

論文内容の要旨

博士論文題目 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

氏名 西澤 雅子

【背景】除虫菊の殺虫主成分として同定されたピレトリンの構造を元に、多くのピレスロイド殺虫剤が合成され汎用されている。合成ピレスロイドのカルボン酸側共通構造である菊酸は、1, 3位に不斉炭素を持ち4種類の立体異性体から成るが、ピレスロイドとしてはラセミ体で使用されている。異性体の中で最も殺虫活性が強い *1R, 3R* 体菊酸の使用により、効力の向上と共に使用量の減少における環境負荷の軽減が期待できる。

【目的】 これまでに、光学活性な天然物からの誘導、不斉合成、および光学分割による *1R, 3R* 菊酸の調製が試みられてきたが、工程数、収率、光学純度に課題があった。このような状況の下で、本研究は、酵素法による光学純度 100%の *1R, 3R* 菊酸製造を目指した。

【結果】 *Arthrobacter globiformis* SC-6-98-28 株から、ラセミ体菊酸エチルエステルを不斉加水分解する酵素を精製した。精製酵素はカルボン酸エステルを広く基質とするエステラーゼであったが、菊酸エチルに対しては厳密な立体選択性を発揮し、加水分解反応により光学純度 100%の *1R, 3R* 菊酸が生成することを明らかにした。

しかしながら、菌体内酵素含量が微量であり、*A. globiformis* を直接不斉加水分解プロセスへ用いることは不可能であった。そこで、酵素の大量取得を目指し、エステラーゼ遺伝子をクローニングした。得られた遺伝子は大腸菌内で高発現する遺伝子とは大きく異なる特徴を有していたため、上流配列および開始コドン周辺の塩基配列を中心に改変し、大腸菌組み換え体内でエステラーゼ活性を誘導発現させることに成功した。さらに、ジャーファーマンターによる高密度培養条件を最適化し、菌体当たりのエステラーゼ生産量を *A. globiformis* の 2, 500 倍上昇させた。大腸菌組み換え体を用いた菊酸エチル不斉加水分解反応は、高基質濃度条件では菊酸による生成物阻害により反応が停止したが、ホローファイバー型限外ろ過膜により生成菊酸を反応系外に除去する方法を考案し、不斉加水分解反応を直線的に進行させることに成功した。さらに、エステラーゼの熱安定性や、最適 pH がアルカリ性であることを利用して、酵素活性を保持したまま大腸菌組み換え体を死菌化し、非組み換え体としてプロセスへ組み込むことが可能になった。未反応の菊酸エステルは直接エピ化・ラセミ化して基質エステリサイクル可能であり、酵素法と化学合成法のハイブリッドプロセスによる光学純度 100%の *1R, 3R* 菊酸製造に向けた基礎的プロセスが構築できた。

不斉加水分解酵素エステラーゼとアミノ酸相同性を示すアミド加水分解酵素類 (PBPs) との触媒機構の異同を調べるため、質量スペクトルと部位特異的変異の手法を用いて、活性に関与するアミノ酸の同定を試みた。その結果、本酵素はエステラーゼであるが、PBPs においても保存されているコンセンサス配列内に触媒残基を持ち、PBPs と類似の機構でエステル加水分解活性を発揮する興味深い酵素であることを明らかにした。

(論文審査結果の要旨)

除虫菊の殺虫主成分として同定されたピレトリンの構造を元に化学合成されているピレスロイド殺虫剤は、カルボン酸側に菊酸を共通構造として有する。菊酸は4種類の立体異性体から成るが、現状のピレスロイドにはラセミ体を使用されており、最も有効な *1R, 3R* 菊酸の使用により、効力の向上と共に使用量の減少による環境負荷の軽減が期待できる。これまでに、光学活性な天然物からの誘導、不斉合成、および光学分割による *1R, 3R* 菊酸の調製が試みられてきたが、工程数、収率、光学純度に課題があった。本論文では、これらの課題を解決すべく、酵素法による光学純度 100%の *1R, 3R* 菊酸製造を目指した。

1) 不斉加水分解酵素の精製と性質解明

Arthrobacter globiformis SC-6-98-28 株から、ラセミ体菊酸エチルエステルを不斉加水分解する酵素を精製した。精製酵素はカルボン酸エステルを広く基質とするエステラーゼであるが、菊酸エチルエステルに対しては優れた立体選択性を発揮し、加水分解反応により光学純度 100%の *1R, 3R* 菊酸が生成することを明らかにした。

2) エステラーゼの大腸菌における発現とプロセスへの利用

A. globiformis 菌体内酵素含量が微量であり、直接不斉加水分解プロセスへ用いることは不可能であったため、エステラーゼ遺伝子クローニングと大腸菌における高発現を目指した。取得したエステラーゼ遺伝子塩基配列の特長を解析し、上流配列および開始コドン近辺の塩基配列を改変した結果、大腸菌組み換え体においてエステラーゼ活性を誘導発現させることに成功した。ジャーファーメンターによる高密度培養条件を最適化し、菌体当たりのエステラーゼ生産量を飛躍的に上昇させた。さらに、実際のプロセス設計のため、高基質濃度条件で認められた生成物阻害を回避するホローファイバー型限外ろ過膜システムを考案し、また、酵素の熱安定性や最適 pH の特性を利用し、酵素活性を保持したまま大腸菌組み換え体を死滅化し、非組み換え体としてプロセスへ組み込むことに成功した。本法と未反応エステルの化学法による直接エピ化・ラセミ化による基質へのリサイクルを組み合わせることで、光学純度 100%の *1R, 3R* 菊酸製造に向けた基礎的プロセス構築に成功した。

3) 不斉加水分解酵素の活性に寄与するアミノ酸の同定

エステラーゼとアミノ酸相同性を示すアミド加水分解酵素類との触媒機構の異同を解析する目的で、質量スペクトルと部位特異的変異の手法を用いて、活性に関与するアミノ酸の同定を実施した。その結果、本酵素はエステラーゼであるが、アミド加水分解酵素と共通のコンセンサス配列内に触媒残基を有し、類似の機構でエステル加水分解活性を発揮する興味深い酵素であることを解明した。本酵素の光学活性物質創製への応用を見据え、さらなる触媒機構の解析と立体選択性の解明が期待される。

以上のように本論文では、光学活性な菊酸の製造に関する研究を行い、酵素法による光学純度 100%の *1R, 3R* 菊酸取得を可能にし、プロセス実用化への道を開いた。これらは、基礎プロセス研究、学術的研究として高く評価でき、物質科学の発展に貢献していると認められる。よって、審査員一同は本論文が博士(理学)の学位論文として価値あるものと認めた。