

氏名	やまもとひろあき 山本浩明
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	論農博第2474号
学位授与の日付	平成15年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Studies of Synthesis of Optically Active Alcohols with Recombinant Whole-cell Biocatalysts (組換え菌体細胞を用いる光学活性アルコールの酵素的合成に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 江崎信芳 教授 清水昌 教授 坂田完三

論文内容の要旨

近年開発されている合成医薬品の大部分はキラル化合物であり、多くの場合、両エナンチオマー間に薬理活性や薬物動態などの差違がみられる。片方のエナンチオマーのみに薬効が認められるのに対し、もう一方のエナンチオマーには薬効がないばかりか、逆に強い毒性が認められる場合もある。サリドマイド禍などの薬害事件を契機として、キラル医薬品は光学活性体として開発・生産されるようになり、今では光学活性原料をいかに低コストで効率よく工業生産するかが重要な課題となっている。光学活性原料のなかでもキラルアルコールは、汎用性などの点で最も重要な位置を占め、特に、(R)-1,3-ブタンジオール((R)-1,3-BDO)、(R)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチル((R)-ECHB)、(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチル((S)-ECHB)などは、抗生物質、高脂血症治療薬など、多種多様な医薬品の合成原料として注目されている。本研究は、これらの光学活性キラルアルコールの工業生産に利用可能な微生物酵素の探索、機能解析、その遺伝子組換え菌体を用いる高生産システムの開発を行ったものであり、その結果は以下のように要約される。

1. ラセミ体の1,3-BDOを原料として(R)-1,3-BDOを選択的に生成する微生物株を探索した結果、*Candida parapsilosis*を見いだした。本菌より、NAD-依存性のS体特異的な2級アルコールデヒドロゲナーゼ(CpSADH)を精製し、その酵素科学的諸性質を明らかにするとともに、その遺伝子をクローニングして高発現させる系を構築した。得られた遺伝子組換え*Escherichia coli*菌体を用いて(R)-1,3-BDOの最適生産条件を検討した結果、高い光学純度の(R)-1,3-BDOを高収率で高濃度に蓄積させる生産系の確立に成功した。

2. CpSADHは、(S)-1,3-BDOを立体選択的に酸化するだけでなく、4-クロロアセト酢酸エチル(ECAA)を不斉還元して(R)-ECHBを生成することを見だし、CpSADHを高発現する組換え*E. coli*菌体を用いて(R)-ECHBを高生産するシステムを構築した。還元反応の補酵素であるNADH再生系の基質としては、CpSADHの基質となる2-プロパノールを利用し、最適反応条件において、補酵素NAD(H)を添加することなく、高光学純度の(R)-ECHBを高収率、高濃度に蓄積させる方法を開発した。

3. *Kluyveromyces lactis*は、ECAAを不斉還元し、(S)-ECHBを生成する活性を有する。本反応を触媒するカルボニルレダクターゼ(KLCR1)を本菌より精製し、その酵素科学的性質を明らかにした。本酵素のアミノ酸配列を解析した結果、本酵素はβ-ケトアシル-アシルキャリアープロテインレダクターゼ(KR)およびアセトアセチル-CoAレダクターゼ(AR)と高い配列相同性を示すことを見いだした。そこで、*E. coli*および*Bacillus subtilis*のKR遺伝子、*Ralstonia eutropha*および*Zoogloea ramigera*のAR遺伝子をクローニングし、*E. coli*を宿主として発現させて検討した結果、いずれの酵素もECAAを還元して(S)-ECHBを生成する活性を有することを見いだした。なかでも*R. eutropha*由来のARは生成物の光学純度や酵素安定性の面で最も優れていることから、*B. subtilis*由来のグルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子とともに本酵素遺伝子を*E. coli*内で共発現させ、その組換え菌体を触媒として用いることで、補酵素NADP(H)を添加することなく、内在のNADP(H)のみを利用して、高い光学純度の(S)-ECHBを高収率、高濃度に蓄積させる系を確立することに成功した。

論文審査の結果の要旨

各種医薬品の合成原料となる光学活性アルコールを低コストで効率よく製造する方法の開発が求められている。本研究は、光学活性アルコールのなかでも特に有用な (*R*)-1,3-BDO, (*R*)-ECHB および (*S*)-ECHB の工業生産に利用できる酵素の探索と酵素科学的諸性質の解明, ならびにそれらを高発現する遺伝子組換え菌体を用いた高生産法の開発を行ったものであり, 評価すべき点は次のとおりである。

1. 酵母 *C. parapsilosis* より *S* 体特異的な 2 級アルコールデヒドロゲナーゼ CpSADH を精製し, その遺伝子をクローン化した。これは, *S* 体特異的な 2 級アルコールデヒドロゲナーゼを遺伝子レベルで詳細に解析した最初の例であり, その意義は大きい。また, CpSADH を高発現する組換え *E. coli* 菌体を用いて, 高濃度の (*R*)-1,3-BDO を生産する方法の確立に成功した。これまで立体選択的な酸化反応による光学活性化合物の生産を工業的なレベルで検討した例はほとんどなく, この点でも本論文は評価できる。

2. CpSADH の幅広い基質特異性を利用し, 2-プロパノールを補酵素 NADH 再生用の補助基質として利用し, ECAA から (*R*)-ECHB を効率よく合成する方法を確立した。不斉還元反応を工業的に成功させるためには補酵素の再生をいかに効率よく行うかが重要な課題となっている。本酵素が安価な 2-プロパノールに対して高い酸化活性を有することを巧みに利用し, 単一の酵素により不斉還元反応と補酵素再生反応を組換え *E. coli* 菌体の中で同時に行い, 内在する NAD(H) のみを用いて (*R*)-ECHB を合成する方法を確立したことには大きな意義がある。

3. 従来微生物スクリーニングの手法により得られた ECAA について, そのホモログ酵素をタンパク質データベースから探索して結果的に (*S*)-ECHB の合成に利用できる酵素を 2 種類見いだした。スクリーニングを補完するものとしてタンパク質データベース探索を巧妙に利用し, 工業生産系の確立にまで至ったことは高く評価できる。グルコースデヒドロゲナーゼを共発現させた組換え *E. coli* 菌体を用いることにより, 補酵素 NADP(H) を添加することなく (*S*)-ECHB を工業生産する方法を確立したことは, 本論文の価値をさらに高くしている。

以上のように本論文は, 光学活性アルコールの合成に有用なアルコールデヒドロゲナーゼやカルボニルレダクターゼを発見し, その酵素科学的性質を解明するとともに, それらの酵素の特徴を巧みに利用して光学活性アルコールの工業生産法を確立したものであり, 応用微生物学と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15年2月12日, 論文なら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。