

氏 名	謝 勝 学
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1079 号
学位授与の日付	平 成 11 年 7 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 農 芸 化 学 専 攻
学位論文題目	Enzymatic production of optically active acetylenic alcohols and α, β -diastereomeric amino acids (酵素法による光学活性アセチレンアルコール及び α, β -異性アミノ酸の生産に関する研究)

論文調査委員 (主 査) 教 授 清 水 昌 教 授 上 野 民 夫 教 授 加 藤 暢 夫

論 文 内 容 の 要 旨

分子内に複数の官能基・不斉中心を有する化合物は、反応性に富むキラルビルディングブロックとして有用であるが、有機化学的手法による選択的合成が非常に困難である。微生物酵素が示す厳密な官能基選択性・立体選択性は、これらの化合物の簡便で高選択的な合成法の開発に利用できる優れた特質のひとつである。本研究は、分子内に三重結合とヒドロキシル基を持つアセチレンアルコール、および、分子内に2つの不斉中心をもつ α, β -異性アミノ酸に関して、微生物酵素を用いた選択的合成法の開発を試みたものである。すなわち、エステル誘導体の酵素的な不斉加水分解、または、酵素的立体反転による光学活性アセチレンアルコールの生産法を開発するとともに、反応に関与する微生物酵素の諸性質を解明した。また、カルバモイルアミノ酸の酵素的な不斉加水分解により、 α, β -異性アミノ酸の4種類の立体異性体を選択的に作り分ける手法を開発した。これらの結果は以下のように要約できる。

1) アセチレンアルコールのモデル化合物である 3-pentyn-2-ol の種々のエステル誘導体に対する不斉加水分解活性を微生物に探索し、酢酸エステルから効率良く (R)-3-pentyn-2-ol を生産する *Rhodococcus rubropertinctus* AKU NOC 082, (S)-3-pentyn-2-ol を生産する *Hansenula nonfermentans* AKU 4332 を見いだした。また、反応条件の最適化により、10～50% (v/v) のラセミ体酢酸エステルから、高い光学純度 (> 94% e.e.) の (R)-および (S)-3-pentyn-2-ol をほぼ定量的に生産することを可能にした。

2) ラセミ体 3-pentyn-2-ol 中の一方の光学異性体を立体反転させ逆の光学異性体へと導くことにより、ラセミ体を一方の光学異性体へと変換する活性を微生物に探索し、ラセミ体 3-pentyn-2-ol を (R)-3-pentyn-2-ol へ変換する *Nocardia fusca* AKU 2123, および、(S)-3-pentyn-2-ol へ変換する *Nocardia pseudosporangifera* AKU 060 を見いだした。また、これらの微生物が触媒する立体反転反応が、立体選択的酸化と立体選択的還元との組み合わせから成っていることを明らかにした。さらに、*N. fusca* を用いた反応条件の検討により、NADPH の添加のもと、ラセミ体 3-pentyn-2-ol を立体反転反応により効率よく (R)-3-pentyn-2-ol へと変換することを可能にした。

3) *N. fusca* より 3-pentyn-2-ol 立体反転の初発反応を触媒する酸化酵素を単離精製し諸性質を解明した。本酵素は分子量 39,000 の同一サブユニットからなる 4 量体であり、NAD に依存して種々の 2 級アルコールを (S)-立体選択的に酸化したが、1 級アルコールには作用しなかったことから、NAD 依存性 2 級アルコール脱水素酵素であると考えられた。また、逆反応である立体選択的還元反応をも触媒し、NADH を補酵素として、2-hexanone から (S)-2-hexanol を、ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate から ethyl (R)-4-chloro-3-hydroxybutanoate を高い光学純度で生成しうることを明らかにした。

4) α -アミノ酸の立体選択的酵素合成法として汎用性の高いヒダントイナーゼプロセスに用いられる酵素 D-および L-カ

ルバモイラーゼについて、 α, β -異性アミノ酸に対する立体選択性を検討した結果、D-カルバモイラーゼが threonine, isoleucine, 3, 4-methylenedioxyphenylserine, β -methylphenylalanine に関して、また、L-カルバモイラーゼが β -methylphenylalanine に関して、 α 位のみならず β 位の立体構造に対しても選択性を示すことを明らかにした。さらに、D-および L-カルバモイラーゼのこれらの性質を利用して、カルバモイル誘導体の立体異性体混合物から β -methylphenylalanine の 4 種の立体異性体を選択的に合成する方法を確立した。

論文審査の結果の要旨

医薬品や農薬などに利用される生理活性物質の多くは、分子内に複数の官能基・不斉中心を持つことから有機化学的手法による選択的合成が非常に困難である。近年、これらの原料となるキラルビルディングブロックの合成に微生物酵素が有する高い選択性を利用する試みが盛んに行われているが、多くの場合は単一の官能基・不斉炭素を認識する反応への応用に限られ、複数の官能基・不斉中心を認識する反応への応用例は少ない。本研究は、分子内に三重結合とヒドロキシル基を持つアセチレンアルコール、および、分子内に 2 つの不斉中心をもつ α, β -異性アミノ酸に関して、微生物酵素を用いた選択的合成法の開発を試みたものであり、微生物酵素による新規な高選択の精密合成法を開拓する先駆的な研究であると言える。評価すべき点は以下の 4 点である。

1) アセチレンアルコールのモデルとして、3-pentyn-2-ol を取り上げ、ラセミ体エステル誘導体から酵素的な不斉加水分解により高い光学純度で (R)-および (S)-3-pentyn-2-ol を生成する微生物を見だし、これらを用いた光学活性 3-pentyn-2-ol の効率的な合成法を新たに開発した。

2) 酵素的立体反転により、ラセミ体 3-pentyn-2-ol を (R)-もしくは (S)-3-pentyn-2-ol へと変換する微生物を見出すとともに、立体反転反応が、立体選択的酸化と立体選択的還元との組み合わせから成っていることを明らかにした。さらに、酵素的立体反転によるラセミ体 3-pentyn-2-ol からの (R)-3-pentyn-2-ol の効率的な合成法を新たに開発した。

3) 3-Pentyn-2-ol の酵素的立体反転に関与する酵素系の解析を行い、初発反応を触媒する (S) 体特異的酸化酵素を単離精製するとともに、本酵素が不飽和アルコールに作用する新規な NAD 依存性 2 級アルコール脱水素酵素であることを明らかにした。

4) α -アミノ酸の立体選択的酵素合成法として汎用性の高いヒダントイナーゼプロセスに用いられる酵素 D-および L-カルバモイラーゼが、 α, β -異性アミノ酸の α 位のみならず β 位の立体構造をも識別することを初めて明らかにし、これらの性質により複数の不斉点を同時認識する、 α, β -異性アミノ酸の高度立体選択的な精密合成法を新たに開発した。

以上のように本論文は、有用化合物の精密酵素合成に関して、新たな可能性を示すものであり、応用微生物学、応用酵素学に貢献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のあるものと認める。

なお、平成 11 年 6 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。