

微生物を用いたヒドロキシ
カルボン酸エステルの光学分割

中川 篤

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 植物代謝調節学講座

(新名 惇彦 教授)

平成19年12月25日提出

目次

略記	5
緒言	6
第一章 CHB を光学分割する微生物の単離	9
1-1 序論	9
1-2 実験材料および方法	11
1-2-1 実験試薬	11
1-2-2 培地	11
1-2-3 微生物のスクリーニング	11
1-2-4 単離微生物の反応性試験	11
1-2-5 微生物の同定	12
1-2-6 DS-S-75 株を用いた CHBM の光学分割反応	13
1-2-7 DS-S-51 株を用いた CHBM の光学分割反応	13
1-2-8 分析方法	13
1-3 結果	15
1-3-1 CHB 光学分割微生物のスクリーニング	15
1-3-2 単離微生物による CHB の光学分割反応	21
1-3-3 CHB 光学分割反応の検討(DS-S-75 株)	22
1-3-4 CHB 光学分割反応の検討(DS-S-51 株)	24
1-3-5 単離微生物の基質特異性	24
1-4 考察	26
第二章 組換え大腸菌を用いた CHB の光学分割	28
2-1 序論	28
2-2 実験材料および方法	29
2-2-1 実験試薬、酵素	29
2-2-2 使用大腸菌、プラスミド	29
2-2-3 大腸菌用培地	29

2-2-4	ゲノム DNA の調製	30
2-2-5	プラスミド DNA の少量調製	30
2-2-6	DNA の電気泳動および DNA 断片の回収	30
2-2-7	大腸菌の形質転換	31
2-2-8	塩基配列の決定	31
2-2-9	タンパク質の定量	32
2-2-10	SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)	32
2-2-11	アミノ酸配列の決定	33
2-2-12	酵素活性測定	33
2-2-13	DS-S-75 株由来酵素の精製	34
2-2-14	DS-S-75 株由来酵素遺伝子のクローニング	34
2-2-15	DS-S-75 株由来酵素遺伝子組換え大腸菌の作製	36
2-2-16	DS-S-51 株由来酵素遺伝子のクローニング	36
2-2-17	DS-S-51 株由来酵素遺伝子組換え大腸菌の作製	37
2-2-18	DS-S-51 株由来酵素遺伝子組換え大腸菌の解析	37
2-2-19	組換え大腸菌を用いた光学活性 CHBM、HL の生産検討	37
2-2-20	分析方法	38
2-3	結果	39
2-3-1	DS-S-75 株由来酵素の精製	39
2-3-2	DS-S-75 株由来酵素の性質	39
2-3-3	DS-S-75 株由来酵素遺伝子のクローニング	41
2-3-4	<i>EnHCH</i> 遺伝子の発現	44
2-3-5	組換え大腸菌を用いた(<i>R</i>)-CHBM、(<i>S</i>)-HL の生産検討	47
2-3-6	DS-S-51 株由来酵素遺伝子のクローニング	48
2-3-7	DS-S-51 株由来酵素遺伝子遺伝子の発現	49
2-3-8	組換え大腸菌を用いた(<i>S</i>)-CHBM、(<i>R</i>)-HL の生産検討	51
2-4	考察	54
第三章	組換え大腸菌を用いたその他カルボン酸エステルの光学分割	58
3-1	序論	58
3-2	実験材料および方法	60
3-2-1	実験試薬	60

3-2-2	THFM の合成	60
3-2-3	使用菌株	60
3-2-4	ヒドロキシカルボン酸エステルの光学分割反応	60
3-2-5	各光学活性体の回収、精製	60
3-2-6	分析方法	61
3-3	結果	62
3-3-1	ヒドロキシカルボン酸エステルの光学分割反応	62
3-3-2	光学活性ヒドロキシカルボン酸およびエステルの生産検討	64
3-4	考察	66
	総括	68
	謝辞	70
	参考文献	71

略記

BPB ; Bromophenol blue
BSA ; Bovine serum albumin
BTB ; Bromothymol blue
CBB ; Coomassie brilliant blue
CHB ; 4-Chloro-3-hydroxybutyrate
CHBE ; Ethyl 4-Chloro-3-hydroxybutyrate
CHBM ; Methyl 4-Chloro-3-hydroxybutyrate
c.p. ; Chemical purity
DMSO ; Dimethylsulfoxide
DNA ; Deoxyribonucleic acid
DTT ; Dithiothreitol
E. coli ; *Escherichia coli*
EDTA ; Ethylene-diamine-tetraacetic acid
EP ; Epichlorohydrin
GC ; Gas chromatography
2HBA ; 2-Hydroxybutyric acid
3HBA ; 3-Hydroxybutyric acid
3HBE ; Ethyl 3-hydroxybutyrate
2HBM ; Methyl 2-hydroxybutyrate
HL ; 3-Hydroxy- γ -butyrolactone
HPLC ; High performance liquid chromatography
IPTG ; Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
o.p. ; Optical purity
PCR ; Polymerase chain reaction
PIPES ; 1,4-Piperazinediethanesulfonic acid
PMSF ; Phenyl methyl sulfonyl fluoride
SDS ; Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE ; SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
16S rDNA ; 16S ribosomal deoxyribonucleic acid
THFA ; Tetrahydrofuran-2-carboxylic acid
THFM ; Methyl tetrahydrofuran-2-carboxylate
Tris ; Tris(hydroxymethyl)aminomethane

緒言

右手と左手や実像と鏡に映し出された虚像のように、対称であってお互いを重ね合わせることができない化合物（エナンチオマー）が存在し、それらは各々光学活性体と呼ばれ（旋光度によって(+)体と(-)体、または立体配置の表現法によって *R* 体と *S* 体や *D* 体と *L* 体等呼ばれる）、両エナンチオマー混合物であるラセミ体と区別される(Fig. 1)。4つの単結合の置換基がすべて異なる原子（不斉中心）を持つ化合物には光学活性体が存在し、各々の物理化学的性質は同じであるが、生理学的には全く異なる挙動を示すことが多いため、精密かつ安全性を重視する医薬品の原料を中心に利用されている。サリドマイドの悲劇は、催奇形性という重大な副作用が片方のエナンチオマーによって引き起こされた結果と言われている。薬効の発現は薬物分子と生体分子との間に起きる相互作用であり、生体内において薬効のない片方のエナンチオマーは異物として扱われるため、現在では不斉中心を有する新たな合成医薬品は例外を除いてすべて光学活性体である(キラル医薬品)。これらの合成には、中間体に分子量の比較的小さな光学活性体をキラルビルディングブロックとして利用する方法が効果的である。医薬品の市場は、全世界で約 60 兆円と言われており、そのうちキラル医薬品は約 40 兆円以上と見積もられている。キラル医薬品の需要は今後も増加し、それに伴い医薬中間体の市場規模の拡大が予想されており、2~4 兆円と見積もられている。医薬中間体の販売価格は化合物によって異なるが、ラセミ体は 1kg あたり、およそ 100~5000 円程度であるのに対し、光学活性体では 5000~100,000 円程度になり付加価値の高い化合物となる。



Fig.1 Model structure of chiral compound. The asterisks indicate asymmetric center.

光学活性体の製法にはアミノ酸、糖類およびキラルビルディングブロック等の別の光学活性体から誘導する方法（キラルプール法）の他、不斉中心のないプロキラル化合物から不斉反応によって得る方法（不斉合成法）、もしくはラセミ体を分割し

て得る方法（光学分割法）があり、これには不斉触媒による有機化学法、光学分離カラム、優先晶析、ジアステレオマーによる物理化学法、酵素反応や発酵生産等、生体触媒による生物化学法がある。特に生物化学法は、温和な条件下で反応することができるため、安全かつ環境に優しい光学分割方法であること、生物は光学活性体で構成されており、生体反応はキラル反応であるため、スクリーニングにより多様な反応を生体から見出すことができることから注目されている。

医薬品の開発において、研究案件のうち実用化まで至るのはごく僅かであり、キラルビルディングブロックとしては、汎用性の高い化合物が望まれる。本研究では3位にヒドロキシル基、末端にクロル基を有するカルボン酸エステルである4-Chloro-3-hydroxybutyrate (CHB) の光学活性体に着目した。光学活性CHBは反応性に優れた炭素数4のキラルビルディングブロックとなり、医薬、農薬や新素材へと展開できる点で重要な化合物である。例えば、(R)-CHBは4-Amino-3-hydroxybutyric acid (GABOB)¹⁻³(生理活性物質誘導)等に、(S)-CHBはHydroxymethylglutaryl-CoA(HMG-CoA) reductase inhibitor⁴(医薬中間体)等に、また、両光学活性体ともにCarnitine⁵⁻⁷(生理活性物質誘導体)、4-Hydroxypyrrrolidone⁸⁻¹⁰(抗生物質側鎖)および1,2,4-Butanetriol等の他の有用なキラルビルディングブロックの前駆体としても需要が多い(Fig. 2)。そこで、微生物の持つ多様な反応から安価で簡便な光学活性CHBの製法を新たに見出すことを目的として本研究を行なった。

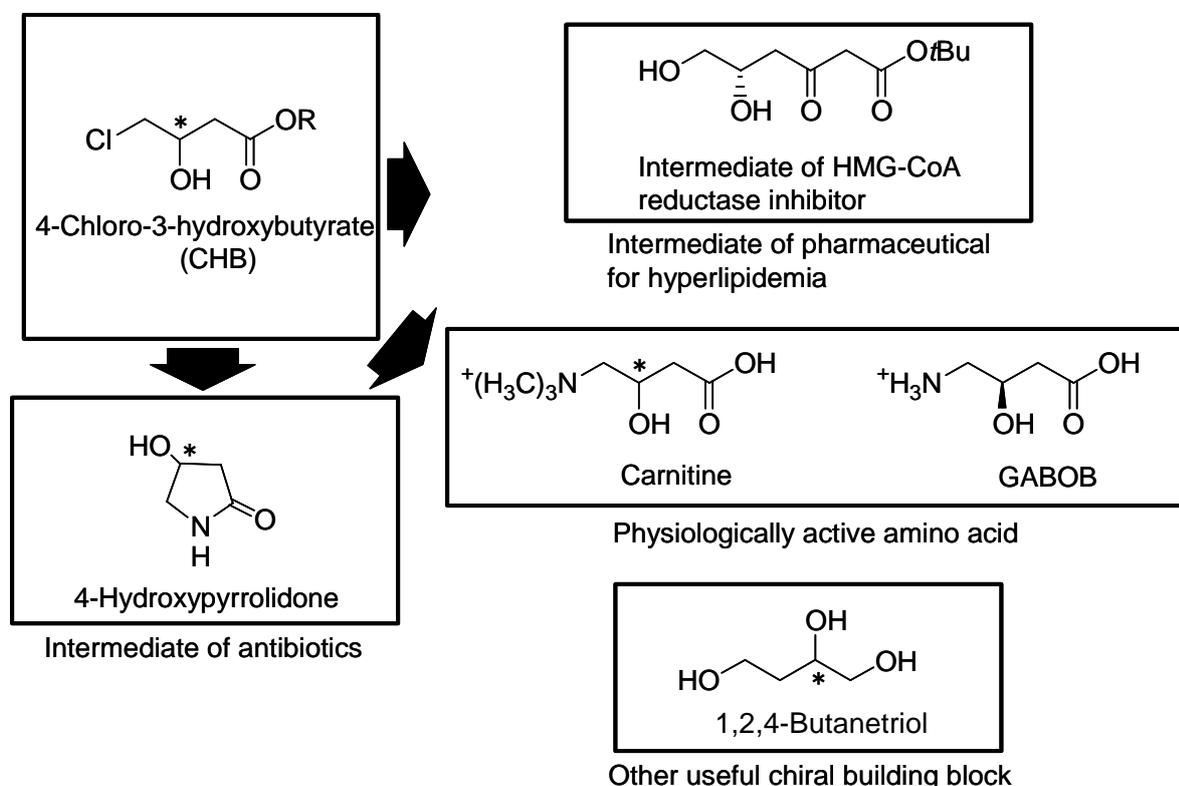


Fig. 2 Application of optically active CHB.

本論文は三章構成としており、第一章では、CHB を光学分割する微生物のスクリーニングを行ない、ラセミ体 CHB のうち一方の光学活性体を 3-Hydroxy- γ -butyrolactone に変換する優れた微生物 2 株(*Enterobacter* sp. DS-S-75 株、*Rhizobium* sp. DS-S-51 株)を単離した。中でも DS-S-75 株のユニークな作用機作、基質特異性、立体選択性、生産性（反応速度、反応基質濃度）の解析、および光学分割反応の条件検討について述べる。第二章では、DS-S-75 株由来の光学分割反応を担う酵素を解析した。また、生産性を向上させることを目的とし、2 株から各々の遺伝子クローニングを行ない、組換え大腸菌を用いた光学活性 CHB の生産検討についても述べる。第三章では、DS-S-75 株由来酵素の基質特異性を利用して、CHB 以外にも有用なキラルビルディングブロックとなる 2-Hydroxybutyrate、3-Hydroxybutyrate、Lactic ester および Tetrahydrofuran-2-carboxylic ester 等のカルボン酸エステルの光学分割の検討について述べる。

第一章 CHB を光学分割する微生物の単離

1-1 序論

本研究で着目する光学活性CHBはこれまでに多くの製法が報告されているが^{2,11-21)}、そのほとんどがケトエステル体である 4-Chloroacetoacetate (CAA)を基質とした不斉還元反応であり^{2,12-21)}、同反応において生物化学法と有機化学法^{2,16,17)}が競合している(Fig. 1-1)。生物化学法では、微生物由来のカルボニル還元酵素を用いた反応が報告されており、各酵素の立体選択性によってR体¹²⁻¹⁵⁾およびS体¹⁸⁻²¹⁾を生成できる。しかし、これらの反応は基質を還元させるための水素供与体としてNADHやNADPH等の補酵素が必要である。そこで各カルボニル還元酵素の遺伝子とグルコース、蟻酸、アルコール等を基質とする各種酸化酵素の遺伝子を組換え体で共発現させて補酵素の再生系を構築することにより利用しているが、二種類の遺伝子発現や酵素反応をコントロールしなければならないため、反応の最適化が難しいこと、補酵素を酸化するための基質が別途必要であることが懸念される。また、カルボニル還元酵素の中には、宿主が産生しない補酵素を要求する場合は高価になる。一方、有機化学法ではBINAP触媒による反応が報告されているが、本基質に対しては立体選択性が低いことから光学純度が低い課題がある。これらの不斉還元反応は不斉中心のないプロキラルなCAAを基質としているため、理論的には全てを光学活性CHBに変換することが可能であるが、未反応のCAAが残存するとCHBとCAAの化学的性質が比較的類似しているため、両化合物を分離することが容易ではない。さらにCAAは高価であり、これらの背景から安価で容易な反応により高光学純度のCHBを得る方法が望まれていた。

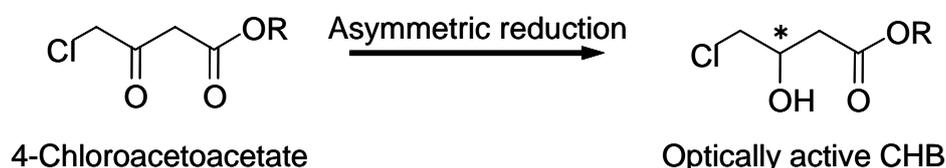


Fig. 1-1 Method of optically active CHB by asymmetric reduction from 4-Chloroacetoacetate. This reaction is traditional one. The keto-ester is used as the prochiral substrate. The carbonyl reductases from various microorganisms or asymmetrical catalyst are used in asymmetric reduction. The chemical and biocatalytic methods are competing.

一方、不斉中心を持つ化合物において、ラセミ体は(+体と(-)体(*R*体と*S*体)のエナンチオマーが混合した化合物であり、これを基質として一方のエナンチオマーに対して優先的に反応する点を利用し、残存する基質(エナンチオマー)または生成物を光学活性体として得る方法が一般的に多く知られている(速度論的光学分割方法)。この場合、理論的に光学活性体の収率は最大でも50%であるが、ラセミ体が光学活性体に比べて安価であれば有効な手段となる。CHBのラセミ体(*R,S*-CHB)は、例えばPropyleneを原料とするポリマー原料のEpichlorohydrin(EP)から有機化学法により4-Chloro-3-hydroxybutyronitrile²²⁾経由、もしくはコバルト触媒を用いて直接的に合成することが可能であり²³⁾、安価に入手できる。また、基質と生成物の化学的性質が異なれば、光学分割反応後に分液、蒸留や晶析等の化学的手法を用いた分離精製が容易である(Fig. 1-2)。これまでも(*R,S*)-ヒドロキシカルボン酸エステルに対し立体選択性を示す *Bacillus thermocatenulatus*、*Ophthiostoma piliferum*、*Pseudomonas fluorescens*、*Streptomyces diastatochromogenes*由来のエステラーゼ、リパーゼが報告されているが²⁴⁾、高い立体選択性を示し、高光学純度なCHBを得る方法は報告されていない。

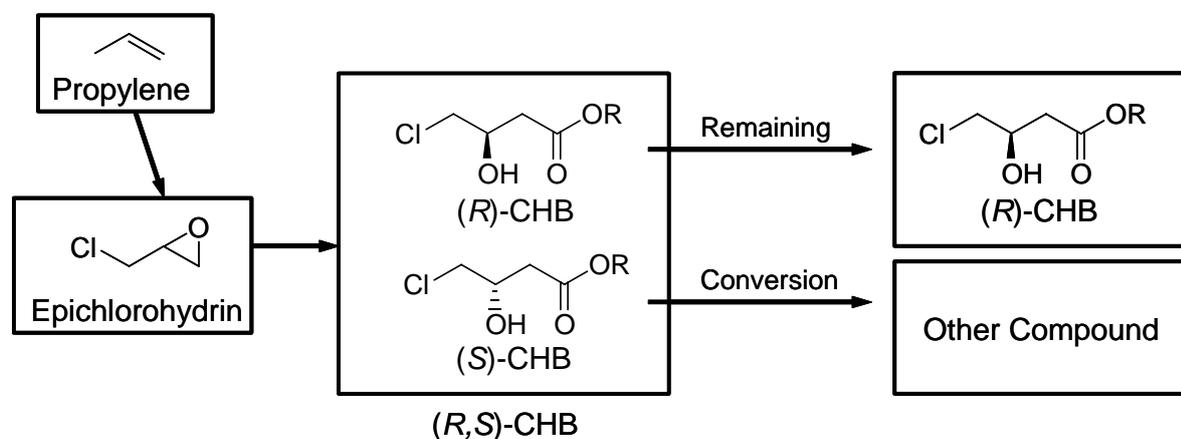


Fig. 1-2 Resolution strategy of (*R,S*)-CHB. One enantiomer of racemate remains and another one is converted to other compound. (*R,S*)-CHB is synthesized from propylene via epichlorohydrin.

そこで本章では、(*R,S*)-CHB に対して高い立体選択性を示し、一方のエナンチオマーを優先的に他の化合物に変換する微生物を土壌よりスクリーニングした。脱ク

ロル化反応、もしくは加水分解反応を指標に行なえば、簡便な反応によって変換された生成物の化学的性質が大きく異なることが期待できる。中でも、効率よくスクリーニングを行なうために、脱クロル化反応による pH 指示薬の呈色の変化を指標にした。その結果、(*R,S*)-CHB の一方のエナンチオマーを 99% e.e. 以上の高光学純度で残存させ、もう一方を 3-Hydroxy- γ -butyrolactone (HL) に変換する有用な菌株を見出したので、これらの解析および (*R,S*)-CHB の光学分割反応を検討した。

1-2 実験材料および方法

1-2-1 実験試薬

CHBの各エステルは、EPから合成した²²⁾。その他の試薬は特に指定のない限り、和光純薬工業(株)、東京化成工業(株)、シグマアルドリッチ(株)製のものを用いた。

1-2-2 培地

a) 選択培地： Pepton 10 g/l、Yeast extract 10 g/l、Ethyl 4-chloro-3-hydroxybutyrate (CHBE) 5 ml/l、Bromothymol blue (BTB) 80 mg/l、(pH 6.8)
平板培地には 15 g/l の精製寒天を加えた。CHBE は、ラセミ体または光学活性体のいずれかを使用した。

b) 栄養培地 A： Pepton 10 g/l、Yeast extract 10 g/l、Glycerol 10 g/l、(pH 6.8)

1-2-3 微生物のスクリーニング

採取した土壌試料を滅菌水に懸濁し、その上澄みをラセミ体 CHBE を含む選択平板培地に塗布した。30°Cにてインキュベート後、CHBE の脱クロル化により BTB を含む培地において、周辺が緑色から黄色に変色しているコロニーを拾い、さらにこれらを各光学活性 CHBE を含む選択培地にて 30°Cで培養し、一方の光学活性 CHBE に対してのみ黄色に変色する菌株を取得した。

1-2-4 単離微生物の反応性試験

1-2-4-1 洗浄菌体(湿菌体)の調製

500 ml 容のバツフル付き三角フラスコに 100 ml の栄養培地 A を調製し、凍結保存バイアルから 1 ml を無菌的に植菌し、ロータリーシェイカーを用いて 30°C、130 rpm にて 20 hr 培養した。遠心分離(26,000 g, 20 min, 4°C)により集菌し、菌体を 20 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.2)で 2 回洗浄し、湿菌体を得た。

1-2-4-2 菌体反応

DS-S-75 株については、同様の三角フラスコに 1% CaCO₃を含む 20 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.2) 100 mlを調製し、湿菌体 1 gおよび各基質を最終濃度 2%になるように加え、ロータリーシェイカーを用いて 130 rpm、30°Cにて 24 hr反応させた。DS-S-51 株については、300 ml容のバツフル付き三角フラスコに 60 mlのPotassium

phosphate buffer、1% CaCO₃、湿菌体 5 gおよび 1%基質とした以外はDS-S-75 株と同様に行なった。反応後、遠心分離(26,000 g, 20 min, 4°C)により除菌を行ない、上清をガスクロマトグラフィー(GC)により分析し、残存した基質と生成物について濃度と光学純度の分析を行なった。

1-2-5 微生物の同定

1-2-5-1 形態学的、生理学的試験

駒形らの一般的な形態学的、生理学的試験²⁵⁾を行なった。顕微鏡観察、グラム染色、鞭毛染色、インドールの生産、カタラーゼ活性、チトクロームオキシダーゼ活性、オキシダーゼ活性、VPテスト、種々の糖に対する資化性テストを行なった。得られた形態学的、生理学的試験結果についてCowan and Steel's manual²⁶⁾および Bergey's manual of systematic bacteriology²⁷⁾を参照し、同定を行なった。

1-2-5-2 ゲノム DNA の調製

1-2-4-1 で調製した DS-S-75 株または DS-S-51 株の培養液 1.5 ml を微小遠心チューブに入れ、遠心分離(6000 rpm, 3 min, 4°C)により集菌した。培地を完全に除去後、この菌体を 490 μ l の TE buffer に懸濁し、10% SDS を 30 μ l、2% Proteinase K を 50 μ l 加え、50°C で 1 hr 反応させた。次に、中性 Tris 飽和フェノールを 300 μ l、4%(v/v) のイソアミルアルコールを含むクロロホルム溶液を 300 μ l 加えて静かに攪拌後、水層のフェノール/クロロホルム溶液(1/1)処理を中間層のタンパク質がなくなるまで行なった。取り出した水層の 0.1 倍量の 3M 酢酸ナトリウム(pH 5.2) を加え、0.6 倍量の 2-プロパノールを静かに重層した。ガラス棒を用いて静かに攪拌し、界面に生じるゲノム DNA を巻きつけて集めた。70%エタノールで洗浄し、目的濃度になるように TE buffer に溶解した。

TE buffer : 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA(pH 8.0)

1-2-5-3 16S rDNA 解析

ゲノムDNAを抽出し、これを鋳型としてPCRにより得られた 16S rRNA遺伝子(16S rDNA)の増幅断片の塩基配列を決定した。ゲノムDNAの抽出にはInstaGene Matrix(BIO RAD(株)社製)を使用、PCRにはMicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit(アプライドバイオシステムズ(株)製)を使用、サイクルシーケンシングにはMicroSeq 500 16SrDNA Bacterial Identification Sequencing Kitを使用した。DNAシーケンサーはABI PRISM 3100 DNA Sequencer(アプライドバイオシステム

ズ(株)製)を使用した。得られた 16S rDNAの塩基配列データを用いてデータベース GenBank/DDBJ/EMBLより相同性検索を行ない、CLUSTAL W²⁸⁾、MEGA ver3.1²⁹⁾ソフトウェアを用いて分子系統解析を行なった。

1-2-6 DS-S-75 株を用いた CHBM の光学分割反応

1-2-6-1 培養液の調製

5 L 容ジャーファーマンター (三ツワ理化学工業(株)製 KMJ-5B) に 3 L の栄養培地 A を調製して攪拌数 500 rpm、通気量 1.5 L / min、30°Cにて培養した。種培養液には 1-2-4-1 と同様に培養した 60 ml の培養液を使用した。

1-2-6-2 洗浄菌体による光学分割反応

培養後 1-2-4-1 と同様に洗浄菌体を調製した。20 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.2) 2.5 Lを調製し、湿菌体 158.6 gおよび最終濃度 8%(524 mM)になるようにCHBMを加え、攪拌数 150 rpm、30°Cにて反応させた。反応中は 25%(w/w) NaOHにてpH6.7に制御した。反応後、遠心分離(26,000 g, 20 min, 4°C)により除菌し、上清のCHBM、HLの濃度および光学純度をGCにより分析した。また、必要によりクロロイオンを定量した³⁰⁾。

1-2-6-3 培養液を用いた CHBM の光学分割反応および中和剤の検討

1-2-6-1 の方法と同様に調製した DS-S-75 株の培養液に目的濃度になるように CHBM を加え、攪拌数 500 rpm、30°Cにて反応させた。反応中は各種アルカリにて pH を制御した。反応後、1-2-6-2 と同様に CHBM、HL 濃度および光学純度を分析した。

1-2-7 DS-S-51 株を用いた CHBM の光学分割反応

pH 制御に 25%(w/w) NaOH を使用した以外は、1-2-6-3 と同様に培養液に直接 CHBM を添加する方法で行なった。

1-2-8 分析方法

各化合物の濃度および光学純度を GC ((株)島津製作所製 GC14A または(株)日立製作所製 G-3000) により分析した。濃度分析には、PEG-20M-HP ;5%, 60/80 メッシュ(ジーエルサイエンス(株)製)パックドカラム(内径 3.2 mm 、長さ 1 m)を使用し、除菌した試料を 1 μ l 注入して解析した。CHB、HL の反応液についてはカラム温度; 180°C、気化室温度; 240°C、検出器温度; 240°C、キャリアーガス; 窒素、流速; 50 ml/min

検出器; FID。Ethyl 3-hydroxybutyrate(3HBE)、Methyl 2-hydroxybutyrate (2HBM)の反応液については除菌した試料をリン酸にて pH4.0 に調整後 1 μ l 注入して解析した。カラム温度は 150°Cから 200°Cまで毎分 5°C昇温させた以外の分析条件は CHB、HL と同様に行なった。

光学純度分析にはCHIRALDEX G-TA(アステック社製)キャピラリーカラム(内径 0.25 mm 、長さ 30 m) を使用した。カラム温度; 110°C、気化室温度; 150°C、検出器温度; 150°C、キャリアーガス; 窒素、流速; 0.5 ml/minスプリット比 1:100、検出器; FID。CHBについては除菌した試料を 1 μ l 注入して解析した。HLについては除菌した試料を減圧濃縮後、適当量の酢酸エチルで抽出した。その濃縮物の 20 μ l を 1 ml のジクロロメタンに溶解し、200 μ l の無水トリフルオロ酢酸によりトリフルオロ化し、エタノール 1 ml で置換したものを 1 μ l 注入して解析した。3HBE、2HBMについて分析条件はカラム温度を 90°Cで行なった以外はHLと同様の分析前処理、分析条件にて行なった。生成した 3-Hydroxybutyric acid (3HBA)、2-Hydroxybutyric acid (2HBA)については、酢酸エチル抽出後の水層を減圧濃縮後、エタノール、MgSO₄を適当量加え、減圧濃縮物 50 mgに*N,N*-Dimethyl- 4-aminopyridine(DMAP) 122 mg、ジクロロメタン 10 ml、塩酸飽和エタノール 100 μ l、1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC \cdot HCl)115 mgを加えて攪拌し、エチルエステルとして 3HBE、2HBMと同様に分析した。

1-3 結果

1-3-1 CHB 光学分割微生物のスクリーニング

西日本各地の化学工場内の約 200 地点の土壌試料からスクリーニングした結果、BTB を含む選択寒天培地にて CHBE を脱クロル化することで、コロニー周辺が黄色に呈色する菌株を見出した(Fig. 1-3A)。そのほとんどで立体選択性を示さなかったが、CHBE の一方のエナンチオマーを立体選択的に分解する菌株を 6 株単離した(Fig. 1-3B)。これらを培養し、洗浄した試料を(*R,S*)-CHBE に反応させた結果、いずれも脱クロル化反応を伴いながら、5 株は 3-Hydroxy- γ -butyrolactone (HL)へ変換、1 株は Ethyl 3,4-dihydroxybutyrate へ変換した(Table 1-1)。その中でも特に DS-S-75 株は収率 48%で(*R*)-CHBE を、DS-S-51 株は収率 31%で(*S*)-CHBE を各々光学純度 99% e.e.以上で残存した。両菌株について形態学的、生理学的解析および 16S rDNA による分子系統解析を行なった結果、DS-S-75 株は *Enterobacter* sp.、DS-S-51 株は *Rhizobium* sp. と同定した(1-4 考察参照)。各同定試験結果を Table 1-2、Fig. 1-4 に示す。

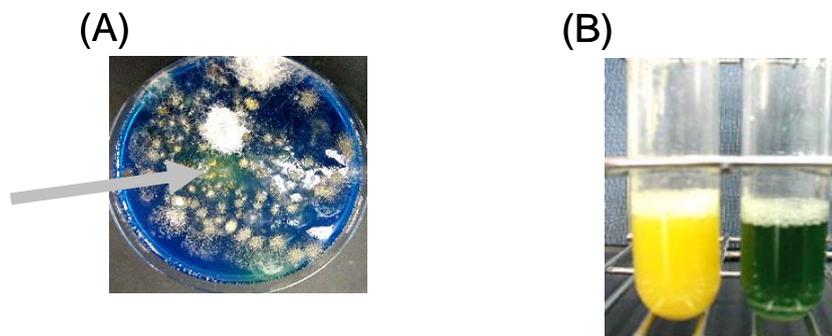
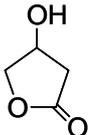
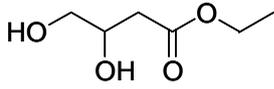


Fig. 1-3 Screening assay for microorganism converting CHB. (A) First screening from soil samples. An arrow indicates positive colony. (B) Second screening for enantioselectivity. The BTB turned to yellow by positive microorganism dechlorinating one enantiomer.

Table 1-1 Reactivity of the isolated microorganisms toward CHBE.

Strain	Substrate (CHBE)		Product
	Residual ratio(%)	Optical purity (%ee)	
DS-S-75	48	99.5(<i>R</i>)	
DS-S-51	31	99.0(<i>S</i>)	
DS-S-13	59	72.5(<i>R</i>)	
DS-K-NR818	40	98.5(<i>R</i>)	3-Hydroxy- γ -butyrolactone(HL)
DS-ID-819	43	91.9(<i>S</i>)	

OS-K-29	56	56.0(<i>S</i>)	 Ethyl 3,4-dihydroxybutyrate

Residual ratio is indicated to be 100 % at initial time. Conversion ratio is shown by mol %. Optical purity is calculated from quantity of each enantiomer using formula: $|R-S| / (R+S) \times 100$.

Table 1-2 Morphological, cultural and physiological properties of the isolated microorganisms.

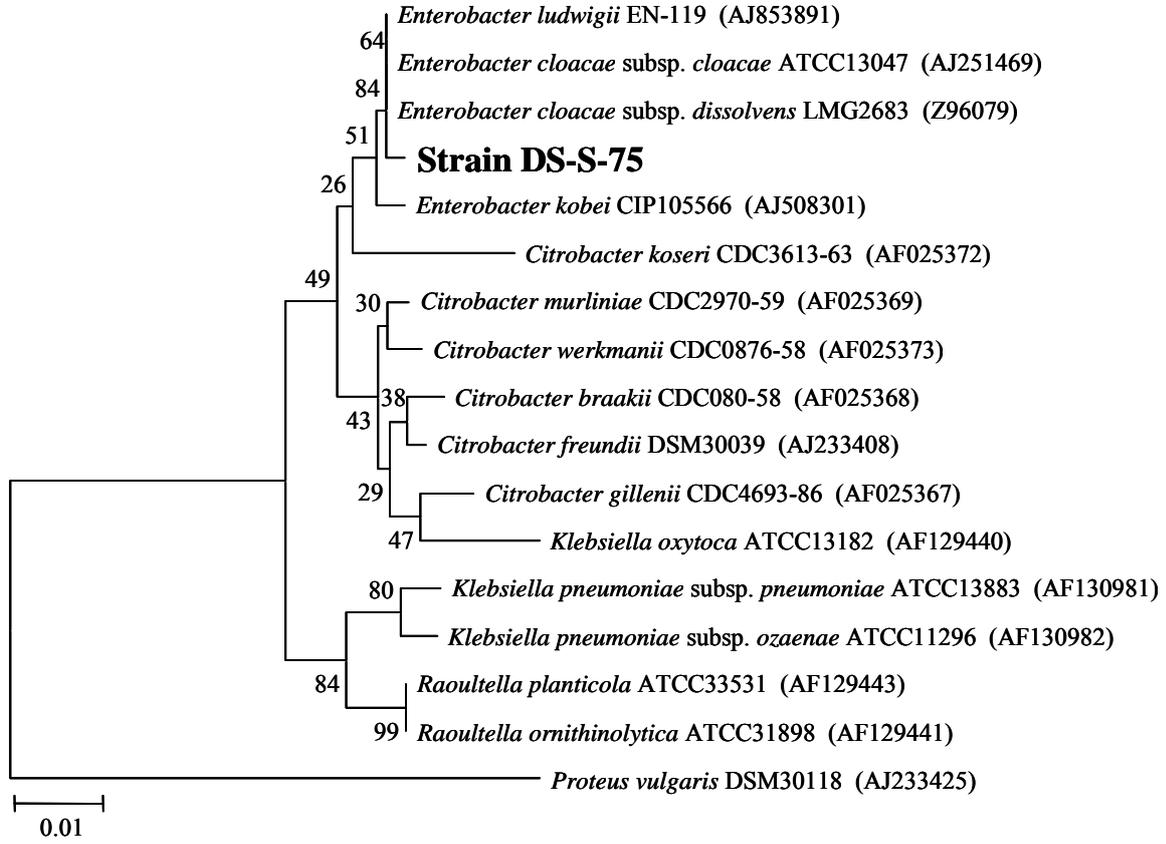
(A) Strain DS-S-75

Morphology	Rod	Production of citric acid	+
Length	1.5-2.8 mm	Hydrolysis of starch	-
Width	0.6-0.8 mm	Liquification of gelatin	-
Pigmentation	-	Methyl red test	-
Flagella	Peripheral flagella	V-P test	+
Motility	+	Reduction of nitrate	+
Gram stain	-	Denitrification	+
Endspores formed	-	Deoxyribonuclease	-
Indole production	+	NPTase	+
Catalase	+	O-F test	Fermentative
Urease	-	D-Glucose, acid	+
Oxidase	+	D-Glucose, gas	+
Lysine decarboxylase	-		

(B) Strain DS-S-51

Morphology	Rod	β -Galactosidase	+
Length	1.5-2.0 mm	Cytochrome oxidase	+
Width	0.6-0.7 mm	Liquification of gelatin	-
Motility	+	Reduction of nitrate	+
Gram stain	-	Fermentation of L-Arabinose	+
Endspores formed	-	Fermentation of D-mannose	+
Indole production	+	Fermentation of D-mannitol	+
Catalase	+	Fermentation of maltose	+
Urease	+	O-F test	Oxidative
Oxidase	+	D-Glucose, acid	-
Arginine dihydrolase	-	D-Glucose, gas	-

(A)



(B)

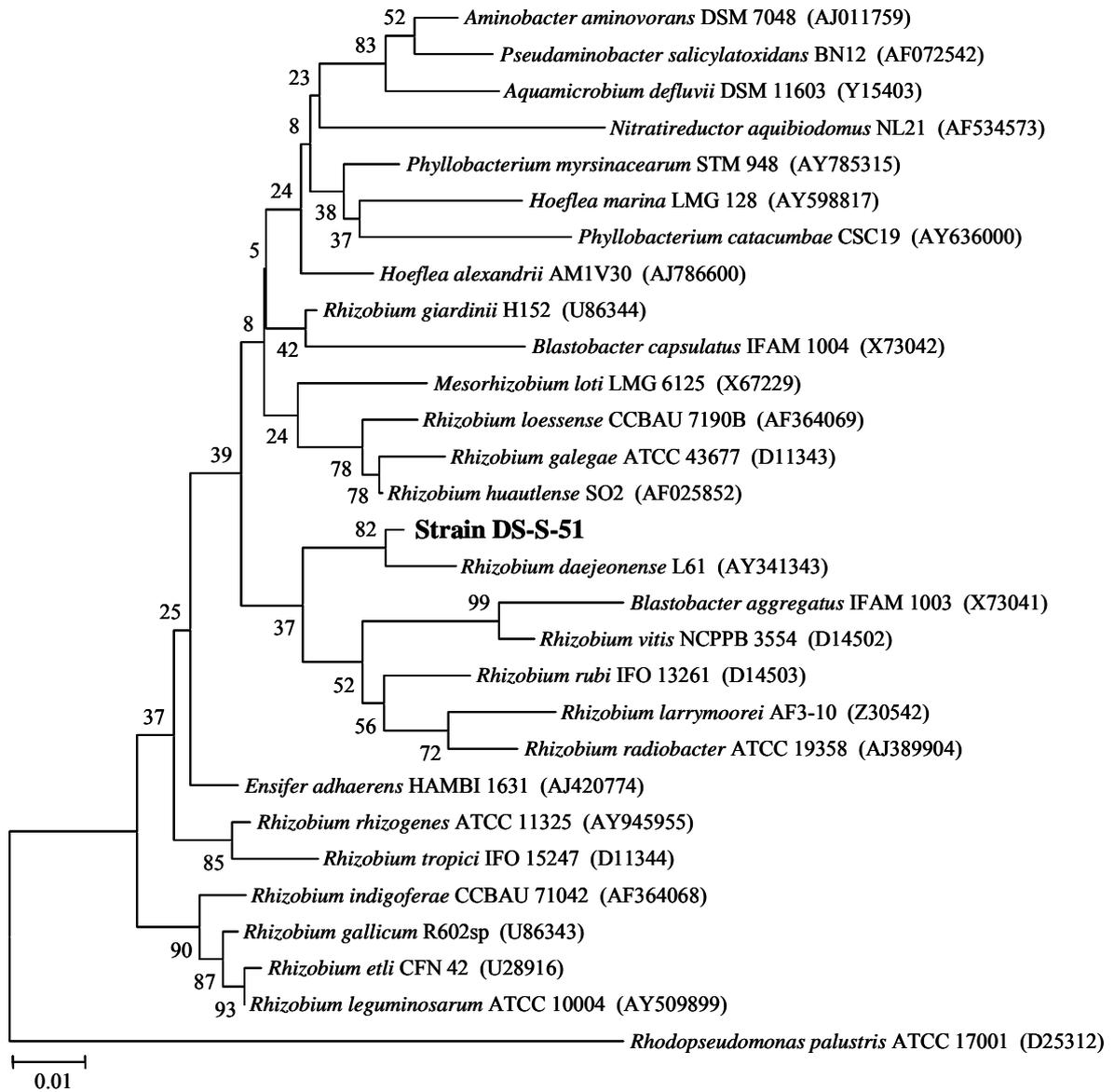


Fig. 1-4 Neighbor-joining trees based on the 16S rDNA sequence. (A) Strain DS-S-75. (B) Strain DS-S-51. Inferred phylogenetic relationships of the strain DS-S-75 or the strain DS-S-51 and other type strains are indicated. The number at each node is the bootstrap value. The scale bar represents 1% sequence divergence. The accession number of database sequence is given in parentheses.

1-3-2 単離微生物による各 CHB に対する反応性

Enterobacter sp. DS-S-75 株および *Rhizobium* sp. DS-S-51 株について、(R,S)-CHB の各エステル(メチル、エチル、イソプロピル、プロピル、ブチル)に対する反応性を洗浄菌体を用いて確認した。その結果、DS-S-75 株は各エステルに対して高い立体選択性を示し、(R)-CHB が高い残存率、光学純度で得られた。一方、DS-S-51 株は DS-S-75 株と比較すると、比活性、(S)-CHB の残存率は低い、光学純度は同等に高い値で得られた。しかしイソプロピルエステルには立体選択性がほとんど無く、生成物の(R)-HL の光学純度も低かった(Table 1-3)。両菌株とも Methyl CHB(CHBM) に対しては比較的比活性および立体選択性が高いこと、および CHBM が安価であることから、以降の基質ラセミ体として使用した。

また、両菌株の温度安定性を調べた。洗浄菌体を 5~50°C で 4 hr インキュベートし、その後 30°C で (R,S)-CHBM を基質として反応させた結果、両菌株とも 30°C まで安定であった(Fig. 1-5)。そこで、温度安定性および CHB の pH 安定性を考慮して、30°C、pH6.9-7.2 で反応を行なうことにした。

Table 1-3 Converting activities and enantioselectivities for some CHBs by resting cell.

Substrate	Specific activity (mU/mg of wet cell)	Substrate (CHB)		Product (HL)	
		Residual ratio (%)	Optical purity (%ee)	Conversion ratio (mol%)	Optical purity (%ee)
<i>Enterobacter</i> sp. DS-S-75					
Methyl CHB	19.5	48.0	99.5(R)	48.0	95.9(S)
Ethyl CHB	18.0	42.7	99.8(R)	45.1	92.4(S)
<i>i</i> -Propyl CHB	17.1	50.0	99.4(R)	47.5	96.8(S)
Propyl CHB	16.3	49.6	96.6(R)	47.0	96.6(S)
Butyl CHB	13.9	48.9	99.7(R)	47.1	96.7(S)

<i>Rhizobium</i> sp. DS-S-51					
Methyl CHB	0.868	30.9	99.0(S)	65.0	53.2(R)
Ethyl CHB	0.877	30.5	99.1(S)	65.6	52.1(R)
<i>i</i> -Propyl CHB	0.470	5.95	98.0(S)	90.0	8.60(R)
Propyl CHB	0.332	30.0	99.0(S)	66.2	51.5(R)
Butyl CHB	0.556	31.0	99.1(S)	64.8	52.7(R)

One unit of activity is defined as releasing 1 μ mol chloride ion for 1 min from CHB. Residual ratio is indicated to be 100 % at initial time. Conversion ratio is shown by mol %. Optical purity is calculated from quantity of each enantiomer using formula: $|R-S| / (R+S) \times 100$.

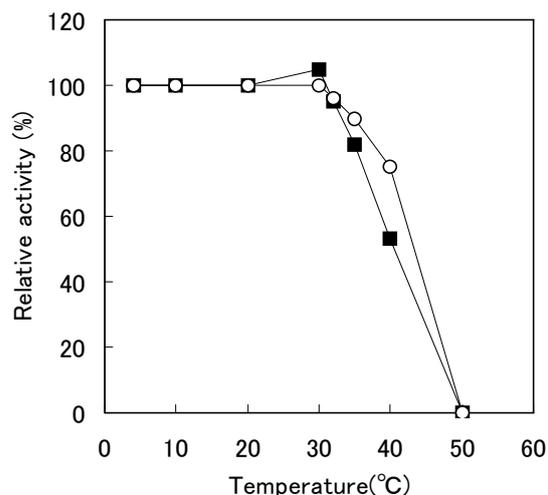


Fig. 1-5 Temperature stability. Strain DS-S-75, ■; strain DS-S-51, ○. The activity was measured by amount of releasing chloride ion after incubation of resting cells for 4 hours at various temperatures. The relative activity shows that the activity of each strain under 4°C is taken to be 100%.

1-3-3 CHB 光学分割反応の検討(DS-S-75 株)

DS-S-75 株を用いて光学分割反応を検討した。3 L の培養液にて調製した洗浄菌体に最終濃度 8%になるように(*R,S*)-CHBM を加え、2.5 L スケールにて 30°C で反応させた。脱クロル化反応の進行に伴って pH が低下するため、25%(w/w) NaOH を加えることにより pH を調整した。Fig. 1-6 のように溶存酸素計、濁度計、pH 計を装着し、コンピューターを通じて自動滴定、また適量の記録ができるように構築した。その結果、反応の進行に伴って CHBM の濃度が低下、HL、クロルイオン、メタノール濃度が増加し、CHBM の光学純度が増加した(Fig. 1-7)。

また、3 L の培養液に (*R,S*)-CHBM を直接加えて反応を行なった結果、40 時間で (*R*)-CHBM は収率 48%、光学純度 99.1% e.e.、(*S*)-HL は収率 48%、光学純度 90.1% e.e. で得られた。HL の光学純度は、中和剤として炭酸カルシウムを用いた 1-3-2 の実験時よりも低かった(Table 1-3)。そこで最適な中和剤を選ぶために、2.5 L スケールにて各種中和剤を検討した。その結果、 K_2CO_3 、 Na_2CO_3 、 $(NH_4)_2CO_3$ 、 $CaCO_3$ 等の弱塩基を用いると (*S*)-HL の光学純度が上昇し、特にアンモニア水を用いると (*S*)-HL の光学純度は 95.1% e.e.、E 値は 300 であった(Table 1-4)。

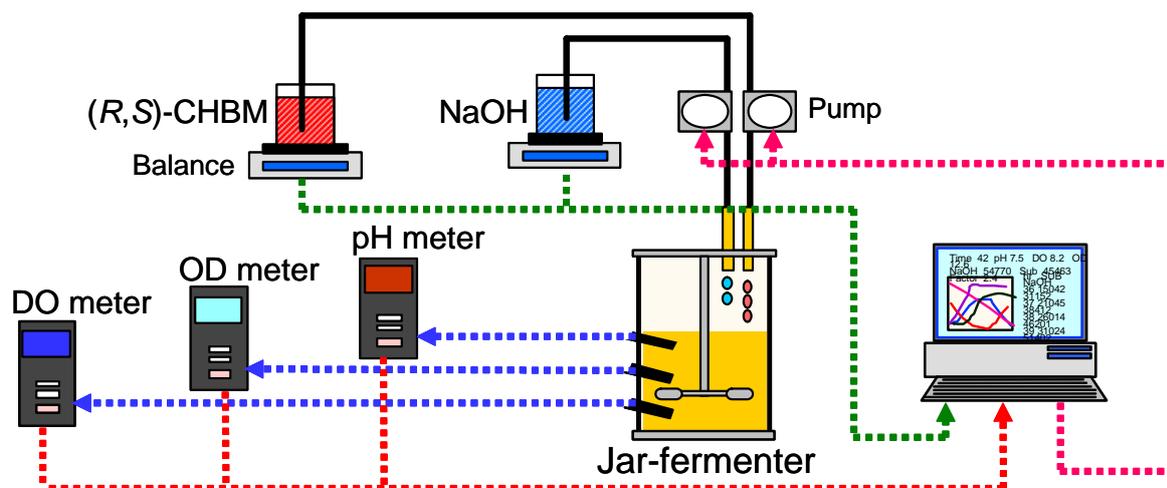


Fig. 1-6 Construction of reaction system for CHBM resolution. The dotted arrows indicate out put signals.

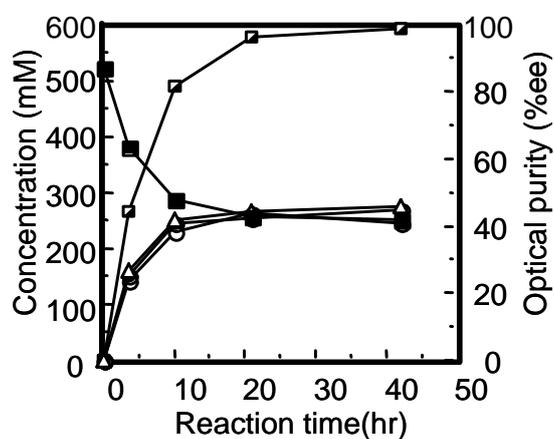


Fig. 1-7 Resolution of (R,S)-CHBM using the resting cells of the strain DS-S-75. Residual CHBM, ■; formed HL, ○; chloride ion, ●; methanol, △; optical purity of residual CHBM, ▴.

Table 1-4 Effect of various bases for titration.

Base	Optical Purity(%e.e.)		E Value
	(R)-CHBM	(S)-HL	
25%(w/w) NaOH	99.1	90.1	102.4
10%(w/w) K ₂ CO ₃	98.3	95.5	207.1
10%(w/w) Na ₂ CO ₃	98.6	95.5	215.3
10%(w/w) (NH ₄) ₂ CO ₃	98.1	95.6	207.2
5%(w/w) CaCO ₃	98.1	95.1	185.4
7%(w/w) NH ₄ OH	99.9	95.1	300.0

Optical purity is calculated from quantity of each enantiomer using formula: $|R-S| / (R+S) \times 100$. E value is calculated from optical purity of substrate (CHB; eeS) and product (HL; eeP) using the formula: $\text{Ln}[(1-eeS) \times (eeP/(eeS+eeP))] / \text{Ln}[(1+eeS) \times (eeP/(eeS+eeP))]$.

1-3-4 CHB 光学分割反応の検討(DS-S-51 株)

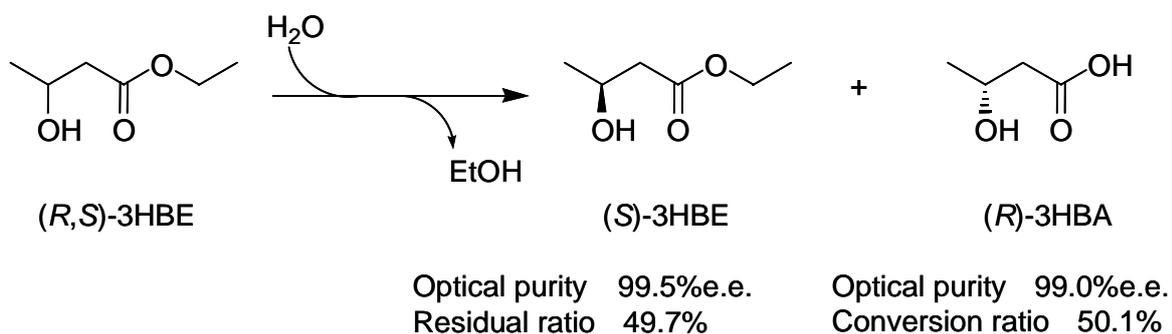
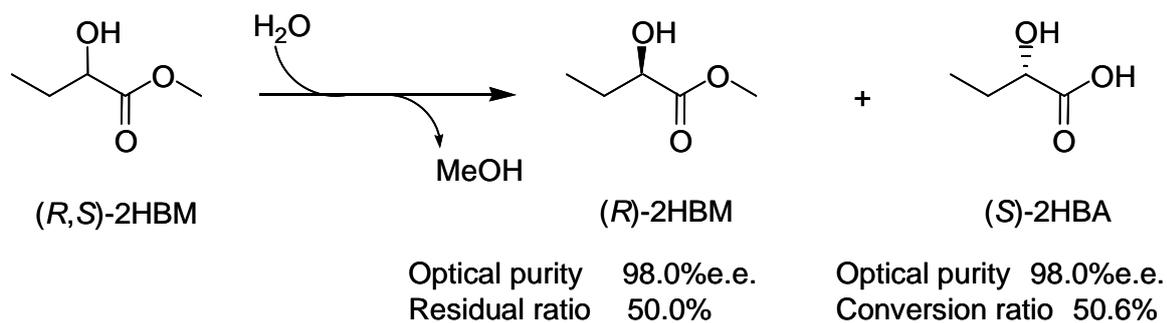
DS-S-51 株について、DS-S-75 株と同様に 2.5 L スケールで光学分割反応を検討した。最終濃度 1% で反応し、反応 40 時間で (S)-CHBM は収率 30.9%、光学純度 99.2% e.e.、(R)-HL は収率 65%、光学純度 53.0% e.e.、E 値は 16.1 であった。HL の光学純度は、中和剤を変えても向上しなかった。

1-3-5 単離微生物の基質特異性

DS-S-75 株および DS-S-51 株の基質特異性を解析するために、洗浄菌体を用いて各種エステル、アルコール、クロル化合物に対する反応性を調べた。その結果、DS-S-75 株は (R,S)-3HBE に対して S 体を残存させ、R 体を加水分解反応によりカルボン酸の 3HBA に変換した。(R,S)-2HBM に対しては、R 体を残存させ、S 体を 2HBA に変換した(Fig. 1-8(A))。各エステルおよびカルボン酸ともに光学純度 98% e.e. 以上で光学分割することができた。一方、DS-S-51 株は 3HBE、2HBM に対して反応性を示さなかった。

また、両菌株とも 4-Chloro-3-hydroxybutyronitrile、3-Chloro-1,2-propanediol、2,3-Dichloro-1-propanol、1,3-Dichloro-2-propanol、Chloroacetone、 α -Chloropropionic acid、 β -Chloropropionic acid および EP に対して反応性を示さなかった(Fig. 1-8(B))。

(A)



(B)

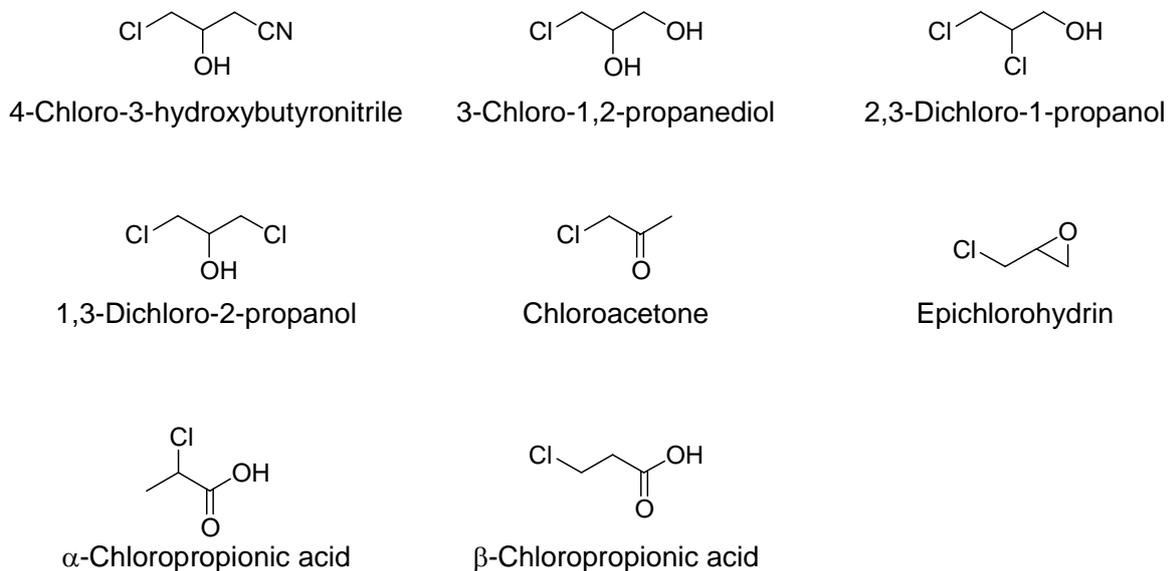


Fig. 1-8 Tested compounds for analysis of substrate specificity of the strain DS-S-75 and DS-S-51. (A) Compounds that the strain DS-S-75 shows activity. Both esters were stereoselectively converted to carboxylic acids. The strain DS-S-51 showed no activity toward them. (B) Compounds that both strain shows no activity.

1-4 考察

土壌から単離した2菌株(*Enterobacter* sp. DS-S-75株、*Rhizobium* sp. DS-S-51株)は、各々高光学純度でCHBのR体またはS体を残存させ、HLへと変換した。DS-S-75株の形態学的、生理学的解析を行なった結果、グラム陰性桿菌、周鞭毛および糖質の資化性から*Enterobacter* sp.であることが推定された。16S rDNAの塩基配列解析の結果、*Enterobacter cloacae*、*Enterobacter dissolvens* および *Enterobacter ludwigii* と99%以上の高い相同性を示し、分子系統樹上で系統枝を形成した。しかし、塩基配列は完全に一致していないため、詳細な帰属分類群の推定には至らず、形態学的、生理学的解析の結果と合わせてDS-S-75株は*Enterobacter* sp.と同定した。一方、DS-S-51株の形態学的、生理学的解析の結果、*Rhizobium radiobacter* に類似の性状を示したが、*N*-Acetyl-D-Glucosamine、Potassium gluconateの資化性試験結果で異なった。16S rDNAの塩基配列解析の結果、*Rhizobium* sp.に属する細菌と高い相同性を示した。さらに16S rDNAの塩基配列は相同性98.9%で*Rhizobium daejeonense* に対し最も高い相同性を示し、分子系統樹上で系統枝を形成した。しかし、塩基配列は完全に一致していないため、詳細な帰属分類群の推定には至らず、形態学的、生理学的解析の結果と合わせてDS-S-51株は*Rhizobium* sp.と同定した。

ジャーファーメンターを用いた洗浄菌体での光学分割反応において、CHBM濃度の低下に伴って、クロロイオン、メタノール、HL濃度が増加した。この結果から、CHBを基質として脱クロル化反応、加水分解反応を伴って、ラクトンを生成させる反応が菌体により行なわれていることが示唆された。4-Chloro-3-hydroxybutyronitrile、2,3-Dichloro-1-propanol、3-Chloro-1,2-propanediolのようなクロルアルコール、およびChloroacetone、 α -Chloropropionic acid、 β -Chloropropionic acid、Epichlorohydrinのようなクロル酸に対して脱クロル化活性を示さず、CHBに対してのみ脱クロル化活性を示し、これまで報告されている脱ハロゲン化酵素³¹⁻³⁵⁾とは異なった基質特異性であった。また、本反応はCHBからHLを生成することから、これまでに報告されているヒドロキシエステル-ヒドロキシル基とエステル-分子間エステル交換反応³⁶⁻³⁹⁾とは異なり、クロル基とカルボン酸エステルの分子内反応であることが示唆された。さらにCHBの各エナンチオマーを識別できる能力(立体選択性)を有しており、以上のことからDS-S-75株およびDS-S-51株は非常にユニークな反応を示す菌株であった。

特にDS-S-75株は反応速度、基質濃度、立体選択性ともに優れており、中和剤に弱塩基を用いると(S)-HLも95% e.e.以上の光学純度で得ることができた。中でもアンモニア水を用いるとE値は300となった。E値とは各々のエナンチオマーに対する

触媒反応の速度比を表し、現在工業化されている光学分割反応ではE値がおおよそ20以上であるものが多い。(S)-HLもまた医薬中間体^{40,41)}として有用なキラルビルディングブロックであり、天然から得られるL-Malic acid⁴²⁾、L-Ascorbic acid⁴³⁾、L-Isoascorbic acid⁴³⁾またはL-Asparatic acid⁴⁴⁾からの合成法が報告されているが、いずれも数ステップの反応を要する。また、有機化学法によりCHBからHLを得るには、1N HCl、高温条件で還流させなければならないが⁴⁵⁾、DS-S-75株を用いると、温和な条件で同反応を進行することができ、(R,S)-CHBから1工程で(R)-CHBとともに生成可能であった。さらにCHBだけでなく、クロル基のない3-Hydroxybutyrate、およびヒドロキシル基が2位に位置する2-Hydroxybutyrateに対しても立体選択的な加水分解反応によりカルボン酸へと変換させることで光学分割することができた。一方、DS-S-51株を用いた光学分割反応では、中和剤を変えても光学純度が変動しなかったことから、各アルカリに対するCHBやHLの安定性ではなく、DS-S-75株の反応を担う酵素の安定性に影響していることが示唆された。

DS-S-51株は(S)-CHBを99% e.e.で残存させるが、DS-S-75株よりも残存率は低かった。加えて(R)-HLの光学純度は低く、変換率は高かった。これは、(R)-CHBを優先的に(R)-HLへ変換するが、立体選択性がDS-S-75株よりも劣るため、(S)-CHBの一部も(S)-HLへと変換されているからである。

両菌株とも培養液に(R,S)-CHBMを直接添加しても反応させることが可能であり、菌体破碎や洗浄菌体の調製が必要なく、反応に補酵素などの高価な添加物を必要としないことから、両菌株を簡便な反応系で利用できた。また、遠心分離や膜ろ過によって除菌を行えば培地には活性を示さなかった。DS-S-51株を用いた反応は立体選択性が低いことから、光学分割反応後に活性が残っていると、(S)-CHBの回収時に収率の低下が懸念されるが、培地に活性がないことから、これを防ぐことが可能である。さらに、HLはCHBと化学的性質が大きく異なり、ろ液と酢酸エチル、ジクロロメタン等の有機溶媒を用いた分液では、CHBは有機層、HLは水層に入り易く、沸点もCHBMは67°C/0.3 mmHg、HLは110°C/0.3 mmHgであり、光学分割反応後の両化合物の分離精製が容易である。以上のことからDS-S-75株、DS-S-51株はCHBをはじめとする有用な各種光学活性体の生産に非常に有効な菌株であると考えられ、両菌株を用いた応用が期待される。

第二章 組換え大腸菌を用いた CHB の光学分割

2-1 序論

第一章で土壌より単離した 2 菌株(*Enterobacter* sp. DS-S-75 株、*Rhizobium* sp. DS-S-51 株)は、ユニークな反応により CHB の *R* 体または *S* 体を各々高光学純度で残存させ、他方のエナンチオマーを立体選択的に HL へと変換させることを述べた。特に DS-S-75 株は活性が高いこと、各種ヒドロキシカルボン酸エステルに対して立体選択的な加水分解活性を持つことから興味深い、これらの菌体反応の作用機作など不明点が多い。そこで本章では、反応を担う DS-S-75 株由来酵素を精製、および遺伝子をクローニングし、酵素、遺伝子レベルでの解析を行なった。また DS-S-75 株は培養条件によって活性が依存する。例えば、高溶存酸素条件下で培養を行なうと菌体の増殖性は高くなるが、活性は低くなる。そこで本章では、構成的に遺伝子を高発現させることで、生産性（反応速度、反応基質濃度）および反応の安定性向上を目的として、組換え大腸菌を作製し、これを用いた(*R*)-CHBM の実用的な製法検討を行なった。

一方、DS-S-51 株は試験した基質の中では CHB にのみ立体選択的な活性を示し、CHB の中でもイソプロピルエステルに対してはほとんど立体選択性がない等、DS-S-75 株と異なる点が多い。そこで、酵素レベルで DS-S-75 株と比較を行なった。また、DS-S-51 株は活性が低いことから、野生株を用いた実生産は困難であると考えられた。そこで、本株についても生産性を向上させるために組換え大腸菌を作製して(*S*)-CHBM の実用的な製法検討を行なった。

2-2 実験材料および方法

2-2-1 実験試薬、酵素

試薬は特に指定のない限り、和光純薬工業(株)、日本製薬(株)、東京化成工業(株)、シグマアルドリッチ(株)製のものを用いた。制限酵素および修飾酵素は、東洋紡績(株)、宝バイオ(株)、(株)ニッポンジーン、NEB(株)製をそれぞれの説明書に従って使用した。

2-2-2 使用大腸菌、プラスミド

Genotype, characteristics	
<u>Host strains</u>	
<i>Escherichia coli</i> JM109 ⁴⁶⁾	E14-(McrA-), recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(rk-mk ⁺), supE44, relA1, Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI ^q Z Δ M15]
DH5α ⁴⁷⁾	deoR, endA1, gyrA96, hsdR17(rk-mk ⁺), recA1, relA1, supE44, thi-1, Δ(lacZYA-argF)U169, φ 80lacZ Δ M15, F-, λ -
<u>Plasmids</u>	
pBluescriptII KS+	Amp ^r , lacZ
pUC18, 19, 118	Amp ^r , lacZ
pKK223-3	Amp ^r , tac

2-2-3 大腸菌用培地

a) LB 培地 : Pepton 10 g/l、Yeast extract 5 g/l、NaCl 10 g/l、(pH 6.8)

平板培地には 15 g/l の精製寒天を加えた。必要に応じて、Ampicillin 100 mg/l、1 mM IPTG を加えた。

b) SOB 培地 : Pepton 20 g/l、Yeast extract 5 g/l、NaCl 0.584 g/l、KCl 0.186 g/l、(pH 6.8)

オートクレーブ後、ろ過滅菌した 1 M MgSO₄、1 M MgCl₂ を 1L に対して 10 ml ずつ加えた。

c) SOC 培地 : SOB 培地 1 L に対して 2 M Glucose を 10 ml ずつ加えた。

d) 栄養培地 A : 1-2-2 参照。

e) 栄養培地 B : Pepton 20 g/l、Yeast extract 10 g/l、Glycerol 5 g/l、(pH 6.8)

2-2-4 ゲノム DNA の調製

1-2-5-2 と同様に行なった。

2-2-5 大腸菌からのプラスミドDNAの少量調製⁴⁸⁾

抗生物質を含む LB 培地 3 ml で 1 晩培養した菌体を遠心分離(3000 rpm, 5 min, 4°C)により集菌した。この菌体を 200 μ l の Solution I に懸濁し、次に、400 μ l の Solution II を加え、穏やかに混ぜ、氷中に 5 分間静置した。300 μ l の Solution III を加え、よく混合し、氷中に 10 分間静置した。遠心(3500 rpm, 5 min, 4°C)後、上清をフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、TE buffer に溶解した。また、必要に応じて、RNaseA(10 mg/ml)を加え、37°C で 30 分消化した後、PEG 沈殿を行い TE buffer に溶解した。

Solution I : 50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)

Solution II : 0.2 N NaOH, 1% SDS

Solution III : 3 M Sodium acetate (pH 5.2)

2-2-6 DNA の電気泳動および DNA 断片の回収

TAE buffer により作製した 1.0% アガロースを使用した。試料に Gel-Loading buffer を 1/10 量加え、ゲルのスロットに注入した。泳動装置は Mupid-2(コスモ・バイオ(株)製)を用い、定電圧 50 V または 100 V で行った。泳動後、ゲルをエチジウムブロマイドを含む TAE 溶液に浸し、トランスイルミネーター上で観察した。

TAE buffer: 40 mM Tris-acetate , 1 mM EDTA

Gel-Loadingbuffer: 0.25% Bromophenolblue, 0.25% Xylene cyanol,
40% Glycerol

アガロースゲルからの DNA 断片の回収は Prep-A-Gene DNA Purification Kit(Bio Rad(株)製)を用いて添付のプロトコールに従って行ない、計 20 μ l の DNA 溶液を得た。

2-2-7 大腸菌の形質転換

2-2-7-1 コンピテントセルの調製⁴⁹⁾

大腸菌DH5 α またはJM109をLB培地5 mlで一晩培養(前培養)し、200 mlのSOB培地により30°CにてOD₆₀₀が0.4~0.8になるまで培養した。培養液を氷中で冷却した後、遠心(3000 rpm, 15 min, 4°C)して集菌し、1/3容(67 ml)の氷冷したTB bufferに懸濁して氷中に10分間放置した。遠心(3000 rpm, 15 min, 4°C)後、菌を再び16 mlの氷冷したTB bufferに懸濁し、終濃度7%となるようにDimethylsulfoxide (DMSO)をゆっくり混ぜながら加え、氷上に10分間放置した。0.2 mlずつ1.5 ml微小遠心チューブに分注し、液体窒素で凍結して-80°Cで保存した。

TB緩衝液 : 10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂·2H₂O, 250 mM KCl
KOHでpH6.7に合わせた後、55 mM MnCl₂·4H₂Oを加え、ろ過滅菌して4°Cで保存した。

2-2-7-2 形質転換

-80°Cで保存したコンピテントセルを氷中で解凍後、1~20 μ l の DNA 溶液を加え、氷中に30分以上放置した。42°Cで15秒間ヒートショック後、直ちに氷中に戻した。800 μ l の SOC 培地を加え、37°Cで30分間振とう培養した。遠心分離後上清を200 μ l の SOC 培地に菌体を懸濁し、適当な抗生物質を含むLB寒天培地上に広げ、37°Cで一晩培養した。

2-2-8 塩基配列の決定

DNAの塩基配列の決定は、アプライドバイオシステムズ(株)製のDNAシーケンシングキットを用い、そのプロトコールに従った。キットはdRhodamine Dye Terminator Cycle Sequenceing Ready Reaction Kit または BigDye Terminator Cycle Sequenceing Ready Reaction Kit を用いた。DNAシークエンサーはABI PRISM 3100 DNA Sequencer を使用した。

2-2-8-1 ポリメラーゼ反応

0.2 ml マイクロチューブに鋳型 DNA と Terminator Ready Reaction Mix 6 μ l、プライマー 2 μ l (1.6 pmol)、滅菌水で 15 μ l にメスアップした反応液を調製し、Gene Amp PCR system 9600 で PCR 反応させた。反応条件は次の通りである。

96°C 1 min

96°C 10 sec、50°C 5 sec、60°C 4 min 25 cycles

2-2-8-2 サンプルの調製

ポリメラーゼ反応の終わった反応液を 1.5 ml の微小遠心チューブに移し、3M NaOAc (pH4.6) 1.5 μ l、100%エタノール 33 μ l を加え、氷上に 10 分間放置した。その後遠心分離(15000 rpm, 20 min, 4°C)し、上清を捨て 70%エタノールで洗浄し、減圧乾燥した。Template Suppression Reagent (TSR: アプライドバイオシステムズ(株)製) 12 μ l によく溶解し、95°C で 5 分間加熱後、氷上で急冷し、気泡が入らないように注意しながら専用のサンプルチューブに移し、セプタを取り付けた。専用サンプルトレーにサンプルチューブを並べ、シーケンサーにセットした。

2-2-9 タンパク質の定量

特に記載のない限り Bradford の方法に従った⁵⁰⁾。1/10 倍希釈した粗酵素液 50 μ l とタンパク質定量試薬 2 ml をキュベットに入れてよく混合し、5 分以上経ってから Abs 595 nm を測定した。BSA (Bovine Serum Albumin) を用いて検量線を作成し、これよりサンプルのタンパク質濃度を求めた。

タンパク質定量試薬: Coomassie Brilliant Blue (CBB) 50 mg, 95% Ethanol 25 ml,
85% (w/v) Phosphoric acid 50 ml

滅菌蒸留水で 500 ml にメスアップし、ろ紙 (Toyo No.2) で 2 回ろ過した。
さらに使用直前に必要量のみ再度ろ紙で 2 回ろ過して使用した。

2-2-10 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

2-2-10-1 電気泳動

SDS-PAGE は、Laemmli の方法に従った⁵¹⁾。下記の分離ゲルと濃縮ゲルを用いてゲルを作製した。調製した各タンパク質試料に等量の SDS-sample buffer を加え、95°C で 2 分間熱変性させた試料をゲルにアプライした。電気泳動は恒温式ミニゲルスラ

ブ電気泳動装置(日本エイドー(株)製)を用い、SDS-running buffer中で行った(定電流 20 mA)。

分離用ゲル : 375 mM Tris-HCl pH8.8, 10% Acrylamide, 0.1% SDS
(適当量の APS と TEMED で重合)

濃縮用ゲル : 125 mM Tris-HCl pH6.8, 5% Acrylamide, 0.1% SDS
(適当量の APS と TEMED で重合)

SDS-sample buffer : 100 mM Tris-HCl pH6.8, 50mM DTT, 4% SDS, 20%
Glycerol, 0.2% BPB

10×SDS-running buffer : 0.25 M Tris, 1.92 M Glycine, 1% SDS

2-2-10-2 Coomassie brilliant blue (CBB) R-250 によるタンパク質染色

SDS-PAGE 後のゲルを CBB 染色液に浸し 1 時間穏やかに振とうした。CBB 染色液を捨て、ゲルを CBB 脱色液に浸して、バンド以外の部分が透明になるまで穏やかに振とうした。

CBB 染色液: 45% Methanol , 10% Acetic Acid , 0.1% (w/v) CBB R-250

CBB 脱色液: 45% Methanol , 10% Acetic Acid

2-2-11 アミノ酸配列の決定

PVDF膜(BIO-RAD(株)製)、ろ紙およびSDS-PAGE後のゲルをTransfer buffer中で 15 分間平衡化した後、エレクトロトランスファー装置(日本エイドー(株)製NA-1512)を用いてTransfer buffer中で 1 mA/cm²の定電流にて 45 分間通電し、タンパク質をPVDF膜上にブロットした。目的のバンドをメスで切り出し、50%メタノールで 2 回、超純水で 2 回洗浄後、アミノ酸シークエンサー(アプライドバイオシステムズ(株)社製 PROCISE 792 または 476A)により分析した。

Transfer buffer : 48 mM Tris-HCl (pH8.3), 39 mM Glycine, 20% Methanol

2-2-12 酵素活性測定

2-2-12-1 脱クロル活性測定

0.5 M Potassium phosphate buffer (pH7.15)に 1% (R,S)-CHBMを基質として 30°Cで反応し、遊離するクロルイオンを岩崎らの方法で測定し³⁰⁾、1 分間に 1 μmolのクロルイオンを遊離させる酵素量を 1Uとした。

2-2-12-2 基質分解活性測定

0.5 M Potassium phosphate buffer (pH7.15)、1 mM 各基質を調製し、30°Cで反応後、GC にて分解率を測定した。

2-2-12-3 加水分解活性測定

0.25 M Tris-sulfate buffer (pH7.15)、1 mM 各 *p*-Nitrophenyl ester を調製し、30°Cで反応後、遊離する *p*-Nitrophenol を 400 nm の吸光により測定した。1 分間に 1 μ mol の *p*-Nitrophenol を遊離させる酵素量を 1U とした。

2-2-13 DS-S-75 株由来酵素の精製

1-2-6-1 と同様の方法で得た DS-S-75 株の洗浄菌体液 を 20 kHz、60-80 W 条件で超音波破碎し、遠心(26,000 g, 10 min, 4°C) 後、上清に 50%飽和になるように硫酸アンモニウムを加えた。沈殿を 10 mM Tris-sulfate buffer (pH7.8)に溶解し、同 buffer の飽和硫酸アンモニウム溶液で平衡化した Butyl-Toyopearl(東ソー(株)製)カラムに供した。硫酸アンモニウムの濃度を下げながら溶出液を分画し、活性画分を集めて 80% 飽和になるように硫酸アンモニウムを加えた。沈殿を 10 mM Tris-sulfate buffer (pH7.8) に溶解し、同 buffer で透析を行なった。同 buffer で平衡化した DEAE-Sepharose に透析試料を供した後、10–200 mM でグラジエントをかけながら溶出液を分画し、活性画分を集めて MicroSep 10K(日本ポール(株)製) にて濃縮した。0.1 M Potassium phosphate buffer (pH7.8) buffer で平衡化した Sephadex-G150(ファルマシア(株)製)に濃縮試料を供して溶出液を分画し、活性画分を集めた。酵素精製時のタンパク質の定量は、280 nm の吸光により行なった。

2-2-14 DS-S-75 株由来酵素遺伝子のクローニング

2-2-14-1 精製酵素の N 末端および内部アミノ酸配列の決定

精製酵素をキモトリプシン処理により断片化し、2-2-11 の方法で N 末端および内部アミノ酸配列を決定した。

2-2-14-2 縮重 PCR

決定したアミノ酸配列より、以下の様に縮重 PCR プライマーを設計し、1-2-5-2 で調製したゲノム DNA を鋳型として ExTaq Polymerase(宝バイオ(株)製)を用いて縮重 PCR を行ない、約 400 bp の PCR 産物を BKL kit(宝バイオ(株)製)を用いて添付のプロトコールに従って pUC118 ヘサブクローニングした。

設計プライマー

E1 : 5'-AARCARTAYCARCARATGTGG-3'

E2 : 5'-RTANGGNSWYTCNGGNGC-3'

R, Y, W, N は下記の混合塩基を示す。

R: A, G Y: C, T W: A, T N: A, C, G, T

反応条件

変性	96°C	1 min	} 40 cycles
	96°C	30sec	
アニーリング	50°C	1 min	
伸長	72°C	1 min	
	72°C	5 min	

2-2-14-3 プローブの調製

プローブとして用いるDNAをゲル回収し、25 ng分を*BcaBEST*TM Labeling kit(宝バイオ(株)製)および[α -³²P]dCTP(1.85 MBq)(ファルマシア(株)製)を用いて添付のプロトコールに従って放射性ラベルした。

2-2-14-4 サザンハイブリダイゼーション

各 5 μ gのゲノムDNAを*Bam*HI、*Eco*RI、*Eco*RV、*Hind*III、*Kpn*I、*Not*I、*Pst*I、*Sac*I、*Sal*I、*Sma*I、*Spe*I、*Xba*I、*Xho*Iの各酵素で完全消化し、サブマリン型電気泳動槽(ATTO(株)製)を用いて、1%アガロースゲルにて電気泳動を行なった。ゲルを酸変性液、アルカリ変性液、中和液の順に浸し、ゲル中のDNAを処理した。20 \times SSCを満たしたブロッティング装置をセットし、DNAをゲルからナイロンメンブレンに16 hrかけて転写した。終了後、紫外線照射(GS Gene LinkerTM UV Chamber; BIO RAD(株)製)によってDNAをメンブレン(HybondTM-N+; アマシャム(株)製)に固定し、2-2-14-3 で得たプローブと 5 \times SSC、0.5% SDS溶液中で 65°Cにてハイブリダイゼーションを行なった。終了後、2 \times SSC、0.1% SDSで 15 min、1 \times SSC、0.1% SDSで 30 min、0.5 \times SSC、0.1% SDSで 1 hr、各 65°Cにて洗浄した。イメージングプレートを用いて感光し、バイオイメージングアナライザーBAS5000(富士フイルム(株)製)により画像を読み込んだ。また、X線フィルムを用いて感光し、現像を行なった(富士フイルム(株)製)。

酸変性液:	0.25 M HCl
アルカリ変性液:	1.5 M NaOH, 0.5 M NaCl
中和液:	1.0 M Tris-HCl (pH7.0)
SSC:	0.15 M NaCl, 0.015 M Sodium citrate

2-2-14-5 コロニーハイブリダイゼーション

ゲノム DNA の *EcoRI* 完全消化断片を電気泳動し、約 6.0 kb 断片を pBluescript II KS+の同部位に挿入し、これを導入した大腸菌 DH5 α の形質転換体を LB 寒天培地に並べて接種した。37°Cで 6 時間インキュベート後、コロニーにナイロンメンブレンを 1 min 密着させ、メンブレンを酸変性液、アルカリ変性液、中和液の順に浸し、メンブレンに付着した DNA を処理した。紫外線照射によって DNA をメンブレンに固定し、2-2-14-4 の方法に従ってハイブリダイゼーションを行なった後、感光した。

2-2-15 DS-S-75 株由来酵素遺伝子組換え大腸菌の作製

PCR によって DS-S-75 株由来酵素遺伝子の開始コドンと考えられる 3 箇所の ATG 配列のすぐ 5'末端側に *EcoRI* 認識配列を付加するようにプライマー(E3、E4、E5)を設計した。また、成熟酵素の N 末端配列のバリンをコードする GTA を ATG に置換し、同様に 5'末端側に *EcoRI* 認識配列を付加するようにプライマー(E6)を設計した。3'末端側プライマーには M13(-20)を使用した。プライマーの配列を以下に示す。

5'末端側 設計プライマー

- E3: 5'-**CCGAATTC**ATGGGGAATGCGCTGATGAG -3'
 E4: 5'-**CCGAATTC**ATGAGAAAAACCATGCAACG -3'
 E5: 5'-**CCGAATTC**ATGCAACGCAGTTTGCTCTC-3'
 E6: 5'-**CCGAATTC**ATGTCTGCTCAGGTAACCCGC -3'

太字は *EcoRI* 認識配列を示す。

増幅された DNA を pUC118 にサブクローニングして塩基配列を確認した後、*EcoRI-PstI* 断片を pKK223-3 に導入した。得られたプラスミドおよび対照用として pKK223-3 のみを大腸菌 JM109 および DH5 α に導入し、組換え大腸菌 JM109(pKK-E3)、JM109(pKK-E4)、JM109(pKK-E5)、JM109(pKK-E6)、JM109(pKK223-3)、DH5 α (pKK-E3)、DH5 α (pKK-223-3)を得た。

2-2-16 DS-S-75 株由来酵素遺伝子のクローニング

DS-S-51 株から抽出したゲノム DNA を *Sau3AI* で部分消化し、各断片を pUC19 の *Bam*HI 認識部位へ挿入した。これを DH5 α に導入し、100 mg/l Amp、0.5%(v/v) (*R,S*)-CHBM および 80 mg/l BTB を含む LB 培地に塗布した。37°C でインキュベート後、周辺が黄色に呈色したコロニーを取得し、プラスミド抽出を行なった。呈色判断の対照試料として DH5 α (pKK-E3) を用いた。

2-2-17 DS-S-51 株由来酵素酵素組換え大腸菌の作製

PCR によって遺伝子の開始コドンのすぐ 5' 末端側に *Eco*RI 認識配列、終始コドンのすぐ 3' 末端側に *Hind*III 認識配列を付加するようにプライマーを設計した。プライマーの配列を以下に示す。

設計プライマー5'末端側

5'-TTGAATTCATGCCCCATAATCTG-3'

太字は *Eco*RI 認識配列を示す。

3'末端側

5'-AAAAGCTTGTGGCCGTCGA-3'

太字は *Hind*III 認識配列を示す。

増幅された DNA を pUC118 にサブクローニングして塩基配列を確認した後、*Eco*RI-*Hind*III 断片を pKK223-3 に導入した。得られたプラスミドを大腸菌 JM109 および DH5 α に導入し、組換え大腸菌 JM109(pKK-R1)、DH5 α (pKK-R1) を得た。

2-2-18 DS-S-51 株由来酵素組換え大腸菌の解析

試験管に 5 ml の LB 培地を調製し、作製した各組換え大腸菌を 37°C にて 16 h 振とう培養した。JM109 については 0.5 mM IPTG 誘導下でも培養を行なった。20 μ l の培養液に対して 3 ml の反応系で 2-2-12-3 の加水分解活性測定方法により活性評価した。また、培養液を 1.5 ml 微小遠心チューブに入れ、遠心分離(6000 rpm, 5 min, 4°C) にて集菌し、20 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.2) 中で 20 kHz、60-80 W にて超音波破碎した。遠心(15,000 rpm, 10 min, 4°C)後の上清を SDS-PAGE、N 末端アミノ酸解析、およびゲルろ過カラム(Sephadex G-100)に供した。

2-2-19 組換え大腸菌を用いた光学活性 CHBM、HL の生産検討

2-2-19-1 (R,S)-CHBM の光学分割反応

5 L 容ジャーファーマンター（三ツワ理化学工業(株)製 KMJ-5B）に 3 L の栄養培地 B を調製して攪拌数 500 rpm、通気量 0.25 L/min、30°Cにて培養した。種培養液には試験管にて 30°Cで培養した 3 ml の培養液を使用した。目的濃度になるように CHBM を加え、攪拌数 500 rpm、30°Cにて反応させた。反応中は 14%アンモニア水溶液にて pH6.9 に制御した。反応後 CHBM、HL の濃度および光学純度を GC により分析した。また、光学活性 CHBM、HL の実用的な生産検討時には、500 ml 容のバッフル付三角フラスコ 3 本に各々 100 ml 栄養培地 B を調製し、ロータリーシェイカーにて 130 rpm、30°Cにて培養後、300 ml の培養液をイオン交換水で 3 L に希釈したものを反応に使用した。

2-2-19-2 (R)-CHBM、(S)-HL の回収、精製

反応液を UF 膜（Spectrum Laboratories(株)製; 分画分子量 50,000）により除菌し、ろ液の 1/2 量の酢酸エチルにて 4 回抽出を行なった。CHBM を含む酢酸エチル層および HL を含む水層を各々減圧濃縮し、CHBM は 67°C/0.3 mmHg、HL は 110°C/0.3 mmHg にて蒸留した。

2-2-20 分析方法

2-2-20-1 GC 分析

CHBM、HL の濃度および光学純度は、1-2-8 の方法で行なった。精製試料の化学純度分析には TC-1701(GL サイエンス(株)製)キャピラリーカラム(内径 0.25 mm、長さ 30 m) 使用した。カラム温度; 70°C(3 min)→250°C(10°C/min)、気化室温度; 250°C、検出器温度; 250°C、キャリアーガス; 窒素、流速; 1 ml/min スプリット比 1:100、検出器; FID。精製試料を 0.2 μ l 注入した。

2-2-20-2 NMR 分析

NMR分析は日本電子(株)製GSX-270 にて¹H NMR(CDCl₃, 270 MHz)および¹³C NMR(CDCl₃, 270 MHz)を行なった。

2-2-20-3 旋光度分析

旋光度分析には、日本分光工業(株)製旋光計(DIP-360 型)を使用した。

2-3 結果

2-3-1 DS-S-75 株由来酵素の精製

CHB の光学分割反応の詳細解析を目的として DS-S-75 株から目的酵素の精製を行った。硫酸沈殿および疎水性カラム、イオン交換カラム、ゲルろ過カラムの各種カラムクロマトグラフィーにより *Enterobacter* sp. DS-S-75 株の粗酵素液から 221 倍に精製した (Table 2-1)。精製した酵素液を SDS-PAGE に供すると CBB 染色にて単一のバンドを示した (Fig. 2-1)。精製酵素の分子量は約 37,500 で、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーの分子量は約 75,000 であったことからホモ二量体であった。

Table 2-1 Summary of the purification steps of the enzyme from the strain DS-S-75

Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg protein)	Yield (%)	Purification (fold)
1. Cell free extract	88.3	2540	0.0348	100	1.0
2. (NH ₄) ₂ SO ₄ (0-50%)	53.8	1680	0.0320	61.0	0.9
3. Butyl Toyopearl	38.1	142	0.269	43.1	7.7
4. (NH ₄) ₂ SO ₄ (0-80%)	23.0	132	0.174	26.0	5.0
5. DEAE-Sephrose	28.2	6	4.75	31.9	136
6. Sephadex G-150	19.5	3	7.69	22.1	221

The enzyme amount which liberates 1 μmol of chloride ion for 1 min was defined to be 1U.



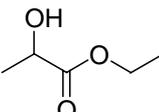
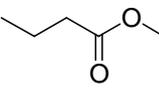
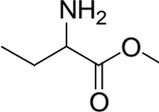
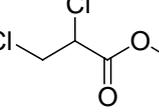
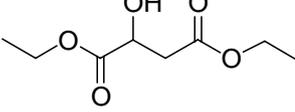
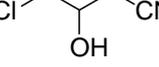
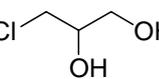
Fig. 2-1 SDS-PAGE for purified enzyme from the strain DS-S-75.

2-3-2 DS-S-75 株由来酵素の性質

各種ハロヒドリンやエステルに対する基質特異性を調べた結果、第一章で解析した菌体を用いた試験と同様であった。CHBM、CHBE に対してクロルイオン、アルコールを放出しながら加水分解により HL に変換したが、4-Chloro-3-hydroxybutyronitrile および 3-Chloro-1,2-propanediol 等の他のハロヒドリンに対しては活性を示さなかった。また 3HBE および 2HBM 等のカルボン酸エステル

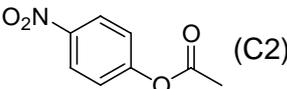
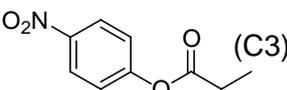
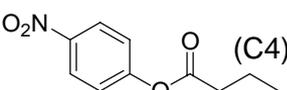
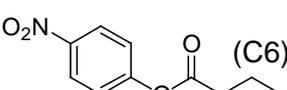
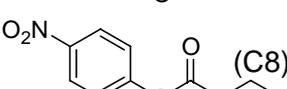
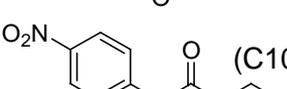
に対して活性を示し、HL ではなく加水分解によりカルボン酸に変換したが、ジエステルや3位の側鎖がヒドロキシル基ではなくアミノ基やクロル基である化合物には活性を示さなかった(Table 2-2)。また、一般的に加水分解酵素の基質として使用される *p*-Nitrophenyl butyrate に対しても高い活性を示したので、各種炭素鎖(C2-C10)の *p*-Nitrophenyl ester に対する活性を調べた結果、炭素鎖4のブチルエステルに対して最も活性が高く、炭素鎖が長くなるに従って低活性であり、炭素鎖10の *p*-Nitrophenyl caprate に対しては全く活性を示さなかった(Table 2-3)。本酵素の(S)-CHBM に対する K_m 値は 8.04 mM、 V_{max} は 19.2 U/mg、至適 pH は 6.6-6.8 であり、pH5.0-8.5 で安定であった。また、金属の要求性は示さなかった。

Table 2-2 Substrate specificity for various halohydrin and esters.

Substrate	Relative activity
CHBM	100
2HBM	19.3
3HBE	240
Ethyl lactate(EL)	 7.00
Methyl butyrate	 71.9
Methyl 2-amino-butyrate	 0
Methyl 2,3-dichloropropionate	 0
Diethyl malate	 0
4-Chloro-3-hydroxybutyronitrile	 0
3-Chloro-1,2-propanediol	 0

The enzyme activity is measured as degrading substrate. The relative activity shows that the activity of CHBM is taken to be 100%.

Table 2-3 Substrate specificity for various *p*-nitrophenyl esters.

Substrate	Relative Activity
 (C2)	6.92
 (C3)	15.0
 (C4)	100
 (C6)	1.04
 (C8)	0.05
 (C10)	0

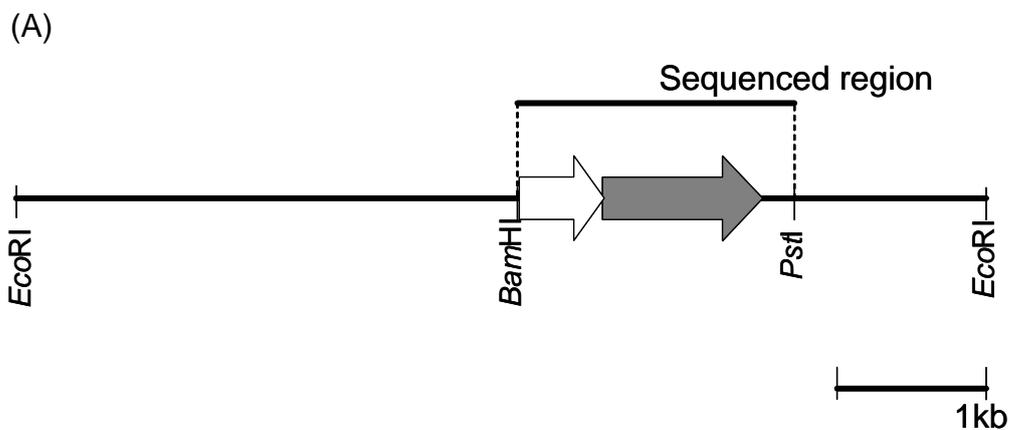
The enzyme activity is measured as releasing *p*-nitrophenol from *p*-nitrophenyl ester. The relative activity shows that the activity of *p*-nitrophenyl butyrate (C4) is taken to be 100%.

2-3-3 DS-S-75 株由来酵素遺伝子のクローニング

精製酵素の部分アミノ酸配列情報をもとに遺伝子クローニングを試みた。N 末端アミノ酸配列は V-S-A-Q-V-T-R-D-T-L-G-T-M-E-K-Q-Y-Q-Q-M であり、N 末端はメチオニンではなくバリンであった。キモトリプシン処理を行なった内部アミノ酸配列は R-R-A-P-E-S-P-Y-P であった。決定したアミノ酸配列より縮重 PCR プライマーを設計し、ゲノム DNA を鋳型として PCR を行なった結果、約 400 bp の増幅断片を得た。これをプローブとして DS-S-75 株から抽出したゲノム DNA を各種制限酵素で消化し、サザン解析を行なった。その結果から、約 6 kb の *EcoRI* 断片によるゲノムライブラリーを大腸菌にて作製し、同プローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行なったところ、160 コロニー中から 1 個の陽性コロニーを得た。挿入 DNA 断片中の 1760 bp の塩基配列を決定した結果、約 1.1 kb から構成される ORF が存在した。塩基配列および推定されるアミノ酸配列を Fig. 2-2 に示す。これらの配列は、DDBJ/EMBL/GenBank データベースに Accession No. AB236152 として登録した。推定アミノ酸配列中にはエステラーゼおよびリパーゼに保存されている G-X-S-X-G 配列が存在し、DDBJ/EMBL/ GenBank データベースに登録されている微生物各種のエステラーゼ、リパーゼ、ハイドロラーゼと最大で 45%の相同性があった(Table 2-4)。

これらの相同性ならびに 2-3-1 で得られた結果から、DS-S-75 株由来酵素は Hydroxy Carboxylic ester Hydrolase from *Enterobacter* sp. (EnHCH) と命名した(2-3 考察参照)。推定アミノ酸配列中には、DS-S-75 株から精製した酵素の部分アミノ酸配列が存在し、精製した酵素の N 末端アミノ酸配列は推定アミノ酸配列の N 末端から 25 残基程度内部に存在した。

また、決定した塩基配列中には、*EnHCH* 遺伝子のすぐ上流に別の ORF 部分断片が認められた。推定した部分 C 末端側アミノ酸配列 (236 残基) は微生物各種の 3-Hydroxybutyrate dehydrogenase と最大 68% の相同性があった(Fig. 2-2)。



(B)

BamHI
 GGATCCAGAT TGTCAGTCCC CTGGATGAAT ACCCGTTTGC TGA CTGGCGG AAGATGATGG CTGTTTCATCT TGACGGGGCA TTTCTGACCA CCCGGGCAGC 100
 ACTGAAACAT ATGTACAAAA ACCCGCAAGG GGGGACGGTC ATTTATATTG GCTCTGTGCA TTCCCATGAA GCCTCCCGGC TGAAGGCGGC GTATGTGACC 200
 GCCAAACATG GGCTGATGGG GCTGGCTAAG GTGGTCGCGA AGGAGGGGGC TGTTTCATCAC GTTCGCTCGC ATGTAGTTTG CCCGGGCTTT GTTGATACGC 300
 CGCTGGTTAA AAAGCAGATC CCTGAGCAGG CCCGTGAGCT GGGTATCAGC GAAGAGGATG TCGTCAAAAA TATTATGCTG GCGGAAACCG TTGACGGGCA 400
 GTTTACATCG GAGGCGGATA TTGCCGAAAC AGTACGTTTT CTGGTGACAT TTCCTTCCAT GGCGCTCACC GGACAGTCAA TTACGGTCAG CCACGGATGG 500

M G

GGAATGCGCT GATGAGAAAA ACCATGCAAC GCAGTTTCTC CTCAGCCCTG GTGCTGGTGG CTTCCTGTTG TCATGGGGCC TGGGCAGTAT CTGCTCAGGT 600
 N A L **M R K T M Q R S L L S A L V L V A S C C H G A W A V S A Q V**
 AACCCGCGAT ACCCTCGGCA CAATGGAGAA ACAGTATCAA CAGATGTGGG AGAAAGAAAA TGCCCGCTG ACGTTGTGCG CTCGGGCCCC CCTGGCGACG 700
T R D T L G T M E K Q Y Q Q M W E K E N G P L T L S P P A P L A T
 CTGTTATCAT CGCTACCCAA AAACAGCAAT AACCCCGAGT ATAATACGCT CGACAGCCGT GATGCGTTGA CTGCGCTGAC CCAAAGTAC GTGACGGATA 800
 L L S S L P K N S N N P E Y N T L D S R D A L T A L T Q K Y V T D K
 AACAAATCCAT AGCCCGAATT ATCAATGTGG ATGTGCGCGT GCCGGGACGA AAAATTCCGG TACGGATCTA CAACCCGCAT CCGGATATAG CAACCCGGGT 900
 Q S I A R I I N V D V A V P G R K I P V R I Y N P H P D I A T G V
 GATTTTCTTC ATTCATGGTG GGGGGCATCT GAGTGGTTTG GTGGATGTTT ACGACCCGAT AGCCCGTCAT CTGGCGGCTG CAACCCGTAA TACCGTCGTG 1000
 I F F I H G G G H L S G S V D V Y D P I A R H L A A A T G N T V V
 GCAGTGGACT ATCGCGGGG GCCGGAGTCC CCCTATCCGG AGGGACTTCA CGATGCGCGT GATGTCCTGA TGCAGTTTA CGCTGTACTG GATCAGAACC 1100
 A V D Y R R A P E S P Y P E G L H D A R D V L M Q V Y A V L D Q N H
 ATGTCCCTG GAAACCGCAA CTGACTCTGG CCGGAGACAG CCGAGGTGGG GCATTACGCG CCACGCTTGC CGGCGATTTA CAGACTGAAC ACCCGGCCTT 1200
 V P W K P Q L T L A **S D S G G** G A F S A T L A G D L Q T E H P G F
 TATCCTCCGC CTGGAGCTGA TTTATCCAG CCTGGATTAC ACGTTGTCTT GCCTTCCGC TGATGAAAAA GGGCAGGGTA AATTGCTTGA TAAAAGCAAA 1300
 I S R L E L I Y P S L D Y T L S W P S A D E N G Q G K L L D K S K
 GTGGCCTGGT ACTTCAGTCA GTATTTTCAG CATGTTGAAG ACAGAGCGTC GCTTTCACCG TTGTACAGAT CAGTCACGCG GCGCTTTCGG CCCACACTTA 1400
 V A W Y F S Q Y F Q H G E D R A S L S P L Y R S V T R A F P P T L I
 TTTTATGTTG CCGTCTGGAT CCATTACGTG ATGAGGATTT TGCTTTTGTG GCCCGACTGA AAAGCGCCGG AGTGCCGGTC AGGCATATCC ACTTCCCGGG 1500
 F S G G L D P L R D E D F A F V A R L K S A G V P V R H I H F P G
 GATGGTACAT GCATTTCTGA TGCTTGAAAA TCTGGTGCCG CAGCAAAGT CACAGTTTA TCAGGCTACC GCTGATTCA TTGCCACACC AGCCATTAG 1600
 M V H A F L M L E N L V P Q Q T A Q V Y Q A T A D F I A T P A H *
 GTCTGAGGGG CAGTTTCCGC AACTGCCCT GTGATTTCTG TAACGAATTA CTTGTTCTGT GCGTGATTG TTTTCATTGG GACAGAAACG CAGCCTTTTA 1700
 AGCCTGCTGT CTGGTCGCTG CCAGCACAAAT TTCGCGGATA CAGACGTTTT GAGGCTGCAG *Pst*I 1760

Fig. 2-2 DNA fragment containing the *EnHCH* gene. (A) The approximately 6 kbp fragment which is cloned on pBluescript II KS+. Gray arrow indicates the location and direction of the ORF of the *EnHCH* gene. It is approximately 1.1 kbp. White arrow indicates partial sequence of ORF located in upstream of *EnHCH* gene. (B) Nucleotide sequence of the isolated gene and deduced amino acid sequence of the *EnHCH* gene product. The conserved amino acid sequence, G-X-S-X-G, on esterase and lipase is boxed. The amino acid sequences for design of the degenerate primer is double-underlined. The bold type of DNA sequence indicates the estimated initiation codons for translation. The signal peptide cleavage site is shown with vertical arrows. The putative inverted repeat sequence is indicated by facing arrows with a solid line. The italic type of DNA sequence indicates the upstream partial ORF.

Table 2-4 Homology search of amino acid sequence of EnHCH toward other enzyme.

Enzyme	Organism	Identity (%)
Carboxylesterase	<i>Chromobacterium violaceum</i>	45
Alpha/beta hydrolase	<i>Shewanella frigidimarina</i>	42
Lipase (lipP-1)	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	34
Similar to lipase	<i>Listeria monocytogenes</i>	31

Amino acid sequence is compared with the entries DDBJ/EMBL/Genbank database.

2-3-4 *EnHCH* 遺伝子の発現

EnHCH 遺伝子の大腸菌での発現を試みた。配列中に開始コドンと想定可能な ATG 配列が 3 箇所存在したため、各々の ATG 配列のすぐ上流に *EcoRI* 認識配列を PCR にて付与した(プライマー-E3、E4、E5) (Fig. 2-3)。また DS-S-75 株から精製した酵素の N 末端配列に相当するバリンを ATG に変換し、同様にすぐ上流に *EcoRI* 認識配列を PCR にて付与した(プライマー-E6)。PCR 産物を大腸菌用の高発現ベクター pKK223-3 の *tac* プロモーター支配下になるよう *EcoRI-PstI* 認識配列部位に挿入し、これらのプラスミドを導入した組換え大腸菌 JM109 を作製した。IPTG を含む LB 培地で培養し、培養液の加水分解活性を *p*-Nitrophenyl butyrate を基質として測定した。その結果、JM109(pKK-E3)および JM109(pKK-E4)で DS-S-75 株の約 4 倍の活性を示した(Table2-5)。JM109(pKK-E4)は菌体あたりの活性が高かったが、菌体の増殖は悪かった。比べて JM109(pKK-E5)および JM109(pKK-E6)の活性は低く、ベクターのみを導入した JM109(pKK223-3)は全く活性を示さなかった。各組換え大腸菌の粗酵素液を SDS-PAGE に供したところ、JM109(pKK-E3)および JM109(pKK-E4)については、DS-S-75 株から精製した酵素と同じ位置 (分子量 37,500) に明確なバンドが現れた (Fig. 2-4)。JM109(pKK-E3)由来の組換え *EnHCH* の N 末端アミノ酸配列を決定したところ、DS-S-75 株由来の *EnHCH* の N 末端アミノ酸配列と一致した(Fig.2-5)。また、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行なった結果、分子量は約 75,000 であり、組換え *EnHCH* も大腸菌内で N 末端配列のプロセッシングが行なわれ、ホモ二量体を形成していることが認められた。

次に、pKK-E3 および pKK-E4 を *LacI* 欠損株である DH5 α に導入した結果、DH5 α (pKK-E3)については構成的に *EnHCH* 遺伝子が発現し、最も高活性を示した。一方、DH5 α (pKK-E4)は生育することができず、コロニーとして得ることができなかった。これらの結果から、以後、組換え大腸菌を用いた CHB の生産検討には DH5 α (pKK-E3)を使用した。



Fig. 2-3 Construction of expression plasmids by *EnHCH* gene. The gene was amplified by PCR with the forward primers E3, E4, E5 or E6 which contained an *EcoRI* site and with the M13 reverse primer as the reverse primer. After the PCR products were digested with *EcoRI* and *PstI*, they were inserted into pKK223-3.

Table 2-5 Comparison of recombinant cells and strain DS-S-75 in the hydrolase activity.

	Cell growth (O.D.)	IPTG	Activity (U/ml)	Specific activity (U/ml/O.D.)
DS- S- 75	17.32	—	3.16	0.18
JM109(pKK223-3)	2.93	+	0	0
JM109(pKK-E3)	2.27	+	12.6	5.55
JM109(pKK-E4)	1.57	+	13.8	8.79
JM109(pKK-E5)	2.41	+	2.76	1.15
JM109(pKK-E6)	2.81	+	2.37	0.84
DH5 α (pKK223-3)	3.52	—	0	0
DH5 α (pKK-E3)	3.32	—	34.0	10.2
DH5 α (pKK-E4)	Non growth	—	—	—

The enzyme amount which releasing 1 μ mol of *p*-nitrophenol from *p*-nitrophenyl butyrate for 1 min is defined to be 1U. Activities are indicated as U per ml of culture broth.

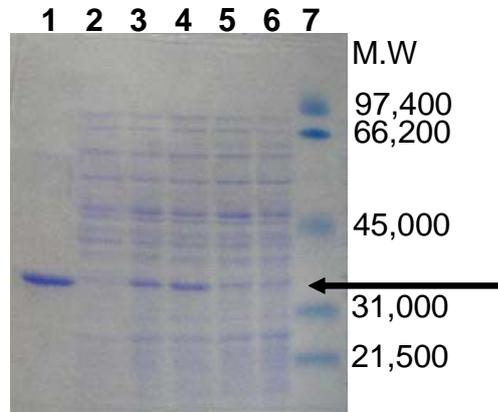


Fig. 2-4 SDS-PAGE of the protein samples including the EnHCH. Lane 1, purified EnHCH from the strain DS-S-75; Lane 2, cell-free extract of JM109(pKK223-3); Lane 3, cell-free extract of JM109(pKK-E3); Lane 4, cell-free extract of JM109(pKK-E4); Lane 5, cell-free extract of JM109(pKK-E5); Lane 6, cell-free extract of JM109(pKK-E6); Lane 7, molecular weight markers; Prestained SDS-PAGE standard low range (Bio-Rad, Tokyo). The EnHCH is indicated with an arrow.

N-terminal amino acid

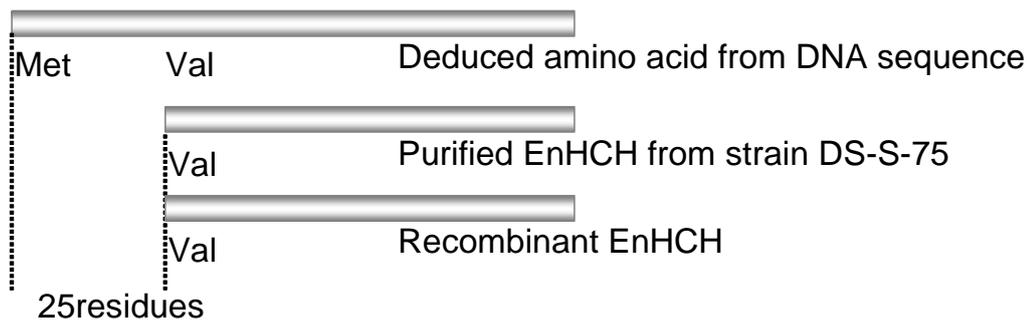


Fig. 2-5 Analysis of N-terminal amino acid.

2-3-5 組換え大腸菌による(R)-CHBM および(S)-HL の生産検討

ジャーファーマンターを用いて調製した DH5 α (pKK-E3)培養液 3 L に最終濃度 8% になるように(R,S)-CHBM を添加して光学分割反応を行なった。その結果、1 hr で (R)-CHBM の光学純度は>99.9% e.e.となった。また、生成した(S)-HL の光学純度も >99.9% e.e.であった。同様に DS-S-75 株で光学分割反応を行なうと 20 hr を要し、(S)-HL の光学純度は 95.9% e.e.であった。DH5 α (pKK-E3)は、最終濃度 15%量の CHBM でも 4 hr で光学純度は>99.9% e.e.となった(Table 2-6)。収率は両菌株で同等であった。

Table 2-6 The resolution of CHBM using the strain DS-S-75 and *E.coli* transformant

Strain	(R,S)-CHBM	(R)-CHBM		(S)-HL		Reaction time (hr)
	Concentration (w/v%)	Residual ratio (%)	Optical purity (%ee)	Conversion ratio (mol%)	Optical purity (%ee)	
DS-S-75	8	47.8	>99.9	48.0	95.9	20

DH5 α (pKK-E3)	8	49.8	>99.9	46.1	>99.9	1
	15	47.8	>99.9	47.8	>99.9	4

Residual ratio is indicated to be 100 % at initial time. Conversion ratio is shown by mol %. Optical purity is calculated from quantity of each enantiomer using formula: $|R-S| / (R+S) \times 100$.

また、実生産を考慮して、300 mlのDH5 α (pKK-E3)の培養液を水で 3 Lに希釈し、最終濃度 15%量のCHBMを添加して光学分割反応を行なった。その結果、20 hrで (R)-CHBMの光学純度が>99.9% e.e.となった。光学分割反応後、UF膜で除菌し、酢酸エチル抽出、濃縮、蒸留により、ろ液から光学活性体の回収、精製を行なった。その結果、(R)-CHBM (o.p. >99.9% e.e., c.p. >99.0%, $[\alpha]_D^{20} = 16.1$ (c 1.21, CH₃OH)), (S)-HL(o.p. >99.9% e.e., c.p. >99.0%, $[\alpha]_D^{20} = -68.1$ (c 1.2, CH₃CH₂OH))を得た。(R,S)-CHBMからの収率は、(R)-CHBMが 38.8%、(S)-HLが 22.8%であった。(S)-HLの NMR解析を行なった結果を以下に示す。¹H NMR (CDCl₃, 270 MHz), dppm: 2.54 (d, 1H, J = 18 Hz); 2.79 (dd, 1H, J = 10 Hz); 4.46 (dd, 1H, J = 10 Hz, J = 4.5 Hz); 4.6-4.7 (m, 1H)。¹³C NMR (CDCl₃, 270 MHz), dppm: 177, 76.3, 67.2, 37.7。

2-3-6 DS-S-51 株由来酵素遺伝子のクローニング

目的酵素の活性が低いこと、*EnHCH*遺伝子を導入した組換え大腸菌を陽性コントロールとして使用可能なことから、遺伝子のクローニングは大腸菌を用いたショットガン法により行なった。DS-S-51 株のゲノムDNAを*Sau3AI*で部分消化した断片をpUC19 の*Bam*HI認識部位に導入し、プラスミドライブラリーを作製した。これをDH5 α に導入し、CHBMとpH指示薬のBTBを含む選択培地に塗布した。約 47,600 コロニーをスクリーニングした結果、強弱はあるが周囲が黄色に変色した 2 個の陽性コロニーを得た。各々プラスミドを抽出して再度DH5 α に導入し、選択培地に塗布した結果、1 つのクローンのみ周囲が黄色に変色した(Fig. 2-6)。このプラスミドには約 4 kbの断片が挿入されていた。塩基配列の決定を行なった結果、断片中に 1197 bp、398 アミノ酸をコードするORFが存在した。塩基配列および推定されるアミノ酸配列をFig. 2-7 に示す。これらの配列は、DDBJ/EMBL/GenBankデータベースに Accession No. AB362771 として登録した。GenBankデータベースのBLASTプログラムに登録されている微生物各種の 1,4-Butanediol diacrylate esterase⁵²⁾、 β -Lactamase、Methyl acetate hydrolase⁵³⁾と高い相同性があったが(Table 2-7)、*EnHCH*遺伝子とは全く相同性がなかった。また、*EnHCH*で見られたGXGXGアミノ酸配列はなかった。

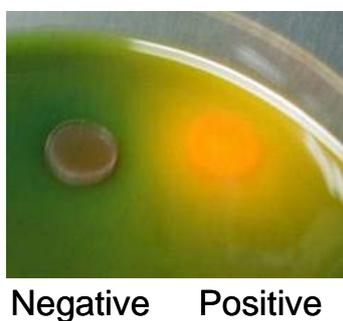


Fig. 2-6 *E.coli* transformants after shot-gun cloning by plasmid library. The BTB is turn to yellow by positive one.

```

AAACCGCGGC GCGTTGATCC CTTGCGCCTC GCAGGATCT TGAATGCCCC ATAATCTGAA GCCGAAAATC GACACGTTGC TCGAAACCCG GGTCAAATCC 100
                                     M P H N L K P K I D T L L E T R V K S
AGTCCGGGAG TGCCGGGTGT GGTCCGCGTC GTCACGGACC GGAACGGCAA TATCTATGAG GGTGCGGCCG GTTCACGCGC CCTTGGCGGC ACTCAGCCCA 200
S P G V P G V V A V V T D R N G N I Y E G A A G S R A L G G T Q P M
TGACGACCGA CAGCGTGTTC GCCATCTTTT CGACGACAAA GGCATAAACC GGAAGTGCAT GTCTCCAAC TGTGGAAGAC GGCAAGCTCG ATCTCGACGC 300
T T D S V F A I F S T T K A I T G T A C L Q L V E D G K L D L D A
GCCTGCAAAG ATCCATGCCC CGAAATCGG CAAGCTGCAG GTGATCGAAG GGTTCGACGA AC GCGGTTTG CCGAAGCTGC GCCCACCGAA ACGCGACATC 400
P A K I H A P E I G K L Q V I E G F D E R G L P K L R P P K R D I
ACCACCCGCA TGCTGTGCTC ACACACGGGC GGCTTCGGCT ATGACTTTTT CAATGCGACC TACAATCGCC TCGCGAATGA ACATGGACAG CCAAGCGTCA 500
T T R M L L L H T A G F G Y D F F N A T Y N R L A N E H G Q P S V I
TTACCTCGTC GCATGCTCCT CTTGCGCACG CGTTGCTCTT CGATCCGGGT GAAGCCTGGG AATATGGCAC CAATATCGAC TGGGCCGGAC AGGTTGTGCA 600
T S S H A S L R T P L L F D P G E A W E Y G T N I D W A G Q V V E
AGGCATTACC GGCAAGCGCC TCGGCGAGGT CATGAAGGAG CGCATCTTCA AGCCGCTCGG CATGGAGGAT ACCGCGTTCA CTATGACGCC ATCCATGTCG 700
G I T G K R L G E V M K E R I F K P L G M E D T A F T M T P S M S
GCCCGCATGG CGACCATGCA CCAGCGCGAC GGAAGCGGAA CATTGACCCC ACTCGCCAAT TTCACGCTGC CGCAGGACCC GGAGGTGCAC ATGGCGGGGC 800
A R M A T M H Q R D G S G T L T P L A N F T L P Q D P E V H M G G H
ACGCTCTCTA CTCGACCGCG CTCGACTACG CCAAATTCAT CCGCATGTGG CTGAATGATG GGGAAAGGCC CGGCGGCAGG GTGCTGAAGG CGGAGACGGT 900
G L Y S T A L D Y A K F I R M W L N D G E G P G G R V L K A E T V
GCGCGCGGCC GAGAAAACG GTCTCGGCGA GATGAAGATC AAGATGCTGC CGGCGCTCAT TCCAAGCCTT TCCAATGACG CGGAGTTCTT CCCCGGCATG 1000
R A A E K N G L G E M K I K M L P G V I P S L S N D A E F F P G M
CCGAAGTCTC GGGGGCTCAC CTTTCATGATC AACGACGAGC CCGCGCCAAC CGGCGTCCC GCTGGCGCAC TCGCTGGGC CGGCTTTGCC AACCTTTATT 1100
P K S W G L T F M I N D E P A P T G R P A G A L A W A G L A N L Y Y
ACTGGATCGA CCGCAAGAAC GGGATAGGGC GCTATTGGGC CACGACGATA CTCCTTTGCG CCGACCCCGC TTCAGTCCGC GGCTATCTGG ATTTTCGAGAC 1200
W I D R K N G I G G Y W A T Q I L P F A D P A S V G G Y L D F E T
AGCCGCTTAT CAATCCCTTC GCGCCAGACA GCGGCGCTAG GTCGCTTCGA TCAAGACCTG CTGACAGCTT GCCTATGCCC GAGCCGTAAA TGGCGCGGGC 1300
A V Y Q S L R A R Q A A *
ATAGCGGCGT TATGGGCACC CTATCTGGCT CGACGGCCAC GGGGCACGAT CATTGGCGTG CCGAAAATCG GGTGCGGCAT GACGATTGAG GTCAGGTTGA 1400

```

Fig. 2-7 Nucleotide sequence of the fragment containing the gene encoding the enzyme from the strain DS-S-51, and its deduced amino acid. The putative Shine–Dalgarno sequence is underlined in the DNA sequence. The determined N-terminal amino acid sequence of the recombinant enzyme is double-underlined.

Table 2-7 Homology search of enzyme from strain DS-S-51 toward other enzyme.

Enzyme	Organism	Identity(%)
1,4-Butanediol diacrylate esterase	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	70
β -Lactamase	<i>Rhodococcus</i> sp.	69
Methyl acetate hydrolase	<i>Gordonia</i> sp.	66

Amino acid sequence is compared with the entries DDBJ/EMBL/Genbank database.

2-3-7 DS-S-51 株由来酵素遺伝子の発現

遺伝子の大腸菌での発現を試みた。ATG のすぐ上流に *EcoRI* 認識配列、停止コードンの下流に *HindIII* 認識配列を PCR にて付与し、pKK223-3 の *tac* プロモーター支配下になるよう *EcoRI-HindIII* 認識部位に挿入し (Fig. 2-8)、これらのプラスミドを導入した組換え大腸菌 JM109 株および DH5 α 株の培養液の加水分解活性を *p*-Nitrophenyl butyrate を基質として測定した。その結果、JM109 株を宿主にした JM109(pKK-R1) を IPTG 非添加で培養したものが最も高活性を示した (Table 2-8)。

IPTG を添加した場合は生育および活性が低かった。また、構成的に発現する DH5 α (pKK-R1)もまた生育、活性が低かった。各種 *p*-Nitrophenyl ester に対する活性を調べた結果、炭素鎖 2 の *p*-Nitrophenyl acetate に対して最も活性が高く、炭素鎖が長くなるに従って低活性であり、炭素鎖 8 の *p*-Nitrophenyl caprylate に対しては全く活性を示さなかった(Table 2-9)。CHB 以外の化合物に対する基質特異性を調べたところ、EnHCH の基質特異性解析に試したクロロヒドリンおよびカルボン酸エステルに対する活性を示さなかった。これらの基質特異性ならびに 2-3-6 で得られた相同性の結果から、DS-S-51 株由来酵素は CHB Hydrolase from *Rhizobium* sp. (RhCHBH) と命名された(2-3 考察参照)。また、JM109(pKK-R1)粗酵素液を SDS-PAGE に供し、ゲルを CBB 染色した結果、明確なバンドが確認された(Fig. 2-9)。その分子量は約 42,000 であり、推定アミノ酸配列から予想される分子量と一致した。ゲルろ過カラムによる分子量も約 42,000 であり、本酵素はモノマーであることが認められた。また、組換え RhCHBH の N 末端配列は推定アミノ酸配列の N 末端と一致したことから(Fig. 2-7)、EnHCH と異なり、N 末端配列のプロセッシングは行なわれていないことが認められた。

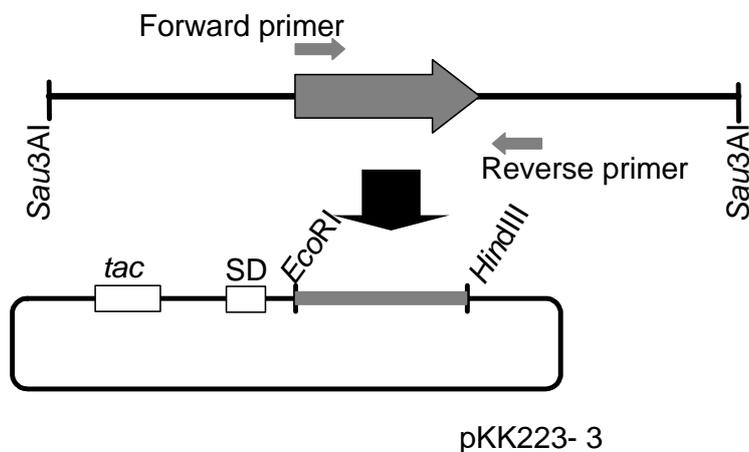


Fig. 2-8 Construction of expression plasmid by *RhCHBH* gene. The gene was amplified by PCR with the forward primer which contained an *EcoRI* site and reverse primer which contained a *HindIII* site. After the PCR product was digested with *EcoRI* and *HindIII* and it was inserted into pKK223-3.

Table 2-8 Comparison of recombinant cells and strain DS-S-51 in the hydrolase activity.

	Cell growth (O.D.)	IPTG	Activity (U/ml)	Specific activity (U/ml/O.D.)
DS- S- 51	15.28	-	0.15	0.01
JM109(pKK223-3)	2.85	+	0	0
JM109(pKK-R1)	2.58	-	5.85	2.27
JM109(pKK-R1)	1.78	+	3.16	1.78
DH5 α (pKK223-3)	3.48	-	0	0
DH5 α (pKK-R1)	0.58	-	0.37	0.64

The enzyme amount which releasing 1 μ mol of *p*-nitrophenol from *p*-nitrophenyl butyrate for 1 min was defined to be 1U. Activities are indicated as U per ml of culture broth.

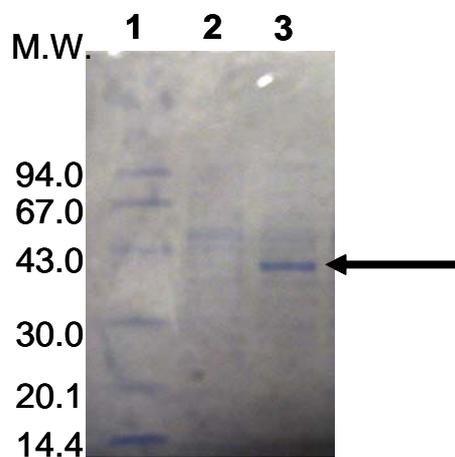
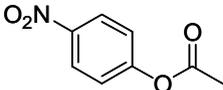
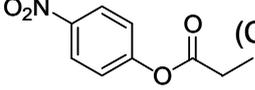
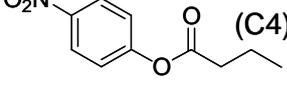
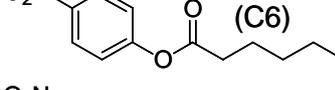
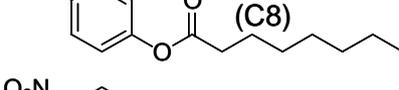
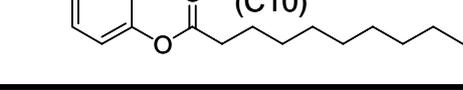


Fig. 2-9 SDS-PAGE of the recombinant cell-free extracts. Lane 1, molecular weight markers; LMW electrophoresis calibration kit (Amersham Pharmacia Biotech). Lane 2, cell-free extract of *E. coli* JM109(pKK223-3); Lane 3, cell-free extract of JM109(pKK-R1). The RhCHBH is indicated with an arrow.

Table 2-9 Substrate specificity for various *p*-nitrophenyl esters.

<i>p</i> - Nitrophenyl ester	Relative activity	
	JM109(pKK223-3)	JM109(pKK-R1)
 (C2)	0	100
 (C3)	0	47.4
 (C4)	0	21.1
 (C6)	0	12.6
 (C8)	0	0
 (C10)	0	0

The enzyme activity is measured as releasing *p*-nitrophenol from *p*-nitrophenyl ester. The relative activity shows that the activity of *p*-nitrophenyl acetate (C2) is taken to be 100%.

2-3-8 組換え大腸菌による(*S*)-CHBM および(*R*)-HL の生産検討

2-3-5 と同様に、ジャーファーマンターを用いて調製した培養液 3 L を用いて行なった。最終濃度 1% になるように (*R,S*)-CHBM を添加して光学分割反応を行なった。その結果、JM109(pKK-R1) の培養液を用いると 1 hr で (*S*)-CHBM の光学純度は >99.0% e.e. になった。同様に DS-S-51 株で光学分割反応を行なうと 40 hr を要した。最終濃度 2% 量の (*R,S*)-CHBM でも 2 hr で光学純度は >99.0% e.e. になった (Table 2-10)。 (*R*)-HL の光学純度は両菌株とも 53% e.e. 程度であった。また、300 ml の培養液を水で 3 L に希釈し、最終濃度 2% 量の (*R,S*)-CHBM を添加して光学分割反応を行なった。その結果、20 hr で (*R*)-CHBM の光学純度が >99.0% e.e. になった。光学分割反応後、UF 膜で除菌し、酢酸エチル抽出、濃縮、蒸留により、ろ液から (*S*)-CHBM の回収、精製を行なった。その結果、(*S*)-CHBM (o.p. >99.0% e.e., c.p. >99.0%, $[\alpha]_D^{20} = -16.1$ (c 1.21, CH₃OH)) を得た。

また、基質に (*R*)-CHBM を用いて同様に反応を行なった場合、光学純度を落とすことなく、100% に近い変換率で (*R*)-HL を得ることができた (Table 2-11)。ろ液を濃縮後、酢酸エチル抽出、濃縮、蒸留により、(*R*)-HL (o.p. >99.0% e.e., c.p. >99.0%, $[\alpha]_D^{20} = 68.1$ (c 1.2, CH₃CH₂OH)) を得た。

Table 2-10 The resolution of CHBM using the strain DS-S-75 and *E.coli* transformant.

Strain	(R,S)-CHBM	(S)-CHBM		(R)-HL		Reaction time (hr)	E value
	Concentration (w/v%)	Residual ratio (%)	Optical purity (%ee)	Conversion ratio (mol%)	Optical purity (%ee)		
DS-S-51	1	30.9	99.2	65.0	53.0	40	16.1
JM109(pKK-R1)	1	30.5	99.0	65.2	53.2	1	15.6
	2	30.5	99.1	64.8	53.2	2	15.9

Residual ratio is indicated to be 100 % at initial time. Conversion ratio is shown by mol %. Optical purity is calculated from quantity of each enantiomer using formula: $|R-S| / (R+S) \times 100$. E value is calculated from optical purity of substrate (CHB; eeS) and product (HL; eeP) using the formula: $\text{Ln}[(1-eeS) \times (eeP/(eeS+eeP))] / \text{Ln}[(1+eeS) \times (eeP/(eeS+eeP))]$.

Table 2-11 The conversion of (R)-CHBM to (R)-HL using the strain DS-S-75 and *E.coli*.

Strain	(R)-CHBM	(R)-HL		Reaction time (hr)
	Concentration (w/v%)	Conversion ratio (mol%)	Optical purity (%ee)	
DS-S-51	1	97.9	99.0	80
JM109(pKK-R1)	2	97.8	99.0	4

Conversion ratio is shown by mol %. Optical purity is calculated from quantity of each enantiomer using formula: $|R-S| / (R+S) \times 100$.

2-4 考察

DS-S-75 株から精製した目的酵素の基質特異性を解析した結果、第一章で記述した菌株による反応と同様にCHBをHLに変換すること確認できたことから、本反応は一種類の酵素による反応であることが示された。また、2HBMおよび 3HBEに対しても加水分解活性を示しカルボン酸に変換させたことから、第一章のDS-S-75 株を用いたCHB、2HBM、3HBEの光学分割反応は、同一の酵素による反応であることが示された。不斉中心を形成させる側鎖に関しては、アミノ基やクロル基には活性を示さず、ヒドロキシル基にのみ活性を示したこと、また、クローニングした本酵素遺伝子の推定アミノ酸配列中に各種Esterase、Lipase、Hydrolase等の加水分解酵素に見られる保存配列の存在および相同性があったことから、本酵素をHydroxy Carboxylic ester Hydrolase from *Enterobacter* sp. (EnHCH)と命名した。しかし、その相同性は最大でも45%であり、ゲノムプロジェクトによって登録された詳細機能不明の酵素であるため、新規な酵素として興味深い。3-Hydroxybutyrate、2-Hydroxybutyrateが立体選択的に加水分解されることから、CHBもエステル基が立体選択的に加水分解された後、カルボキシル基とクロル基の分子内反応によりHLが生成されることが示唆された。EnHCHは脱ハロゲン化および脱クロル化酵素と相同性はない。しかしながら、有機化学法では1N HCl、高温条件でも加水分解後の中間体である4-Chloro-3-hydroxybutyric acidが反応進行中に検出される⁴⁵⁾のに対し、EnHCHによる反応ではpH中性、30°C条件下で検出されないため、ラクトン化にも本酵素が関与していることが考えられる。

EnHCH遺伝子のすぐ上流に3-Hydroxybutyrate dehydrogenaseと高い相同性のアミノ配列をコードする遺伝子が存在した。本遺伝子は一般にPoly(3-hydroxybutyrate)を炭素源として蓄積する微生物に見られ、分解された3-Hydroxybutyrateは3-Hydroxybutyrate dehydrogenaseによってAcetoacetateに酸化された後、Succinyl-CoA transferase またはAcetoacetyl-CoA synthetase によってAcetoacetyl-CoAに活性化され、 β -Ketothiolaseによって2分子のAcetyl-CoAを生成しTCAサイクル等にて代謝される⁵⁴⁻⁵⁶⁾。基質特異性試験において、3HBEに対して最も高活性であったこと、および

Nitrophenyl esterの中でもブチルエステルに対して最も高活性であったことからEnHCHもこの一連の代謝経路に関与していることが示唆された。本代謝経路でEnHCHのようなエステル化または加水分解反応を担う酵素はこれまでに報告されていないが、DS-S-75 株が高溶存酸素下で、菌体増殖により活性が低いのは、本代謝経路に関与することにより発現が制御されていることが考えられる。

DS-S-75 株からクローニングした DNA 断片中には、EnHCH 遺伝子の開始コドン

と考えられる配列が 3 ヶ所存在した。組換え大腸菌での発現試験の結果、2 番目の ATG から発現させると菌体あたりの活性が最も高いこと(JM109(pKK-E4))、SD 配列と推定される DNA 配列の位置、および 3 番目の ATG から発現させると発現量が著しく低いことから(JM109(pKK-E5))、2 番目の ATG が翻訳開始点であることが示唆された。その結果、*EnHCH* 遺伝子は 1104 bp で 367 アミノ酸をコードしていることが示された。また、DS-S-75 株から精製した *EnHCH* の N 末端配列は、塩基配列から推定されるアミノ酸の N 末端配列よりも 25 残基内部に存在したことから、DS-S-75 株において翻訳後のプロセッシングが行われていることが示された。本配列は疎水性アミノ酸に富んでいること、および AXA からなる切断認識の保存配列の存在からシグナル配列であることが考えられる。SDS-PAGE において、組換え *EnHCH* は DS-S-75 株から精製した酵素と同じ分子量であり、N 末端配列も同じであったことから、大腸菌でも翻訳後のプロセッシングが行なわれていることが示された。本配列が欠損すると発現量が著しく低いことから(JM109(pKK-E6))、この N 末端配列が安定した遺伝子発現に重要であることが考えられる。また、組換え大腸菌でも DS-S-75 株と同様に培養液が活性を示すため、培養液に直接(*R,S*)-CHBM を添加しても反応させることが可能であり、培地には活性を示さないことから、*EnHCH* はペリプラズムに局在していることが考えられ、これには N 末端配列が関与している可能性が高い。

本来の開始コドンから翻訳させるために pKK-E4 を導入した大腸菌の場合、生育阻害が生じ、過剰な高発現により大腸菌の代謝経路に影響を及ぼすことが示唆された。一方、pKK-E3 を使用すれば、適度な発現量のため生育阻害は生じなかった。組換え大腸菌 DH5 α (pKK-E3)を用いて CHBM の光学分割反応を行なうと、構成的に *EnHCH* が高発現された結果、培養液あたりの酵素量が多くなり、DS-S-75 株と比較して反応速度、反応可能な CHBM 濃度が向上した。また、(*S*)-HL の光学純度が高くなったことから、*EnHCH* 酵素は本来 CHB に対する立体選択性は非常に高く、光学分割に相応しい優秀な酵素であった。DS-S-75 株の菌体反応では、(*S*)-HL の光学純度を下げる要因として他の酵素の存在等が考えられた。組換え大腸菌でも DS-S-75 株の菌体反応と同様に菌体破碎や洗浄菌体の調製が必要なく、反応に補酵素などの高価な添加物を必要としないことから、簡便な反応系で利用できた。また DS-S-75 株と異なり、培養条件に影響なく構成的に発現するため、製造プロセスにおける安定した再現性が期待できる。さらに、高活性な培養液を水で 10 倍希釈して反応液として用いることにより、培養コストの削減、反応液から光学活性体の精製収率の向上が期待できる。

一方、ショットガン法によってクローニングした DS-S-51 株由来の酵素遺伝子は、 β -ラクタマーゼやエステラーゼ等の加水分解酵素と高い相同性があった。組換え大

腸菌 JM109(pKK-R1)は、2HBM および 3HBE に対しては活性を示さずに CHB へのみ活性を示したことから、CHB Hydrolase from *Rhizobium* sp. (RhCHBH)と命名した。RhCHBH は EnHCH と同様に CHB を光学分割するが、基質特異性、立体選択性、保存アミノ酸配列、サブユニット構造およびシグナル配列に違いが見られた。組換え大腸菌により反応速度が向上したため、DH5 α (pKK-E3)と同様に 10 倍希釈して反応液として用いることができた。しかし、(R)-HL の光学純度は向上せず、CHB に対して EnHCH よりも立体選択性が低い酵素であることがわかった。各種 *p*-Nitrophenyl ester に対する反応性および相同性検索結果から、特異性を示す基質としてブタン酸よりも炭素数の少ない化合物が存在する可能性が高い。また、反応可能な CHBM 濃度は DS-S-51 株よりも向上したものの、DH5 α (pKK-E3)と比べると低かった。DS-S-51 株の酵素活性が低いことの他にシグナル配列が存在しないことも要因として考えられる。今後の課題として遺伝子を単離している利点を活かし、ランダム変異による立体選択性の向上、および *EnHCH* 遺伝子のシグナル配列の付加を行えば、さらに優秀な酵素への展開が期待できる。

一方、(R)-CHBMを基質として反応した結果、光学純度を落とすことなく(R)-HLに変換することができた。先述のように有機化学法では、本反応は 1N HCl、高温条件での反応が必要であり、HLの光学純度の低下および 4-Chloro-3-hydroxybutyric acidならびにHLの脱水体が副産物として生成することから実用的ではない⁴⁴⁾。(R)-CHBM はDH5 α (pKK-E3)を用いて(R,S)-CHBMから得ることが可能であるため、両組換え大腸菌を使い分けることにより、安価な(R,S)-CHBMから簡便な方法でCHB、HLの両光学活性体を得ることが可能になった(Fig. 2-10)。

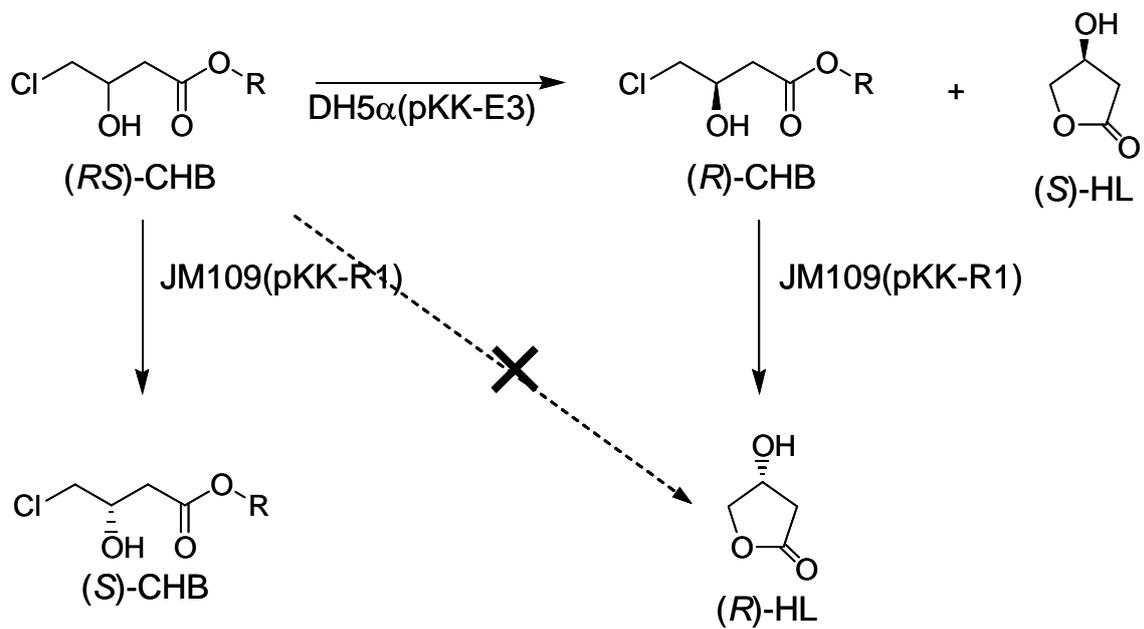


Fig. 2-10 Scheme for the production of optically active CHB and HL from (*R,S*)-CHB.

第三章 組換え大腸菌を用いたその他カルボン酸エステルの光学分割

3-1 序論

第一章および第二章では CHB の光学分割に関して述べたが、第一章において DS-S-75 株は、クロル基がない 3HBE、およびヒドロキシル基が 2 位に位置する 2HBM も立体選択的な加水分解反応により、一方のエナンチオマーをカルボン酸へと変換させた。第二章において精製した EnHCH は 3HBE、2HBM および EL に対して加水分解活性を示し、同酵素によって光学分割可能であることが期待されるが、未だ立体選択性は立証していない。

3HB は抗生物質⁵⁷⁾、生理活性物質⁵⁸⁾、香水⁵⁹⁾およびフェロモン⁶⁰⁾用途として有用なキラルビルディングブロックであり、CHB と同様に主に不斉還元法、または代謝経路を利用した発酵法⁶¹⁾により生成される。2HB や乳酸エステル等の 2-ヒドロキシカルボン酸エステルの光学活性体もまた医薬や抗生物質の中間体として有用なキラルビルディングブロックである⁶²⁾。さらに、D-乳酸はバイオプラスチックとして活用されている L-乳酸ポリマーとステレオコンプレックスを形成し、その熱安定性を増強させることが報告されており、近年注目されている (Fig. 3-1)⁶³⁾。光学活性 2-ヒドロキシカルボン酸エステルの有機化学的製法は、他の光学活性体やプロキラル化合物から誘導する方法が多く報告されているが、高価な前駆体が要求される^{64,65)}。また天然の光学活性体である D-Fructose を前駆体とする方法も報告されているが、 -70°C 以下の低温反応条件が要求され実用的ではない⁶⁶⁾。生物化学的製法は、不斉還元法¹⁹⁾およびラセミ体の立体選択的酸化反応^{67,68)}による光学分割が報告されているが、第一章で記述したように酸化還元反応には高価な補酵素が要求され、その反応制御も容易ではない。また、L-乳酸と同様に、D-乳酸も乳酸菌等による炭水化物の発酵により生成させることが報告されているが、微生物の代謝経路を利用するため、培養条件の検討が難しい^{69,70)}。また、生成した乳酸を培養液から回収、精製するためにはエステル化または重合を行なう必要がある。

また、これらの (*R,S*)-ヒドロキシカルボン酸エステルに対して立体選択性を示すエステラーゼ、リパーゼが報告されているが²⁴⁾、高い立体選択性を示し、高光学純度な光学活性体を得る方法は報告されていない。そこで、本章では、DH5 α (pKK-E3) を用いて 3HBE、2HBM および Ethyl lactate (EL) の光学分割反応を行ない、各光学活性体の製法を検討した。また、Tetrahydrofuran-2-carboxylic ester も β -ラクタム系抗生物質用途として有用な光学活性体であり (Fig. 3-2)、*Aspergillus melleus* 由来プロテアーゼを用いたラセミ体の光学分割による製法が報告されているが光学純度が低い⁷¹⁾。

EnHCHは本化合物のラセミ体も光学分割することが可能であり、そのメチルエステル(THFM)についても合わせて検討を行なった。

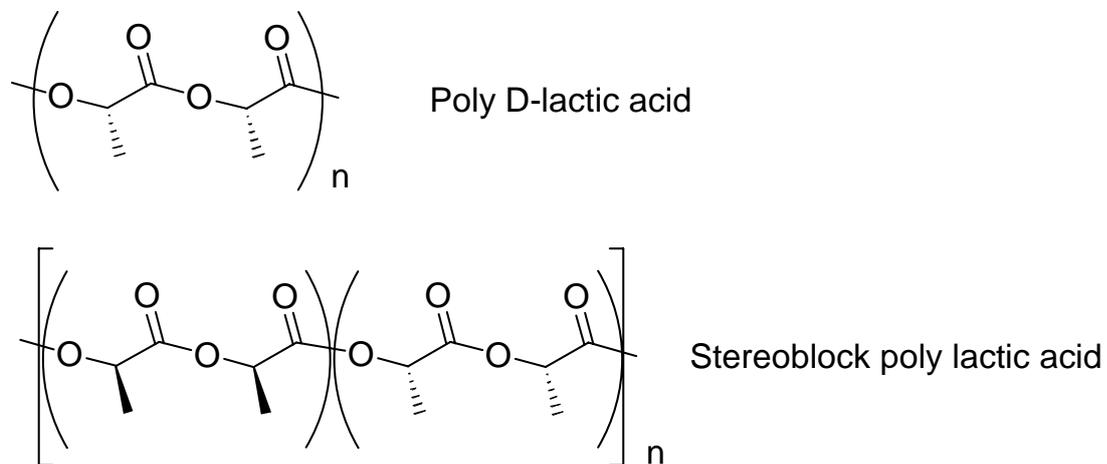


Fig. 3-1 Poly D-lactic acid and stereoblock poly lactic acid.

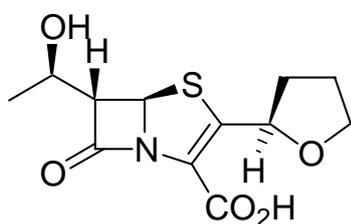


Fig. 3-2 Antibiotics that derive from THFM.

3-2 実験材料および方法

3-2-1 実験試薬

Methyl (*R,S*)-tetrahydrofuran-2-carboxylate (THFM) は、(*R,S*)-Tetrahydrofuran-2-carboxylic acid (THFA)(東京化成工業(株)製)からエステル化反応により合成した。その他のカルボン酸およびそのエステルは、東京化成工業(株)製を用いた。その他の試薬は特に指定のない限り、和光純薬工業(株)、ナカライテスク(株)、シグマアルドリッチ(株)製を用いた。

3-2-2 (*R,S*)-THFM の合成

メタノール 418 ml に THFA 150 g を加え、攪拌しながら硫酸 6 ml をゆっくりと滴下した。70°C で 10 hr 還流後、ジクロロメタン 550 ml で抽出し、有機層を pH 7.0 になるまで 5% 炭酸水素ナトリウムで洗浄した。さらに水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、80°C/20 mmHg にて蒸留した。合成した THFM は ¹H NMR により解析した。¹H NMR (CDCl₃, 270 MHz), δ 1.88-2.09 (m, 3H), 2.22-2.32 (m, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.90-4.06 (m, 2H), 4.47 (dd, *J*=5.1, 8.4 Hz, 1H)。

3-2-3 使用菌株

第二章で作製した DH5α(pKK-E3) を使用した。また対照実験として *Enterobacter* sp. DS-S-75 株を使用した。

3-2-4 ヒドロキシカルボン酸エステルの光学分割反応

500 mL 容バッフル付三角フラスコに栄養培地 B を 100 ml 調製し、DH5α(pKK-E3) 凍結保存バイアルから 1 ml を無菌的に植菌し、ロータリーシェイカーにて 130 rpm、30°C にて 20 hr 培養した。培養液に 5 g の CaCO₃ および 3HBE、2HBM、EL または THFM のラセミ体を目的濃度になるように添加し、培養と同条件下で反応させた。1-2-4-1 で調製した DS-S-75 株の培養液 100 ml も同様に反応させた。

実用的な生産検討時には、上記と同条件で培養した 300 ml の DH5α(pKK-E3) 培養液をイオン交換水で 3 L に希釈し、各目的量のラセミ体を加え 5 L ジャーファーマンターにて反応した。中和剤は 3HBE、2HBM の反応には 25%(w/w) NaOH を用い、EL、THFM の反応には 14%(w/w) アンモニア水を用いた。

3-2-5 各光学活性体の回収、精製

反応液を UF 膜(分画分子量 50,000) により除菌し、3HBE、2HBM、THFM につい

ては、ろ液の 1/2 量の酢酸エチルにて 4 回抽出を行なった。EL については、ろ液の 1/2 量のジクロロメタンにて 4 回抽出を行なった。エステルを含む有機層を各々減圧濃縮し、3HBE、2HBM は 60°C/15 mmHg、EL は 40°C/20 mmHg、THFM は 80°C/20 mmHg にて蒸留した。

3HBA または 2HBA を含む水層を減圧濃縮し、2.3 L のメタノールに溶解した。減圧ろ過後さらに減圧濃縮し、1 L の 2-プロパノールを加えて 4°C で 24 hr 冷却し、ナトリウム塩として沈殿を回収、乾燥した。

3-2-6 分析方法

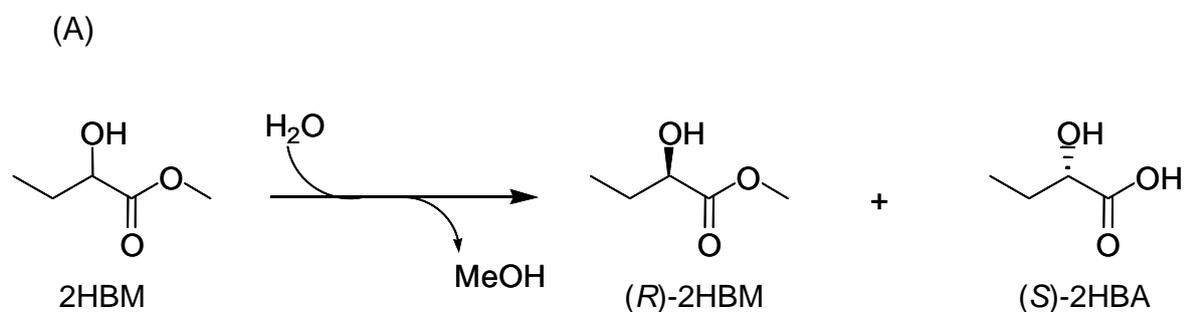
エステル体の濃度、光学純度、化学純度分析は 1-2-8 および 2-2-20-1 の方法により行なった。カルボン酸の濃度測定は、リン酸にて pH を 4.0 に調整した試料を 1-2-8 の濃度分析方法にて行なった。光学純度分析は 1-2-8 と同様にエチルエステルとして分析した。3HBA、2HBA の化学純度分析は(株)日立作所製 HPLC を使用した。カラム担体は ODS-AP(内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒子径 5 μm : ダイソー(株)製)を使用し、移動相 ; 0.1%リン酸水溶液を用いてカラム温度 ; 40°C、流速 ; 1.0 ml / min、検出器 ; UV 210 nm で行なった。

3-3 結果

3-3-1 組換え大腸菌によるヒドロキシカルボン酸エステルの光学分割反応

DH5 α (pKK-E3)培養液 100 ml に対して(*R,S*)-3HBE、(*R,S*)-2HBM は 8 g、(*R,S*)-EL、(*R,S*)-THFM は 2 g を添加して 30°C にて光学分割反応を行なった。結果を Table 3-1 に示す。3HBE については *S* 体エステル、2HBM、EL、THFM については *R* 体エステルが残存し、もう一方の光学活性体はカルボン酸へと変換された。いずれの反応もエステル体の光学純度は >98.0% e.e. になった。また、3HBE、2HBM については、生成したカルボン酸 ((*R*)-3HBA、(*S*)-2HBA) も光学純度が 98% e.e. 以上であり、高い E 値を示した。同様に DS-S-75 株の培養液を用いて同じ基質濃度で反応させた結果、エステル体、カルボン酸とも光学純度は同等であったが、各々の反応時間は 40 倍程度を要した。

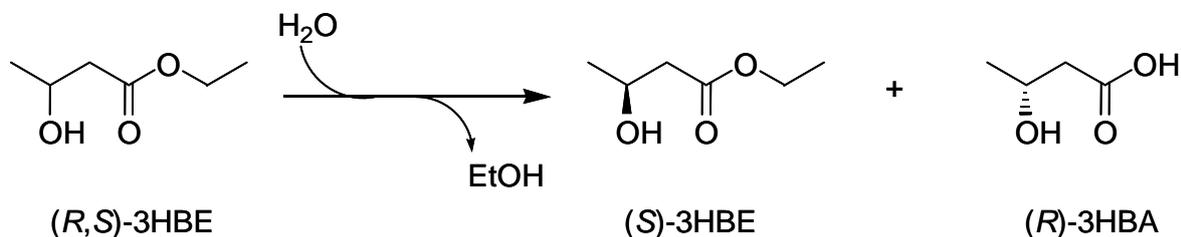
Table 3-1 The resolutions of various carboxylic esters using the strain DS-S-75 and *E.coli* transformant. (A) Methyl 2-hydroxybutyrate (2HBM). (B) Ethyl 3-hydroxybutyrate (3HBE). (C) Ethyl lactate (EL). (D) Methyl tetrahydrofuran-2-carboxylate (THFM).



Strain	(<i>R,S</i>)-2HBM	(<i>R</i>)-2HBM		(<i>S</i>)-2HBA		Reaction time (hr)	E value
	Concentration (w/v%)	Residual ratio (%)	Optical purity (%ee)	Conversion ratio (mol%)	Optical purity (%ee)		
DS-S-75	8	50.0	98.0	50.6	98.0	36	458
DH5 α (pKK-E3)	8	49.8	98.5	50.3	98.1	1.5	553

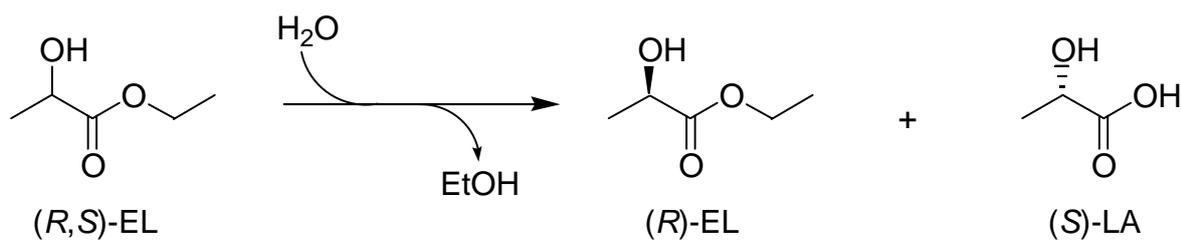
Residual ratio is indicated to be 100 % at initial time. Conversion ratio is shown by mol %. Optical purity is calculated from quantity of each enantiomer using formula: $|R-S| / (R+S) \times 100$. E value is calculated from optical purity of substrate (ester; eeS) and product (acid; eeP) using the formula: $\text{Ln}[(1-eeS) \times (eeP/(eeS+eeP))] / \text{Ln}[(1+eeS) \times (eeP/(eeS+eeP))]$.

(B)



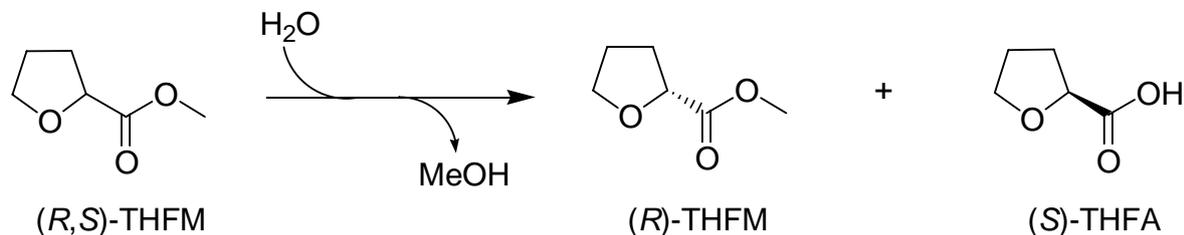
Strain	(R,S)-3HBE	(S)-3HBE		(R)-3HBA		Reaction time (hr)	E value
	Concentration (w/v%)	Residual ratio (%)	Optical purity (%ee)	Conversion ratio (mol%)	Optical purity (%ee)		
DS-S-75	8	49.7	99.5	50.1	99.0	6	1190
DH5 α (pKK-E3)	8	49.8	99.5	50.2	99.1	0.25	1330
	15	49.7	99.0	50.5	99.1	0.5	1175

(C)



Strain	(R,S)-EL	(R)-EL		(S)-LA		Reaction time (hr)	E value
	Concentration (w/v%)	Residual ratio (%)	Optical purity (%ee)	Conversion ratio (mol%)	Optical purity (%ee)		
DS-S-75	2	39.5	98.5	60.0	65.8	40	22.3
DH5 α (pKK-E3)	8	39.3	98.5	60.5	65.2	4	21.8

(D)



Strain	(R,S)-THFM	(R)-THFM		(S)-THFA		Reaction time (hr)	E value
	Concentration (w/v%)	Residual ratio (%)	Optical purity (%ee)	Conversion ratio (mol%)	Optical purity (%ee)		
DS-S-75	2	32.5	98.5	64.7	53.2	20	14.5
DH5 α (pKK-E3)	8	32.6	98.5	64.5	53.3	2	14.5

3-3-2 組換え大腸菌による光学活性ヒドロキシカルボン酸およびエステルの生産検討

300 ml の培養液を水で 3 L に希釈し、各種ラセミ体を添加して光学分割反応を行なった。その結果、最終濃度 15% で (R,S)-3HBE を反応させた結果、6 hr で (S)-3HBE の光学純度が 98% e.e. に到達した。また、(R,S)-2HBM、(R,S)-EL、(R,S)-THFM については、最終濃度 8% で、各々 20 hr、72 hr、20 hr でエステル体の光学純度が 98% e.e. に到達した。3-3-1 の結果と同様に 3HBE、2HBM については、生成したカルボン酸も光学純度が 98% e.e. 以上であった。DS-S-75 株の培養液を用いて、同じラセミ体濃度で反応させた場合は希釈を行わずに反応させたが、(R,S)-2HBM で 36 hr を要して分割できた以外は、エステル体の光学純度 99% e.e. に到達せずに反応が途中で停止した。

光学分割反応後、UF膜で除菌し、溶媒抽出、濃縮、蒸留により、ろ液から光学活性エステルの回収、精製を行なった。その結果、(S)-3HBE (o.p. 99.5% e.e., c.p. >99.0%, $[\alpha]_D^{20} = +18.0$ (neat)), (R)-2HBM (o.p. 98.5% e.e., c.p. >99.0%, $[\alpha]_D^{20} = +2.45$ (neat)), (R)-EL (o.p. 98.5% e.e., c.p. >99.0%, $[\alpha]_D^{20} = +11.2$ (neat)), (R)-THFM (o.p. 98.5% e.e., c.p. >99.0%, $[\alpha]_D^{20} = -17.7$ (neat)) を得た。ラセミ体からの収率は (S)-3HBE 36.4%、(R)-2HBM 32.4%、(R)-EL 34.5%、(R)-THFM 23.4% であった。また、溶媒抽出後の水層を濃縮し、2-プロパノールによる塩析を行い、(R)-3HBA、(S)-2HBA をナトリウム

塩として(*R*)-3HBNa (o.p. 99.1% e.e., c.p. >99.0%, $[\alpha]_D^{20} = -14.1$ (c 10 H₂O)), (*S*)-2HBNa (o.p. 99.1% e.e., c.p. >99.0%, $[\alpha]_D^{20} = -10.4$ (c 10 H₂O))を得た。ラセミ体からの収率は各々15.5%、16.7%であった。

3-4 考察

組換え大腸菌 DH5 α (pKK-E3)を用いて 3HBE、2HBM を光学分割した結果、非常に高い立体選択性を示し、加水分解反応によりカルボン酸へと変換された。また、EL、THFM を光学分割した結果、変換された *S* 体カルボン酸の光学純度は高くなかったが、*R* 体のエステルは高光学純度で残存された。*R* 体は非天然体であることから付加価値の高い化合物であり、エステル体は培養液からの回収精製が容易であるため好都合であった。本章で試みた各種エステルは、化学的性質の大きく異なるカルボン酸へと変換されたため、CHB、HL の場合と同様に光学分割反応後の光学活性体の分離が容易であった。エステルからカルボン酸への加水分解反応およびその逆のエステル化反応は、有機合成の常法によって光学純度を落とすことなく容易に変換可能であるので、3HB、2HB についてはラセミ体から両方の光学活性体を 1 反応で得られることになる。EL、THFM については立体選択性が低いため、光学分割反応後に活性が残っていると、光学活性エステルの回収時に収率の低下が懸念されるが、遠心分離や膜ろ過によって除菌を行えば培地には活性を示さないため、これを防ぐことが可能である。また、高活性な培養液を水で 10 倍希釈して反応液として用いることにより、第二章の CHB の光学分割反応と同様に、培養コストの削減、反応液から光学活性体の精製収率の向上が期待できる。以上のように、EnHCH の基質特異性を活用して、CHB 同様に各種カルボン酸エステルを簡便に光学分割することができた。

試験した 4 種類の化合物について、残存エステル、生成カルボン酸の光学純度、収率が DH5 α (pKK-E3)と DS-S-75 株ではほぼ同等であり、ベクターのみ導入した組換え大腸菌は全く活性を示さなかった。DH5 α (pKK-E3)が示す基質特異性は EnHCH のそれを表しており、EnHCH はこれらのラセミ体に対しても立体選択的な加水分解活性を示すことが確認できた。DH5 α (pKK-E3)において DS-S-75 株と比較して反応速度および基質濃度が向上したのは、組換え大腸菌にて多くの酵素が発現された結果である。第二章で、EnHCH は不斉中心を形成させる側鎖に関して、アミノ基やクロール基を持つ化合物には活性を示さず、ヒドロキシル基を持つ化合物にのみ活性を示したことから、ヒドロキシル基を立体選択的に認識していることが認められた。さらに本章では 3HBE に対する活性は、2HBM に対する活性よりも高いため、3 位のヒドロキシル基に特異性が高いことがわかった。また C3 の EL 対しては、C4 の 2HBM と比較して、反応速度および立体選択性が劣り、*p*-Nitrophenyl ester に対しても C4 が最も高活性であったことから、C4 に対して特異性が高いことが認められた。

これらの知見からも 3HBE に対して反応速度、立体選択性が高く、DS-S-75 株において本酵素は第二章にて考察した 3-Hydroxybutyrate の代謝経路に機能していることがより示唆された。

総括

本研究により、CHB のラセミ体を光学分割する有用な微生物(*Enterobacter* sp. DS-S-75 株、*Rhizobium* sp. DS-S-51 株)を土壌より単離した。特に高活性で各種ヒドロキシカルボン酸エステルを光学分割する EnHCH 酵素および遺伝子を解析した結果、Poly(3-Hydroxybutyrate) を炭素源として蓄積する微生物に見られる 3-Hydroxybutyrate の代謝経路に関わる加水分解酵素であることが示唆された。また、単離した各々の遺伝子(*EnHCH*、*RhCHBH*)を導入した組換え大腸菌を用いて光学活性 CHB、HL、その他各種カルボン酸およびエステルの安価で簡便な実用生産方法を確立した。

光学活性体の製法は緒言で記述の通り、有機化学法、物理化学法、生物化学法等が知られているが、一昔前までは生物化学法で得られた光学活性体を物理化学法で光学純度を上げたり、有機化学法で他の光学活性体へ誘導する方法が主流であった。しかし、近年の光学分離技術の発展に伴って、生物化学法を利用せずに有機化学法、物理化学法のみで光学活性体を得る方法も発展してきた。特に有機化学法では有用な不斉触媒が開発され、生体触媒と競うことが多くなった。Ru-BINAP 錯体の不斉還元触媒の功績によるノーベル化学賞 (2001 年) は記憶に新しい。生物化学法は、温和な条件下で反応することができるため、安全かつ環境に優しく、スクリーニングにより多様な反応を生体から見出すことができることが長所であるが、一方で釜効率 (発酵、反応スケールあたりの光学活性体の生産量) が低いこと、反応の安定性および再現性が低い等の短所がある。これらを回避するために、菌株の育種や酵素の固定化等の改良、より有効な微生物、酵素のスクリーニングによる高活性化が常に行なわれている。遺伝子組換え技術も改良法の一つであるが、目的とする反応を担う酵素をクローニングし、他の宿主に導入して得られた組換え体を使用する場合、組換え体が目的とする活性を示すかがポイントとなるため、親株の反応系がなるべく簡便であることが望ましい。本研究で見出し、使用した 2 種類の酵素は各々 1 種類で反応を担い、1 つの遺伝子の発現により適応可能である。補酵素ならびに補助的な遺伝子は必要としない反応系である。さらに、このような簡便な反応系では、酵素または菌体を固定化して反応することも容易であると考えられ、今後検討を進める予定である。また、親株と近縁種で組換え体を作製することも望ましく、*Enterobacter* sp. は大腸菌と同じく腸内細菌であるため、大腸菌でも N 末端アミノ酸がプロセッシングされて、ホモ二量体を形成したことが推測される。組換え体の培養液に直接ラセミ体を添加して反応することが可能であり、除菌によって活性が無

くなることも含めて親株の性質に近い組換え体を作製することができた。

本法を CHB の従来の製法と比較すると、不斉還元法は基質の変換率が高くなるが、補酵素、補酵素再生用（還元用）の基質（Glucose や 2-Propanol など）が必要である。比べて本法はこれらを要求せず、また培養スケールが反応スケールの 1/10 量で行えるため、人件費、設備費、原材料の入手条件など、原材料の使用量以外の条件が同じであれば安価に製造可能である。さらに、組換え大腸菌 DH5 α (pKK-E3)を用いれば、副産物として高光学純度の(S)-HL も同時に得ることができ、その他の光学活性カルボン酸およびエステルの製法にも応用できる。また、JM109(pKK-R1)も合わせて用いれば、(R,S)-CHB から CHB、HL の両光学活性体を得ることが可能である。

以上のように、本研究は生物化学法による光学活性体の製法の模範となる応用例であり、光学活性 CHB およびその他の光学活性カルボン酸およびエステルの従来法と比較して優れた製法でもある。得られた知見をもとに、現在、産業利用において法律が定める GILSP(Good Industrial Large Scale Practice)拡散防止対応の 50 L および 1 kL 培養槽を用いてスケールアップを行なっている。最後に、本研究由来の各種光学活性体がキラルビルディングブロックとして、医薬合成、新素材などの用途に多く利用され、世界の人々の健康と豊かな生活に貢献できることを願っている。また、有機化学法、物理化学法、生物化学法の各技術が競い、各分野の長所を伸ばし、短所を補ったハイブリッドプロセスを開発することで、今後もさらに多くの有用なキラルビルディングブロックが開発されることを切望している。

謝辞

本研究にあたり終始御懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました奈良先端科学技術大学院大学教授 新名惇彦先生、同助教 加藤晃先生に深く御礼申し上げます。また、種々有益なるご助言と討論を賜りました奈良先端科学技術大学院大学准教授 吉田和哉先生、同助教 仲山英樹先生に深甚なる謝意を表します。また、研究に関するご教示とご助言ならびに激励を賜りましたダイソー株式会社主席研究員鈴木利雄博士に慎んで深謝致します。

また、種々有益なご助言を賜りました柴谷武爾博士、大阪市立大学名誉教授 南浦能至先生に感謝致します。

また、共同研究者であり本研究にご協力いただきましたダイソー株式会社井戸垣秀聡課長、鈴木隆浩研究員に感謝致します。

また、本研究にご協力頂きました奈良先端科学技術大学院大学新名研究室のスタッフ、学生の皆様、そしてダイソー株式会社研究所生物化学グループの皆様に感謝致します。

最後に、本研究をまとめる機会を与えていただきましたダイソー株式会社専務取締役 橋本明研究開発本部長ならびに同理事 古川喜朗研究所長に深く感謝いたします。

参考文献

1. Jung, M. E., and Shaw, T. J. (1980). Total synthesis of (*R*)-glycerol acetonide and the antiepileptic and hypotensive drug (-)- γ -amino- β -hydroxybutyric acid (GABOB). Use of Vitamin C as a chiral starting material. *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 6304-6311.
2. Bock, K., Lundt, I., and Pedersen, C. (1983). Synthesis of *S*- and *R*-4-amino-3-hydroxybutyric acid (GABOB) and *S*- and *R*-carnitine from arabinose or ascorbic acid. *Acta Chem. Scand. B.*, 37, 341-344.
3. Rossiter, B. E., and Sharpless, K. B. (1984). Asymmetric epoxidation of homoallylic alcohols. Synthesis of (-)- γ -amino- β (*R*)-hydroxybutyric acid (GABOB). *J. Org. Chem.*, 49, 3707-3711.
4. Karanewsky, D. S., Badia, M. C., Ciosek, C. P. Jr., Robl, J. F., Sofia, M. J., Simpkins, L. M., DeLange, B., Harrity, T. W., Biller, S. A., and Gorden, E. M. (1990). Phosphorous containing inhibitors of HMG-CoA reductase. 1. 4-[2-(Arylethyl)hydroxyphosphinyl]-3-hydroxy-butanoic acids: A new class of cell-sensitive inhibitors of cholesterol biosynthesis. *J. Med. Chem.*, 33, 2925-2956.
5. Zhou, B., Gopalan, A.S., VanMiddlesworth, F., Shieh, W.-R., and Sih, C.J. (1983). Stereochemical control of yeast reductions. 1. Asymmetric synthesis of L-carnitine. *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 5925-5926.
6. Kitamura, M., Ohkuma, T., Takaya, H., and Noyori, N. (1988). A practical asymmetric synthesis of carnitine. *Tetrahedr. Lett.*, 29, 1555-1556.
7. Kasai, N. and Sakaguchi, K. (1992). An efficient synthesis of (*R*)-carnitine. *Tetrahedr. Lett.*, 33, 1211-1212.
8. Pifferi, G., and Pinza, M. (1977). Cyclic GABA-GABOB analogues. I. Synthesis of new 4-hydroxy-2-pyrrolinone derivatives. *Farmaco. Ed. Sci.*, 32, 602-613.
9. Pellegata, R., Pinza, M., and Pifferi, G. (1978). An improved syntheses of γ -, δ -

- ϵ -lactams. Synthesis, 614-616.
10. Santaniello, E., Casati, R., and Milani, F. (1984). Chiral synthesis of a component of *Amanita muscaria*, (*S*)-(-)-4-hydroxypyrrolidin-2-one, and assessment of its absolute configuration. *J. Chem. Res.*, 132-133.
 11. Bare, G., Jaques, P., Hubert, J. B., Rikir, R., and Thonart, P. (1991). Bioconversion of an L-carnitine precursor in a one- or two-phase system. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 28-29, 445-456.
 12. Shimizu, S., Kataoka, M., Morishita, A., Katoh, M., Morikawa, T., Miyoshi, T., and Yamada, H. (1990). Microbial asymmetric reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate to optically active ethyl 4-chloro-3-hydroxybutanoate. *Biotechnol. Lett.*, 12, 593-596.
 13. Hunt, J. R., Carter, A. S., Murell, J. C., Dalton, H., Hallinan, K. O., Crout, D. H. G., Holt, R. A., and Crosby, J. (1995). Yeast-catalysed reduction of β -keto esters. 1. Factors affecting whole-cell catalytic activity and stereoselectivity. *Biocatal. Biotransform.*, 12, 159-178.
 14. Hallinan, K. O., Crout, D. H. G., Hunt, J. R., Carter, A. S., Dalton, H., Murrell, J. C., Holt, R., and Crosby, J. (1995). Yeast-catalysed reduction of β -keto esters. 2. Optimization of the stereospecific reduction by *Zygosaccharomyces rouxii*. *Biocatal. Biotransform.*, 12, 179-191.
 15. Yamamoto, H., Matsuyama, A., and Kobayashi, Y. (2002). Synthesis of ethyl (*R*)-4-chloro-3-hydroxybutanoate with recombinant *Escherichia coli* cells expressing (*S*)-specific secondary alcohol dehydrogenase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 481-483.
 16. Kitamura, M., Tokunaga, M., Ohkuma, T., and Noyori, R. (1991). Convenient preparation of BINAP-Ruthenium (II) complexes catalyzing symmetric hydrogenation of functionalized ketones. *Tetrahedr.Lett.*, 32, 4163-4166.
 17. Davies, S. G., and Ichihara, O. (1996). Asymmetric synthesis of (+)-negamycin. *Tetrahedron: Asymmetry.*, 7, 1919-1922.

18. Inoue, K., Makino, Y., and Itoh, N. (2005). Production of (*R*)-chiral alcohols by a hydrogen-transfer bioreduction with NADH-dependent *Leifsonia* alcohol dehydrogenase (LSADH). *Tetrahedron: Asymmetry*, 16, 2539-2549.
19. Yamamoto, H., Mitsuhashi, K., Kimoto, N., Matsuyama, A., Esaki, N., and Kobayashi, Y. (2004). A novel NADH-dependent carbonyl reductase from *Kluyveromyces aestuarii* and Comparison of NADH-Regeneration System for the synthesis of ethyl (*S*)-4-chloro-3-oxobutanoate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 638-649.
20. Saratani, Y., Uheda, E., Yamamoto, H., Nishimura, A., and Yoshizako, F. (2001). Stereoselective reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate by fungi. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 1676-1679.
21. Kizaki, N., Yasohara, Y., Hasegawa, J., Wada, M., Kataoka, M., and Shimizu, S. (2001). Synthesis of optically pure ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate by *Escherichia coli* transformant cells coexpressing the carbonyl reductase and glucose dehydrogenase genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55, 590-595.
22. Kasai, N. (1993). A new generation of C3 chiral building blocks. *Pharmaceutical Manufacturing International*, 147-151.
23. Denmark, S. E., and Ahmad, M. (2007). Carbonylative ring opening of terminal epoxides at atmospheric pressure. *J. Org. Chem.*, 72, 9630-9634.
24. Liu, A. M. F., Somers, N. A., Kazlauskas, R. J., Brush, T. S., Zocher, F., Enzelberger, M. M., Bornscheuer, U. T., Horsman, G. P., Mezzetti, A., Schmidt-Dannert, C., and Schmid, R. D. (2001). Mapping the substrate selectivity of new hydrolase using colorimetric screening: lipases from *Bacillus thermocatenuatus* and *Ophiostoma piliferum*, esterases from *Pseudomonas fluorescens* and *Streptomyces diastatochromogenes*. *Tetrahedron: Asymmetry*, 12, 545-556.
25. Komagata, K. (1981). Classification and identification of aerobic bacteria. In: *Classification and identification of microorganisms* (Hasegawa, T., Ed.). Gakkai Syuppan Center, Tokyo, 203-245.

26. Barrow, G. I. and Feltham, R.K.A. (1993). Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria, 3rd edition. Cambridge university press.
27. Krieg, N. R. and Holt, J. G. (1984). Bergey's manual of systematic bacteriology, vol.1. Williams and Willkins, Baltimore.
28. Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994). Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl. Acids Res., 22, 4673-4680.
29. Kumar, S., Tamura, K., and Nei, M. (2004). Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Brief. in Bioinform., 5, 150-163.
30. Iwasaki, I., Utsumi, S., and Ozawa, T. (1952). New colorimetric determination of chloride using mercuric thiocyanate and ferric ion. Bull. Chem. Soc. Jpn., 25, 226.
31. Kasai, N., Tsujimura, K., Unoura, K., and Suzuki, T. (1990). Degradation of 2,3-dichloro-1-propanol by a *Pseudomonas*. Agric. Biol. Chem., 54, 3185-3190.
32. Kasai, N., Tsujimura, K., Unoura, K., and Suzuki, T. (1992). Isolation of (*S*)-2,3-dichloro-1-propanol assimilating bacterium, its characterization, and its use in preparation of (*R*)-2,3-dichloro-1-propanol and (*S*)-epichlorohydrin. J. Ind. Microbiol., 9, 97-101.
33. van den Wijngaard, A. J., Janssen, D. B., and Witholt, B. (1989). Degradation of epichlorohydrin and haloalcohols by bacterial cultures isolated from freshwater sediment. J. Gen. Microbiol., 135, 2199-2208.
34. van den Wijngaard, A. J., Reuvekamp, P. T. W., and Janssen, D. B. (1991). Purification and characterization of haloalcohol dehalogenase from *Arthrobacter* sp. Strain AD2. J. Bacteriol., 173, 124-129.
35. Nakamura, T., Nagasawa, T., Yu, F., Watanabe, I., and Yamada, H. (1992). Resolution and some properties of enzyme involved in enantioselective transformation of 1,3-dichloro-2-propanol to (*R*)-3-chloro-1,2-propanediol by *Corynebacterium* sp. Strain

- N-1704. *J. Bacteriol.*, 174, 7613-7619.
36. Suzuki, T., Kasai, N., and Minamiura, N. (1994). A novel generation of optically active 1,2-diols from the racemates by using halohydrin dehydro-dehalogenase. *Tetrahedr Asym.*, 5, 239-246.
37. Makita, A., Nihira, T., and Yamada, Y. (1987). Lipase catalyzed synthesis of macrocyclic lactones in organic solvent. *Tetrahedr. Lett.*, 28, 805-808.
38. Kageyama, Y., Nihira, T., and Yamada, Y. (1990). Lipase-catalyzed synthesis of macrocyclic lactones in organic solvent. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 613, 681-685.
39. Ihara, F., Kageyama, T., Hirata, M., Nihira, T., and Yamada, Y. (1991). Purification, characterization, and molecular cloning of lactonizing lipase from *Pseudomonas* sp. *J. Biol. Chem.*, 299, 18135-18140.
40. Yamada, H., Sugiyama, H., and Kajiwara, M. (1987). Synthesis of (*S*)-*N*-(benzyloxy)-4-acetoxymethyl-2-azetidione, potential intermediate for carbapenem antibiotics, by chemomicrobiological approach. *Heterocycles*, 26, 2841-2844.
41. Mori, K., Takigawa, T., and Matsuo, T. (1979). Synthesis of optically active forms of ipsdienol and ipsenol. *Tetrahedron*, 35, 933-940.
42. Saito, S., Hasegawa, T., Inaba, M., Nishida, R., Fujii, T., Nomizu, S., and Moriwake, T. (1984). Combination of borane-dimethyl sulfide complex with catalytic sodium tetrahydroborate as a selective reducing agent for α -hydroxy esters, versatile chiral building block from (*S*)-(-)-malic acid. *Chem. Lett.*, 1389-1392.
43. Tanaka, A., and Yamashita, K. (1987). A novel synthesis of (*R*)- and (*S*)-4-hydroxytetrahydrofuran-2-ones. *Synthesis*, 570-573.
44. Henrot, S., Larcheveque, M., and Petit, Y. (1986). Amino acids as chiral synthons: Preparation of enantiomerically pure (*R*)- and (*S*)-malic acids and its application to the synthesis of 3-hydroxy-4-butanolide. *Syn. Commun.*, 16, 183-190.

45. Yuasa, Y., and Tsuruta, H. (1997). Practical syntheses of (*S*)-4-hydroxytetrahydrofuran-2-one, (*S*)-3-hydroxytetrahydrofuran and their (*R*)-enantiomers. *Liebigs Ann./Recueil*, 1877-1879.
46. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33, 103-119.
47. Grant, S. G. N., J. jessie, F. R. Bloom, and D. Hanahan. (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4645-4649.
48. Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7, 1513-1523.
49. Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96, 23-28.
50. Bradford, M. M. (1976). A rapid sensitive method for the quantitative analysis of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
51. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
52. Sakai, Y., Ishikawa, J., Fukusaka, S., Yurimoto, H., Mitsui, R., Ynase, H., and Kato, N. (1999). A new carboxylesterase from *Brevibacterium linens* IFO 12171 responsible for the conversion of 1,4-butanediol diacrylate to 4-hydroxybutyl acrylate: purification, characterization, gene cloning, and gene expression in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 688-697.
53. Kotani, T., Yurimoto, H., Kato, N., and Sakai, Y. (2007). Novel Acetone Metabolism in a Propane-Utilizing Bacterium, *Gordonia* sp. Strain TY-5. *J. Bacteriol.*, 189, 886-893.
54. Takanashi, M., and Saito, T. (2006). Characterization of two 3-hydroxybutyrate

- dehydrogenases in poly(3-hydroxybutyrate)-degradable bacterium, *Ralstonia pickettii* T1. *J. Biosci. Bioeng.*, 101, 501-507.
55. Anderson, A.J., and Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.*, 54, 450-472.
56. Dawes, E. A., Senior, P. J. (1973). The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.*, 10, 135-266.
57. Chiba, T., Nakai, T. (1985). A synthetic approach to (+)-thienamycin from methylene (R)-3-hydroxybutanoate. *Chem. Lett.*, 651-654.
58. Lee, S. Y. (1996). Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 1-14.
59. Schnurrenberger, P., E. Hungerbuhler., and D. Seebach. (1987). Total synthesis of (+)-colletodiol from (S,S)-tartarate and (R)-3-hydroxybutanoate. *Liebigs Ann. Chem.*, 733-744.
60. Seebach, D., A. K. Beck, R. Breitschuh, and K. Job. (1992). Direct degradation of the biopolymer poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] to (R)-3-hydroxybutanoic acid and its methyl ester. *Org. Synth.*, 71, 39-47.
61. Lee, S. Y., and Lee, Y. (2003). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of enantiomerically pure (R)-(-)-hydroxycarboxylic acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 3421-3426.
62. Karl, J. H., Jiaqiang, C., Soraya, M., and Andrew, P. S. (1995). Synthetic studies on the azinotrin family of antibiotics. 4. Enantioselective synthesis of the northern half of antitumor antibiotics A83586C and citropeptin. *Tetrahedron Lett.*, 36, 6965-6968.
63. Fukushima, K., Furuhashi, Y., Sogo, K., Miura, S., and Kimura, Y. (2005). Stereoblock Poly (lactic acid): Synthesis via Solid-State Polycondensation of a Stereocomplexed mixture of poly (L-lactic acid) and poly (D-lactic acid). *Macromol. Biosci.*, 5, 21-29.
64. Evans, D. A., Morrissey, M. M., and Dorow, R. L. (1985). Asymmetric oxygenation of

- chiral imide enolates. A general approach to synthesis of enantiomerically pure α -hydroxy carboxylic acid synthons. *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 4346-4348.
65. Corey, E. J., Link, J. O., and Shao, Y. (1992). Two effective procedures for the synthesis of trichloromethyl ketones, useful precursors of chiral α -amino and α -hydroxy acids. *Tetrahedron Lett.*, 33, 3435-3478.
66. Yu, H., Ballard, C. E., Boyle, P. D., and Wang, B. (2002). An inexpensive carbohydrate derivative used as a chiral auxiliary in the synthesis of α -hydroxy carboxylic acids. *Tetrahedron*, 58, 7663-7679.
67. Adam, W., Lazarus, M., Saha-Moller, C. R., and Schreier, P. (1998). Quantitative transformation of racemic 2-hydroxy acids into (*R*)-2-hydroxy acids by enantioselective oxidation with glycolate oxidase and subsequent reduction of 2-keto acids with D-lactate dehydrogenase. *Tetrahedron: asymmetry*, 9, 351-355.
68. Oikawa, T., Mukoyama, S., and Soda, K. (2001). Chemo-enzymatic D-enantiomerization of DL-lactate. *Biotechnol. Bioeng.*, 73, 80-82.
69. Zhou, S., Yomano, L. P., Shanmugam, K. T., and Ingram, L. O. (2005). Fermentation of 10% (w/v) sugar to D: (-)-Lactate by engineered *Escherichia coli* B. *Biotechnol. Lett.*, 27, 1891-1896.
70. Ishida, N., Suzuki, T., Tokuhira, K., Nagamori, E., Onishi, T., Saitoh, S., Kitamoto, K., and Takahashi, H. (2006). D-Lactic acid production by metabolically engineered *Saccaromyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.*, 101, 172-177.
71. Fujima, Y., Hirayama, Y., Ikunaka, M., and Nishimoto, Y. (2003). A scalable chemoenzymatic preparation of (*R*)-tetrahydrofuran-2-carboxylic acid. *Tetrahedron: Asymmetry*, 14, 1385-1391.

論文目録

学位論文の主たる部分を公表した論文

(題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)

Improvement on production of (R)-4-chloro-3-hydroxybutyrate and (S)-3-hydroxy- γ -butyrolactone with recombinant *Escherichia coli* cells.

Atsushi Nakagawa, Hideaki Idogaki, Ko Kato, Atsuhiko Shinmyo and Toshio Suzuki.

2006, Journal of Bioscience and Bioengineering, 101, 97-103.

Asymmetric hydrolysis of 2-hydroxy-carboxylic esters using recombinant *Escherichia coli*.

Atsushi Nakagawa, Ko Kato, Atsuhiko Shinmyo and Toshio Suzuki.

2007, Tetrahedron:Asymmetry, 18, 2394-2398.

Production of (S)-4-chloro-3-hydroxybutyrate by microbial resolution using hydrolase from *Rhizobium* sp. DS-S-51.

Atsushi Nakagawa, Takahiro Suzuki, Ko Kato, Atsuhiko Shinmyo and Toshio Suzuki.

2008, Journal of Bioscience and Bioengineering, in press.

参考論文

(題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)

クロロアルコール脱ハロゲン化酵素と光学分割への応用

中川 篤, 鈴木利雄

2007, 酵素工学ニュース, 58, 34-44.