

微生物酵素を用いた光学活性ピレスロイド中間体の  
製造に関する研究

2011年3月

奈良先端科学技術大学院大学  
物質創成科学研究科

西 澤 雅 子

## 目次

略記	5
緒言	6
第1章 菊酸エチルエステル不斉加水分解微生物内酵素の精製と性質	
1-1 序論	9
1-2 実験材料および方法	
1-2-1 実験試薬	11
1-2-2 培地	11
1-2-3 <i>Arthrobacter globiformis</i> SC-6-98-28 株のジャーファーメンター培養	11
1-2-4 不斉加水分解酵素精製	11
1-2-5 精製酵素の性質解析	12
1-2-6 ラセミ体菊酸エチルエステル不斉加水分解反応	13
1-2-7 カルボン酸エステル加水分解反応	13
1-2-8 分析方法	14
1-3 結果	
1-3-1 <i>A. globiformis</i> SC-6-98-28 株ジャーファーメンター培養	15
1-3-2 <i>A. globiformis</i> SC-6-98-28 株からの不斉加水分解酵素精製	15
1-3-3 精製した不斉加水分解酵素の物性解析	18
1-3-4 各種エステルに対する基質特異性解析および阻害剤感受性解析	20
1-4 考察	22
第2章 大腸菌組み換え体による光学活性菊酸の製造	
2-1 序論	23
2-2 実験材料および方法	
2-2-1 実験試薬	24
2-2-2 使用大腸菌およびプラスミド	24
2-2-3 精製酵素のアミノ酸配列解析	24

2-2-4	染色体 DNA 調製	25
2-2-5	サザンハイブリダイゼーション	25
2-2-6	コロニーハイブリダイゼーション	26
2-2-7	クローニングした断片の塩基配列決定	27
2-2-8	塩基配列改変による大腸菌内高発現	28
2-2-9	大腸菌組み換え体のラセミ体菊酸エチル不斉加水分解活性解析	29
2-2-10	大腸菌組み換え体の高密度培養	29
2-2-11	組み換えエステラーゼ精製	30
2-2-12	組み換えエステラーゼの CD スペクトル解析	30
2-2-13	ホローファイバーリアクターによるラセミ体菊酸エチル不斉加水分解	30
2-3 結果		
2-3-1	<i>A. globiformis</i> SC-6-98-28 株エステラーゼ遺伝子クローニング	32
2-3-2	塩基配列解析結果	32
2-3-3	上流および開始コドン近傍塩基配列改変による大腸菌内高発現	33
2-3-4	大腸菌組み換え体のラセミ体菊酸エチル不斉加水分解活性	34
2-3-5	大腸菌組み換え体の高密度培養	35
2-3-6	組み換えエステラーゼ精製と性質解析	38
2-3-7	大腸菌組み換え体を用いたラセミ体菊酸エチル不斉加水分解反応	39
2-3-8	ろ過システムによる高濃度ラセミ体菊酸エチル不斉加水分解反応	41
2-4 考察		
		44
第 3 章 不斉加水分解酵素の構造と活性		
3-1 序論		
		48
3-2 実験材料および方法		
3-2-1	実験試薬	49
3-2-2	アミノ酸配列アラインメント	49
3-2-3	$\beta$ ラクタム抗生物質および D-アミノ酸ペプチド加水分解活性測定	49
3-2-4	エステラーゼの DFP 修飾と断片化	49
3-2-5	ESI-MS 解析	50
3-2-6	FAB-MS 解析	50
3-2-7	PCR による部位特異的変異導入	50
3-2-8	変異酵素精製	51

3-2-9	野性型エステラーゼと変異酵素の活性測定	52
3-2-10	抗エステラーゼポリクローナル抗体作製	52
3-1-11	阻害剤 DFP との共有結合検出	52
3-2-12	変異酵素の CD スペクトル解析	53
3-2-13	システイン滴定	53
3-3 結果		
3-3-1	エステラーゼのアミノ酸配列相同性解析	54
3-3-2	$\beta$ ラクタム抗生物質および D-アミノ酸ペプチドに対する活性評価	57
3-3-3	エステラーゼの DFP 修飾と質量スペクトル測定による活性中心解析	57
3-3-4	部位特異的変異体の構築と精製	61
3-3-5	各変異酵素の 2 次構造解析	61
3-3-6	各変異酵素の菊酸エチル加水分解活性	62
3-3-7	各変異酵素のアシル化反応解析	63
3-3-8	K62R 変異酵素のエステル加水分解反応の pH プロファイル検討	64
3-3-9	C60A 変異酵素を用いた酵素内遊離システイン残基数測定	64
3-4 考察		
		66
総括		
		72
謝辞		
		74
参考文献		
		75

## 略記

API; *Achromobacter lyticus* lysyl endopeptidase EC 3.4.21.50

BSA; bovine serum albumin

CBB; Coomassie Brilliant Blue

DFP; diisopropyl fluorophosphate

DNA; deoxyribonucleic acid

DTNB; 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)

DTT; dithiothreitol

*E. coli*; *Escherichia coli*

EDTA; ethylene-diamine-tetraacetic acid

ESI-MS; electrospray ionization mass spectrometry

FAB-MS; fast atom bombardment mass spectrometry

HPLC; high-performance liquid chromatography

IPTG; isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside

MIBK ; methyl isobutyl ketone

PBPs ; penicillin-binding proteins

PCMB; *p*-chloromercuribenzoic acid

PCR; polymerase chain reaction

PMSF; phenyl methyl sulfonyl fluoride

PPD; phenolphthalein dibutyrate

SDS; sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE; SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

Tris; Tris(hydroxymethyl)aminomethane

S59A; site-directed mutagenesis from serine to alanine at position 59

## 緒言

近年、有用物質生産のための手法として、有機合成に加え、酵素あるいは微生物そのものを利用したバイオプロセスが用いられるようになってきた。酵素を触媒として用いることを考えた場合、元々生体内で働いているという性質上、高い基質特異性や温和な反応条件において触媒機能を発揮するという特徴を持つため、エネルギー消費を抑えることができる環境調和型のプロセス構築といえる。さらに、医薬農薬中間体の中には光学活性を示すものが多く存在するが、酵素の厳密な立体選択性を利用した製造法は、有用な光学活性中間体のみを製造し、その他の無用な立体異性体を作らないプロセスに繋がり、薬効が高く無効異性体による副作用リスクが回避された医薬農薬の創出にもつながる。

不斉中心を持つ医薬品の承認過程においては、過去の有害事象の経験から、異性体により薬効が異なる場合にはそれぞれの光学活性体の薬理活性および副作用データ提出が義務づけられた。それ以降、光学活性体は医薬品を中心に年々重要性を増しており、2000年代の前半には、世界で承認された不斉中心を持つ医薬品のうち、70%が光学活性体であり、ラセミ体で承認を取得している例は30%にとどまった。最近の新規医薬品創製に当たっては、ますます光学活性体が主流になってきている。一方、農薬や家庭防疫薬においては、純粋な光学異性体が最終製品となっている例はまだ少ないが、人体を含めた環境への影響に対する規制は年々厳しくなっており、近い将来非医薬品の分野においても薬効を示す異性体のみを用いる方向へ進むものと思われる。

除虫菊 (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) が産生する天然殺虫成分の1つとして同定されたピレトリン I は(1, 2, 3)、図1に示すシクロプロパンカルボン酸のシクロペンテノールエステルを基本骨格としている。

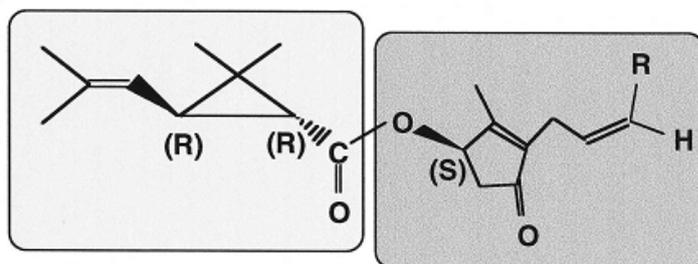


図1. 天然ピレトリンの構造

ピレトリン I は、即効性、致死性および揮散性という、総合的な殺虫効力を備えた理想的な化合物である。しかし、有機合成が困難な構造であることや、空気中で自動

酸化および樹脂化しやすいという難点も有している。この性質がアルコール側構造に起因することが明らかになってから、アルコール側構造を合成化学的に改変した、いわゆる合成ピレスロイド系殺虫剤(4, 5)が次々と発明され、現在に至るまで、家庭防除用および農業用殺虫剤として広く使用されている。その一部を図2に示した。

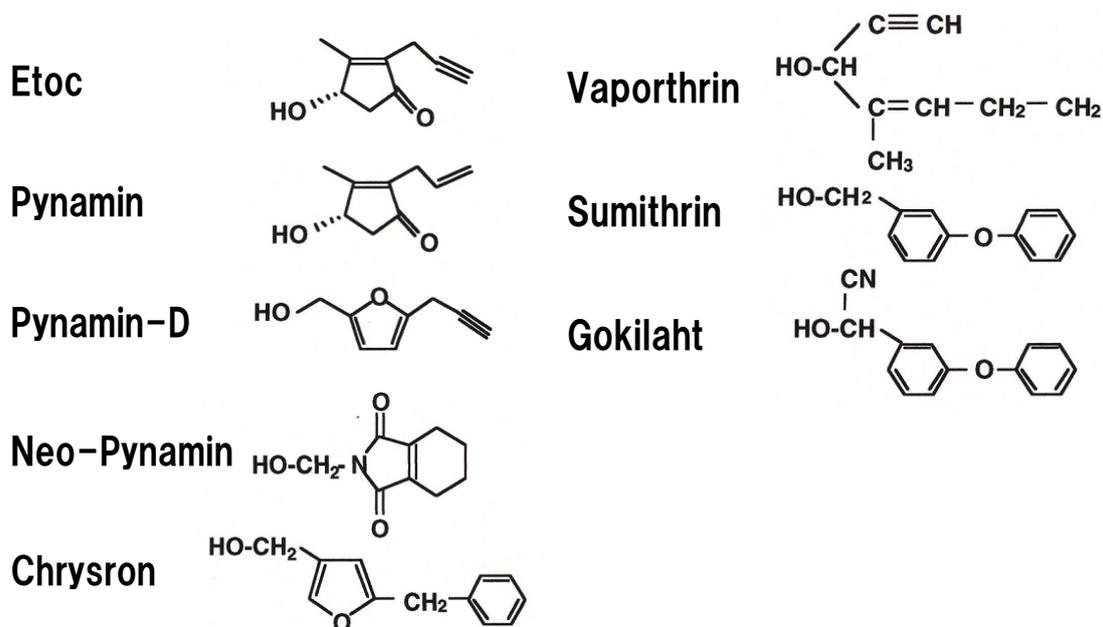


図2. 菊酸をカルボン酸とする合成ピレスロイド類のアルコール側構造

天然ピレトリンIの酸側成分である菊酸((1*R*,3*R*)-2,2-ジメチル-3-(2-メチル-1-プロペニル)シクロプロパンカルボン酸)は、ピレスロイド中間体の共通のカルボン酸側成分として広く用いられているが、天然ピレトリンIの菊酸が1*R*,3*R*体であるのに対して、合成ピレスロイド系殺虫剤のカルボン酸成分として使用されている菊酸は、混合比率は各々の殺虫剤で異なるものの、1位および3位の立体異性体の混合物である。

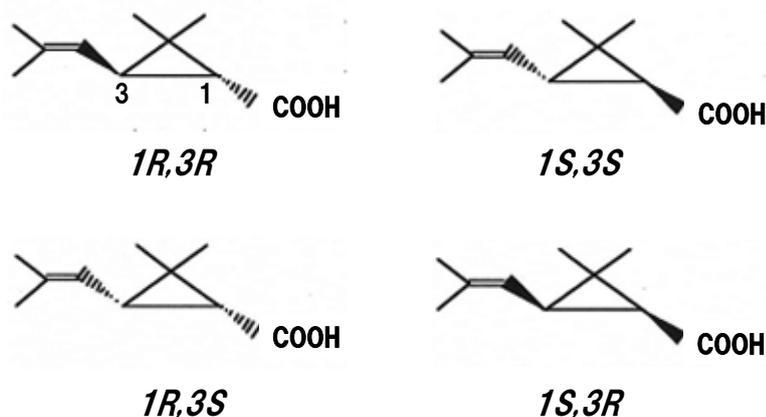


図3. 菊酸の4種の異性体構造

酵素反応の特徴を活かし、最も殺虫活性の高い異性体である *1R,3R* 配置の菊酸を製造することができれば、より比活性の高い殺虫剤の創製につながるばかりでなく、不要の立体異性体が環境に及ぼす影響も最小限にとどめることが可能になる。そこで、微生物酵素を用いた *1R,3R* 菊酸の製造により、光学活性菊酸を成分とする高効力で低毒性の合成ピレスロイド殺虫剤の創製を目指し、研究を行なった。

本論文は 3 章構成とした。第 1 章においては、菊酸エチルエステルを立体選択的に加水分解する微生物 *Arthrobacter globiformis* SC-6-98-28 株からの酵素精製と、精製した不斉加水分解酵素の基質特異性および性質解析について述べる。第 2 章では、酵素の生産性向上を目的として、不斉加水分解酵素遺伝子のクローニングと大腸菌における発現、高密度培養、および、組み換え大腸菌を用いた光学活性な *1R,3R* 菊酸調製法の検討について述べる。さらに、第 3 章においては、不斉加水分解酵素の触媒機構解析を目的として、阻害剤修飾および部位特異的変異の手法を用いた検討の結果について述べる。

## 第1章 菊酸エチルエステル不斉加水分解微生物内酵素の精製と性質

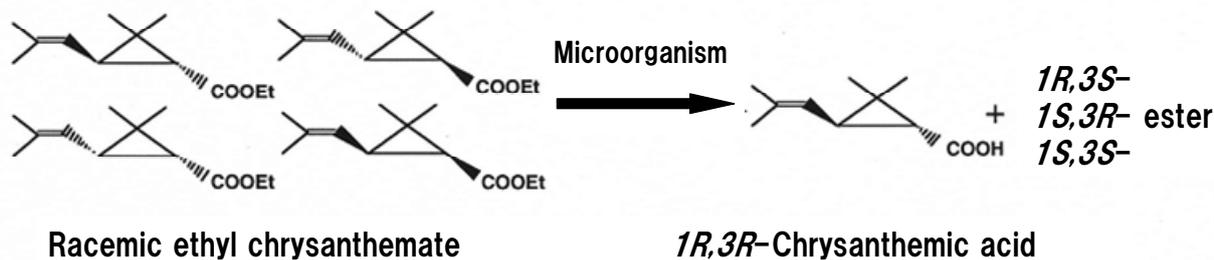
### 1-1 序論

緒言図3に示したように、菊酸は構造中に2つの不斉中心を持つため4種類の異性体が存在する。表1-1に合成ピレスロイド Pynamin の菊酸側異性体4種類のイエバエに対する殺虫効力を示した(6)。最も強い殺虫活性を示すのは *1R,3R* 体であり、その次に効力の高いのは *1R,3S* 体であるのに対して、1位が *S* 配置の異性体の効力は劣る。

(表1-1) Pynamin の4種の異性体のイエバエに対する殺虫効果  
(参考文献6)

Stereoisomer	LD50 ( $\gamma$ )	Relative activity (%)
<i>1R,3R</i>	0.24	100.0
<i>1R,3S</i>	0.41	58.5
<i>1S,3S</i>	4.96	4.84
<i>1S,3R</i>	3.30	7.31

光学活性な物質を製造する方法として、一般的には、光学活性な天然物からの誘導法、不斉合成法、光学分割法などが挙げられる。菊酸についても、天然物質から誘導する方法が報告されているが(7)、出発材料となる光学活性な天然物が限られるほか、誘導合成に多数の工程を必要とするため、製造プロセスとしては有利ではない。不斉合成法としては、顕谷らによる有機銅錯体を触媒とする不斉誘起合成(8)などが報告されており、例えば、トランス:シス比が91:9で各々の光学純度がトランス(86% *enantiomeric excess*)、シス(22% *enantiomeric excess*)の混合物から成る菊酸が得られているが、光学純度が100%に近い *1R,3R* 菊酸を得ることは現状では困難である。物理化学的な光学分割法としては晶析法で *1R,3R* 体を取得した例が発表されているが(9)、高い光学純度の *1R,3R* 体を得ようとすると結晶化を繰り返す必要があり、煩雑である。一方、結晶化の回数を抑えて工程を簡略化しようとする、十分な光学純度の菊酸が得られない。また、菊酸の合成工程の最終段階、すなわちラセミ体菊酸が得られてから光学分割を行うため、結果的に多数の工程を要する。



(図 1-1) 微生物酵素による菊酸エステル立体選択的加水分解反応

これらの方法に対して、微生物酵素による立体選択的な加水分解反応（不斉加水分解反応）を利用して、1段階で光学活性な  $1R,3R$  菊酸を生産することができれば、全体として工程の効率化に結びつき、且つ省エネルギー化にも繋がると考えられる。

これまでも、酵素を利用した光学活性菊酸製法が検討されている。例えば、*Trichoderma sp.* を用いてラセミ体菊酸メチルエステルを加水分解したところ、トランス菊酸とシス菊酸の混合物が得られたという報告 (10) や、Schneider らによる、ブタ肝臓エステラーゼを用いてラセミ体菊酸エステルを加水分解し、70 % *enantiomeric excess* の  $1R,3R$  菊酸を得たとの報告がある (11)。しかしながら、いずれも純粋な  $1R,3R$  体を調製できる方法ではなく、より高い光学純度の菊酸取得法が望まれていた。そこで、酵素を利用したバイオプロセスによる、光学純度 100 % の  $1R,3R$  菊酸製造法構築を目指して研究を開始した。

## 1-2 実験材料および方法

### 1-2-1 実験試薬

菊酸エチルエステル ( $1R, 3R : 1S, 3S : 1R, 3S : 1S, 3R = 45:45:5:5$ 、以下ラセミ体菊酸エチルエステル) および  $1R, 3R$ -菊酸エチルエステルは住友化学農業化学品研究所より提供いただいた。Phenolphthalein dibutyrate (以下 PPD) は Research Organics Inc. より、*p*-nitrophenyl esters と phenyl-methylsulphonyl fluoride (PMSF) は Sigma Aldrich より、その他のエステル類、triglyceride、diisopropyl fluorophosphates (DFP)、*p*-chloromercuribenzoic acid (PCMB)、エセリン硫酸は和光純薬より、DTNB はナカライテスクから購入した。培地成分は Gibco より購入した。

### 1-2-2 培地

前培養培地 ; 3.0 % soluble starch、0.7 % polypeptone、0.5 % yeast extract、  
0.5 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 5.0)

本培養培地 ; 6.0 % soluble starch、1.0 % polypeptone、0.2 % yeast extract、  
0.5 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 5.0)

### 1-2-3 *Arthrobacter globiformis* SC-6-98-28 株のジャーファーマンター培養

フラスコに 100mL の前培養培地を調製し、そこへ *Arthrobacter globiformis* SC-6-98-28 株を播種し、30°Cにて 48 時間振蕩培養して前培養液とした。7 L 容積ジャーファーマンター (AC-D-4; イワシヤ製) に 5.0 L の本培養培地を調製し、そこへ、50mL の前培養液を播種し、攪拌数 650 rpm、通気量 7.0 L/min、30°Cにて 48 時間培養した。

### 1-2-4 不斉加水分解酵素精製

1-2-3 で得られた培養液を遠心し、回収した菌体を 4°Cで 200 mM glycine-NaOH (pH 10.0) で洗浄した。菌体を 1,000 mL の同バッファーに懸濁し、Dyno-Mill (Bacofen 製) 中でビーズを使用して破碎した。ろ過によりビーズを除去した後、100,000 x g、4°Cで 60min 超遠心し、得られた上清をさらに精製した。

上清に終濃度 25%となるよう硫酸を加え、4°Cで遠心後、沈殿を除去した。再び終濃度 60%となるよう硫酸を加え、遠心により酵素を含む沈殿画分を集め、1 mM EDTA を含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) に沈殿を溶解し、4°Cで同バッファーに対して透析した。これ以降のクロマトグラフィーは島津 LC-5A HPLC システムを用いた。まず、DEAE-5PW (21.5 mm  $\phi$  x 150 mm ; 日本ウオーターズ製) に透析液をアプライし、NaCl 濃度勾配にて分離した。塩濃度 250 mM 付近に溶出した酵素活性画分を集め、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 1 mM EDTA で 10 倍に希釈し、再度 DEAE-5PW にて精製した。集めた酵素を含む画

分は Amicon YM-5 限外ろ過膜にて濃縮し、200 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) で予め平衡化したゲルろ過カラム TSKgel-G3000SW (21.5 mm  $\phi$  x 600 mm ; Tosoh 製) にアプライした。溶出された酵素活性画分は、2.0 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) で予め平衡化した疎水カラム ULTRON glycol-HC (20.0 mm  $\phi$  x 250 mm ; Shinwa Chemical Industries 製) にアプライし、2.0 M から 0 M の Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 濃度勾配にて分離した。溶出された酵素活性画分を集めて脱塩した後、予め 5 mM *tetra-n-butyl ammonium hydroxide* を含む 100 mM Glycine-NaOH (pH 10.0) にて平衡化した逆相カラム Phenyl 5PW-RP (4.6 mm  $\phi$  x 75 mm ; Tosoh 製) にアプライし、15-50%アセトニトリルの濃度勾配にて分離溶出した。精製に際して、溶出された画分の酵素活性は、PPD あるいは 菊酸 *p*-ニトロフェニルを基質として測定した。

#### 1-2-5 精製酵素の性質解析

タンパク質定量は、ウシ血清アルブミンを標準物質として、Lowry 法(12)あるいは Bio-Rad タンパク質定量キットを用いて行なった。Bovine Serum Albumin (BSA) を標準物質として検量線を作成し、サンプルのタンパク質濃度を求めた。

SDS-PAGE は Laemmli らの方法(13) に従って、分離ゲルおよび濃縮ゲルを作成して実施した。サンプルに等量の SDS-sample buffer (100 mM Tris-HCl (pH 6.8)、50 mM DTT、4 % SDS、20 % glycerol、0.2 % BPB) を加え、95°C、10min 加熱した後、ゲルにアプライし、SDS-running buffer (25 mM Tris、192 mM glycine、0.1 % SDS) を用い、定電流下で泳動を行なった。電気泳動後のゲルを Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) により染色した。

分離ゲル ; 375 mM Tris-HCl (pH 8.8)、10% アクリルアミド、0.1% SDS  
濃縮ゲル ; 125 mM Tris-HCl (pH 6.8)、5 % アクリルアミド、0.1% SDS  
いずれも重合剤で重合させゲル化した。

精製酵素を用いた最適反応 pH の検討は、菊酸エチルエステルおよびフェノールフタレインジブチレート を基質として、pH 4.0-5.0 は 200 mM 酢酸、pH 5.0-8.0 は 200 mM リン酸、pH 7.0-9.0 は 200 mM Tris-HCl、pH 9.0-11.0 は 200 mM glycine-NaOH の各バッファーを用いて 40°C で測定した。各 pH における精製酵素の安定性は、4°C で終夜酵素をインキュベートした後、pH を 10.0 に戻し、その後、40°C におけるフェノールフタレインジブチレート加水分解活性を測定して、残存活性を調べた。

酵素反応の最適温度は、35°C~55°C に設定した反応水槽中で、200 mM glycine-NaOH (pH 10.0) 中に懸濁した菊酸エチルエステルに精製酵素を添加して、加水分解の初速度を測定し、最大活性を示した温度に対する相対活性で求めた。また、酵素の熱安定性については、200 mM glycine-NaOH (pH 10.0) 中で精製酵素を 30 min あるいは 24

時間インキュベーションした後、フェノールフタレインジブチレートに対する加水分解活性を測定し、インキュベーションなしの酵素活性を 100 % として残存活性として表示した。

各種酵素阻害剤に対する感受性は、下記 1-2-6 あるいは 1-2-7 に記す酵素反応の際、基質添加前に阻害剤を添加して、阻害剤無添加の場合の酵素反応性を 100 % とした相対活性により表した。

#### 1-2-6 ラセミ体菊酸エチルエステル加水分解反応

ラセミ体菊酸エチルエステル 0.5 g を 24.5 mL の 200mM glycine-NaOH (pH 10.0) に添加し、さらに菌体あるいは酵素を加えて反応を開始した。反応中は、1,000 rpm で反応液を攪拌し、また、1.0N NaOH で常に pH を 10.0 に保った。2.0 mL の 35% HCl を添加して反応を停止し、反応液と等量のメチルイソブチルケトン (以下 MIBK) で残存する基質エステルと生成した菊酸を抽出し、ガスクロマトグラフィーで分析を行った。

#### 1-2-7 カルボン酸エステル加水分解反応

酵素活性は、全て十分な基質量が添加された条件で測定し、反応の初速度により求めた。

PPD に対する活性は、反応液 200 mM glycine-NaOH (pH 10.0) 2.5 mL に基質である 50  $\mu$ M PPD をエタノール溶液として添加し (エタノール終濃度 0.5 %) 40°C に保温したキュベット内で 3 min プレインキュベーションした後、酵素溶液を添加して反応を開始した。酵素活性は、phenolphthalein のモル吸光係数 23,200  $M^{-1}cm^{-1}$  を元に、1  $\mu$ mol の phenolphthalein を 1 分間に生成する酵素活性を 1 ユニットとして算出した。

精製酵素の各種 *p*-ニトロフェニルエステルに対する活性は、加水分解の結果遊離する *p*-nitrophenol の 405 nm における吸光度により測定した。反応液 200 mM Tris-HCl (pH 8.5) 3.0 mL を 40°C に保温したキュベット内で 3 min プレインキュベーションした後、酵素溶液を添加して反応を開始した。酵素活性は、*p*-nitrophenolate anion のモル吸光係数 16,100  $M^{-1}cm^{-1}$  を元に算出した。

各種脂肪酸エチルエステルおよびトリグリセライドを加水分解する活性は、pH-Stat 自動滴定システム (Titrator, TTT8; Autoburette, ABU80; pH meter, PHM82; Radiometer 製) により測定した (14, 15)。20 mM の基質と 2.0% のポリビニルアルコールを含む 20 mM Tris-HCl (pH 8.5) を反応溶液とし、その 9.5 mL を 1,000 rpm, 40°C で 10 min プレインキュベーションした後、0.5 mL の酵素溶液を添加して反応を開始した。加水分解反応の結果生成したカルボン酸は 0.01 N NaOH で中和し、中和に要

した NaOH 量から酵素活性を計算した。特に、短鎖脂肪酸エステルに著明な、酵素活性に拠らない化学的加水分解分をバックグラウンドとして差し引いて、酵素による加水分解活性とした。

#### 1-2-8 分析方法

内部標準物質として 2.8 mg/mL のイソアミルカプリレートを含む MIBK により、酵素反応終了後の反応液から未反応のエステルおよび生成した菊酸を抽出し、ガスクロマトグラフィー（カラム；10 % Shinchrom F<sub>51</sub>+1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 3.2 mm φ x 2.6 m, 190°C）により各物質の濃度を分析した。菊酸エチルエステル、菊酸、イソアミルカプリレートの溶出時間はそれぞれ、3.9、6.2、および 8.1 min であった。

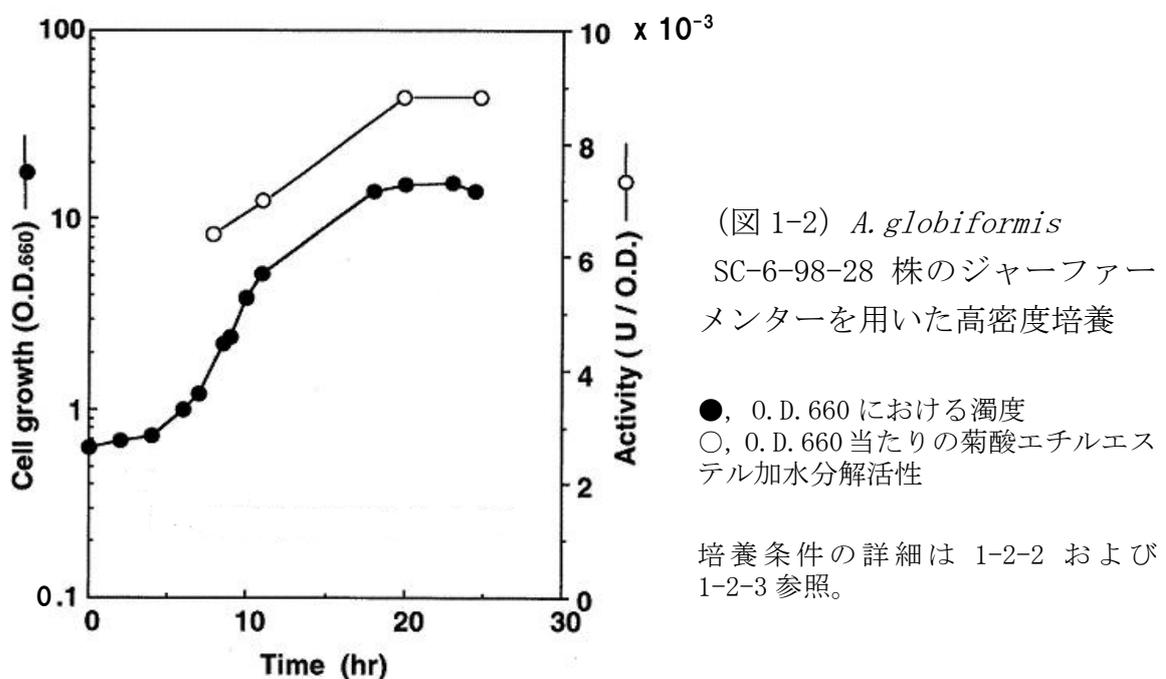
また、生成した菊酸の光学異性体分析は、以下の方法で行なった。MIBK と等量の 0.01 N NaOH で 3 回抽出を行ない、得られた菊酸を含む水層は HCl を加えて pH<2 とした。さらに MIBK で再抽出を行ない、ガスクロマトグラフィーで回収された菊酸の量を定量した。回収された菊酸のモル数に対して過剰の 3,5-ジクロロアニリンとジシクロヘキシルカルボジイミドを 4.0 %トルエン溶液として加え、室温で 3 時間静置した。未反応の 3,5-ジクロロアニリンは、1.0 N HCl および蒸留水で抽出して除去し、MgSO<sub>4</sub>を加えて反応液を脱水した。生成した菊酸アニリド誘導体を HPLC にアプライシ（カラム；SUMIPAX OA-2100 (5 mm φ x 200 mm x 2；住化分析センター、移動層；n-ヘキサン：ジクロロメタン=17：3 (v/v) %、流速 1.5 mL/min、検出 254 nm)、各異性体量を分析した。変換率 (%) は、1*R*, 3*R* 菊酸エチルエステルから生成した 1*R*, 3*R* 菊酸のモル分率を表す。

### 1-3 結果

#### 1-3-1 *Arthrobacter globiformis* SC-6-98-28 株ジャーファーマンター培養

ラセミ体菊酸エチルエステルを基質として、この基質を立体選択的に加水分解する微生物あるいは酵素が探索された。市販酵素、市販微生物株、および土壌から採取・分離した微生物約 250 点についてスクリーニングされた結果、1*R*, 3*R* 体に特異的に作用する微生物として *Arthrobacter globiformis* IF0-12958 株とその他 1~2 種が見出された(16)。*Candida* 属および *Thermomyces* 属菌株にも高い立体選択性を示すものが見出されたが、培養を初めとする取り扱いの容易さから、バクテリアである *Arthrobacter globiformis* IF0-12958 の高活性変異株 SC-6-98-28 を以下の研究に使用した。

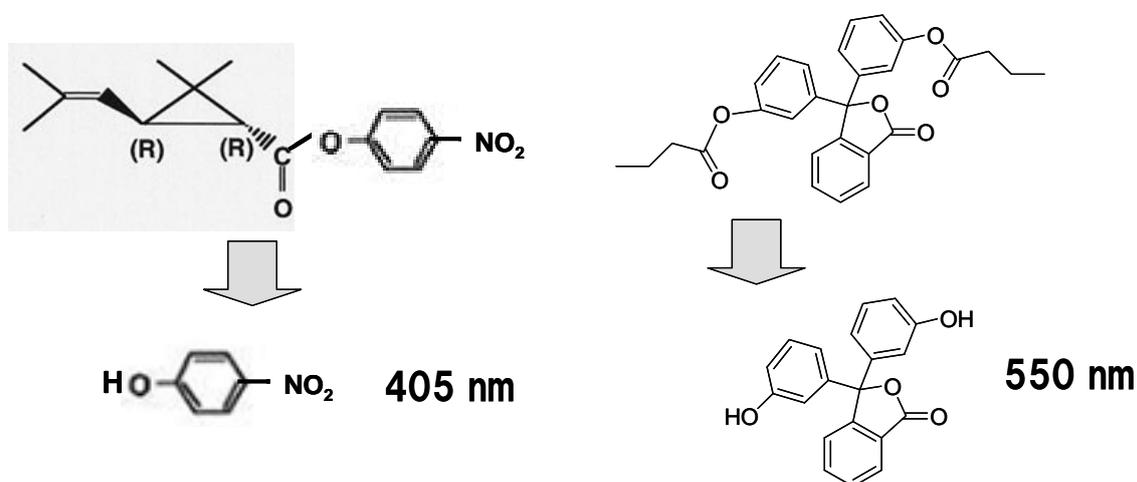
菊酸エチルエステルの立体選択的加水分解に関わる酵素遺伝子クローニングのためのアミノ酸配列情報を得ること、さらにこその性質を解析することを目的に、*Arthrobacter globiformis* SC-6-98-28 株 (以下 *A. globiformis* SC-6-98-28 株) 菌体を高密度培養した (図 1-2)。5 L のジャーファーマンターによる高密度培養を 6 バッチ行い、合計 30 L の培養液から湿重量で 580 g の菌体を取得した。菌体をダイノミルで破碎した後、超遠心して得られた菌体内可溶性画分の全タンパク質量は 27.0 g であった。また、乾燥菌体重量当たりの酵素活性は、 $0.24 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g-dry cell}$  であった。



#### 1-3-2 *A. globiformis* SC-6-98-28 株からの不斉加水分解酵素精製

精製過程においては、菊酸エチルエステル加水分解活性のように、ガスクロマトグ

ラフィーや HPLC を用いる煩雑な活性評価法ではなく、より簡便でハイスループットな方法が必要であるため、基質である菊酸エチルの構造アナログとして菊酸 *p*-ニトロフェニルを合成した。しかしながら、検討過程において、不斉加水分解に関わる酵素は pH 10.0 というアルカリ性領域において加水分解反応が最大となることが判明し、このようなアルカリ条件下においては菊酸 *p*-ニトロフェニルは酵素反応に抛らないバックグラウンドの加水分解を起こしてしまうため、酵素活性評価用として適していないと判断した。代替法として、菊酸エステルとは構造の類似性は無いが、アルカリ性 pH においても自然加水分解を起こさないフェノールフタレインジブチレート（以下 PPD）を基質として用いることとし、加水分解反応により生成するフェノールフタレインの 550nm における吸光度を測定して活性を算出した。



(図 1-3) 酵素活性測定の簡易基質として用いた菊酸 *p*-ニトロフェニルと PPD の構造

菌体内には目的以外の複数の加水分解酵素が存在していると予想されたため、各精製段階において、ピークフラクションのラセミ体菊酸エチルエステルに対する活性と PPD に対する活性が同じ倍率で上昇することを以って、目的の酵素が精製できていることの確認とした。さらに、SDS を含まない Native-PAGE 後のゲルを PPD 溶液に浸して活性染色を行い、精製されたバンドが PPD を加水分解し、フェノールフタレインを生成するため、バンドが桃色を呈することを確認した。

菌体内可溶性画分を出発材料として、硫安分画、2 段階のイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、および逆相クロマトグラフィーという多段階の精製により、目的酵素を単一のバンドに精製した (図 1-4)。各精製ステップにおける活性回収率、比活性、および精製倍率を表 1-2 に示した。

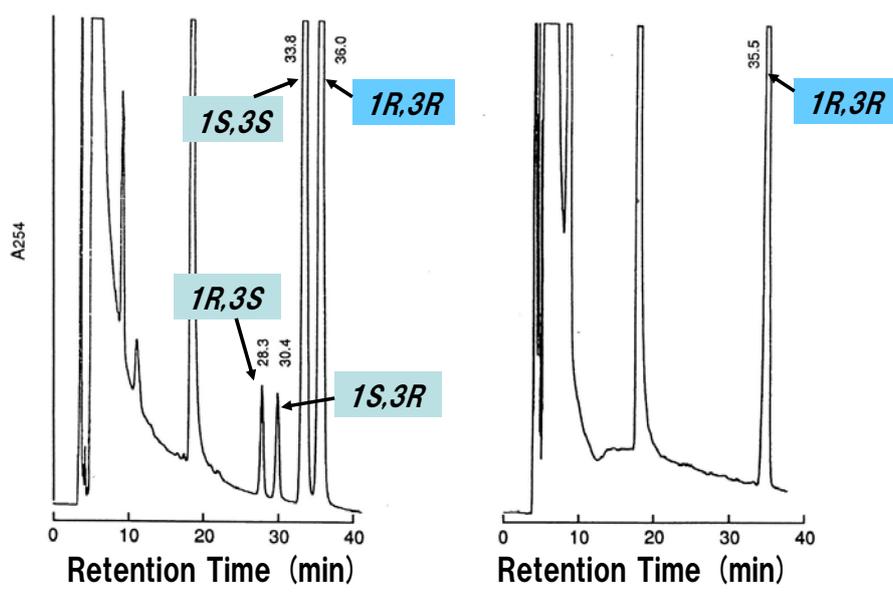
(表 1-2) *A. globiformis* SC-6-98-28 由来菊酸エステル不斉加水分解酵素精製結果

Purification step	Activity (U)	Yield (%)	Protein (mg)	Sp Act (U / mg)	Purification (fold)
1. Cell-free extract	226	100.0	2.70x10 <sup>4</sup>	8.36x10 <sup>-3</sup>	1.00
2. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 25-60%	208	92.0	5.67x10 <sup>3</sup>	3.66x10 <sup>-2</sup>	4.37
3. 1st DEAE-5PW	166	73.6	4.82x10 <sup>2</sup>	0.345	41.3
4. 2nd DEAE-5PW	137	60.8	1.86x10 <sup>2</sup>	0.738	88.3
5. TSK G3000SW	71.7	31.7	3.42x10	2.10	251
6. ULTRON glycol-HC	45.5	20.1	2.77	16.4	1970
7. TSK Phenyl 5PW-RP	11.8	5.20	0.223	52.8	6280

Specific activity (U) = 1 μmol phenolphthalein /min at 40°C

最終的に、6,280 倍の精製により、活性回収率 5.2 % で精製酵素が 200 μg 余り得られた。また、酵素の *Arthrobacter globiformis* SC-6-98-28 菌体内含量は可溶性全タンパク質の 0.016% であった。

単一バンドにまで精製した酵素タンパク質をラセミ体菊酸エチルエステルに反応させた。反応生成物である菊酸の異性体を HPLC 分析した結果 (図 1-5、右)、1*R*, 3*R* 菊酸のみが生成し、その他の異性体は検出限界以下であった。*Arthrobacter globiformis* SC-6-98-28 菌体を用いてラセミ体菊酸エチルエステル加水分解反応を行った場合にも、加水分解率は 10 % の時点ではあるが、光学純度 100 % の 1*R*, 3*R* 菊酸が得られたことから、目的の酵素が精製されたことを確認した。

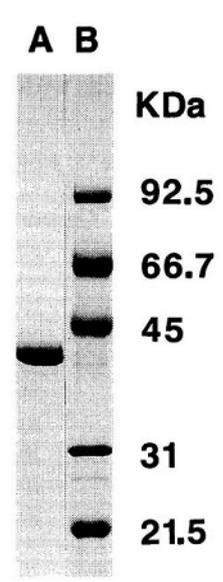


(図 1-5) 精製酵素を用いた加水分解反応生成物の HPLC 溶出パターン  
 左 ; 標準菊酸 ( $1R, 3R:1S, 3S:1R, 3S:1S, 3R=45:45:5:5$ )  
 右 ; 精製酵素による反応の結果生成した菊酸の分析結果

精製酵素の  $1R, 3R$ -菊酸エチルエステルに対する加水分解の  $V_{max}$  および  $K_m$  値は、 $45^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{pH } 10.0$  において、それぞれ  $6.0 \text{ mol/sec/mol enzyme}$ 、 $3.3 \text{ mM}$  であった。

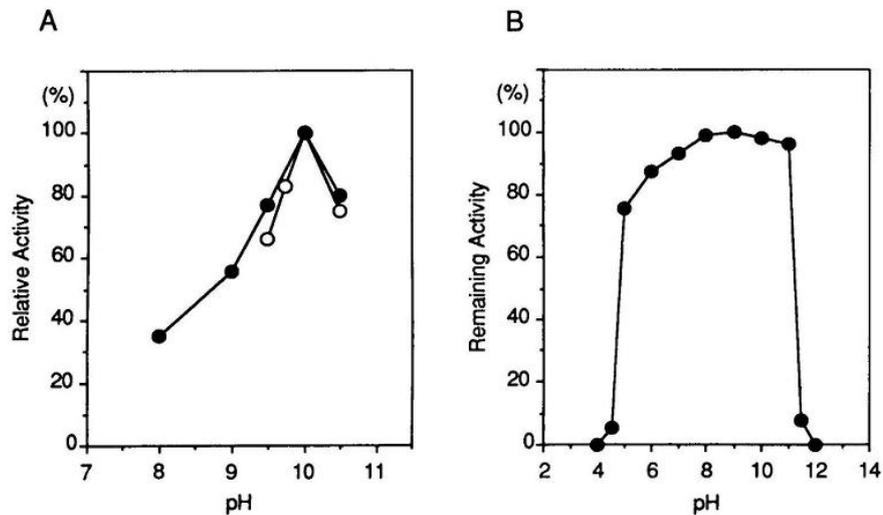
### 1-3-3 精製した不斉加水分解酵素の物性解析

精製酵素は、SDS-PAGE 上で分子量約 43,000 の単一のバンドを示した。ゲルろ過クロマトグラフィーによる溶出位置は、標準タンパク質の溶出曲線から求めたところ約 90,000 であったことから、本酵素は 2 量体構造を取っているものと推定された。



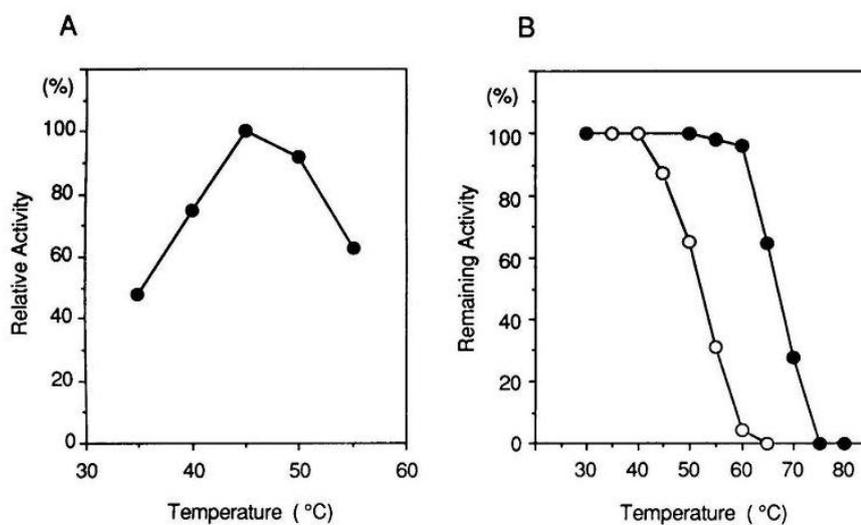
(図 1-4) 精製酵素の SDS-PAGE パターン  
 レーン A; 精製酵素 ( $2.0 \mu\text{g}$ )  
 レーン B, 分子量マーカー; phosphorylase b (92,500), BSA (66,700), ovalbumin (45,000), carbonic anhydrase (31,000), soybean trypsin inhibitor (21,500).

本酵素の最適反応条件を検討した。その結果、菊酸エチルエステルおよび PPD のいずれを基質にした場合も、pH 10.0 で最大活性を示した。また、酵素活性は pH6~11 と幅広い範囲で安定であった。



(図 1-6) 精製酵素活性の pH 依存性と各 pH における酵素の安定性  
 菊酸エチルエステル (●) あるいは PPD (○) を基質とし、40°C で反応を行なった。

本酵素の菊酸エチルエステル加水分解の最適温度は 45°C であった。また、本酵素を 60°C、30 分熱処理し、最適反応温度である 45°C にて残存する活性を測定したところ、菊酸エチル加水分解活性をほぼ完全に保持していた。さらに、処理時間を 24 時間として 50°C でインキュベートした場合にも、その後 45°C において加水分解反応を行ったところ、無処理の場合の 60% 以上の活性を確認した。



(図 1-7) 不斉加水分解反応の最適温度と精製酵素の熱安定性  
 A; 反応は 200 mM Glycine-NaOH (pH 10.0) 中で行なった。B; 精製酵素を各温度において 30 min (●) あるいは 24 hr (○) インキュベートし、45°C にて残存活性を測定した。

#### 1-3-4 各種エステルに対する基質特異性解析および阻害剤感受性解析

精製した不斉加水分解酵素は、種々のカルボン酸エステルに対して幅広く加水分解活性を示した。表 1-3 に示すように、エチルエステル、トリグリセリルエステル、*p*-ニトロフェニルエステルのいずれにも活性を示すことを確認した。直鎖状カルボン酸の鎖長が C2-C4 の場合に最大の活性を示し、鎖長が長くなると活性が低下した。

(表 1-3) 菊酸エチル不斉加水分解酵素の基質特異性解析

Substrate			Concentration (mM)	Relative activity (%)
Ethyl	Acetate	(C2)	20	5.7
	Propionate	(C3)	20	8.0
	Butyrate	(C4)	20	10.3
	Caproate	(C6)	20	1.3
	Caprylate	(C8)	20	0.4
	Caprate	(C10)	20	0.2
	Palmitate	(C16)	20	0.0
	Chrysanthemate		50	0.3
Triglyceryl	Acetate	(C2)	20	24.1
	Butyrate	(C4)	20	18.1
	Caproate	(C6)	20	4.0
	Caprylate	(C8)	20	0.8
	Caprate	(C10)	20	1.2
	Palmitate	(C16)	20	0.0
<i>p</i> -Nitrophenyl	Acetate	(C2)	0.1	12.0
	Propionate	(C3)	0.1	100.0
	Butyrate	(C4)	0.1	39.0
	Caproate	(C6)	0.1	21.8
	Caprylate	(C8)	0.1	3.8
	Caprate	(C10)	0.1	0.7
	Laurate	(C12)	0.1	0.5
	Palmitate	(C16)	0.1	0.0
	Chrysanthemate		0.1	4.0

活性値は、*p*-nitrophenyl propionate に対する酵素活性 (1,380  $\mu$ mol/min/mg) に対する相対活性として表示した。

また、精製酵素に各種酵素阻害剤を添加し、感受性を調べた。その結果、表 1-4 に示すように、精製酵素はセリン (Ser) を触媒残基とする加水分解酵素の阻害剤であ

る PMSF および DFP により酵素活性を完全に失ったが、PCMB、DTNB、2-メルカプトエタノールなどの SH 基に反応する試薬は酵素活性に影響を与えなかった。また、精製酵素はコリンエステラーゼ阻害剤であるエセリン硫酸、フォスファターゼ阻害剤である NaF にも非感受性であった。さらに、メタノール、エタノールおよび DMSO を 10 (v/v)% 反応系に添加しても活性の低下は認められなかった。

(表 1-4) 酵素阻害剤の *A. globiformis* エステラーゼへの作用

Inhibitor	Concentration (mM)	Remaining Activity (%)
None	-	100
PMSF	1.0	0
DFP	0.1	0
PCMB	1.0	100
DTNB	1.0	95
2-Mercaptoethanol	1.0	89
Eserine sulfate	1.0	79
EDTA	1.0	100
NaF	10.0	100

各阻害剤と酵素を 40°C で 30 min インキュベーションし、PPD および菊酸エチルエステルを用いて残存する活性を測定した。

## 1-4 考察

*Arthrobacter globiformis* SC-6-98-28 から精製した菊酸エチルエステル不斉加水分解酵素は、1*R*, 3*R* 体に選択的に作用して加水分解する性質を持つ理想的な酵素であることが判明した。また、基質特異性を検討した結果、同時に種々のエステル基質にも広く作用するという興味深い酵素であった。

エチルエステル、トリグリセリルエステル、*p*-ニトロフェニルエステルのいずれにおいても、酵素活性は直鎖状カルボン酸鎖長に依存し、カルボン酸炭素鎖が2から4個の基質に対してもっとも高活性を示し、鎖長と共に活性が低下する傾向が認められた。この傾向は、*Ochrobactrum anthropi*(17)、*Bacillus stearothermophilus*(18)、*Bacillus subtilis*(19)、および *Aspergillus niger*(20) などにおいて報告されている酵素と類似していた。この結果から、本酵素は疎水性基質を好むリパーゼ類(21, 22)とは異なり、水溶性短鎖脂肪酸エステル類を主な基質とするカルボキシルエステラーゼの1種であると推察した。

また、精製酵素の阻害剤感受性検討の結果、DFP や PMSF という Ser 残基に特異的に結合する阻害剤で活性が完全に阻害されたのに対して、PCMB、DTNB、メルカプトエタノールなどの SH 基に反応する化合物では活性を失わなかった。この結果から、本酵素活性に Cys は関与しておらず、多くの Ser プロテアーゼ(23) やリパーゼ(24) と同様、Ser を活性中心に持つカルボキシルエステラーゼ(25) の1種と考えられた。ただし、中性付近の pH で最大活性を示す典型的な Ser エステラーゼやリパーゼとは異なり、本酵素反応の最適 pH は 10.0 とアルカリ側にシフトしており、塩基性 pKa を側鎖に有するアミノ酸が、加水分解反応の base として働いている可能性が示唆された。

精製酵素の菊酸エチルエステル加水分解の最適温度は 45°C であり、また、熱処理後に 45°C で酵素活性を評価すると、無処理の場合と比較して活性をほぼ 100% 保持している条件が見出された。この結果と、第2章における組み換え精製酵素を用いた CD スペクトル解析結果(2-3-6) から、本酵素タンパク質の立体構造は、熱による変性が高温まで起こりにくい、あるいは、温度にも拠るが、熱変性した構造が refolding され易い性質を持つと考えられた。この性質は、工業プロセスへ本酵素を利用する場合に利点になると考えられた。また、エタノールなど一部の極性溶媒に対しても検討した 10(v/v)% まで活性を保持していたことから、溶媒存在下の反応にも応用できる可能性がある。

## 第2章 大腸菌組み換え体による光学活性菊酸の製造

### 2-1 序論

*A. globiformis* SC-6-98-28 株から精製したカルボキシルエステラーゼ（以下、エステラーゼ）は、ラセミ体菊酸エチルエステルに対して優れた立体選択性を有していた。当初、この菌体自身を直接菊酸エチルエステルの不斉加水分解プロセスに用いることを検討したが、菌体の保有する酵素量が著しく低く、大量の菌体を不斉加水分解反応系に投入しても十分な反応効率が得られない点が問題であった。

第1章に記載した方法でエステラーゼを大量に精製し、例えば樹脂に固定化して繰り返し使用すれば、理論上は効率的に不斉加水分解反応を行うことができる。しかしながら、エステラーゼ含有量が全可溶性タンパク質の0.016%という微量であること、多段階のクロマトグラフィーによる精製工程は煩雑で日数を要すること、現状の精製における収率は5.2%と決して高いとは言えないことなどから、実用面において多くの課題があった。

そこで、エステラーゼ遺伝子をクローニングし、これまでに異種タンパク質の高発現が報告されている大腸菌における高発現を試みることで安定的な酵素源の供給を検討した。

## 2-2 実験材料および方法

### 2-2-1 実験試薬

*Achromobacter lyticus* protease I:EC 3.4.21.50 (26) (以下 API リジルエンドペプチダーゼ、あるいは API) およびペニシリン G は和光純薬より、各種制限酵素、T4 polynucleotide kinase および DNA シークエンスキットは TaKaRa BIO より購入した。[ $\gamma$ <sup>32</sup>P]ATP と [ $\alpha$ <sup>32</sup>P]dCTP は GE ヘルスケア (旧アマシャム) より、isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (以下 IPTG) はナカライテスクより購入した。サケ精子 DNA はフナコシより購入した。

### 2-2-2 使用大腸菌およびプラスミド

エステラーゼ遺伝子クローニングと発現の宿主として、*E. coli* HB101、JM101、JM103、JM105、JM109 株を使用した。各々の遺伝子型を下記に示した。クローニング用プラスミド pUC19 は TaKaRa BIO より、発現用プラスミド pKK223-3 は GE ヘルスケア (旧 Pharmacia LKB Biotechnology) より購入した。pKK223-4 は pKK223-3 の 2 箇所 BamHI サイトのうち 1 箇所を欠失させて作製した (27)。

Strains	Genotype
<i>E. coli</i> HB101	<i>F</i> , <i>mcrB</i> , <i>mrr</i> , <i>hsdS20</i> ( $r_B^- m_B^-$ ), <i>recA13</i> , <i>leuB6</i> , <i>ara-14</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>xy1-5</i> , <i>mt1-1</i> , <i>rpsL20</i> ( <i>Sm<sup>r</sup></i> ), <i>glnV44</i> , $\lambda^-$
JM101	<i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ), <i>F'</i> , [ <i>lacI<sup>n</sup>Z</i> $\Delta$ <i>M15</i> <i>traD36</i> <i>proAB<sup>r</sup></i> ]
JM103	<i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>sbcBC</i> , <i>rpsL</i> , <i>thi-1</i> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ), <i>F'</i> , [ <i>traD36</i> <i>proAB<sup>r</sup></i> , <i>lacI<sup>n</sup></i> , <i>lacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> ]
JM105	<i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>sbcB15</i> , <i>rpsL</i> , <i>thi-1</i> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ), [ <i>F'</i> , <i>traD36</i> , <i>proAB<sup>r</sup></i> , <i>lacI<sup>n</sup></i> , <i>lacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> ] , <i>hsdR4</i> ( $r_K^- m_K^+$ )
JM109	<i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>recA1</i> , <i>mcrB<sup>r</sup></i> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ), <i>e14-</i> , [ <i>F'</i> , <i>traD36</i> , <i>proAB<sup>r</sup></i> , <i>lacI<sup>n</sup></i> , <i>lacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> ] , <i>hsdR17</i> ( $r_K^- m_K^+$ )

### 2-2-3 精製酵素のアミノ酸配列解析

第 1 章に示した方法により SDS - PAGE で単一バンドに精製されたエステラーゼを、8.0M ウレアと 100mM ジチオスレイトールを含む 80mM Tris-HCl (pH 8.5) 溶液中において、モル比で 20 : 1 となるよう添加した API リジルエンドペプチダーゼにより、37°C で終夜消化した。反応後の溶液は、0.1%トリフルオロ酢酸で平衡化した  $\mu$  Bondapack C4 カラム (4.6  $\phi$  x 150mm ; 日本ウオーターズ) にアプライし、アセトニトリルの濃度勾

配によりペプチド断片を分離した。溶出したペプチド断片は 215 nm の吸収により回収し、470A プロテインシーケンサー (Applied Biosystems) を用いてアミノ酸配列解析した。

#### 2-2-4 染色体 DNA 調製

*A. globiformis* SC-6-98-28 株を 1-2-2 に記載の前培養培地 5 mL を用いて 30°C で 24 時間浸とう培養した。得られた培養液を 500 mL の本培養培地に播種し、30°C で浸とう培養し、O.D.<sub>660 nm</sub> が 0.6 に達した時点で培地 1 mL あたり 0.3 U のペニシリン G を添加してさらに O.D.<sub>660 nm</sub> が 1.0 に達するまで培養した。以下、斉藤と三浦らの方法 (28) を参考に行なった。

培養液を遠心し、菌体を回収した後、45 mL の 150 mM NaCl, 15 mM クエン酸ナトリウム, 10 mM EDTA, 27% ショ糖に懸濁し、さらに卵白リゾチームを終濃度が 5 mg/mL となるよう添加して、37°C で 30 min インキュベーションした。さらに 10 mL の 10% SDS と protease K を終濃度が 200 μg/mL となるよう添加し、37°C で 4 時間インキュベーションした。等量の Tris 飽和フェノールで 2 回、フェノールクロロホルム溶液 (1:1(v/v))、エーテルで 2 回抽出を行ない、有機層および中間に生成する変性タンパク質の層を除去した。水層の 2 倍容のエタノールを添加し、ガラス棒を用いて攪拌し、析出した染色体 DNA を巻きつけて集めた。得られた染色体 DNA を乾燥後、5 mL の TE バッファー (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA (pH 8.0)) に溶解し、終濃度 100 μg/mL の RNase 処理を 37°C で 2 時間行なった。その後、等量のフェノールクロロホルム溶液 (1:1(v/v)) で 2 回抽出操作を行ない、水層に 2 倍容の冷エタノールを添加して DNA を沈殿させた。得られた DNA を 80% エタノールで洗浄後乾燥し、TE バッファーに溶解した。調製した染色体 DNA は、260 nm の吸光値に対する 280 nm の吸光値の比が 1.8 以上であり、純度に問題が無いことを確認した。

#### 2-2-5 サザンハイブリダイゼーション

2-2-3 で解析した N 末端アミノ酸配列から下記の DNA プローブ I (N 末端 Met から 7 番目の Ala までに相当) と II (23 番目の Glu から 28 番目の Ser までに相当) を、また、内部アミノ酸配列から DNA プローブ III を設計し、Applied Biosystems 社の DNA 合成機モデル 380A を用いて合成した。

	5'						3'	
DNA プローブ I		ATG	GAT	GCT	CAA	ACT	ATT	GC
			C	C	G	C	C	
				A		A	A	
				G		G		

DNA プローブ II           GAA GAT CGT GAA TAT TC  
                                   G   C   C   G   C AG  
   A  
   G  
                                       AGA  
                                       G

DNA プローブ III           GAT GCG GCC GCT GTG GAA G

合成した各 DNA プローブの 5' 末端を下記の反応により [ $\gamma$   $^{32}$ P]ATP で標識した。37°C で 30 min 反応後、スピнкаラム DE-521 により標識された DNA と未反応の [ $\gamma$   $^{32}$ P]ATP を分離した。

DNA プローブ	10 p mol
10 x キナーゼバッファー(*)	2.5 $\mu$ L
T4 polynucleotide kinase	2.0 $\mu$ L (20 U 相当)
<u>[<math>\gamma</math> <math>^{32}</math>P]ATP</u>	<u>16 p mol (約 80 <math>\mu</math> Ci)</u>
dH <sub>2</sub> O	25 $\mu$ L

(\*) 500 mM Tris-HCl (pH 8.0)、100 mM MgCl<sub>2</sub>、50 mM ジチオスレイトール

2-2-4 で調製した染色体 DNA を KpnI などのさまざまな制限酵素で消化し、1% アガロースゲル電気泳動に供した。ゲルをアルカリバッファー (0.4 N NaOH, 0.6 M NaCl) に 30 min 浸し、予め同バッファーに浸した Zeta-probe membrane (Bio-Rad 製) に接着させて重しを載せ、終夜静置し、ゲル中の DNA をメンブロンに転写した。メンブロンは 1 M Tris-HCl, 500 mM NaCl (pH 8.0) で洗浄して中和した後、風乾した。

標識した各 DNA プローブを、6 x SSC, 0.5% SDS 溶液中に浸したメンブロンに 10 cm x 10 cm フィルター当たり約 5 x 10<sup>5</sup>cpm 添加し、60°C で終夜インキュベーションした。翌日、メンブロンを 2 x SSC, 0.1% SDS で 2 回、0.5 x SSC, 0.1% SDS で 1 回、60°C で洗浄し、風乾した。メンブロンをろ紙に貼り付け、X 線フィルム (富士フィルム製) を用いて感光し、現像を行い、プローブにより標識される DNA 断片を検出した。

SSC ; 150 mM NaCl, 15 mM クエン酸 3 ナトリウム (pH7.0)

#### 2-2-6 コロニーハイブリダイゼーション

サザンハイブリダイゼーションの結果から、エステラーゼ遺伝子の部分配列が含まれると推定された 0.6kbp 近辺の KpnI 消化断片をゲルから抽出、回収し、定法のライ

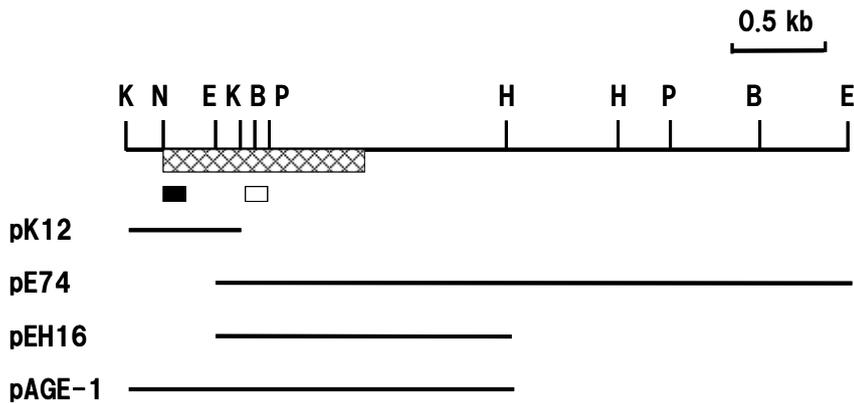
ゲーション反応にて pUC19 の KpnI サイトへ挿入した。得られたプラスミド DNA ライブラリーで *E. coli* JM109 を形質転換し、100 mg/L の ampicillin を含む LB プレート (10 g/L peptone, 5 g/L yeast extract, 10 g/L NaCl, 15 g/L agar (pH 6.8)) 上に播種した。

出現した組み換え大腸菌コロニーを、コロニープラークスクリーン (NEM 製) をシャーレ上に重層してメンブランに写し取った後、0.5 N NaOH に浸し、緩やかに浸とうしながら 5 min x 2 回洗浄してタンパク質を除去した。その後、1 M Tris-HCl (pH 7.5) に浸し、5 min x 2 回洗浄してメンブランを中和した。最後に、3 x SSC に 5 min 浸し、メンブランを風乾した。紫外線照射により DNA をメンブランに固定した後、メンブランを 6 x SSC に浸し、60°C で 30 min ゆるやかに浸とうし、さらに 6 x SSC で 1 回洗浄後、1% SDS、100  $\mu$ g/mL サケ精子 DNA、10x デンハルト液 (0.2 % ウシ血清アルブミン、0.2 % Ficoll、0.2 % polyvinyl pyrrolidone) を含む 6 x SSC 溶液中で 60°C で終夜プレインキュベーションした。フィルター 1 枚当たり 2-2-5 で合成した標識 DNA プローブ I を約  $5 \times 10^5$  cpm 用いて、6 x SSC 溶液内で 54°C、終夜ハイブリダイゼーションを行なった。同様に、標識 DNA プローブ II に関しては 37.5°C で、プローブ III に関しては 37°C でハイブリダイゼーションを実施した。翌日フィルターを 6 x SSC で 2 回洗浄し、さらに 1 % の SDS を含む 6 x SSC で 1 回洗浄し、風乾後、オートラジオグラフィーに供し、プローブが結合したポジティブコロニーを検出した。

#### 2-2-7 クローニングした断片の塩基配列決定

制限酵素 KpnI 消化断片による *A. globiformis* 染色体ライブラリーで形質転換した *E. coli* JM109 から、コロニーハイブリダイゼーションにより、プラスミド pK12 を取得した。この pK12 が有する 0.6 kbp の KpnI 断片を切り出し、2-2-5 と同様に 5' 末端を標識して残りの領域をクローニングするプローブとした。DNA プローブ III と、この標識断片の両方を用いて再度ハイブリダイゼーションによりスクリーニングし、図 2-1 に示した 3.3 kbp の EcoRI 断片を含むプラスミド pE74 を取得した。この pE74 から 1.7 kbp の EcoRI-HincII 断片をサブクローニングし (pEH16)、pK12 の EcoRI-KpnI 部分を削除した後、pEH16 の挿入断片と連結し、2.2 kbp の KpnI-HincII 断片を含むプラスミド pAGE-1 を取得した。

この pAGE-1 の 2.2 kbp の KpnI-HindIII 断片について、 $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP を用いて、dideoxynucleotide chain termination 法によって塩基配列解析を行った。



(図 2-1) *A. globiformis* SC-6-98-28 染色体由来のエステラーゼ遺伝子断片

Open Reading Frame 、DNA プローブ I、II 、DNA プローブ III   
 K ; KpnI、N ; Nsp(7524)V、E ; EcoRI、B ; BamHI、P ; PstI、H ; HincII

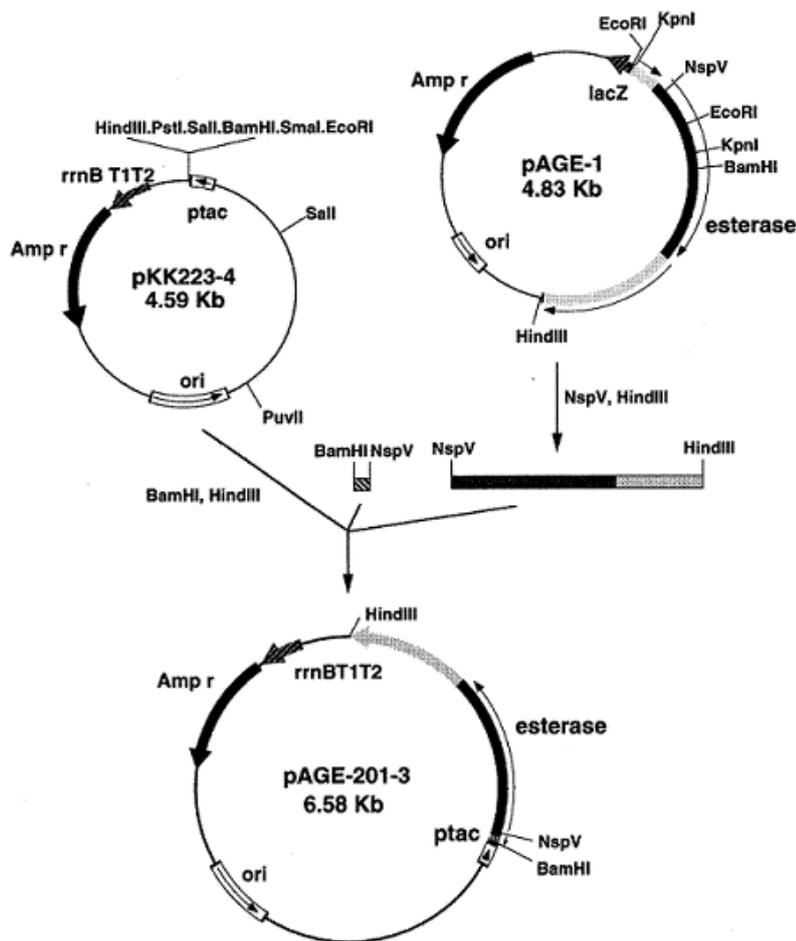
#### 2-2-8 塩基配列改変による大腸菌内高発現

下記に示すように、5' 末端に BamHI、3' 末端に Nsp(7524)V 制限酵素サイトを付加した DNA 断片を合成し、BamHI および Nsp(7524)V で消化した。

pAGE-203 構築に使用した合成 DNA 配列 (太字は開始コドン)

5' 3'  
 BamHI Nsp(7524)V  
GGATCCTTTTTTAATAAAATCAGGAGGAAAAATA**AT**GGACGCACAGACCATCGCACCGGGCTTCGAA

一方、*Arthrobacter globiformis* SC-6-98-28 染色体からクローニングしたエステラーゼをコードする遺伝子断片 (2-3-1 参照) の Nsp(7524)V-HindIII 断片を pAGE-1 から切り出した。発現ベクター pKK223-4 は、pKK223-3 の 2 箇所の BamHI サイトのうちマルチクローニングサイト以外のサイトを欠失させて作製した。pKK223-4 を BamHI, HindIII 消化し、合成 DNA 断片とエステラーゼ由来の Nsp(7524)V-HindIII 断片をライゲーションし、発現プラスミド pAGE-203 を構築した。同様の方法で pAGE-201 および pAGE-202 を構築した (SD-ATG 間の配列詳細は、結果の項 2-3-3 参照)。



(図 2-2) 大腸菌高発現プラスミド構築

#### 2-2-9 大腸菌組み換え体のラセミ体菊酸エチル不斉加水分解活性解析

2-2-8 で構築した 3 種類の発現プラスミドで *E. coli* JM101, JM103, JM105 および JM109 をそれぞれ形質転換した。得られた大腸菌組み換え体を TB 培地(29)で培養した。

培養した大腸菌を遠心操作で回収し、1-2-4 に記載した方法を用いてラセミ体菊酸エチルエステルに対する加水分解活性および反応の立体選択性を測定した。

#### 2-2-10 大腸菌組み換え体の高密度培養

JM105/pAGE-203 株を、アンピシリンを含む 100 mL の LB 培地(29)に播種し、30°C で終夜振とう培養した。この前培養液 80 mL を、800 mL の培地 I に播種し、2.6 L 容のジャーファーマンター (培養体積 1.0 L、MD-250 ; 丸菱エンジニアリング製) にて 900 rpm の攪拌速度で、1.5L/L の通気量にて培養した。660 nm における吸光度が 60 に達した時点で 0.05 mM の IPTG を添加し、エステラーゼの発現を誘導した。培養中、グリセロールおよび酢酸濃度を HPLC (カラム Aminex HPX-87H ; 7.8 φ x 300 mm ; Bio-Rad

製；移動相 6 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>；60°C）によりモニターし、培地 II を流加して培養液中の酢酸濃度を最小に保った(30)。

培地 I；0.9 g/L casamino acids, 0.6 g/L yeast extract, 30 g/L glycerol, 4.0 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4.0 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7.0 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 1.2 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2 g/L NH<sub>4</sub>Cl, metal mixture(\*) 0.5 mg/L, 0.01 g/L thiamine-HCl, 0.05 g/L sodium ampicillin [森らの報告より改変 (31) ]

培地 II；6.0 g/40 mL casamino acids, 4.0 g/40 mL yeast extract, 16 g/40 mL glycerol

(\*) metal mixture；2.4 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.04 g/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.04 g/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2.0 mg/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.0 mg/L CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 4.0 mg/L CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 2.0 mg/L Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.01 g/L MnSO<sub>4</sub>·nH<sub>2</sub>O, 0.5 mg/L H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>

#### 2-2-11 組み換えエステラーゼ精製

2-2-10 の高密度培養により得られた大腸菌組み換え体を遠心操作により回収し、菌体を 80W x 5 min x3 回、4°C の超音波処理により破碎した。破碎液を 100,000 g x 60 min、4°C で超遠心し、上清を回収した。得られた可溶性画分に硫酸を添加し、30 % 飽和濃度にして 4°C で静置した。12,000 rpm x 15 min、4°C の遠心により得られた沈殿を 20 mM Tris-HCl (pH7.5) に溶解した後、同バッファーで平衡化した DEAE-5PW イオン交換クロマトグラフィー(21.5 mm φ x 150 mm；日本ウオーターズ製)に供し、NaCl の濃度勾配でエステラーゼを溶出した。

#### 2-2-12 組み換えエステラーゼの CD (circular dichroism) スペクトル解析(32)

Jasco J-720 を用いて、精製したエステラーゼのスペクトルを測定した。光路長 1.0 cm のキュベットを用いて、100 mM リン酸バッファー (pH8.0) あるいは 100 mM Tris-HCl (pH9.5) に酵素濃度を 0.1-0.2 mg/mL となるようにエステラーゼを添加し、各温度における 180-300 nm のスペクトルを測定した。各 2 次構造の含量は、Yang らの方法 (33) に基づき計算した。

#### 2-2-13 ホローファイバーリアクターによるラセミ体菊酸エチル不斉加水分解

160 g のラセミ体菊酸エチルエステルを懸濁した 400 mL の 200 mM Glycine-NaOH (50 °C において pH を 9.5 に調整) 溶液を 1 L の丸底フラスコに入れ、マグネティックスターラーを用いて 1,000 rpm の速度で持続的に攪拌した。2-2-10 で得られた高密度培養菌体 3.2 g (乾燥重量) を加えて不斉加水分解反応を開始し、反応中は温度を 50°C とし、また、pH 電極 (FC-10；東京理科器械製) と pH コントローラーを用いて、2.0 N NaCl により pH を常に 9.5 に保った。ペリスタリックポンプ (流速 20 mL/min) により、反応溶液をペンシル型ホローファイバー限外ろ過膜 (AIP-0013 他；20 mm φ x 130 mm；

旭化成製) に通過させ、生成した菊酸を反応系から分離した。残存した反応液は再び丸底フラスコに戻し、200 mM Glycine-NaOH (pH 9.5) を加えて、攪拌下に反応を継続した。この限外ろ過による分離操作を3回行い、48時間まで反応を行った。最終反応液を4回目の限外ろ過に供し、全てのろ液を集めて酸性にし、菊酸を MIBK で抽出した。

## 2-3 結果

### 2-3-1 *A. globiformis* SC-6-98-28 株エステラーゼ遺伝子クローニング

精製酵素を API で消化し、得られたペプチド断片のアミノ酸配列解析を行った。その結果、N 末端ペプチドを含む 5 種のペプチドについて配列が分析できた (図 2-3 の下線部)。これらの情報をもとに、なるべく塩基の縮重が少ないコドンを含む部分を選んで DNA プローブとした。N 末端およびその近傍部分に対応する 2 種類の標識 DNA プローブ I、II を用いて *A. globiformis* SC-6-98-28 染色体ライブラリーの KpnI 消化断片を含むプラスミドを有する大腸菌 JM109 をスクリーニングし、2.2 kbp の *A. globiformis* 由来断片を含むプラスミド pAGE-1 (図 2-1) を取得した。

### 2-3-2 塩基配列解析結果

2-3-1 にて取得した pAGE-1 上の 2.2 kbp の *A. globiformis* SC-6-98-28 染色体由来塩基配列を解析した。その結果、GTG を開始コドンとし、375 アミノ酸から成る ORF (Open Reading Frame) を見出した。アミノ酸配列から計算したモノマー当たりの分子量は 39,836 であり、第 1 章で精製したエステラーゼタンパク質のカラムクロマトグラフィーから予想した約 43,000 よりやや小さいものの、ほぼ一致すると言えるものであった。精製したエステラーゼの API リジルエンドペプチダーゼ消化断片のアミノ酸配列が、N 末端部分および ORF 内部に複数認められたことから (図 2-3、下線部分)、目的のエステラーゼ遺伝子がクローニングできたと判断した。解析した 2.2kbp の塩基配列は GenBank へ提出した (Accession no. L22516)。

エステラーゼの ORF 上流には、典型的なリボソーム結合サイトは見当たらず、図 2-3 に示すように 192 および 200 の 2 箇所が 16S rRNA の 3' 末端と 6 塩基中 4 塩基という弱い一致を示した (34)。 *Arthrobacter* 属の他の遺伝子とは異なり (35-37)、典型的な -10 および -35 領域配列も見当たらなかった (38)。さらに、終始コドン TAG の下流には、転写終結配列として働く典型的な inverted repeat も無かった。

エステラーゼの ORF 部分の G+C 含量は 65.3% であり、特にコドンの第 3 塩基には 77.9% という高い確率で G あるいは C が使用されていた。

```

1   GGTACCCTACCTTTTCATGCACCCAGCGGTGAGGACCTGAAATTCCTGTACCGCTGGTTTCCGAGGGGAAACTGCAACCCGTTGGTGGACAGCAGCTA
101 TCCGCTCGAAAAGATCGGGCAGCTTTTCGCGCGCTGGAGCAGGGACCGCCCAAGGGCAAGATCGTGGTGACCATGGACACGCGCGCAGTTAGGCAGTTA
201 GGCTGTCCGGTGGATGCACAGACGATTTCCCTGGATTTCGAATCAGTCGCCGAACCTTTTGGCCGTTTCCTGAGCGAAGACCGGGAAATATTCAGCCCCAG
1   M D A Q T I A P G F E S V A E L F G R F L S E D R E Y S A Q
301 CTCGCGGCTACCACCCGGGAGTCAAGGTATTGGACATCAGCGGTGGGCGCCACCGCCCGCGGATTCCGTGACCGGTGTTTTCTCCTGCTCCAAGGGAG
31  L A A Y H R G V K V L D I S G G P H R R P D S V T G V F S C S K G V
401 TATCCGGCTGGTCACTGCACTTTTGGTCCAGGACGGCTTCCTCGACCTCGACCGCAAGTGGTCAAGTACTGGCCGGAAATTCGCGCGCAAGGAAAGGC
65  S G L V I A L L V Q D G F L D L D A E V V K Y W P E F G A E G K A
501 CACGATTACCGTGGCCAGCTGCTCTCCACCCAGGCGGGCTTCTGGGAGTCAAGGCGGACTCACCTCGCGGAATACAACTCCGAACTGGCCGCGC
98  T I T V A Q L L S H Q A G L L L G V E G G L T L A E Y N N S E L A A
601 GCCAAGCTCGCGCAGATGCGGCCGCTGTGGAAGCCCGGGACCGCCTTCGGGTACACCGCCCTGACCATCGCGCTTCAATGGAGGAGCTTTGCGCCGCGGA
131 A K L A Q M R P L W K P G T A F G Y H A L T I G V F M E E L C R R I
701 TCACCGGGTCCACGCTCCAGGAAATCTACGAACAGCGGATCCGCTCGGTTCACGGGCGCCACTTCTTCCCTGGGACTGCCTGAGTCCGAGGAACCCCGCTA
165 T G S T L Q E I Y E Q R I R S V T G A H F F L G L P E S E E P R Y
801 TGCCACCCCTCCGTTGGGTGACAGACCCCTCCAGCCGCTGGATTGATCCCGCCAGCCATTTGGGCTTTCCGCAAACTCGGCGGTGGGGGACATCCCTTGAC
198 A T L R W A A D P S A Q P W I D P A S H F G L S A N S A V G D I L D
901 CTGCCAACCTCCGCGAGGTCCGCGCAGCCGCGCTGAGTTCAGCCGCGGAGTCCGACGCGGGAAGGCATGGCCCGCTTACGCTGCGGCACTCACCG
231 L P N L R E V R A A G L S S A A G V A S A E G M A R V Y A A A L T G
1001 GACTTGGCCCAACCGCGACCGGACCGCCCGCTCGCGCCCTCCTCAGCGAAGAGACCATCCAAACCGTACCGCCGAGCAGGTCTTCGGCATCGACCCGGT
265 L A A N G D R A A V A P L L S E E T I Q T V T A E Q V F G I D R V
1101 GTTCGGCGAGACGAGCTGCTTTGGGACAGTGTTCATGAAATCGCATGCACGCTCGCCTTATGGCAGCTACCGGGCGTTCGGGCACGACGCGCCAGCGCA
298 F G E T S C F G T V F M K S H A R S P Y G S Y R A F G H D G A S A
1201 TCTPTGGGGTTCGCTGACCTGTGTATGAACTCGCCTTCGGGTACGTGCCGCAACAGCCGAGCCGGGCGGAGCGGGATGCCGCAACCTTGAGCTGAGCG
331 S L G F A D P V Y E L A F G Y V P Q Q A E P G G A G C R N L E L S A
1301 CCGCCGTGCGGAAGGCAGTCAACGAACTGGCTCAGTAGGATGAAGCATGACCGAACCAGAGATTCACCGTTGAAACAGCCATGCTCCTGCGGAAGTGGCG
365 A V R K A V T E L A Q *
1401 CACAATCGCCAGAAGGACAAGCTGAAGCGGCCGTACCGCGAGCACGTTTCGGCGGTAGGGGATGCGCTCGCCGACTTCGACGACGACATCCGGATCGCAG
1501 GTTACCTGCACGACATCGCCAAAGGACACGCCGATTACCAAGCAGGCGCTGCTCGACATGGGTGTTTCGAGCGGTGCGGTGGGCATCATCGAACCGGTGAC
1601 GCGCCGATTCCAGGATGATTCGGACAACGATGAAGCCGTCGTTCTGCATATCGCACAGGACCATGACGCCACCCCTGGTCAAGATCGCCTGCAACGCCCCAC
1701 AACTCCGTGCGCGAGCGCTGCGGGCGCTCGCCGAAAAGTGGCCGGACAAGGCACCCAGCACCGCTACCGCAGACGCCCGGGAAGTGTCTACAAGGCGG
1801 TGCCACGGGTGAAATCCACTTGGTCTGCAACGCATCAACCCGATCTGCTGTCGAGATGGACCGGCTGGCGGACTAGTAGTTCGACCGCGCAGGTCT
1901 CGCCTGTCTACGGTTTCGTCGGTTCCTGTAATCGGGTTGGCAGCGCCCGCCCTCCCGGTAGCGGATGCGGTGACGTCGCGGAGAATCCGTTGGTG
2001 GATCTGGGCGGTGAGCTCGTAATCGCACCGCTCAGGTCGGTGTTCCTCAGCAGATGCTCCTGGGCGTTGAGTCAATGTTCTGCTTCACTGCTGTTG
2101 AAAGCCCGCTGACGGTCTGCTCCGATCATGACGAAGTTCGAGAGGAAGATCGCTTCGAGCGAGACGATCAAGGT

```

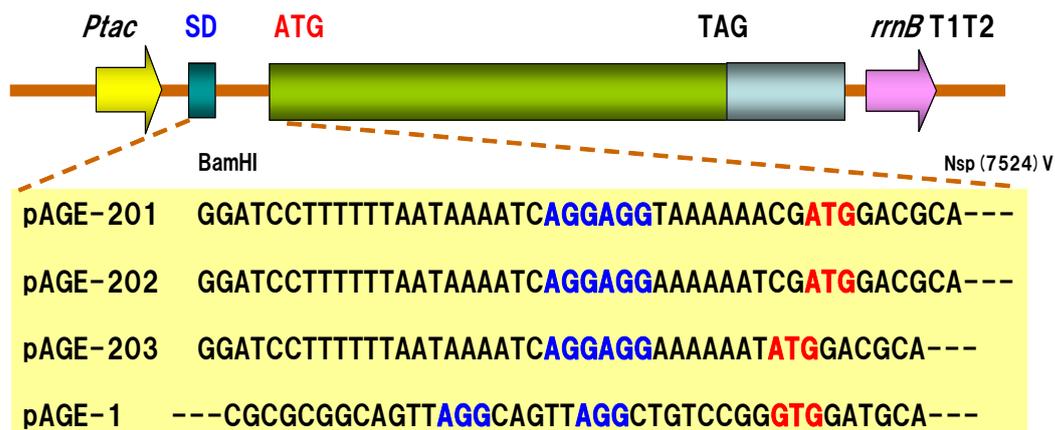
(図 2-3) エステラーゼ遺伝子翻訳領域を含む 2.2kbp 断片の塩基配列とアミノ酸配列  
二重下線は SD 配列と想定される塩基、赤線はクローニングに使用した DNA プローブ I~III に該  
当する部分、下線は精製酵素の API 消化断片についてアミノ酸配列解析した部分を示す。

### 2-3-3 上流および開始コドン近傍塩基配列改変による大腸菌内高発現

*A. globiformis* SC-6-98-28 染色体 DNA 由来のエステラーゼ遺伝子配列を持つ発現プ  
ラスミド pAGE-1 は、*E. coli* JM109 株に導入しても菊酸エチルエステル加水分解活性  
を示さなかった。2-3-2 に述べたように、クローニングしたエステラーゼ遺伝子とそ  
の上流塩基配列は *E. coli* において発現している遺伝子とは大きく異なっていたため、  
エステラーゼ遺伝子を高発現させるために下記の変更を行なった。

- ①翻訳開始コドンを GTG から ATG に変更した。
- ②Shine-Dalgarno 配列と開始コドン間の配列を変更した。
- ③SD 配列上流に AT に富んだ塩基配列を挿入した。
- ④開始コドン以下 10 アミノ酸をコードする部分の塩基配列を変更した。

具体的には、下図 2-4 に示すように 3 種類の合成配列を設計し、発現プラスミド pKK223-4 に挿入し、それぞれ pAGE-201, 202 および 203 を構築した。



(図 2-4) *A. globiformis* エステラーゼ遺伝子開始コドン周辺配列変換  
青字は SD 配列を、赤字は開始コドンを示す

#### 2-3-4 大腸菌組み換え体のラセミ体菊酸エチルエステル不斉加水分解活性

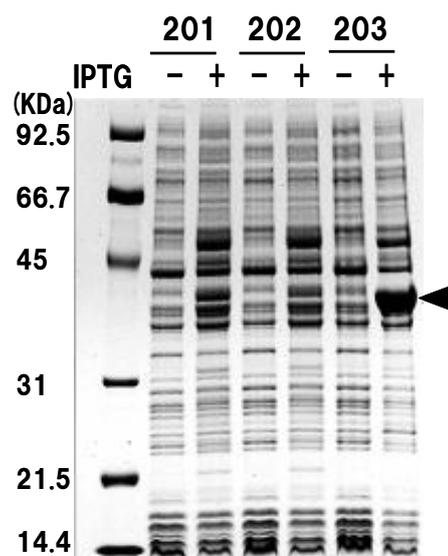
このような改変を施したエステラーゼ遺伝子をプラスミド pKK223-4 の *tac* プロモーター下流に繋いだ発現プラスミドで形質転換した *E. coli* JM109 株は、IPTG 誘導により高い酵素活性を示すようになった (図 2-5、左)。不斉加水分解活性と IPTG により誘導される酵素タンパク質量 (図 2-5、右矢頭) は良い相関性を示し、pAGE-203 を導入した場合にエステラーゼ活性は最大となった。

組み換え大腸菌によるラセミ体菊酸エチルエステル不斉加水分解反応で生成した菊酸の光学純度は *1R, 3R* 体 100% であり、大腸菌自身によるバックグラウンド活性および異宿主内での大量発現による酵素の立体選択性の低下は認められなかった。

Cells	Activity (U/O.D.)
<i>JM109</i> / pKK223-4	N.D.
<i>JM109</i> / pAGE-1	N.D.
<i>JM109</i> / pAGE-201	0.050
<i>JM109</i> / pAGE-202	0.025
<i>JM109</i> / pAGE-203	0.30
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>	
<i>A.globiformis</i>	0.00027

1U=1  $\mu$  mol 1R, 3R 菊酸/min

N. D., 検出限界以下



(図 2-5) 大腸菌組み換え体の菊酸エチルエステル加水分解活性と菌体内の酵素発現パターン

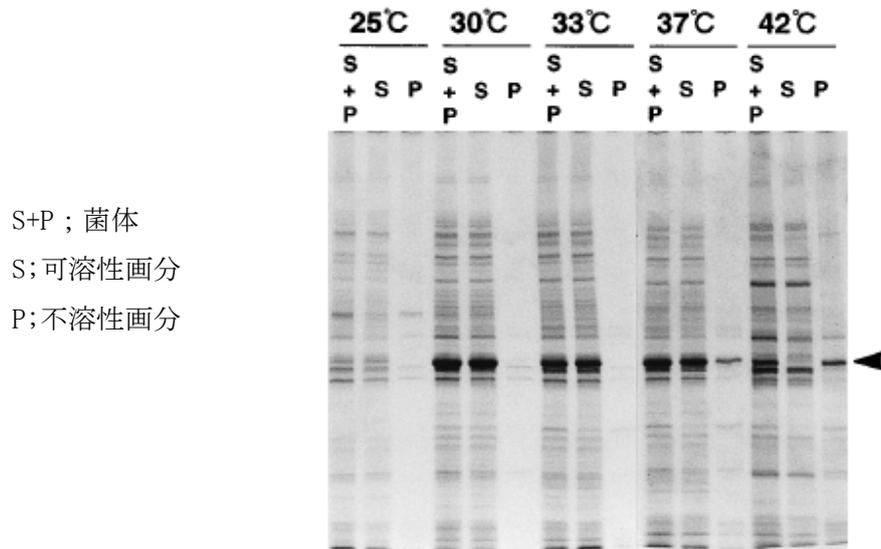
右図中、+は1 mM IPTG を添加した条件、矢頭はエステラーゼに相当するバンドを示す。

### 2-3-5 大腸菌組み換え体の高密度培養

作出した大腸菌組み換え体を大量生産するため、高密度培養条件を検討した。pAGE-203 で形質転換した *E. coli* JM101、JM103、JM105 および JM109 のうち、JM105 が最も高活性な菌体当たりの菊酸エチル加水分解活性を示したため、これ以降の検討には JM105 を用いた。

ジャーファーメンターを用いた流加培養で、初発培地および栄養源の組成、流加のタイミング、培養温度、pH、誘導剤である IPTG の濃度と酵素誘導時期について最適化を行った。

培養温度に関しては、図 2-6 に示すように、30°C 以上で著明なエステラーゼタンパク質の発現誘導が認められ、33°C 以下では発現した酵素はほぼ可溶性画分に局在したが、それ以上の温度においては、一部が不溶性画分にも存在すること、すなわち、封入体を形成していることが判明した (図 2-6 中 P で示したレーン)。各温度において乾燥重量 1g の菌体内に生産されたエステラーゼ活性を下記表 2-1 に示したが、可溶性画分 (図 2-6、S で示したレーン) のエステラーゼ発現量と良い相関性を示した。



(図 2-6) *E. coli* JM105/pAGE-203 のエステラーゼ発現に及ぼす培養温度の影響  
矢頭はエステラーゼに相当するバンドを示す。

(表 2-1) 図 2-5 に示す各温度で高密度培養した *E. coli* JM105/pAGE-203 の活性

Temp (°C)	Activity (U/g dry cells)
25	77.5
30	605
33	533
37	405
42	N.D.

1U=1 μmol 1R, 3R 菊酸/hr

最適な初発培地および流加培地の組成は、2-2-10 に記載した通りであった。IPTG は対数増殖後期に添加した場合に、エステラーゼ誘導能が最も高まった。また、IPTG 濃度は、エステラーゼ発現量を損なうことなく 0.05 mM まで低下させることが可能であった。さらに、栄養源としてグリセロールを流加する速度を調節し、大腸菌の増殖を阻害する酢酸の生成を最小限に留めた。以上の検討の結果、最適と判断した条件は以下の通りであった。

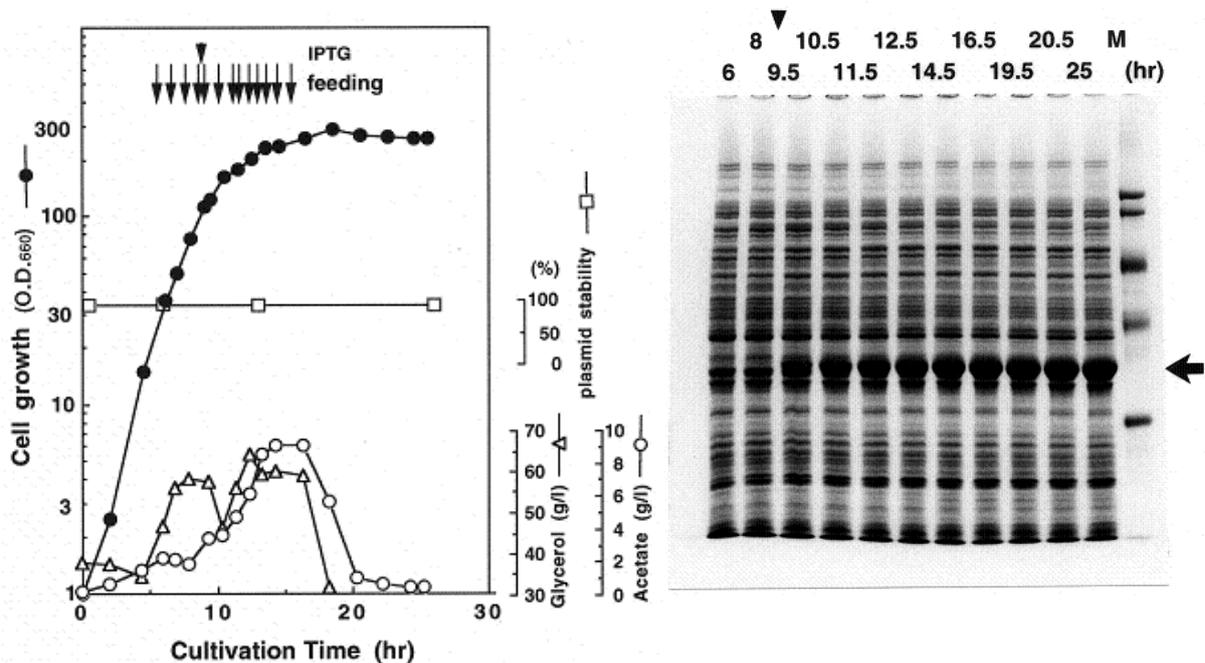
初発培地組成；カザミノ酸 0.9 g/L、酵母エキス 0.6 g/L、グリセロール 30 g/L、  
無機塩（詳細は 2-2-10 参照）

流加培地；カザミノ酸 9 g/L、酵母エキス 6 g/L、グリセロール 400 g/L、  
流加速度 14 mL/hr

温度；30°C、pH；7.5、通気；1.5 L/min、攪拌；900 rpm

IPTG 濃度；0.05 mM（対数増殖後期に添加）

最適化した条件において、高密度培養を行った。その結果、図 2-7 に示すように菌体当たりのエステラーゼ発現量を低下させることなく、 $O.D._{660}=260$  まで組み換え大腸菌を高密度培養できた。単位培養液当たりのエステラーゼ活性は、フラスコレベルの約 660 倍となった。産生された酵素の一部は不活性な封入体を形成していたものの、大部分は可溶性の活性型として回収された。乾燥菌体重量当たりの菊酸エチルに対する酵素活性は、 $605 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g-dry cell}$  であり、1-3-1 において高密度培養した *A. globiformis* SC-6-98-28 株の活性 ( $0.24 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g-dry cell}$ ) の約 2,500 倍であった (表 2-2)。



(図 2-7) *E. coli* JM105/pAGE-203 の高密度培養

左；矢印は栄養源（培地 II）の流加を、矢頭は 0.05 mM IPTG 添加を示す。

右；高密度培養の各時間におけるエステラーゼ発現量。矢頭は IPTG 添加を、矢印はエステラーゼに相当するバンドの位置を示す。

(表 2-2) *A. globiformis* と大腸菌組み換え体のエステラーゼ生産性比較

Cell	Esterase content in soluble protein (%)	Activity (U= $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g-dry cell}$ )	Optical purity of produced acid (%)
<i>A. globiformis</i> 6-98-28	0.016	0.238	100.0
<i>E. coli</i> JM105/pAGE-203	33.0	605	100.0

### 2-3-6 組み換えエステラーゼ精製と性質解析

高密度培養した組み換え大腸菌からエステラーゼを精製した。菌体破碎、可溶性画分の分離、硫酸沈殿、およびイオン交換クロマトグラフィーという簡単な精製操作で、図 2-8 に示すようにエステラーゼは SDS-PAGE 的に単一のバンドとなった。

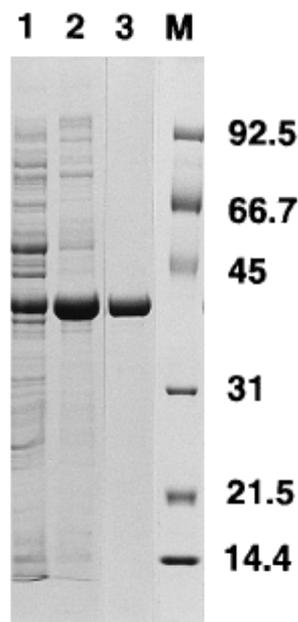
精製過程を表 2-3 に示した。組み換えエステラーゼは、活性評価用基質である PPD に対して、第 1 章にて報告した *A. globiformis* SC-6-98-28 菌体内から精製したエステラーゼと同等の比活性を有していた。組み換えエステラーゼの *1R,3R* 菊酸エチルエステルに対する加水分解の速度論的定数は、45°C、pH 10.0 において、それぞれ 5.8 mol/sec/mol enzyme (8.7  $\mu$ mol/min/mg enzyme) および 3.3 mM であり、天然型エステラーゼの 6.0 mol/sec/mol enzyme および 3.3 mM と同等であった。

高密度培養の結果、可溶性の活性型精製酵素として、54%の収率で、1L の培養液当たり 3.2 g を取得した。活性型酵素の生産量は菌体内総可溶性タンパク質の約 33%に達し、その含量は *A. globiformis* SC-6-98-28 株の約 2,000 倍となった。活性回収率から計算した高密度培養液中の組み換えエステラーゼ産生量は、5.6 g/L であった。

(表 2-3) 組み換え大腸菌からのエステラーゼ精製

Purification Step	Activity (U)	Yield (%)	Protein (mg)	Sp.act. (U/mg)
Cell extract	2,922	100.0	168.8	17.3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0 to 30%)	1,596	54.6	46.9	34.0
DEAE-5PW	1,566	53.6	29.9	52.4

精製過程における酵素活性は PPD を基質として測定した。



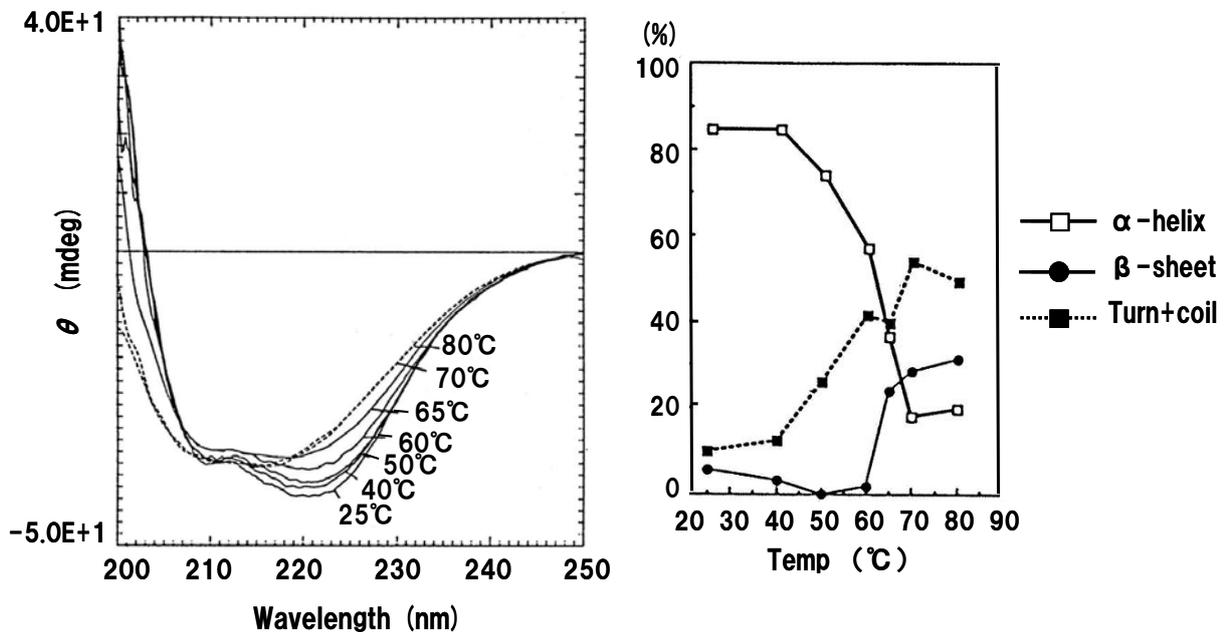
(図 2-8) 組み換えエステラーゼ精製ステップの SDS-PAGE

各レーン番号は精製ステップに相当する

組み換え精製酵素の熱安定性を調べる目的で、精製エステラーゼの CD スペクトルの温度による変化を測定した。その結果、図 2-9 左に示すように、50°C までは大きな構造のくずれは認められなかったが、60°C 以上において構造変化を起こすことが判った。この CD スペクトルから、Yang らの方法 (33) に基づき 2 次構造の含量を予測した結果を図 2-9 右に示した。 $\alpha$  ヘリックス含量は 40°C を越すと減少しはじめ、50°C を

超えると急激に減少した。一方、ターンとランダムコイルから成る不規則構造は 40°C から 70°C まで増加し続けた。70°C 以上になると各構造の含量は変化しなかった。 $\alpha$ ヘリックス含量が 50 % となる温度を  $T_m$  値と定義した場合、図 2-9 右より  $T_m$  値は 60°C と算出された。

これらの結果から、本酵素は、60°C を超えると何らかの立体構造変化を起こし、さらに 70°C 以上においては、質的に異なる変性状態へ移行することが判った。1 段階目の変化は、立体構造は崩れつつあるが 2 次構造はある程度保たれているモルテン・グロビュール状態であり、その後、2 次構造自体の崩壊が起きたものと推察しているが、1 段階目の変化は通常の状態変性であり、70°C 以上ではさらに会合化が促進されるという可能性も考えられた。



(図 2-9) 組み換えエステラーゼ構造の熱安定性検討

左；各温度における CD スペクトルパターン

右；CD スペクトルから計算した各温度における 2 次構造の割合

#### 2-3-7 大腸菌組み換え体を用いたラセミ体菊酸エチル不斉加水分解反応

高密度培養により得られた大腸菌組み換え体を熱処理し、酵素活性を残存させたまま大腸菌を死滅させることが可能か検討した。ジャーファーメンターによる高密度培養後、培養液を pH 7.5 のままで、あるいは NaOH によって pH を 9.0 および 10.0 に上昇させた後、50°C で 1.5 時間攪拌した。各条件における熱処理前後の生菌数と菊酸エチル加水分解活性の相対値を表 2-4 に示した。

(表 2-4) 大腸菌組み換え体の死菌化処理条件検討

pH	生菌数 (個/mL)		酵素活性 (%)	
	熱処理前	熱処理後	熱処理前	熱処理後
7.5	10 <sup>10</sup>	10 <sup>3</sup>	100	96
9.0	10 <sup>10</sup>	1	100	97
10.0	10 <sup>10</sup>	0	100	99

pH9.0あるいは10.0で熱処理することにより、大腸菌組み換え体はほぼ完全に死滅したが、この処理により、大腸菌組み換え体内のエステラーゼ活性はほとんど影響を受けず、活性が完全に保たれていることを確認した。

大腸菌組み換え体を、ラセミ体菊酸エチルエステル不斉加水分解反応に供した。まずバッチ式で反応条件を検討した。基質としては、既に稼動している製造プロセスの混合比を模して、*1R, 3R* : *1S, 3S* : *1R, 3S* : *1S, 3R* = 45:45:5:5 の菊酸エチルエステル混合物を用いた。その結果、表2-5に示すように、基質濃度10%において、pH 9.5、50°Cの条件で、*1R, 3R*体の98%が加水分解された。24時間後も反応を継続した場合にも、*1R, 3R*体以外の異性体エステルの加水分解反応は認められなかった。

(表 2-5) 組み換え大腸菌を用いたラセミ体菊酸エチル不斉加水分解反応条件検討

Substrate conc.(%)	pH	Temp (°C)	Yield (g)	Conversion <sup>a)</sup>		Optical purity(%) <sup>b)</sup>			
				(%)		<i>1R, 3R</i>	<i>1R, 3S</i>	<i>1S, 3S</i>	<i>1S, 3R</i>
10	9.0	45	1.53	79		-			
10	9.5	45	1.70	88		-			
10	10.0	45	1.12	58		100	0	0	0
10	9.5	50	1.89	98		100	0	0	0
10	9.5	55	1.77	92		99.3	0.7	0	0
10	9.5	60	1.52	79		99.2	0.8	0	0
15	9.5	50	2.87	99		-			
* 20	9.5	50	1.97	46		-			
* 30	9.5	50	1.80	31		-			
* 40	9.5	50	1.60	21		-			

a) 変換率は *1R, 3R* 菊酸エチルが加水分解された割合を示す。

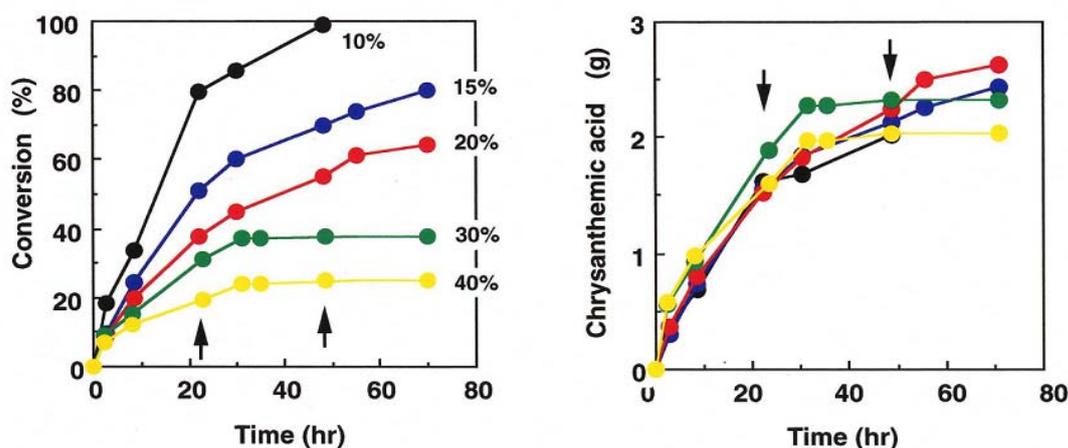
b) 基質の組成 ; *1R, 3R* : *1R, 3S* : *1S, 3S* : *1S, 3R* = 45:5:45:5

\* 24時間後に *E. coli* JM105/pAGE-203 を加え、さらに24時間反応を継続した。

一方、反応温度を55°C以上にすると、*1R, 3R*体以外に *1R, 3S*体も生成するように

なること、すなわち、酵素の立体選択性が緩む現象が認められた。また、基質エステルの濃度が 15 %を超えると変換率が 100 %に達しない時点、すなわち *1R,3R* 体が全て加水分解されない時点で反応が停止することが判った。大腸菌組み換え体を 24 時間後に反応系にフィードし、さらに反応を続けた場合にも、*1R,3R* 体の加水分解率は 100 %に達しなかった。

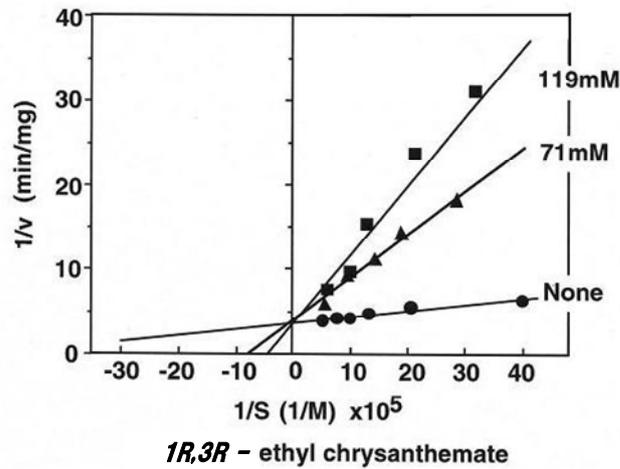
この現象を解析するため、図 2-10 に、菊酸エチルエステルを各濃度で反応させた場合の変換率の経時変化を示した。基質濃度が高くなるに従い *1R,3R* 体の変換率が低下したが、生成した *1R,3R* 菊酸の絶対量に換算すると、全ての反応において、反応系内にほぼ一定量の *1R,3R* 菊酸が蓄積した時点から反応が停止していることが判明した。



(図 2-10) 組み換え大腸菌を用いた菊酸エチル不斉加水分解反応の基質濃度と反応率  
反応は全て 50°Cで行い、左図中の矢印で示した時点で酵素を追加した。

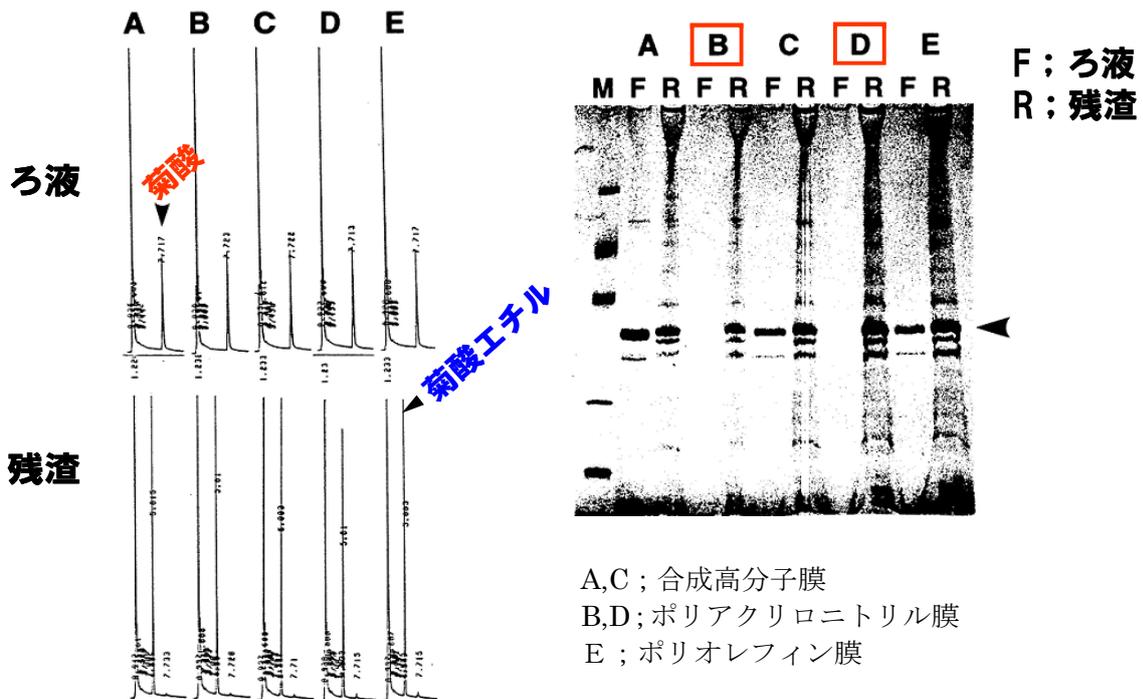
### 2-3-8 ろ過システムによる高濃度ラセミ体菊酸エチル不斉加水分解反応

基質濃度を上げた時に、全ての *1R,3R* 体が加水分解されない時点で反応が停止してしまう理由を、生成物である *1R,3R* 菊酸が酵素反応を阻害するためと推察した。そこで、精製酵素を用いて *1R,3R* 菊酸エチルエステルを基質として加水分解反応を行う際に *1R,3R* 菊酸を反応系に添加した。その結果、添加した *1R,3R* 菊酸の濃度依存的に加水分解反応が抑制された。Lineweaver-Burk プロット解析の結果、図 2-11 に示すように、*1R,3R* 菊酸が  $K_i=7.1$  mM で競合的な反応阻害を起こすことが判明した。



(図 2-11) 生成物 1R, 3R 菊酸による酵素阻害 (Lineweaver-Burk プロット解析)

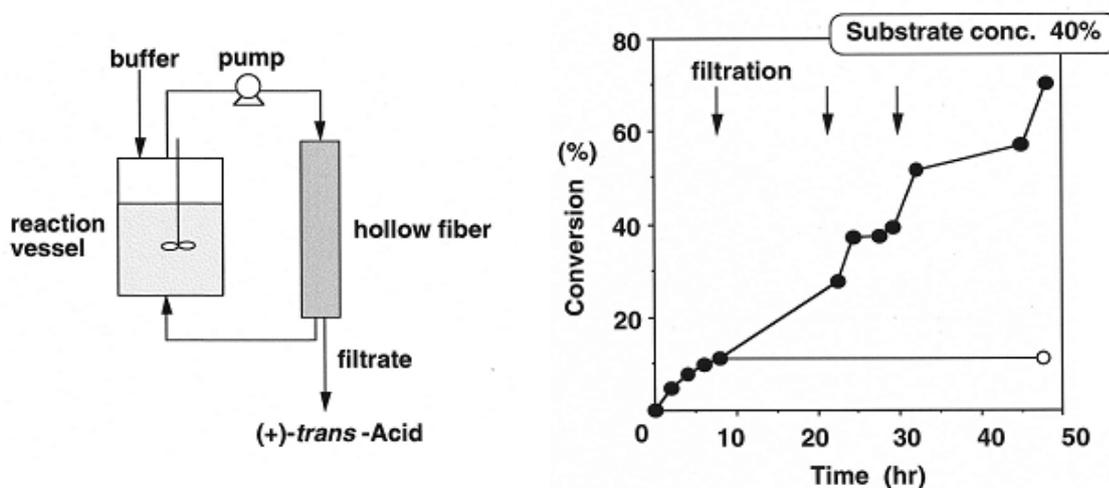
そこで、ホローファイバー型限外ろ過膜により生成物を連続的に反応系から除去することを試みた。ろ過膜として、合成高分子複合体、ポリオレフィン、ポリアクリロニトリルから成る 5 種類のペンシル型ホローファイバー限外ろ過膜を検討した。その結果、どの膜を用いた場合にも、ろ液中には精製した菊酸のみが認められ、未反応のエステルは全て菌体と共に残渣中に回収された (図 2-12、左)。しかし、合成高分子複合体およびポリオレフィン膜を使用した場合、エステラーゼの一部がろ液に漏出したのに対して、ポリアクリロニトリル製膜においては、酵素の漏出は検出されなかった (図 2-12、右)。



(図 2-12) 限外ろ過膜による生成菊酸除去検討

以上の結果とエステラーゼの分子量を考慮し、分画分子量 6,000 のポリアクリロニトリル性膜を採用することとした。

ホローファイバー型にした限外ろ過膜を用いた菊酸エチル不斉加水分解システムの概略を図 2-13 左に示した。菊酸エチルエステル濃度 40 %、50°C、pH 9.5 の glycine-NaOH バッファー中に *E. coli* JM105/pAGE-203 菌体を添加し、1N NaOH により pH を 9.5 に制御しながら反応を行なった。



(図 2-13) ホローファイバー型限外ろ過システムを用いたラセミ体菊酸エチル不斉加水分解反応

右図中、矢印で示した時点で、反応液をホローファイバー型限外ろ過膜で処理した。  
○は限外ろ過を行なわなかった場合の変換率を示す。

その結果、図 2-13 右に示すように、40 %という高基質濃度においても変換率 70% (基質である *1R,3R* 菊酸エチルの 70 %が加水分解された状態) まで反応が直線的に進行するようになった。予備実験と同様に、未反応のエステルはろ過されずに菌体残渣と共に反応系内にトラップされ、且つ、ろ液から回収された菊酸の光学純度は 99.9 %以上であり、他の異性体加水分解などの副反応は認められなかった。得られた *1R,3R* 菊酸と反応残渣中から回収された未反応のエステル量から計算した反応系全体の物質収支は 90.1 %であった。

## 2-4 考察

*A. globiformis* SC-6-98-28 菊酸エステル不斉加水分解酵素（エステラーゼ）遺伝子は、*Arthrobacter* 属微生物酵素の特徴である高い G+C 含量を示し、*E. coli* 内で高発現している遺伝子とは大きく異なる性質を有していた。開始コドン上流に典型的な Shine-Dalgarno 配列 (39) は見当たらず、開始コドン自体も ATG ではなく GTG であった。エステラーゼのコーディング領域の G+C 含量は 65.3% であり、特にコドンの第 3 塩基には 77.9% という高い確率で G あるいは C が使用されていた。*Arthrobacter globiformis* (35-37) および *Arthrobacter simplex* (38) 遺伝子の G+C 含量はそれぞれ 56-66% および 70-74% と報告されており、また、両種ともにコドンの第 3 塩基は G あるいは C に著しく偏っているという報告と一致した。

これらの特徴から、本来の遺伝子配列ではエステラーゼを *E. coli* 内で機能的に発現させることは困難と予想された。予想通り、オリジナルなコーディング領域および上流配列を持つ pAGE-1 で形質転換した *E. coli* JM109 は、菊酸エチルエステル加水分解活性を全く示さなかった。当初、ショットガン法による遺伝子クローニングを試みたが、ポジティブクローンを得ることができなかったのは、発色基質を用いてエステラーゼ活性を指標にスクリーニングしたためと考えられた。

不斉加水分解プロセスへの応用を目指して、*E. coli* 菌体内でエステラーゼ遺伝子を高発現させるため、下記の点に着目し、2-3-3 に記載した変換を行なった。

- ① 翻訳開始コドンとしては稀な GTG が使用されていた。*Arthrobacter oxdans* の 6-hydroxy-D-nicotine oxidase 遺伝子の開始コドン TTG を通常使用される ATG に変更した結果、発現量が 2.5 倍上昇したという報告がなされている (40)。また、 $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase 遺伝子の開始コドンも、TTG から ATG へ変更することにより、大腸菌において 1.5 倍発現量が向上している (41)。これらのレアコドンからの変換例を参考に、GTG から ATG に変更した。
- ② *E. coli* において Shine-Dalgarno-ATG 間の距離と配列の異なるプラスミドを多数設計した結果、ヒト成長因子の分泌量が数十倍変化したという報告 (42)、プラスミノーゲンアクチベーターの高発現配列 (43) を参考に、Shine-Dalgarno-ATG 間配列を設計した。
- ③ *E. coli* において高発現している遺伝子の Shine-Dalgarno 配列上流を網羅的に統計解析した結果、導き出された AT に富んだ塩基配列 (44) を挿入した。
- ④ *E. coli* において高発現している遺伝子のコドン使用頻度を参考に (45)、開始コドン

以下 10 アミノ酸をコードする塩基配列を変換した。特にコドンの第 3 塩基が G, C に偏らないように設計した。

以上の改変の結果、*E. coli* JM105/pAGE-203 株は著明なエステラーゼ活性を示すようになった。

さらに、流加培養法による高密度化を検討した結果、ジャーファーメンターで大量の組み換えエステラーゼ発現大腸菌を取得することが可能になった。遺伝子組み換えと培養条件検討により、*E. coli* JM105/pAGE-203 株菌体重量当たりから得られる組み換えエステラーゼ酵素量は、*A. globiformis* SC-6-98-28 株の重量当たり得られる天然型エステラーゼ酵素量の約 2,500 倍に達し、光学活性菊酸製造の実用化にも耐える酵素量を経済的に供給できるようになった。

なお、高密度培養法の最適化に際して、高価な IPTG を添加しないエステラーゼ誘導法としてグルコース濃度変化による誘導法である *lac* プロモーターなど *tac* 以外のプロモーターや、誘導型にしない構成的発現法も並行して検討した。しかし、いずれの方法も、エステラーゼ発現量の点で *tac* プロモーター/IPTG 誘導法に遠く及ばなかったため、高密度培養時に添加する IPTG 濃度を可能な限り落とす検討を行い、最終的に 0.05 mM とした。

*E. coli* 菌体内で高発現させた組み換えエステラーゼは、菊酸エチルエステルおよび精製の際の活性評価用基質として用いた PPD に対して、*A. globiformis* SC-6-98-28 株から精製した天然型エステラーゼと同等の比活性を示したことから、大腸菌内全可溶性タンパク質の 1/3 という高い発現量に達したにもかかわらず、天然型と遜色ない立体構造を取っていると推察された。

天然型エステラーゼと同等の性質を持つ組み換えエステラーゼを大量に調製することが可能になったため、酵素の熱安定性を調べる目的で、CD スペクト測定を実施した。その結果、 $\alpha$ ヘリックス含量が 50 %となる温度を  $T_m$  値と定義した場合、本酵素の  $T_m$  は 60 °C であり、リゾチームなどの  $\alpha$ ヘリックスに富むタンパク質が一般的に高い熱安定性を示すのと同様に、高い温度まで熱変性を起こさない酵素であることが確認できた。また、エステラーゼの活性最適 pH は 10.0 とアルカリ側に偏っており、大腸菌の最適生育 pH が中性付近であることとはかなり異なっていた。

これらの特性を利用し、不斉加水分解反応の前工程として、高密度培養終了後の *E. coli* JM105/pAGE-203 菌体溶液を、pH10.0、50 °C で 1.5 時間熱処理したところ、菌体内のエステラーゼ活性を保持したまま、組み換え大腸菌菌体を完全に死菌化することが可能であった。すなわち、大腸菌組み換え体から組み換えエステラーゼを精製する工程も省略可能となり、熱処理した *E. coli* JM105/pAGE-203 菌体をそのまま反応系

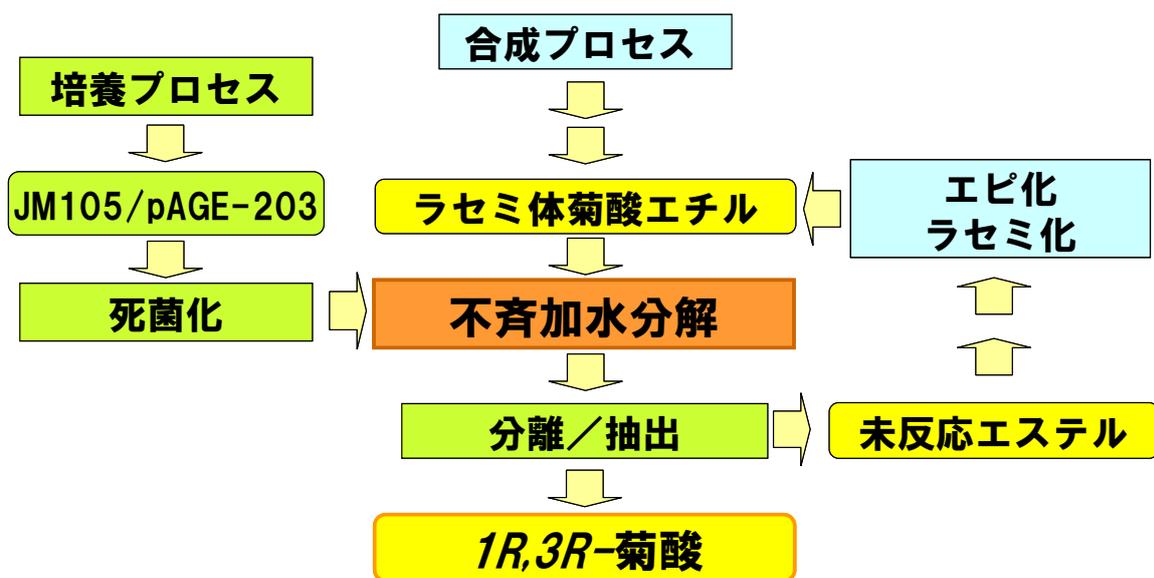
に添加し、非組み換え体として取り扱うことが可能となった。実際のプロセスを設計する上で大きなメリットと考えられる。

また、酵素反応は高い立体選択性や基質特異性を有するものの、通常は基質濃度が高くないため、化学反応と比較すると反応の効率という点では劣る。本研究においても、ラセミ体菊酸エチルエステル濃度 2% を活性測定の条件として採用してきたが、酵素反応の実用化を目指すためには基質濃度を上げることが必須であった。このため、さらに高濃度の菊酸エチルエステルを用いた反応の可能性を検討した。

その結果、酵素反応にしばしば認められる生成物阻害により、15% を越える基質濃度で反応を行った場合には、*1R,3R* 体菊酸エチルが完全に加水分解されない時点で反応が停止してしまうことが判明した。この現象を回避するため、生成した菊酸を反応系から除去することを試みた。検討に際しては、基質である菊酸エチルは水に難溶性であるためミセルを形成しているのに対して、加水分解反応により生成する菊酸は、反応条件であるアルカリ性 pH においては水溶性であることに着目した。この性質の差を利用して、限外ろ過膜により菊酸を反応系外へ除去することを検討した。その結果、ポリアクリロニトリル性の限外ろ過膜を使用すれば、菊酸のみがろ過され、組み換え酵素と未反応の菊酸エチルエステルは反応系内にとどめることができることを見出した。

ホローファイバー型の限外ろ過膜を反応系に組み込むことにより、40% という高基質濃度においても 70% の *1R,3R* 体菊酸エチルが不斉加水分解される時点まで、反応が直線的に進むシステムを構築することができた。本システムを用いることにより、理論的には全ての *1R,3R* 体菊酸エチルを不斉加水分解することが可能であり、さらに基質濃度を高めることができれば、より一層の反応効率向上につながる。

反応効率という点からは、本不斉加水分解反応が 100% 進行した場合にも、化学合成プロセスの都合により基質となる菊酸エチルエステルの異性体比が *1R, 3R : 1S, 3S : 1R, 3S : 1S, 3R* = 45:45:5:5 であるため、生成する *1R, 3R* 菊酸は全体の 45% にとどまる。しかし、未反応の異性体エステルは反応系残渣から回収、分離し、別途、住友化学の研究者により確立された方法 (46, 47) により、そのまま直接ラセミ化・エピ化することが可能であるため、再び基質として利用可能となり、図 2-14 に示すように効率的なプロセスが構築可能である。



(図 2-14) 組み換えエステラーゼによる菊酸エチルエステル不斉加水分解フロー

## 第3章 不斉加水分解酵素の構造と活性

### 3-1 序論

第1章、第2章において記載した *A. globiformis* SC-6-98-28 株由来エステラーゼは、菊酸エチルエステルに対して高い立体選択性を有する興味深い酵素であった。しかしながら、本酵素がどのように触媒活性を発揮するのか、また、これまでに知られている加水分解酵素類と共通な触媒機構を示すかどうかという点に関しては、不明である。将来、光学活性菊酸の製造プロセスへの利用にとどまらず、他のバイオプロセスへの応用を図るために、まず、本酵素の構造と活性に関して考察する目的で実験を行なうこととした。

酵素の構造活性相関に関する考察を行う上で、X線結晶構造解析は有効な手段であるが、良質の解像度を与える結晶、特に、基質アナログあるいは阻害剤との複合体結晶が必ずしも得られるとは限らず、結晶化条件を試行錯誤する可能性もある。得られた立体構造データに基づいて、*in silico* で基質あるいは阻害化合物を分子設計したとしても、実際に化合物を合成し、酵素を用いて生化学的手法で活性評価を行なうことと同様に、酵素タンパク質側についても、得られた構造データから触媒活性に関与するアミノ酸残基を予測することは可能であるものの、その予測を実証により確認する必要がある。通常、活性に関与すると予想されるアミノ酸残基の変換などの方法に頼り、検証を行なう。

本酵素とアミノ酸配列上の相同性を示す酵素のいくつかに関しては、これまでにX線結晶構造データ取得ならびに部位特異的変異酵素作製が行われ、触媒活性を発揮するために必須のアミノ酸残基や、加水分解反応メカニズムが一部解析されていることから、これらの報告を参考に、エステラーゼに関して数種のアミノ酸変異酵素を作製し、各変異酵素の活性評価を行うこととした。また、古典的な方法ではあるが、直接活性中心に、代謝されない基質アナログあるいは阻害剤を共有結合させて、修飾されたアミノ酸残基を解析する、いわゆる化学修飾法による活性中心の同定を試みることにした。

## 3-2 実験材料および方法

### 3-2-1 実験試薬

*Achromobacter lyticus* protease I:EC 3.4.21.50 (以下 API) は和光純薬より、各種制限酵素、T4 polynucleotide kinase および DNA シークエンスキットは TaKaRa BIO より購入した。ProteinA-FF および [<sup>3</sup>H]-DFP は GE ヘルスケア (旧アマシャム) より購入した。Pfu polymerase は Strategene (La Jolla, CA) から、dye-termination DNA シークエンシングキットは Applied Biosystems (Warrington, UK) から購入した。Cephalothin sodium 塩 および *Enterobacter cloacae*  $\beta$ -lactamase は Sigma Aldrich から購入した。D-アミノ酸ペプチドはペプチド研究所から購入した。

### 3-2-2 アミノ酸配列アラインメント

エステラーゼと既知タンパク質との相同性検索は、FASTA (48)、PRF (Protein Research Foundation, Osaka)、および PIR (National Biomedical Research Foundation, Washington, D. C.) を利用して行なった。また、相同性を示したタンパク質とエステラーゼとの多重アミノ酸アラインメントには ClustalV (49) を用いた。2次構造予測には Chou & Fasman のプログラム (50) を用いた。

### 3-2-3 $\beta$ ラクタム抗生物質および D-アミノ酸ペプチド加水分解活性測定

セファロスポリン系抗生物質である cepharothin を終濃度 50  $\mu$ M となるように 2 mL の 50 mM リン酸バッファー (pH 7.0) あるいは 50 mM Tris-HCl (pH 9.0) に添加し、40°C でプレインキュベーションした。そこへ、2-2-12 に記載した方法で調製した精製エステラーゼを加え、アミド結合切断活性を 265 nm の吸収の変化で検出した。酵素反応の陽性コントロールとして、*Enterobacter cloacae* の  $\beta$ -lactamase タンパク質粗精製品を用いた。

同様に、10 mM の D-Alanyl-D-Alanine を含む 50 mM Tris-HCl (pH 9.0) に精製エステラーゼを加え、40°C で反応を行った。1N HCl を加えて反応を停止し、反応液を HPLC (SUMICHIRAL OA-5000, 4.6 mm  $\phi$  x 250 mm 住化分析センター; 移動相, 1.0 mM CuSO<sub>4</sub>、流速 1.0 mL/min) に供し、生成したアミノ酸を 254 nm で検出した (D-Ala の保持時間, 9.2 min)。

### 3-2-4 エステラーゼの DFP 修飾 (51) と断片化

2-2-12 に記載した方法で精製したエステラーゼ 200  $\mu$ g を 50mM Tris-HCl (pH 8.5) 溶液とし、 $4.0 \times 10^{-7}$  モル (モル比で 1:100) の DFP を添加し、30°C で 1 時間インキュベーションした。Sephadex G-25 により未反応の DFP を除去し、修飾されたエステラーゼを回収した。

DFP による修飾反応を上記と同様に行い、その後、回収したエステラーゼを 8.0 M 尿

素と 100 mM DTT を含む 80 mM Tris-HCl (pH 8.5) に溶解し、モル比で 20:1 となるよう API を添加し、37°C で終夜、酵素消化を行なった。同量の API を添加して、さらに 37°C で 24 時間反応させた。反応液を 0.1 % の TFA で平衡化した  $\mu$  Bondapak C4 カラム (4.6 mm  $\phi$  x 150 mm ; 日本ウオーターズ) にアプライし、0-60 % のアセトニトリルの直線的勾配によりエステラーゼペプチド断片を溶出した。ペプチドの溶出は 215 nm の吸収により検出し、各ピークフラクションは回収後、溶媒を除去し、FAB-MS 解析あるいはアミノ酸配列解析に供した。

### 3-2-5 ESI-MS 解析 (52)

3-2-3 にて Sephadex G-25 から回収したエステラーゼ 200  $\mu$ g を含む溶液から、スピードバック型エバポレーターを用いて溶媒を除去し、100  $\mu$ L の 50 % 酢酸に溶解し、さらに 10 % 容積のアセトニトリルを添加した。得られた溶液の上清を、Harvard シリンジポンプ (Holliston, MA) を用いて 1.0  $\mu$ L/min の流速で TSQ-700 四重極型質量スペクトルメーター (Finnigan MAT, San Jose, CA) にアプライした。測定は正電荷モードで、電位 3,780 V にて行った。得られたスペクトルを deconvolute し、DFP 修飾エステラーゼおよび未修飾エステラーゼの分子量をそれぞれ計算した。

### 3-2-6 FAB-MS 解析

Joel JMS-HX110 (Joel, Tokyo) を用いて正電荷モードにて測定を行なった。FAB ガンは 6.0 kV にセットし、加速電圧は 10kV とし、100~6,000 (m/Z) の範囲をスキャンした。3-2-3 で得られた API 消化エステラーゼ断片は、グリセロール : チオグリセロール : 0.1 N HCl (1:1:1) に溶解してアプライし、JMA-DA5000 によりデータを収集し解析した。また、溶解したサンプルの一部を 473A 型アミノ酸シーケンサー (Applied Biosystems) にアプライし、アミノ酸配列を解析した。

### 3-2-7 PCR による部位特異的変異導入

変異箇所を含む 1 組の変異入り DNA プライマーセット (5' 用と 3' 用) と、普遍的 DNA プライマーとして、Nsp(7524)V サイト上流の 5' 側プライマーと KpnI サイトを含む 3' 側プライマーを合成した。

5' 側普遍的プライマー                      5' -ATGGACGCACAGACCATCGCACCG-3'

3' 側普遍的プライマー                      5' -CGATGGTCAGGGCGTGGTACCCGA-3'

変異導入用 DNA プライマー ;

5' -CGGTGTTTTTCGCATGCTCCAAGGGA-3'

5' -TCCCTTGGAGCATGCGAAACACCG-3'

Serine59 (TCC) を Alanine (GCA) へ変換するプライマーであり、変異導入部分を下線で示した。同様に 7 種の変異用 DNA プライマーを合成した。変異コドンを順に示す。  
 S53A, Ser53 (TCC) を Ala (GCA) に変換、F58A, Phe58 (TTC) を Ala (GCA) に変換  
 C60A, Cys60 (TGC) を Ala (GCC) に変換、S61A, Ser61 (TCC) を Ala (GCA) に変換  
 K62L, Lys62 (AAG) を Leu (CTG) に変換、K62R, Lys62 (AAG) を Arg (AGG) に変換  
 K62E, Lys62 (AAG) を Glu (GAG) に変換

1 段階目 PCR		2 段階目 PCR	
pAGE-203/HindIII	0.5 $\mu$ g	1stPCR 産物 (5' 側)	
普遍的プライマー	1.0 $\mu$ g	1stPCR 産物 (3' 側)	
変異導入用プライマー	1.0 $\mu$ g	普遍的プライマー	各 1.0 $\mu$ g
dNTP	0.2 mM	dNTP	0.2 mM
pfu polymerase	2.5 U	pfu polymerase	2.5 U
x10 buffer	10 $\mu$ L	x10 buffer	10 $\mu$ L
Total	100 $\mu$ L	Total	100 $\mu$ L

94°C	5 min	94°C	5 min
↓		↓	
94°C	1 min	94°C	1 min
45°C	2 min	50°C	2 min
72°C	3 min	72°C	3 min
	} 20 cycle		} 20 cycle

1 段階目の PCR において、pAGE-203 を鋳型として、普遍的 5' 側プライマーと変異導入用 3' 側プライマーのセットで変異導入箇所の 5' 側配列を増幅した。同様に、変異導入用 5' 側プライマーと普遍的 3' 側プライマーのセットで変異導入箇所の 3' 側配列を増幅した。増幅された断片をそれぞれアガロースゲルから回収した。2 段階目の PCR においては、回収した 2 つの断片を鋳型として、普遍的 5' 側プライマーと 3' 側プライマーを用いて変異箇所を中央に含む断片を増幅した。得られた断片を Nsp(7524)V と KpnI で消化し、pAGE-203 の Nsp(7524)V-KpnI サイトへ挿入した。得られた変異エステラーゼをコードするプラスミドは、変異箇所の塩基配列を解析し、目的通りの変異が導入されていることを確認した。

### 3-2-8 変異酵素精製

構築した 7 種類の変異酵素をコードする発現プラスミドを *E. coli* JM105 に導入して、野生型酵素を発現する *E. coli* JM105 と同様の条件で培養した。(詳細な培養条件

は 2-2-9 参照)。7 種類の部位特異的変異酵素は、全て野生型酵素と同様に、TB 培地 (29)にて 37°Cで培養し、対数増殖期に 1mM IPTG で酵素生産を誘導した。終夜培養後の培養液から遠心操作で菌体を回収し、氷上で超音波破碎した。破碎後、4°Cにおいて 1 00,000 g x 60 min の超遠心により得られた菌体内可溶性画分のタンパク質濃度を 10 mg/mL に調整した後、飽和濃度 30 %となるように硫酸を添加し、4°Cで 30 min 静置した。この溶液を 4°Cで 15,000 g x 10min 遠心して硫酸沈殿画分を回収し、20 mM Tris-HCl (pH 8.0) に沈殿を溶解し、DEAE-5PW イオン交換クロマトグラフィーにアプライした。NaCl の濃度勾配にて各変異酵素を溶出し、ピークフラクションを集めて濃縮した。

### 3-2-9 野生型エステラーゼと変異酵素の活性測定

野生型エステラーゼおよび各変異酵素の活性測定および速度論的解析には、1R, 3R 菊酸および PPD を用い、1-2-6 および 1-2-8 にそれぞれ示した条件にて酵素反応を行った。また、立体選択性を調べる目的においては、ラセミ体菊酸エチルエステルを基質として用いた。反応の最大速度  $V_{max}$  および  $K_m$  値は Lineweaver-Burk プロットにより求めた。

### 3-2-10 抗エステラーゼポリクローナル抗体作製

*E. coli* JM105/pAGE-203 から精製した酵素タンパク質の生理食塩水溶液 2 mg/mL を RIBI アジュバンド (Immunochem Research 製) と混合して、ウサギ (ニュージーランドホワイト、♂) の後肢 10 箇所皮下注射し、2 週間後に同様の免疫を 1 回行なった。さらに 2 週間後に追加免疫を行い、その 3、5 および 7 日後に耳静脈から試採血し、オクタロイ法により抗体力価の上昇を確認した。7 日後に抗体力価が十分上昇していることを確認後に全採血し、定法に従い抗血清を分離した。さらに、ProteinA-FF カラムにより IgG 画分を分取し、-80°Cで保存した。

### 3-2-11 阻害剤 DFP との共有結合検出

野生型エステラーゼおよび各変異酵素の精製タンパク質 25  $\mu$ g と 30  $\mu$ Ci (10 Ci/mol) の [ $^3$ H]-DFP を 100  $\mu$ L の 50 mM リン酸バッファー (pH 8.4) 中で、室温にて 30 min 反応させた。終濃度 0.1 %の SDS を添加し、400  $\mu$ L の免疫沈降用バッファー (50 mM リン酸バッファー (pH 7.4), 190 mM NaCl, 6 mM EDTA, 2.5 % Triton X-100) で反応液を希釈し、さらに 3-2-10 で調製した抗エステラーゼ抗体 IgG 画分を 10  $\mu$ g 添加し、4°Cで終夜インキュベーションした。50 mM リン酸バッファー (pH 7.4) で平衡化した ProteinA-FF を 40  $\mu$ L 添加し、室温で 3 時間緩やかに攪拌した後、10,000 x g、5 min の遠心により担体を回収した。回収した ProteinA-FF を洗浄バッファー (10 mM リン酸バッファー (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.2 % SDS, 0.7 % Triton X-100) で 3 回洗浄した後、SDS-PAGE サンプルバッファーを加え、100°Cで 5 min 加熱した。遠心後の上

清を SDS-PAGE にアプライし、ゲルを乾燥後、X 線フィルム (Hyperfilm<sup>-3</sup>H; 富士フィルム製) を用いてオートラジオグラフィーに供した。

### 3-2-12 変異酵素の CD (circular dichroism) スペクトル解析(32)

Jasco J-720 を用いて、精製した野生型エステラーゼおよび各変異エステラーゼのスペクトルを測定した。詳細は、2-2-12 に記載した方法に従った。

### 3-2-13 システイン滴定(53)

野生型酵素および C60A 変異酵素を 25°C の 100 mM Tris-HCl (pH8.0) で 5 分間プレインキュベーションし、DTNB を添加した。反応の結果生成する 2-ニトロ-5-チオベンゾエートの 412 nm における吸収を測定することにより (モル吸光係数  $E=13,700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )、DTNB と反応したシステイン残基数を計算した(54)。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 エステラーゼのアミノ酸配列相同性解析

エステラーゼのアミノ酸配列には、Ser を活性中心とするリパーゼ／カルボキシルエステラーゼが持つ典型的なコンセンサス配列 (Gly-X-Ser-X-Gly) (55)が見当たらず、また、Ser 残基とともに catalytic triad を形成する Asp, His(55)も特定されなかった。一方、興味深いことに、本酵素は、細胞壁ペプチドグリカン合成酵素である *Streptomyces* R61 の D, D-カルボキシペプチダーゼと 26.7 %(56)、 $\beta$ ラクタム系抗生物質を加水分解するクラス C  $\beta$ ラクタマーゼに分類される *Citrobacter freundii* OS60 酵素と 19.3 %(57)、*E. coli* K12 cepharosporinase と 20.2 %(58)の配列相同性を示した。

これらの酵素とエステラーゼのマルチプルアラインメント結果を図 3-1 に示した。これらの酵素は、ペニシリン結合タンパク質 (以下 PBPs) と総称される一群の酵素に属する(59, 60)。その他、クラス A  $\beta$ ラクタマーゼ(61)、ナイロンオリゴマー加水分解酵素(62)および D-アミノペプチダーゼ(63)などのアミド加水分解酵素とも、有意な相同性を示した。

```

+1          10          20          30          40
K12  -----A--AP---QQIN-DIVHRTITPLIEQQKIPGMAVAVIYQGKPHYFTW-GYADIA
P99  -----A--TPVSEKQLA-EVVANTITPLMKAQSVPGMAVAVIYQGKPHYFTW-GKADIA
CF   -----A--AAKTEQQIA-DIVNRTITPLMQEQAIIPGMAVAIIYBGKPHYFTW-GKADIA
EST  M---DAQTIAPG-----FESVAELFGRFLSEDRYSAQLAAYHRGVKVLDI-----S
PSE  MVFFEAAYVQIQGHYELQFPAIREAFAALFDDPQERGAQLCIQIGGETVVDLWAGTADKD
R61  -----ADLPAPDDTGLQ-AVLHTALS-----QGAPGAMVRVDDNGTIHQLSE-GVADRA

          50          60          70          80          90          100
K12  KKQPVTQQTLPFLGSVSKTFTGVLGGDAIARGEIKLSDPTTKYWPEL--TAKQWNGITLL
P99  ANKPVTQQTLPFLGSISKTFTGVLGGDAIARGEISLDDAVTRYWPQL--TGKQWQGIRML
CF   NNHPVTQQTLPFLGSVSKTFTGVLGGDRIARGEIKLSDPTTKYWPEL--TGKQWRGISLL
EST  GGPFRRPDSVTGVSCSKSVSGLVIALLVQDGPLDLDAEVVVKYWPEFGABGKATITVAQL
PSE  GAEAWHSDTIVNLSCTRTFTAVTALQLVAEGKLQLDAPVAKYWPEFAAAGKESITLRQL
R61  TGRAITTTDRFRVSVTKSFAVVLQLLVDEGKLDLDAVNTYLPGL--LPDDRITVRQV

          110         120         130         140         150
K12  -----HLATYTAGGLPLQVPD--EVKSSS----DLLRFYQNWQPAWAPGTQRLYANSSIG
P99  -----DLATYTAGGLPLQVPD--EVTDNA----SLLRFYQNWQPKWPGTTRLYANASIG
CF   -----HLATYTAGGLPLQIPG--DVTDKA---ELLRFYQNWQPWTPGAKRLYANSSIG
EST  LSHQAGLLG-VEGGLTLA-----EYNNSELAALKLAQM----RPLWKPGTAFQYHALTIG
PSE  LCHQAGLPA-IREMLPTE-----ALYDWQLMVDTLAAE---APNWTFGQGHTEAITYG
R61  MSHRSGLYDYTNDMFAQTVPGFESVRNKVFSYQDLITLSLKHGVTNAPGAAYVYSNENFV

          160         170         180         190         200
K12  LF-GALAVKPSGLSFEQAMQTRVFPQPLKLNHTWINVPPAE-EKNYAWGYR----EGKAV
P99  LF-GALAVKPSGMPYEQAMTTRVLKPLKLDHTWINVPKAE-EAHYAWGYR----DGKAV
CF   LF-GALAVKSSGMSYBEAMTRRVLQPLKLAHTWITVQSE-QKNYAWGYL----EGKPV
EST  VFMEELCRRTGSTLQEIYEQRIRSVTGA-HFFLGLPESEEPY-YATLRWA----ADPS
PSE  WLVGELLRRADGRGPGESIVARVARPLGL-DFHVGLADEEFPYR-VAHIARSKGNMGDEBAA
R61  VA-GMLIEKLTGHSVATEYQNRIFTPLNLTDTFYVHPDVTIPGTHANGYLTPEAGGALV

          210         220         230         240         250         260
K12  HVSPGALD--AEAYGVKSTIEDMARWVQSNLKLPLDINEKTLQGGIQLAQSRYWQTDGMYQ
P99  RVSPGMLD--AQAYGVKTNVQDMANWVMANMAPENVADASLKQGIQLAQSRYWRIGSMYQ
CF   HVSPGQLD--AEAYGVKSSVIDMARWVQANMDASHVQEKTLQGGIELAQSRYWRIGDMYQ
EST  QPWIDP----ASHFGLSANSVAVGDIIDLPLNREVRAAGLSAAGVASAEGMARVYAAALT
PSE  QRLQLQVMREPTAMTTRAFANPPSILTSTNKPEWRRMQQPAANGHGNAKSLAGFYSGLLD
R61  DSTBQTVSWAQTGAAVVISSTQDLDTFFSALMSGQ-----LMSAAQLAQMQQWTTVNSTQ

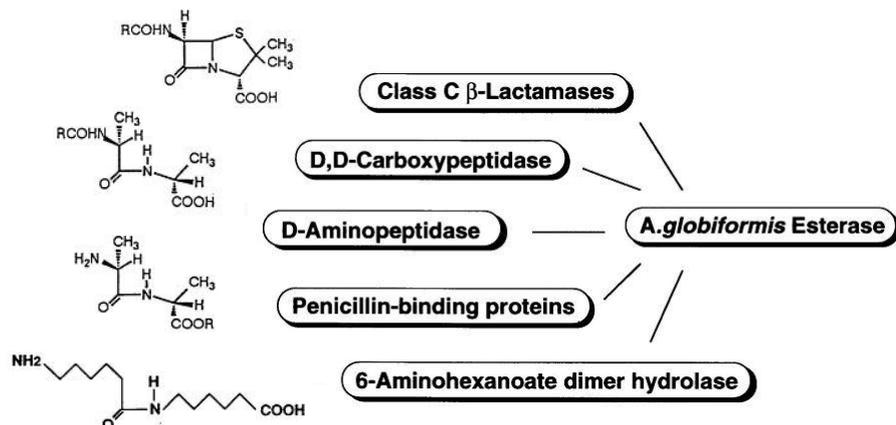
          270         280         290         300         310
K12  GLGWEMLDWPVNPDSIINGSDNKI-----ALARPV-KAITPPTPAVRASWVKTGATG
P99  GLGWEMLNWPVEANTVVEGSDSKV-----ALAPLPV-AEVNPPAPPVKASWVKTGSTG
CF   GLGWEMLNWPLKADSIINGSSDSKV-----ALAALPA-VEVNPPAPPVKASWVKTGSTG
EST  GLA-ANGDRAAVAPLLSEETIQVTAEQVFGIDRVFGETSCFGTV-----FKSHARS
PSE  G-----SLLPADMLEBLTREHSIGPKTLTQTFRFGLG-----CMLDQPM
R61  GYGLGLRRRDLSCGISVYGHGTGTQGYTYAFASKDQQAHTALANTSNNVNVLNTMART

          320         330         340         350         360         370
K12  GFPGSY----VAFIPEKELGIVMLANKNYP-----NPARVDAA-----WQIILNAL-Q
P99  GFPGSY----VAFIPEKQIGIVMLANTSYP-----NPARVEAA-----YHILEAL-Q
CF   GFPGSY----VAFVPEKNLGIIVMLANKSYP-----NPARVEAA-----WRILEKL-Q
EST  FYGSY----RAFQHDGASASLGFADPVYELAFGYVPPQAEPGGAGCRNLELSAAVRKAVTELAQ
PSE  FNATEGLGPRAFGHPGAGGSVGFADPEHDVAFGFVTNTLGPYVLMDPRAQKLVLGAGCL
R61  LESAF----CGKPTTGEAAQRDLLGDHRG-----APEDIAPG-----IAR-D

```

(図 3-1) *A. globiformis* エステラーゼと PBP<sub>s</sub> のアミノ酸配列アラインメント  
 K12, *E. coli* K12 cepharosporinase *ampC* (58); P99, *Enterobacter cloacae*  $\beta$ -lactamase (64);  
 CF, *Citrobacter freundii* OS60  $\beta$ -lactamase (57); EST, *A. globiformis* esterase; PSE,  
*Pseudomonas* sp. strain LS107d2 esterase (65); R61, *Streptomyces* R61  
 D,D-carboxypeptidase(56). 相同な部分はグレーで、 $\beta$ ラクタマーゼおよび D,D-カルボキシペプ  
 チダーゼの結晶構造解析から活性中心を形成していると示唆される配列を赤枠で示した。アステ  
 リスクは 6 種の全てにおいて保存されているアミノ酸を示す。

エステラーゼと相同性を示した酵素の基質となる化合物の構造を図3-2に示したが、全てアミド結合を持ち、この部分が酵素により加水分解される点が特徴として挙げられ、そのうちいくつかに関しては、アミノ酸変異実験やX線結晶構造解析が行われており、活性中心アミノ酸残基、加水分解反応に際してアシル中間体を形成するために重要なアミノ酸残基、脱アシル化に関わるアミノ酸残基、酵素-基質複合体を安定化するアミノ酸残基などに関して考察されている。



(図 3-2) *A. globiformis* エステラーゼとアミノ酸配列上の相同性を示す酵素と基質

また、図 3-3 に示すように、エステラーゼは、これらの酵素の活性中心に共通して認められる (Ser-X-X-Lys) という配列を持つことが判明した。アミノ酸アラインメントから、本酵素の 59 位 Ser (図 3-3、アスタリスク) が活性中心アミノ酸残基と予想された。

Esterase	<i>A. globiformis</i>	
Class C	<i>C. freundii</i>	PHRRPDSVTGVFSCSKGVSGLVIALLLVQDGF
	<i>E. coli</i> K12	HPVTQQTLELGSVSKTFNGVLGGDAIARGEI
	<i>E. cloacae</i>	QPVTQQTLELGSVSKTFNGVLGGDAIARGEI
DDPase	<i>Streptomyces</i>	KPVTQQTLELGSISKTFNGVLGGDAIARGEI
	<i>E. coli</i> PBP5	RAITTTDRFRVGSVTKSFSAVVLLQLVDEGKL
	<i>E. coli</i> PBP6	AEQNADVRRDPASLTKMMTSYVIGQAMKAGKF
TPase	<i>E. coli</i> PBP1A	AEGNADEKLDPASLTKIMTSYVVGQALKADKI
	PBP1B	FNRRATQALRQVGSNIKPFPLYTAAMDKGLTLAS
	PBP2	YNRAMQARRSIGSLAKPATYLTALSQPKIYRL
	PBP3	VKFNSDKRFAYASTSKAINSAILLEQVPYNKL
DAP	<i>O. anthropi</i>	RNRTITDVFEPGSTVKPMVVM TALQRGVVREN
AHDase	<i>Flavobacterium</i>	TPMTLDTRMPICSVSKQFTCAVLLDAVGPEPEL
		AGFAPDDRHLMSVSKSLCGTVV GALIDEGRI

(図 3-3) *A. globiformis* エステラーゼと PBP の活性中心アラインメント

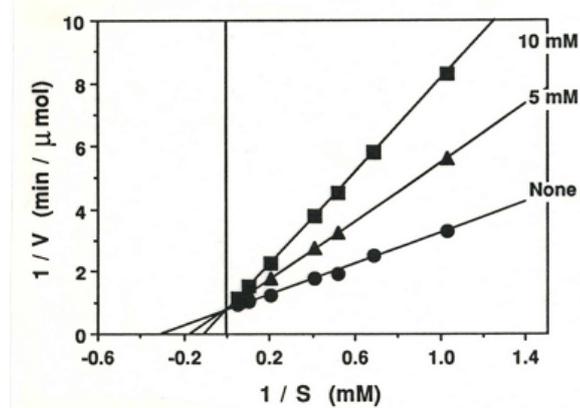
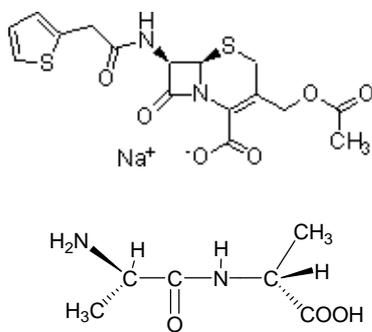
Class C ; classC  $\beta$ -lactamase、DDPase ; D,D-carboxypeptidase、TPase ; transpeptidase / penicillin binding protein、DAP ; D-amino peptidase、AHDase ; 6-aminohexanoate-dimer hydrolase

### 3-3-2 $\beta$ ラクタム抗生物質およびD-アミノ酸ペプチドに対する活性評価

エステラーゼが、クラスC  $\beta$ -ラクタマーゼの基質であるセファロsporin系  $\beta$ ラクタム抗生物質 cephalothin を基質とするか調べた。その結果、*Enterobacter cloacae* 由来  $\beta$ -ラクタマーゼ (64) は pH 7.0 において cephalothin を加水分解したが、エステラーゼは、全く活性を示さなかった。両酵素の最適 pH が異なっているため、pH 9.0 においてもエステラーゼの活性を評価したが、cephalothin を全く加水分解しなかった。エステラーゼは、クラスA  $\beta$ -ラクタマーゼの基質であるペニシリン系  $\beta$ ラクタム抗生物質も加水分解しなかった。

一方、エステラーゼによる 1*R*, 3*R* 菊酸エチルエステル加水分解反応系に cephalothin を添加すると、図 3-4 に示すようにエステラーゼ活性が競合的に阻害され、阻害定数を求めたところ、 $K_i=5.0$  mM であった。

同様に、本酵素と相同性を示す D,D-カルボキシペプチダーゼの基質である D-Alanyl-D-Alanine に対する活性を調べた。その結果、エステラーゼはペプチド加水分解活性を示さなかったが、cephalothin の場合と同様に D-Alanyl-D-Alanine により酵素活性が競合的に阻害され、その  $K_i$  は 8.4 mM であった。



(図 3-4)  $\beta$ ラクタム抗生物質 cephalothin によるエステラーゼ活性阻害

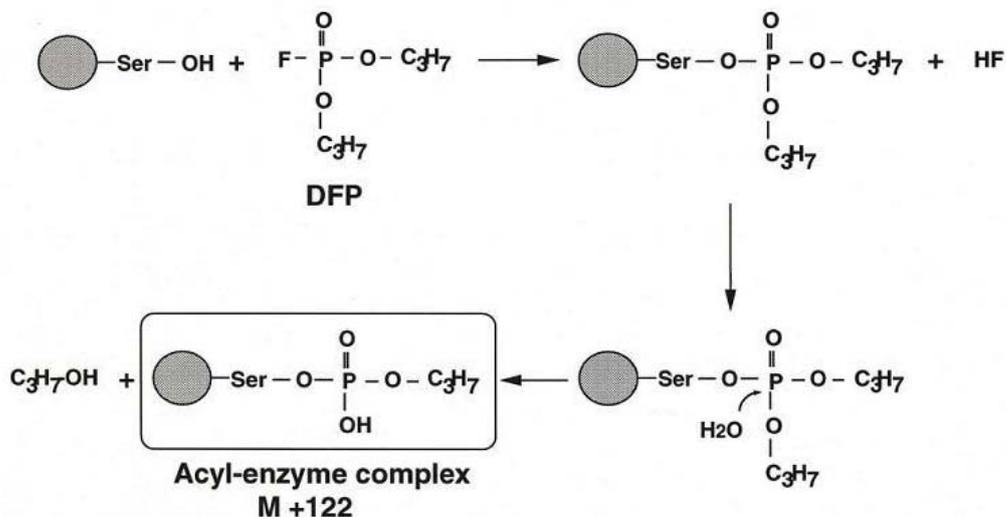
1*R*, 3*R* 菊酸エチルエステル (1-20 mM) に対して 0, 5, および 10 mM の cephalothin を加えて、200 mM Tris-HCl (pH 9.0)、45°C において反応を行った。下段に、参考のため、D-Alanyl-D-Alanine の構造も示した。

### 3-3-3 エステラーゼの DFP 修飾と質量スペクトル測定による活性中心解析

不可逆的な酵素阻害剤を用いて、直接エステラーゼの活性中心アミノ酸残基の同定を試みた。Ser を活性中心に持つ加水分解酵素エステラーゼの基質として共通のカルボキシル結合部分をトリフルオロメチルケトン基に置換した基質アナログを用いた解析例があるため (66, 67)、菊酸のカルボン酸の代わりにトリフルオロメチルケトン

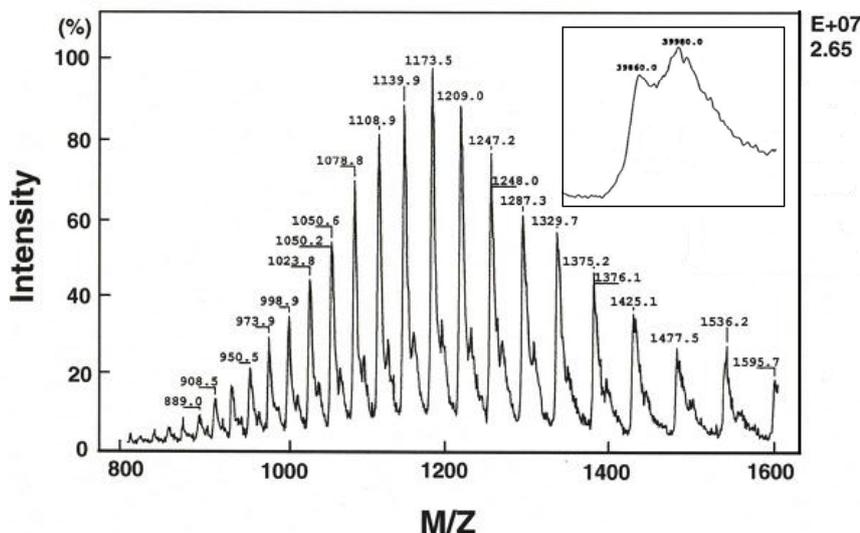
基を導入した化合物の合成を試みたが、サンプルが微量しか得られなかった。そこで、基質アナログではないが、エステラーゼ活性を阻害することを第1章で確認した、Ser加水分解酵素の共通の阻害剤であるDFPを用いることとした。

DFPとエステラーゼを30°Cにおいて1時間インキュベーションし、完全に酵素活性が阻害されたことを確認後、未反応のDFPとDFPで修飾されたエステラーゼを分離した。DFPがSer酵素の活性中心に結合した後、図3-5に示すように、リン酸基の1つが脱離する現象が報告されており(51)、このagingプロセスを完全に行なうことで、複数の段階の生成物が出現することを回避した。



(図 3-5) DFP による Ser エステラーゼ活性中心の不可逆的阻害機構

回収した DFP 修飾エステラーゼをイオンスプレー質量スペクトル解析 (ESI-MS) に供した。図 3-6 に、native なエステラーゼと DFP 修飾エステラーゼをモル数で 1:1 に混合した際のスペクトルパターンを示した。このスペクトルから deconvolution により、元のエステラーゼの質量を求めた。その結果を図 3-6 に挿入図として示した。Native なエステラーゼの質量数は 39,860 と算出され、アミノ酸組成から計算される分子量 39,836 と良い一致を示した。一方、DFP 修飾エステラーゼの質量数は 39,980 と算出され、native なエステラーゼに対して質量数として 120 増加していた。この質量数は、図 3-5 に示した DFP の一方のイソプロピル基が脱離したアシル中間体における質量増加数 122 とほぼ一致した。以上の結果から、エステラーゼの活性中心に 1:1 の割合で阻害剤 DFP が不可逆的に共有結合したことが確認できた。



(図 3-6) Native および DFP 修飾エステラーゼの ESI-MS パターン  
Native なエステラーゼと修飾エステラーゼをモル数で 1:1 に混合したスペクトルデータを示した。挿入図は得られたスペクトルから計算された各エステラーゼの質量を示す。

次に、FDP で修飾されたアミノ酸を同定するため、エステラーゼをリジルエンドペプチダーゼ (API) で消化した。API は Lys 残基のカルボキシル末端側を特異的に切断する酵素であるため、配列上はエステラーゼから 9 つの断片が出現すると考えられた。SDS-PAGE によりインタクトなエステラーゼが残存していないことを確認した後、逆相クロマトグラフィーにより断片の分離と回収を行なった。

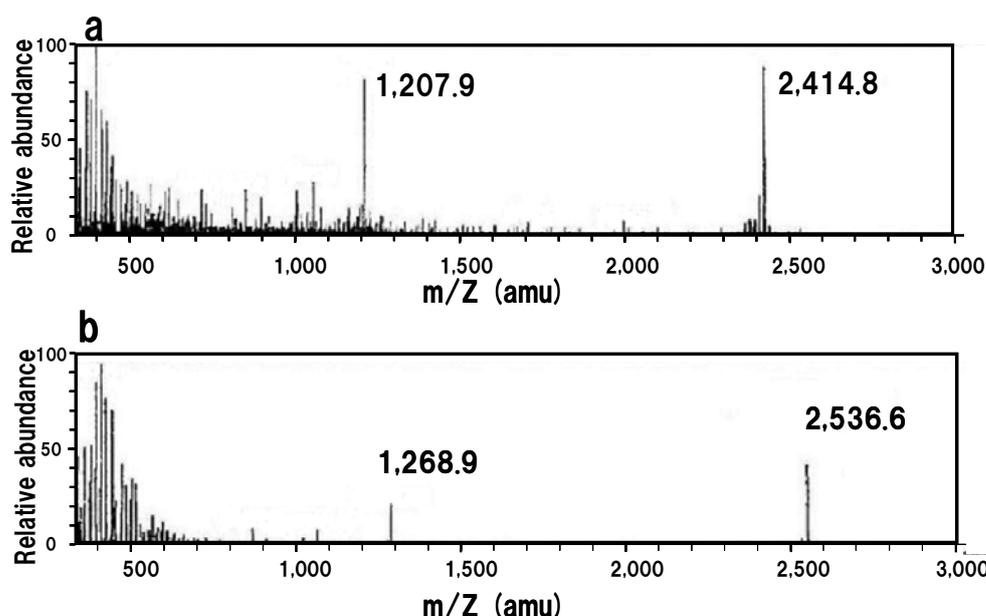
アミノ酸 169 個から成る最大のペプチド断片 7 (N 末端から数えて 7 番目の断片) および C 末端の最小ペプチド断片 9 は逆相クロマトグラフィー上のピークとして捉えることができなかった。ペプチド断片 7 は、その疎水性のためカラムから回収されなかったと考えられた。回収した残りの 7 断片を FAB-MS に供して質量を分析した。結果を表 3-1 に示した。

7 断片のうち 5 断片に関して、FAB-MS によりスペクトルが得られた。スペクトルが得られなかった断片 3 と 8 については、アミノ酸シーケンサーにより、それぞれ断片 3 および 8 に相当することを確認した。Native なエステラーゼ由来の断片はいずれも理論値とほぼ一致する質量を示したのに対して、DFP 修飾エステラーゼ由来の 5 つのペプチドのうち N 末端から 2 番目の断片についてのみ、122 マスの質量増加が認められた (図 3-7)。この質量増加分は、図 3-5 に示したモデルの理論値と一致したことから、この断片内の Ser に DFP が共有結合したと判断した。

(表 3-1) API 消化エステラーゼ断片の FAB-MS による質量解析

Fragment	Residue (n)	Molecular mass		
		Theoretical	Native	DFP-modified
1	39	4361.5	4360.6	4361.1
2	23	2414.6	2414.8	2536.6
3	24	2470.7	N.D.	N.D.
4	10	1183.2	1183.2	1183.2
5	36	3624.9	3624.6	3623.2
6	9	1142.4	1142.2	1142.4
7	169	17994.0	—	—
8	58	6058.2	N.D.	N.D.
9	7	730.8	—	—

ペプチド断片は N 末端から順に番号で表した。N. D., 質量スペクトルが得られなかった断片；  
—, 逆相カラムから回収されなかった断片



(図 3-7) エステラーゼ断片 2 (アミノ酸 40-62 番目) の FAB-MS スペクトル  
a, Native なエステラーゼ由来 b, DFP 修飾エステラーゼ由来

断片 2 は 4 つの Ser を含むため、さらにトリプシンおよびキモトリプシンによる消化を行った結果、 $\text{H}_2\text{N-VLDISGGPH(R)-COOH}$ 、 $\text{H}_2\text{N-RPDSVTGVF-COOH}$ 、 $\text{H}_2\text{N-SCSK-COOH}$  の 3 断片が回収された。このうち、DFP 修飾エステラーゼ由来の SCSK ペプチドの質量のみが 122 増加していた。このペプチドを MS/MS 解析し、直接修飾残基同定を試みたが、明瞭なスペクトルは得られなかった。

### 3-3-4 部位特異的変異体の構築と精製

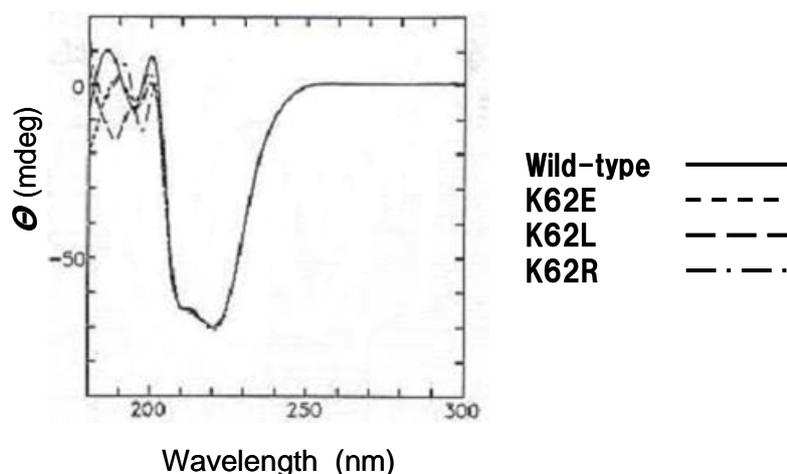
前項に記載した DFP による修飾実験および PBP<sub>s</sub> とのアミノ酸アラインメント結果から、活性中心アミノ酸と考えられた Ser59 近辺のアミノ酸部位特異的変異酵素を作製した。変異酵素作製にあたっては、原則、アミノ酸側鎖のかさ高さの違いが最小となるように置換するアミノ酸を選んだ。ただし、62 位に関しては、Lys の塩基性側鎖の重要性を考察する目的で、酸性、中性、および塩基性側鎖を持つアミノ酸として、それぞれ Glu、Leu、および Arg 変異体を構築した。

8 種類の部位特異的変異酵素は、全て、過剰発現させた *E. coli* JM105 菌体内可溶性画分から、野生型酵素と同様に硫安沈殿と DEAE-5PW イオン交換クロマトグラフィーにより SDS-PAGE 上で単一のバンドとなる純度まで精製した。

### 3-3-5 各変異酵素の 2 次構造解析

精製した変異酵素が、どの程度高次構造の変化を起こしているか検討するため、CD スペクトル解析を行った。第 2 章の 2-3-6 においても測定結果を記載したが、野生型酵素は 210 nm 付近および 222 nm 付近に負の吸収極大を持ち、200 nm 近辺に正から負へのクロスオーバーポイントを持っていた。この CD スペクトル上の特徴は、リゾチーム、ミオグロビンやミオシンなどの、 $\alpha$ ヘリックスに富む  $\alpha/\beta$ -fold 型タンパク質に共通して認められるスペクトルであった (32, 33)。

図 3-8 に野生型酵素と 62 位 Lys の変異体酵素 3 種のスペクトルを重ね書きした結果を示した。各種変異酵素の CD スペクトルはほぼ野生型酵素のそれと一致していた。構築した各変異酵素の高次構造が野生型酵素と大きく異なっておらず、変異酵素において活性が消失した場合、それが立体構造の変化に起因するものではないと判断できる結果であった。S53A、F58A、S59A、C60A および S61A についても同様のスペクトルが得られた。



(図 3-8) 野生型エステラーゼと部位特異的変異酵素の CD スペクトル

### 3-3-6 各変異酵素の菊酸エチル加水分解活性

野生型エステラーゼと各変異酵素の *1R, 3R* 菊酸エチルエステル加水分解活性の速度論的解析を行った。結果を表 3-2 に示した。

Ser 変異体酵素のうち、S53A および S61A が共に野生型酵素と大きく変わらない  $V_{max}$  および  $K_m$  値を示したのに対して、S59A の活性は検出限界以下であった。3-3-2 に示した DFP 修飾エステラーゼの質量スペクトル解析結果とこの部位特異的変異酵素の結果、および 3-3-7 のアシル中間体解析結果から、エステラーゼの活性中心は Ser59 であると判断した。

また、C60A、S61A 変異酵素は、野生型酵素より *1R, 3R* 菊酸エチルエステルへの反応性が向上していた。

一方、62 位の変異体に関しては、K62E、K62L がいずれも活性を示さなかったのに対して、K62R のみが弱いながら活性を示した。この結果から、62 位は酸性及び中性の側鎖では活性を発揮できず、塩基性側鎖が必要であると考えられた。K62R 変異酵素の *1R, 3R* 菊酸エチルエステルに対する親和性は野生型の約 1/3 であったのに対して、 $V_{max}$  は約 7% と大きく低下しており、結果的に  $V_{max}/K_m$  値が大きく低下する原因となっていた。

(表 3-2) 野生型および部位特異的変異エステラーゼの *1R, 3R* 菊酸エチルエステルに対する加水分解速度および親和性

Enzyme	$V_{max}$ ( $s^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	$V_{max}/K_m$ ( $s^{-1}mM^{-1}$ )
Wild type	<b>5.4±0.13</b>	<b>3.3±0.28</b>	<b>1.6±0.15</b>
S53A	<b>4.6±0.32</b>	<b>3.1±0.13</b>	<b>1.5±0.10</b>
S59A	N.D.	N.D.	N.D.
C60A	<b>6.6±0.25</b>	<b>1.8±0.16</b>	<b>3.6±0.18</b>
S61A	<b>2.6±0.07</b>	<b>1.0±0.10</b>	<b>2.6±0.18</b>
K62E	N.D.	N.D.	N.D.
K62L	N.D.	N.D.	N.D.
L62R	<b>0.32±0.03</b>	<b>10±1.2</b>	<b>0.032±0.004</b>

$V_{max}$  ( $S^{-1}$ ) corresponds to 1 mole of *1R,3R*-chrysanthemic acid hydrolyzed per 1 mole of purified enzyme subunit per S.  
N.D., not detected.

作製した各変異酵素のうち活性を示したものについて、ラセミ体菊酸エチルエステルに対する加水分解の立体選択性について調べた。その結果、表 3-3 に示すように、S53A、C60A、S61A 変異酵素は野生型と同様に *1R, 3R* 体にものみ作用し、変換率が 100%

となった時点で酵素反応は停止したが、K62R 変異酵素を用いた場合、加水分解率 15 % の時点で *1R, 3R* 体と共に *1S, 3S* 体も生成し、その割合は 71 % と 29 % であった。

(表 3-3) 変異酵素のラセミ体菊酸エチルエステル加水分解の立体選択性

酵素	加水分解率 (%)	<i>1R, 3R</i> / <i>1R, 3S</i> / <i>1S, 3S</i> / <i>1S, 3R</i>
Wild type	100	100 : 0 : 0 : 0
S53A	100	100 : 0 : 0 : 0
S60A	100	100 : 0 : 0 : 0
C60A	100	100 : 0 : 0 : 0
S61A	100	100 : 0 : 0 : 0
K62R	15	79 : 0 : 21 : 0

\* 基質の組成 ; *1R, 3R* : *1R, 3S* : *1S, 3S* : *1S, 3R* = 45:5:45:5

### 3-3-7 各変異酵素のアシル化反応解析

作成した各変異酵素を [<sup>3</sup>H]-DFP とインキュベーションし、ポリクローナル抗体を用いて反応後のエステラーゼを免疫沈降した。回収したエステラーゼを SDS-PAGE に供し、オートラジオグラフィーにより、エステラーゼと共有結合した [<sup>3</sup>H]-DFP を検出した (図 3-9, a)。



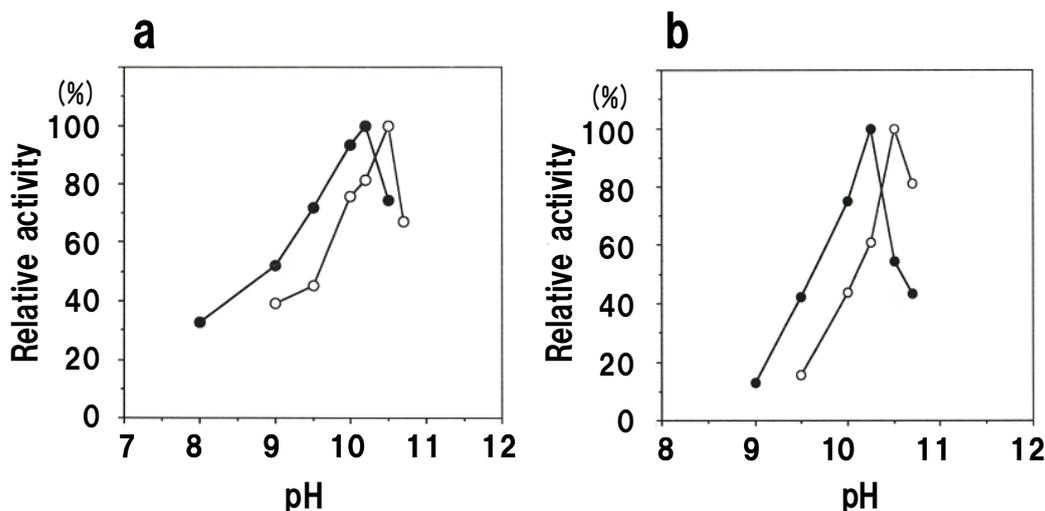
(図 3-9) [<sup>3</sup>H]-DFP と各変異酵素のアシル中間体検出

a ; オートラジオグラフィーパターン、b ; CBB 染色。レーン番号 1, 野生型エステラーゼ; 2, S53A ; 3, F58A ; 4, S59A ; 5, C60A ; 6, S61A ; 7, K62R ; 8, K62E ; 9, K62L 変異酵素。

その結果、Ser 変異体に関しては、S53A、S61A がいずれも [<sup>3</sup>H]-DFP と共有結合しアシル中間体を形成したのに対して、S59A についてはアシル中間体が検出されなかった。一方、62 位の Lys 変異体に関しては、K62E、K62L がいずれも [<sup>3</sup>H]-DFP と共有結合しなかったのに対して、Lys と同様に塩基性の側鎖を持つ Arg に変異させた K62R のみがアシル中間体を形成した。

### 3-3-8 K62R 変異酵素のエステル加水分解反応の pH プロファイル検討

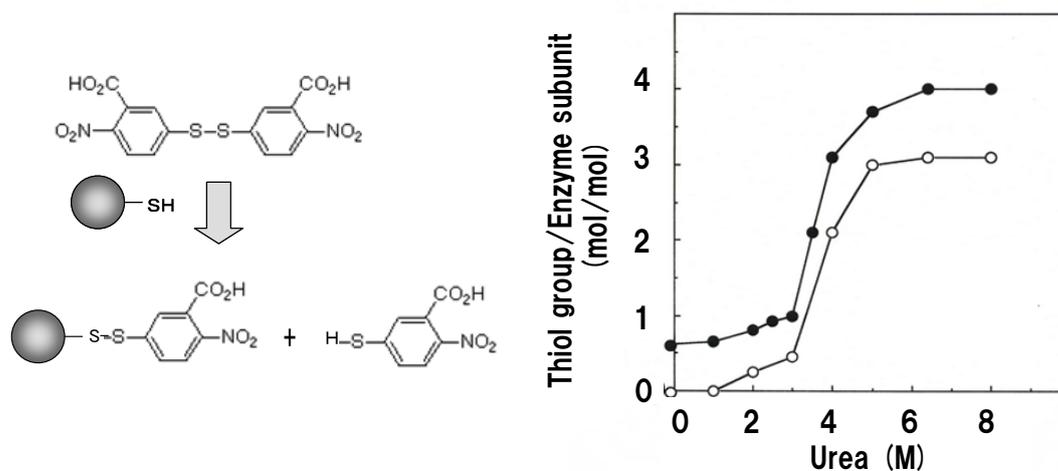
62 位の変異酵素の中で活性を保持していた K62R に関して、活性の pH 依存性を調べた。図 3-10 に示すように、野生型酵素は菊酸エチルエステルおよび PPD のどちらに対しても pH10.0 で最大活性を示したのに対して、K62R 変異酵素は、野生型酵素とほぼ同様の pH 依存性曲線を示したが、活性の最大値はどちらの基質に対しても pH10.3 であった。



(図 3-10) 野生型エステラーゼ (●) および K62R (○) 変異酵素の活性の pH 依存性 左図; 菊酸エチルエステル、右図; PPD、を基質とした。活性は、最大値を 100% とした相対活性で表した。

### 3-3-9 C60A 変異酵素を用いた酵素内遊離システイン残基数測定

エステラーゼはアミノ酸配列上 4 個の Cys 残基を持つ。これらの Cys について、SH 滴定試薬 DTNB を用いて反応性を調べた。



(図 3-11) 野生型エステラーゼ (●) および C60A 変異酵素 (○) の SH 基滴定 横軸には尿素濃度を、縦軸には、1 モルの酵素サブユニット当たり滴定された SH 基のモル数を表した。

その結果、野生型酵素においては、活性を持つ生理的条件下で、1モルの酵素に対して0.6モルのSH基がDTNBと反応したのに対して、C60A変異酵素においては、生理的条件下ではDTNBと反応するSH基は存在しなかった。尿素により酵素を段階的に変性させた場合、野生型酵素においては最終的に1モル当たり4個のSH基が反応した。一方、C60A変異酵素に関しては1モル当たり3個のSH基が滴定された（図3-11）。

### 3-4 考察

*A. globiformis* エステラーゼは、菊酸エチルエステル以外にカルボン酸エステルに対して広く作用するという基質特異性を示したため、カルボキシエステラーゼの1種であると考えていたが、アミノ酸配列上は、ペニシリン結合タンパク質(PBPs) (59, 60)に相同な酵素であった。PBPs はアミド結合を加水分解する酵素群の総称であり、代表的な酵素としては、抗生物質耐性の原因となるβラクタマーゼ(57, 58, 64)や、細胞壁合成酵素であるD,D-カルボキシペプチダーゼ(56)などが含まれている。また、本酵素遺伝子クローニング以来、数個のエステラーゼがPBPsと類似配列を持つと報告されており(65, 68-72)、本酵素を含めて、現在はfamily VIII-lipolytic enzymesとして分類されている(73)。

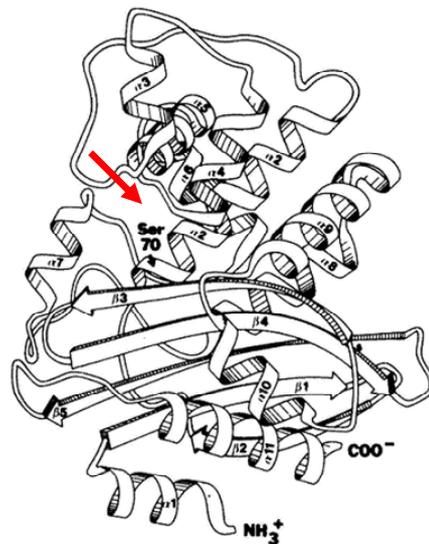
βラクタマーゼやD,D-カルボキシペプチダーゼの一部はエステル結合を分解すると報告されており(74)、エステラーゼにもβラクタム抗生物質ノアミド結合を加水分解するものがあると報告されているため(75)、両者は基質を共有している可能性があると考え、エステラーゼがこれらの酵素の基質を加水分解するか検討した。エステラーゼには、βラクタム抗生物質cephalothinやD-alanyl-D-Alanineのアミド結合を切断する活性は見出されなかった。しかし、これらの基質でエステラーゼ活性が競合的に阻害されたことから、βラクタマーゼとエステラーゼの活性中心における基質認識が類似していることが示唆された。

一般的に、アミド結合はエステル結合と比較して切断されにくく、その違いはアシル中間体を経て加水分解される際の活性化エネルギーの差で説明される。この違いが、*A. globiformis* エステラーゼがアミド結合を認識するものの切断せず、エステル結合は認識して切断する、という基質特異性の違いとして現れていると思われる。*A. globiformis* エステラーゼは、アミノ酸配列上類似性を示す細胞壁合成酵素から枝分かれして進化した可能性が考えられるが、菌体の生育に不可欠である細胞壁合成酵素とは異なり、細胞質の可溶性画分に局在する本エステラーゼが、*A. globiformis* 菌体内でどのような生理的役割を果たしているのかについては不明である。進化の過程において、何らかの選択圧により、活性中心近傍のアミノ酸変異を起こしてエステル結合を志向するようになったのかも知れない。

PBPsのうちいくつかの酵素については、X線結晶構造解析や部位特異的変異体の解析により触媒機構の一端が解明されているため(61, 76-81)、それらの情報を参考にエステラーゼ活性中心と加水分解に関与するアミノ酸残基の同定を試みた。PBPsの間で保存されている3箇所のモチーフとその役割に関しては、これまでの各論を総合すると下記のようにまとめることができる。

- ① 3-3-1 の図 3-3 に示した N 末端側の活性中心コンセンサス Ser-X-X-Lys (82-84)  $\alpha 2$  ヘリックスの N 末端部分に存在する。  
Ser は触媒残基である。  
Lys は基質と酵素の結合を安定化させ、加水分解されるアミド結合部分を Ser の方向へ固定する役割を果たしている (61, 76) という解釈と、Ser の反応性を高める base として働くとの報告がある (85, 86)。
- ② タンパク質の中央部に見出される Tyr-X-Asn  
 $\beta$  ラクタマーゼでは  $\alpha 4$  ヘリックス近傍のループ上にあり、活性中心ポケットの壁の一部を形成している。  
Tyr が Ser の反応性を高める base として解析されている (61, 76)。
- ③ C 末端側に位置する Lys-Thr/Ser-Gly  
 $\beta$  ラクタマーゼでは  $\beta 3$  シート上に存在する。活性ポケットの反対側の壁を形成し、基質の結合に関与する (85)。

(図 3-12) クラス C  $\beta$  ラクタマーゼの立体構造リボンモデル (参考文献 61 より) 赤矢印で示した活性中心 Ser (*A. globiformis* エステラーゼでは Ser59 に相当) は、 $\alpha 2$  ヘリックスの開始部分に存在し、それを囲むように②、③番めのコンセンサス配列部分が存在する。



エステラーゼにおいては、1 番目の活性中心コンセンサスは完全に保存されていたが、2 番目、3 番目のモチーフに相当する配列はそれぞれ Tyr-His-Ala および Lys-Ser-His と部分的な一致を示した。そこで、本研究においては、特に活性中心コンセンサス近傍アミノ酸に着目して解析を行った。

#### (1) Ser59

DFP による化学修飾と S59A 変異酵素の解析結果から、エステラーゼの活性中心は予想通り Ser59 であると判断した。

## (2) Lys62

62 位に酸性側鎖 (Glu) や中性側鎖 (Leu) を持つ酵素は菊酸エチルエステル加水分解活性を示さなかったことから、この部位には Lys や Arg という塩基性側鎖を持ったアミノ酸残基が必要であることが明らかになった。*Citrobacter freundii* のクラス C  $\beta$  ラクタマーゼの変異体解析においても、Arg 変異酵素は活性を保持しており、K62R エステラーゼと同様に、最適 pH がアルカリ側へシフトしており (86)、この変化は、Lys と Arg 側鎖の pKa の違いによるものと考えられた。*E. coli* PBP5 についても、同様に、Lys の  $\gamma$ -thialysine への変換による酵素活性の最適 pH のシフトが報告されている (87)。

K62R 変異酵素の 1R, 3R 菊酸エチルエステルに対する反応性低の原因は、親和性の低下より  $V_{max}$  値の低下による影響が大きかった。3-3-7 において K62R 変異酵素がアシル中間体を形成可能であったが、酸性あるいは中性の側鎖を持つ場合には、アシル化自体が進行しなかったという結果と合わせて考察すると、あくまで定性的ではあるが、脱アシル化過程が部分的に損なわれているためと推察した。

いわゆる catalytic triad を持つ Ser 加水分解酵素 (プロテアーゼ、リパーゼ、カルボキシエステラーゼも含む) が、酵素と基質によるアシル中間体を形成する際に Ser の水酸基の水素イオンを引き抜く機構については以前から研究されてきたが (図 3-13、左) (88)、PBP5 の触媒残基 Ser がどのようなメカニズムで脱プロトン化されて基質への求核性を高めるのか、という点については、未だに議論されている。*Citrobacter freundii* のクラス C  $\beta$  ラクタマーゼを用いた解析では、活性中心コンセンサス Ser-X-X-Lys の Lys が base として働き Ser 側鎖の水素イオンを引き抜くとしているが (86)、同じ酵素を用いた他のグループの報告では、2 番目の保存モチーフ Tyr-X-Asn に存在する Tyr が base の役割を果たしていると解釈されている (76)。また、別のクラス C  $\beta$  ラクタマーゼを用いた解析によれば、3 つの保存モチーフの中のいずれのアミノ酸残基も base としては働いておらず、他のアミノ酸の関与を示唆している (89)。

クラス A  $\beta$  ラクタマーゼの解析においては、活性中心コンセンサス中の Lys の pKa は理論上 (90) も実験による検証においても (91) 10.0 あるいはそれ以上であり、酵素が働く中性近辺の pH においてはプロトン化されて  $-\text{NH}_3^+$  となっているため、触媒残基の Ser の -OH 基と水素結合を形成できず、また、base として触媒残基 Ser の -OH 基の水素イオンを引き抜くことは不可能と結論づけている。

しかし、 $\beta$  ラクタマーゼと共に PBP5 に属し、D, D-カルボキシペプチダーゼ活性を持ち、且つ *A. globiformis* エステラーゼとアミノ酸相同性を示す PBP5 については、活性中心コンセンサス中の Lys 残基を部位特異的変異手法と化学修飾手法を組み合わせ、 $\gamma$ -thialysine に変換し、触媒機構を検討した結果、Lys がアシル中間体形成に



PBP5の活性中心コンセンサス中のLysに関する実験結果と*A. globiformis*エステラーゼの62位Lys変異体の実験結果、PBP5とエステラーゼのアミノ酸配列の類似性、活性pHプロファイルの類似性を考え合わせると、*A. globiformis*エステラーゼが活性を発揮するアルカリ性pHにおいて、活性中心コンセンサス中のLys62の塩基性側鎖が触媒残基であるSer59の-OH基からプロトンを引き抜き、触媒残基として求核性を高めるbaseとしての役割を果たしていると推察される。

### (3) Cys60

DTNBによるSH滴定の結果から、酵素が活性を保っている生理的条件においては、エステラーゼに存在する4個のCysのうち活性中心コンセンサス内Cys60のみが溶媒に露出しており、他の3個のCysはタンパク質内部に埋もれていることが判明した。この結果は、アミノ酸アラインメントから予測されるエステラーゼの3個のCysの位置が、 $\beta$ ラクタマーゼの立体構造上では溶媒に露出していないという結果と矛盾せず、この点からも、両者が類似の高次構造を取っていることが示唆された。

### (4) 酵素の立体選択性に関する予備的考察

何故*A. globiformis*エステラーゼが、4種類の菊酸エチルエステルのうち1*R*, 3*R*体にのみ作用するという厳密な立体選択性を持つのかという点は、非常に興味深い。この点について解析するため、 $\beta$ ラクタマーゼの立体構造を利用できないか検討した。 $\beta$ ラクタム抗生物質により本酵素活性が競合的に阻害されたことから、本酵素と $\beta$ ラクタマーゼの活性中心ポケット構造が類似していると推察し、Protein Data Bankに登録されている約60種類のクラスC $\beta$ ラクタマーゼと基質アナログの複合体立体構造データを元に、 $\beta$ ラクタマーゼの活性中心ポケットへ菊酸の各異性体をドッキングさせることを試みた。しかしながら、 $\beta$ ラクタマーゼの活性中心ポケットサイズは、結合した基質アナログの周囲にも空間的間隙を残す、かなり大きなポケットであり、且つ、基質アナログも一定の方向に配向しておらず、ランダムな方向で触媒残基Serと結合していた。この結果から、 $\beta$ ラクタムより小さい菊酸エチルを $\beta$ ラクタマーゼの活性中心にドッキングさせて、1*R*, 3*R*体への立体選択性を考察することは不可能であると判断した。

活性中心コンセンサスSer-X-X-Lysは、立体構造が解明されている $\beta$ ラクタマーゼやD,D-カルボキシペプチダーゼにおいて、必ず $\alpha$ ヘリックスの開始部分に存在し、その先端部分が活性中心ポケットに配向している(図3-12、赤矢印部分)。本酵素においても、2次構造予測を行なうとSer-X-X-Lysは $\alpha$ ヘリックスのN端に位置すると予測される。

厳密な考察には、本酵素の基質複合体のX線結晶構造解析を待たなければならないが、変異酵素のうちK62Rのみが菊酸エチルエステルに対する立体選択性が変化した

理由として、側鎖のかさ高さの差による可能性も否定できないものの、各アミノ酸残基の空間的位置の違いによる可能性もあると考えている。すなわち、C60A、S61A は活性中心ポケットの溶媒側に直接面しておらず、基質結合に影響を与えないのに対して、活性残基の Ser および、 $\alpha$ ヘリックス上でひと巻き下流、すなわち3残基下流に存在する Lys は完全に溶媒側に面しているため、Lys の側鎖の変換が基質認識に影響を与えた可能性があると考えている。

本酵素の新たな光学活性化合物製造プロセスへの応用を考える上においても、立体構造解析を含めて、本酵素がどのように厳格な立体選択性を発揮しているのか、解明が期待される。

## 総括

本研究により、ラセミ体菊酸エチルエステルを立体選択的に加水分解し、*1R,3R* 菊酸を生成する微生物 *Arthrobacter globiformis* SC-6-98-28 より不斉加水分解酵素を精製し、その諸性質を解明した。また、酵素の機能的大量発現を目的とし、不斉加水分解酵素遺伝子のクローニングと大腸菌における高発現を検討した結果、上流配列の改変、翻訳領域コドンの変換、およびジャーファーマンターを用いた高密度流加培養の最適化により、菌体当たりの酵素生産量を飛躍的に高めることに成功した。ホローファイバー型限外ろ過膜により、不斉加水分解反応の結果生成した *1R,3R* 菊酸を反応系から分離する方法を設計し、高濃度の基質エステルを用いた反応が可能になった。

さらに、部位特異的変異や阻害剤による化学修飾と質量分析の手法を用いて、不斉加水分解酵素の活性中心の同定と触媒活性に重要なアミノ酸残基を特定した。本酵素はペニシリン結合タンパク質と総称されるアミド結合加水分解酵素類と相同性を示し、加水分解の反応機構も一部類似しているが、エステル類に対して広く作用するという興味深い性質を持った酵素であることを明らかにした。

本研究を通じて、ピレスロイド系殺虫剤中間体として汎用されている菊酸に関して、最も高い殺虫効力を示す立体異性体である *1R,3R* 菊酸のみを、酵素反応により光学純度 100 % で調製する方法を確立した。今回確立した方法は、大腸菌組み換え体の高密度培養条件確立により莫大な培養スケールを必要としなくなったこと、死菌化処理後に不斉加水分解反応を行うことが可能であるため、反応系としては組み換え体用の設備が不要であること、酵素精製の工程を省略できること、有機合成のように高価な触媒や高温での反応を必要としないことなど、多くの点で省エネルギー的であり、且つ経済的である。

また、本法と、菊酸エステルの直接ラセミ化エピ化反応を組み合わせることにより、未反応のエステルは原料として再利用されるため、無用の異性体を廃棄することなく、理論上、全てが *1R,3R* 菊酸として回収できる。光学活性な天然物からの誘導法、不斉合成法、物理化学的手法による光学分割法と比較しても、得られる *1R,3R* 菊酸の光学純度や収率を考えた場合、最も合理的な方法と考えられる。

酵素法を用いた光学活性化合物製造の実用化に成功している例としては、田辺三菱製薬の冠動脈血管拡張剤ジルチアゼム中間体製造 (92) や、第一ファインケミカルと京都大学による D-パントテン酸製造 (93) が挙げられる。

前者は、*Serratia marcescens* リパーゼの不斉加水分解により、*trans*-3-(4-methoxyphenyl)glycidic acid methyl ester から選択的に (*2R,3S*)-3-(4-methoxyphenyl)glycidic acid methyl ester を調製する工程を確立し、全体として製造ステップを 9 工程から 5 工程に簡略化することに成功している (94)。この方法

は、本論文と同様に不斉加水分解反応によるプロセスであることや、本論文においても検討したホローファイバー型限外ろ過システムを用いて水-有機溶媒の2相系反応を行っている点が類似しており、光学活性菊酸製造プロセス実用化に向けて、参考となるものと考えられる。

後者においては、B群ビタミン類の合成に重要な光学活性ビルディングブロックであるD-パントラクトンを、DL体の不斉加水分解により生成するラクトナーゼを見出し(95)、酵素の高生産菌株である *Fusarium oxysporum* をアルギン酸カルシウムで固定化することにより、酵素の安定化と繰り返し使用を可能にし、工業的生産を実現させている(96)。本論文において、光学活性菊酸製造に用いたホローファイバー型限外ろ過システムでは、反応後の菌体残渣と未反応エステルの回収、分離工程が課題として残されており、今後、エステラーゼの固定化による回収・分離操作の簡略化も検討すべき点であろう。

さらに、スケールアップ検討やプロセス全体としての経済性評価など、検討すべき課題も多いが、酵素法と化学法の理想的なハイブリッドプロセスと成り得る本法が、新たな光学活性菊酸製造法として利用されることを切望する。

有機溶媒を含む反応系における酵素反応は、難水溶性基質の溶解度向上により反応効率が改善すること、加水分解の逆反応が期待できること、微生物汚染による予期せぬ副産物の生成を低減できること、など多くの利点を持つ。本酵素は、エタノール、アセトニトリルなどの極性溶媒存在下でも活性を示すため、水溶液中の反応のみならず、有機溶媒を含む水溶液系や、基質濃度が高く基質自体が溶媒となるようなプロセスにも応用できる可能性があると考えている。

また、本酵素と基質アナログ複合体の立体構造が解明できれば、反応機構のより詳細な解析や、反応の立体選択性に関する解析が進展すると思われる。本酵素とアミノ酸配列上の類似性を示すペニシリン結合タンパク質に関しては、加水分解反応の際のアシル化と脱アシル化が別の機構で進行するという報告がなされている。本酵素に関しても、脱アシル化過程が独立していれば、その過程に関与するアミノ酸の同定とエンジニアリングを通じて、生成物による反応阻害を回避できる酵素の設計が可能になるとと思われる。

本論文や先行例が示すように、酵素反応は、有機合成法とうまく組み合わせることにより、医薬・農薬などの光学活性中間体を製造する手法として、非常に魅力的且つ合理的な方法となり得る。本酵素についても、光学活性菊酸製造の実用化に向けて高機能化を検討すると共に、種々の光学活性な医薬・農薬中間体製造への応用を目指したい。

## 謝辞

本研究を完成させるにあたり、終始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 垣内 喜代三先生、同 片岡 幹雄先生に深く御礼申し上げます。また、種々の有益なご助言をいただくと共にコメントを下さいました奈良先端科学技術大学院大学准教授 松尾 貴史先生、森本 積先生に謝意を表します。

住友化学在職中から長年に渡り、温かく且つ厳しくご指導いただきました、元神戸大学教授、現福山大学教授 大川 秀郎先生に心から御礼申し上げます。また、有機合成化学と生化学・分子生物学の接点となる本研究を開始する機会を与えていただきました、元滋賀県立大学教授 広原 日出男先生に御礼申し上げます。

また、本研究をまとめる機会を与えていただきました大日本住友製薬 金岡 昌治研究本部長、平松 隆司ゲノム科学研究所長に深く感謝いたします。

最後に、有機合成実験に関する指導とともに、私の研究活動を公私にわたり支え、見守ってくれた夫 西澤完治と、私の研究に常に理解を示してくれた息子 西澤彪吾に感謝いたします。

## 参考文献

- 1) LaForge FB and Barthel WF, *J. Org. Chem.*, 9, 242-249 (1944).
- 2) Staudinger H and Ruzicka L, *Helv. Chim. Acta*, 7, 177-259 (1924).
- 3) Elliott M and Janes NF, "Pyrethrum, The Natural Insecticide," ed. by Casida JE, Academic Press, pp.56 (1973)
- 4) Yoshioka H and Miyamoto J, *Kagaku to Seibutu (in Japanese)*, 14, 427-434 (1976).
- 5) Yoshioka H and Miyamoto J, *Kagaku to Seibutu (in Japanese)*, 14, 549-556 (1976).
- 6) Yoshioka H, *J. Synthetic Organic Chem. (in Japanese)*, 38, 1151-1162 (1980).
- 7) Matsuo T, Mori K, and Matsui M, *Tetrahedron Lett.*, 23, 1979-1982 (1976).
- 8) Aratani T, Yoneyoshi Y, and Nagase T, *Tetrahedron Lett.*, 30, 2599-2602 (1977).
- 9) Campbell IGM and Harper SH, *J. Sci. Food Agric.*, 3, 189-192 (1952).
- 10) Oritani T and Yamashita K, *Agric. Biol. Chem.*, 39, 89-96 (1975).
- 11) Schneider M, Engel N, and Boensmann H, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 23, 64-66 (1984).
- 12) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).
- 13) Laemmli UK, *Nature*, 227, 680-685 (1970).

- 14) Mitsuda S, Komaki R, Hirohara H, and Nabeshima S, *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2865-2870 (1991).
- 15) Horgan DJ, Stoops JK, Webb EC, and Zerner B, *Biochemistry*, 8, 2000-2006 (1969).
- 16) Schär HP, Gygax D, Tombo GMR, and Ghisalba O, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 451-456 (1988).
- 17) Murase H, Sugihara A, Muro T, Shimada Y, and Tominaga Y, *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2579-2584 (1991).
- 18) Amaki Y, Tulin EE, Ueda S, Ohmiya K, and Yamane T, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 238-241 (1992).
- 19) Meghji K, Ward OP, and Araujo A, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 3735-3740 (1990).
- 20) Okumura S, Iwai M, and Tsujisaka Y, *Agric. Biol. Chem.*, 47, 1869-1872 (1983).
- 21) Sarda L and Desnuelle P, *Biochim. Biophys. Acta*, 30, 513-521 (1958).
- 22) Van Oort MG, Deveer AMTJ, Dijkmen R, Tjeenk ML, Vereij HM, de Haas GH, Wenzig E, and Götz F, *Biochemistry*, 28, 9278-9285 (1989).
- 23) Walsh KA and Wilcox, in "Methods in Enzymology," Vol.19, ed. by Perlmann GE and Lorand L, Academic Press Inc., New York, pp.31-226 (1970).
- 24) Gubernator K, Müller K, and Winkler FK, in "Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering," ed. by Alberghina L, Schmid RD, and Verger R, Weinheim VCH, pp.9-16 (1991); *ibid.*, Derewenda Z, Dodson G, and Turkenburg J, pp.39-46.

25) Krisch K, in "The Enzymes," 3rd Ed., Vol.5, ed. By Boyer PD, Academic Press Inc., New York, pp.43-69 (1971).

## 第 2 章

26) Masaki T, Fujihashi T, Nakamura K, and Soejima M, *Biochim. Biophys. Acta*, 660, 51-55 (1981).

27) Oeda K, Oshie K, Shimizu M, Nakamura K, Yamamoto H, Nakayama I, and Ohkawa H, *Gene*, 53, 113-119 (1987).

28) Saito H and Miura K, *Biochim. Biophys. Acta*, 72, 619-629 (1963).

29) Maniatis T, Fritsch EF, and Sambrook J, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1982).

30) Yee L and Blanch HW, *Bio/Technology*, 10, 1550-1557 (1992).

31) Mori H, Yano T, Kobayashi T, and Shimizu S, *J. Chem. Eng.*, 12, 313-319 (1979).

32) Townend R, Kumosinski TF, Timasheff SN, Fasman GD, and Davidson B., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23, 163-169 (1966).

33) Yang JT, Wu CSC, and Martinez HM, in "Methods in Enzymology," vol.130, ed. by Hirs CHW and Timasheff SN, Academic Press Inc., New York, pp.208-269 (1986).

34) Gold L and Stormo GD, in "Translation initiation," ed. by Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Schacchter M, and Umberger HE, pp.1302-1307, Washington D.C. (1987).

- 35) Anderton TL, Shaw PC, Shin MK, and Hartley BS, *Biochem. J.*, 277, 263-271 (1991).
- 36) Brandsch R, Hinkkanen AE, Mauch L, Nagursky H, and Decker K, *Eur.J.Biochem.*, 167, 315-320 (1987).
- 37) Okushima M, Sugino D, Kouno Y, Nakano S, Miyahara J, Toda H, Kubo S, and Matsushiro A, *Jpn. J. Genet.*, 66, 173-187 (1991).
- 38) Roberts AN, Hudson GS, and Brenner S, *Gene*, 35, 259-270 (1985).
- 39) McClure WR, *Ann. Rev. Biochem.*, 54, 171-204 (1985).
- 40) Mauch L, Bichler V, and Brandsch R, *Mol. Gen. Genet.*, 221, 427-434 (1990).
- 41) Watanabe K, Murata K, and Kimura A, *Agric. Biol. Chem.*, 51, 1111-1114 (1987).
- 42) Dalbøge H, Carlsen S, Jensen EB, Christensen T, and Dahl HHM, *DNA*, 7, 399-405 (1988).
- 43) Surek B, Wilhelm M, and Hillen W, *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, 34, 488-494 (1991).
- 44) Scherer GFE, Walkinshaw MD, Arnott S, and Morre DJ, *Nucleic Acids Res.*, 8, 3895-3905 (1980).
- 45) Ikemura T, *J.Mol.Biol.*, 151, 389-409 (1981).
- 46) Suzukamo G, Fukao M, Hagiya K, and Saito Y, *Sumitomo Chem. (in Japanese)*, II, 35-42 (1989).

47) Suzukamo G, *J. Synthetic Organic Chem. (in Japanese)*, 40, 930-938 (1982).

### 第 3 章

48) Lipman DJ and Pearson WR, *Science*, 227, 1435-1441 (1985).

49) Higgins DG, Bleasby AJ, and Fuchs R, *Comput. Appl. Biosci.*, 8, 189-191 (1992).

50) Chou PY and Fasman GD, *Adv. Enzymol.*, 47, 45-148 (1978).

51) Millard CB, Kryger G, Ordentlich A, Greenblatt HM, Harel M, Raves ML, Segall Y, Barak D, Shafferman A, Silman I, and Sussman JL, *Biochemistry*, 38, 7032-7039 (1999).

52) Dobo A and Kaltashov IA., *Anal. Chem.*, 73, 4763-4773 (2001).

53) Ellman GL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 70-77 (1959).

54) Higaki JN, Evnin LB, and Craik CS, *Biochemistry*, 28, 9256-9263 (1989).

55) Anthonsen HW, Baptista A, Drabløs F, Martel P, Petersen SB, Sebastião M, and Vaz L, *Biotechnol. Annu. Rev.*, 1, 315-371 (1995).

56) Duez C, Fraipont CP, Joris B, Dusart J, Urdea MS, Martial JA, Frere JM, and Ghuysen JM, *Eur. J. Biochem.*, 162, 509-518 (1987).

57) Lindberg F and Normark S, *Eur. J. Biochem.*, 156, 441-445 (1986).

58) Jaurin B and Grundström T, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 4897-4901 (1981).

59) Peitsaro N, Polianskyte Z, Tuimala J, Pörn-Ares I, Liobikas J, Speer O, Lindholm D,

- Thompson J, and Eriksson O, *BMC Evol. Biol.*, 8, 1-11 (2008).
- 60) Ghuysen JM, *Annu. Rev. Microbiol.*, 45, 37-67 (1991).
- 61) Herzberg O and Moulton J, *Science*, 236, 694-701 (1987).
- 62) Negoro S, Taniguchi T, Kanaoka M, Kimura H, and Okada H, *J. Bacteriol.*, 155, 22-31 (1983).
- 63) Asano Y, Kato Y, and Kondo K, *Biochemistry*, 31, 2316-2328 (1992).
- 64) Galleni M, Lindberg F, Normark S, Cole S, Honore N, Joris B, and Frere JM, *Biochem.J.*, 250, 753-760 (1988).
- 65) McKay DB, Jennings MP, Godfrey EA, MacRae IC, Rogers PJ, and Beacham IR, *J.Gen.Microbiol.*, 138, 701-708 (1992).
- 66) Gelb, M.H., Svaren, J.P., and Abeles, R.H., *Biochemistry*, 24, 1813-1817 (1985).
- 67) Rosell, G., Herrero, S., and Guerrero, A., *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 226, 287-292 (1996).
- 68) Petersen EI, Valinger G, Sölkner B, Stubenrauch G, and Schwab H, *J.Biotechnol.*, 89, 11-25 (2001).
- 69) Berger R, Hoffmann M, and Keller U, *J. Bacteriol.*, 180, 6396-6399 (1998).
- 70) Schütte M and Fetzner S, *Curr. Microbiol.*, 54, 230-236 (2007).
- 71) Elend C, Schmeisser C, Leggewie C, Babiak P, Carballeira JD, Steele HL, Reymond JL,

- Jaeger KE, and Streit WR, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 3637-3645 (2006).
- 72) Rashamuse K, Magomani V, Ronneburg T, and Brady D, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 83, 491-500 (2009).
- 73) Arpigny JL and Jaeger KE, *Biochem.J.*, 343, 177-183 (1999).
- 74) Kelly A, Dideberg O, Charlier P, Wery JP, Libert M, Moews PC, Knox JR, Duez C, Fraipont C, Joris B, Dusart J, Frere JM, and Ghuysen JM, *Science*, 231, 1429-1431 (1986).
- 75) Jones M and Page MI, *J.Chem. Soc. Chem. Commun.*, 5, 316-317 (1991).
- 76) Oefner C, D'Arcy A, Daly JJ, Gubernator K, Charnas RL, Heinze I, Hubschwerlen C, and Winkler FK, *Nature*, 343, 284-288 (1990).
- 77) Lobkovsky E, Moews PC, Liu H, Zhao H, Frere JM, and Knox JR, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 90, 11257-11261 (1993).
- 78) Kelly JA and Kuzin AP, *J.Mol.Biol.*, 254, 223-236 (1995).
- 79) Kelly A, Knox JR, and Zhao H, *J.Mol.Biol.*, 209, 281-295 (1989).
- 80) Negoro S, Ohki T, Shibata N, Sasa K, Hayashi H, Nakano H, Yasuhira K, Kato D, Takeo M, and Higuchi Y, *J.Mol.Biol.*, 370, 142-156 (2007).
- 81) Ghosh AS, Chowdhury C, and Nelson DE, *Trends Microbiol.*, 16, 309-317(2008).
- 82) Brenner S, *Nature*, 334, 528-530 (1988).
- 83) Dale JW, Godwin D, Mossakowska D, Stephenson P, and Wall S, *FEBS lett.*, 191, 39-44

(1985).

- 84) Joris B, Ghuysen JM, Dive G, Renard A, Dideberg O, Charlier P, Frere JM, Kelly A, Boyington JC, Moews PC, and Knox JR, *Biochem.J.*, 250, 313-324 (1988).
- 85) Wagner UG, Petersen EI, Schwab H, and Kratky C., *Protein Sci.*, 11, 467-478 (2002).
- 86) Tsukamoto K, Tachibana K, Yamazaki N, Ishii Y, Ujiie K, Nishida N, and Sawai T, *Eur.J.Biochem.*, 188, 15-22 (1990).
- 87) Zhang W, Shi Q, Meroueh SO, Vakulenko SB, and Mobashery S, *Biochemistry*, 46, 10113-10121 (2007).
- 88) Brady L, Brzozowski AM, Derewenda ZS, Dodson E, Dodson G, Tolley S, Turkenburg JP, Christiansen L, Huge-Jensen B, and Norskov L, *Nature*, 343, 767-70 (1990).
- 89) Goldberg SD, Iannuccilli W, Nguyen T, Ju J, and Cornish VW, *Protein Sci.*, 12, 1633-1645 (2003).
- 90) Lamotte-Brasseur J, Lounnas V, Raquet X, and Wade RC, *Protein Sci.*, 8, 404-409 (1999).
- 91) Damblon C, Raquet X, Lian LY, Lamotte-Brasseur J, Fonze E, Charlier P, Roberts GCK, and Frere JM, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 93, 1747-1752 (1996).
- 92) Tosa T, *Ann. N Y Acad. Sci.*, 750, 364-375 (1995).
- 93) Kataoka M, Honda K, Sakamoto K, and Shimizu S, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 75, 257-266 (2007).
- 94) Matsumae H, Furui A, and Shibatani T, *J. Ferment. Bioeng.*, 75, 93-98 (1993).

95) Shimizu S, Kataoka M, Honda K, and Sakamoto K, *J.Biotechnol.*, 92, 187–194 (2001).

96) Sakamoto K, Honda K, Wada K, Kita S, Tsuzaki K, Nose H, Kataoka M, and Shimizu S, *J.Biotechnol.*, 118, 99–106 (2005).

## 論文目録

学位論文の主たる部分を公表した論文、特許

1. Purification and some properties of carboxylesterase from *Arthrobacter globiformis*,  
M. Nishizawa, H. Gomi, and F. Kishimoto,  
1993, *Biosci. Biotech. Biochem.*, vol.57, pp594-598.
2. Stereoselective production of (+)-*trans*-chrysanthemic acid by microbial esterase; cloning nucleotide sequence, and over expression of the esterase gene of *Arthrobacter globiformis* in *Escherichia coli*,  
M. Nishizawa, M. Shimizu, H. Ohkawa, and M. Kanaoka,  
1995, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol.61, No.9, pp3208-3215.
3. Identification of the catalytic residues of carboxylesterase from *Arthrobacter globiformis* by diisopropyl fluorophosphate-labeling and site-directed mutagenesis,  
M. Nishizawa, Y. Yabusaki, and M. Kanaoka,  
2011, *Biosci. Biotech. Biochem.*, vol.75, pp.89-94.

## 参考論文

1. Biochemical synthesis of several chiral insecticide intermediates and mechanism of action of relevant enzymes,  
H. Hirohara and M. Nishizawa,  
1998, *Biosci. Biotech. Biochem.*, vol.62, No.1, pp1-9.
2. *Arthrobacter globiformis* エステラーゼの構造と同酵素を用いた光学活性ピレスロイド中間体の調製  
西澤雅子、金岡昌治、清水将年、光田賢、小牧良平、藪崎義康  
1995, 生物工学会誌, vol.73, No.3, pp226-228.

## 学会発表

1. *Bacillus* sp. DC-1 由来ジクロロビニル菊酸エチルエステル不斉加水分解酵素の精製と性質  
杉本(西澤)雅子、杉木千晶、西澤完治、岸本文貴  
1987, 日本農芸化学会昭和 62 年度大会

2. 新規な抗体結合蛋白プロテインH  
西澤雅子、五味英行、穂積龍信、服部静夫、田川千晶、岸本文貴、L. Björck  
 1990, 日本薬学会第 111 年会
  
3. *Arthrobacter globiformis* SC-6-98-28 の菊酸エステル不斉加水分解酵素遺伝子の  
 クローニングと大腸菌における高発現  
西澤雅子、大川秀郎、金岡昌治  
 1993, 日本農芸化学会大会
  
4. 光学活性ピレスロイド中間体の酵素反応による製造 — 遺伝子工学的手法の工業  
 プロセスへの応用—  
西澤雅子  
 1993, 日本農芸化学会大会
  
5. *Arthrobacter globiformis* エステラーゼを用いた光学活性ピレスロイド中間体の  
 調製  
西澤雅子、金岡昌治、清水将年、光田賢、小牧良平、藪崎義康  
 1994, 日本生物工学会リパーゼ研究部会
  
6. Differential Display により同定した内臓脂肪由来分子  
 船橋徹、高橋雅彦、堀田紀久子、下村伊一郎、木原進士、中村正、松澤佑次、西  
 澤雅子、村上裕子、平松隆司  
 2001, 日本糖尿病学会第 44 回年次学術集会
  
7. RNA ディスプレー解析による内臓脂肪由来分泌因子の同定  
 船橋徹、高橋雅彦、下村伊一郎、木原進士、松澤佑次、西澤雅子、村上裕子、平  
 松隆司  
 2001, 日本臨床分子学会第 38 回学術集会

#### 特許出願

1. 新規微生物  
 杉木千晶、西澤完治、杉本（西澤）雅子、園田一美、岸本文貴  
 1987, JP 62-248482

2. (+)-トランス-パーメトリン酸の酵素による製法  
西澤完治、杉木千晶、杉本（西澤）雅子、園田一美、岸本文貴  
1987, JP 62-253398
3. Process for preparing optically active cyclopropanecarboxylic acids with microorganisms or enzymes.  
K. Nishizawa, S. Mitsuda, R. Komaki, M.Sugimoto-Nishizawa, C. Sugiki, Y. Ogami, K. Sonoda, F. Kishimoto.  
1987, WO 8706269
4. (+)-シス-2,2-ジメチル-3 (2-クロロ-3,3',3"-トリフロロプロペニル) シクロプロパンカルボン酸の製造法  
光田賢、小牧良平、杉本（西澤）雅子  
1988, JP 63-255246
5. 新規なエステラーゼおよびその製造法  
杉本（西澤）雅子、杉木千晶、西澤完治、岸本文貴  
JP 63-003789 (1988)
6. エステラーゼおよびその製造法  
杉本（西澤）雅子、穂積龍信、五味英行、岸本文貴  
JP 01-181788 (1989)
7. Gene encoding asymmetrically active esterase.  
M. Nishizawa, M. Kanaoka, H. Ohkawa  
1993, JP H05-56787, 1994, US 07-817917
8. 改変プロテインH遺伝子およびそれを用いる改変プロテインHの生産方法  
五味英行、穂積龍信、西澤雅子、岸本文貴  
1993, JP 05-304963
9. A method for evaluating intraabdominal adipose tissue mass.  
Y. Matsuzawa, M. Nishizawa, H. Murakami.  
2000, WO200062073, JP 2000-356637
10. 脂肪蓄積抑制能力の検定方法

大坪 嗣輝、西澤雅子

2003, JP 2003-230393

11. 脂肪細胞における細胞内取り込み糖量の分析方法

秋吉恵、西澤雅子、村上裕子

2004, JP 2004-057137

12. 脂肪細胞関連因子の分析方法

西澤雅子

2004, JP 2004-065194

13. ノックアウト非ヒト動物

平峯加恵、西澤雅子、山中伸弥

2004, JP 2004-154135