

## 論文内容の要旨

申請者氏名 中 川 篤

抗生物質、高脂血症薬および生理活性物質等の優れたキラルビルディングブロックとして需要が高い 4-クロロ-3-ヒドロキシブタン酸エステル (CHB) のラセミ体を光学分割する高い立体選択性を示す微生物を取得し、反応の解析およびそれらの利用法を検討した。

- 1) ラセミ体 CHB を立体選択的に 3-ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトン(HL)に変換する微生物を、CHB エチル (CHBE)の脱クロル化反応を指標に土壌からスクリーニングし、光学純度 99 %e.e.以上で CHB の *R* 体または *S* 体を残存させる細菌を各 1 種類取得した。
- 2) *R* 体の CHBE を残存させる菌を *Enterobacter* sp.、*S* 体を残存させる菌を *Rhizobium* sp. と同定した。両菌はラセミ体 CHB の他方のエナンチオマーは脱クロル化を伴った加水分解反応により HL に変換した。
- 3) *Enterobacter* sp. の酵素は分子量 37,500 のサブユニットから成るホモ二量体であった。アミノ酸配列情報から遺伝子を単離した。ORF は 367 アミノ酸残基をコードし、N 末端配列はプロセッシングされることが判明した。本酵素をヒドロキシカルボン酸エステル加水分解酵素 Hydroxy Carboxylic ester Hydrolase from *Enterobacter* sp. (EnHCH) と命名した。EnHCH は単一酵素で加水分解、脱クロルを伴い CHB を HL に変換させるユニークな酵素であった。
- 4) EnHCH 遺伝子をベクター pKK223-3 に挿入し、組換え大腸菌 (DH5  $\alpha$ ) で発現させ CHBM の光学分割を行なった結果、反応速度は donor 株の 20 倍、生成 (*S*)-HL の光学純度も 99%e. e. 以上になった。
- 5) *Rhizobium* sp. の目的遺伝子を、脱クロル化反応を指標にショットガンクローニング法により単離した。ORF は 398 アミノ酸残基をコードし、pKK223-3 を用いて組換え大腸菌 (JM109) を作製した。組換え酵素は分子量 42,000 の単量体で、基質は CHB に特異的であり、CHB Hydrolase from *Rhizobium* sp. (RhCHBH) と命名した。
- 6) 組換え大腸菌による CHB メチル (CHBM) の光学分割の反応速度は donor 株の 40 倍に上昇したが、(*R*)-HL の光学純度は向上しなかった。(*R*)-CHBM を基質にすれば、光学純度を維持し (*R*)-HL に変換した。(*R*)-CHBM は組換え DH5  $\alpha$  を用いてラセミ体 CHBM から得られるので、両組換え大腸菌を使うことにより、両光学活性体が得られる。

以上、安価なラセミ体 CHB から簡便に高収率で CHB、HL の高光学純度の *R* 体、*S* 体を得ることに成功し、1kl 反応槽での実用生産段階に至った。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 中 川 篤

生体内において、薬効のない片方の光学活性体は異物となるため、不斉中心を有する新規合成医薬品はほとんどが光学活性体であり、光学活性中間体の市場は拡大しつつある。本論文では、需要が高い 4-クロロ-3-ヒドロキシブタン酸エステル (CHB) のラセミ体の細菌による工業的光学分割法の開発成果を記載している。

- 1) CHB エチルエステル (CHBE) を単一炭素源にして生育する微生物を土壌からスクリーニングし、ラセミ体 CHB から光学純度 99 %e.e. 以上で、*R* 体または *S* 体の CHBE を残存させる菌として、*Enterobacter* sp. と *Rhizobium* sp. 細菌を取得している。
- 2) 両菌はラセミ体 CHB の他方のエナンチオマーを、脱クロル化を伴った加水分解反応により 3-ヒドロキシ- $\gamma$ -ブチロラクトン (HL) に立体選択的に変換した。
- 3) *Enterobacter* sp. 培養菌体から酵素を精製し、単一酵素で加水分解、脱クロルを伴い CHB を HL に変換させるユニークな酵素であることを見出し、ヒドロキシカルボン酸エステル加水分解酵素 (EnHCH) と命名した。EnHCH は分子量 37,500 のサブユニットから成るホモ二量体であった。
- 4) アミノ酸配列に基づき DNA プローブを作成し *EnHCH* 遺伝子を単離し、組換え大腸菌 (DH5  $\alpha$ ) で発現させ CHBM の光学分割を行なった結果、反応速度が元株の 20 倍に上昇し、生成 (*S*)-HL の光学純度も 99%e. e. 以上と実用可能になったことを示している。
- 5) *Rhizobium* sp. の目的遺伝子も単離し、組換え大腸菌 (JM109) を作製している。組換え酵素の CHB に対する基質特異性は高く、CHB Hydrolase from *Rhizobium* sp. (RhCHBH) と命名した。
- 6) 組換え大腸菌 (JM109) による CHBM の光学分割の反応速度は元株の 40 倍にまで上昇したが、(*R*)-HL の光学純度は向上しなかった。そこで、*EnHCH* 遺伝子を保持する組換え大腸菌 (DH5  $\alpha$ ) により (*R*)-CHBM を生成し、それを基質に高光学純度の (*R*)-HL を得る方法を考案している。
- 7) 両組換え大腸菌を使い分けることにより、安価なラセミ体 CHB およびその類縁体から簡便な方法で CHB、HL の両光学活性体を得ることに成功している。

以上、本論文は、CHB の光学分割と高い光学純度の CHB、HL を生じる細菌の取得、酵素・遺伝子の単離と同定、組換え大腸菌による反応速度の上昇、実用生産プロセス開発まで、一貫した高度な成果を記載したもので学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。