

氏名	浦野信行
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第1597号
学位授与の日付	平成19年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	農学研究科応用生命科学専攻
学位論文題目	Studies of Microbial Aminoalcohol Dehydrogenase: Biochemical Analysis and Application to Chiral Compound Production (微生物由来アミノアルコール脱水素酵素に関する生化学及び応用研究)
論文調査委員	(主査) 教授 清水 昌 教授 喜多恵子 教授 江崎信芳

### 論文内容の要旨

本論文は、*Rhodococcus erythropolis* MAK154 株の生産する新規アミノアルコール脱水素酵素 (AADH) に関して酵素科学および遺伝子工学的手法を用いた基礎解析を行い、さらに産業的に重要な *d*-ブソイドエフェドリン (dPE) の効率的生産への応用を目指して遂行した研究成果をまとめたものである。主な内容は次の通りである。

(1) ラセミ体 1-フェニル-1-ケト-2-メチルアミノプロパン (MAK) のうち (*S*)-MAK のカルボニル基のみを選択的に不斉還元し、2つのキラル中心を持つ化合物 dPE へと変換する酵素として *R. erythropolis* MAK154 株由来 AADH を見出した。本菌株より AADH を単離精製し、その諸性質の解明を行った。本酵素は、MAK が自発的にラセミ化をおこす弱アルカリ条件下で最大活性を示し、本酵素を用いることによりラセミ体 MAK を dPE へと効率的に変換できることを示した。本酵素は NADPH 依存的に (*S*)-MAK を還元するのみでなく、様々なアミノアルコールを NADP<sup>+</sup> 依存的に酸化することを明らかにした。また、本菌株より AADH 遺伝子のクローニングを行い、本酵素遺伝子が 259 アミノ酸残基をコードし、短鎖アルコール酸化還元酵素スーパーファミリーに属する酵素であることを明らかにした。本酵素遺伝子を *tac* プロモーター下流に挿入した組換えプラスミド pKKAADH を構築し、大腸菌内で本酵素を大量発現させることに成功した。さらに、NADPH 再生系酵素としてグルコース脱水素酵素遺伝子を共発現させた組換え大腸菌を調製することに成功した。この共発現大腸菌を触媒として用いることにより、200 mM のラセミ体 MAK を 178 mM の dPE へと光学純度 >99% *e. e.* で変換することに成功した。また、本酵素による変換反応の律速段階は基質である MAK のラセミ化の速度であることを示した。

(2) AADH を用いたラセミ体 MAK の dPE への変換反応では、生成物である dPE が反応液中に蓄積することにより AADH の酵素活性が阻害されることを認めた。そこで、進化工学的手法と高効率なスクリーニング法を併用することにより、高濃度の dPE の存在下でも高い酵素活性を示す変異型 AADH の取得を試みた。得られた 2 種類の変異型酵素の変異点を解析したところ、それぞれ異なる位置に 1 アミノ酸残基の置換が認められた。また、これらの 2 カ所のアミノ酸置換を併せ持つ変異型酵素を作製し、dPE 存在下での反応性を解析したところ、この変異型酵素もまた高濃度の dPE 存在下でも高い酵素活性を有することが明らかとなった。野生型酵素とこれら 3 種の変異型酵素をそれぞれ精製し、酵素学的性質を解析したところ、これら 2 カ所の変異部位はそれぞれ酵素の活性及び基質との親和性に影響を与えるアミノ酸残基であることが示唆された。

(3) *R. erythropolis* MAK154 株内での AADH の生理学的意義と転写調節機構の解明を目指し、本菌株の AADH 遺伝子周辺およそ 14 kb の塩基配列の解析を行った。AADH 遺伝子周辺の遺伝子の配置は数種の *Mycobacterium* 属のそれと類似したものであり、AADH 遺伝子周辺には 1-アミノ-2-プロパノール等のアミノアルコールの代謝に関与すると推測される遺伝子群の存在が明らかとなった。また、AADH 遺伝子のすぐ下流に存在している ORF の遺伝子産物が多くの微生物に見いだされる転写調節タンパク質と高い相同性を示すことに着目し、その機能解析を行った結果、この遺伝子産物は

AADH を含む遺伝子群の発現を負に調節する転写調節タンパク質であることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

酸化還元酵素は、様々な生物種において多種多様に存在しており、生体を維持するためには必要不可欠な酵素群である。また近年、有機合成化学が苦手とする立体選択的な物質生産の分野をはじめとする工業的生産プロセスへの利用も新たな展開を見せている。本論文では、産業的に重要な2つのキラル中心を有する化合物である *d*-プソイドエフェドリン (dPE) の生産に有効な酸化還元酵素である *Rhodococcus erythropolis* MAK154 株由来のアミノアルコール脱水素酵素 (AADH) について、その基礎解析から本酵素を用いる dPE の実用生産に向けた検討結果がまとめられている。以下に示す点が成果として評価できる。

(1) ラセミ体 1-フェニル-1-ケト-2-メチルアミノプロパン (MAK) のうち、(*S*)-MAK のみを立体選択的に認識し、dPE へと不斉還元する酵素として *R. erythropolis* MAK154 株由来の AADH を見出し、その精製と諸性質の解明、遺伝子のクローニングに成功した。本酵素は、ラセミ体基質の一方のエナンチオマーのみに作用し、そのカルボニル基を不斉還元することが示され、dPE をはじめとする2つのキラル中心を有する化合物を立体選択的に生成するための強力なツールとなり得ることが明らかとなった。

(2) 上述の AADH をコードする遺伝子および補酵素再生系酵素 (グルコース脱水素酵素) 遺伝子の共発現大腸菌の作製に成功した。この共発現大腸菌を触媒として用い、MAK が自発的にラセミ化を起こすことを利用して、ラセミ体 MAK をほぼ定量的に dPE へと光学純度 >99% *e. e.* で変換できることを示し、工業生産への可能性を示した。

(3) 本酵素は生成物である dPE の反応溶液中への蓄積によって活性阻害をうけることを明らかにし、進化工学的方法によって、阻害を受けにくい酵素への改変に成功した。得られた変異酵素の変異点の解析と、酵素学的性質の比較によってそれぞれの変異点が酵素のどのような性質に影響を与えるかを推測した。本酵素は短鎖アルコール酸化還元酵素スーパーファミリーに属する酵素であるが、本酵素ファミリーは多様に進化しているためそのアミノ酸配列と酵素活性との相関関係はこれまであまり解明されていなかった。本研究では、これまで研究例の少なかった本酵素ファミリーの研究に新たな研究展開の始点となる重要な知見を得た。

(4) *R. erythropolis* MAK154 株の AADH 遺伝子周辺領域について分子生物学的手法を用いて詳細な解析を行い、AADH 遺伝子を含む遺伝子群の転写調節に関わる遺伝子の同定とその転写調節メカニズムの推定を行った。本酵素はスレオニン等の代謝の結果生成されるアミノアセトンやアミノプロパノールの代謝に関与していると考えられるが、本研究でなされた周辺遺伝子の機能推定は、これら物質の代謝系の解明に重要な示唆を与えるものといえる。また、データベース検索により、同様の代謝系が他の複数の微生物においても存在することが示された。これは、新たな代謝経路の発見につながる重要な知見といえる。

以上のように本論文は微生物由来のアミノアルコール脱水素酵素について基礎・応用両面にわたって検討を加えたものである。得られた結果は、本酵素ファミリーの分子レベルでの研究の進展を促進するとともに、新たな産業利用への可能性を示しており、応用微生物学、応用酵素学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成19年1月11日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。