戦略的創造研究推進事業
ERATO
追跡評価用資料

「浅野酵素活性分子」プロジェクト
2011 年 10 月～2018 年 3 月

研究総括：浅野　泰久

2024 年 3 月

国立研究開発法人
科学技術振興機構
Japan Science and Technology Agency

目次

要旨 1
まとめ図 2
第 1 章 プロジェクトの概要..... 3
1.1 研究期間..... 3
1.2 プロジェクトのねらい..... 3
1.3 研究体制..... 3
1.4 プロジェクトの研究成果の概要..... 3
第 2 章 プロジェクト終了から現在に至る状況..... 7
2.1 調査方法 7
2.2 競争的研究資金の獲得状況..... 8
2.3 論文の発表状況..... 8
2.4 特許の出願・公開・登録状況..... 10
2.5 共同研究 10
2.6 受賞状況 11
第 3 章 プロジェクト終了後の研究成果と科学技術や社会･経済への波及効果..... 12
3.1 動植物酵素の異種宿主における可溶性発現技術の開発とそれらの有用物質生産への利用とスマート探索プログラムによる有用酵素探索..... 12
3.2 アルドキシムーニトリル経路の酵素群の開発；ヤスデ由来ヒドロキシニトリルリアーゼを用いる医薬品中間体の合成、光学活性フッ素化ビルディングブロックの合成 13
(1)ヤンバルトサカヤスデ(*Chamberlinius hualienensis*)のゲノム解析..... 13
(2)シアン代謝に関与する微生物･動植物由来酵素の X 線結晶構造解析と有機合成への利用 13
(3)アルドキシム脱水酵素が触媒する Kemp 脱離反応の発見と応用、光学活性フッ素化ビルディングブロックの合成..... 14
3.3 科学技術や社会･経済への波及効果..... 15

要旨

本資料は、国立研究開発法人科学技術振興機構(JST)における戦略的創造研究推進事業ERATO「酵素活性分子」プロジェクト(2011年10月～2018年3月)において、研究終了後一定期間を経過した後、副次的効果を含めて研究成果の発展状況や活用状況を明らかにし、事業およびその事業運営の改善等に資するために、追跡調査を実施した結果をまとめたものである。

第1章では本プロジェクトの概要と期間中の成果を記載した。主な研究成果は、微生物だけでなく動物や植物からの酵素の発見、新規な反応を触媒する酵素の創出、酵素を用いる新規有用物質生産法の開発を実現した。また、これらの研究を支援する技術として、酵素の新規可溶性発現技術と実用的なバイオインフォマティクスや計算化学的手法を開発した。さらに、実用的物質生産法とアミノ酸定量法に関して企業と共同研究を実施し、上記の研究成果が実用的かつ汎用性があることを実証した。これらの研究成果は、酵素利用分野の拡大と発展に有用な基盤技術となった。

第2章では本プロジェクト終了後から追跡調査時点までの状況について記載した。浅野研究総括(以後、浅野)は科学研究費助成事業（科研費）基盤研究(S)および(A)、また地方大学･地域産業創生交付金の大型の競争的研究資金を獲得し、動植物酵素の異種宿主における可溶性発現技術の開発とそれらの有用物質生産への利用について継続的に研究を展開している。さらに、多くの国内外の大学、研究機関や民間企業とも共同研究を進めている。国内外の民間企業へは特許譲渡や実施許諾、成果･ノウハウ提供や技術指導を行っている。

第3章では本プロジェクト終了後の研究成果と科学技術および社会経済への波及効果について記述した。微生物・植物・動物から見出される新たな酵素を活性分子として活用し、発酵法や酵素的結晶変換法等によるニトリルやアミノ酸などの有用化合物の合成への取り組みやソフトウェアを用いた有用酵素の探索などの基盤技術を創出し、物質生産プロセスの開発へと展開しており、医薬品中間体の多品目の工業的製造法への適用また適用が検討されている。

まとめ図

<table>
<tr><th rowspan="2">戦略目標</th><th rowspan="2">インプット</th><th rowspan="2">アクティビティ/アウトプット</th><th colspan="2">アウトカム（short/mid-term）</th><th>アウトカム（long-term）/
インパクト</th></tr>
<tr><th>～追跡調査時点</th><th>今後予想される展開</th><th>今後想定される波及効果</th></tr>
<tr>
<td>戦略目標：
二酸化炭素の効率的資源化の実現のための植物光合成機能やバイオマスの利活用技術等の基盤技術の創出</td>
<td>研究総括：
浅野 泰久

研究体制

(1) 酵素工学グループ
(松井大亮)
(2) 生物有機化学グループ
(元島史尋)
(3) 生物資源探索グループ

* 2017年10月時点、( )内はグループリーダー</td>
<td>研究成果

論文

<table>
<tr><th>①ERATOの成の論文数</th><th>②ERATOの発展論文数</th><th>③ERATOの展開論文数</th></tr>
<tr><td>47(0)</td><td>35(1)</td><td>7(0)</td></tr>
</table>
()の値はTop10%以内論文数

特許申請・登録

<table>
<tr><th colspan="2"></th><th>期間中</th><th>終了後</th></tr>
<tr><td rowspan="2">出願</td><td>国内</td><td>21</td><td>4</td></tr>
<tr><td>海外</td><td>9</td><td>2</td></tr>
<tr><td rowspan="2">登録</td><td>国内</td><td>11</td><td>0</td></tr>
<tr><td>海外</td><td>4</td><td>0</td></tr>
</table>
</td>
<td colspan="2">科学技術的および社会・経済的な波及効果

①動物や植物からの酵素の発見
・植物および動物（ヤスデ）におけるアルドキシム－ニトリル経路の酵素群、およびマンデロニトリル分解に関与する酵素の発見。
・ヤンバルトサカヤスデ（Chamberlinius hualienensis）のゲノム解析

②酵素を用いた新規有用物質生産法の開発
・シアン代謝に関与する微生物・動植物由来酵素のX線結晶構造解析と有機合成への利用
・アルドキシム脱水酵素が触媒するKemp脱離反応の発見と応用。光学活性フッ素化ビルディングブロックの合成

③異種酵素の新規可溶性発現法の開発
・α-ヘリックス法、INTMSAlign-HiSol法、およびGAOptimizer-HiSol法を実行するソフトウエアの開発。
・高機能化したタンパク質の設計。

④実用的物質生産法
上記について、医薬品中間体の工業的製造法に適用。

展開

科研費 基盤研究(S)、基盤研究(A)
地方大学・地域産業創生交付金</td>
<td>・従来の有機合成化学や酵素工学では実現不可能であった技術の基盤の創出と物質生産プロセス

・医薬品中間体の工業的製造</td>
<td>環境にやさしい有用物質生産の工業技術の確立</td>
</tr>
</table>

第 1 章　プロジェクトの概要

本調査の対象である ERATO「浅野酵素活性分子」プロジェクト(以後、本プロジェクトと記載)の概要を下記に示す。

1.1　研究期間

研究期間は 2011 年 10 月～2018 年 3 月。但し、最後の 1 年(2017 年 4 月～2018 年 3 月)は特別重点期間として継続された。

1.2　プロジェクトのねらい

本プロジェクトでは、微生物のみならず植物や動物などにおける高活性な酵素分子が示す反応を探究し、有用物質生産や健康診断法などに資する手法の基盤創出へと展開することを目標とした。有用物質生産の研究においては、微生物・植物・動物から見いだされる新たな酵素を活性分子として活用し、発酵法や酵素的結晶変換法等によるニトリルやアミノ酸などの有用化合物の合成に取り組むことで、これまでの有機合成化学や酵素工学では実現不可能であった技術の基盤を創出し、物質生産プロセスの開発に新たな展開を誘発することを目指した。健康診断法開発の研究においては、アミノ酸代謝に関与する微生物の酵素などを用いて、新しいアミノ酸定量法の基盤技術の創出に取り組むことで、血液中のアミノ酸単体の定量に利用することなどを目指した。このように自然から学ぶことで(新規酵素を探索することで)、環境にやさしい工業技術の確立や新たな診断方法の開発に貢献する。

1.3　研究体制

本プロジェクトは、2012 年 4 月に、酵素工学グループ、生物有機化学グループ、化学生態学グループの 3 グループの体制で研究を開始した。2014 年 3 月をもって、京都分室に設置していた化学生態学グループの研究を終了し、新たに富山県立大学に生物資源探索グループを設置した。2017 年 10 月時点の研究体制は以下である。

(1) 酵素工学グループ(松井大亮)
(2) 生物有機化学グループ(元島史尋)
(3) 生物資源探索グループ
*(　)内はグループリーダー

1.4　プロジェクトの研究成果の概要[1]

酵素は、化学反応を温和な条件で効率的に触媒することから、次世代が求める環境に優しい革新的技術への応用が期待されている。本プロジェクトでは、酵素を用いる有用物質生産と生体成分分析に関する研究を通して、基盤的な新規酵素利用技術を開発し、将来の酵素利用産業の創出に貢献することを目標とした。

[1] https://www.jst.go.jp/erato/research_area/completed/akk_PJ.html

図１　プロジェクトの研究成果の概要[1]

酵素の利用拡大には、酵素の研究に関する技術的革新が必要と考え、「実用性の高い新規酵素の発見」と「新規な物質生産法の開発」を中心に研究を行った。具体的には、微生物だけでなく動物や植物からの酵素の発見、新規な反応を触媒する酵素の創出、酵素を用いる新規有用物質生産法の開発を実現した。そして、これらの研究を支援する技術として、酵素の新規可溶性発現技術と実用的なバイオインフォマティクスや計算化学的手法を開発した。さらに、実用的物質生産法とアミノ酸定量法に関して企業と共同研究を実施し、上記の研究成果が実用的かつ汎用性があることを実証した。これらの研究成果は、酵素利用分野の拡大と発展に有用な基盤技術として高い評価を受けている。

(1)「新規酵素および遺伝子資源の探索と発見」[2]

植物および動物(ヤスデ)におけるアルドキシムーニトリル経路の酵素群、およびマンデロニトリル分解に関与する酵素を探索し、これらの酵素が植物とヤスデおよび植物種間で異なること、見出した酵素がいずれも新規な酵素であることを明らかにした(2 種類の酵素が、新規酵素として IUBMB Enzyme Nomenclature に登録された)。また、ヤンバルトサカヤスデから発見したヒドロキシニトリルリアーゼ（HNL）が、酵素の中で類を見ない高い比活性を持つ新しい構造の酵素であり、他のヤスデにも高い比活性の HNL が存在することを示した。海洋性動物由来の酵素も多様であることを示した。これらの結果より、動物や植物は、微生物とは異なる多様な酵素を有することを明らかにした。そして、本研究で見出した酵素が有用物質生産に利用可能であることを実証し、異種発現系も確立した。

[2] 代表論文「M. Dadashipour, Y. Ishida, K. Yamamoto, Y. Asano: Discovery and molecular and biocatalytic properties of hydroxynitrile lyase from an invasive millipede, *Chamberlinius hualienensis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 112, 10605-10610 (2015).」

(2)「酵素を用いる新規有用物質生産技術の開発」[3]

物質生産に使用されている酵素種は限定的で、多様な物質生産に対応できない。そこで、酵素の産業利用を拡大するために、①理論的機能改変による産業上有用な酵素の開発、②新規酵素反応の開拓、③酵素的結晶変換の利用法について研究した。①では、自然界から発見されていない *R*-立体選択的アミン酸化酵素やアミノ酸アミド合成酵素を開発し、基質認識機構を明らかにした。②では、機能改変酵素を用いて非天然型アミノ酸やイミンの酵素的合成法を開発した。また、アルドキシム脱水酵素でシアン化物を使用しないエナンチオ選択的ニトリル化反応を可能にし、本酵素が高いKemp脱離反応活性を持つこと、ヤスデHNLがヘンリー反応活性を有し、β-ニトロアルコールの合成に利用できることを見出した。③では、酵素的結晶変換法の実施例を増やし、物質生産に活用するためのデータベースを作製して、その有用性を実証した。

(3)「新規可溶性発現技術の開発」[4]

大腸菌を用いる異種発現法では、酵素が活性を示さない封入体として発現される頻度が高く、植物や動物由来酵素の利用は限定的である。この問題点を解決するためにタンパク質の新規可溶性発現法について検討した。そして、タンパク質に存在するα-ヘリックス構造の親水性領域に存在する疎水性アミノ酸を親水性アミノ酸に変換すること、あるいは疎水性領域に存在する親水性アミノ酸を疎水性アミノ酸に変換することにより、活性型可溶性タンパク質として発現できることを見出した(α-ヘリックス法)。さらに、(4)に記載の一次配列解析ソフトウェア「INTMSAlign」をベースにして、目的酵素と類似アミノ酸配列酵素でアミノ酸残基の疎水度が大きく異なる残基を抽出し、変換するアミノ酸候補を予測するプログラムを開発した(Hisol法)。これらの方法は、特定の構造を持つ酵素ではなく、広い範囲の酵素に適応でき、2つの方法を組み合わせた場合、不溶性酵素の約50%を可溶性発現させることができた。

(4)「実験室における研究の要望に沿った情報科学研究」[5]

近年、バイオインフォマティクスや計算化学の進歩により、タンパク質の解析は深化してきたが、ウェット研究とドライ研究が本格的に融合した研究は実施されていない。プロジェクトでは、ドライ分野とウェット分野の研究者が緊密に協力し、将来の酵素研究の発展に寄与するソフトウェアの開発と計算科学的解析の利用について研究した。まず、酵素の一次配列解析ソフトウェア「INTMSAlign」を開発し、その機能を完全コンセンサス配列の設計、*in silico* スクリーニングへの応用、異種酵素の可溶性発現への応用に拡大し、INTMSAlignが

---

[3] 代表論文「K. Yasukawa, S. Nakano, Y. Asano: Tailoring D-amino acid oxidase from the pig kidney to *R*-stereoselective amine oxidase and its use in deracemization of α-methylbenzylamine. Angew Chem. Int. Ed., 53, 4428-4431 (2014).」

[4] 代表論文「D. Matsui, S. Nakano, M. Dadashipour, Y. Asano: Rational assignment of aggregation hot spots based on secondary structure and amino acid hydrophobicity. Sci. Rep. 7, 9558 (2017).」

[5] 代表論文「S. Nakano Y. Asano: Protein evolution analysis of *S*-hydroxynitrile lyase by complete sequence design utilizing the INTMSAlign software, Sci. Rep. 5, 8193 (2015).」

産業用酵素の開発に有用であることを示した。また、酵素の結晶構造解析と構造に基づく酵素反応の計算化学的な解析を行い、酵素の構造の段階的な変化の解析、構造と機能の解析、基質認識機構の解析、変異体の構造解析と理論的変異体作成への応用などで成果を上げた。

(5)実用的有用物質生産用酵素の開発

前記(1)～(4)で得られた基盤的な研究成果を、具体的な物質生産用酵素の開発に適用するために、企業と共同研究を行い、企業の期待に応える研究成果を挙げた。

(6)アミノ酸定量用酵素の開発

アミノ酸の特異的測定法として汎用性のある3種類の方法を開発した。そして、酸化還元酵素を用いる測定法に関して企業と共同研究を行い、実用化研究に道を拓いた。

第 2 章　プロジェクト終了から現在に至る状況

2.1　調査方法

(1)研究者アンケート

研究総括に、プロジェクト終了後の研究成果の発展状況や波及効果等についてアンケートを送付した。

(2)競争的研究資金

プロジェクト終了後からの競争的研究資金の獲得状況については、アンケート回答をもとにした。調査対象期間は、各研究課題の研究期間中を含めて調査対象とし、その中から研究代表者/研究者が当該研究の代表を務める研究助成金、また原則、研究助成金の総額が 1 千万円/件以上のものを抽出した。ただし、各研究課題の開始後に研究助成を受け、当該研究課題が終了する前にその助成期間が終了してしまう事案および当該研究課題終了と同年度に助成期間が終了する事案に関しては対象外とした。

なお、研究代表者/研究者の研究助成資金の獲得状況の調査については、主に以下の WEB サイトも利用した。

・調査対象研究代表者/研究者所属大学の研究者データベース
・調査対象研究代表者/研究者の所属する研究室、本人の WEB サイト
・科学研究費助成事業データベース
・researchmap(https://researchmap.jp/)

(3)論文

論文の抽出は、文献データベースとして Scopus を用い、文献タイプは、Book(Book chapter, Book review)、Editorial、Erratum を除く全文献タイプを対象とした。研究期間中から調査時点まで、研究代表者/研究者が著者になっている論文を著者名より検索し出力した。各著者名から論文リストを作成し、①ERATO の成果(期間中に JST に報告があったもの)、②ERATO の発展(研究終了以降で①の論文を引用しているもの)、および③ERATO の展開(研究終了以降で前記②以外)ものに分類し、論文数を求めた。また、各論文については評価指標 FWCI (Field-Weighted Citation Impact: 年別・分野別・文献タイプ別に 1 文献あたりの算出被引用数を平均で割った数値)および FWCI TopX%、および Jornal の指標となる CiteScore についても収集した。

(4)特許

PatentSQUARE、補完的に Espacenet を利用して検索を行い、研究代表者/研究者が発明者になっており、出願日(もしくは優先権主張日)が研究開始以降の特許を収集した。その後、期間中は、研究期間中に JST に報告があったもの、また終了報告書との照らし合わせを行い不足分については追加、また終了後は研究終了後のものでリストを作成した。

(5)共同研究や企業との連携等

アンケートにより情報を収集した。

(6)受賞

アンケートにより収集した。

2.2　競争的研究資金の獲得状況

本プロジェクト期間中から現在までの競争的研究資金の獲得状況を表 2-1 に示す。浅野は、科研費基盤研究(S)また(A)、地方大学･地域産業創生交付金の競争的研究資金を獲得し研究を展開させている。

表 2-1　競争的研究資金の獲得状況

No	研究代表者	事業・研究種目	研究期間（年度）	研究課題
1	浅野 泰久	科研費基盤研究(A)	2017～2019	反応機構に基づく酵素改変による含窒素有用化合物の合成
2	浅野 泰久	科研費基盤研究(S)	2017～2021	動植物酵素の異種宿主における可溶性発現技術の開発とそれらの有用物質生産への利用
3	浅野 泰久	地方大学･地域産業創生交付金	2018～2022	新規医薬品(低分子)合成プロセスの開発
4	浅野 泰久	科研費基盤研究(A)	2022～2024	バイオ技術とデジタル技術の融合による酵素開発と医薬品合成への利用

2022 年 10 月調査

2.3　論文の発表状況

プロジェクト期間中および終了後の論文を①ERATO の成果、②ERATO の発展、また③ERATO の展開に分類し、それぞれの論文数および Top10%以内の論文数を表 2-2 に示した。

表 2-2　プロジェクト期間中および終了後の論文

①成果論文		②発展論文		③展開論文	
論文数	TOP10%論文数	論文数	TOP10%論文数	論文数	TOP10%論文数
47	0	35	1	7	0

調査日　2022 年 9 月 1 日

(1)本プロジェクト成果に直接関わる論文

成果論文数は 47 報であり、被引用数上位 3 報を表 2-3 に示した。

1位は*R*-立体選択的アミン酸化酵素によるデラセミ化反応、2位はそれぞれ、ヤンバルトサカヤスデからヒドロキシニトリルリアーゼとマンデロニトリル酸化酵素の精製とそれら酵素性質や遺伝子構造、またフェニルアセトアルドキシム合成酵素CYP79D16およびマンデロニトリル合成酵素CYP71AN24の発見、に関する論文である。

表 2-3　成果論文の被引用数上位 3 報

No.	著者名	タイトル	出版年	掲載誌	巻	号	ページ	Citations	FWCI[1]
1	Yasukawa K., Nakano S., Asano Y.	Tailoring D-amino acid oxidase from the pig kidney to *R*-stereoselective amine oxidase and its use in the deracemization of α-methylbenzylamine	2014	Angewandte Chemie - International Edition	53	17	4428	56	1.31
2	Yamaguchi T., Yamamoto K., Asano Y.	Identification and characterization of CYP79D16 and CYP71AN24 catalyzing the first and second steps in l-phenylalanine-derived cyanogenic glycoside biosynthesis in the Japanese apricot, *Prunus mume* Sieb. et Zucc.	2014	Plant Molecular Biology	86	1-2	215	45	1.91
2	Dadashipour M., Ishida Y., Yamamoto K., Asano Y.	Discovery and molecular and biocatalytic properties of hydroxynitrile lyase from an invasive millipede, *Chamberlinius hualienensis*	2015	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	112	34	10605	45	1.64

調査日　2022 年 9 月 1 日

[1] Field-Weighted Citation Impact: 1 文献あたりの被引用数を世界平均(年別・分野別・文献タイプ別に算出)で割った数値。

(2)本プロジェクトの研究成果の発展または展開論文

本プロジェクトの研究成果の発展および展開論文は計 42 報である。また、発展論文のうち、被引用数上位 3 位までの論文を表 2-4 に示した。それぞれ、ヒドロホルミル化反応と生体触媒を組み合わせたシアン化水素フリーなアルケンからのニトリルの合成、アルドキシムの脱水反応によるニトリルの生体触媒的合成、また特異性の高い L-アルギニン酸化酵素の変異過程に関する論文である。

表 2-4　プロジェクトの成果の発展および展開論文の内、被引用数上位 3 報の論文

No.	著者名	タイトル	出版年	掲載誌	巻	号	ページ	Citations	FWCI[1]
1	Plass C., Hinzmann A., Terhorst M., Brauer W., Oike K., Yavuzer H., Asano Y., Vorholt A.J., Betke T., Gröger H.	Approaching Bulk Chemical Nitriles from Alkenes: A Hydrogen Cyanide-Free Approach through a Combination of Hydroformylation and Biocatalysis	2019	ACS Catalysis	9	6	5198	30	1.61
2	Betke T., Higuchi J., Rommelmann P., Oike K., Nomura T., Kato Y., Asano Y., Gröger H.	Biocatalytic Synthesis of Nitriles through Dehydration of Aldoximes: The Substrate Scope of Aldoxime Dehydratases	2018	ChemBioChem	19	8	768	29	0.90
3	Nakano S., Niwa M., Asano Y., Ito S.	Following the evolutionary track of a highly specific L-arginine oxidase by reconstruction and biochemical analysis of ancestral and native enzymes	2019	Applied and Environmental Microbiology	85	12		15	1.48

調査日　2022 年 9 月 1 日

[1] Field-Weighted Citation Impact: 1 文献あたりの被引用数を世界平均(年別・分野別・文献タイプ別に算出)で割った数値。

2.4　特許の出願・公開・登録状況

本プロジェクトの期間中と終了後の調査時点に至るまでの特許出願状況を表 2-5 に示す。プロジェクト終了後の国内出願は 4 件、そのうち 2 件は国際(PCT)出願である。

表 2-5　プロジェクトの特許出願状況一覧

	出願件数		登録件数	
	国内	(国際)海外	国内	(国際)海外
プロジェクト期間中	21	9	11	4
プロジェクト終了後	4	2	0	0

調査日　2022 年 9 月 1 日

2.5　共同研究

富山県立大学情報システム工学科および立命館大学生命科学部と酵素の可溶性発現の機械学習について、静岡県立大学食品栄養科学部とソフトウェア開発、岩手医科大学、東京大学、東京工業大学、千葉大学、新潟大学、京都大学、大阪医科大学、鹿児島大学と酵素の可

溶性発現についての実証実験について共同研究を行っている。また、ドイツ・ビーレフェルト大学と酵素の有機合成への利用(留学および若手研究員の派遣を含む)について、タイ・マヒドン大学との酵素の反応機構、英国・クリック研究所との酵素開発の共同研究も進めている。

民間企業とは、ドイツ・BASF 社に成果物提供を含めた共同研究、また国内 9 社と共同研究を行っている。国内外の民間企業へ特許譲渡や実施許諾、成果･ノウハウ提供や技術指導も行っている。

2.6　受賞状況

2018 年に、公益社団法人日本生物工学会の生物工学賞「微生物からの動植物へと展開する酵素利用技術とその基盤開拓」、また 2022 年に Stiftung Mercator foundation の Mercator fellowship「Contribution to Biocatalysis and Enzyme Engineering」を受賞した。

第 3 章　プロジェクト終了後の研究成果と科学技術や社会･経済への波及効果

3.1　動植物酵素の異種宿主における可溶性発現技術の開発とそれらの有用物質生産への利用とスマート探索プログラムによる有用酵素探索

大量の遺伝子構造情報に基づく酵素の改良や、有機合成化学と連動した医薬中間体の製造技術は近年大きく進展している。浅野らが開発したα-ヘリックス法、INTMSAlign-HiSol 法、および GAOptimizer-HiSol 法を実行するソフトウェア等を利用した未知な酵素の探索、穏やかな反応条件で短時間に多くの収量をもたらすような酵素の最適化条件を見出す基盤技術を確立している[6]。

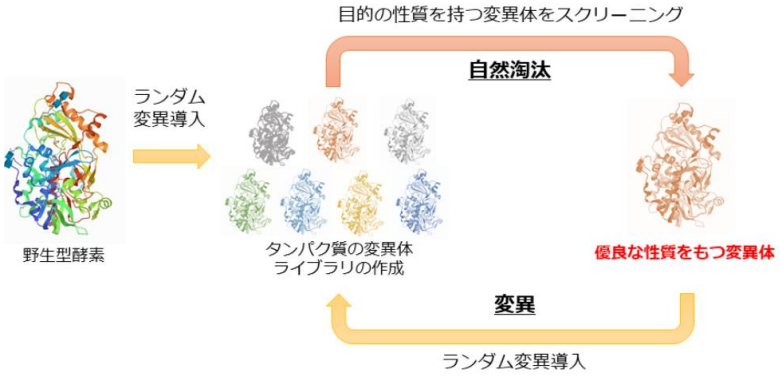

図 3.1　進化分子工学(指向性進化)を用いた酵素性質の改良

例えば、α-ヘリックス法と INTMSAlign-HiSol 法を用い、大腸菌発現系で高可溶性かつ活性に発現する *Xenorhabdus doucetiae*(XdPH)変異体を合理的に設計し、L142R 変異体は野生型 XdPH と比較して顕著に高い可溶性発現を示した。さらに、L142R 遺伝子に部位特異的変異を導入したところ、I28P/L142R および C76Y/L142R 二重変異体は、一重変異体に比べて可溶性発現が向上し、野生型 XdPH よりもさらに高い安定性を示すようになった[7]。

また、外部研究機関(複数の企業や大学)との共同研究を通して高機能化した人工タンパク質の設計に取り組んでいる。現在までに膜タンパク質や抗体を含む複数の人工タンパク質の設計・高機能化に成功しており、特許出願を行っている。また、研究レベルでの基盤技術を医薬品原料の新たな製造技術の開発に繋げ、産業に実装す

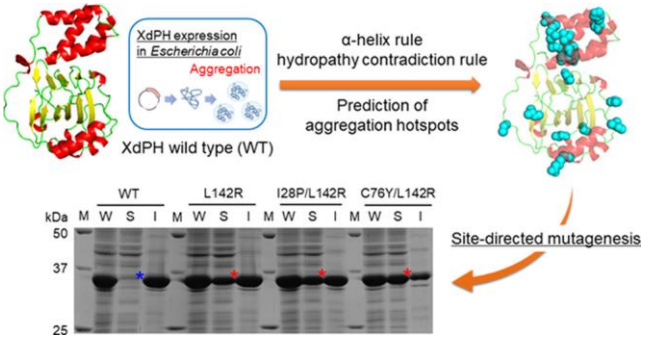

図 3.2　α-ヘリックス法と INTMSAlign-HiSol 法を用いた *Xenorhabdus doucetiae*（XdPH）変異体を合理的な設計[7]

[6] https://www.pu-toyama.ac.jp/BR/asano/INTMSAlign12.html
[7] S. Shinoda, S. et al.: Rational design of the soluble variant of L-pipecolic acid hydroxylase using the α-helix rule and hydropathy contradiction rule, ACS Omega, 7(33), 29508-29516 (2022).

るため、既に企業との共同研究などを行っており、多品目の医薬品中間体の工業的製造法に適用されている。

3.2　アルドキシムーニトリル経路の酵素群の開発；ヤスデ由来ヒドロキシニトリルリアーゼを用いる医薬品中間体の合成、光学活性フッ素化ビルディングブロックの合成

(1) ヤンバルトサカヤスデ(*Chamberlinius hualienensis*)のゲノム解析[8]

ヤンバルトサカヤスデ由来 HNL(ChuaHNL)の採捕、酵素精製、および糖鎖解析とヤスデ DNA についてゲノム解読作業を行った。ヤスデのゲノムシークエンスデータの解析により 112 のスカフォールド(N50 16.6 Mbp, Total size 148.7 Mbp)からなる、ドラフトゲノムを得た。また、ヤスデ各組織の RNA-seq データを利用して、ヤスデゲノム上の遺伝子を推定し、13235 遺伝子を得た。ヤスデのシアン化水素発生に関与する ChuaHNL 遺伝子は多くの ChuaHNL-like 遺伝子とクラスターを形成しており、ChuaHNL の祖先遺伝子がゲノム上で多重化していく過程で HNL 活性を獲得したと推察した。ChuaHNL-like 遺伝子の発現組織を検討した結果、触覚で高発現しているものが複数認められた。ヤスデのゲノムシークエンスデータを解析しゲノム解読済みの節足動物と系統解析を行い、これまでと矛盾しない結果を得た。

(2) シアン代謝に関与する微生物･動植物由来酵素の X 線結晶構造解析と有機合成への利用[9]

シアノヤスデから新しい HNL を発見し、新しい一次構造と高い安定性、(*R*)-マンデロニトリル(MAN)合成における比活性など、HNL の中で最も高い特徴を持つことなどを見いだしていた。新たに ChuaHNL の X 線構造解析を行い、その反応機構について考察し、その結果、水素結合残基が反応機構で重要であること示した。

さらにヤケヤスデ *Oxidus gracillis* 由来の HNL と(*R*)-マンデロニトリル(Man)、(*R*)-2-Cl-Man との複合体の結晶構造より、2-クロロマンデロニトリルの合成における反応速度とエナンチオ選択性のメカニズムを想定することが出来た。

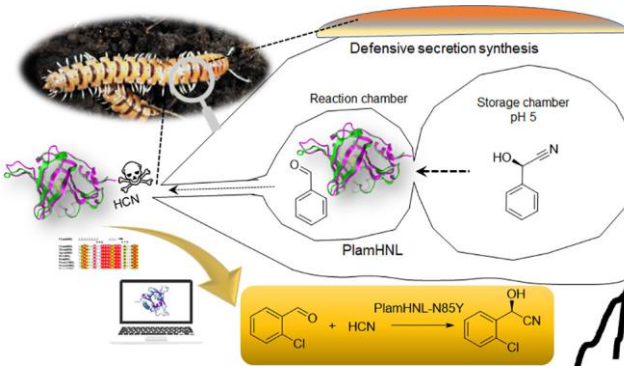

図 3.3　ヤスデ由来ヒドロキシニトリルリアーゼの(*R*)-2-クロロマンデロニトリル合成におけるエナンチオ選択性向上と構造解析[9]

---

[8] Motojima, F. et al.: *R*-hydroxynitrile lyase from the cyanogenic millipede, *Chamberlinius hualienensis* -A new entry to the carrier protein family Lipocalines -, FEBS J., 288(5), 1679-1695 (2021).

[9] Nuylert, A. et al.: Discovery and structural analysis to improve the enantioselectivity of hydroxynitrile lyase from *Parafonteria laminata* millipedes for (*R*)-2-chloromandelonitrile synthesis, ACS Omega, 5 (43), 27896-27908 (2020).

(3)アルドキシム脱水酵素が触媒する Kemp 脱離反応の発見と応用、光学活性フッ素化ビルディングブロックの合成

入手しやすい幅広い種類のアルドキシムを生体触媒的に不斉脱水反応させる、キラルなニトリル合成を見いだした[10]。ニトリルは 90%ee 以上(最大 99%ee)の高いエナンチオマー過剰で得られ、この高いエナンチオ選択性に関して「特異的な基質構造」が同定された。さらに、エナンチオ選択性については、通常、酵素触媒作用では見られないラセミ体アルドキシム基質の *E* あるいは *Z* 異性体のどちらかが作用することで、対応するニトリルの一方あるいは他方のエナンチオマーが同じ酵素で優先的に生成する現象が観察された。

シアンを用いないキラルなニトリル類の合成とアルドキシムデヒドラターゼによるケンプ脱離反応の組み合わせにより、アルドキシムデヒドラターゼを用いた 5-sub-4,5-dihydroisoxazoles の不斉開環反応により、幅広い基質選択性、高いエナンチオ選択性(99%ee まで)、良好なターンオーバー数回転数(～11s^{-1})でキラル β-ヒドロキシニトリル合成に成功した[11]。また、アルカリ処理により、残存するキラルな 5-sub-4,5-dihydroisoxazole は対応する β-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。この反応は、単純なアルケンから一度にアキラルな水酸基とニトリル基を合成する初めての酵素反応であり、β-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新規かつ有用である。

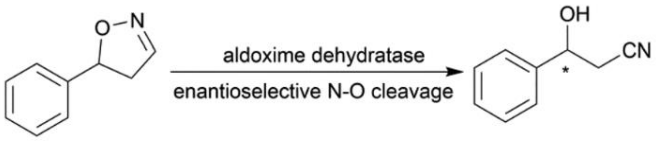

図 3.4　5-sub-4,5-dihydroisoxazoles の不斉開環反応[11]

ニトリル類の不斉合成は、医薬品合成におけるキラルなニトリル類の需要の増加などにより、ますます関心を集めている。既存の合成経路を補完する形で、シアンを用いることなくキラルなニトリル部位を不斉に生成する触媒的プロセスが最近実現した[12]。これらのプロセスは、異なるタイプの基質、触媒方法(化学触媒と生体触媒の利用)、立体化学反応の概念(不斉合成と分離)に基づくものであり、互いに補完的であることが注目される。

(1)～(3)は、既に企業との共同研究などを行っており、医薬品中間体の工業的製造法に適用が検討されている。

---

[10] Betke, T. et al.: Cyanide-free and broadly applicable enantioselective synthetic platform for chiral nitriles through a biocatalytic approach, Angew. Chem. Int. Ed., 56 (40), 12361-12366 (2017).

[11] Zheng, D.-j. and Asano Y.: Biocatalytic asymmetric ring-opening of dihydroisoxazole: a cyanide-free route to complementary enantiomers of β-hydroxynitrile from olefins, Green Chem., 22, 4930-4936 (2020).

[12] Gröger, H. and Asano Y.: Cyanide-free enantioselective catalytic strategies for the synthesis of chiral nitriles, J. Org. Chem., 85 (10), 6243-6251 (2020).

3.3　科学技術や社会･経済への波及効果

本プロジェクト終了後も、動植物由来タンパク質を異種宿主において可溶性発現させるための合理的手法の確立並びにこれまで検討対象とされてこなかった節足動物由来の有用酵素の探索および特性解明に取り組んでいる。

可溶性発現を可能とするタンパク質のアミノ酸変異予測法として開発した「α－ヘリックス則」および「INTMSAlign-HiSol 法」のソフトウェアに関する有効性の検証については、適用範囲の拡張等の研究が進展している。また、ヤスデのゲノム解析については、シアン代謝に関与する多くの酵素遺伝子群を見いだし、研究成果を上げている。これらの研究は、酵素の *in silico* 探索、酵素の異種宿主における可溶性発現技術、酵素の耐熱性向上技術、酵素の *in silico* 進化探技術を提供するものである。

また、国内外の大学や研究機関、また企業との共同研究も多く進めており、医薬品中間体の工業的製造法への適用および適用が検討されている。