

二国間交流事業 共同研究報告書

令和5年4月 17 日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

[日本側代表者所属機関・部局]

富山県立大学・工学部

[職・氏名]

名誉教授・浅野 泰久

[課題番号]

JPJSBP 120213508

1. 事業名 相手国: ドイツ (振興会対応機関: DAAD) との共同研究

2. 研究課題名

(和文) 酵素実装による医薬品中間体のフロー合成

(英文) Enzyme-integrated flow synthesis of pharmaceutical intermediates

3. 共同研究実施期間 令和3年 4月 1日 ~ 令和5年 3月 31日 (2年 0ヶ月)

【延長前】 年 月 日 ~ 年 月 日 (年 ヶ月)

4. 相手国側代表者(所属機関名・職名・氏名【全て英文】)

Bielefeld University, Professor, Harald Gröger

5. 委託費総額(返還額を除く)

本事業により執行した委託費総額		直接経費 3,800,000 円
内訳	1年度目執行経費	直接経費 1,900,000 円
	2年度目執行経費	直接経費 1,900,000 円
	3年度目執行経費	- 円

6. 共同研究実施期間を通じた参加者数(代表者を含む)

日本側参加者等	12 名
相手国側参加者等	7 名

* 参加者リスト(様式 B1(1))に表示される合計数を転記してください(途中で不参加となった方も含め、全ての期間で参加した通算の参加者数となります)。

7. 派遣・受入実績

	派遣		受入
	相手国	第三国	
1年度目	0	0	0 (0)
2年度目	2	0	4 (0)
3年度目			()

* 派遣・受入実績(様式 B1(3))に表示される合計数を転記してください。

派遣: 委託費を使用した日本側参加者等の相手国及び相手国以外への渡航実績(延べ人数)。

受入:相手国側参加者等の来日実績(延べ人数)。カッコ内は委託費で滞在費等を負担した内数。

8. 研究交流の概要・成果等

(1)研究交流概要(全期間を通じた研究交流の目的・実施状況)

目的 本研究では、フロー合成に酵素反応を導入し、医薬品等の合成への適用を中心として共同研究を行う。フロー型の反応器は、熱伝達性、後処理に優れ、スケールアップが容易である。フロー合成への酵素反応の導入により、立体選択性の向上、酵素の安定利用などが期待できる。酵素が導入されたフロー合成は、特に欧州で基礎研究が行われ、すでに Gröger 研究室などが優れた論文を出版している(Adebar ら、*Angew. Chem. Int. Ed.*, (2021)、*ChemCatChem* (2019))。本研究では、現在、国策として、医薬品供給における国際リスクを回避し、原薬製造プロセスをさらに洗練させることが求められている中、今後大きく増大すると期待されている、酵素が導入されたフロー合成について共同研究を行う。

実施状況

(令和 3 年度) 両国ともコロナウイルスの蔓延による措置により本学学生がドイツへの渡航を行うことはできなかった。また、ドイツ側も、日本への渡航は不可能であり、講義は完全オンライン化され、実験は 2 部制を取り一部行われたとこのことであった。JSPS の指導により令和 3 年度の予算を遠隔会議用機器の購入および実験費用に振り分けた。双方において自国での実験を充実させ、遠隔会議やメールなどで適宜連絡を取り合うことにより、共同研究の遂行に支障が起きないようにした。

(i) ヒドロキシニトリルリアーゼ(HNL)とニトリラーゼを組み合わせたフロー合成:まず、富山県立大学における検討として、ベンズアルデヒドと各種シアン源から、酵素を用いるフロー合成により、(*R*)-マンデロニトリルおよびその類縁体を合成した。ヤスデ由来の変異型 HNL のみ用いて(*R*)-マンデロニトリルを合成する場合、および、さらにニトリラーゼを組み合わせて(*R*)-マンデル酸誘導体を合成する場合の二方法を検討した。前者では、酵素およびシアン源を含む緩衝液と、有機溶媒とアルデヒドを含む有機溶媒を用い、微細な両層が交互に混合しながら流路を流す反応について検討した。有機溶媒層への生成物の連続的な抽出により、ラセミ化を防いだ。次に、同様な手法で変異型 HNL を用いて高光学純度の 2-クロロ (*R*)-マンデロニトリルを合成し、酸加水分解によって抗血栓剤クロピドグレルの合成中間体である 2-クロロ(*R*)-マンデル酸を調製した。富山県立大学においては、くすりのシリコンバレーTOYAMA の研究において、フロー合成流路にドイツの研究室と全く同じ機種の卓上 NMR を導入し、基質や生成物の検出および定量の基本的な操作ができるように習熟した。

(ii) 医薬中間体には立体化学を有するイミン構造が多く存在する。それらのイミン構造を酵素を用いて合成するために、富山県立大学においてイミン還元酵素類の *in silico* 探索を行った。また、放線菌由来の既知のイミン脱水素酵素の遺伝子ライブラリーを作成するとともに、土壌中などより放線菌を分離し、イミン還元酵素遺伝子の探索・クローニング・発現を行った。

(令和 4 年度)

(i) 令和 4 年 9 月 30 日から 10 月 1 日に浅野教授が主催した、Active Enzyme Molecule 2022(会場:富山県立大学)において、来日していた Harald Gröger 教授が、「Novel synthetic pathways to industrial chemicals by combining chemo- and biocatalysis」と題して、また、浅野教授が、「Digital methods for the enzyme discovery, development and application for synthesis of chiral molecules」と題してそれぞれ基調講演を行った。来日した Mr. Tim Lukas Guntelmann は、「Optimized reaction conditions for the synthesis of 12-opda」、Ms. Hannah Bork は、「Identifying process conditions for combining enzyme catalysis with high pressure reaction using syngas」、Ms. Alina Gunterman は、「Leading the way to sustainable lubricants: Process development for the production of tailor-made, bio-based, high-performance lubricants」と題して、それぞれポスター発表した。

- (ii) 令和 4 年 10 月 21 日～27 日の旅程で、山口拓也助教が、本学の大学院博士前期課程1年生池田宇宙君の渡航と一緒にドイツまで付き添った。先方において「Identification and utilization of aldoxime and nitrile metabolizing enzymes from plants and arthropods」と題して、講演を行った。池田君は、令和 4 年 10 月 21 日～12 月 25 日の間、ドイツに滞在し、「補酵素再生系を兼ねたアルコールデヒドロゲナーゼによるフロー合成」について研究を行った。

(2)学術的価値(本研究交流により得られた新たな知見や概念の展開等、学術的成果)

協定先のビーレフェルト大学化学科は、有機化学的立場から生体触媒(酵素)反応を化学反応に組込んで利用する研究を展開している。一方、富山県立大学側は、主として生化学的立場から微生物や動植物などの生物資源から有用物質合成に適用できる酵素触媒を開発する研究を展開している。このように、本学とビーレフェルト大学は、酵素触媒の有機合成への利用研究分野において、相補的な立場からの共同研究を行っている。今回も同様に、お互いが相補的に共同研究を行うことで、ドイツ側に対して、新たな酵素化学に関する知見を提供でき、一方では、日本側は、合成基質に対する酵素反応の展開やフロー合成に関する概念を得ることができた。すでに、13報の共著論文があり、今後も今回の共同研究を基に共著論文が増加すると見込まれる。

(3)相手国との交流(両国の研究者が協力して学術交流することによって得られた成果)

富山県立大学において、Mr. Tim Lukas Guntelmann が、当方のテーマである「リボースのリン酸化のための ATP 再生反応」について、Ms. Hannah Bork が「トランスアミナーゼによるアミノ基転移反応」について、Ms. Alina Guntermann が「D-グルタミンの酵素的合成」について、それぞれ研究した。本学の池田宇宙君は、ドイツでは、当方との共同研究のテーマである「補酵素再生系を兼ねたアルコールデヒドロゲナーゼによるフロー合成」について研究した。これらは、いずれも初期段階の研究であるが、3 名の来訪者はドイツに帰国してから、日本で研究した課題と密接な研究テーマである補酵素再生反応(Mr. Tim Lukas Guntelmann)、トランスアミナーゼによるアミノ基転移反応(Ms. Hannah Bork)、およびアミノ酸誘導体の酵素変換反応(Ms. Alina Guntermann)についての研究を継続している。一方、本学の池田君は、日本でもオリジナルの酸化還元酵素に関する研究を行ってきたので、今後、それらの酸化還元酵素群を、先方で学んできた補酵素再生系を組み込んだフロー合成において有効に用い、効率良い物質生産系を作る研究展開を行う予定である。

(4)社会的貢献(社会の基盤となる文化の継承と発展、社会生活の質の改善、現代的諸問題の克服と解決に資する等の社会的貢献はどのようにあったか)

本研究では、国策として、医薬品供給における国際リスクを回避し、原薬製造プロセスをさらに洗練させることが求められている中、今後大きく増大すると期待されている、酵素が導入されたフロー合成について共同研究を行った。酵素を導入したフロー合成については、欧州が先行しているが、日本では、ほとんど研究が行われていなかった。くすりのシリコンバレーTOYAMA の資金を得て、Harald Gröger 研究室と全く同じ機種 of 卓上 NMR を導入し、フロー合成流路に卓上 NMR を連結して、基質や生成物の検出および定量の基本的な操作ができるように習熟した。ドイツに派遣した修士学生が、今後 1 年間、ドイツで習得した技術を参考にして、当方のオリジナルの酵素でフロー合成を研究する。

(5)若手研究者養成への貢献(若手研究者養成への取組、成果)

渡航はしていない本学の学生・博士研究員が、医薬品合成中間体を流路を用いて合成する研究を行い、ドイツ側と遠隔会議を行った。また、ドイツ側から当研究室に 3 名が滞在し、当方からドイツに 1 名が訪問し、共同研究を行った。ドイツ側の学生は、酵素を有機合成反応に組込むために、富山県立大学側が得意な、新規酵

素反応の探索や酵素化学研究など基礎的な研究に興味を持っており、あらかじめ行った遠隔会議で当方が提案した複数のテーマから興味ある課題を選択した。その後、先方の各学生それぞれに対して、日本側の学生・博士研究員を担当させ、若手双方が遠隔会議やメールを用いて意見交換を行い、それらの打合せに基づいてドイツ側が来日するまでに、試薬購入、遺伝子合成などを行って準備した。来日してからも、学生同士が、毎日お互いに綿密な意見交換が出来るような体制を作り、切磋琢磨ができる環境を作った。一方、本学の池田宇宙君は、ドイツに滞在した2か月間、フロー合成に関するテーマを希望し、先方の大学院生と共に実験を行った。ドイツから帰国後、非常に積極的に研究に打ち込む姿勢が顕著に認められ、フロー合成に関する研究を継続する希望を持っている。よって、本短期留学の意義があったと考えられる。また、山口拓也助教が、先方において講演の機会を得た。このように、若手研究者養成に取り組み、今後これらの研究者の発展が期待される。

(6)将来発展可能性(本事業を実施したことにより、今後どのような発展の可能性が認められるか)

当研究室では、国際交流として、タイ王国、ドイツ、中国と3か国との学術交流協定を結んでおり、令和4年度では、それら3か国からの留学生・博士研究員が、それぞれ5名、3名、1名在籍していた。そこに日本人大大学院生・学部学生、さらにインドからの博士研究員が加わり、多方面の専門性を持ち、かつ非常に国際的な環境下、それぞれがお互いに議論・支援するように仕向けた。このような幅広い研究分野を扱い、さらに国際的な環境に身を置いていた学生が、将来、再度同様な環境で活躍しようという気持ちを抱くことは当然であり、今回の日独二国間共同研究を契機として形成された多国間のネットワークが、必ず若手研究者の心に刻まれ、将来大きく生かされると確信している。

(7)その他(上記(2)～(6)以外に得られた成果があれば記載してください)

来日中に国際学会 Active Enzyme Molecule 2022(会場:富山県立大学)に参加した Mr. Tim Lukas Guntelmann が行ったポスター発表が、ChemBioChem 賞を受賞した。