

氏名	やまぐちひとみ 山 口 仁 美
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2494 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 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	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	Asymmetric Reduction of Keto Esters with Actinomycetes (放線菌を利用するケトエステルの不斉還元)
論文調査委員	(主 査) 教 授 林 民 生 教 授 時 任 宣 博 助 教 授 中 村 薫

論 文 内 容 の 要 旨

生体触媒を利用するカルボニル化合物の不斉還元反応は光学活性アルコールを合成するための有用な手段の一つである。これまでに、パン酵母やカビを利用した種々のカルボニル化合物の不斉還元反応に関する研究が行われており、生成物の立体選択性が低い場合にはそれらを向上させるための方法が開発されてきた。しかしながら、生体触媒として用いられてきた微生物の多くは真核生物である酵母やカビに限られ、その他の微生物、とりわけ原核生物を利用した報告例は極めて少ない。原核生物である放線菌は、代表的な土壌細菌として世界各地に分布している種類の豊富な微生物群であるにも関わらず、これらを有機合成のための生体触媒として利用した研究例は見当たらない。申請者は、放線菌(特に耐熱性菌株)に着目し、生体触媒として有用な菌株のスクリーニングを行った結果、*Streptomyces thermocyaneoviolaceus* IFO 14271に優れた α -ケトエステル還元能力を見だし、この菌体の持つ還元酵素の研究を行った。

各種 α -ケトエステルについて*S. thermocyaneoviolaceus* IFO 14271を用いて還元した結果、3-メチル-2-オキソブタン酸エチル(1f)およびベンゾイルギ酸エチル(1g)が高い光学純度で対応する(R)-ヒドロキシエステルへと変換されることを見出した。これらの基質は(1f, 1g) 37°Cで還元を行うと99%以上のエナンチオマー過剰率(e.e.)でアルコール体へと変換されたが、55°Cで反応を行った場合には、生成物のe.e.が低下した。ビルビン酸エチル(1a)、2-オキソブタン酸エチル(1b)の還元では、反応温度を上げることで、得られる(S)-体のヒドロキシエステルのe.e.が向上した。また、2-オキソブタン酸エチル(1c)、3-メチル-2-オキソブタン酸エチル(1f)およびベンゾイルギ酸エチル(1g)の還元では、反応系中にグルタミン酸などのアミノ酸類を添加することにより、>99%e.e.で(S)-体のヒドロキシエステルを得ることに成功した。

菌体反応における立体選択仕の変化がどのようなメカニズムで起こるのかを明らかにするために、*S. thermocyaneoviolaceus* IFO 14271の無細胞抽出液から、 α -ケトエステルの還元反応に関わる酵素の精製を試みた。各種クロマトグラフィーを行った結果、3種類の α -ケトエステル還元酵素(STKER-I, II, III)の精製に成功した。これらの酵素は、いずれも分子質量が60-70kDaの同一サブユニットからなる二量体構造を有していた。還元反応の至適pHは6-6.5付近であった。基質特異性および還元反応の立体選択性は異なっており、STKER-Iは脂肪族および芳香族の α -ケトエステルを立体特異的に対応する(S)-ヒドロキシエステルへと還元した。STKER-IIによる還元生成物の立体選択性はそれほど高くなかったが、STKER-IIIはかさ高い基質に対しての不斉認識が高く、1e, 1f, 1gを>99%e.e.で(R)-体へと還元した。これらの酵素の動力学定数を調べた結果、STKER-Iは1a, 1bのような小さな基質、STKER-IIは1e, 1f, STKER-IIIは芳香族基質に対して、反応性が高いことがわかった。さらに、3つの還元酵素の熱安定性を調べた結果、STKER-Iは他の2種類の酵素と比較して、高い安定性を有していることがわかった。

3種類のSTKERの性質を詳細に検討した結果から、反応温度による立体選択性の変化は、還元反応に関わる酵素の動力学定数および熱安定性が大きく反映されていることがわかった。たとえば3-メチル-2-オキソブタン酸エチル(1f)の

還元反応においては、37°Cでは高い kcat/Km 値を有する STKER-II が主として作用し、高い光学純度で (R)-ヒドロキシエステルを生成し、一方、55°Cでは、STKER-II が熱に対して不安定であるために、反応性は低いものの安定性の高い STKER-I の寄与が大きくなり、結果として生成物の e.e. が低下したものと考えられた。

STKER の N-末端アミノ酸配列を決定し、相同性の高いタンパク質をデータベースを利用して検索したところ、いずれの酵素も *Streptomyces coelicolor* A3(2)に由来する酸化還元酵素と考えられる酵素と高い相同性が得られた。そこで、*S. coelicolor* A3(2)から、 α -ケトエステル還元酵素の精製をおこなった。得られた酵素は、分子量が STKER の約 2 倍で、補酵素として NADH に特異的であり、 α -ケト酸に対してもケトエステル同様の活性を示した。分子内に亜鉛を有する点でも STKER と異なっていた。SCKER は、 α -ケトエステルの還元という共通の機能を有しているながらも、多くの点で STKER と異なる酵素であることがわかった。

本研究により、放線菌が生体触媒として有用な微生物種であることを示すことができ、*S. thermocyanoviolaceus* IFO 14271 を用いて α -ヒドロキシエステルを立体選択的に得ることに成功した。また、菌体内から 3 種類の α -ケトエステル還元酵素を単離精製し、それらの性質に基づいて菌体反応における反応機構を明らかにすることができた。さらに、種の異なる微生物から単離した、同じ機能を持った酵素同士を比較することにより、 α -ケトエステル還元酵素の多様性を示すことができた。

論文審査の結果の要旨

生体触媒を利用するカルボニル化合物の不斉還元反応は、光学活性なアルコールを合成するための有用な手段の一つであることから、盛んに研究が行われてきたが、用いられる微生物の多くは酵母やカビに限られ、それ以外の微生物、特に原核生物を利用した研究例はほとんど無かった。ましてや、非天然の化合物の還元反応を触媒する酵素の性質を解明し、菌体内で起こっている反応のメカニズムを酵素レベルで解明した研究例は、パン酵母を除いてほとんど無い。

申請者は、これまで生体触媒としては未開発であった放線菌が生体触媒としての有用性が高いと考え、カルボニル化合物の還元能力を検索した。生体触媒を利用する際の必要条件である「安定性」の高い酵素を得るために、耐熱性の高い放線菌をターゲットとしたところに特徴がある。検索の結果、耐熱性放線菌の種である *Streptomyces thermocyanoviolaceus* IFO 14271 に α -ケトエステルに対する優れた還元能力を見出した。そして、反応温度や添加剤などの反応条件をコントロールすることにより、(α -ヒドロキシエステルの両エナンチオマーをつくり分けることに成功した。また、菌体内から 3 種類の α -ケトエステル還元酵素 (STKER-I, II, III) の単離精製に成功し、分子質量、基質特異性、補酵素特異性、動力学定数、熱や pH に対する安定性、金属塩やキレート試薬の影響などの酵素化学的性質を明らかにすることにより、これらの酵素がそれぞれ特徴的な性質を有していることを明らかにした。申請者は、研究初期の段階から、菌体を用いた反応による還元生成物の立体選択性が、反応条件の違いに応じて変化することを見出していたが、この現象が各酵素の特徴が反映されることによって起こることを実証し、各酵素の性質に基づいて菌体反応における反応機構を明らかにした。精製酵素の中でも STKER-I は、様々な α -ケトエステルを、99% 以上のエナンチオマー過剰で (S)-ヒドロキシエステルへと還元する立体選択性の高い酵素であり、熱安定性にも優れていることから、有機合成への利用の可能性が示された。さらに、N-末端アミノ酸配列を決定し、相同性の高いタンパク質をサーチした結果、すべての STKER が *Streptomyces coelicolor* A3(2) 由来の酸化還元酵素であると推定されている酵素と高い相同性を有していたことから、*S. coelicolor* A3(2)からも α -ケトエステル還元酵素 (SCKER) を単離し、その性質を調べた。SCKER は、STKER-I, II, III と同じ反応を触媒する酵素でありながら、分子質量、基質特異性、補酵素特異性、分子内に金属を有する点など、多くの相違点が見出された。SCKER の精製を行うことにより、 α -ケトエステルの還元反応が複数のタイプの酵素によって触媒されるという興味深い結果を得た。

以下のように申請者は、放線菌が生体触媒として有用な微生物種であることを示し、微生物利用に関する研究分野においてその可能性を広げた。また、ケトエステルのような、生体には存在しない化合物の還元反応を触媒する酵素について詳細に検討し、酵素レベルで反応機構を解明した。さらに、異なる微生物に存在する、同じ機能を持った酵素を比較することにより、酵素の多様性について示した。申請者が本研究によって得た成果は、今後の生体触媒化学、酵素化学関連の研究分野

の発展に貢献するものであり、その業績は高く評価される。

よって申請者の研究は、博士（理学）の称号に価するものであることを認める。

なお、主論文および参考論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した分野について口頭試問を行った結果、合格と認めた。