

# 論文審査報告書

氏名	テイ 鄭 ダイグン 代軍
学位の種類	博士 (工学)
学位記番号	博生第 33 号
学位授与日	令和 4 年 3 月 19 日
論文題目	Studies on the enzymatic synthesis of chiral hydroxyl nitriles (キラルなヒドロキシニトリル類化合物の酵素合成に関する研究)
論文審査委員	(主査) 富山県立大学 教授 浅野 泰久 教授 米田 英伸 教授 加藤 康夫 福井県立大学 教授 伊藤 貴文 富山県立大学 准教授 日比 慎

## 内容の要旨

キラル (光学活性) なヒドロキシニトリル化合物は、それぞれキラルなアミド、アミノ酸、およびヒドロキシルアミンなどに変換できる重要な合成中間体である。これらのキラルヒドロキシニトリルに由来する分子構造は、多くの医薬品や生理活性分子の構成要素として存在している。

本論文では、キラルな $\alpha$ -ヒドロキシニトリルおよび $\beta$ -ヒドロキシニトリル類化合物の酵素的合成に関する研究として、それぞれ植物 *Linum usitatissimum* 由来のヒドロキシニトリルリアーゼ (*LuHNL*) の立体構造および触媒機構の解明、並びに $\beta$ -ヒドロキシニトリルの相補的なエナンチオマーの新しい合成法の開発を行った。*LuHNL* は、ケトン・シアノヒドリンの不斉合成を触媒する稀な HNL である。特に、祖先タンパク質と考えられるアルコール脱水素酵素 (ADH) との、構造と触媒機能の違いを明らかにし、*LuHNL* の新しいシアノヒドリン分解機構を解明した。次に、キラルな $\beta$ -ヒドロキシニトリルの相補的なエナンチオマーの合成法として、入手しやすいアルケンを出発点とし、細菌由来のアルドキシム脱水酵素を用いて、毒性の高いシアンの使用を回避し、環境に配慮した新しい合成法を開発した。

以下に本論文の構成を示す。

第一章では、ケトン・シアノヒドリン分解反応に関与する、植物 *Linum usitatissimum* 由来のヒドロキシニトリルリアーゼ (*LuHNL*) の触媒機構について研究した。*LuHNL* は、*L. usitatissimum* のシアン配糖体の分解に関与し、組織障害時にシアン化水素を放出する酵素として働く。本酵素は、他の HNL との相

同性を示さず、その一次構造から、祖先タンパク質と考えられるアルコール脱水素酵素 (ADH) と類似の基質および NAD (H) 結合部位を保持することが明らかにされて来た。しかし、*L*uHNL が ADH 活性を有することを示唆する証拠は存在しない。この理由を知るために、*L*uHNL と ADH のそれぞれの構造および機能を比較した。まず、*L*uHNL のリガンドフリーの立体構造とアセトシアノヒドリンおよび (*R*)-2-ブタノンシアノヒドリンとの複合体の構造を X 線結晶構造解析によって決定した。これらの構造をウマ肝臓由来の ADH と比較し、*L*uHNL の各サブユニットには、A フォームの NAD<sup>+</sup> 分子が共有結合ではなく強固に結合していることを明らかにした。この構造においては、NAD<sup>+</sup> のアデニン部分に「サンドイッチ構造」が形成されており、NAD<sup>+</sup> 分子の自由な動きを制限していることがわかった。また、*L*uHNL に強固に結合している NAD<sup>+</sup> の機能について検討し、3 点の部位特異的変異 (Arg249Gly/Ser268Ala/Asp269Leu) により NAD<sup>+</sup> を含まないアポ酵素を創製した。本アポ酵素は、HNL 活性を失っていたが、CD スペクトルから立体構造を保持していると推定した。また、Zn<sup>2+</sup> を含む触媒ポケットには、キレート剤である EDTA が入りにくい構造をしており、EDTA による酵素の活性阻害は、ADH と比較して少なかった。このような情報から、NAD<sup>+</sup> は酸化還元に関与する補酵素としての役割を持たず、触媒ポケットの構成要素として HNL 活性の発現に必要であると判断した。さらに、部位特異的変異導入による構造解析を行い、シアノヒドリン分解の新しい触媒機構として、シアノ亜鉛複合体、同複合体の水酸基、Glu323/Thr65 および H<sub>2</sub>O/Lys162 との水素結合による相互作用が関与する機構を提案した。脱プロトン化された Lys162 残基とプロトン化された Glu323 残基は、部分的に脱溶媒された微小環境によって安定化されと考えられる。

第二章では、毒性を有するシアンを全く使わずに  $\beta$ -ヒドロキシニトリルの相補的エナンチオマーを合成するための手法として、オレフィンを出発原料として合成したジヒドロイソオキサゾールを基質とし、細菌由来のアルドキシム脱水酵素を作用させる不斉開環反応の開発について報告している。現在まで、酵素を用いて  $\beta$ -ヒドロキシニトリルを合成するには、いずれもニトリル基の構築のためにシアンを利用せざるを得ず、さらにニトリルの  $\beta$  位の立体を形成するために酵素反応による官能基変換を行う方法が取られていた。本論文では、アルドキシム脱水酵素が触媒する Kemp 脱離反応により、4, 5-ジヒドロイソオキサゾールを基質とする不斉開環反応を行って、一気に  $\beta$ -ヒドロキシニトリルを得る合成法を新しく開発した。本法は、主として *Bacillus* sp. 由来のアルドキシム脱水酵素 (Oxd B) が示す広い基質特異性、優れた立体選択性 (最高 99% のエナンチオマー過剰率 (*ee*))、良好なターンオーバー数 (最高 11 s<sup>-1</sup>) を利用し、一般的なキラル  $\beta$ -ヒドロキシニトリルの酵素的合成法となり得る。基質の 4, 5-ジヒドロイソオキサゾールは、アルケンとニトロメタンの [3+2] 環化付加反応によって合成できる。酵素反応で残存する 4, 5-ジヒドロイソオキサゾールは、アルカリ処理により *ee* を損なわずに、対応するキラル  $\beta$ -ヒドロキシニトリルに容易に変換することが可能である。また、部位特異的変異導入により、第一鉄ヘムを含む活性部位を確認し、2 種類の触媒機構を提案した。このように、本法は、シアン化合物を使用せずにアルケンからキラルな  $\beta$ -ヒドロキシニトリルを構築するための酵素反応として最初の報告であり、 $\beta$ -ヒドロキシニトリルの相補的なエナンチオマーの合成のための有用な酵素材料および手法を提供するものである。

第三章では、*L*-カルニチンやアトルバスタチンの合成中間体として有用なキラル 4-クロロ-3-ヒドロキシブタンニトリルを塩化アリルから合成するために、アルドキシム脱水酵素の新しい変異型酵素を開発した。まず、*Pseudomonas chlororaphis* B23 由来のアルドキシム脱水酵素 (Oxd A) を選抜し、さらに酵

素工学的手法により合理的変異を与えた。次に Oxd A と 5-(クロロメチル)-4, 5-ジヒドロイソオキサゾールのドッキングシミュレーションを行い、触媒ポケット周辺の Leu318、Ala147、Met29、Leu145 の各残基を選択して飽和変異を導入した。スクリーニングでは、ラセミ体の 5-(クロロメチル)-4, 5-ジヒドロイソオキサゾールの光学分割において野生型よりも優れた立体選択性を示す 4 種類の候補変異体 (Met29Gln、Leu318Ile、Leu318Thr、Leu318Ile/Ala147Arg) を得た。その中で、OxdA-Leu318Ile (OxdA-L318I) は野生型酵素 (OxdA-wild、 $E = 11$ ) に比べ、立体選択性  $E$  を約 6 倍 ( $E = 68$ ) に向上させることに成功した。OxdA-L318I を用いることにより、(*R*)-4-クロロ-3-ヒドロキシブタンニトリルを 90% *ee*、単離収率 39% で、(*S*)-4-クロロ-3-ヒドロキシブタンニトリルを 99% *ee*、単離収率 39% でそれぞれ合成することが可能であった。本反応で用いる 5-(クロロメチル)-4, 5-ジヒドロイソオキサゾールのラセミ前駆体は、毒性の高いシアンを使用せず、容易に入手できる塩化アリルから合成することが可能である。また、光学分割で残った光学活性な (*S*)-5-(クロロメチル)-4, 5-ジヒドロイソオキサゾールは、アセトニトリル中でトリエチルアミンで処理するか (99% *ee*、単離収率 72%)、野生型の OxdA の触媒作用 (99% *ee*、単離収率 88%) により、対応する (*S*)-4-クロロ-3-ヒドロキシブタンニトリルに変換することが可能である。

以上まとめると、本論文は生物化学的および有機化学的手法の両方を用いて、キラルな  $\alpha$ -ヒドロキシニトリルおよび  $\beta$ -ヒドロキシニトリル類化合物の酵素的合成に関する研究を行ったものである。まず、産業用酵素としての HNL の研究において長年不明であった *L*HNL の X 線構造解析を行い、ケトン・ $\alpha$ -シアノヒドリンの分解における新しい触媒機構を明らかにした。*L*HNL の立体構造は、本酵素をキラルなケトンシアノヒドリン合成に応用するための酵素工学的モデルを提供するものである。さらに、 $\beta$ -ヒドロキシニトリルの合成において、新しいタイプの酵素触媒であるアルドキシム脱水酵素を用いる光学分割反応を開発した。本法は、シアンを全く用いることなくアルケンからキラルな  $\beta$ -ヒドロキシニトリルを合成する新しい酵素的手法である。

## 審査の結果の要旨

本論文は、キラルな $\alpha$ -ヒドロキシニトリルおよび $\beta$ -ヒドロキシニトリル類化合物の酵素合成に関する研究として、それぞれ植物 *Linum usitatissimum* 由来のヒドロキシニトリルリアーゼ (*L**u*HNL) の X 線構造および触媒機構の解明、並びに細菌由来のアルドキシム脱水酵素を用いる  $\beta$ -ヒドロキシニトリルの相補的なエナンチオマーの新しい合成法を開発した結果を著したものである。

本論文は、全三章で構成されている。主な内容は以下の通りである。

1. ケトン・シアノヒドリン分解反応に関与する、植物 *Linum usitatissimum* 由来のヒドロキシニトリルリアーゼ (*L**u*HNL) の X 線結晶構造解析を行い、その触媒機構について研究した。*L**u*HNL は、他の HNL との一次構造の相同性を示さず、祖先タンパク質として想定されるアルコール脱水酵素 (ADH) の基質および NAD (H) 結合部位を有することが明らかにされて来たが、*L**u*HNL は ADH 活性を示さない。この理由を探るために、*L**u*HNL のリガンドフリーの立体構造とアセトンシアノヒドリンおよび (*R*)-2-ブタノンシアノヒドリンとの複合体の構造を X 線結晶構造解析によって決定した。ウマ肝臓 ADH との相違点として、*L**u*HNL の各サブユニットには、A フォームの NAD<sup>+</sup>分子が共有結合ではなく、強固に結合していること、NAD<sup>+</sup>のアデニン部分が自由な動きが制限された構造をしていることなどを明らかにした。また、ADH において基質アルコールと作用する補欠分子族 Zn<sup>2+</sup>について、*L**u*HNL では Zn<sup>2+</sup>が強固に結合した NAD<sup>+</sup>の存在などにより、キレート剤 EDTA による活性阻害が起こりにくいことを確認している。部位特異的変異導入により創製したアポ酵素が示す性質からも NAD<sup>+</sup>は酸化還元補酵素としてではなく、活性部位の構成要素として HNL 活性の発現に必要であることを推定している。さらに、変異導入による解析を加え、シアノヒドリン分解の新しい触媒機構として、シアノ亜鉛複合体、および脱プロトン化された Lys162 残基並びにプロトン化された Glu323 残基が関与する機構を提案している。このように、*L**u*HNL の X 線結晶構造解析により基質結合構造を明らかにし、ADH との酵素活性の違いを論じている。
2. 医薬品合成中間体などとして有用である  $\beta$ -ヒドロキシニトリルの相補的なエナンチオマーを合成する新しい酵素的手法を開発している。オレフィン为原料としてジヒドロイソオキサゾールを合成し、各種の細菌由来のアルドキシム脱水酵素を作用させ、それらが触媒する Kemp 脱離反応により不斉開環反応を起こし、シアンを全く使わずキラルな  $\beta$ -ヒドロキシニトリルを合成している。本法は、主として *Bacillus* sp. 由来のアルドキシム脱水酵素 (Oxd B) が示す広い基質特異性、優れた立体選択性、良好なターンオーバー数を利用し、シアン化合物を使用せずに  $\beta$ -ヒドロキシニトリルの相補的なエナンチオマーを酵素的に合成する手法として最初の研究である。
3. 2. で開発したジヒドロイソオキサゾールの酵素的な不斉開環反応により、*L*-カルニチンやアトルバスタチンの合成中間体として有用なキラル 4-クロロ-3-ヒドロキシブタンニトリルの合成法を開発した。まず、*Pseudomonas chlororaphis* B23 由来のアルドキシム脱水酵素 (Oxd A) を選抜し、引き続いて Oxd A と 5-(クロロメチル)-4, 5-ジヒドロイソオキサゾールとのドッキングシミュレーションを行い、触媒ポケット周辺の Leu318、Ala147、Met29、Leu145 の各残基を選択して合理的飽和変異

を導入した。この中では、ラセミ体の 5-(クロロメチル)-4, 5-ジヒドロイソオキサゾールの光学分割において野生型よりも優れた立体選択性を示した OxdA-L318I が、野生型酵素 (Oxd A、 $E=11$ ) に比べ、約 6 倍 ( $E=68$ ) の立体選択性を示した。OxdA-L318I を用いることにより、(*R*)-4-クロロ-3-ヒドロキシブタンニトリルを 90% *ee*、単離収率 39%で、(*S*)-4-クロロ-3-ヒドロキシブタンニトリルを 99% *ee*、単離収率 39%でそれぞれ合成した。本反応で用いる 5-(クロロメチル)-4, 5-ジヒドロイソオキサゾールのラセミ前駆体は、毒性の高いシアンを使用せず、容易に入手できる塩化アシルから合成できる。また、光学分割に残った光学活性な (*S*)- 5-(クロロメチル)-4, 5-ジヒドロイソオキサゾールは、対応する (*S*)- 4-クロロ-3-ヒドロキシブタンニトリルに容易に変換することができる。

以上のように、本論文では、第一章において、植物由来のヒドロキシニトリルリアーゼ (*LdHNL*) の X 線構造解析を行い、その新しい立体構造と触媒機構を解明しており、本酵素を  $\alpha$ -シアノヒドリン合成に応用するための酵素工学的モデルを提供している。また、第二章および三章において、細菌由来のアルドキシム脱水酵素を用いて、有害なシアン化合物を使用しないキラル  $\beta$ -ヒドロキシニトリルの新規合成法を開発しており、基礎および産業利用研究に寄与するところが多い。研究成果は、国際学会論文誌に 3 件が掲載され、その内 3 件について、申請者が筆頭著者である。

論文の内容について、令和 4 年 2 月 2 日に博士論文の審査および最終試験を実施し、申請者は生物化学および有機化学の両方の分野に精通し、博士としての十分な全般的知識を持ち、学術研究にふさわしい討論ができ、独立して研究を遂行する能力を有するものと判定し、博士 (工学) の学位論文として合格であると認められた。