(5.0 mg, 4%)を得た。

得られた母液から、(*S*)-(+)-phenylethylamine を用いて同様の方法にて、目的物(*S*)-**8**(10.5 mg, 9%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.91 (3H, t,  $J=7.3\text{Hz}$ ), 1.24-1.36 (2H, m), 1.73-1.80 (1H, m), 1.98-2.08 (1H, m), 3.56 (1H, t,  $J=7.1\text{Hz}$ ), 7.22-7.31 (5H, m);

IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 2956, 2659, 1697, 1455, 1413, 1249, 1214, 1186, 1070, 952, 727, 698  $\text{cm}^{-1}$   
mp: 51-52  $^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +54.0^{\circ}$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ , *R*-form),  $-53.8^{\circ}$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ , *S*-form)

以下の条件の HPLC により光学純度の測定を行った。

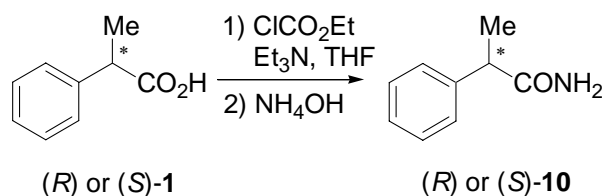
HPLC 条件

カラム: Chiralcel OD-H

移動層: Hexane / 2-Propanol / TFA = 95 / 5 / 0.05 (v / v / v)

流速: 0.5 mL / min

Retention time: R 体 12.6 min、S 体 14.3 min



#### (*R*)-2-phenylpropionamide ((*R*)-**10**)

$-15^{\circ}\text{C}$  にて、(*R*)-2-phenylpropionic acid ((*R*)-**1**) (500 mg, 3.3 mmol) の THF (5 mL) 溶液に triethylamine (364 mg, 3.6 mmol) 存在下、ethyl chloroformate (2.9 mL, 3.6 mmol) を 20 分かけて滴下した。28% ammonium hydroxide (2.1 mL 16.6 mmol) 水溶液を加え、 $0^{\circ}\text{C}$  で 2 時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、エーテルを用いて抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。残渣をヘキサン/酢酸エチルから再結晶し、目的物(*R*)-**10**(391 mg, 79%)を無色個体として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.14 (3H, d,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 2.8 (1H, q,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 7.24-7.36 (5H, m); IR  $\nu_{\text{max}}$ : 3361, 3185, 1658, 1496, 1452, 1405, 1288, 1133, 696  $\text{cm}^{-1}$

mp : 86-88 °C

$[\alpha]_D^{22} = -54.0^\circ$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>)

得られてきた化合物の光学純度は、触媒量の硫酸存在下、メタノール中 3 時間加熱還流することでメチルエステル体へと変換し、測定した。

HPLC 条件

カラム : Chiralcel OJ

移動層 : Hexane / 2-Propanol = 90 / 10

流速 : 0.5 mL / min

Retention time : S 体 13.2 min、R 体 15.0 min

(S)-2-phenylpropionamide ((S)-**10**)

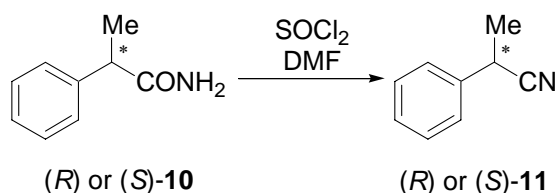
-15 °C にて、(S)-2-phenylpropionic acid ((R)-**1**) (500 mg, 3.3 mmol) の THF (5 mL) 溶液に triethylamine (364 mg, 3.6 mmol) 存在下、ethyl chloroformate (2.9 mL, 3.6 mmol) を 20 分かけて滴下した。28% ammonium hydroxide (2.1 mL 16.6 mmol) 水溶液を加え、0 °C で 2 時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、エーテルを用いて抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。残渣をヘキサン / 酢酸エチルから再結晶し、目的物(S)-**10**(390 mg, 79%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.14 (3H, d, J= 7.2Hz), 2.8 (1H, q, J=7.2Hz), 7.24-7.36 (5H, m)

IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3361, 3185, 1658, 1496, 1452, 1405, 1288, 1133, 696 cm<sup>-1</sup>

mp : 86-88 °C

$[\alpha]_D^{22} = +52.8^\circ$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>)



(R)-2-phenylpropionitrile ((R)-**11**)

(R)-2-phenylpropionamide ((R)-**10**) (22.4 mg, 0.15 mmol) の DMF (1 mL) とベンゼン(2

mL)溶液に thionyl chloride (35.7 mg, 0.30 mmol)を加え、室温でアミドが全て変換されるまで撹拌を続けた。砕いた氷に反応液を注ぎクエンチした後、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル = 1 / 1)により精製し、目的物(*R*)-**11**(6.3 mg, 32%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.55 (3H, d, *J*= 7.0Hz), 3.66 (1H, q, *J*=7.0Hz), 7.24-7.42 (5H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\max}$ : 3032, 2938, 2244, 1711, 1600, 1494, 1462, 1379, 1284, 1199, 1081, 760, 696 cm<sup>-1</sup>

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>22</sup> = + 14.0 ° (c = 1.10, Et<sub>2</sub>O)

#### HPLC 条件

カラム : Chiralcel OB

移動層 : hexane / 2-propanol = 95 / 5

流速 : 0.5 mL/min

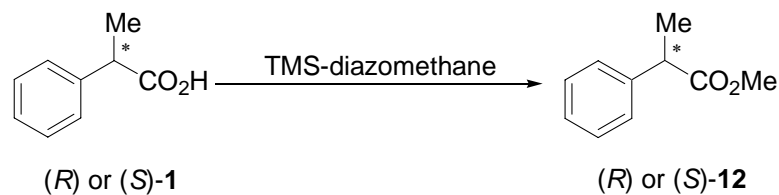
Retention time : S 体 24.7 min、R 体 28.9 min

#### (*S*)-2-phenylpropionitrile ((*S*)-**11**)

(*S*)-2-phenylpropionamide ((*S*)-**10**) (22.4 mg, 0.15 mmol)の DMF (1 mL)とベンゼン(2 mL)溶液に thionyl chloride (35.7 mg, 0.30 mmol)を加え、室温でアミドが全て変換されるまで撹拌を続けた。砕いた氷に反応液を注ぎクエンチした後、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル = 1 / 1)により精製し、目的物(*S*)-**11**(7.4 mg, 38%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.55 (3H, d, *J*= 7.0Hz), 3.66 (1H, q, *J*=7.0Hz), 7.24-7.42 (5H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\max}$ : 3032, 2938, 2244, 1711, 1600, 1494, 1462, 1379, 1284, 1199, 1081, 760, 696 cm<sup>-1</sup>



**(R)-Methyl 2-phenylpropionate ((R)-12)**

(R)-2-phenylpropionic acid ((R)-1) (5.0 mg, 0.03 mmol)のメタノール溶液(1 mL)に TMS-diazomethane ヘキサン溶液を滴下し、減圧下溶媒等を留去した後、分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル = 3 / 1)により精製し、目的物(R)-12 (5.4 mg, 99%)を無色液体として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.50 (3H, d,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 3.65 (3H, s), 3.72 (1H, q,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 7.23-7.35 (5H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$ : 3451, 2981, 2951, 1737, 1601, 1494, 1454, 1434, 1375, 1330, 1208, 1166, 1067, 1031, 967, 858, 769, 735, 699  $\text{cm}^{-1}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -90.6^\circ$  ( $c = 1.0$ , EtOH)

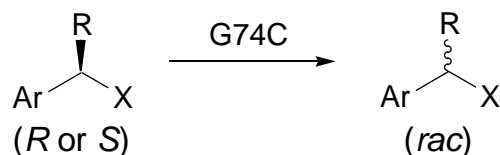
HPLC 条件

カラム : Chiralcel OJ

移動層 : Hexane / 2-Propanol = 90 / 10

流速 : 0.5 mL / min

Retention time : S 体 13.2 min、R 体 15.0 min



Sub.	Ar	R	X	Activity
1	Ph	Me	CO <sub>2</sub> H	++
2	2-Np	Me	CO <sub>2</sub> H	+++
3	2-Th	Me	CO <sub>2</sub> H	+++
4	Ph	NH <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> H	+
5	Ph	OH	CO <sub>2</sub> H	+
6	Ph	Et	CO <sub>2</sub> H	+
7	Ph	<i>i</i> -Pr	CO <sub>2</sub> H	-
8	Ph	<i>n</i> -Pr	CO <sub>2</sub> H	-
9	Ph	Me	CH <sub>2</sub> OH	-
10	Ph	Me	CONH <sub>2</sub>	-
11	Ph	Me	CN	-
12	Ph	Me	CO <sub>2</sub> Me	-

#### G74C 変異型 AMDase によるラセミ化反応

1.5 mL のエッペンドルフチューブに、(R or S)-フェニルプロピオン酸 1.0 mg を 100 mM Tris-HCl (pH 8.5) 緩衝液を 50 μL に溶かした。精製した G74C 変異型 AMDase 液 200 μL と蒸留水 250 μL 加え全体量を 500 μL とし、37 °C で一晩反応させた。2 M HCl を 200 μL 加え反応をクエンチした後、定法にてエーテルを用いて生成物を抽出し、HPLC により光学純度を確認した。

#### 各基質における HPLC 条件

##### 2-Phenylpropionic acid (1)

カラム ; Chiralcel OD-H, 移動層 ; hexane / 2-propanol / TFA = 98 / 2 / 0.1 (v / v / v),  
 流速 ; 0.5 mL/min, 保持時間 R<sub>t</sub> (min) ; 24.4(R), 28.5(S)

##### 2-(2-Naphthyl)propionic acid (2)

カラム ; Chiralcel OD-H, 移動層 ; hexane / 2-propanol / TFA = 98 / 2 / 0.1 (v / v / v),  
 流速 ; 0.5 mL/min, R<sub>t</sub> (min); 41.4(R), 47.8(S)

##### 2-(2-Thienyl)propionic acid (3)

カラム ; Chiralcel OD-H, 移動層 ; hexane / 2-propanol / TFA = 98 / 2 / 0.1 (v / v / v),  
 流速 ; 0.5 mL/min, R<sub>t</sub> (min); 30.0(S), 38.0(R)

Phenylglycine (4)

カラム ; Crownpak CR(+), 移動層 ; HClO<sub>4</sub>aq, pH = 2.0, 流速 ; 1.0 mL/min, R<sub>t</sub> (min); 2.3(D), 4.5(L)

Mandelic acid (5)

カラム ; Chiralcel OD-H, 移動層 ; hexane / 2-propanol / TFA = 90 / 10 / 0.1 (v / v / v), 流速 ; 0.5 mL/min, R<sub>t</sub> (min); 21.0(S), 26.1(R)

2-Phenylbutyric acid (6)

カラム ; Chiralcel OD-H, 移動層 ; hexane / 2-propanol / TFA = 95 / 5 / 0.05 (v / v / v), 流速 ; 0.5 mL/min, R<sub>t</sub> (min); 13.8(R), 17.0(S)

2-isopropyl-2-phenylacetic acid (7)

カラム ; Chiralcel OD-H, 移動層 ; hexane / 2-propanol / TFA = 95 / 5 / 0.05 (v / v / v), 流速 ; 0.5 mL/min, R<sub>t</sub> (min); 11.8(R), 14.4(S)

2-Phenylpentanoic acid (8)

カラム ; Chiralcel OD-H, 移動層 ; hexane / 2-propanol / TFA = 95 / 5 / 0.05 (v / v / v), 流速 ; 0.5 mL/min, R<sub>t</sub> (min); 12.6(R), 14.3(S)

2-Phenylpropanol (9)

カラム ; Chiralcel OB, 移動層 ; hexane / 2-propanol = 95 / 5, 流速 ; 0.5 mL/min, R<sub>t</sub> (min); 17.9(S), 19.4(R)

2-Phenylpropionamide (10)

カラム ; Chiralcel OJ, 移動層 ; hexane / 2-propanol = 90 / 10, 流速 ; 0.5 mL/min, R<sub>t</sub> (min); 13.2(S), 15.0(R)

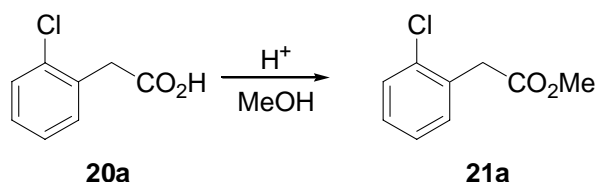
2-Phenylpropionitrile (11)

カラム ; Chiralcel OB, 移動層 ; hexane / 2-propanol = 95 / 5, 流速 ; 0.5 mL/min, R<sub>t</sub> (min); 24.7(S), 28.9(R)

Methyl 2-phenylpropionate (12)

カラム ; Chiralcel OJ, 移動層 ; hexane / 2-propanol = 90 / 10, 流速 ; 0.5 mL/min, R<sub>t</sub> (min); 13.2(S), 15.0(R)

entry	Substrate	<i>e.e.</i> of substrate	<i>e.e.</i> of product
1	( <i>R</i> )-1	99	<i>rac</i>
2	( <i>S</i> )-1	95	<i>rac</i>
3	( <i>R</i> )-2	97	<i>rac</i>
4	( <i>S</i> )-2	96	<i>rac</i>
5	( <i>R</i> )-3	99	<i>rac</i>
6	( <i>S</i> )-3	95	<i>rac</i>
7	( <i>R</i> )-4	98	83
8	( <i>S</i> )-4	99	80
9	( <i>R</i> )-5	98	<i>rac</i>
10	( <i>S</i> )-5	99	<i>rac</i>
11	( <i>R</i> )-6	95	<i>rac</i>
12	( <i>S</i> )-6	98	<i>rac</i>
13	( <i>R</i> )-7	94	93
14	( <i>S</i> )-7	92	92
15	( <i>R</i> )-8	91	91
16	( <i>S</i> )-8	92	90
17	( <i>R</i> )-9	99	99
18	( <i>S</i> )-9	97	97
19	( <i>R</i> )-10	98	98
20	( <i>S</i> )-10	96	95
21	( <i>R</i> )-11	90	89
22	( <i>S</i> )-11	93	94
23	( <i>R</i> )-12	99	99
24	( <i>S</i> )-12	95	95



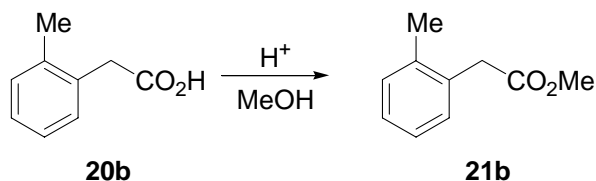
#### Methyl (2-chlorophenyl)acetate (**21a**)

市販品の 2-chlorophenylacetic acid (**20a**) (1.00 g, 6.65 mmol)と触媒量の p-トルエン  
スルホン酸一水和物をメタノール 10 mL に加え、加熱還流下 12 時間攪拌した。メ  
タノールを減圧下留去し、酢酸エチルを用いて抽出した。飽和炭酸水素ナトリウム  
水溶液、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。硫酸マグネシウ  
ムを濾過した後、減圧下溶媒を留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘ  
キサン / 酢酸エチル = 3 / 1)で精製し目的物 **21a** (1.06 g, 97%)を無色液体として得た。

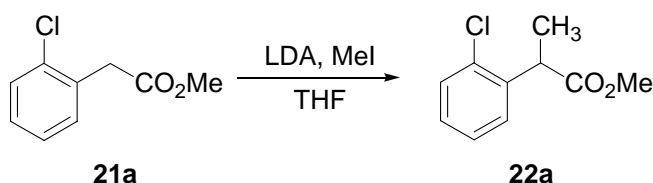
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.71 (3H, s), 3.78 (2H, s), 7.20-7.40 (4H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$ : 2952, 1742, 1475, 1435, 1341, 1252, 1218, 1166, 1053, 1040, 1013, 740,



683 cm<sup>-1</sup>Methyl 2-methylphenylacetate (**21b**)

市販品の 2-methylphenylacetic acid (**20b**) (1.00 g, 5.86 mmol)と触媒量の p-トルエンスルホン酸一水和物をメタノール 10 mL に加え、加熱還流下 12 時間撹拌した。メタノールを減圧下留去し、酢酸エチルを用いて抽出した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。硫酸マグネシウムを濾過した後、減圧下溶媒を留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル = 3 / 1)で精製し目的物 **21b** (1.04 g, 96%)を無色液体として得た。  
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 2.31 (3H, s), 3.64 (3H, s), 3.68 (2H, s), 7.14-7.25 (4H, m)  
 IR (NaCl) ν<sub>max</sub>: 2952, 1737, 1494, 1434, 1338, 1258, 1159, 1012, 747, 727 cm<sup>-1</sup>

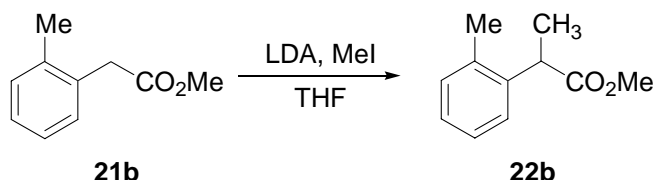
Methyl 2-(2-chlorophenyl)propionate (**22a**)

アルゴン雰囲気下、-78 °C にて diisopropylamine(0.78 mL, 5.19 mmol) / THF (10 mL)に *n*-butyl lithium のヘキサン溶液(3.29 mL, 5.19 mmol)を滴下して LDA を調製した。滴下終了後 30 分間その温度で撹拌した。この溶液に Methyl 2-chlorophenylacetate (**21a**) (0.80 g, 4.33 mmol)の THF 溶液(10 mL)を加え、30 分間-78 °C で撹拌した。次に、よう化メチル(0.32 mL、5.19 mmol)を加え、温度を-78 °C から室温へと自然昇温させ、2 時間撹拌した。2 M 塩酸 (10 mL)を加えてクエンチした後、酢酸エチルを用いて抽出、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水、10%亜硫酸ナトリウム水溶液で洗浄した。無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、濾過、減圧下溶媒を留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル=5 / 1)で精製して目的物 **22a** (0.81 g, 95%)を無色液体として得た。

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.49 (3H, d, *J*= 7.2Hz), 3.68 (3H, s), 4.22 (1H, q, *J*= 7.2Hz),

7.16-7.38 (4H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\max}$ : 2985, 2951, 1738, 1477, 1438, 1375, 1334, 1211, 1080, 1036, 966, 861, 754, 691  $\text{cm}^{-1}$

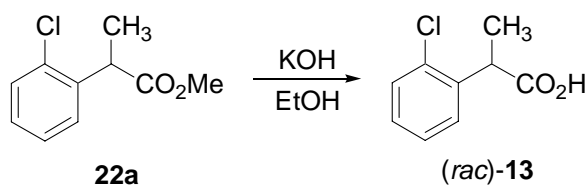


#### Methyl 2-(2-methylphenyl)propionate (**22b**)

アルゴン雰囲気下、 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  にて diisopropylamine(0.82 mL, 5.84 mmol) / THF (10 mL)に *n*-butyl lithium のヘキサン溶液(3.70 mL, 5.84 mmol)を滴下して LDA を調製した。滴下終了後 30 分間その温度で撹拌した。この溶液に Methyl 2-methylphenylacetate (**21b**) (0.80 g, 4.87 mmol)の THF 溶液(10 mL)を加え、30 分間 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  で撹拌した。次に、よう化メチル(0.36 mL, 5.84 mmol)を加え、温度を $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  から室温へと自然昇温させ、2 時間撹拌した。2 M 塩酸 (10 mL)を加えてクエンチした後、酢酸エチルを用いて抽出、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水、10%亜硫酸ナトリウム水溶液で洗浄した。無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、濾過、減圧下溶媒を留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル=5 / 1)で精製して目的物 **22b** (0.79 g, 91%)を無色液体として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.47 (3H, d,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 2.36 (3H, s), 3.65 (3H, s), 3.95 (1H, q,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 7.11-7.28 (4H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\max}$ : 2951, 1738, 1492, 1458, 1434, 1375, 1335, 1202, 1167, 1119, 1064, 966, 859, 757, 730  $\text{cm}^{-1}$



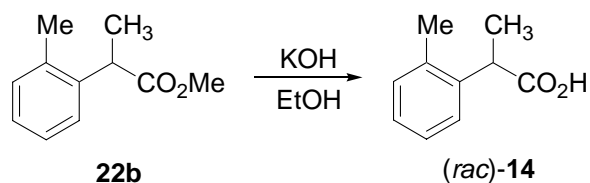
#### 2-(2-Chlorophenyl)propionic acid (**13**)

50 mL ナスフラスコに Methyl 2-(2-chlorophenyl)propionate (**22a**) (0.70 g, 3.52 mmol) のメタノール溶液(10 mL)と、水酸化カリウム(1.97 g, 35.2 mmol)水溶液(10 mL)を混

合し、氷水浴中で 12 時間攪拌して加水分解を行った。濃塩酸(10 mL)を加えた後、減圧下溶媒を留去しエーテルを用いて抽出した。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、濾過、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル / 酢酸 = 50 / 10 / 1)により精製し、目的物 **13**(0.60 g, 93%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.53 (3H, d,  $J=7.1$  Hz), 4.28 (1H, q,  $J=7.1$  Hz), 7.18-7.40 (7H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$ : 2990, 1703, 1478, 1446, 1379, 1326, 1252, 1189, 1133, 1079, 1036, 929, 754, 682  $\text{cm}^{-1}$

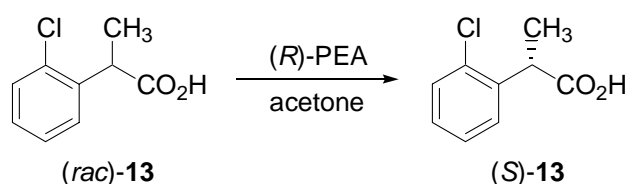


#### 2-(2-Methylphenyl)propionic acid (**14**)

50 mL ナスフラスコに Methyl 2-(2-methylphenyl)propionate (**22b**) (0.70 g, 3.92 mmol)のメタノール溶液(10 mL)と、水酸化カリウム(2.20 g, 39.2 mmol)水溶液(10 mL)を混合し、氷水浴中で 12 時間攪拌して加水分解を行った。濃塩酸(10 mL)を加えた後、減圧下溶媒を留去しエーテルを用いて抽出した。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、濾過、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル / 酢酸 = 50 / 10 / 1)により精製し、目的物 **14**(0.55 g, 86%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.50 (3H, d,  $J=7.1$  Hz), 2.38 (3H, s), 3.99 (1H, q,  $J=7.1$  Hz), 7.16-7.29 (7H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$ : 2987, 1698, 1494, 1455, 1409, 1375, 1326, 1240, 1172, 1065, 940, 867, 758, 729, 646  $\text{cm}^{-1}$



## 2-(2-Chlorophenyl)propionic acid (**13**)の光学分割

(*rac*) 2-(2-chlorophenyl)propionic acid (**13**) (200 mg, 1.08 mmol)と

(*R*)-(+)-phenylethylamine (131 mg, 1.08 mmol)をアセトン(2.5 mL)に加え、熱を加えることで一旦溶解させた。徐々に冷却することで塩の沈殿物(141 mg)を得た。濾過することで母液と分離し回収した。同様にアセトン(2.0, 1.5, 1.0 mL)から再結晶を計4回繰り返し、アンモニウム塩 76.5 mg を得た。0 °C にて 2 M HCl で処理し、エーテルで抽出、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル / 酢酸 = 50 / 10 / 1)により精製し、目的物(*S*)-**13**(46.8 mg, 23%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 1.53 (3H, d, *J*=7.1 Hz), 4.28 (1H, q, *J*=7.1 Hz), 7.18-7.40 (7H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\max}$ : 2990, 1703, 1478, 1446, 1379, 1326, 1252, 1189, 1133, 1079, 1036, 929, 754, 682 cm<sup>-1</sup>

$[\alpha]_D^{22} = +80.4^\circ$  (c = 0.15, CHCl<sub>3</sub>)

以下の条件の HPLC により光学純度の測定を行った。

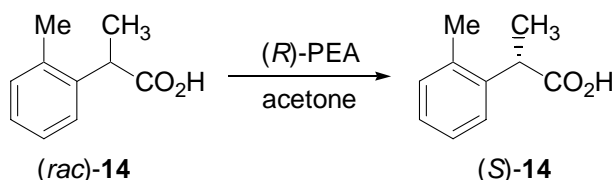
HPLC 条件

カラム : Chiralcel OD-H

移動層 : Hexane / 2-Propanol / TFA = 98 / 2 / 0.1 (v / v / v)

流速 : 0.5 mL / min

Retention time : R 体 28.2 min、S 体 35.4 min



## 2-(2-Methylphenyl)propionic acid (**14**)の光学分割

(*rac*) 2-(2-methylphenyl)propionic acid (**14**) (200 mg, 1.21 mmol)と

(*R*)-(+)-phenylethylamine (147 mg, 1.21 mmol)をアセトン(2.5 mL)に加え、熱を加えることで一旦溶解させた。徐々に冷却することで塩の沈殿物(155 mg)を得た。濾過することで母液と分離し回収した。同様にアセトン(2.0, 1.5, 1.0 mL)から再結晶を計4

回繰り返し、アンモニウム塩 116 mg を得た。0 °C にて 2 M HCl で処理し、エーテルで抽出、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル / 酢酸 = 50 / 10 / 1)により精製し、目的物(*S*)-**14**(66.8 mg, 33%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 1.50 (3H, d, *J*=7.1 Hz), 2.38 (3H, s), 3.99 (1H, q, *J*=7.1 Hz), 7.16-7.29 (7H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\max}$ : 2987, 1698, 1494, 1455, 1409, 1375, 1326, 1240, 1172, 1065, 940, 867, 758, 729, 646 cm<sup>-1</sup>

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>22</sup> = +100.6° (c = 0.10, CHCl<sub>3</sub>)

以下の条件の HPLC により光学純度の測定を行った。

HPLC 条件

カラム: Chiralcel OD-H

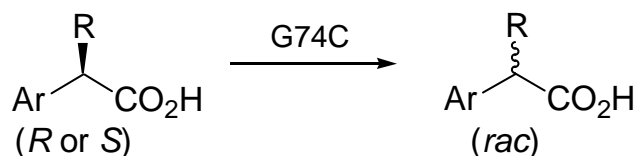
移動層: Hexane / 2-Propanol / TFA = 98 / 2 / 0.1 (v / v / v)

流速: 0.5 mL / min

Retention time: R 体 26.1 min、S 体 29.7 min

#### G74C 変異型 AMDase によるラセミ化反応

1.5 mL のエッペンドルフチューブに、(*S*)-2-X-phenylpropionic acid 1.0 mg を 100 mM Tris-HCl (pH 8.5) 緩衝液を 50  $\mu$ L に溶かした。精製した G74C 変異型 AMDase 液 200  $\mu$ L と蒸留水 250  $\mu$ L 加え全体量を 500  $\mu$ L とし、37 °C で一晩反応させた。2 M HCl を 200  $\mu$ L 加え反応をクエンチした後、定法にてエーテルを用いて生成物を抽出し、HPLC により光学純度を確認した。



Sub.	Ar	R	Substrate ee	Product ee
<b>1</b>	Ph	Me	99	0 ( <i>rac</i> )
<b>6</b>	Ph	Et	98	0 ( <i>rac</i> )
<b>13</b>	2-ClPh	Me	99	66
<b>14</b>	2-MePh	Me	98	88

## Kinetics の測定

速度論的パラメータを測定した基本の組成は以下の通りである。

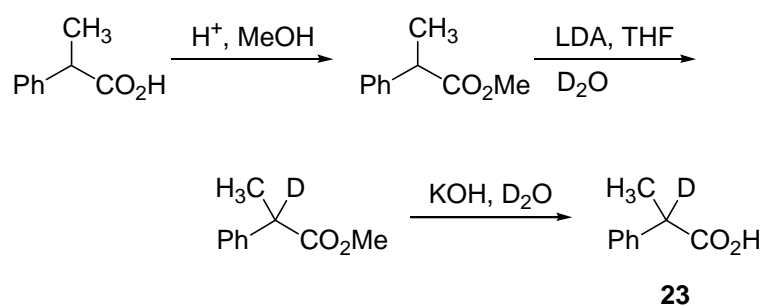
蒸留水	300 $\mu$ L
1 M Tris HCl (pH 8.5)	50 $\mu$ L
Substrate solution	100 $\mu$ L
G74C mutant AMDase	50 $\mu$ L

基質溶液は様々な濃度になるよう調整したものを作成した(1.0 mg/100  $\mu$ L-0.125 mg/100  $\mu$ L)。また、酵素溶液も反応の進行度合いを見計らって適宜希釈、または、増量した。酵素以外の溶液を 1.5 mL マイクロチューブに入れ、35  $^{\circ}$ C で 10 分間保温した。酵素溶液を加え、5 分間反応させた(反応性によってもう少し長い時間)。2 M HCl にて反応をクエンチし、エーテルで抽出し、HPLC により生成物の光学純度の変化を測定した。光学純度の変化から反応速度を求め、その逆数と基質濃度の逆数の値から Lineweaver-Burk プロットを描いた。グラフの傾き、切片から  $K_m$ 、 $k_{cat}$  の値を求めた。

$$\text{Ar}-\underset{\text{(R or S)}}{\text{CH}}(\text{R})-\text{CO}_2\text{H} \xrightarrow{\text{G74C}} \text{Ar}-\underset{\text{(rac)}}{\text{CH}}(\text{R})-\text{CO}_2\text{H}$$

Sub	Ar	R	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat} / K_m$ ( $mM^{-1}s^{-1}$ )	Relative Activity
1	Ph	CH <sub>3</sub>	17.4	1.34	0.077	100
2	Naphthyl	CH <sub>3</sub>	31.4	18.8	0.60	720
3	Thienyl	CH <sub>3</sub>	75.4	20.7	0.27	350
4	Ph	NH <sub>2</sub>	3.90	0.015	0.0038	14
5	Ph	OH	55.6	0.59	0.011	5
6	Ph	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	4.63	0.032	0.0070	23
13	2-MePh	CH <sub>3</sub>	48.47	0.028	0.00058	0.75
14	2-ClPh	CH <sub>3</sub>	51.17	0.0062	0.00012	0.15

## 2-Deuterium-2-phenylpropionic acid (**23**)の合成

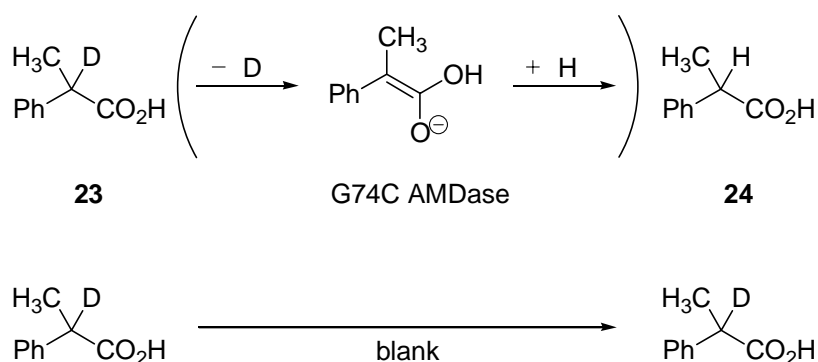


市販品の 2-phenylpropionic acid を酸触媒下、メチルエステル化し、続いて LDA で 位のプロトンを引き抜いた後に、重水によりクエンチすることで重水素が導入された化合物を作成した。重水素化を三回繰り返し、加水分解することでほぼ 100% の重水化率の基質 **23** を合成した。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.51 (3H, s), 7.23-7.36 (5H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$ : 3032, 2659, 2546, 1706, 1603, 1510, 1459, 1408, 1293, 1231, 940, 835  $\text{cm}^{-1}$

#### G74C 変異型 AMDase による重水素化基質の反応



1.5 mL のエッペンドルフチューブに、2-Deutrium-2-phenylpropionic acid (**23**) 2.0 mg を 100 mM Tris-HCl (pH 8.5) 緩衝液を 50  $\mu\text{L}$  に溶かした。精製した G74C 変異型 AMDase 液 200  $\mu\text{L}$  と蒸留水 250  $\mu\text{L}$  加え全体量を 500  $\mu\text{L}$  として、35  $^\circ\text{C}$  で一晩反応させた。同時に、酵素液の代わりに緩衝液を使用したブランク反応を行った。2 M HCl を 200  $\mu\text{L}$  加え反応をクエンチした後、定法にてエーテルを用いて生成物を抽出し、NMR にて 位の重水素がプロトンに変換されているか確認した。

#### G74C 変異型酵素反応生成物 (**24**)

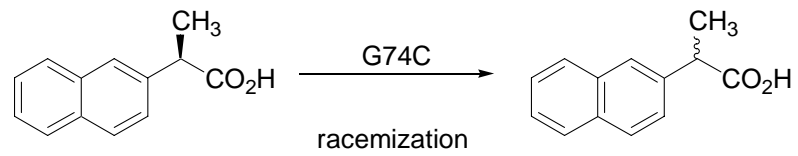
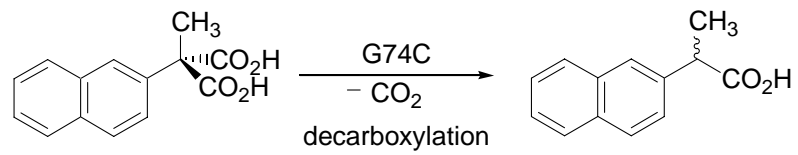
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.51 (3H, d,  $J=7.0$  Hz), 3.74 (1H, q,  $J=7.0$  Hz), 7.24-7.33 (5H, m)

#### ブランク反応生成物

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.50 (3H, s), 7.25-7.32 (5H, m)

#### G74C 変異型 AMDase の脱炭酸反応の測定

脱炭酸反応はこれまでに示した方法と同様の方法にて、種々の値を測定した。



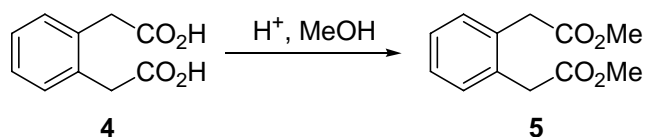
各種変異型 AMDase の作成と種々の酵素活性の測定。

各種変異型 AMDase は、これまでと同様の Kit を用いた方法にて作成し、ラセミ化反応、脱炭酸反応の測定を行った。



## 実験の部

## 第五章

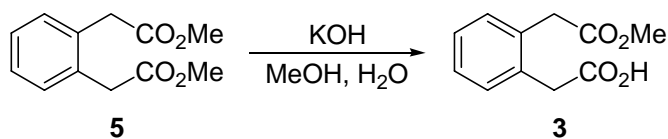


## Dimethyl 1,2-benzenediacetate (5)

市販品の 1,2-benzenediacetic acid (4) (5.37 g, 27.6 mmol) と触媒量の p-トルエンスルホン酸一水和物をメタノール 50 mL に加え、加熱還流下 6 時間攪拌した。定法により抽出後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサ / 酢酸エチル = 5 / 1) で精製し目的物 5 (5.98 g, 97%) を無色液体として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 3.67 (6H, s), 3.71 (4H, s), 7.18-7.30 (4H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$  : 3028, 2953, 2843, 1738, 1497, 1434, 1338, 1257, 1162, 1091, 1010, 840, 754, 637, 573  $\text{cm}^{-1}$



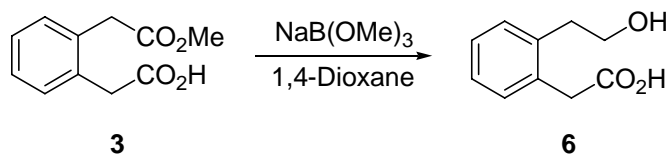
## 2-(Methoxycarbonylmethyl)phenylacetic acid (3)

Dimethyl 1,2-benzenediacetate (5) (5.56 g, 25.0 mmol) と水酸化カリウム (1.40 g, 25.0 mmol) をメタノール (20 mL) と蒸留水 (4 mL) の溶液に加えて、室温にて一晩攪拌した。メタノールを留去した後、酢酸エチルにて原料 5 を抽出し、回収した (3.82 g, 34.3%)。2 M 塩酸にて酸性にした後、酢酸エチルにて抽出した。飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥、溶媒を留去した。得られた結晶をヘキサン / 酢酸エチルにて再結晶を行い、無色結晶として目的物 3 (5.91 g, 56.7%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 3.67 (3H, s), 3.71 (2H, s), 3.74 (2H, s), 7.12-7.30 (4H, m)

IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  : 2947, 1728, 1495, 1435, 1421, 1332, 1306, 1240, 1213, 1155, 1097, 1012, 932, 814, 747, 700, 674, 612, 562  $\text{cm}^{-1}$

mp : 90-91  $^{\circ}\text{C}$



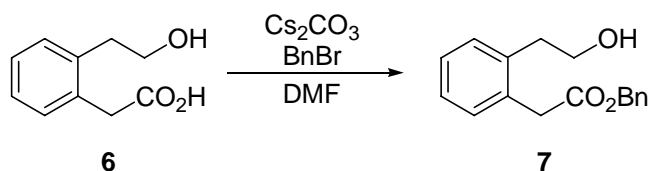
## 2-(2-Hydroxyethyl)phenylacetic acid (**6**)

アルゴン雰囲気下、Sodium trimethoxyborohydride(5.40 g, 42.2 mmol)と1,4-ジオキサン(20 mL)の溶液に、2-(Methoxycarbonylmethyl)phenylacetic acid (**3**)(2.20 g, 10.5 mmol)を加え、加熱還流下一晩撹拌した。溶媒を留去し、2 M 塩酸にて酸性にした後、エーテルにて抽出した。定法により後処理し、分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル/酢酸 = 1 / 1 / 1%)で精製し目的物 **6** (1.60 g, 84.5%)を無色結晶として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 2.92 (2H, t,  $J=6.6$  Hz), 3.88 (2H, t,  $J=6.6$  Hz), 3.74 (2H, s), 7.18-7.30 (4H, m)

IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  : 2957, 1728, 1493, 1252, 1249, 1154, 1045, 1003, 754  $\text{cm}^{-1}$

mp : 70-71  $^{\circ}\text{C}$

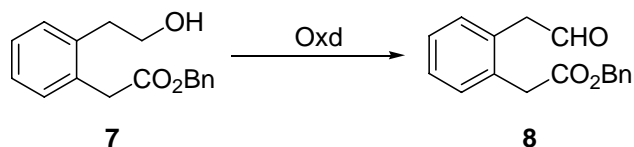


## Benzyl 2-(2-hydroxyethyl)phenylacetate (**7**)

アルゴン雰囲気下、2-(2-Hydroxyethyl)phenylacetic acid (**6**) (0.98 g, 5.50 mmol)とベンジルブロミド(0.94 g, 5.50 mmol)、炭酸セシウム(1.97 g, 6.05 mmol)をDMFに溶かし、室温にて一晩撹拌した。定法にて抽出後、分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル = 2 / 1)で精製し目的物 **7** (0.96 g, 65.0%)を無色液体として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 2.90 (2H, t,  $J=6.6$  Hz), 3.75 (2H, s), 3.81 (2H, t,  $J=6.6$  Hz), 5.13 (2H, s), 7.16-7.38 (9H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$  : 3410, 2958, 1742, 1493, 1454, 1397, 1371, 1263, 1159, 1043, 953, 789, 754, 698, 578  $\text{cm}^{-1}$



## アルコール **7** のアルドヒド **8** への酸化反応の検討

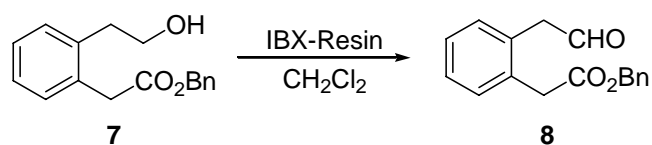
ジクロロメタンにアルコール **7** (200 mg, 1.24 mmol)を溶解させ、酸化剤として2等量の Dess-Martin Reagent を加え、0  $^{\circ}\text{C}$  にて12時間撹拌した。飽和次亜硫酸ナトリウム水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応をクエンチ後、ジクロロメタ

ンを用いて抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過し、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル = 1 / 1)により精製し、目的物 **8** (29.6 mg, 15%)を得た。

ジクロロメタンにアルコール **7** (200 mg, 1.24 mmol)を溶解させ、酸化剤として 2 等量の PCC を加え、室温にて 12 時間撹拌した。濾過により、PCC を濾別したのち、エーテルを用いて抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過し、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル = 3 / 1)により精製し、目的物 **8** (33.2 mg, 16%)を得た。

0 °C にて、ジクロロメタン 2 mL 中、炭酸カリウム( 170 mg, 1.2 mmol )、MS 4A (120 mg)、chloramine T (30.9 mg, 0.13 mmol)を混合し、*N*-*tert*-Butylbenzenesulfeneamide (1.1 mg, 6.18 μmol)を加え、Benzyl 2-(2-hydroxyethyl)phenylacetate (**7**) (50 mg, 0.12 mmol) のジクロロメタン溶液(3 mL)を滴下した。撹拌しながら 0 °C から室温まで自然昇温させた。TLC により反応の進行を確認したが、反応の進行は見られなかった。

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 3.67 (2H, s), 3.74 (2H, d, *J*=2.0 Hz), 5.10 (2H, s), 7.16-7.36 (9H, m), 9.65 (1H, t, *J*=2.0 Hz)

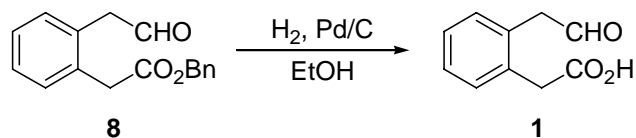


#### Benzyl 2-(2-oxoethyl)phenylacetate (**8**)

IBX-Resin(0.67 g, 0.73 mmol)をジクロロメタン(10 mL)に加え、室温で 15 分間撹拌した。Benzyl 2-(2-hydroxyethyl)phenylacetate (**7**) (50 mg, 0.18 mmol)を加え室温で 9 時間撹拌した。混合物をろ過し、IBX-Resin を取り除いた後、溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル = 3 / 1)で精製し目的物 **8** (27.9 mg, 57.7%)を無色液体として得た。

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 3.67 (2H, s), 3.74 (2H, d, *J*=2.0 Hz), 5.10 (2H, s), 7.16-7.36 (9H, m), 9.65 (1H, t, *J*=2.0 Hz)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$  : 3032, 1731, 1714, 1495, 1455, 1409, 1273, 1170, 750, 699 cm<sup>-1</sup>



## 2-(2-Oxoethyl)phenylacetic acid (**1**)

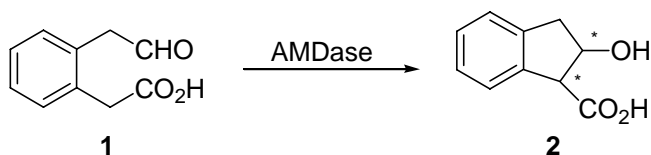
水素雰囲気下、Benzyl 2-(2-oxoethyl)phenylacetate (**8**) (64.0 mg, 0.24 mmol)と触媒量のパラジウム / 活性炭素をエタノール中で室温にて3時間攪拌し、水素添加によりBnの脱保護を行った。ろ過でパラジウムをのぞいた後、溶媒を留去し、分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル / 酢酸 = 1 / 1 / 1%)で精製し目的物**1** (24.0 mg, 56.5%)を無色結晶として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 3.66 (2H, s), 3.77 (2H, d,  $J=2.0$  Hz), 7.19-7.34 (4H, m), 9.71 (1H, t,  $J=2.0$  Hz)

IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  : 2924, 1704, 1602, 1577, 1494, 1409, 1239, 1083, 930, 752, 712, 614, 551  $\text{cm}^{-1}$

mp : 85-87 °C

Anal. Calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$ , C: 67.39%, H: 5.66%, O: 26.95%, found C: 67.31%, H: 5.58%, O: 27.11%

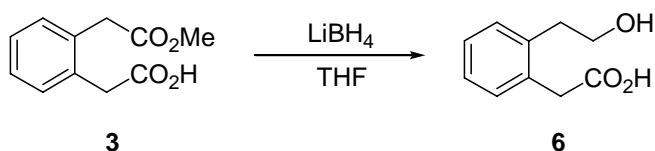


### AMDaseによる基質**1**の変換

2-(2-Oxoethyl)phenylacetic acid (**1**) (5.0 mg, 28.0  $\mu\text{mol}$ )を1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 8.5)50  $\mu\text{L}$ に加え、蒸留水 250  $\mu\text{L}$ 、G74C 変異型 AMDase 溶液 200  $\mu\text{L}$ を加え、35 °Cで12時間反応させた。2 M HClで反応をクエンチし、エーテルを用いて抽出した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル = 3 / 1)により精製したが、原料**1** (4.6 mg, 92%)を回収するにとどまった。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 3.66 (2H, s), 3.77 (2H, d,  $J=2.0$  Hz), 7.19-7.34 (4H, m), 9.71 (1H, t,  $J=2.0$  Hz)

同様に G74C 変異型 AMDase の代わりに野生型 AMDase を用いて検討を行ってみたが、反応の進行は確認できなかった。



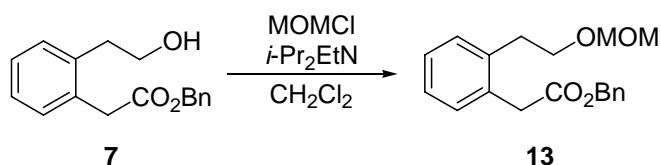
2-(2-Hydroxyethyl)phenylacetic acid (**6**)

アルゴン雰囲気下、水素化ホウ素リチウム(3.33 g, 153 mmol)の THF 溶液(20 mL)に、2-(Methoxycarbonylmethyl)phenylacetic acid (**3**) (7.96 g, 38.2 mmol)THF 溶液(30 mL)を 0 °C にて滴下し、攪拌しながら室温まで自然昇温させ、一晩攪拌した。蒸留水を加え塩酸にて酸性としたのち、定法により抽出した。ヘキサン / 酢酸エチルより再結晶を行い、目的物 **6** (6.36 g, 92.3%)を無色結晶として得た。

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 2.92 (2H, t, *J*=6.6 Hz), 3.88 (2H, t, *J*=6.6 Hz), 3.74 (2H, s), 7.18-7.30 (4H, m)

IR (KBr)  $\nu_{\max}$  : 2957, 1728, 1493, 1252, 1249, 1154, 1045, 1003, 754 cm<sup>-1</sup>

mp : 70-71 °C

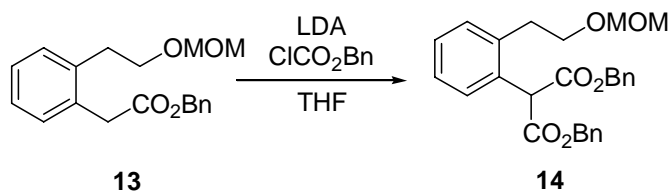


Benzyl 2-(2-methoxymethoxyethyl)phenylacetate (**13**)

アルゴン雰囲気下、Benzyl 2-(2-hydroxyethyl)phenylacetate (**7**) (4.03 g, 14.9 mmol)と Ethyldiisopropylamine(5.2 mL, 29.8 mmol)のジクロロメタン溶液(30 mL)に、0 °C にて Chloromethyl methyl ether(2.26 mL, 29.8 mmol)を滴下し、攪拌しながら室温まで自然昇温させ、一晩攪拌した。水酸化ナトリウム水溶液にてクエンチ後、定法にて抽出した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル = 2 / 1)で精製し目的物 **13** (4.67 g, 99.8%)を無色液体として得た。

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 2.93 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 3.25 (3H, s), 3.70 (2H, t, *J*=7.0 Hz), 3.75 (2H, s), 4.55 (2H, s), 5.13 (2H, s), 7.15-7.37 (9H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\max}$  : 2947, 1737, 1495, 1455, 1377, 1255, 1149, 1108, 1032, 916, 752, 699 cm<sup>-1</sup>



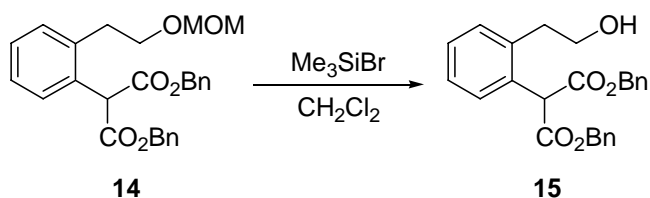
Dibenzyl 2-(2-methoxymethoxyethyl)phenylmalonate (**14**)

アルゴン雰囲気下、-78 °C にてジイソプロピルアミン(2.49 mL, 17.8 mmol)と *n*-ブチルリチウムヘキサン溶液(11.1 mL, 17.8 mmol)より LDA の THF 溶液(20 mL)を作

成し、Benzyl 2-(2-methoxymethoxyethyl)phenylacetate (**13**) (4.67 g, 14.8 mmol)の THF 溶液(20 mL)を滴下し、10 分間攪拌した。クロロギ酸ベンジル(2.53 mL, 17.8 mmol)を滴下した後、 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  から室温まで自然昇温し3時間攪拌した。定法により抽出後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル = 9 / 1 3 / 1)で精製し、原料(2.26 g, 48.4%)を回収、目的物 **14** (3.18 g, 47.7%)を無色液体として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 2.92 (2H, t,  $J=7.0$  Hz), 3.13 (3H, s), 3.66 (2H, t,  $J=7.0$  Hz), 4.42 (2H, s), 5.11-5.22 (5H, m), 7.19-7.47 (14H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$ : 3032, 2948, 1736, 1497, 1455, 1377, 1265, 1213, 1147, 1109, 1030, 916, 752, 698, 608  $\text{cm}^{-1}$

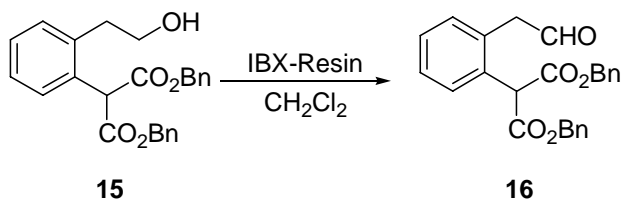


Dibenzyl 2-(2-hydroxyethyl)phenylmalonate (**15**)

アルゴン雰囲気下、氷浴にて MS 4A、Dibenzyl 2-(2-methoxymethoxyethyl)phenylmalonate (**14**) (3.00 g, 6.68 mmol)のジクロロメタン溶液(40 mL)に、トリメチルシリルプロマイド(3.53 mL, 26.7 mmol)を滴下し、一晩攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液にてクエンチした後、定法にて抽出した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル = 3 / 1)で精製し、目的物 **15** (2.00 g, 70.9%)を無色液体として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.57 (1H, s), 2.88 (2H, t,  $J=6.6$  Hz), 3.76 (2H, t,  $J=6.6$  Hz), 5.11-5.22 (5H, m), 7.19-7.47 (14H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$ : 3439, 3032, 3951, 1735, 1497, 1455, 1376, 1213, 1143, 1042, 751, 698, 612  $\text{cm}^{-1}$



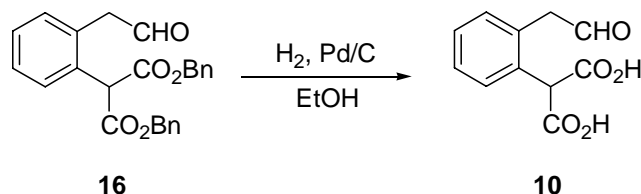
Dibenzyl 2-(2-oxoethyl)phenylmalonate (**16**)

IBX-Resin(0.30 g, 0.32 mmol)をジクロロメタン(10 mL)に加え、室温で 15 分間攪拌した。Dibenzyl 2-(2-hydroxyethyl)phenylmalonate (**15**) (30 mg, 0.074 mmol)を加え室温

で一晩撹拌した。混合物をろ過し、IBX-Resin を取り除いた後、溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル = 2 / 1)で精製し目的物 **16** (25.1 mg, 84.2%)を無色液体として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 3.74 (2H, d,  $J=2.0$  Hz), 5.11-5.22 (5H, m), 7.16-7.36 (14H, m), 9.65 (1H, t,  $J=2.0$  Hz)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$  : 2957, 1728, 1493, 1252, 1249, 1154, 1045, 1003, 754  $\text{cm}^{-1}$



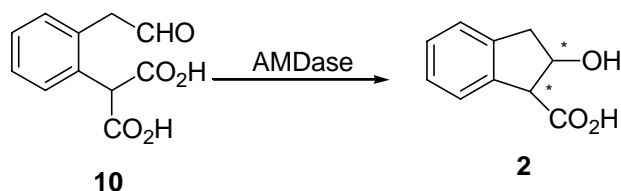
### 2-(2-Oxoethyl)phenylmalonic acid (**10**)

水素雰囲気下、Dibenzyl 2-(2-oxoethyl)phenylmalonate (**16**) (25.0 mg, 0.062 mmol)と触媒量のパラジウム 活性炭素をエタノール中で室温にて 5 時間撹拌し、水素添加により Bn の脱保護を行った。ろ過でパラジウムをのぞいた後、溶媒を留去し、分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル / 酢酸 = 1 / 1 / 1%)で精製し目的物 **10** (13.4 mg, 99.7%)を無色結晶として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 3.74 (2H, d,  $J=2.0$  Hz), 4.95 (1H, s), 7.16-7.36 (4H, m), 9.65 (1H, t,  $J=2.0$  Hz)

IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  : 2924, 1704, 1409, 1239, 930, 752  $\text{cm}^{-1}$

Anal. Calcd for  $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_5$ , C: 59.45%, H: 4.55%, O: 36.00%, found C: 59.43%, H: 4.24%, O: 36.33%



### AMDase による基質 **10** の変換

2-(2-Oxoethyl)phenylmalonic acid (**10**) (5.0 mg, 22.5  $\mu\text{mol}$ )を 1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 8.5)50  $\mu\text{L}$  に加え、蒸留水 250  $\mu\text{L}$ 、野生型 AMDase 溶液 200  $\mu\text{L}$  を加え、35  $^\circ\text{C}$  で 12 時間反応させた。2 M HCl で反応をクエンチし、エーテルを用いて抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル / 酢酸 = 3 / 1

/1%)により精製し、目的物 **2** (1.4 mg, 35%)を得た。

メタノール約 1 mL を加え、TMS-diazomethane によりメチルエステル化し、解析した。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 2.88-3.40 (2H, m), 3.80 (3H, s), 3.79-4.12 (1H, m), 4.81-4.94 (1H, m), 7.20-7.41 (4H, m)

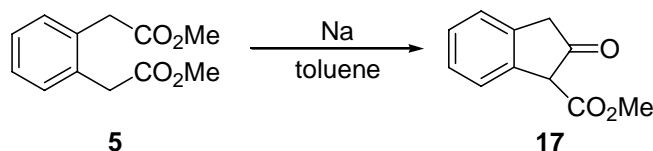
IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  : 3330, 2970, 2710, 2600, 1705, 750  $\text{cm}^{-1}$

cis 体標品

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 3.05-3.12 (1H, dd,  $J=4.6$  Hz, 16.0 Hz), 3.15-3.22 (1H, dd,  $J=6.1$  Hz, 16.0 Hz), 3.80 (3H, s), 4.11 (1H, d,  $J=6.1$  Hz), 4.81-4.86 (1H, q,  $J=5.9$  Hz), 7.20-7.41 (4H, m)

trans 体標品

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 2.88-2.96 (1H, dd,  $J=6.2$  Hz, 16.0 Hz), 3.32-3.40 (1H, dd,  $J=6.9$  Hz, 16.0 Hz), 3.80 (3H, s), 3.98 (1H, d,  $J=6.1$  Hz), 4.87-4.94 (1H, q,  $J=6.1$  Hz), 7.20-7.41 (4H, m)



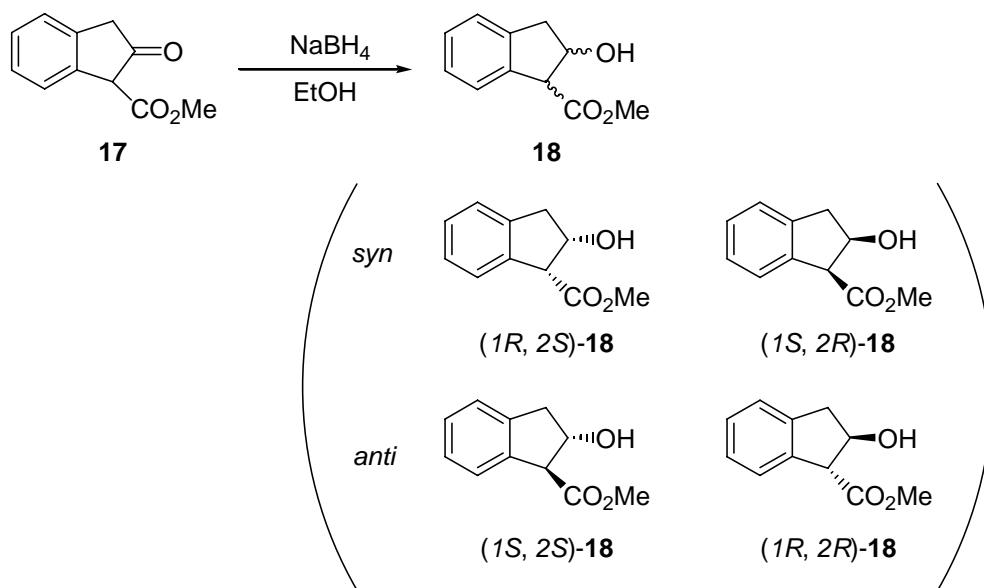
#### Methyl 2-oxo-2,3-dihydro-1H-indane-1-carboxylate (**17**)

Dimethyl 1,2-benzenediacetate (**5**) (2.00 g, 9.0 mmol)のトルエン溶液(20 mL)に細かく刻んだ金属ナトリウム(0.40 g, 18.0 mmol)を加え、12時間加熱還流した。2 M HClにより反応をクエンチした後、エーテルにて抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル = 5 / 1)で精製し目的物 **17** (1.00 g, 58%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 3.58 (2H, s), 3.96 (3H, s), 7.05-7.60 (4H, m), 11.0 (1H, s)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$  : 1662, 1595, 1480, 1445, 1370, 1365, 1344, 1234, 1203, 1054  $\text{cm}^{-1}$





### Methyl 2-hydroxy-indane-1-carboxylate (**18**)

0 °C にて、Methyl 2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-indane-1-carboxylate (**17**) (100 mg, 0.52 mmol)のエタノール溶液(20 mL)に水素化ホウ素ナトリウム(39.7 mg, 1.0 mmol)を加え、12 時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液に注いで反応をクエンチした後、エーテルを用いて抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル / 酢酸 = 1 / 1 / 0.1)により精製し、目的物 **18** (46.6 mg, 46%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 2.89-3.40 (2H, m), 3.79-3.80 (3H, m), 3.96-4.11 (1H, m), 4.79-4.90 (1H, m), 7.19-7.41 (4H, m)

IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  : 3376, 2955, 1727, 1458, 1436, 1340, 1302, 1280, 1219, 1172, 1049, 1018, 999, 835, 749, 709 cm<sup>-1</sup>

mp : 68-70 °C

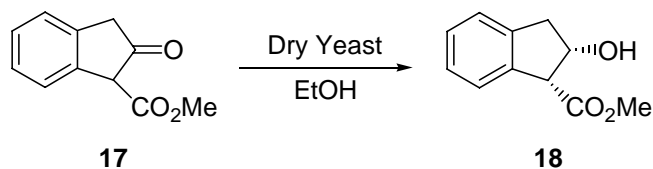
HPLC 分析条件

カラム : Chiralcel OD-H

移動層 : hexane / 2-propanol = 25 / 1

流速 : 1.0 mL / min

Retention time : (1*S*, 2*S*) 16.0 min, (1*S*, 2*R*) 17.9 min, (1*R*, 2*S*) 21.9 min, (1*R*, 2*R*) 25.2 min



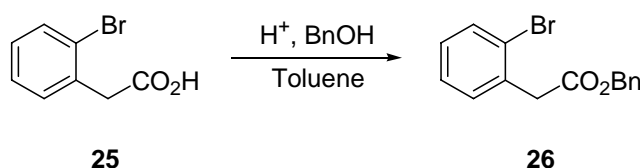
Methyl (*1R, 2S*)-2-hydroxy-indane-1-carboxylate ((*1R, 2S*)-**18**)

35 °C にて、30 mL の蒸留水にドライースト 400 mg を加え、30 分間攪拌した。少量のエタノールに溶解させた Methyl 2-Oxo-2,3-dihydro-1*H*-indane-1-carboxylate (**17**) (100 mg, 0.52 mmol) を加え、24 時間攪拌した。セライト濾過により不溶性のドライーストを取り除いた後、エーテルにて抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル/酢酸 = 1/1/0.1)により精製し、目的物(*1R, 2S*)-**18** (27.8 mg, 28%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 3.05-3.12 (1H, dd, *J*=4.6 Hz, 16.0 Hz), 3.15-3.22 (1H, dd, *J*=6.1 Hz, 16.0 Hz), 3.80 (3H, s), 4.11 (1H, d, *J*=6.1 Hz), 4.81-4.86 (1H, q, *J*=5.9 Hz), 7.20-7.41 (4H, m)

IR (KBr)  $\nu_{\max}$  : 3376, 2955, 1727, 1458, 1436, 1340, 1302, 1280, 1219, 1172, 1049, 1018, 999, 835, 749, 709 cm<sup>-1</sup>

mp : 68-70 °C

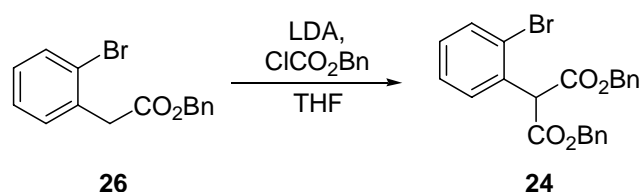


Benzyl 2-bromophenylacetate (**26**)

市販品の 2-Bromophenylacetic acid (**25**) (4.30 g, 20.0 mmol) と触媒量の *p*-トルエンスルホン酸一水和物、ベンジルアルコール(2.16 g, 20.0 mmol) のトルエン溶液(30 mL) を Dean-Stark trap を用いた加熱還流下、一晩攪拌した。定法により抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル = 3/1) で精製し、目的物 **26** (5.34 g, 87.6%) を無色液体として得た。

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 3.84 (2H, s), 5.17 (2H, s), 7.11-7.58 (9H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\max}$  : 2969, 1741, 1692, 1497, 1440, 1369, 1291, 1215, 1156, 1058, 1028, 749, 698, 611 cm<sup>-1</sup>

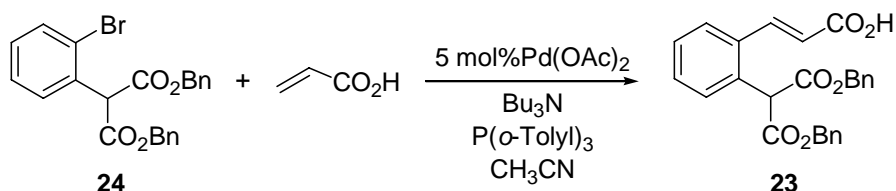


Dibenzyl 2-bromophenylmalonate (**24**)

アルゴン雰囲気下、 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ にてジイソプロピルアミン(2.93 mL, 20.9 mmol)と *n*-ブチルリチウムヘキサン溶液(13.3 mL, 20.9 mmol)より LDA の THF 溶液(20 mL)を作成し、Benzyl 2-bromophenylacetate (**26**) (5.32 g, 17.4 mmol)の THF 溶液(30 mL)を滴下し、10 分間攪拌した。クロロギ酸ベンジル(2.97 mL, 20.9 mmol)を滴下した後、 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ から室温まで自然昇温し 3 時間攪拌した。定法により抽出後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル = 10 / 1)で精製し、原料 **26** (2.10 g, 39.5%)を回収、目的物 **24** (3.56 g, 56.8%)を無色液体として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 5.20 (4H, s), 5.34 (1H, s), 7.15-7.59 (14H, m)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$  : 3033, 1737, 1498, 1473, 1455, 1375, 1301, 1215, 1144, 1022, 747, 697, 605  $\text{cm}^{-1}$

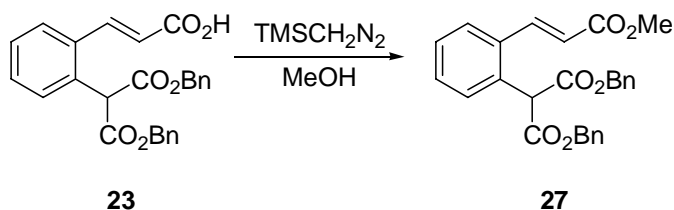
Dibenzyl 2-[2-(2-carboxyethenyl)phenyl]malonate (**23**)

アルゴン雰囲気下、酢酸パラジウム(0.41 g, 1.82 mmol)、Tri-*o*-tolyphosphine(1.67 g, 5.47 mmol)、Tributylamine(13.5 g, 73.0 mmol)、Dibenzyl (2-bromophenyl)malonate (**24**) (13.1 g, 36.5 mmol)のアセトニトリル溶液(80 mL)に、アクリル酸(3.15 g, 43.8 mmol)アセトニトリル溶液(20 mL)を滴下した。加熱還流下一晩攪拌し、蒸留水・塩酸でクエンチした後、定法により抽出した。ヘキサン / 酢酸エチルより再結晶し、目的物 **23** (13.2 g, 84.3%)を無色結晶として得た。

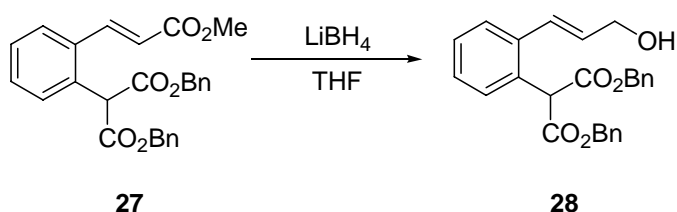
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 5.11-5.18 (5H, m), 6.32 (1H, d,  $J=15.6$  Hz), 7.24-7.61 (14H, m), 8.04 (1H, d,  $J=15.6$  Hz)

IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  : 2363, 1735, 1696, 1626, 1319, 1222, 1146, 946, 749, 698, 552, 515  $\text{cm}^{-1}$

mp : 107-109  $^{\circ}\text{C}$

Dibenzyl 2-[2-(2-methoxycarbonylethenyl)phenyl]malonate (**27**)

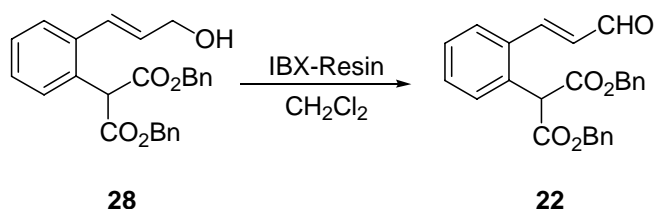
氷浴中、Dibenzyl 2-[2-(2-carboxyethenyl)phenyl]malonate (**23**) (3.86 g, 8.68 mmol)のメタノール溶液(10 mL)に TMS ジアゾメタンヘキサン溶液を適量添加し、メチルエステル化を行った。溶媒を留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル=3/1)で精製し、目的物 **27** (3.47 g, 89.9%)を無色液体として得た。<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 3.78 (3H, s), 5.12-5.22 (5H, m), 6.31 (1H, d, *J*=15.8 Hz), 7.23-7.56 (14H, m), 7.94 (1H, d, *J*=15.8 Hz)  
IR (NaCl)  $\nu_{\max}$  : 3033, 2951, 2002, 1728, 1637, 1486, 1455, 1376, 1173, 976, 863, 751, 698, 603 cm<sup>-1</sup>



Dibenzyl 2-[2-(3-hydroxypropenyl)phenyl]malonate (**28**)

アルゴン雰囲気下、水素化ホウ素リチウム(0.76 g, 35.0 mmol)と Dibenzyl 2-[2-(2-methoxycarbonyl)ethenyl]phenyl]malonate (**27**) (3.90 g, 8.7 mmol)の THF 溶液(60 mL)を一晩攪拌した。定法にて抽出後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル=5/1 1/1)で精製し、原料を回収(1.32 g, 33.8%)、目的物 **28** (1.01 g, 27.7%)を無色液体として得た。

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 4.22 (2H, d, *J*=5.3 Hz), 5.06-5.17 (5H, m), 6.09-6.18 (1H, dt, *J*=5.3, 15.6 Hz), 6.77 (1H, d, *J*=15.8 Hz), 7.21-7.43 (14H, m)  
IR (NaCl)  $\nu_{\max}$  : 3396, 3032, 2949, 1725, 1497, 1454, 1375, 1308, 1254, 1153, 1080, 1010, 970, 750, 728, 697 cm<sup>-1</sup>



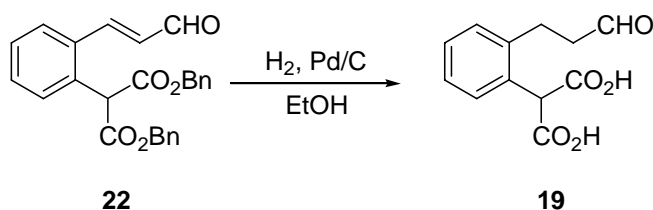
Dibenzyl 2-[2-(3-oxopropenyl)phenyl]malonate (**22**)

IBX-Resin(1.00 g, 1.06 mmol)をジクロロメタン(20 mL)に加え、室温で 15 分間攪拌した。Dibenzyl 2-[2-(3-hydroxypropenyl)phenyl]malonate (**28**) (0.21 g, 0.51 mmol)を加え室温で一晩攪拌した。混合物を濾過し、IBX-Resin を取り除いた後、溶媒を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル=2/1)で精

製し目的物 **22** (117.4 mg, 55.4%)を無色液体として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 5.05 (1H, s), 5.20 (4H, s), 6.21-6.59 (1H, dd,  $J=7.7, 15.6$  Hz), 7.21-7.43 (14H, m), 7.67 (1H, d,  $J=15.6$  Hz), 9.47 (1H, d,  $J=7.5$ Hz)

IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}$  : 2957, 1728, 1493, 1252, 1249, 1154, 1045, 1003, 754  $\text{cm}^{-1}$



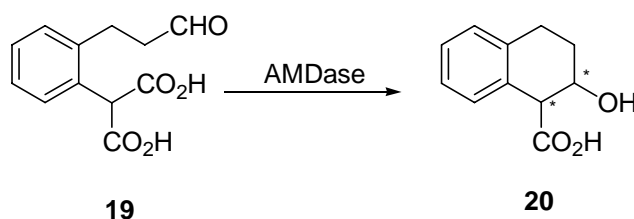
### 2-[2-(3-Oxopropyl)phenyl]malonic acid (**19**)

水素雰囲気下、Dibenzyl 2-[2-(3-oxopropenyl)phenyl]malonate (**22**) (200 mg, 0.48 mmol)と触媒量のパラジウム / 活性炭素をエタノール中で室温にて 5 時間攪拌し、水素添加により Bn の脱保護を行った。濾過でパラジウムをのぞいた後、溶媒を留去し、分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル / 酢酸 = 1 / 1 / 1%)で精製し目的物 **19** (134 mg, 80.5%)を無色結晶として得た。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 2.75 (2H, t,  $J=7.9$  Hz), 2.97-3.06 (2H, m,  $J=7.9$  Hz), 4.53 (1H, m), 7.16-7.36 (4H, m), 9.68 (1H, t,  $J=1.6$  Hz)

IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  : 2924, 1704, 1602, 1577, 1494, 1409, 1239, 1083, 930, 752, 712, 614, 551  $\text{cm}^{-1}$

Anal. Calcd for  $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_5$ , C: 61.01%, H: 5.13%, O: 33.86%, found C: 60.92%, H: 4.97%, O: 34.11%



### AMDase による基質 **19** の変換

2-[2-(3-Oxopropyl)phenyl]malonic acid (**19**) (5.0 mg, 22.5  $\mu\text{mol}$ )を 1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 8.5)50  $\mu\text{L}$  に加え、蒸留水 250  $\mu\text{L}$ 、野生型 AMDase 溶液 200  $\mu\text{L}$  を加え、35  $^{\circ}\text{C}$  で 24 時間反応させた。TLC 分析により反応の進行を確認したが、反応の進行は確認できなかった。念のため、2 M HCl で反応をクエンチし、エーテルを用いて抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、濾過した後、減圧下溶媒

を留去した。分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル / 酢酸 = 1 / 1 / 1%)により精製したが、原料 **19** を回収するにとどまった。



## 論文リスト

- 1 ) Enzymatic Synthesis of (*R*)-Flurbiprofen, Yosuke Terao, Yoichiro Ijima, Hitoshi Kakidani, and Hiromichi Ohta, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2003**, 76, 2395-2397
- 2 ) Introduction of single mutation changes arylmalonate decarboxylase to racemase, Yosuke Terao, Kenji Miyamoto, Hiromichi Ohta, *Chem. Commun.*, **2006**, 3600-3602
- 3 ) Improvement of the activity of arylmalonate decarboxylase by random mutagenesis, Yosuke Terao, Kenji Miyamoto, Hiromichi Ohta, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 73, 647-653
- 4 ) Inversion of enantioselectivity of Arylmalonate decarboxylase via site-directed mutation based on the estimated reaction mechanism, Yosuke Terao, Yoichiro Ijima, Kenji Miyamoto, and Hiromichi Ohta, *J. Mol. Catal. B:Enzymatic*, **2007**, *in press*
- 5 ) The aldol type reaction catalyzed by arylmalonate decarboxylase – a decarboxylase can catalyze an entirely different reaction, aldol reaction -, Yosuke Terao, Kenji Miyamoto, and Hiromichi Ohta, *Chem. Lett.*, **2007**, *in press*
- 6 ) Inversion of enantioselectivity of asymmetric biocatalytic decarboxylation by site-directed mutagenesis based on the reaction mechanism, Yoichiro Ijima, Kaori Matoishi, Yosuke Terao, Nobuhide Doi, Hiroshi Yanagawa, and Hiromichi Ohta, *Chem. Comm.*, **2005**, 877-879
- 7 ) (*R*)-1-Phenyl-1-ethylammonium(*R*)-2-hydroxymethyl-2-(2-naphthyl)propanoate, Shigeru Ohba, Tomomi Tsutsumi, Yosuke Terao, Kenji Miyamoto, Hiromichi Ohta, *Acta Cryst.*, **2005**, *E61*, o1283-1285



学会発表リスト

国内学会

- 1) アリールマロン酸脱炭酸酵素を利用する(*R*)-フルルビプロフェンの合成、寺尾陽介、居島洋一郎、柿谷均、太田博道、第5回生体触媒シンポジウム、岡山、2001.12.13-14
- 2) アリールマロン酸脱炭酸酵素を利用する(*R*)-フルルビプロフェンの合成、寺尾陽介、居島洋一郎、柿谷均、太田博道、日本化学会第81春季年会、東京、2002.3.26-29
- 3) 部位特異的変異導入によるアリールマロン酸脱炭酸酵素の機能変換、寺尾陽介、居島洋一郎、柿谷均、太田博道、第6回生体触媒シンポジウム、奈良、2002.12.12-13
- 4) 部位特異的変異導入によるアリールマロン酸脱炭酸酵素の機能変換、寺尾陽介、居島洋一郎、柿谷均、太田博道、日本化学会第83春季年会、東京、2003.3.18-21
- 5) ランダム変異導入によるアリールマロン酸脱炭酸酵素(AMDase)の機能改変、寺尾陽介、宮本憲二、太田博道、日本化学会第84春季年会、西ノ宮、2004.3.26-29
- 6) ランダム変異導入によるアリールマロン酸脱炭酸酵素(AMDase)の機能改変、寺尾陽介、宮本憲二、太田博道、21世紀COEワークショップ統合システム生物学若手の会、鶴岡、2004.9.20-22
- 7) ランダム変異導入によるAMDaseの機能改変、寺尾陽介、宮本憲二、太田博道、第8回バイオテクノロジー部会シンポジウム、神戸、2004.11.6
- 8) 変異導入によるアリールマロン酸脱炭酸酵素(AMDase)の機能改変、寺尾陽介、宮本憲二、太田博道、COE生命科学ワークショップ2004、横浜、2004.11.26-28
- 9) 変異導入によるアリールマロン酸脱炭酸酵素(AMDase)の機能改変、寺尾陽介、田村圭輔、宮本憲二、太田博道、第8回生体触媒シンポジウム、横浜、2004.12.16-17
- 10) 変異導入によるアリールマロン酸脱炭酸酵素(AMDase)の機能改変、寺尾陽介、田村圭輔、宮本憲二、太田博道、日本化学会第85春季年会、横浜、2005.3.26-29

- 1 1 ) 部位特異的変異導入によるアリールマロン酸脱炭酸酵素(AMDase)のラセマ  
ーゼへの機能改変、寺尾陽介、宮本憲二、太田博道、COE 生命科学ワークショ  
ップ 2005、湘南、2005.9.19-21
- 1 2 ) アリールマロン酸脱炭酸酵素(AMDase)が触媒するアルドール型反応、寺尾陽  
介、宮本憲二、太田博道、第 9 回生体触媒化学シンポジウム、大津、2006.1.26-27
- 1 3 ) アリールマロン酸脱炭酸酵素(AMDase)が触媒するアルドール型反応、寺尾陽  
介、宮本憲二、太田博道、日本化学会第 86 春季年会、船橋、2006.3.27-30
- 1 4 ) Aldol Reaction Catalyzed by Arylmalonate Decarboxylase、寺尾陽介、宮本憲二、  
太田博道、COE 生命科学ワークショップ 2006、湘南、2006.9.18-20
- 1 5 ) アリールマロン酸脱炭酸酵素によるアルドール型反応、寺尾陽介、宮本憲二、  
太田博道、第 9 回バイオテクノロジー部会合同シンポジウム、京都、2006.9.28-30
- 1 6 ) アリールマロン酸脱炭酸酵素の "Promiscuity"、寺尾陽介、宮本憲二、太田博  
道、第 10 回生体触媒化学シンポジウム、小倉、2006.12.14-15

#### 国際会議

- 1 ) Inversion of the Enantioselectivity of AMDase by Point Mutation, Yosuke Terao,  
Yoichiro Ijima, Hitoshi Kakidani, and Hiromichi, 6<sup>th</sup> International Symposium on  
Biocatalysis and Biotransformations, Olomouc (Czech Republic), 2003.6.28-7.3
- 2 ) Modifying the function of arylmalonate decarboxylase by site-directed mutagenesis  
based on the estimated reaction mechanism, Yosuke Terao, Kenji Miyamoto, Hiromichi  
Ohta, 7<sup>th</sup> International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, Delft (the  
Netherlands), 2005.7.3-7.8
- 3 ) Modification of the Function of AMDase by the Introduction of Mutation  
– from decarboxylase to racemase –, Yosuke Terao, Kenji Miyamoto, Hiromichi Ohta,  
2005 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2005),  
Honolulu (USA), 2005.12.15-20
- 4 ) Introduction of Single Mutation Changes Arylmalonate Decarboxylase to Racemase,

Yosuke Terao, Kenji Miyamoto, Hiromichi Ohta, International Congress on Biocatalysis (biocat2006), Hamburg (Germany), 2006.9.3-8

5 ) Introduction of Single Mutation Changes Arylmalonate Decarboxylase to Racemase, Yosuke Terao, Kenji Miyamoto, Hiromichi Ohta, 1st International IUPAC Conference on Green-Sustainable Chemistry, Dresden (Germany), 2006.9. 10-15

6 ) One enzyme can give both enantiomers, Yosuke Terao, Kenji Miyamoto, Hiromichi Ohta, The Seventh International Conference on Systems Biology, Yokohama (Japan), 2006.10.9-13

## 受賞

- 1 ) ベストポスター賞 (第 8 回生体触媒シンポジウム、2004.12.16)
- 2 ) 学生講演賞 (日本化学会第 85 春季年会、2005.03.27-30)
- 3 ) 国際会議論文発表奨励賞 (慶應義塾大学、2006.10.10)

## 謝辞

本研究の遂行、ならびに本論文の執筆にあたり、終始適切なるご助言、ご指導を賜り、研究の機会を与え、見守って頂きました慶應義塾大学理工学部 教授 太田 博道 博士に心より感謝致します。

本研究を行うにあたり、本研究の基礎を築いて頂き、また有益なご助言、ご指導を頂きました慶應義塾大学理工学部 専任講師 宮本 憲二 博士に深く感謝致します。

本研究において、酵素有機化学の立場からご助言とご指導を頂きました慶應義塾大学理工学部 助教授 須貝 威 博士に深く感謝致します。

本論文の執筆にあたり、副査として適切なお助言とご指導を頂きました、慶應義塾大学理工学部 教授 井本正哉博士、教授 佐藤智典博士、教授 西山繁博士に深謝致します。

酵素の立体構造に関するモデリングを行って頂き、有用なご助言を頂きました東ソー株式会社 柿谷 均 博士に深く感謝致します。

酵素精製法・実験操作に関するご指導とご助言を頂きました現三菱化学株式会社 居島 洋一郎 修士、および有機合成方法論・実験操作に関するご指導とご助言を頂きました現兵庫県立大学 助手 加藤 太一郎 博士に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、良き先輩としてご指導頂きました下条めぐみ博士、鈴木陽一博士、富宿賢一博士、鈴木麻珠三博士、辻上敏邦修士、中野淳博士、進藤武之修士、木村真弓修士、宗像(長澤)千晶修士に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、同期生として互いに励まし合い、競い合った所寛樹修士、伊藤直之修士、黒川真行修士、富田美奈修士、柏木美恵子修士に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、共同研究者として苦楽をともにした堤智美学士を始めとし、研究生生活を共にした石田直之修士、岩城慎一郎修士、田村 圭輔修士、廣川慎司修士、平野淳一郎修士、和田利夫修士、島本美和学士、伊藤健太郎学士、小崎将功学士、酒井航学士、秋吉朝子学士、大黒耕学士、望月慎吾学士、矢竹嘉人学士、水戸秀章君、佐野友子さん、澤崎正人君、門脇英希君、中村麻希さん、藤森久美子さん、また留学生として共に時間を過ごしたMs. Jemma Morgan(UK)、Mr. Johan Larsbrink(Sweden)に感謝します。

研究を行うにあたり、小泉信三大学院特別奨学研究生、21世紀COEリサーチアシスタントとして経済的な援助を頂きました。また、慶應義塾大学藤原奨学基金、日本学生支援機構から奨学金を頂きました。感謝します。

研究生生活・大学生活をより豊かなものにし、心に財産を残してくれた慶應義塾ワグネル・ソサィエティー男声合唱団とその仲間、関係者の方々に感謝します。

最後に、常に支えてくれた家族(父哲夫、母有子、弟健介)に深く感謝します。