

氏 名	やそはら よし ひこ 八十原 良 彦
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	論 農 博 第 2398 号
学位授与の日付	平成 13 年 11 月 26 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	PRODUCTION OF USEFUL OPTICALLY ACTIVE COMPOUNDS BY MICROBIAL ENZYMES (微生物酵素による有用光学活性化合物の生産)
論文調査委員	(主 査) 教 授 清 水 昌 教 授 熊 谷 英 彦 教 授 江 崎 信 芳

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、微生物酵素を用いた有用光学活性化合物の生産に関するものである。本論文は二章によりなり、第一章では、不斉還元反応を利用した各種光学活性 β -ヒドロキシ酪酸エステルの実用的製法を確立するために行った、還元酵素の探索、酵素遺伝子のクローニング、本酵素を含む不斉還元触媒微生物の育種に関する成果をまとめた。また、第二章では加水分解酵素を用いた光学活性グリセリン誘導体の合成とこれを用いた抗真菌剤原料の新規合成法の確立に関する成果をまとめた。主な内容は以下に示すとおりである。

1. 4-クロロアセト酢酸エチル (COBE) を 4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチル (CHBE) に効率よく不斉還元する酵母菌数株をアセトン乾燥菌体を用いたスクリーニング方法により見いだした。高活性菌として選択した *Candida magnoliae* AKU4643 は、グルコース脱水素酵素による補酵素再生系の存在下、水-有機溶媒二相系反応において、90 g/L の (S)-CHBE (96%ee) を蓄積した。

2. COBE から (S)-CHBE への還元に関与する NADPH 依存性カルボニル還元酵素 S1 をコードする遺伝子を、*C. magnoliae* のゲノム DNA から、クローニングした。本遺伝子のコードする849アミノ酸残基からなるタンパク質は、短鎖アルコール脱水素スーパーファミリーに属するタンパク質との高いアミノ酸配列相同性を示した。本遺伝子を、大腸菌を宿主として *lac* プロモーター支配下で高発現させた。本形質転換体が生産するカルボニル還元酵素の諸性質は、*C. magnoliae* のそれとよく一致した。また、本形質転換大腸菌は、水-有機溶媒二相系反応において補酵素再生系の存在下、125 g/L の光学的に純粋な (S)-CHBE を蓄積した。

3. 還元反応に必須な補酵素 NADPH を効率的に再生しながら (S)-CHBE 生産を行なうために、カルボニル還元酵素 S1 遺伝子と *Bacillus megaterium* IWG3 由来のグルコース脱水素酵素遺伝子を *lac* プロモーター支配下のプラスミドベクターに組み込み、これにより大腸菌を形質転換して両酵素を高生産する大腸菌株を得た。本菌は、水-有機溶媒二相系反応において、収率85%で、430 g/L の (S)-CHBE を蓄積した。また、水系反応においても、208g/L の (S)-CHBE の蓄積が認められた。後者の反応系における NADP^+ のターンオーバー数を生成 CHBE 量から計算すると、約21,600であった。

4. 上記の両酵素を共生産する形質転換大腸菌細胞を触媒として用いることにより、CHBE のほかにも光学的に純粋な (S)-4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステル類を効率的に合成できることを示した。

5. プロキラルなジエステルである、1,3-ジアシルオキシ-2-(2,4-ジフルオロフェニル)-2-プロパノールをリパーゼにより効率よく不斉加水分解できることを示した。*Rhizopus delemere* 由来のリパーゼを用いた最適反応条件下では、光学純度 97%ee の (R)-1-イソブチリルオキシ-2-(2,4-ジフルオロフェニル)-2,3-プロパンジオールが、収率87%で得られた。

6. Grignard 反応によって、安価なジヒドロキシアセトンから上記のプロキラルな基質を収率よく合成できることを示した。

7. 上記の光学活性モノエステルは、その光学純度を低下させることなく、収率よく目的とする抗真菌剤の合成鍵中間体へ誘導できることを示し、安価でかつ入手の容易な原料を用いた実用的な抗真菌剤原料の合成方法を確立した。

論文審査の結果の要旨

光学活性な医薬品等の合成原料等として有用ないわゆる汎用的光学活性合成素子に対する需要は増大の一途にある。一方、酵素が示す立体特異性を生かした生体触媒反応は数多く発見されてきているが、実用的な製造プロセスへの応用例はごくわずかである。著者は、理論的には100%のモル転換率での生産が可能なプロキラルな原料を用いる酵素的な不斉還元反応と不斉加水分解反応に着目し、それぞれを鍵反応とする、医薬品中間原料や抗菌剤原料の新規で実用性の高い生産プロセス開発の基盤を築いた。成果として評価すべき点は次のとおりである。

1. アセトン乾燥菌体を用いて4-クロロアセト酢酸エチル(COBE)を4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチル(CHBE)に不斉還元する微生物のスクリーニングを実施し、(*S*)-CHBEを著量蓄積する酵母菌株を発見した。これは、スクリーニング方法を工夫することにより、従来にない高活性を示す微生物を見いだせることを示したものである。
2. 本酵母菌株の生産する立体選択性の異なる複数のCOBE還元酵素のうち、光学的に純粋な(*S*)-CHBEを与えるカルボニル還元酵素をコードする遺伝子を本菌のゲノムDNAからクローン化した。本遺伝子を高発現させた大腸菌形質転換体を用い、著量の光学的に純粋な(*S*)-CHBEの生産が可能なことを示した。よって、微生物のもつ有用酵素のみを遺伝子組換え技術により大量に生産させることにより、高品質な物質の合成に適した生体触媒を調製できることが明らかとなった。
3. 遺伝子組換え技術を用いて、還元反応に必須な還元型補酵素を再生するグルコース脱水素酵素および当該カルボニル還元酵素の両者を高生産し、著量の(*S*)-CHBEを生産できる大腸菌株を育種した。よって、二つの酵素を高生産するより高機能な生体触媒を創製できること、さらに、補酵素再生を必要とする酵素反応が実用的な化学反応として利用可能であることを示した。
4. COBE以外の化合物に対する当該カルボニル還元酵素の反応性および生成物の立体選択性を明らかにし、本酵素の応用範囲を明示した。
5. プロキラルな2-置換-グリセリン-1,3-ジエステルの片方のエステルのみを選択的に加水分解する酵素反応について検討し、使用する基質のエステル鎖の種類と触媒となる加水分解酵素を選択することにより、光学活性モノエステルが得られることを明らかにした。さらに、反応条件の最適化を行い実用的な不斉加水分解法を実現した。
6. 上記のジエステルを安価な原料から合成しうる新規な合成方法を開発した。さらに、光学活性モノエステルを抗真菌剤の合成中間体にまで収率よく誘導し、酵素反応と有機合成化学反応を組合せた実用的かつ効率的な有用化合物の合成法を確立した。

以上のように本論文は、カルボニル還元酵素を用いた実用的な酵素的な不斉還元反応システム開発と加水分解酵素を用いる抗真菌剤原料の合成プロセス構築のための技術基盤を築くとともに、新規なカルボニル還元酵素の諸性質を解明し、さらに水-有機溶媒二相系下での酸化還元酵素反応の解析を通して酵素法による有用物質合成に新知見を提示したものであり、応用微生物学、酵素化学、有機合成化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13年9月13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。