

ピルビン酸と α -ブロモエステルのラジカルカップリング反応を触媒する酵素の探索と遺伝子工学的改変

○藤沢 修斗・加藤 俊介・林 高史（阪大院工）

Enzyme Discovery and its Genetic Engineering for Catalytic Radical Coupling Reaction between Pyruvate and α -Bromoester (Graduate School of Engineering, Osaka University) FUJISAWA, Shuto; KATO, Shunsuke; HAYASHI, Takashi

環境問題の解決や持続可能な社会の実現に向けた新たな物質生産プロセスとして、近年、酵素や微生物等の生体触媒に注目が集まっている。このような背景のもと、生体触媒の反応適用範囲を本来の生体反応だけでなく、非天然の化学反応へと拡張する試みが精力的に行われている^[1]。本研究では特に、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) とチアミンニリン酸 (ThDP) を補酵素として有する FAD/ThDP 依存性酵素を用いた、ピルビン酸と α -ブロモエステルのラジカルカップリング反応の開発に着手した。酵素活性部位内において、ThDP とピルビン酸の反応により形成される Breslow 中間体と α -ブロモエステルを、FAD により一電子酸化・還元することで、ラジカルカップリング反応の進行が期待される。

この仮説のもと、本研究では、ピルビン酸オキシダーゼ (POX) やアセト乳酸合成酵素 (ALS) をはじめとする種々の FAD/ThDP 依存性酵素のスクリーニングを実施した。その結果、放線菌由来のアセト乳酸合成酵素が、ピルビン酸と 2-ブロモプロピオン酸エチルのカップリング反応 (図 1) に対して有望な触媒活性を示すことを見出した (収率 2.4%) (図 2)。次に、これらの酵素の紫外可視吸収スペクトルを測定したところ、図 3 に示すように、ALS は POX のような一般的な FAD/ThDP 依存性酵素とは異なり、550 nm 付近に特徴的な吸収端を有することが判明した。さらに、この ALS の活性中心内の FAD 近傍に、遺伝子工学的な手法によりチロシンを変異導入することで、その触媒活性が約 1.5 倍向上することが確認でき、また紫外可視吸収スペクトルにおいても、550 nm の吸収端の増大が観測できた。さらなる触媒活性の向上をめざし、基質とのドッキングシミュレーションも検討した。

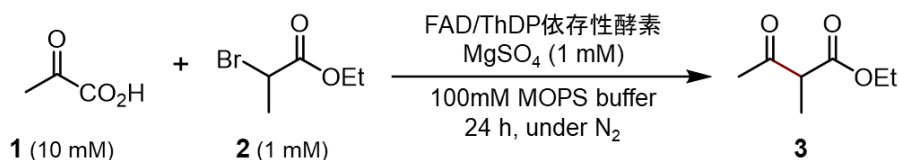


図 1 ピルビン酸と 2-ブロモプロピオン酸エチルのカップリング反応

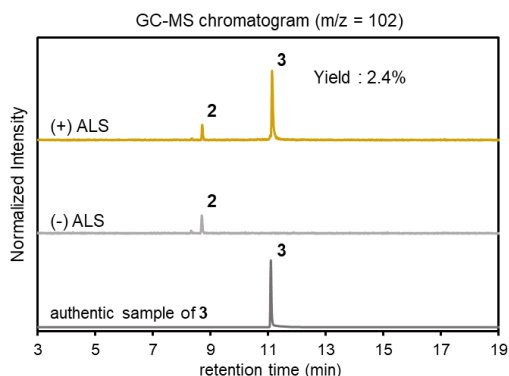


図 2 反応混合物の GC-MS 解析の結果

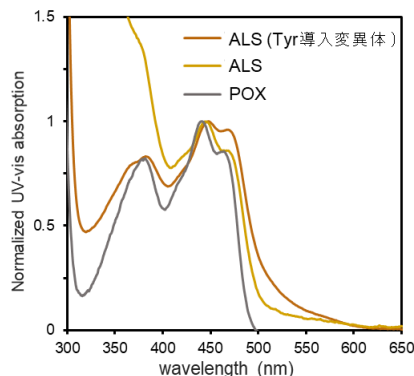


図 3 紫外可視吸収スペクトルの測定結果

1. K. Chen, F. Arnold, *Nat. Catal.* **2020**, *3*, 203-213.