

氏 名	和田 大 ^{まさる}
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2217 号
学位授与の日付	平成 11 年 1 月 25 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 novel microbial enzymes useful for the production of optically active alcohols

(光学活性アルコール類の生産に有用な微生物酵素の探索と開発に関する研究)

(主査)

論文調査委員 教授 清水 昌 教授 加藤 暢 夫 教授 江崎 信 芳

論 文 内 容 の 要 旨

医薬等の有用生理、活性物質はその構造中に不斉炭素原子を有するものが多く、たいいていの場合是一方のエナンチオマーのみが生理活性を持つ。また、もう一方のエナンチオマーは活性を持たないばかりか、副作用など好ましくない性質を示す場合がある。このため、このような有用生理活性物質を有機合成的に手に入れるには、ラセミ体の光学分割などの煩雑な過程を経なければならないことが多い。光学活性な有用生理活性物質の生産に酵素法を取り入れる利点のひとつに、酵素の持つ高い立体選択性があげられる。本研究ではこのような観点から、光学活性アルコールの生成および分解に関与する酵素をターゲットとして、微生物の生産する有用酵素の探索、精製と諸性質の解明、光学活性アルコール生産への応用について検討を加えた。その主な内容は以下のとおりである。

第1章では細菌由来のスレオニンアルドラーゼに関する研究について述べた。スレオニンの変換に関与する酵素反応のうち、スレオニンアルドラーゼ反応に注目し、スレオニンの各種異性体に作用するスレオニンアルドラーゼの探索を行った。その結果、スレオニンアルドラーゼ反応を示す菌株は無細胞抽出液の立体選択性によって3種類に分類することができた。また、土壌より分離した *Acromonas jandaei* DK-39 に L-アロスレオニンアルドラーゼ、*Arthrobacter* sp. DK-38 に D-スレオニンアルドラーゼの2種の新規なスレオニンアルドラーゼを見だし、その諸性質を明らかにした。L-アロスレオニンアルドラーゼは L-スレオニンや L-セリンに対して活性を示さず、新規なスレオニンアルドラーゼであると考えられた。また、D-スレオニンアルドラーゼは補酵素としてピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) を要求した。また、 Mn^{2+} などの2価金属イオンが反応に必須の因子であることも明らかとなった。

第2章では微生物酵素を利用した ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate (COBE) の不斉還元による、ethyl (R)-4-chloro-3-hydroxybutanoate ((R)-CHBE) の生産に関する研究について述べた。*Sporobolomyces salmonicolor* 由来のアルデヒド還元酵素をコードする cDNA (AR-cDNA) および補酵素再生系として *Bacillus megaterium* 由来のグルコース脱水素酵素 (GDH) 遺伝子を組み込んだ大腸菌を作製し、COBE の不斉還元による (R)-CHBE の高濃度生産法の開発を行った。AR-cDNA 大量発現菌 *Escherichia coli* JM109 (pKAR) を用いて、水-酢酸 n-ブチル 2 相系で COBE の不斉還元反応を行うと最適条件下で 255 mg/ml の (R)-CHBE が生成し、この時の収率は 91%、生成した (R)-CHBE の光学純度は 91% e.e. であった。また、GDH 遺伝子大量発現菌 *E. coli* JM109 (pGDA2) の菌体が市販 GDH と同様、に $NADP^+$ およびグルコースを基質として NADPH 再生系酵素として働くことを認め、不斉還元反応に供することが可能なことを示した。さらに、AR-cDNA と GDH 遺伝子を同時に発現させた大腸菌 *E. coli* JM109 (pKAR, pKKGDH) を上記の反応系に適用しても同等の結果が得られることを示した。

第3章では COBE を (S)-CHBE に不斉還元する微生物の探索を行い、*Candida magnoliae* を見いだした。さらに、本菌株より複数の COBE 還元酵素を精製・単離し、その諸性質を明らかにした。本菌の洗浄菌体と GDH あるいは上記の GDH 発

現大腸菌共存下でCOBEの還元反応を行うと、190 mg/mlの (S)-CHBEが生成した (モル収率, 95%; 光学純度, 99% e.e.)。また、本菌より上記還元反応に関与する還元酵素3種を電気泳動的に均一に精製し、その諸性質を明らかにした。それらのうちのひとつは、アミノ酸配列上、他の酸化還元酵素と有意な相同性を示さなかったが、他の2つはそれぞれ短鎖アルコール脱水素酵素/還元酵素ファミリーおよびアルド-ケトレダクターゼスーパーファミリーに属するタンパク質と相同性を示した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、酵素の持つ高い立体選択性に着目し、微生物の生産する有用酵素の探索、精製と諸性質の解明、光学活性アルコール生産への応用について検討を加えた結果をまとめたものであり、評価すべき主要な点は以下のとおりである。

1. 好気性細菌におけるスレオニンアルドラーゼ活性の分布を調べ、*A. jandaei* DK-39よりL-スレオニンやL-セリンに対して活性を示さない新規なスレオニンアルドラーゼ、L-アロスレオニンアルドラーゼ、を均一に精製した。また、*Arthrobacter* sp. DK-38よりPLP酵素でかつ、反応に2価金属を要求するユニークな性質を示すD-スレオニンアルドラーゼを均一に精製した。これらの結果は細菌のスレオニンアルドラーゼ類が多様な立体選択性を持つことを示すものである。
2. *S. salmonicolor*由来のAR-cDNAおよび*B. megaterium*由来のGDH遺伝子を組み込んだ大腸菌を用いてCOBEの不斉還元を行い、(R)-CHBEの高濃度生産が可能であることを示した。酵素法による不斉還元反応では補酵素の再生が問題となるが、本研究では酸化酵素と還元酵素を同一宿主内で発現させることにも成功し、この問題を解決している。
3. *C. magnoliae*がCOBEを立体選択的に還元して (S)-CHBEを与える能力が高いことを認め気本菌体を用いる (S)-CHBEの高濃度生産法を確立した。
4. *C. magnoliac*よりCOBEの還元に関与する3種の酵素を均一に精製し、諸性質を解明した。

以上のように、本論文は微生物の生産するカルボニル還元酵素の立体選択性、光学活性アルコール類の合成について基礎・応用両面にわたって多くの新しい知見を加えたものであり、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あるものと認める。なお、平成10年12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。