

|          |   |
|----------|---|
| 氏名       | くら た あつ し<br>倉 田 淳 志  |
| 学位(専攻分野) | 博 士 (農 学)   |
| 学位記番号    | 農 博 第 1493 号  |
| 学位授与の日付  | 平成 17 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 Novel Enzyme Catalyzing Asymmetric Reduction of<br>2-Chloroacrylic Acid<br>(2-クロロアクリル酸の不斉還元を触媒する新奇酵素の研究) |
| 論文調査委員   | (主査)<br>教授 江崎信芳 教授 清水 昌 教授 坂田完三   |

### 論 文 内 容 の 要 旨

有機ハロゲン化合物は、農業や医薬などの合成原料として広い用途をもつ化合物群であり、生体触媒を用いてこれらを生産する技術は、今後の化学工業を支える基盤技術の一つと考えられる。中でも不飽和有機ハロゲン化合物を酵素的に不斉還元する方法は、光学活性有機ハロゲン化合物を合成する方法として利用価値が高い。しかし、不飽和有機ハロゲン化合物の代謝に関与する酵素が同定され、諸性質が明らかにされた例はきわめて少なく、応用開発も遅れているのが現状である。本研究は、不飽和有機ハロゲン化合物代謝酵素の諸性質の解明と、世界的に大きな需要のあるフェノキシプロピオン酸系除草剤の原料 (S)-2-クロロプロピオン酸を 2-クロロアクリル酸の酵素的な不斉還元によって生産する方法の開発を目的としており、その成果は以下のように要約される。

1. 2-クロロアクリル酸を炭素源として生育する *Burkholderia* sp. WS を土壌から単離した。本菌において、2-クロロアクリル酸は NADPH 依存的に (S)-2-クロロプロピオン酸に還元され、さらに (S)-2-ハロ酸デハロゲナーゼによって加水分解されて乳酸と塩化物イオンに変換されることを明らかにした。

2. *Burkholderia* sp. WS の 2-クロロアクリル酸還元活性は、2-クロロアクリル酸を炭素源としたときにのみ検出され、乳酸を炭素源とした場合には検出されなかった。2-クロロアクリル酸を炭素源としたときに誘導合成されるタンパク質を二次元電気泳動で同定し、そのうちの一つが還元活性を担うことを明らかにした。本還元酵素の遺伝子配列を決定し、大腸菌を宿主とした大量発現系を構築し、本酵素を均一状態に精製してその諸性質を明らかにした。本酵素は NADPH キノン酸化還元酵素と高い配列相同性を示し、medium-chain dehydrogenase/reductase スーパーファミリーに属すると考えられた。しかし、本酵素は NADPH キノン酸化還元酵素の基質であるキノン類には作用しなかった。2-クロロアクリル酸と 2-プロモアクリル酸を良好な基質としたことから、この新奇酵素を 2-ハロアクリル酸還元酵素と命名した。

3. 2-ハロアクリル酸還元酵素の X 線結晶構造解析を行い、1.3Å の分解能で立体構造を明らかにした。本酵素は 2つのドメインからなり、ドメイン I は 5つの  $\alpha$ -ヘリックスと 10本の  $\beta$ -ストランドで構成され、ドメイン II は 7つの  $\alpha$ -ヘリックスと 6本の  $\beta$ -ストランドで構成されていた。ドメイン II の  $\beta\alpha\beta$  ユニットの NAD(P)H 結合モチーフ (AXXGXXG) が存在したことから、ドメイン II は NADPH 結合ドメインであり、一方、ドメイン I は触媒ドメインと考えられた。2-ハロアクリル酸還元酵素は大腸菌由来 NADPH キノン酸化還元酵素と構造類似性があり、対応する二次構造の位置や長さはよく保存されていた。大腸菌由来 NADPH キノン酸化還元酵素については NADPH 結合型の立体構造が明らかにされており、この立体構造にもとづいて本酵素の NADPH 結合部位を推定した。その結果、Ser178, Lys182, Tyr197, Arg323 が NADPH の 2'-リン酸基を認識すると推定された。

4. 2-ハロアクリル酸還元酵素と、NADPH 再生系として機能する *Bacillus subtilis* 由来グルコースデヒドロゲナーゼを共発現する大腸菌組換え株を作製した。本菌の粗酵素抽出液を用いて 2-クロロアクリル酸を変換する反応系を構築し、(S)-2-クロロプロピオン酸を 99.9%以上の光学純度、99.9%以上の収率、34g/l の濃度で得ることができた。

## 論文審査の結果の要旨

有機ハロゲン化合物は化学工業の基幹をなす化合物群の一つであり、その酵素的生産法や変換法の開発は、グリーンケミストリーの実現に向けた重要な研究課題である。特に光学活性有機ハロゲン化合物は農薬や医薬の合成原料として有用であり、これらを効率よく生産する方法の開発が期待されている。本研究は、不飽和有機ハロゲン化合物の不斉還元を触媒する新奇酵素を発見し、諸性質や精密立体構造を明らかにするとともに、本酵素を用いた光学活性有機ハロゲン化合物の生産系を構築したものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. 2-クロロアクリル酸資化性細菌 *Burkholderia* sp. WS において、2-クロロアクリル酸が不斉還元されて (*S*)-2-クロロプロピオン酸に変換され、さらに (*S*)-2-ハロ酸デハロゲナーゼ的作用により、乳酸と塩化物イオンに分解されることを明らかにした。天然には2-クロロアクリル酸の類縁体など、種々の不飽和有機ハロゲン化合物が存在するが、これらの代謝経路はほとんど明らかにされていない。本論文によって不飽和有機ハロゲン化合物の新しい代謝経路が解明された意義は大きい。
2. 2-クロロアクリル酸を炭素源とすることで2-クロロアクリル酸還元活性が誘導されることを見だし、この誘導特性にもとづいて還元酵素を同定し、その諸性質を明らかにした。本酵素は NADPH キノン酸化還元酵素と配列相同性をもつが、これとは明確に異なる基質特異性を示す新奇酵素であることが判明し、本酵素を2-ハロアクリル酸還元酵素と命名した。まったく報告例のない新奇酵素の実体を明らかにしたものであり、高く評価できる。
3. 2-ハロアクリル酸還元酵素の X 線結晶構造解析を行い、その立体構造を 1.3Å の分解能で決定した。さらに、NADPH キノン酸化還元酵素との比較から、NADPH の 2'-リン酸基を認識するアミノ酸残基を推定した。得られた知見は本酵素の構造-機能相関の解明に寄与するところが大きく、基質特異性や補酵素特異性の改変にも繋がるものと考えられる。
4. 2-ハロアクリル酸還元酵素を用い、除草剤の合成前駆体として大きな需要のある (*S*)-2-クロロプロピオン酸の合成法を開発した。安価な D-グルコースを基質として用いる補酵素再生系によって、(*S*)-2-クロロプロピオン酸を 99.9% 以上の収率で合成する方法を確立した。従来、(*S*)-2-クロロプロピオン酸はラセミ体の光学分割によって生産されており、最大収率は 50% であった。これをはるかに上回る収率で目的物を得るプロセスを開発した生物工学的な意義は大きい。

以上のように本論文は、不飽和有機ハロゲン化合物の新しい代謝経路を解明するとともに、光学活性有機ハロゲン化合物の不斉合成に利用できる新奇酵素を見だし、その酵素科学的諸性質の解明と応用面の開発を行ったものであり、応用微生物学および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17年2月10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。