

氏 名	ほん だ こう すけ 本 田 孝 祐
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1309 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 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	Biochemical and applied studies of microbial lactonases (微生物由来ラクトナーゼの生化学的および応用研究)

論文調査委員	(主 査) 教 授 清 水 昌 教 授 加 藤 暢 夫 教 授 宮 川 恒
--------	--

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、微生物が生産するラクトン加水分解酵素（ラクトナーゼ）に関して、酵素化学的および遺伝子工学的手法を用いた基礎解析を行うとともに、これらの酵素を利用した有用化合物の効率的生産への応用を目的として行った研究結果をまとめたものである。以下にその概要を記す。

(1) D-パントイルラクトン (D-PL) に立体選択的に作用し、DL-PL の光学分割に有用な *Fusarium oxysporum* 由来ラクトナーゼの異種糸状菌内での発現系を構築し、これを利用した DL-PL の酵素的分割を試みた。まず、*Aspergillus oryzae* を宿主とした発現系の構築を行った。得られた組換え菌体を触媒として DL-PL を基質とした不斉加水分解を試み、分割反応が効率よく進行することを認めた。次に酵素活性の安定化のためアルギン酸カルシウムによる菌体の固定化を行った。この結果ラクトナーゼ活性は大幅に安定化され、本固定化菌体を触媒として 35% (w/v) の DL-PL を基質とした反応を行った場合、加水分解率はおよそ 50%、すなわち理論値どおり D-PL のみがほぼ完全に加水分解を受けることを認めた。

さらに、*Acremonium chrysogenum* を宿主とした本ラクトナーゼの分泌生産を試みた。*Fusarium* sp. S19-5 株由来アルカリプロテアーゼのプロモーターおよび分泌シグナルペプチドをコードする領域の下流にラクトナーゼ染色体 DNA を導入することにより、分泌発現系を構築した。得られた形質転換体は最大で 192 mg/ml のラクトナーゼを培養培地中に分泌した。これをデュオライト A568 に吸着させた固定化酵素を触媒とすると 35% (w/v) DL-PL を 24 時間で D 体選択的に加水分解することができた。

(2) *Acinetobacter calcoaceticus* F46 より芳香族ラクトンに作用する新規ラクトナーゼ、3,4-ジヒドロクマリンヒドロラーゼ (DCH) を発見・単離した。DCH 遺伝子をクローニングし、その推定アミノ酸配列の相同性検索を行ったところ、セリンヒドロラーゼファミリーに属するエステラーゼやノンヘムハロペルオキシダーゼなどの高い相同性が認められた。また、DCH はラクトン加水分解に加え、過酸化水素の存在下でモノクロロジメドンに対する臭素体化反応を触媒した。本ハロゲン化反応は有機酸と過酸化水素から DCH による触媒のもと生成する過酸が中間体として働き進行するものであることを明らかにした。このユニークな触媒活性に着目し、DCH 遺伝子破壊株を用いた検討を行うことにより本酵素の *in vivo* での機能を探った。その結果、DCH はカタラーゼと協調的に働き、過酸の加水分解的な無毒化を担うものであると推測した。

また、DCH は芳香族ラクトンだけでなく一部の直鎖状エステルに対しても厳密な選択性を伴った加水分解活性を示した。セトラキサートおよび DL- β -アセチルチオイソ酪酸の各メチルエステルに対する位置および立体選択的加水分解を試みたところ、その反応産物はいずれも医薬品やその合成中間体として有用なセトラキサートおよび D- β -アセチルチオイソ酪酸と同定された。そこで、DCH 遺伝子を大量発現させた大腸菌を触媒として、これらの反応を行ったところ、高濃度の基質 (50% (w/v) DL- β -アセチルチオイソ酪酸メチルおよび 25% (w/v) メチルセトラキサート) が短時間 (前者は 4 時間、後者は 1 時間) のうちに目的の生成物へと定量的に変換された。

(3) *Microbacterium* sp. 7-1W にセトラキサートエステルを位置選択的に加水分解し、セトラキサートへと変換する新規エ

ステラーゼを見出し、本菌を用いたメチルセトラキサートの酵素的脱保護を試みた。本エステラーゼは *Microbacterium* sp. 7-1W の細胞破碎液中の不溶性画分に局在し、界面活性剤 Brij 58 による可溶化の後、数段階のクロマトグラフィーを経て電気泳動的に均一に精製された。本酵素はセトラキサートエステルの位置選択的加水分解を触媒するほか、パントテン酸エステル中のエステル結合とアミド結合を識別し、エステル結合のみを選択的に加水分解した。そこで *Microbacterium* sp. 7-1W の湿菌体を触媒とし、メチルセトラキサートの位置選択的加水分解反応を行った。湿菌体 5 g を含む反応液 50 ml 中に基質を分割添加することにより、最終的に 20 g のメチルセトラキサートを17時間で目的の生成物セトラキサートに変換することができた。

論文審査の結果の要旨

分子内エステル結合を有する環状化合物であるラクトンは、種々の代謝中間体や生理活性物質として天然にも広く見られる物質であり、これらを開環加水分解する酵素であるラクトナーゼもまた自然界に普遍的に存在するものと考えられている。また、ラクトナーゼはその独特の基質特異性から新たな産業用触媒としても期待されるものである。しかし、リパーゼなどの一般的なエステル加水分解酵素に比べ、その研究は大きく遅れをとっている。本論文では微生物由来のラクトナーゼに焦点を当て、それらの基礎および応用の両面について検討した結果がまとめられている。以下に示す点が成果として評価できる。

(1)すでに DL-パントイルラクトン (DL-PL) の工業的光学分割に利用されている糸状菌 *Fusarium oxysporum* 由来のラクトナーゼについて、異種糸状菌を宿主とした本酵素遺伝子の発現を行った。麹菌 *Aspergillus oryzae* および抗生物質生産菌である *Acremonium chrysogenum* を宿主として、それぞれラクトナーゼ遺伝子の菌体内および分泌発現系の構築に成功した。また、ラクトナーゼのシグナルペプチド領域が小胞体への輸送・糖鎖付加に関与することを明らかにしている。得られた形質転換体を触媒とした高濃度 DL-PL の不斉加水分解反応を行い、いずれの組換え菌体、組換え酵素を用いた検討でも現行の *F. oxysporum* を用いた場合と同等以上の効率で光学分割が行えることを示している。*F. oxysporum* ラクトナーゼの大量調製法が開発されたことにより、本酵素の触媒素子としての新たな利用が期待できる。

(2)細菌 *Acinetobacter calcoaceticus* F46 よりハロペルオキシダーゼ活性を持ち合わせた 3,4-ジヒドロクマリンヒドロラーゼ (DCH) を発見・単離した。DCH によるハロペルオキシダーゼ活性は、本酵素によって有機酸と過酸化水素から生成する過酸が中間体となり生じるものであることを示した。また、このユニークな触媒機能に着目することにより、DCH の生理的役割が過酸の加水分解的な無毒化にあることを示した。これは今までハロゲン化合物の生合成に関与すると考えられていた細菌由来のハロペルオキシダーゼについての知見を大きく覆すものであると同時に、新たな酸化的ストレス防御系酵素の発見でもある。

また、DCH が DL- β -アセチルチオイソ酪酸メチルの D 体選択的加水分解およびメチルセトラキサートの位置選択的加水分解を触媒することを明らかにした。DCH 遺伝子を大量発現させた大腸菌を触媒として、医薬品等の合成を目的としたこれらの物質の酵素的な光学分割あるいは酵素的脱保護反応が効率よく進行することを示した。

(3)細菌 *Microbacterium* sp. 7-1W に位置選択的加水分解活性を有するエステラーゼを見出した。本酵素の諸性質を解明し、これが新規エステラーゼであることを示した。また、本菌の湿菌体を触媒として高濃度のメチルセトラキサートの酵素的脱保護が効率よく進行することを示した。

以上のように本論文は微生物由来のラクトナーゼについて基礎・応用の両面にわたって検討を加えたものである。得られた結果は、これまで未解明であったラクトン加水分解酵素について様々な知見をもたらすものであるとともに、新たな産業的利用への可能性を示しており、応用微生物学、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1月9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にあるものと認めた。