

Pseudomonas putida が生産する
エステラーゼの遺伝子工学的研究

1998

尾崎 英司

目 次

略語一覧

はじめに

第1章 *Pseudomonas putida* MR-2068が生産するエステラーゼ遺伝子の
クローニングと遺伝子解析

第1節 *Pseudomonas putida* MR-2068が生産するエステラーゼ遺伝子の
クローニング

第2節 エステラーゼ遺伝子の塩基配列の解析

第3節 考察

第2章 エステラーゼの精製と性質

第1節 組換え大腸菌を用いたエステラーゼの精製

第2節 エステラーゼの諸性質

第3節 考察

第3章 酵素法によるD-(-)- β -Acetylthioisobutyric acid (DAT)工業生産技術の
開発

第1節 組換え大腸菌の大量培養

第2節 酵素法によるDATの製造

第3節 考察

第4章 エステラーゼの応用研究

第1節 光学活性 α -置換アルカンカルボン酸の合成

第2節 アルカンジカルボン酸モノメチルの合成

第3節 エステラーゼの活性部位モデルについて

第4節 考察

総括

実験の部

参考文献

本論文の基礎となる原著

謝辞

略語一覽

| | |
|----------------|---|
| ACE: | Angiotensine converting enzyme |
| CAP: | Captopril |
| CIP: | Alkaline phosphatase from calf intestine |
| CPO: | Chloroperoxidase |
| CRL: | <i>Candida rugosa</i> lipase |
| DAT: | D-(-)- β -acetylthioisobutyric acid |
| DBU: | 1,8-diazabicyclo-[5,4,0]-undecene-7 |
| DFP: | Diisopropyl fluorophosphate |
| DL-ester: | Methyl β -acetylthioisobutyrate |
| GILSP: | Good industrial large scale practice |
| β -HIBA: | β -Hydroxyisobutyric acid |
| IBA: | Isobutyric acid |
| LAH: | Lithium aluminium hydride |
| MCD: | Monochlorodimedone |
| MMA: | Methyl methacrylate |
| ORF: | Open reading frame |
| PLE: | Porcine liver esterase |
| PPL: | Porcine pancreatic lipase |

はじめに

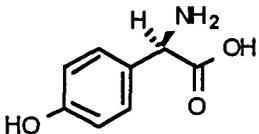
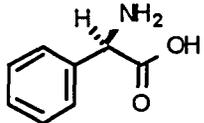
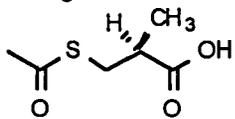
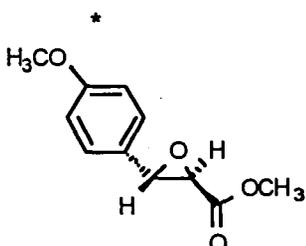
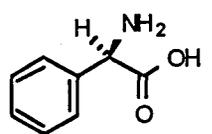
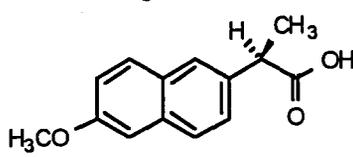
生化学や、有機合成化学の発展により、多くの生理活性化合物が分離同定あるいは合成されるようになり、その立体構造と生理活性の関係が次第に明らかにされつつある。その結果、化合物が不斉炭素を持つ場合、その光学活性も生理活性に大きく関与する重要な因子と認識され、種々の手法による光学活性化合物合成研究が広く行われている。光学活性化合物の合成方法としては、立体構造による結晶性の違いを利用した優先晶析法、不斉触媒を用いた不斉還元法、立体構造による反応性の違いを利用した不斉合成法などがあるが、生体触媒を用いる方法は、最も有効且つ現実的な手法の1つとして認識されつつある¹⁻¹²⁾。

微生物や酵素を利用して、アミノ酸、核酸、有機酸、抗生物質等を効率よく生産することは古くから行われているが、近年、有機合成に微生物や酵素反応を利用する研究が活発に行われている。酵素反応の最大の利点は、反応が立体選択的に進む点であり、不斉還元反応、酸化還元酵素を用いる方法、脱ハロゲン酵素を用いる方法、加水分解酵素による不斉加水分解反応などが工業レベルでも広く利用されている。

これらの中で、リパーゼ、エステラーゼ、プロテアーゼなどの加水分解酵素によるエステル結合、アミド結合の加水分解反応は、もっとも多く研究されている分野である。その特徴として、リサイクルの必要な補酵素類を必要としない、市販されている酵素が多い、立体選択性に優れている、基質特異性が比較的フレキシブルである、といった利点が挙げられる。エステラーゼはエステル結合を加水分解する酵素であり、動物、植物、微生物に広く分布している¹³⁾。真核生物由来のエステラーゼに比べて微生物由来のエステラーゼに関する報告は少ないが、*Bacillus* 属や、*Pseudomonas fluorescens*, それに *Aspergillus niger* 由来の細胞内在型や分泌型エステラーゼが単離され、その酵素学的諸性質が報告されている¹⁴⁻²⁰⁾。

生物変換分野の研究の中で加水分解酵素を用いる内容は約6割を占めるといわれている。多くの研究結果が報告されている反面、実際に工業化に至った例は意外に少ない。その代表的なものをTable 1に示した²¹⁾。

Table 1. Top 10 optically active pharmaceuticals /synthetic, optically active intermediate production; Former technology versus New technology.

| Product | Turnover (mil.\$, 1992) | Synthetic Intermediate | Technology | |
|-------------------|----------------------------|---|------------|---------|
| | | | Former | New |
| 1, Amoxicillin | 2200 |  | DR | DR/B |
| 2, Ampicillin | 2100 |  | DR | DR |
| 3, Captopril | 2100 |  | DR/B | B |
| 4, Enalapril | 2000 | * | | |
| 5, Diltiazem | 1800 |  | DR | B |
| 6, Lovastatin | 1450 | ** | | |
| 7, Erythropoietin | 1250 | ** | | |
| 8, Cefaclor | 1200 |  | DR | DR |
| 9, Naproxen | 1100 |  | DR | DR/B/AS |
| 10, ceftriaxon | 900 | * | | |

DR Diastereomer resolution
 B Biocatalysis (kinetic resolution/asymmetric synthesis)
 AS Asymmetric synthesis
 * No optically active, synthetic intermediate
 ** Fermentation product
 mil. \$ million dollars

化学企業にとっては、工業レベルで安価に大量生産されている汎用化学品を原料として、より付加価値の高い製品群を生み出す技術開発は重要である。その1つの手段として、酵素または微生物反応の特徴を生かし、有機合成反応の効率の良さを組み合わせることにより目的化合物を合成するプロセスは、合理的なものとなりうる。

工業レベルで大量生産されているアクリル系モノマーの微生物変換に関して、メタクリル酸を原料とした光学活性β-ヒドロキシイソ酪酸(HIBA)の合成技術が広く知られている(Fig. 1)。これはバリンの代謝経路にメタクリルコエンザイム-A (Co-A)があることに着目したもので、β-水和が立体選択的に進む。β-HIBAの代謝経路にあるβ-HIBAデヒドロゲナーゼをブロックすることにより、光学活性β-HIBAを蓄積させることが可能である。微生物のスクリーニングや、ブロックミュータントの単離等により、β-HIBAのD-体および、L-体がともに生産可能となっている^{14,15)}。ちなみに、ある企業ではイソ酪酸(IBA)を原料としてD-β-HIBAを工業生産することに成功している。

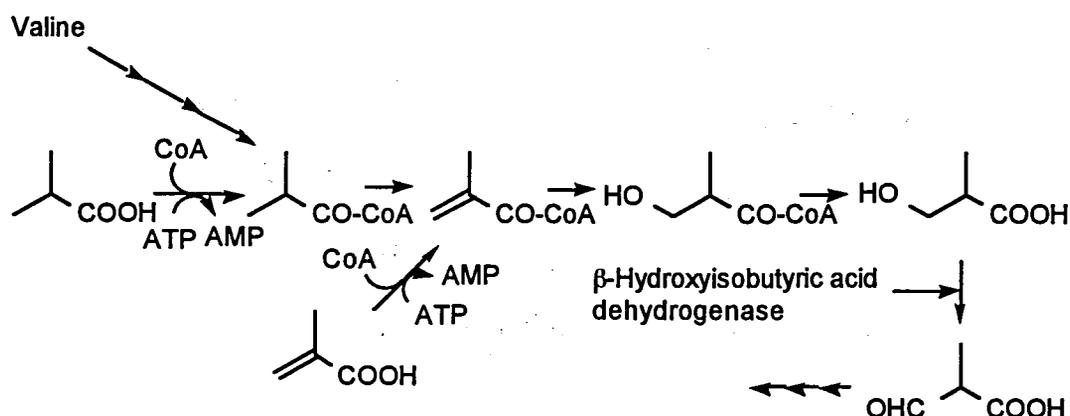


Fig. 1. Synthesis of optically active β-hydroxyisobutyric acid via valine metabolic pathway.

これらの光学活性β-HIBAは、分子内に2つの異なった官能基を持っており、その特性の違いを利用して種々の光学活性物質に誘導可能であり、さまざまな用途が期待される。その一例として次のような用途が知られ

ている。すなわち、D-β-HIBAをクロルイソ酪酸クロリドとしたのち、クロルイソ酪酸として水酸化ソーダ(NaHS)を用いてメルカプトイソ酪酸とし、アセチル化することによりD-β-アセチルチオイソ酪酸(DAT)が得られる。その後、酸クロライドを経てL-プロリンを付加させ、脱アセチル化することにより、カプトプリル(CAP)が合成可能である(Fig. 2)²⁴⁾。CAPは、代表的なアンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害剤系の血圧降下剤として、1976年に米国スキブ社(現プリストルマイヤーズ・スキブ、BMS社)によって開発された^{25,26)}。上市以来、順調に売り上げを伸ばし、売上高推定約1800億円の大型医薬品として成長した。

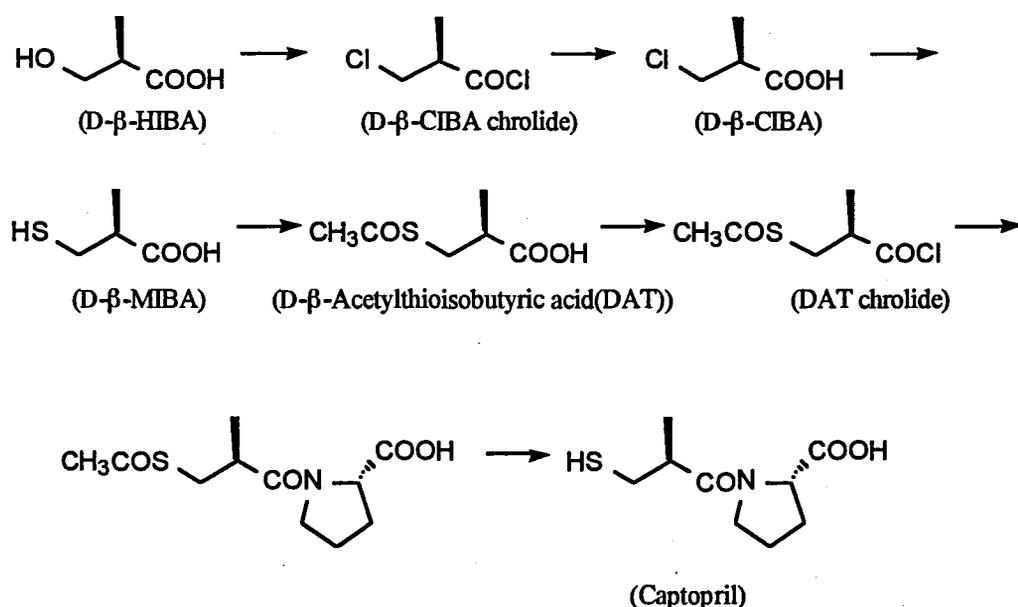


Fig. 2. Synthesis of Captopril from D-β-HIBA.

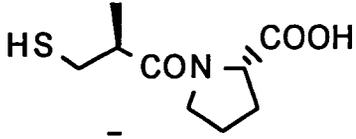
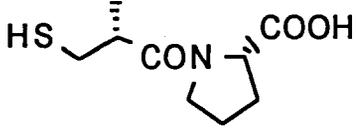
医薬品の薬理活性は分子内の不斉炭素の立体配置に起因していることが多く、CAPの場合もL-プロリンとD-β-メルカプトイソ酪酸がアミド結合した比較的簡単な化学構造を有しているが、β-メルカプトイソ酪酸骨格のα位のメチル基がD配置であることがきわめて重要である。Table 2は、

ウサギ肺の血圧上昇ペプチドホルモンの合成酵素(ACE-II)に対する阻害

注) Fig. 2.において、本来は(RS)表示を用いるべきであるが、目的化合物はペプチドのアナログであり、非天然骨格であることを表すため、DL表示を用いた。

活性を比較したものである。このメチル基の立体配置がL-配置 (R-体) のものは、D-配置 (S-体) のものに比較して、ACE阻害活性が1/100以下である²⁷⁾。

Table 2. IC₅₀ of Each Diastereomer.

| No. | Chemical Formula | IC ₅₀ (μM)* |
|--------------------|---|------------------------|
| SQ 14,225 (CAP) |  | 0.023 |
| SQ 14,534 |  | 2.4 |

* IC₅₀ for rabbit lung ACE.

CAP合成法として、古くからメタクリル酸にチオ酢酸を付加させたラセミ体のβ-アセチルチオイソ酪酸をL-プロリンと反応させて得られるアミド体ジアステレオマーを、シクロヘキシルアミンの塩として光学分割した後、脱アセチルする方法が知られている²⁸⁾。しかしながら、ジアステレオマーの光学分割法では、目的物である化合物の対掌体が必然的に不要物として副生するため、必ずしも経済的な方法とはいえない。一般に、CAPのように複数の不斉炭素を有する化合物を合成する場合、それぞれの不斉炭素部分に対応する光学活性体をキラルシントンとして用いる方法が効率的である。CAPの場合、L-プロリンとD-β-置換イソ酪酸がこれに相当するが、L-プロリンは、すでにアミノ酸の1つとして製法が確立しており、D-β-置換イソ酪酸の製法開発が医薬中間体メーカーの目標となる。

従来のD-β-置換イソ酪酸合成法として、ラセミ体β-アシルチオイソ酪酸を光学活性アミンを用いて光学分割する方法²⁹⁾、前述の光学活性β-ヒドロキシイソ酪酸より誘導する方法²⁴⁾、光学活性β-ハロイソ酪酸より誘導する方法等が報告されている³⁰⁾。

Sakimaeらは、D-β-置換イソ酪酸の新規合成ルートとしてメタクリル酸

メチル(MMA)とチオ酢酸から容易に合成できるラセミ体 β -アセチルチオ
イソ酪酸メチル (DL-エステル) の酵素による光学分割法を開発した³¹⁻³⁴。

本研究では、自然界よりエステラーゼ生産菌として新規に単離された
Pseudomonas putida MR-2068株から本酵素遺伝子をクローニング後、組
換え技術を用いて大量生産させ、酵素学的諸性質について調べた。さら
に、エステラーゼ遺伝子を導入した工業生産菌を分子育種することによ
り、それを利用したエステラーゼ応用技術開発について述べる。

第1章 *Pseudomonas putida* MR-2068 が生産する エステラーゼ遺伝子のクローニングと遺伝子解析

著者と同じ研究グループのSakimaeらは、 β -アセチルチオイソ酪酸メチル(DL-エステル)のD-体のメチルエステルを酵素的に不斉加水分解してDATに変換する酵素反応を開発した (Fig. 3)。

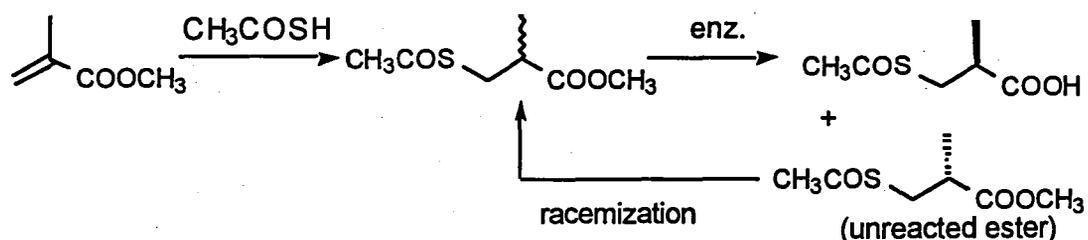


Fig. 3. New Synthetic route of DAT.

DL-エステルは、工業的に大量生産されている安価なメタクリル酸メチルとチオ酢酸から容易に合成できる。副生するL- β -アセチルチオイソ酪酸メチルは、化学的にラセミ化して原料のDL-エステルとして回収可能である。DL-エステルは、分子内にメチルエステル基だけでなく、加水分解を受けやすいアセチルチオエステル基も有する。そのため、チオエステル基には作用せず、D-体のメチルエステル基のみを選択的に加水分解するエステラーゼの開発がターゲットとなる。これまでに市販されている酵素ならびに既存のエステラーゼ生産菌についてその酵素活性を調べてみた (Table 3)。

Sakimaeらは、土壌からエステラーゼを産生する細菌を分離し、それを *Pseudomonas putida* と同定した (Table 4)。本菌株 (*P. putida* MR-2068 と命名) の生産するエステラーゼは、高い光学純度のDATを与える工業的に有用な酵素であった。また、これまでに得られたエステラーゼと比較してはるかに高い耐熱性を示した。

一般に工業的に酵素を利用する場合、耐熱性酵素には多くの利点が期待できる。^{35,36)}しかしながら、MR-2068株における酵素産生量はごく微

Table 3. Optical purities of DAT produced by some strains

| Microorganisms | | Strains Number | Optical Purity of DAT(%e.e.) |
|-----------------------|--------------------------|-------------------|---------------------------------|
| Genera | Species | | |
| <i>Agrobacterium</i> | <i>radiobacter</i> | IFO 12607 | 90.8 |
| <i>Agrobacterium</i> | <i>tumefaciens</i> | IAM 1037 | 74.6 |
| <i>Cellulomonas</i> | <i>flavigena</i> | ATCC 484 | 91.9 |
| <i>Brevibacterium</i> | <i>linens</i> | ATCC 8377 | 75.0 |
| <i>Enterobacter</i> | <i>cloacae</i> | IAM 1624 | 91.6 |
| <i>Pseudomonas</i> | <i>ovalis</i> | IAM 1049 | 80.0 |
| <i>Pseudomonas</i> | <i>ovalis</i> | IAM 1153 | 86.4 |
| <i>Pseudomonas</i> | <i>putida</i> | IFO 3738 | 90.0 |
| <i>Pseudomonas</i> | <i>putida</i> | IFO 12996 | 96.5 |
| <i>Pseudomonas</i> | <i>fluorescens</i> | IFO 3081 | 97.0 |
| <i>Pseudomonas</i> | <i>fluorescens</i> | IFO 12055 | 96.0 |
| <i>Pseudomonas</i> | <i>fluorescens</i> | IFO 12180 | 95.8 |
| <i>Pseudomonas</i> | <i>schuyllkilliensis</i> | IAM 1008 | 90.6 |
| <i>Rhodococcus</i> | <i>erythropolis</i> | IFO 12538 | 93.9 |
| <i>Toluroopsis</i> | <i>gropengieseri</i> | IFO 0659 | 90.4 |

Table 4. Morphological and physiological characteristics of strain, MR-2068**Morphological characteristics**

Rods (0.35 - 0.5 x 1.5 - 3.0 μm), non pleomorphic, motile (polar flagella, 2<), Gram-negative, non spore forming.

Physiological characteristics

- (1) O-F test, oxidative
- (2) Catalase reaction, positive
- (3) Oxidase reaction, positive
- (4) Urease reaction, positive
- (5) Denitrification, negative
- (6) Indole, not produced
- (7) Citrate, utilized
- (8) Growth at 41°C, negative
- (9) Phenylalanine deaminase reaction, negative
- (10) Arginine dihydrolase, positive
- (11) Lysine decarboxylase reaction, positive
- (12) Gelatin liquefaction, negative
- (13) Water-soluble pigments, produced
- (14) Fluorescent pigment, positive
- (15) Acid production from sugar D-glucose, positive; D-xylose, positive; sucrose, negative; maltose, negative; D-mannitol, negative; lactose, negative

量であったことから、エステラーゼの酵素学的諸性質は十分に解析されていなかった。また、酵素の供給源としての工業的使用にあたって酵素活性の高い菌株の育種が望まれる。それ故、本研究では、先ず、遺伝子操作法によるエステラーゼ高活性菌株の分子育種を目的として、*P. putida* MR-2068株を遺伝子供与体として大腸菌の宿主-ベクター系を用いたエステラーゼ遺伝子のショットガンクローニングを試みた。

第1節 *Pseudomonas putida* MR-2068 が生産するエステラーゼ遺伝子のクローニング

P. putida MR-2068株をLB培地で培養し、遠心分離により集菌した。染色体DNAの調製は、Marmurらの方法³⁷⁾に従った。

得られた染色体DNAを*Eco*RIで部分消化した。大腸菌プラスミドベクターpUC19を*Eco*RIで完全消化した後、フォスファターゼで処理し、脱リン酸化をした。これらのDNA溶液をT4 DNAリガーゼを用いてライゲーション反応を行い、大腸菌JM109株のコンペテントセルに導入した。得られた組換えプラスミドをX-gal, IPTG, ampicillin (実験の部参照)を含むLBプレートに接種し、約1000株の形質転換体を得た。

酵素反応の基質となるDL-エステルを加水分解するとカルボン酸を生成する結果、pH変化を生じる。そこで、pH指示薬による検出が可能となることから、基質溶液 (0.1% DL-エステル、0.01% ブロムクレゾールパープルを50mM Tris/HCl(pH7.5)バッファーに溶解したもの) をしみこませたる紙に形質転換体のコロニーをレプリカし、37℃にて静置した。1時間後、コロニー周辺に色調変化を生じさせた株をエステラーゼ活性株とし、保存した (Fig. 4)。得られたエステラーゼ活性株よりプラスミドを抽出し、その制限酵素切断地図を作成したところ、約8 kbの親株由来*Eco*RI DNA断片が挿入されていた³⁸⁾。そこで、このプラスミドをpPE101と命名した。さらに、挿入断片のdeletion mutantを作成し、エステラーゼ活性を確認したところ、エステラーゼ遺伝子は約1.1 kbのPstI-ClaI断片中に存在することがわかった (Fig. 5)。

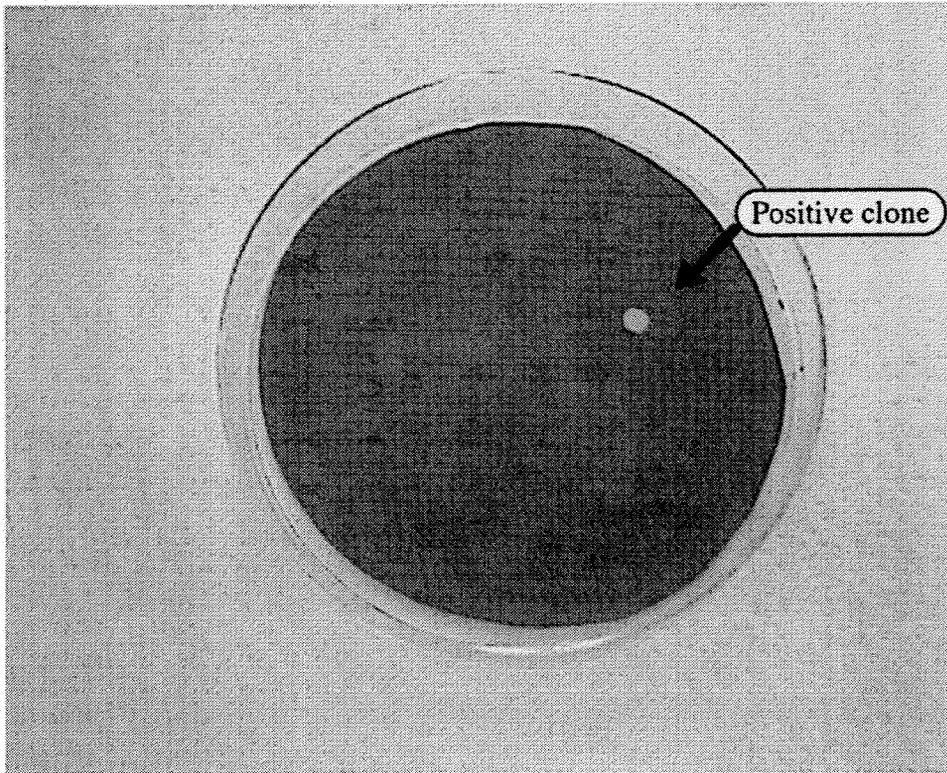


Fig. 4. Screening of esterase positive clone.

A Filter paper was soaked in a solution of
0.1 % of DL-ester,
0.01 % of Bromocresolpurple,
in 50 mM Tris/HCl (pH 7.5)

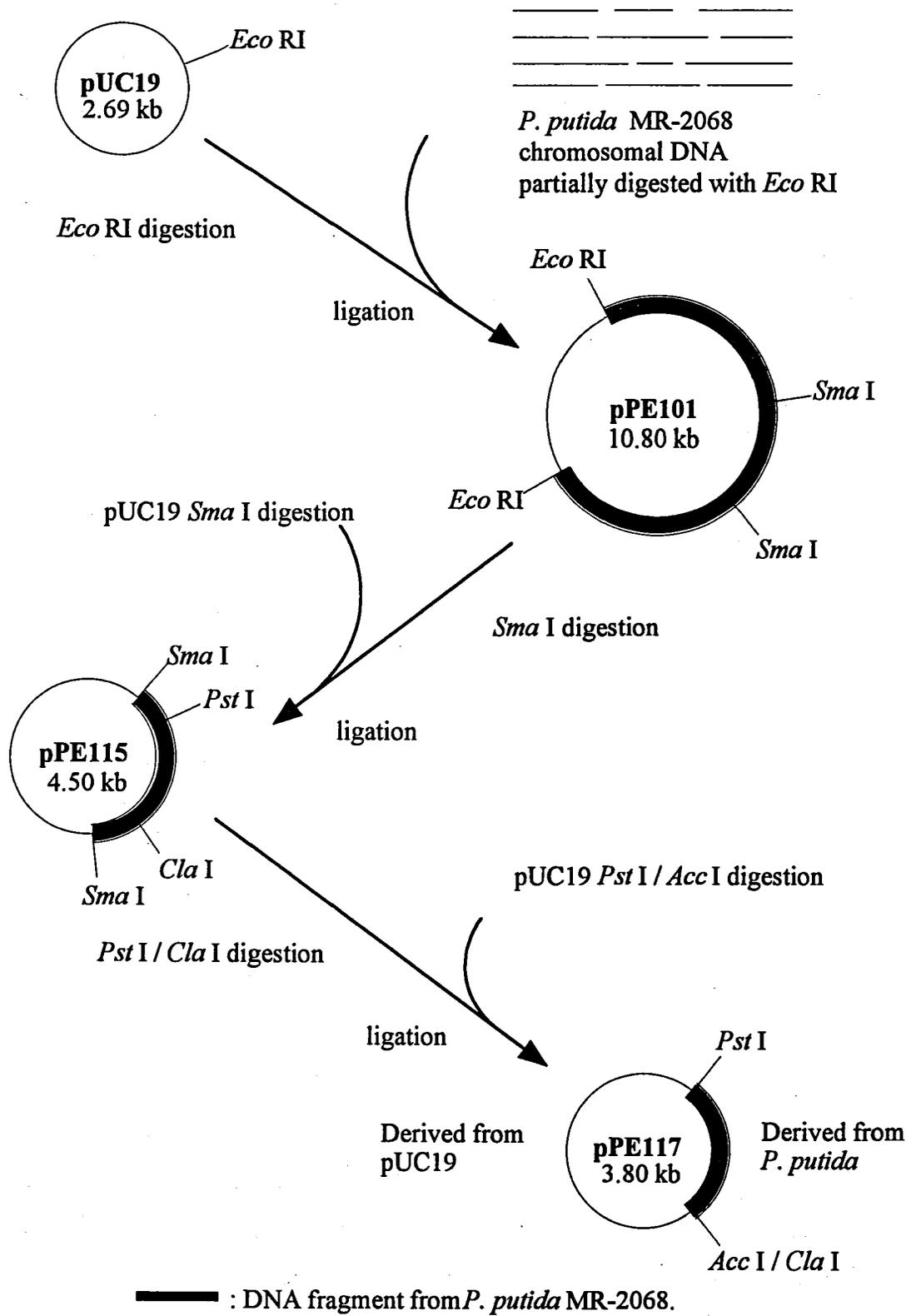


Fig. 5. Cloning of esterase gene of *P. putida* MR-2068.

第2節 エステラーゼ遺伝子の塩基配列の解析

pPE117 に含まれる *P. putida* MR-2068 の染色体 DNA 由来の断片を含む約1.3 kbのDNA塩基配列を決定した (Fig. 6)。DNAシーケンスにあたっては、挿入DNAをmp18またはmp19にサブクローニングしたのから一本鎖ファージを調製し³⁹⁾、dideoxy chain termination法によって決定した (Fig. 7)⁴⁰⁾。

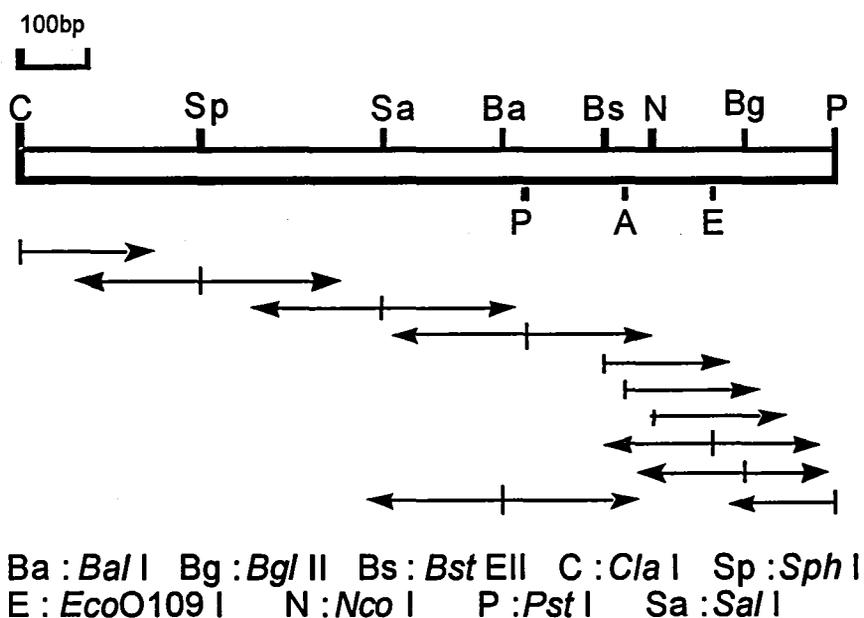


Fig.6. Sequencing strategies.

約1.3 kbのDNA断片の塩基配列を決定した結果、277アミノ酸残基よりなるOpen Reading Frame (ORF)が見いだされた。本遺伝子は、ATGを開始コドンとし、TGAを終始コドンとする831 bpから構成されていた。DNA塩基配列から推定されるエステラーゼ蛋白質の分子量は、30,184であり、精製酵素のSDS-PAGEの結果(約30,000)とほぼ一致した。また、N末のアミノ酸配列(7アミノ酸残基)も精製酵素のそれと完全に一致したが、開始コドンに相当するメチオニンは欠落していた。これは、大腸菌のデフォルミラーゼとメチオニンアミノペプチダーゼの作用によるも

```

10      20      30      40      50      60
CCGGGGCGTGAGCGATGCCATCCTCGGTGACGACGACCTGCTGGCGCTATATCAAGGCA
70      80      90      100     110     120
TCGACAACGGCCGCTTCCCCGGTGGCGACCTGCTGGCCGACCGCTGGAAGCCGCCCA
130     140     150     160     170     180
AGGCCTGGTACCGGATGCGGACCGCGCCTGATCGCCTGGCACCGCTCCTACACGGCGCC
190     200     210     220     230     240
GGGCAGGCCGGAAGCATGGTGCAAGCCCACTGCAGTGCAGTACCACAAATCCGGCGCC
250     260     270     280     290     300
AAGCAAAATTCCTCCTATTCTCAATAGCTCACTTCGCTTCTGTCACACAGGAGACCCGAC
310     320     330     340     350     360
CATGAGCTATGTAACCACGAAGGACGGCGTACAGATCTTCTACAGGACTGGGGCCCGCG
MetSerTyrValThrThrLysAspGlyValGlnIlePheTyrLysAspTrpGlyProArg
370     380     390     400     410     420
CGATGCGCCGGTCCACTTCCACCACGGCTGGCCGCTCAGTGGCCGACGACTGGGACGC
AspAlaProValIleHisPheHisHisGlyTrpProLeuSerAlaAspAspTrpAspAla
430     440     450     460     470     480
GCAGATGCTGTTCTTCTCGCCACGGTTACCGCGTGGTGGCCACGACCGCGCGGCCA
GlnMetLeuPhePheLeuAlaHisGlyTyrArgValValAlaHisAspArgArgGlyHis
490     500     510     520     530     540
TGGCCGCTCCAGCCAGGTATGGGACGGCCACGACATGACCCTACGCGGACGACGTAGC
GlyArgSerSerGlnValTrpAspGlyHisAspMetAspHisTyrAlaAspAspValAla
550     560     570     580     590     600
CGCAGTGGTGGCCCACTGGGCATTTCAGGGCCCGTGCATGTCGGCCACTCGACCGGTGG
AlaValValAlaHisLeuGlyIleGlnGlyAlaValHisValGlyHisSerThrGlyIle
610     620     630     640     650     660
CGGTGAGGTGGTGGCTACATGGCCCGACACCCTGCAGACAAGGTGGCCAAGGCCGTGCT
GlyGluValValArgTyrMetAlaArgHisProAlaAspLysValAlaLysAlaValLeu
670     680     690     700     710     720
GATCGCCCGCTACCGCCGTTGATGGTGCAGACTCCCGATAATCCCGTGGCCTGCCCAA
IleAlaAlaValProProLeuMetValGlnThrProAspAsnProGlyGlyLeuProLys
730     740     750     760     770     780
ATCCGTTTTTCGACGGCTTCCAGGCCAGGTCCGACCAACCGCGCGAGTTCTACCGGGA
SerValPheAspGlyPheGlnAlaGlnValAlaSerAsnArgAlaGlnPheTyrArgAsp
790     800     810     820     830     840
TGTGCCGCGAGGCCGTTCTACGGCTACAACCGCCCGGTGTCGACGCGGAGGAGCAT
ValProAlaGlyProPheTyrGlyTyrAsnArgProGlyValAspAlaSerGluGlyIle
850     860     870     880     890     900
CATCGGCAACTGGTGGCCAGGGCATGATCGGTAGCCCAAGGCCATTACGATGGCAT
IleGlyAsnTrpTrpArgGlnGlyMetIleGlySerAlaLysAlaHisTyrAspGlyIle
910     920     930     940     950     960
CGTGGCGTTTTCCAGACCGACTTCACCGAAGACCTGAAGGGCATTACCCAGCCGGTGCCT
ValAlaPheSerGlnThrAspPheThrGluAspLeuLysGlyIleThrGlnProValLeu
970     980     990     1000    1010    1020
GGTGATGCATGGCGACGACGACCAGATCGTGGCGTATGAGAACTCCGGGCTGCTGTCGGC
ValMetHisGlyAspAspAspGlnIleValProTyrGluAsnSerGlyLeuLeuSerAla
1030    1040    1050    1060    1070    1080
CAAGCTGTGCCCAATGGCACACTGAAGACCTACCAGGGCTACCCGATGGCATGCCGAC
LysLeuLeuProAsnGlyThrLeuLysThrTyrGlnGlyTyrProHisGlyMetProThr
1090    1100    1110    1120    1130    1140
CACCCATGCCGATGTGATCAATGCGGATTTGCTGGCGTTTATCCGTAGCTGATGTGATCG
ThrHisAlaAspValIleAsnAlaAspLeuLeuAlaPheIleArgSer***
1150    1160    1170    1180    1190    1200
CCTGCACCGGCTCTTCGGGGCACTGGCAACACACCTCCCCAGGATTACCATGTCACG
1210    1220    1230    1240    1250    1260
CTTCTAGTGGCGCCCTTTGCCGCCCTTGCCCTCCCTGCCAAAACCCCATGCCCCTTC
1270    1280    1290    1300    1310    1320
GAACTCACCGTAGAACCCCTCACCTGCTGATCCTGGCCCTGGTCCGCTTCTGCGCCGCT
TTCATCGAT

```

Fig.7. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the esterase

Underline; amino acid sequence which was confirmed by the sequence of the purified esterase.

Broken line; putative promoter.

Double line; potential SD-sequence.

Box; putative active center.

Converting arrows; inverted repeats.

のと思われる^{41,42)}。構造遺伝子の上流には7 bpの間隔を置いて、大腸菌と同様のSD配列(AGGAGA)が存在し⁴³⁾、遺伝子の下流にはターミネーターと思われる inverted repeat が確認された。また、構造遺伝子の上流にはプロモーターと思われる配列が存在したが、大腸菌中での遺伝子発現はベクターへの遺伝子断片の挿入方向に左右されるため、大腸菌中ではプロモーターとしてはほとんど機能していないものと思われる。したがって、大腸菌中での発現は、ベクター由来の lacUV5 プロモーターよりの read through によるものと思われた。ORF中のG+C含量は64.3%であり、コドンのthird positionがGまたはCである確率は89%であった。この結果は *Pseudomonas* 属の典型的な遺伝子の塩基配列のパターンと一致している。

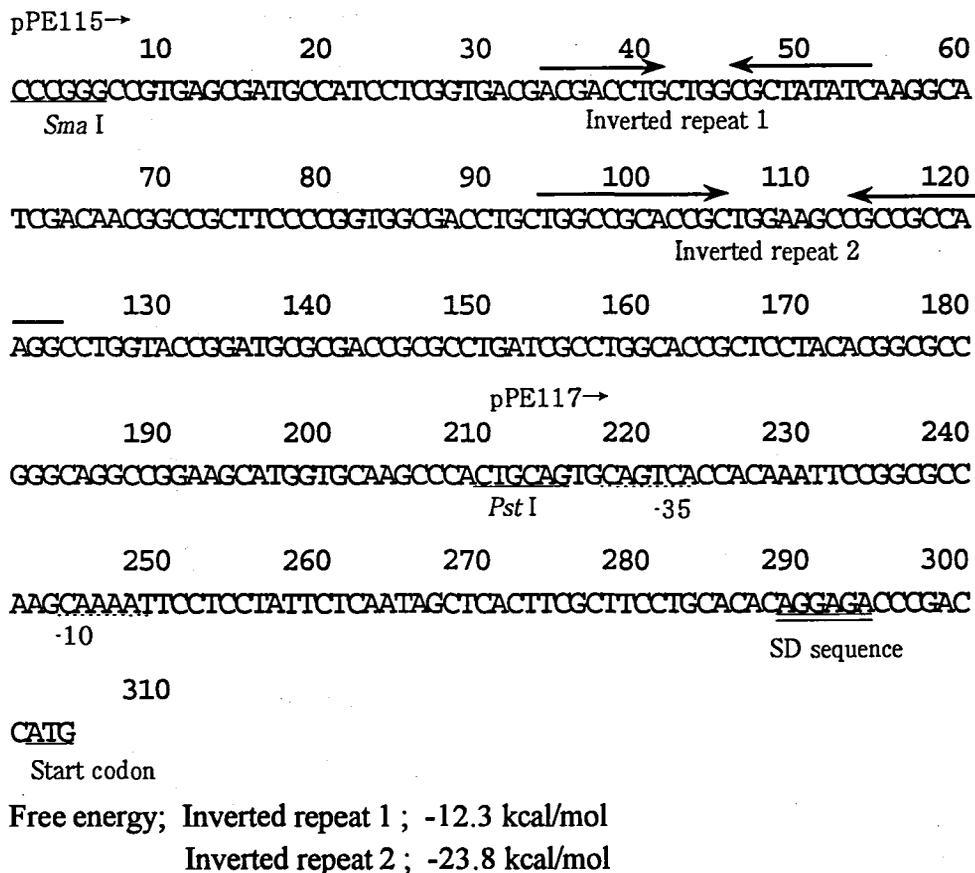


Fig. 8. Sequence analysis of untranslated region.

次に、pPE115の210 bp *Sma* I-*Pst* I断片を欠失したpPE117を作成した

(Fig. 8)。ちなみに、ベクター由来のlacUV5プロモーターよりスタートコードンまでの間隔は、それぞれ302 bpおよび92 bpであった。これらのプラスミドを*E. coli* JM109に導入し、エステラーゼ活性を測定したところ、pPE115プラスミドの場合と比べ、100倍程度本酵素活性が向上した。欠失した210 bpフラグメント中には安定したヘアピン構造を取りうる inverted repeat が2つ存在し、自由エネルギーはそれぞれ-23.8 kcal/mol および-12.3 kcal/molである⁴⁴⁾。これらの領域を取り除くことにより、遺伝子発現の効率が向上したものと推定された。mRNAの二次構造がその安定性及び遺伝子発現構造に影響を及ぼすことはよく知られているが⁴⁵⁻⁴⁸⁾、これらの配列が、実際に*in vivo*で生理的機能を持っているかどうかは不明である。MR-2068株、宿主大腸菌および各種プラスミドを導入した大腸菌のエステラーゼ活性をTable 5にて比較した。

Table 5. Esterase Activity of Each Strain

| Strain | Esterase activity (U)* |
|-----------------------------|------------------------|
| <i>P. putida</i> MR-2068 | 0.267 |
| <i>E. coli</i> JM109 | 0 |
| <i>E. coli</i> JM109/pPE101 | 0.462 |
| <i>E. coli</i> JM109/pPE115 | 0.534 |
| <i>E. coli</i> JM109/pPE117 | 55.5 |

* Esterase activities were measured as described previously.

U; units = μ mole / min / mg dry cell.

第3節 考察

これまでに知られている微生物由来のエステラーゼは、セリン残基を活性中心に持つセリンプロテアーゼファミリーに属するものが多い。これらの酵素は、活性中心にGly-X-Ser-X-Glyという保存された配列を持つことが知られている (Table 6)⁴⁹⁾。本酵素遺伝子の塩基配列から推定されたタンパク質のアミノ酸配列中にもこの保存配列が存在することから、セリン⁹⁷が本酵素の活性中心であるかも知れない。

Table 6. A conserved sequence among lipolytic enzymes.

| Lipase | Substrate binding site |
|-----------------------------------|--|
| Microorganisms | |
| <i>Pseudomonas fragi</i> | ⁷⁶ RVNLIGHSQGA ⁸⁶ |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ⁴⁰⁵ KVHLVGHSMGG ⁴¹⁵ |
| <i>Staphylococcus hyicus</i> | ³⁶² PVHFIGHSMGG ³⁷² |
| <i>Rhizomucor miehei</i> | ¹³⁷ KVAVTGHSLGG ¹⁴⁷ |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | ¹⁹⁹ DVLVSGHSLGG ²⁰⁹ |
| <i>Pseudomonas putida</i> MR-2068 | ⁹⁰ GAVHVGHSTGG ¹⁰⁰ |
| Animals | |
| Rat hepatic lipase | ¹⁴⁰ KVHLIGYSLGA ¹⁵⁰ |
| Human hepatic lipase | ¹³⁸ HVHLIGYSLGA ¹⁴⁸ |
| Bovine lipoprotein lipase | ¹²⁷ NVHLLGYSLGA ¹³⁷ |
| Porcine pancreatic lipase | ¹⁴⁵ NVHVI GHSLGS ¹⁵⁵ |
| Human lipoprotein lipase | ¹²⁵ NVHLLGYSLGA ¹³⁵ |

興味深いことに、本遺伝子のDNA塩基配列のホモロジー検索の結果、*P. putida* MR-2068由来のエステラーゼは、*Pseudomonas pyrocinia* の生産するchloroperoxidase (CPO)とアミノ酸レベルで約70%という非常に高いホモロジーを示した (Fig. 9)⁵⁰⁾。ちなみに、*P. pyrocinia* は、含ハロゲ

[GENETYX : Amino Acid Sequence Homology Data]

1st Amino Acid Sequence

File Name : B:ESTAA.PTN
Sequence Size : 277

2nd Amino Acid Sequence

File Name : B:CPO-P.NUC
Sequence Size : 278

Unit Size to compare = 2

Homology Score : 1048
[70.1% / 278aa]

```

1' MSYVTTKDG VQIF YKDWGPRDAPVIHFHHGWPLSADDWDAQMLFFLAHGYRVVAHDRRGH
*.*****.*.*****.**. * *****.*****.....*****.*****
1" MPYVTTKDNVEIF YKDWGPKDAQPIVFHHGWPLSGDDWDAQMLFFVQKGYRVI AHDRRGH

61' GRSSQVWDGHDM DHYADDVA AVVAHLGIQGAVHVG HSTGGGEVVRYMARH--PADKVAKA
***.** *****.*.***. *.....**.* *****.***.* **..****
61" GRSAQVSDGHDM DHYAADAFAVVEALDLR NAVHIGHSTGGGEVARYVAKHGQPAGRVAKA

119' VLIAAVPPLMVQTPDNP GGLPKSVFDGFQAQVASNRAQFYRDVPAGPFYGYNRP GVDASE
**..*****.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.*
121" VLVSAVPPLMLKTESNPEGLPIEVFDGFRKALADNRAQFFLDVPTGPFYGFNRAGATVHQ

179' GIIGNWWRQGMIGSAKAHYDGI VAFSQTDFTE DLKGITQPVLVMHGDDDQIVPYENSGLL
*.* ***** ***** **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.*
181" GVIRNWRQGMESAKAHYDGIKAFSETDQTE DLKSITVPTLV LHGEDDQIVPIADAALK

239' SAKLLPNGTLKTYQGYPHGMPTTHADV INADLLAFIRSX
* **.* ***** **.* **.* **.* **.* **.* **.*
241" SIKLLQNGTLKTYPGYSHGMLTVNADVLNADLLAFVQA

```

Fig. 9. Amino acid sequence homology between esterase and CPO-P.

ン抗生物質であるピロールニトリンの生産菌であり、CPOはその生合成経路におけるハロゲン化に関与しているとされている^{51,52)}。

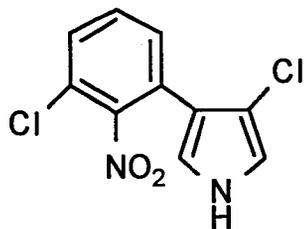
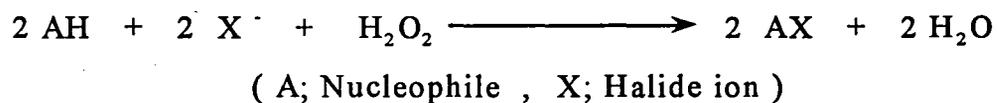


Fig. 10. Chemical formula of pyrrolnitrine.

自然界におけるハロゲンの有機化合物への導入は、過酸化水素に依存することが知られており、この反応に関与する酵素はハロパーオキシダーゼと呼ばれ、次の反応を触媒する。



酵素として分類の異なる酸化還元酵素と加水分解酵素が高い相同性を示すことは興味深い。

第2章 エステラーゼの精製と性質

第1節 組換え大腸菌を用いたエステラーゼの精製

E. coli C600/pPE117を50 $\mu\text{g/ml}$ のampicillinを含むLB培地で培養し、得られた菌体より無細胞抽出液を調製した。無細胞抽出液より、硫酸アンモニウム（硫安）沈殿、DEAE Sephadex A-25カラムクロマトグラフ (Fig. 10)、Sephadex G-100カラム (Fig. 11)によるゲルろ過により、電気泳動的に単一バンドとなるまで精製した。各ステップの精製収率及び比活性はTable 7に示した。

Table 7. Purification of Esterase from Recombinant *E. coli* .

| Step | Total protein (mg) | Total activity (U)* | Specific activity (U/mg) | Yield (%) | Fold |
|-----------------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------------|--------------|------|
| Cell-free extract | 1400 | 79800 | 57 | 100 | 1 |
| Ammonium sulfate precipitation | 660 | 49500 | 75 | 62 | 1.3 |
| DEAE-Sephadex A-50 | 320 | 48800 | 160 | 61 | 2.7 |
| Sephadex G-100 | 210 | 45500 | 220 | 57 | 3.8 |

* U = μ mole /min /mg protein

第2節 エステラーゼの諸性質

1) 分子量及び等電点

精製酵素のゲルろ過による分子量は約57,000、SDS-PAGEによる分子量は約30,000であることから本酵素は二量体である可能性が高い (Fig. 12)。

また、本酵素は等電点電気泳動の結果、約3.9の pI 値を示した (Fig. 12)。

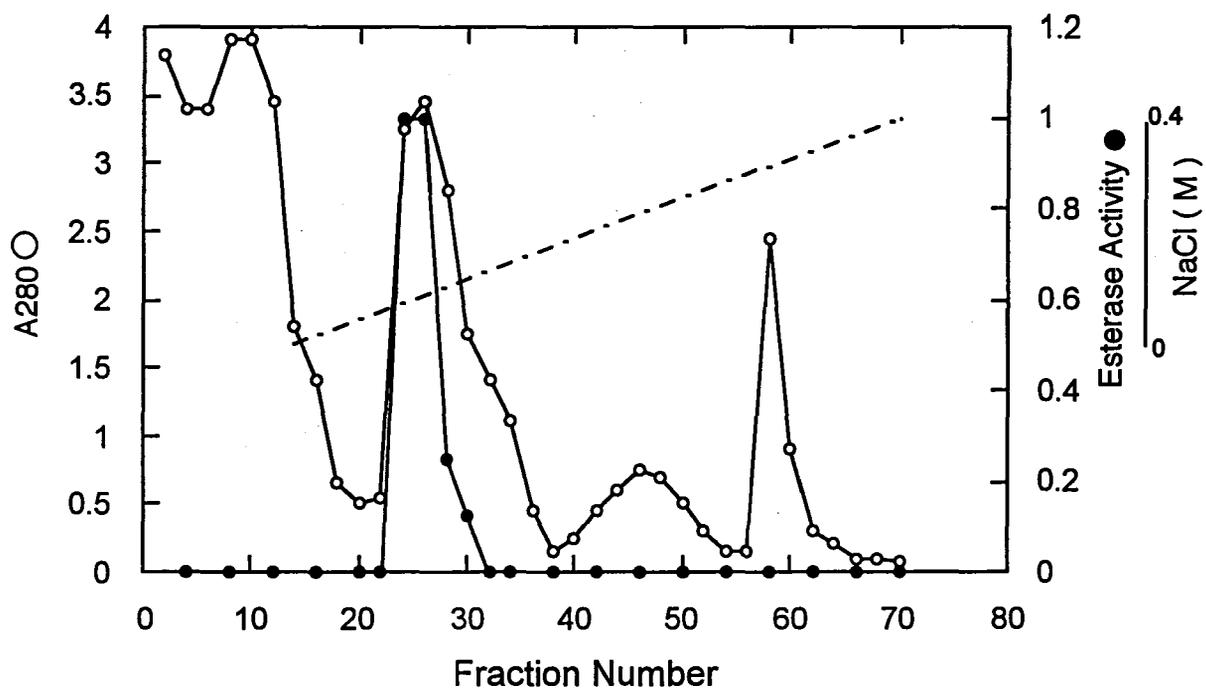


Fig.10. Elution profile of DEAE-Sephadex column chromatogram.

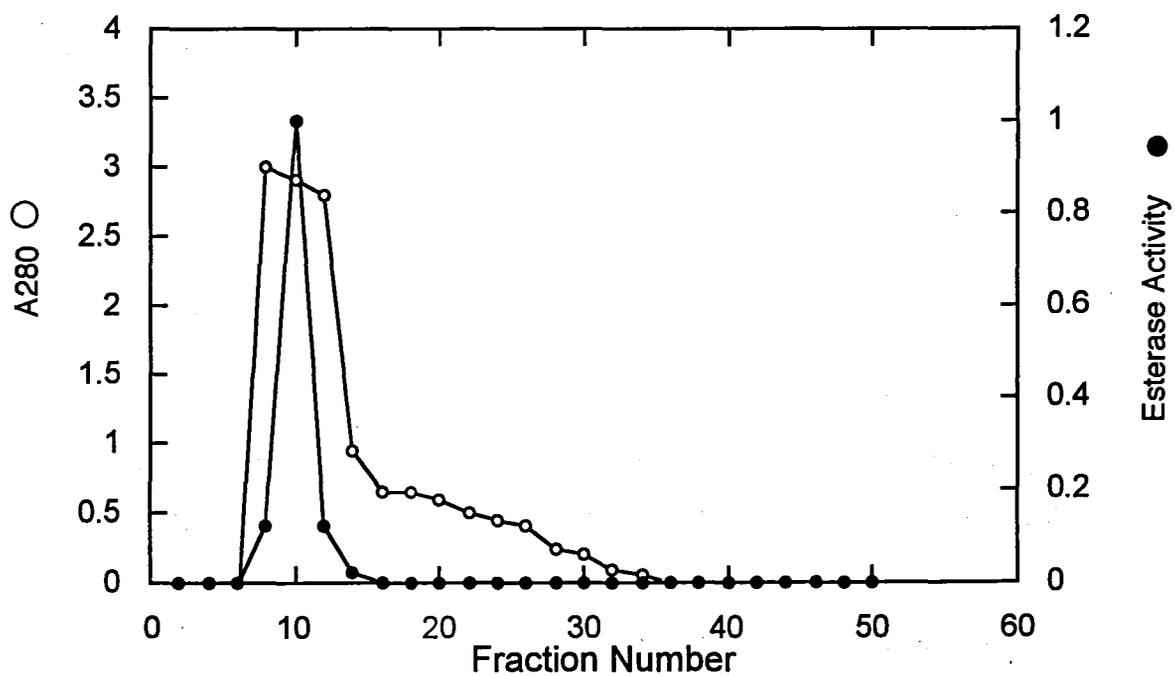


Fig.11. Elution profile of Gel permeation column chromatogram.

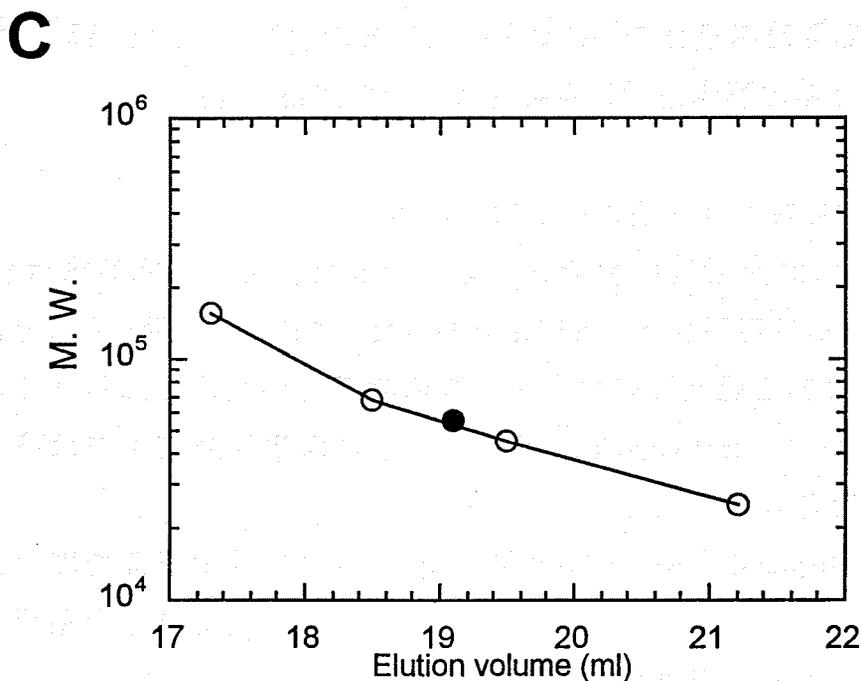
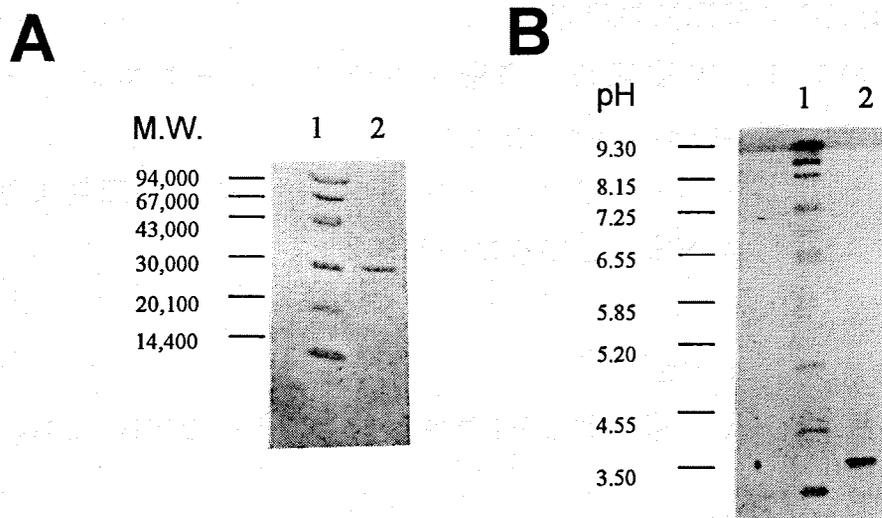


Fig. 12. SDS-PAGE (A), IEF-PAGE (B) and gel permeation (C) of the purified esterase.

(A) Purified esterase was analyzed by SDS-PAGE (20% gel).

Lane 1, molecular weight markers; lane 2, purified esterase.

(B) Purified esterase was subjected to a PhastGel IEF 3-9, using PhastSystem (Pharmacia). Lane 1, pI marker proteins; lane 2, purified esterase.

(C) Estimation of a molecular weight of the purified esterase was done by HPLC gel filtration with TSK-gel G4000SW and G3000SW columns (7.8 x 450 mm) tandemly connected with each other in 0.2 M phosphate buffer (pH 6.8) at a flow rate of 1 ml/min, ○; marker proteins, ●; esterase.

2) N末端アミノ酸配列の決定

精製酵素のアミノ末端配列を自動プロテインシーケンサーにて Ser-Tyr-Val-Thr-Thr-Lys-Asp と決定した。

この結果は、クローン化したエステラーゼ遺伝子の塩基配列より推測されるアミノ酸配列のN末端と完全に一致した。

3) 至適pH及びpH安定性

本酵素反応における至適pHは6~7の中性領域であった(Fig. 13)。

4) 至適温度及び熱安定性

本酵素の反応至適温度は70℃であった。また、60℃、1時間の熱処理をしてもほとんど酵素活性は保存されていた(Fig. 14)。

5) 各種化学物質の酵素活性に及ぼす影響

EDTAの存在は酵素活性に影響を与えなかった。また、本酵素はSDS, LBSなどの界面活性剤存在下でも安定であった。Table 8に示したように、酵素活性が100%を超えるのはエステルの相溶性のためと思われる。また、メタノールやTetrahydrofuran(THF)などの水溶性溶媒中ではその活性が著しく阻害された(Table 8)。

Diisopropyl fluorophosphate(DFP)の酵素活性に及ぼす影響を調べた。即ち、酵素溶液に1 mMのDFPを添加し、室温で1時間処理した結果、本酵素活性は、ほとんど阻害されなかった。

6) 各種金属イオンの酵素活性に及ぼす影響

本酵素は、試験したほとんどの金属イオン存在下での著しい阻害は認められなかった(Table 9)。

7) 基質特異性について

本酵素の各種エステルに対する基質特異性を調べた。基質となるのは比較的鎖長の短い脂肪族カルボン酸のメチルエステルにはほぼ限定される

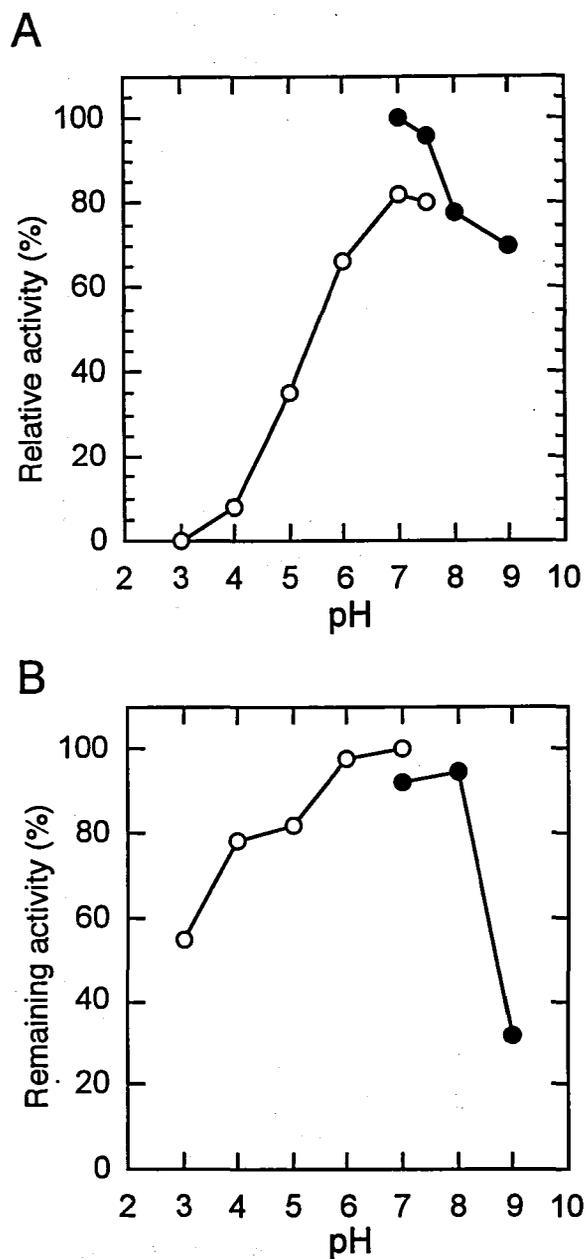


Fig. 13. Effects of pH on the esterase activity and stability. (A): Effects of pH on the esterase activity were measured. Standard assay conditions were used except for the buffer, for which McIlvaine buffer (pH 3.0-7.5) (O) and Tris/HCl buffer (pH 7.0-9.0) (●) were used. (B): Effects of pH on the esterase stability were measured. The remaining esterase activity was assayed under the standard conditions after incubating the enzyme solution in buffer solutions described above at 4 °C for 24 h.

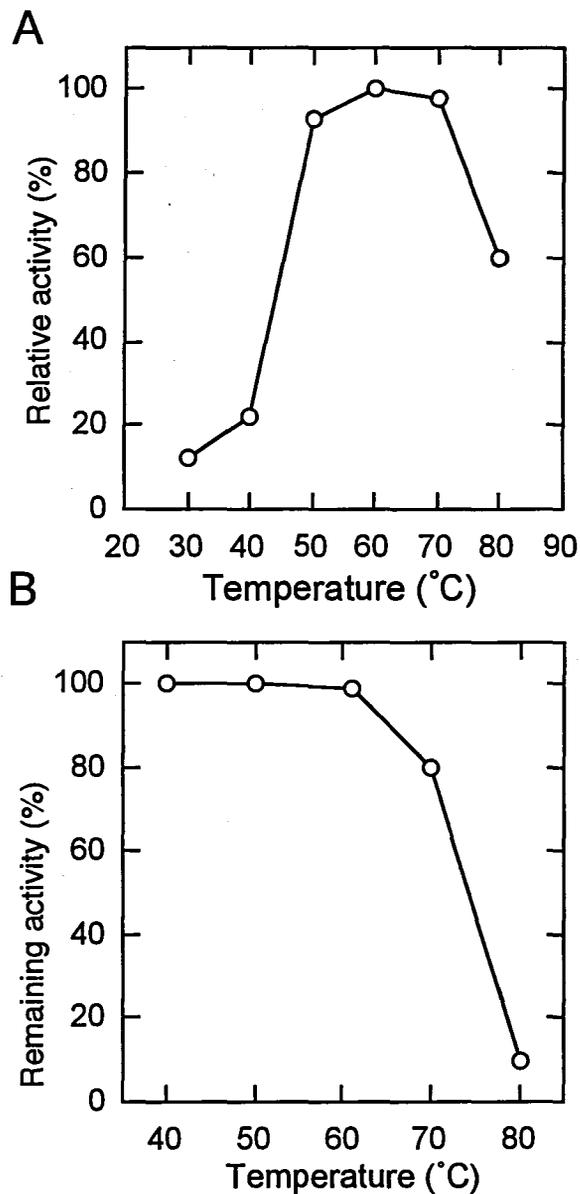


Fig. 14. Effects of temperature on the esterase activity and stability.

(A): Effects of temperature on the esterase activity were measured. Standard assay conditions were used except for temperature.

(B): Effects of temperature on the esterase stability were measured.

The remaining esterase activity was assayed under the standard conditions after incubating the enzyme solution at various temperatures shown in the figure for 1 h.

Table 8. Effects of various reagents on the esterase activity.

| Reagents | Concentration (%) | Relative activity (%) |
|--|-------------------|-----------------------|
| Sodium dodecyl sulfate | 0.4 | 98 |
| Lauryl benzene sulfate | 0.4 | 124 |
| Tetra- <i>n</i> -butylammonium bromide | 0.4 | 117 |
| Sodium cholate | 0.4 | 110 |
| Sodium deoxycholate | 0.4 | 113 |
| Sorbitan monostearate | 0.4 | 92 |
| Tween 80 | 0.4 | 113 |
| Triton X-100 | 0.4 | 111 |
| EtOH | 50 | 4 |
| MeOH | 50 | 25 |
| Acetone | 50 | 10 |
| DMF | 50 | 15 |
| THF | 50 | 0 |
| <i>t</i> -BuOH | 50 | 44 |
| None | - | 100 |

The esterase activity was determined in the standard assay mixture supplemented with various compounds at a concentration indicated and expressed as a percentage of the activity relative to that in the absence of the compounds.

Table 9. Effects of metal ions on the esterase activity*.

| Metal salt | Relative activity (%) |
|-------------------|-----------------------|
| KCl | 94 |
| NaCl | 99 |
| FeCl ₃ | 71 |
| AlCl ₃ | 65 |
| CoCl ₂ | 92 |
| CaCl ₂ | 73 |
| MnSO ₄ | 74 |
| CuSO ₄ | 100 |
| MgSO ₄ | 99 |
| NiCl ₂ | 97 |
| ZnSO ₄ | 93 |
| CdCl ₂ | 106 |
| SnCl ₂ | 113 |
| None | 100 |

* Esterase activities were assayed under the standard conditions containing 1 mM metal salts as final concentration and expressed as a percentage of the activity level in the absence of the metal salts.

ことがわかった(Table 10)。

Table 10. Substrate specificity of the esterase.

| Substrates | Relative activity (%) |
|---|-----------------------|
| Methylacetate | 105 |
| Methylpropionate | 123 |
| Methylbutyrate | 46 |
| Methylcaproate | 65 |
| Methylcaplyrate | 57 |
| Methyldecanoate | 7 |
| Methylaurate | 0 |
| Triacetin | 0 |
| Phenylacetate | 0 |
| Methylbenzoate | 0 |
| <i>n</i> -Propylacetate | 0 |
| Methylactate | 103 |
| Methylmethacrylate | 55 |
| Ethylmethacrylate | 0 |
| Methyl DL- β -acetylthioisobutyrate | 100 |

The esterase activity was determined in the standard assay mixture containing DL-ester or various esters indicated at a concentration of 50 mM, and expressed as a percentage that of the reference ester (Methyl DL- β -acetylthioisobutyrate) taken as 100 %.

8) kinetics

DL-エステルに対するエステラーゼ活性の K_m 及び V_{max} を測定した。測定方法は、Michaelis-Menten法に従った。 K_m は9.52 mMであり、 V_{max} は0.238 $\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{g}$ proteinであった(Fig. 15)。

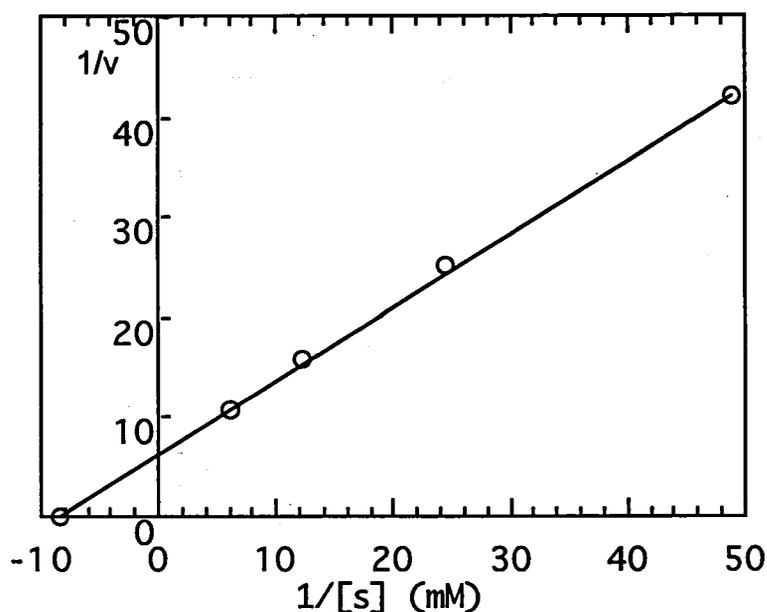


Fig. 15. Kinetics study of esterase activity.

9) ハロパーオキシダーゼ活性について

本酵素は、エステラーゼ活性を指標に解析を進めてきた酵素であるが、第1章に述べたように、アミノ酸配列の解析結果、ハロパーオキシダーゼと高い相同性を示すことが明らかとなった。そこで、精製酵素を用いてハロパーオキシダーゼ活性を測定した。測定方法は、モノクロロジメドン(MCD)を用いたアッセイ法に従った。⁵³⁾

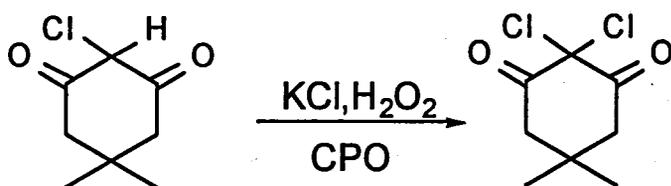


Fig. 16. Haloperoxidase assay with Monochlorodimedone.

本酵素はMCDのクロル化活性はなかったが、NaBrを基質としてブロム化を触媒することがわかった(Fig. 17)。NaBrによるMCDのブロム化活性は、3.2 units/mg proteinであり、NaBrに対する K_m 値は、118 mMであった(Fig. 18)。

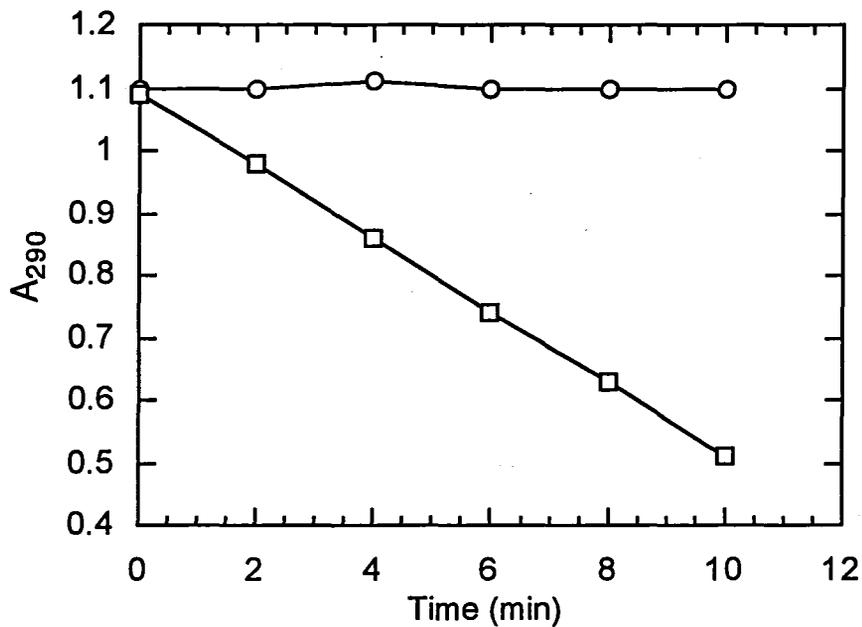


Fig. 17. Haloperoxidase activity of the esterase.

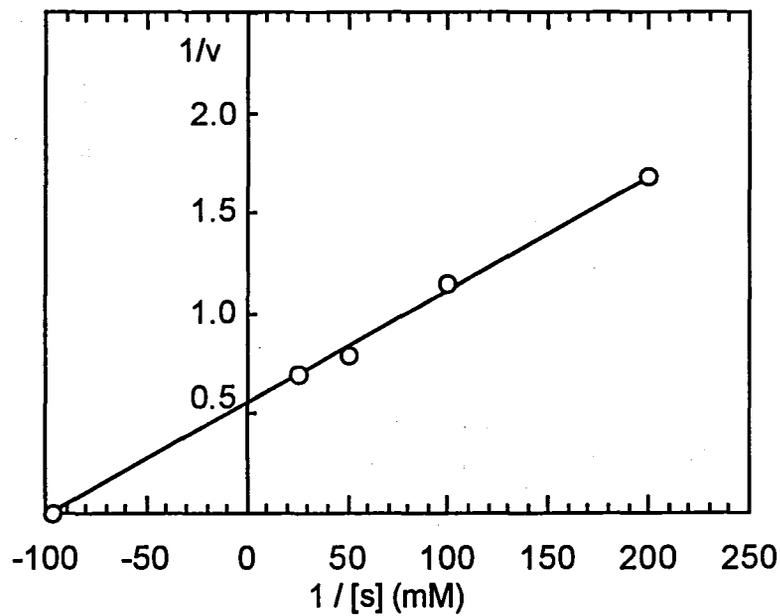


Fig. 18. K_m of haloperoxidase activity for NaBr.

1 0) ハロパーオキシダーゼ活性の至適 pH

ハロパーオキシダーゼ活性の至適 pHはpH 4.8付近であることがわかった(Fig. 19)。

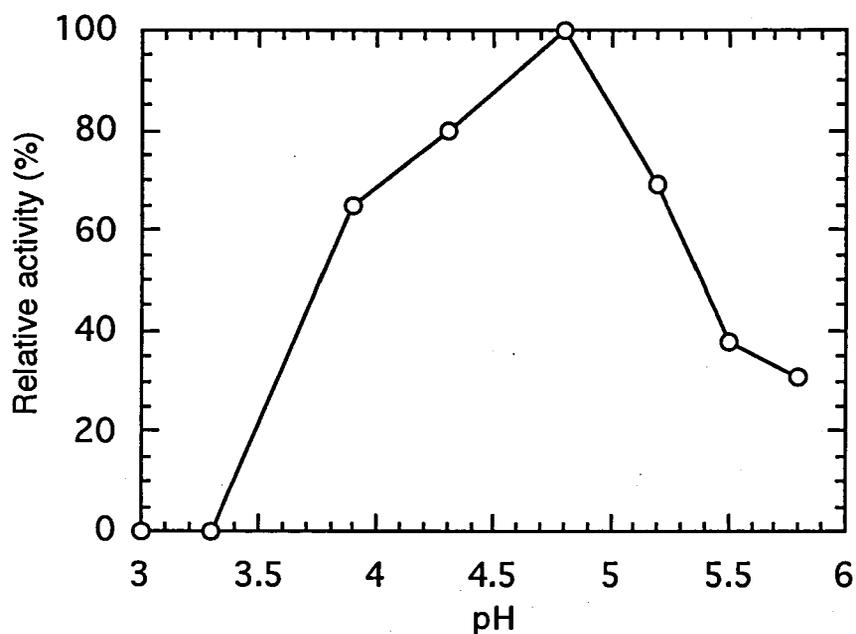


Fig. 19. Effects of pH on haloperoxidase activity.

1 1) ハロパーオキシダーゼ活性及びエステラーゼ活性の熱失活について

2種類の酵素活性が1つの酵素タンパクに由来することを証明する場合、両酵素活性の熱失活プロフィールが重要である。そこで、75 °C処理による酵素活性の失活を測定した。その結果、エステラーゼ活性、ハロパーオキシダーゼ活性ともにほぼ同様の失活プロフィールを示した(Fig. 20)。従って両酵素活性は1つの酵素タンパクに由来すると結論した。

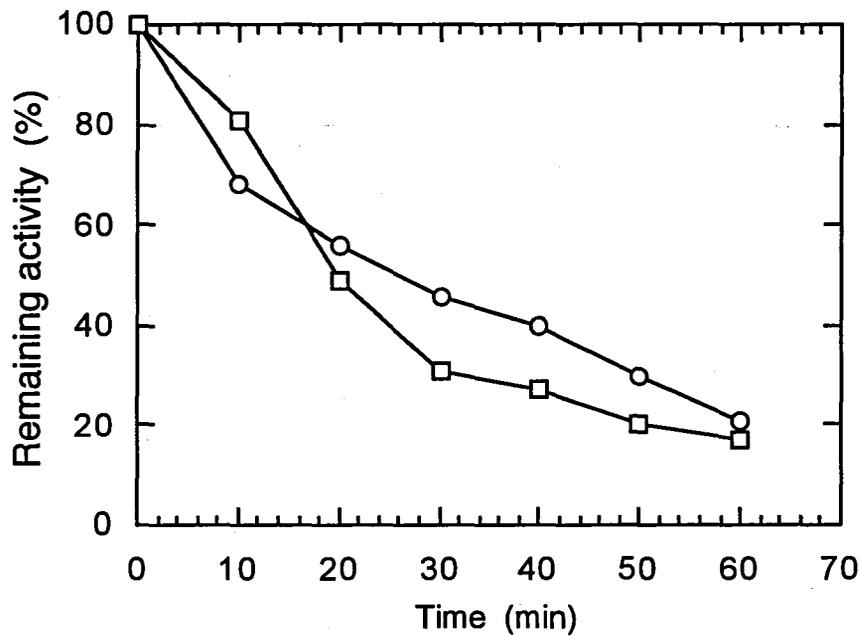


Fig. 20. Course of thermal inactivation (75 °C) of both activities

- : esterase activity
- : haloperoxidase activity

1 2) 各種阻害剤のハロパーオキシダーゼ活性に及ぼす影響

10 μ M KCN存在下で酵素活性を測定したところ、ハロパーオキシダーゼ活性は約50%阻害された。同様に0.18 mM KF存在下では、約75%阻害された。また、10 μ M DAT存在下では、約80%阻害された。

第3節 考察

本酵素は、エステル不斉加水分解酵素として自然界から単離した酵素であり、その諸性質よりセリンエステラーゼファミリーの1つであるカルボキシルエステラーゼ(EC.3.1.1.1)であると推定される。これまでに知られている多くのプロテアーゼ、リパーゼ、エステラーゼと同様に、アミド結合またはエステル結合の加水分解点として求核アミノ酸残基としてのセリン、酸性アミノ酸残基としてのアスパラギン酸またはグルタミン酸、ヒスチジンよりなるcatalytic triadを活性中心とすることが特徴であり、その活性中心であるセリン残基周辺にはGly-X-Ser-X-Glyといった共通保存配列が存在する。本酵素にもセリン97 (N末端から97番目のセリン残基) 付近にこの配列が存在することから、本酵素が典型的なセリンエステラーゼであり、セリン残基の水酸基の求核攻撃によりエステル結合が加水分解されるものと推測される。セリンエステラーゼは、DFPなどの有機リン化合物により著しく阻害されることが知られている。しかしながら、本エステラーゼは、DFP処理によりほとんど失活しなかった。これは、第4章で述べるように酵素の活性中心領域がrigidな構造を持つため、活性中心であるセリンがDFPによりマスクされないためではないかと思われる。

本エステラーゼは中性～弱アルカリ付近に至適pHを持ち、中性領域で安定であった。反応至適温度は60～70℃であり、中温菌由来の酵素であるが高い耐熱性を持つ点が興味深い。基質となるエステルは、比較的鎖長の短い脂肪族カルボン酸のメチルエステルにほぼ限定されるため、酵素の分類上、カルボキシルエステラーゼ (EC3.1.1.1)と思われる。

遺伝子のDNA塩基配列より推測されるアミノ酸配列は、*P. pyrrocinia* ATCC15958由来のクロルパーオキシダーゼとアミノ酸配列レベルで70%のホモロジーを示し、本エステラーゼにもハロパーオキシダーゼ活性があることが示唆された。実際にMCDを用いたアッセイにより、過酸化水素、臭素イオン存在下で、ハロパーオキシダーゼ活性を示すことが確認された。また、精製酵素の分子量、ダイマー構造、等電点、至適pH (ハ

ロパーオキシダーゼ活性について)などの酵素学的諸性質もほぼ一致し、熱失活プロフィールも同様であることから、両酵素は類縁酵素であると考えられる。⁵¹⁾

また、近年報告された *Streptomyces lividans* TK64 由来のクロルパーオキシダーゼ (CPO-L) ともアミノ酸レベルで 70 % のホモロジーを示すことがわかった。⁵⁹⁾

本研究で得られた *P. putida* MR-2068 由来のカルボキシルエステラーゼが *P. pyrrocinia* ATCC 15958 由来のクロルパーオキシダーゼと高い相同性を示し、両活性を示すことは、自然界における酵素の多様性という観点から考えると、興味深い結果と言える。また、エステラーゼ活性の至適 pH が中性領域であるのに対して、ハロパーオキシダーゼ活性の至適 pH は pH 4.8 付近である。このことは、pH 環境の違いにより両酵素活性が制御されている可能性を示唆するものである。

多くのカビや細菌がハロゲン含有化合物を生産し、自然界におけるハロゲン関連化合物の代謝に深く関わっていることが知られている。⁶⁰⁻⁶³⁾ そのひとつとして、*Streptomyces* 属の産生する抗生物質の中にもハロゲン原子を含有するものが知られている。例えば、*S. venezuelae* の産生する chloramphenicol や、*S. aureofaciens* の産生する chlortetracycline などにはクロル原子を含有する。これらの抗生物質の生合成経路についてはよく研究されているもののハロゲン化のメカニズムに関する情報は乏しい。抗生物質のクロル化に関与するとされるクロルパーオキシダーゼの単離が試みられているが、単離された酵素にブロムパーオキシダーゼ活性は確認されるものの、クロル化に関しては確認が困難な状況である。近年、tetracycline のクロル化に関与する可能性のある酵素遺伝子がクローニングされた。⁶⁴⁾

ハロゲンイオンの取り込みにはハロパーオキシダーゼが関与していると考えられており、酵素化学的には鉄-プロトポルフィリン IX を補欠因子として要求するヘム型酵素と非ヘム型金属酵素及び非金属酵素に分類される。近年相次いで報告されている非ヘム型酵素は、有用物質の生産に応用できる可能性を秘めていることから、詳細な研究が望まれる。⁶⁵⁾

興味深いのは、これらの非ヘム型ハロパーオキシダーゼに共通してセリンエステラーゼモチーフが存在する点であり、弱いながらもエステラーゼ活性の認められているものもある。

Pelletierらによると、*P. fluorescens* SIK W1由来のアリルエステラーゼは、*S. aureofaciens* ATCC 10762由来のブロムパーオキシダーゼ(BPO-A1)とアミノ酸レベルで68.8%のホモロジーを示し、エステラーゼ活性と共にハロパーオキシダーゼ活性も示した⁵⁴⁾。さらに、セリンエステラーゼの活性中心であるcatalytic triadを形成するセリン、アスパラギン酸、ヒスチジンに変異を導入するとハロパーオキシダーゼ活性も失われた⁵⁵⁾。従って、ハロパーオキシダーゼ活性の発現には、セリンエステラーゼの活性中心であるcatalytic triad motifが関与していることが示唆される。自然界における酵素の多様性を示す例として興味深い。

多くのセリンヒドロラーゼはその本来の加水分解活性のほかに非天然基質である過酸化水素(H_2O_2)を基質とすることが知られている^{56,57)}。*Mucor miehei*, *Pseudomonas* sp., *Candida antarctica* 由来のリパーゼを用いた H_2O_2 存在下での過酸(peroxycarboxylic acids, peracids)生成はよく知られている⁵⁸⁾。

エステラーゼによるハロゲン化の反応メカニズムは、リパーゼにより触媒される H_2O_2 とカルボン酸の反応と同様のメカニズムと考えられている。すなわち、第一段階として H_2O_2 とカルボン酸より過酸が生成し、第二段階として過酸によりハロゲン原子が酸化され、ハロゲン化に適した分子種として Br_2 の生成が続いて起こるといえる⁵⁵⁾。Pelletierらによれば、*P. fluorescens* SIK W1由来のアリルエステラーゼやハロパーオキシダーゼによるハロゲン化は酢酸(アセテートバッファー)に強く依存するという。これは、ハロゲン化のステップに過酸(過酢酸)生成が含まれていることを示唆している。次のステップとして、ハライドイオンが過酢酸により酸化され、ハロゲン化に適した分子種として Br_2 が生成するものと推測されている。

このように、一つの酵素が全く異なる2種類の酵素活性を示し、周囲の環境により両酵素活性がコントロールされている可能性が示唆される

結果は、生体触媒の多様性といった観点で興味深いものである。これらの2つの酵素活性が生体内で実際にどのような役割を果たしているかは不明であり、その解明が望まれる。

第3章 酵素法による D-(-)- β -Acetylthioisobutyric acid (DAT)工業生産技術の開発

第1章で分子育種された*E. coli* C600/pPE117 (MR-2103と命名)は、親株と比較して200倍以上のエステラーゼ活性を示した。そこで、本菌株を実生産に用いるためのプロセスの開発を試みた。

P. putida と *E. coli* 間では、自然界においても遺伝子交換を行っていることが知られている。従って、大腸菌における *P. putida* の遺伝子発現は、ナチュラルオカレンス（自然界において遺伝子交換が非人為的に起こりうる）に相当するため、基本的には遺伝子操作微生物のあらゆる法規制の対象外と判断される。本件においては安全性を重視し、通産省「組み換えDNA技術工業化指針」の、GILSP (Good Industrial Large Scale Practice) に準拠した生産設備、取り扱いを実施しており、通産省より工業化製造承認を取得した。酵素は菌体内に存在するため、培養菌体を「bag of enzyme」として酵素反応工程に使用可能である。酵素反応終了液より未反応のエステルを抽出除去した後に、酸析、抽出、蒸留精製を経て目的物を得ることができる。形質転換株を用いて生産したDATは、光学純度、化学純度共に親株と同等であり、副反応等は認められなかった。

第1節 組換え体の保存培養法

1. 1. ストックカルチャーの調製

MR-2103株をLB Agarプレート上に接種し、コロニーを形成させた。このコロニー中から、エステラーゼ高生産株を選択し、3 mlのampicillin (50 μ g/ml)を含むLB培地に接種し、37 $^{\circ}$ Cで3時間振とう培養した。OD_{610 nm}が0.6-0.8に達したとき、その培養液1 mlをampicillin (50 μ g/ml)を含むLB培地100 mlに接種し、さらに37 $^{\circ}$ Cで3時間振とう培養した。その培養液のOD_{610 nm}が0.6-0.8に達したとき、その培養液に殺菌済みグリセロールを20 g加え、3 mlずつバイアルに分注し、-80 $^{\circ}$ Cにて保存し

た。

1. 2. スケールアップ培養

MR-2103株のストックカルチャー (-80 °C保存) 3mlをampicillin (50 µg/ml)を含むLB培地300 mlに接種し、37 °Cで3時間振とう培養し、種培養液とした。種培養液600 ml (300 ml x 2)を10 µg/mlのampicillinを含むLB培地60 Lに接種し、37 °Cで3時間培養し、前培養液とした。前培養液を700 LのSOB培地を含む1 m³発酵装置に植菌し、37 °Cで20時間培養した。培養終了後、連続遠心分離器で濃縮し、菌体濃縮液を-40°Cで冷凍保存し、酵素源として利用した。培養の経時変化をFig. 21に示した。

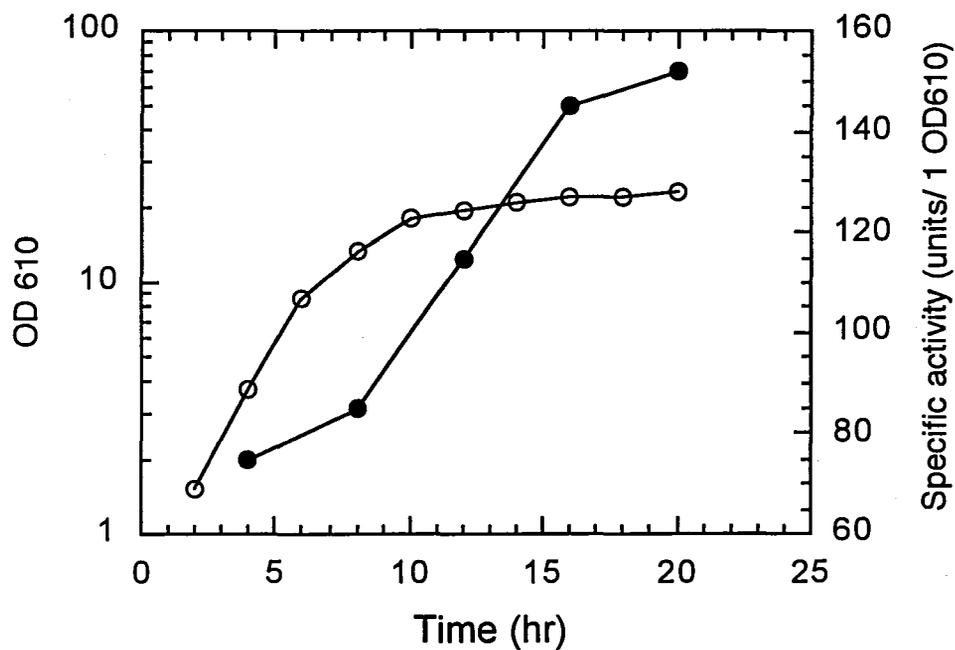


Fig. 21. Time course in esterase production.

○ : OD610

● : Specific activity

1. 3. 酵素活性の評価

培養終了液10 mlを80,000 rpm x 5 minの遠心分離により集菌し、イオン交換水で洗浄し、再度遠心分離により集菌し、10 mlのイオン交換水に懸濁した。105 °Cの乾燥機で5時間乾燥した後、重量を測定し、菌体乾燥重量(dry cell weight)とした。

培養終了液を酵素活性評価に用いた。190 gの50 mM リン酸バッファー(pH 7.0)に10 gのDL-エステルを添加し、培養液 0.5 ml を加えた。反応液のpHをpHコントローラーを用いてpH 7.0に維持し、初期1時間における酵素反応で消費された0.1N NaOHより、次式によって酵素活性を求めた。

$$\text{酵素活性 Unit (} \mu \text{ mole / min / mg dry cell)} = \frac{a / 600}{b}$$

a; 1時間に消費された0.1N NaOH (ml)

b; 菌体乾燥重量 (g)

第2節 酵素法によるDATの製造

2. 1. 酵素反応工程

50 mMリン酸バッファー(pH 7.0)700 mlに300 g(1.70 mole)のDL-エステルを仕込み、45 °Cに昇温し、pHを調整した。菌体懸濁液(固形分8.7%、比活性46.8 units) 7.2 gを添加し、酵素反応を開始した。反応中、pHコントローラーを用いて10%(w/w) NaOHを連続添加し、pHをコントロールした。8時間後、355 gの10%(w/w) NaOH(0.889 mole)が消費された時点で酵素反応を終了した。アルカリ添加量の経時変化をFig. 22に示した。

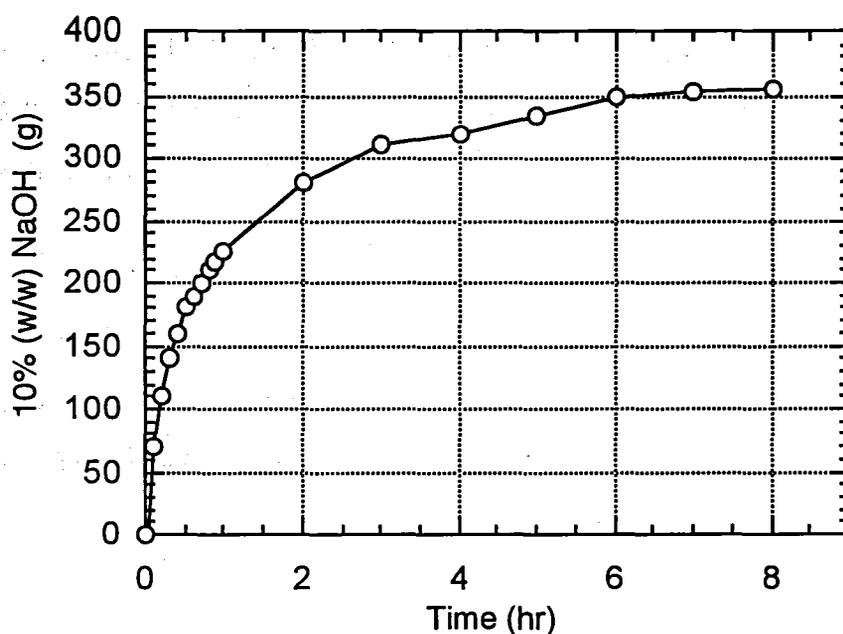


Fig. 22. Course of enzymatic reaction

2. 2. 抽出精製工程

酵素反応終了液に214 gの*n*-ヘキサンを加え、未反応のL-エステルを抽出した。抽出後、水相に48.3 gの濃硫酸を添加し、pH 2.0に調整した。水相を560 gのメチルイソブチルケトンで2回抽出し、有機相をあわせて濃縮し、140.8 gの粗DATを得た。さらに蒸留精製し、110 gの精製DATを得た。得られたDATのHPLCクロマトグラムをFig. 23に示した。光学純度の決定は、ジアステレオマー法によった。

化学純度 >99% (HPLC)

光学純度 98.2% e.e. (diastereomer, GC)

START
00/00/00

06:51:03

8.54

10.695

CHROMATOPAC C-R6A
SAMPLE NO 0
REPORT NO 989

FILE 1
METHOD 41

| PKNO | TIME | AREA | MK | IDNO | CONC | NAME |
|-------|--------|-------|----|------|------|------|
| 1 | 10.695 | 86377 | | | 100 | |
| TOTAL | | 86377 | | | 100 | |

Fig. 23. HPLC chromatogram of DAT.

column: TOSOH ODS 120 A

mobile phase: H₂O / MeOH / 85 % H₃PO₄ = 55 / 45 / 0.1

flow rate: 0.7 ml / min

detect: 220 nm

第3節 考察

遺伝子操作をほどこした微生物を実用化する際、目的遺伝子の発現安定性が大きな問題となる。本件に関しては、組み換え体プラスミドを保有する大腸菌を大量培養する際、*Pseudomonas*由来のエステラーゼ遺伝子の発現安定性が得られるか否かがポイントとなる。当初、通常のスケールアップ培養を試みたが、基礎スケールの1/5～1/10程度のエステラーゼ活性しか示さなかった。これは、プラスミドの安定性に問題があり、スケールアップ時にプラスミド欠失株が混入したためと思われる。pUC19の選択マーカーとして用いられているアンピシリン耐性遺伝子産物は β -ラクタマーゼであり、分泌型の酵素である。 β -ラクタマーゼは培地中に選択圧として添加されているアンピシリンを分解するため、培養後期には選択圧の低い状態となることが当然予測される。このため、スケールアップの際には対数増殖期前期の培養液を植菌することとした。対数増殖期前期より、定常期に到達するまでに17～18世代かかっていたが、この間プラスミドの保持率はほぼ100%を維持していた。

酵素反応の基質であるDL-エステルは、チオ酢酸中にメタクリル酸メチルを滴下することにより、高収率で合成される。DL-エステルは、分子内にメチルエステルのみでなく、化学的に加水分解を受けやすいチオエステル基を有する。副反応としてメチルエステル基の化学的加水分解が起こった場合、D-型だけでなくL-型も加水分解されるため、反応生成物であるDATの光学純度が低下する。また、副反応としてチオエステル基が化学的に加水分解されると β -メルカプトイソ酪酸が不純物として副生する。これは、DATと類似した物性を示すため、抽出、蒸留等の操作による精製が困難である。したがって、これらの化学的加水分解をできるだけ抑える条件下で酵素反応を行う必要がある。

ラセミ体の光学分割では、目的とする光学活性体の対掌体が不要物として副生するため、コスト上の制約となることが多い。本プロセスにおいては、L-エステルが未反応のエステルとして回収される。このL-エステルをラセミ化し、原料のDL-エステルとして回収できれば、コスト上、

有利であると考えられる。各種ラセミ化触媒および、反応条件の検討を行った結果、強塩基性触媒である DBU(1,8-diazabicyclo-[5.4.0]-undecene-7)を用いることにより、効率よくラセミ化されることがわかった。ラセミ化反応にメタクリル酸メチル(MMA)を溶媒として用いると収率が向上することから、ラセミ化の反応機構はチオ酢酸の脱離再付加ではないかと推測された。

これらの諸条件の最適化により、工業生産技術として確立し、現在、アクリエステルDATの工業生産が実施されている。

第4章 エステラーゼの応用研究

これまで述べてきたように、*P. putida* MR-2068の生産するエステラーゼは、立体選択性に優れ、高い耐熱性を持った工業的に有用な酵素であった。本酵素をできるだけ幅広く応用するためには、その基質特異性をコントロールする要因を把握しておくことが必要である。これまで、いくつかのグループより、加水分解酵素のアクティブサイトモデルが報告されており、新しい基質に対する立体選択性の予想に用いることが可能となっている。⁶⁶⁻⁷¹⁾加水分解されやすい基質の共通骨格は、立体認識の「経験則」としてまとめられている。例えば、リパーゼによる2級アルコールのエステルに対する光学分割に関しては、立体認識の「経験則」がよく知られている。^{72,73)}これらの経験則は、新しい基質に対して酵素反応を試みる際の一つの指標となる。本章ではエステラーゼの基質特異性、他の光学活性化合物の合成への応用、*P. putida* MR-2068由来のエステラーゼの活性中心モデルの構築について以下に述べる。

第1節 光学活性 α -置換アルカンカルボン酸の合成

先に述べたように、*P. putida* MR-2068由来の特徴は、カルボン酸エステルとチオ酢酸エステルが存在するDL-エステルにおいて立体障害の大きなカルボン酸エステルのみを立体選択的に加水分解することである。そこで、 α 位に置換基を持つ各種カルボン酸エステルに対する加水分解活性を調べることにより、本酵素の活性部位と基質の化学構造の関係を明らかにすることを試みた。本酵素を用いた光学分割の応用例を次に示す。

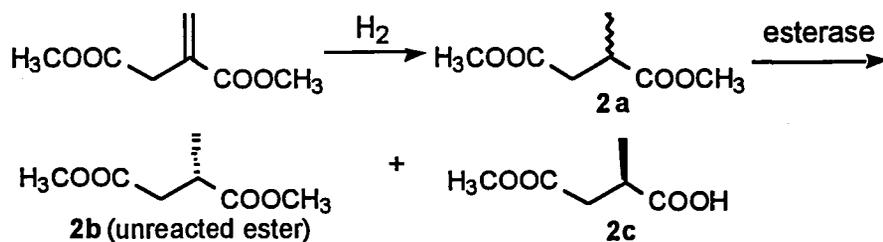


Fig. 23. Optical resolution of racemic dimethyl methylsuccinate.

DL-エステルと似た構造を持つメチルコハク酸ジメチル(Table 11, 基質 No. 2a)は本酵素の非常に良い基質である。2aを50 mMリン酸バッファー(pH 7.0)に懸濁し、エステラーゼによる光学分割を試みた。酵素反応中、反応液のpHは第3章の第2節と同様にpHコントローラーを用いて調整した。酵素反応は、仕込みエステルに対して1/2モル等量のアルカリが消費された時点でほぼ終了した。酵素反応の経時変化をFig. 24に示した。

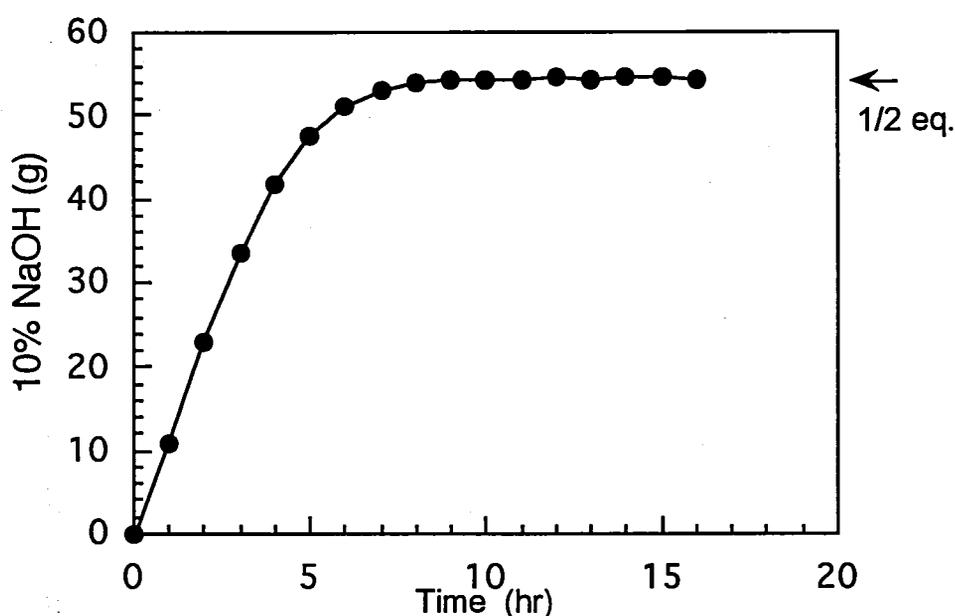


Fig. 24. Time course of optical resolution of dimethyl methylsuccinate.

酵素反応終了液に1/2量の酢酸エチルを加え、未反応のエステルを回収した。抽出後、水相に希硫酸を加え、pH 2.0に調整し、酢酸エチルで抽出し、酵素反応生成物であるカルボン酸を回収した。未反応のエステルは、(S)-メチルコハク酸ジメチル(Table 11, ester No. 2b)であり、光学純度はほぼ100% enantiomeric excess(e. e.)であった。¹Hおよび¹³C NMR分析の結果、酵素反応生成物は(R)-3-カルボキシ酪酸メチル(Table 11, acid No. 2c)であり、光学純度は98.8%e. e.であった。2cのNMRスペクトルをFig. 25、Fig. 26に示した。

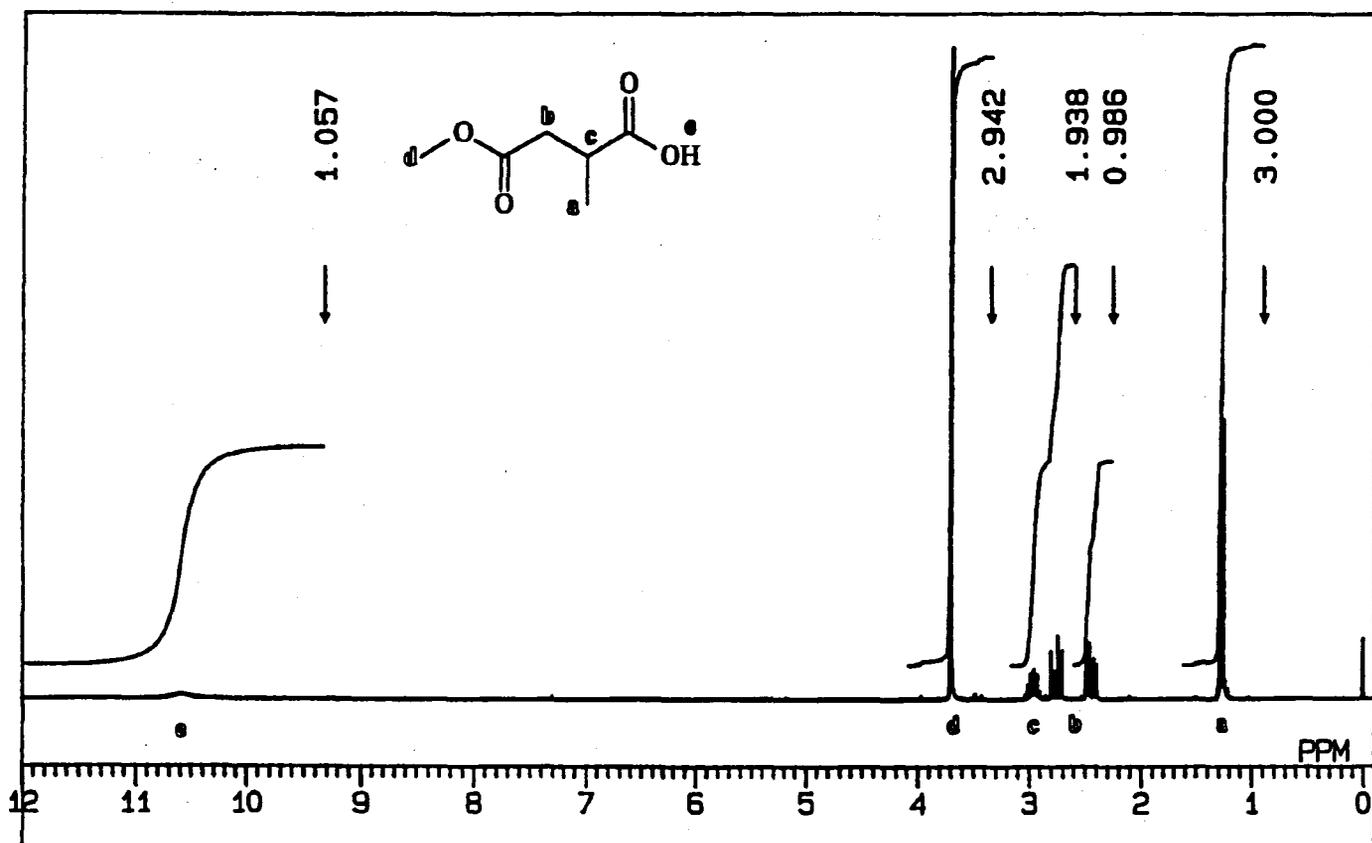


Fig. 25. ¹H NMR spectrum of methyl (*R*)-3-carboxybutyrate.

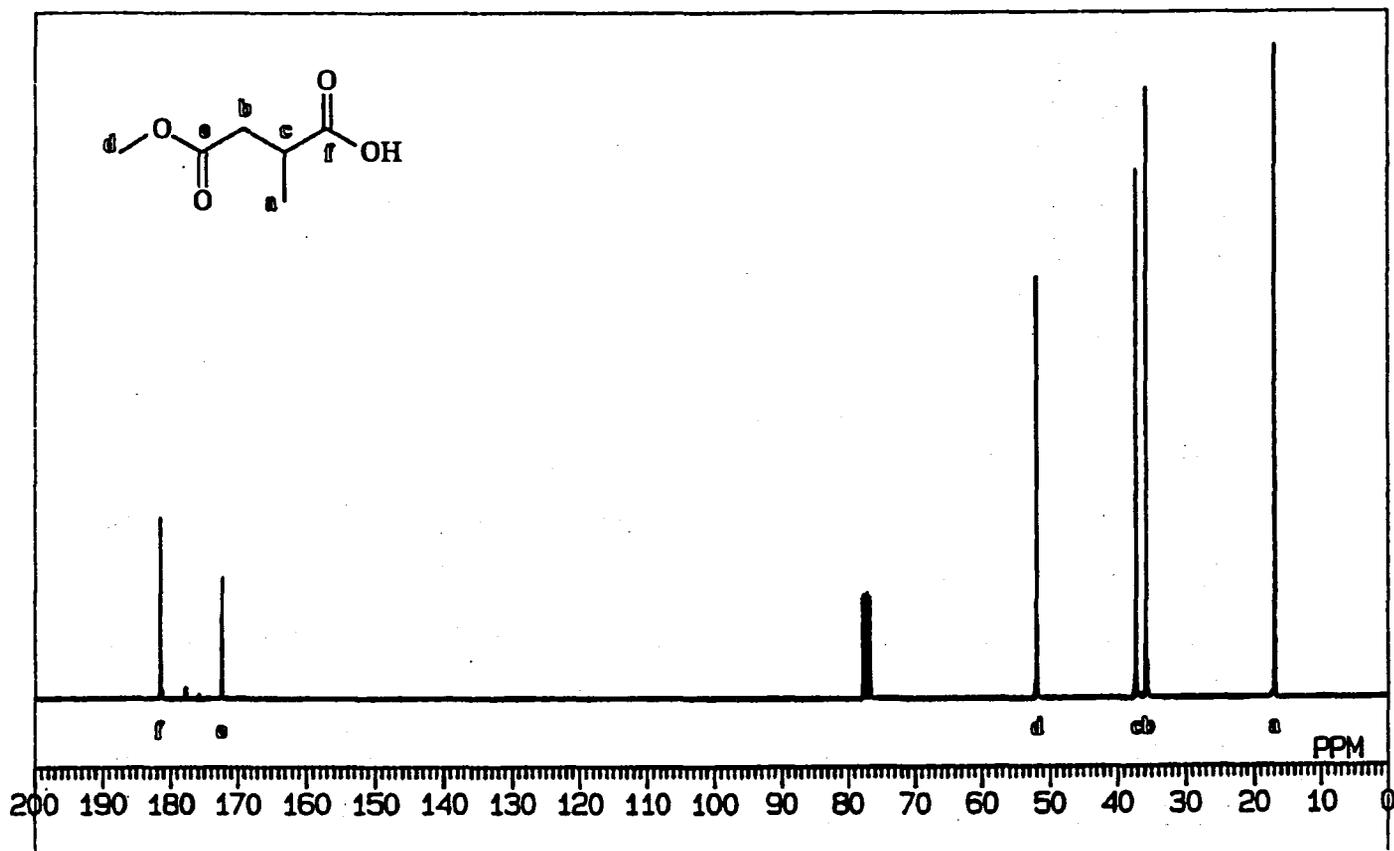


Fig. 26. ¹³C NMR spectrum of methyl (*R*)-3-carboxybutyrate.

3-メトキシカルボニル酪酸、メチルコハク酸はほとんど検出されない
 ので、酵素反応では化学的にほとんど等価であるメチルエステル基の違いを厳密に区別していることがわかる。(S)-ジエステルの光学純度がほぼ100 %e.e.であるのに対し、(R)-モノエステルの光学純度は 98.8 %e.e.であり、若干低めである。これは、基質であるエステルの化学的加水分解によるものと推測される。エステラーゼによる光学分割で得られた(R)-モノエステルを 50 モル等量のメタノールおよび、1/10 モル等量の硫酸と共に室温で一晩攪拌し、(R)-ジエステル (98.8 %e.e.) を得た。再度エステラーゼにより光学分割し、同様に硫酸メタノールで処理することにより、ほぼ 100 %e.e. の(R)-ジエステルを得ることができた。(Fig. 27)

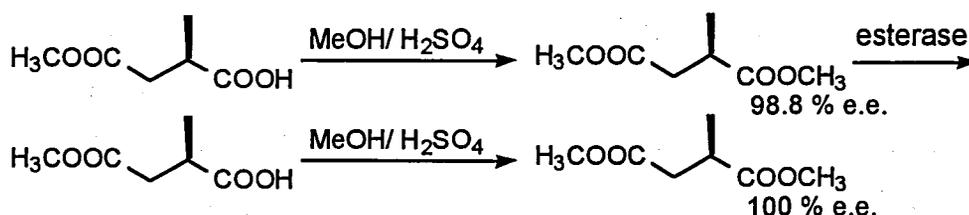


Fig. 27 Preparation of (R)-dimethyl methylsuccinate (high purity).

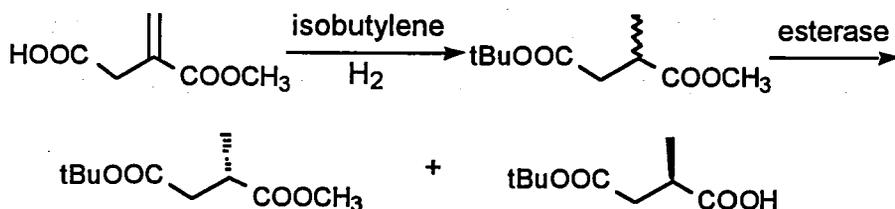


Fig. 28. Optical resolution of racemic 4-*t*-butyl-1-methyl methylsuccinate.

イタコン酸1-モノメチルに酸触媒存在下イソブチレンを付加するとイタコン酸1-メチル-4-*t*-ブチルが得られる。これを接触還元するとメチルコハク酸1-メチル-4-*t*-ブチルが得られる。これを基質に用いると、酵素反応生成物は(R)-3-カルボキシ酪酸*t*-ブチルが得られる。未反応のエステルは、(S)-メチルコハク酸1-メチル-4-*t*-ブチルエステルであり、トリフルオロ酢酸などで処理することで(S)-3-メトキシカルボニル酪酸を97 %e.e.以

上の高純度で得ることができる。(Fig. 28)

(*S*)-3-メトキシカルボニル酪酸はメチルコハク酸ジメチルのPorcine pancreatic Lipase(PPL)による光学分割で作る例も報告されているが、光学純度は73 %e.e.と低い。⁷⁴⁾

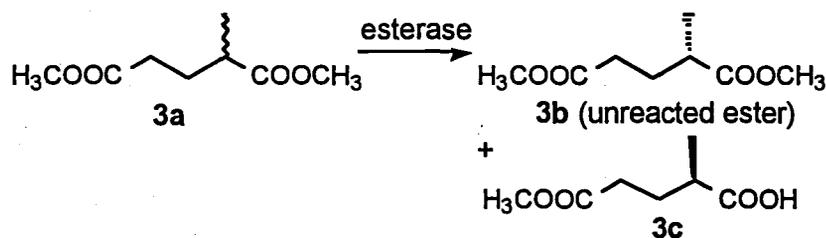


Fig. 29. Optical resolution of racemic dimethyl 2-methylglutarate.

メチレン鎖が伸びた2-メチルグルタル酸ジメチル(Table 11, 基質 3a)も本エステラーゼにより光学分割された。(S)-2-メチルグルタル酸ジメチル(Table 11, ester 3b)が未反応のエステルとして回収され、¹Hおよび¹³C NMR分析の結果、反応生成物は(R)-4-カルボキシ吉草酸メチル(Table 11, acid 3c)であった。3cのNMRスペクトルをFig. 30、Fig. 31示した。

酵素反応終了液中に4-メトキシカルボニル吉草酸、2-メチルグルタル酸は検出されない。また、3-メチルグルタル酸ジメチルや2,4-ジメチルグルタル酸ジメチルは基質にならないことから加水分解点であるエステルのβ位、γ位にあるメチル置換基は活性部位に対して立体障害となっていると思われる。

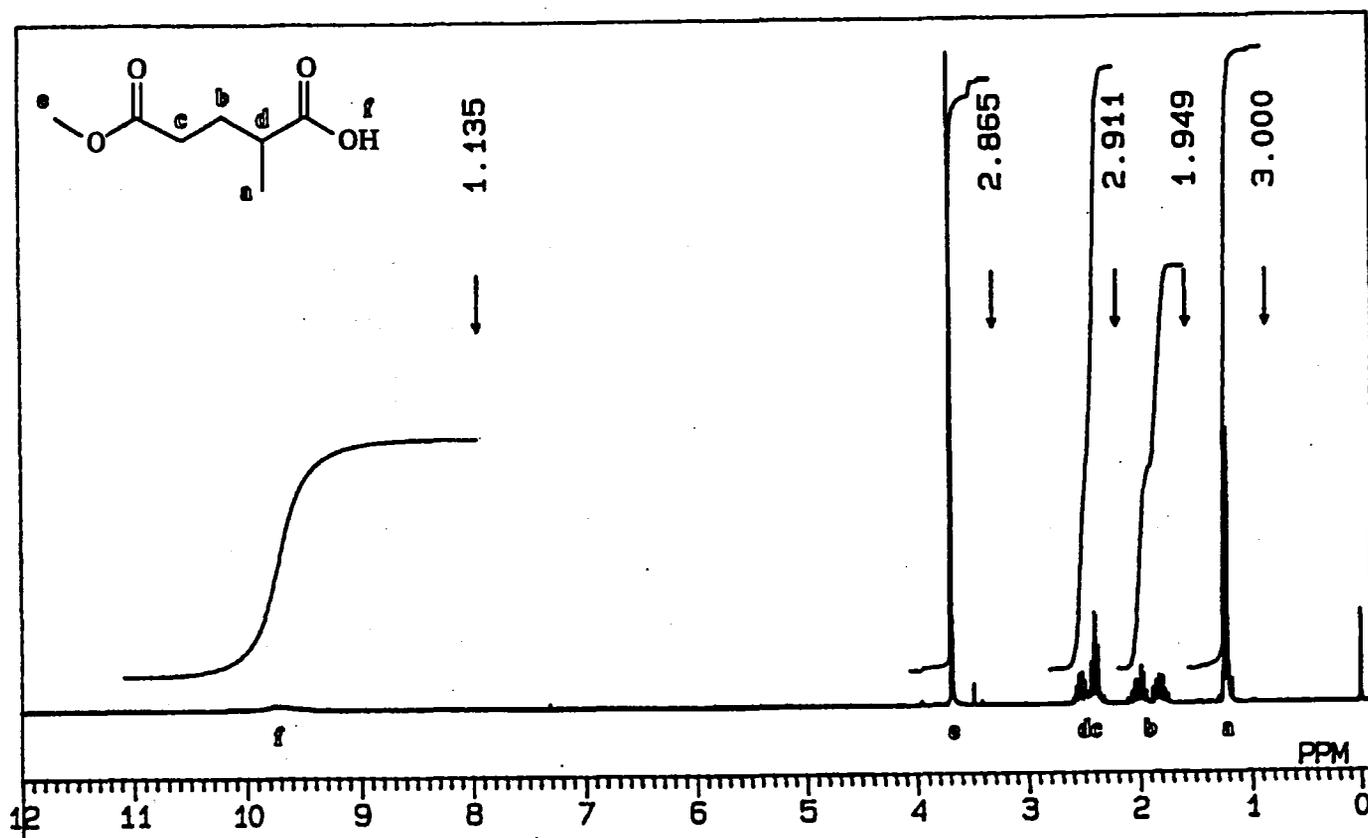


Fig. 30. ¹H NMR spectrum of methyl (R)-4-carboxyvalerate.

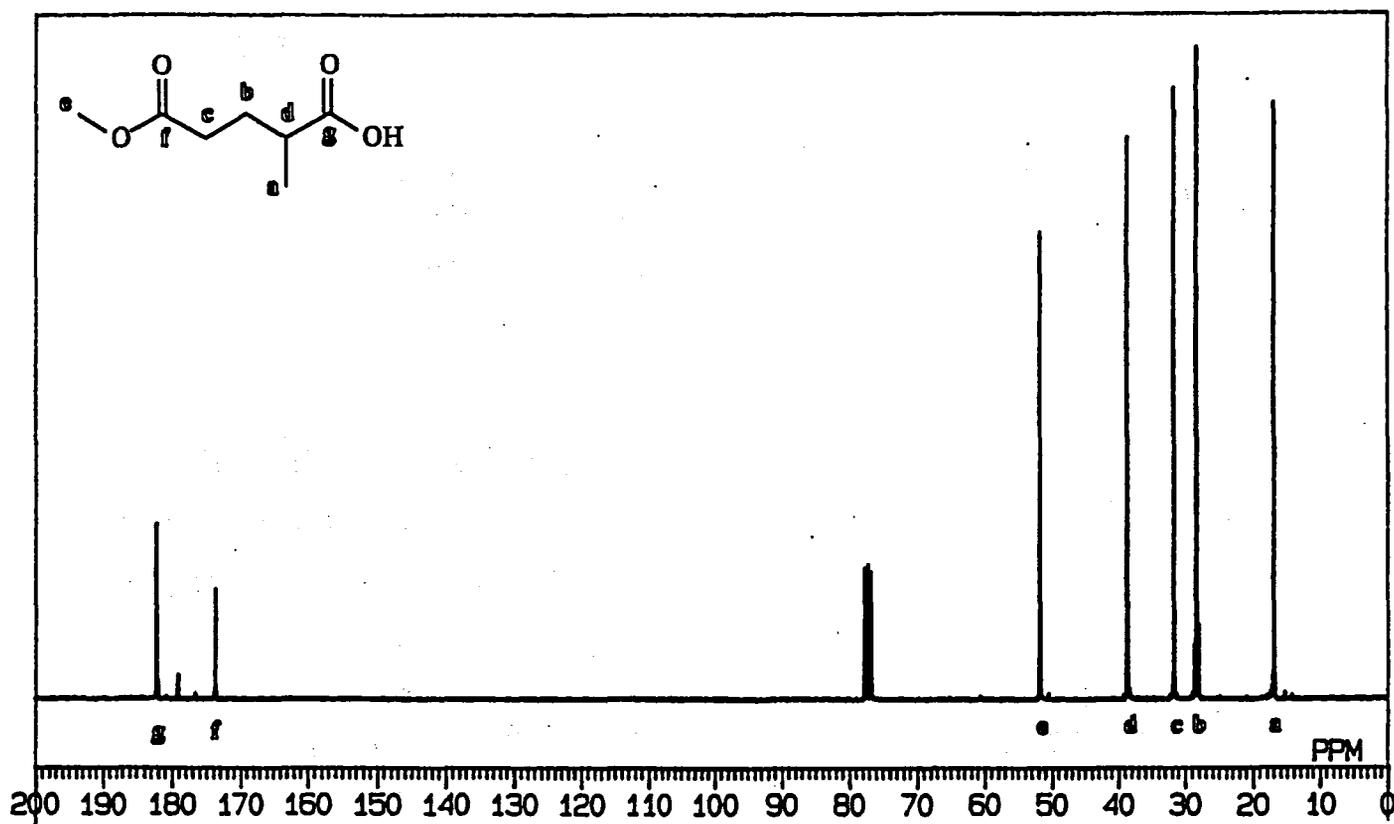


Fig. 31. ¹³C NMR spectrum of methyl (R)-4-carboxyvalerate.

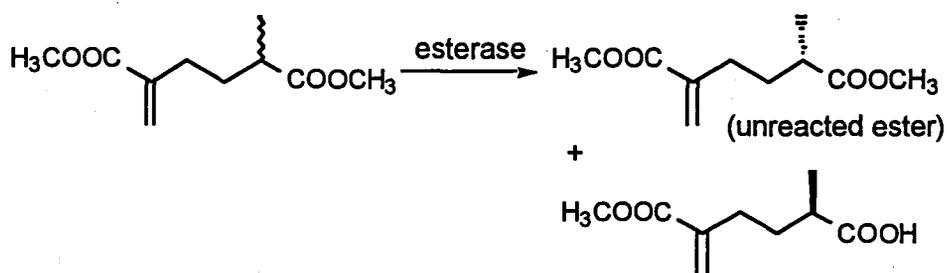


Fig. 32. Optical resolution of dimethyl 2-methyl-5-methylene-adipate.

2-メチル-5-メチレンアジピン酸ジメチルはMMAダイマーとして知られているが、本酵素により光学分割される。酵素反応生成物は(*R*)-2-メチル-5-メチレンアジピン酸6-モノメチルであり、2-メチル-5-メチレンアジピン酸1-モノメチルはほとんど得られない。これは δ 位のメチレン基は立体障害にならないが、イタコン酸ジメチル(Table 11, 基質 9a)が酵素反応の基質にならないのと同様に α 位のメチレン基が酵素反応を阻害しているからであると思われる。

β 置換基としてメトキシカルボニル以外のものについても酵素反応を試みた。

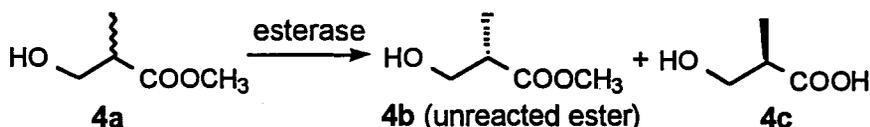


Fig. 33. Optical resolution of methyl β -hydroxyisobutyrate.

β -ヒドロキシイソ酪酸メチル(Table 11, 基質 4a)は、本酵素により立体選択的に加水分解されて(*R*)- β -ヒドロキシイソ酪酸(Table 11, acid 4c)と未反応の(*S*)- β -ヒドロキシイソ酪酸メチル(Table 11, ester 4b)に分割される。

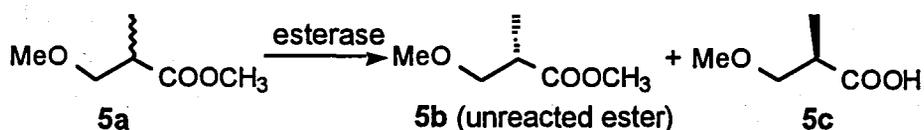


Fig. 34 Optical resolution of methyl β -methoxyisobutyrate.

β -メトキシイソ酪酸メチル(Table 11, 基質 5a)も同様に加水分解されて(*R*)- β -メトキシイソ酪酸(Table 11, acid 5c)が生成し、(*S*)- β -メトキシイソ酪酸メチル(Table 11, ester 5b)は未反応エステルとして得られる。

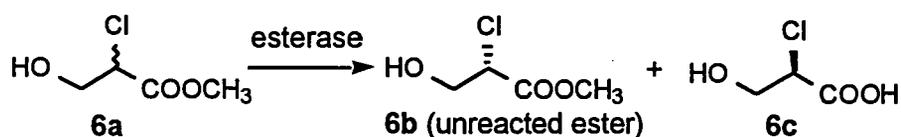


Fig. 35 Optical resolution of methyl 2-chloro-3-hydroxypropionate.

α -クロロ- β -ヒドロキシプロピオン酸メチル(Table 11, 基質 6a)は本酵素により立体選択的に加水分解されて(*R*)- α -クロロ- β -ヒドロキシプロピオン酸(Table 11, acid 6c)を与える。しかしながら、バッファー中では基質が不安定であり、化学的に加水分解されるため、光学純度は30 %e.e.とかなり低くなる。しかし、未反応の(*S*)- α -クロロ- β -ヒドロキシプロピオン酸メチル(Table 11, ester 6b)は98 %e.e.以上の純度で得られる。

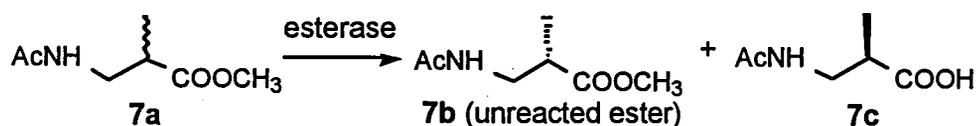


Fig. 36. Optical resolution of methyl N-acetyl- β -aminoisobutyrate.

β 位の置換基としてアミノ基誘導体でも本酵素は有効である。 β -アセチルアミノイソ酪酸メチル(Table 11, 基質 7a)からは本酵素により立体選択的に加水分解されて(*S*)- β -アセチルアミノイソ酪酸(Table 11, acid 7c)が高純度で得られるが、バッファー中からの単離が困難である。しかし、未反応の(*R*)- β -アセチルアミノイソ酪酸メチル(Table 11, ester 7b)は高純度で単離できる。

これらの結果をTable 11にまとめた。

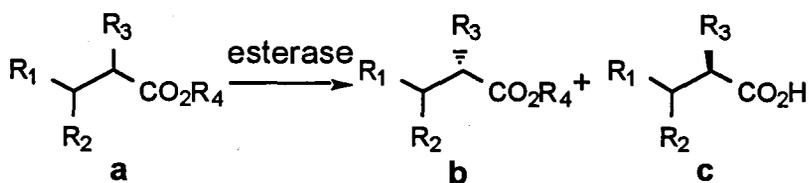


Fig. 37. Enzymatic hydrolysis of α -substituted carboxylates.

Table 11. Enzymatic hydrolysis of α -substituted carboxylates.

| No. | Substrate (a) | | | | Conv. (%) | ester (b) (%e.e.) | acid (c) (%e.e.) | <i>E</i> |
|-----|--------------------------------------|----------------|-----------------|----------------|--------------|----------------------|---------------------|----------|
| | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | | | | |
| 1 | AcS | H | Me | Me | 49.9 | 98.0 | 98.5 | 622 |
| 2 | MeO ₂ C | H | Me | Me | 50.3 | 99.8 | 98.8 | 1690 |
| 3 | MeO ₂ C(CH ₂) | H | Me | Me | 50.3 | 99.0 | 98.0 | 545 |
| 4 | HO | H | Me | Me | - | 98.0 | ND | - |
| 5 | MeO | H | Me | Me | 50.0 | 98.0 | 98.0 | 458 |
| 6 | HO | H | Cl | Me | 76.6 | 98.0 | 30.0 | 3.6 |
| 7 | AcNH | H | Me | Me | - | 98.0 | ND | - |
| 8 | MeO ₂ C(CH ₂) | Me | H | Me | NR | - | - | - |
| 9 | MeO ₂ C | H | CH ₂ | Me | NR | - | - | - |
| 10 | Me | Me | H | Me | NR | - | - | - |
| 11 | Me | H | Me | Me | 100 | - | 0 | - |

$$\text{Conv.} = e e_s / (e e_p + e e_s).$$

$$E = \ln [1 - c (1 + e e_p)] / \ln [1 + c (1 - e e_p)].^{75)}$$

NR; not reacted.

ND; not determined.

$e e_s$, $e e_p$ shows enantiomeric excess of substrate, enantiomeric excess of product, respectively.

第2節 アルカンジカルボン酸モノメチルの合成

第4章の第1節に示したように、ある種の α 置換アルカンジカルボン酸ジメチルからは光学活性モノメチルエステルが得られるが、無置換アルカンジカルボン酸ジメチルからはFig. 38に示す様に高い選択率でアルカンジカルボン酸モノメチルが得られた。対応する酸無水物が容易に得られない場合、アルカンジカルボン酸モノエステルの調製法は有用である。マロン酸またはアジピン酸のモノエステルは、多くの用途が期待される化合物であり、その調製法に関しても広く研究されている。⁷⁶⁻⁷⁸⁾生体触媒を用いる方法としては、porcine liver esterase (PLE) によるモノエステルの生成がよく知られている。⁷⁹⁾



Fig. 38. Enzymatic preparation of alkanedicarboxylic acid monoesters.

アルカンジカルボン酸ジメチルを50 mMリン酸バッファー(pH 7.0)に懸濁し、エステラーゼによる酵素反応を試みた。酵素反応中のpHは、第3章の第2節と同様にpHコントローラーを用いて調整した。酵素反応は、仕込みエステルに対して等モルのアルカリが消費された時点でほぼ終了した(Fig. 39)。酵素反応終了液に1/2量の酢酸エチルを加え、未反応のエステルを除去した。抽出後、水相に濃硫酸を加え、pH 2.0に調整した後、酢酸エチルで抽出し、酵素反応生成物であるカルボン酸を回収した。酵素反応生成物はアルカンジカルボン酸モノエステルであり、アルカンジカルボン酸の生成量は1%以下であった。

Table 12にエステラーゼの各種ジエステルに対する相対活性を示したが、マロン酸ジエステルに対する酵素活性は、アジピン酸ジエステルに対する活性の1/10以下であった。また、メチレン鎖が1つ伸びたピメリン酸ジメチルは本エステラーゼの基質とはならなかった。

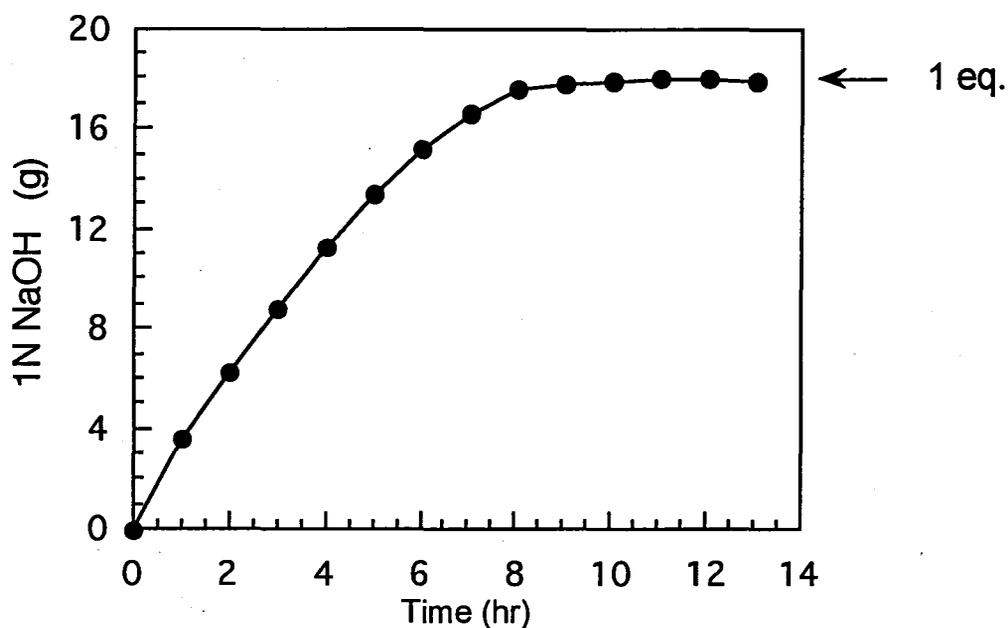


Fig. 39. Time course of enzymatic hydrolysis of dimethyl adipate.

Table 12. Esterase catalyzed hydrolysis of alkanedicarboxylic acid dimethyl esters.

| Substrate | Relative activity(%) ^a | Selectivity (%) ^b |
|--------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| Dimethyl malonate | 9 | >99 |
| Dimethyl succinate | 79 | >99 |
| Dimethyl glutarate | 81 | >99 |
| Dimethyl adipate | 100 | >99 |
| Dimethyl pimelate | 0 | - |

a; Relative activities were expressed by initial rate of hydrolysis as a percentage that of dimethyl adipate taken as 100%.

b; Selectivities were expressed as a percentage of monoester/(monoester+dicarboxylic acid) formed.

第3節 エステラーゼの活性部位モデルについて

本エステラーゼの活性部位モデルを以下のように推定した(Fig. 40)。

- 1) 本酵素はセリンエステラーゼであり、活性中心は97番目のセリンである。
- 2) 基質となるエステルのアルコール部分の炭素数は厳密に認識され、加水分解点であるエステルは、メチルエステルにほぼ限定される。
- 3) α 置換基に相当するR2ポケットは、疎水性領域と推定され、基質の疎水性領域と疎水性相互作用等により結合するものと思われる。このポケットは、紙面の前方に向いており、平面上にある側鎖(不飽和側鎖)は、基質として受け入れられないものと思われる。
- 4) β 置換基に相当するR1ポケットは、比較的フレキシブルであり、親水性領域と推定される。基質の親水性領域が、この領域にある極性アミノ酸側鎖と水素結合により安定化され、活性部位における立体認識に関与しているものと思われる。

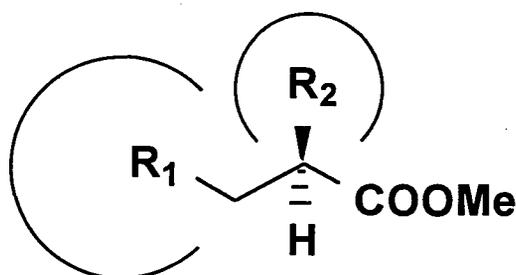


Fig. 40. An empirical rule to predict the enantioselectivity of the esterase. This schematic shows the favored enantiomer for α -substituted carboxylates.

第4節 考察

イタコン酸ジメチルとメチルコハク酸ジメチルとの違いは側鎖がメチル基およびメチレン基のみであるが、イタコン酸ジメチルは全く加水分解を受けない。イタコン酸の場合、 α -炭素周辺の主鎖と側鎖は同一平面上にある。しかしながらメチルコハク酸の場合、 α -炭素周辺の主鎖と側鎖は正四面体構造を形成しているものと思われる。したがって、基質の α 置換基に相当するR2ポケットの向きは厳密に認識されており、主鎖を紙面に平行に考えた場合、 α 側鎖の向きは紙面の前方に向いているものと思われる。また、光学分割にはアクティブサイトモデルのR1ポケットに相当する位置に極性官能基が存在することが必須であり、例えば、2-メチル酪酸メチルは光学分割されず、ラセミ体の2-メチル酪酸を与える。2-メチル吉草酸メチル、2-メチルヘキサン酸メチルなどはほとんどエステラーゼの基質とはならない。これらの結果より、R1ポケットは比較的親水性アミノ酸側鎖に囲まれた領域であり、酵素反応基質の主鎖とこの領域と水素結合等の相互作用が立体選択的加水分解に重要な役割を果たしていると思われる。

近年、数種の加水分解酵素結晶のX線構造解析により、リパーゼによる加水分解反応の詳細なメカニズムが考察されている。また、*Candida rugosa*由来のリパーゼ(CRL)では、基質のアナログを用いることにより、酵素反応の中間生成物について詳細に考察されている。^{80,81)}これらの報告によると、まず、基質のエステルのカルボニル基が酵素のオキシアニオンホールに存在するアミドNH₂と水素結合により活性化され、セリン残基による求核攻撃を受けやすくなる。その後、基質-酵素複合体を経て水による求核攻撃を受け、カルボン酸として解放される。このモデルは、本エステラーゼによる加水分解反応に応用可能であると思われる。酵素による基質の立体及び位置の認識は、酵素反応の早い時期に行われると考えることができる。すなわち、基質が酵素の活性部位にフィットするか否かで立体及び位置特異的な酵素反応がなされるかどうか決定されるものと考えられる。メチルコハク酸ジメチルや、2-メチルグルタ

ル酸ジメチルの加水分解反応時に見られる高い位置選択性は、アクティブサイトモデルの β 位、 γ 位の側鎖に相当する位置に立体障害となるアミノ酸側鎖が存在するためと推測される。ラセミ体メチルコハク酸ジメチルのエステル部位の加水分解を考えた場合、(R)-体、(S)-体それぞれの1-メチルエステル、4-メチルエステルの4種類が加水分解点となり得る。(S)-体ジエステルは未反応エステルとして回収されるため、(R)-メチルコハク酸ジメチルの酵素活性部位への結合を考えた場合、2つのバイディングモデル（コンプレックスA,B）(Fig. 41)が考えられる。コンプレックスAに比較してコンプレックスBは、図中斜線で示した部位が立体障害となるものと推測される。従ってコンプレックスAが基質のバイディングモデルとして適当であり、酵素反応生成物は、(R)-3-カルボキシ酪酸メチルのみとなる。また、高い立体選択性は、 α -置換基と水素が厳密に認識されているためと推測できる。

アルカンジカルボン酸ジエステルに対する酵素活性は、主鎖の長さにより相対活性が大きく異なり、マロン酸ジメチルではアジピン酸ジメチルの1/10以下であった。これは β 位のメトキシカルボニル基が酵素活性部位に対して立体障害になるためと思われる。コハク酸ジメチル、グルタル酸ジメチルになると γ -あるいは δ -メトキシカルボニル基が β 位の立体障害から緩和されるために活性はアジピン酸ジメチルの場合に比べて大きく低下しないと推察される。

また、ピメリン酸ジメチルのようにアジピン酸ジメチルから1つメチレン鎖が伸びると全く酵素による加水分解を受けない。これは酵素が厳密に基質の大きさを認識しているためと思われる。

これらの酵素加水分解ではいずれも99%以上の選択率でモノメチルエステルを合成する。これは酵素により加水分解を受けたカルボン酸は速やかに中和されて塩となるが、塩は静電的な反発により基質として酵素活性部位に受け入れられないためではないかと考えられる。

光学活性メチルコハク酸合成の先行技術としてはBinap触媒を用いたイタコン酸の不斉還元が知られている^{82,83)}。我々の開発した酵素法は、不斉還元法に比較して立体選択性および生産性ともに有利である。光学活

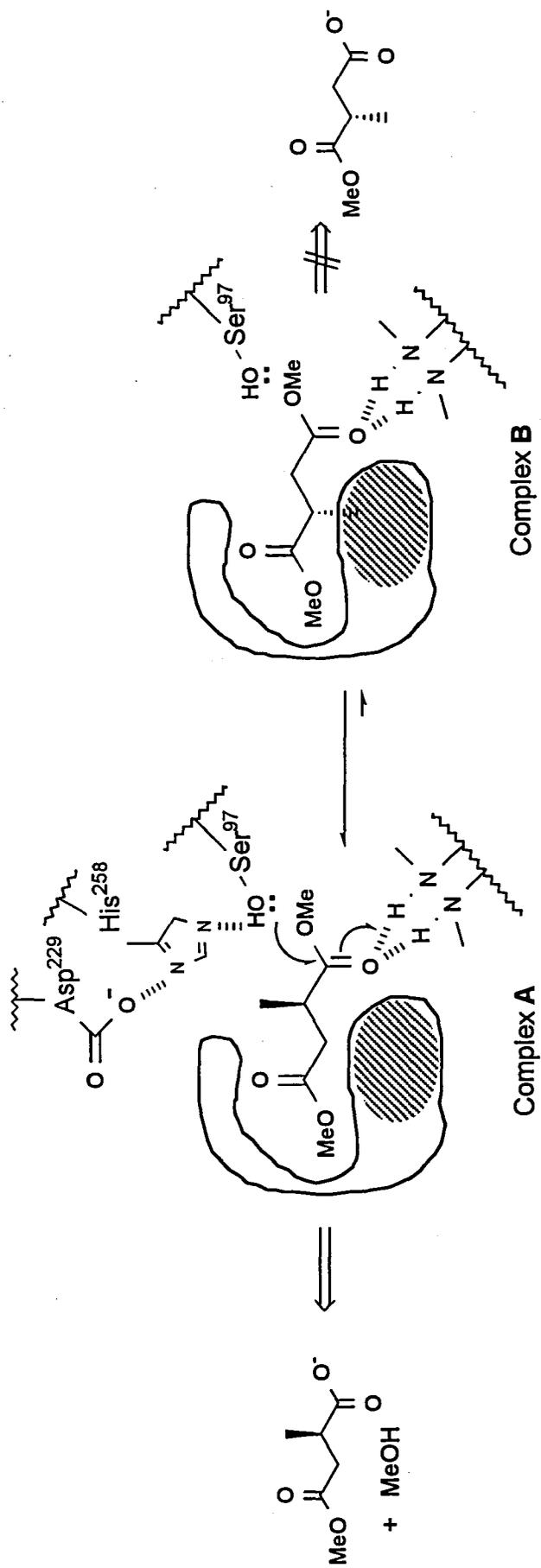


Fig. 41. Binding models of (R)-2a in the active site of the esterase.

性メチルコハク酸をLAH(Lithium aluminium hydride)還元すると、光学活性2-メチル-1,4-ブタンジオールが得られる。このジオールは高分子液晶ポリマーの成分として有用であり、商品化が進められている⁸⁴⁾。また、(R)-メチルコハク酸モノエステルは、Moriらにより、昆虫フェロモンの原料として用いられている他⁸⁵⁾、医薬原料として有用であり、複数の医薬メーカーにおいて開発が進められている。これらの需要に対応するため、現在、酵素法による光学活性メチルコハク酸誘導体の製造が工業スケールで実施されている。

総括

医薬品の候補となる化合物が分子内に不斉炭素を持つ場合、各エナンチオマーで生理活性が全く異なることもあり、安全性の面からも純粋な光学活性化合物を使用することが必要となる。近年、天然由来の生理活性物質のアナログを医薬品開発の候補とするケースが多く、その合成原料として化学的且つ光学的に純粋な各種光学活性化合物を工業的スケールで安定に供給可能な技術開発は重要な意義を持つと考えられる。

自然界より単離された *Pseudomonas putida* MR-2068 の生産するエステラーゼは、耐熱性且つ立体選択性に優れている加水分解酵素である。精製酵素の諸性質を調べた結果、本酵素は他の微生物由来のエステラーゼと同様に⁹⁷セリンを活性中心とするセリンエステラーゼであることがわかった。基質となるエステルは、比較的鎖長の短い脂肪族カルボン酸のメチルエステルにほぼ限定されることより、酵素の分類上カルボキシルエステラーゼ(EC 3.1.1.1)であると考えられる。本菌株より単離したエステラーゼ遺伝子のDNA塩基配列より推測されるアミノ酸配列は、酸化還元系酵素であるハロパーオキシダーゼと70%のホモロジーを示し、実際にMCD(Monochlorodimedone)を用いたアッセイにより、過酸化水素、臭素イオン存在下、ハロパーオキシダーゼ活性を示すことが確認された。本酵素はエステラーゼ活性を指標として自然界より単離された酵素であるが、同時にハロパーオキシダーゼ活性をも示すユニークな多機能酵素であることを明らかにした。これらの異なる機能が実際にどのような生理的意義を持つかは不明であるが、自然界における酵素の多様性という点で興味深い結果といえる。

本エステラーゼの特徴はカルボン酸エステルとチオ酢酸エステルが存在するDL-エステルにおいて立体障害の大きなカルボン酸エステルのみを立体選択的に加水分解することである。そこで、 α 位に置換基を持つ各種カルボン酸エステルに対する加水分解活性を調べることにより、酵素の活性部位と基質の化学構造の関係を明らかにすることを試みた。例えばDL-エステルと似た構造を持つメチルコハク酸ジメチルは本酵素により98% e.e.以上で光学分割された。酵素反応生成物は(R)-3-カルボキシ酪酸メチルであり、3-メトキシカルボニル酪酸、メチルコハク酸はほとんど検出されないため、酵素反応では化学的にほとんど等価であるメチルエステル基の違いを厳密に区別していることが分かった。これは酵素反応においてエステルの β 位のメチル置換基が酵素活性部位に対して立体障害となっ

ているためと推測した。また、高い立体選択性は、 α -置換基と水素が厳密に認識されているためと推測した。

本研究成果は汎用化学品プラントにおける各種光学活性カルボン酸およびその誘導体合成技術として実用化されている。D-(-)- β -Acetylthioisobutyric acid (DAT) は、カプトプリル合成原料として医薬メーカーに供給中である。また、光学活性 β -ヒドロキシイソ酪酸およびその誘導体や光学活性メチルコハク酸およびその誘導体も医薬原料として製薬メーカーに供給中である。これらの医薬品開発が進み、医療に貢献することを期待したい。

実験の部

一般的操作

1) 使用菌株

- ・ *Pseudomonas putida* MR-2068 (工業技術院生命工学工業技術研究所寄託番号FERM BP 3846)
- ・ *Escherichia coli* JM109 [$e14^-(McrA^-)$, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*($r_k^- m_k^+$), *supE44*, *relA1* Δ (lac-proAB), [F' *traD36 proAB lacI^q Z Δ M15*]]
- ・ *E. coli* C600 [F⁻, *thi-1*, *thr-1*, *leuB6*, *lacY1*, *tonA21*, *sup E44*, λ]
- ・ *E. coli* XL1-Blue [*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *lac*[F', *proAB*, *lacI^q Z Δ M15*, Tn10(Tet^r)]]

2) 使用培地

- ・ LB-broth polypeptone 10g
 yeast ext. 5g
 NaCl 5g/liter
 (Agar 15g)

- ・ 2 × YT broth polypeptone 16g
 yeast ext. 10g
 NaCl 5g/liter
 (Agar 15g)

- ・ SOB broth polypeptone 20g
 yeast ext. 5g
 NaCl 0.6g
 KCl 0.2g
 MgCl₂/6H₂O 2g
 *MgSO₄/7H₂O 2.43g
 *glucose 40g/liter *別殺菌

| | | |
|------------|----------------------------------|-----------|
| · M9 broth | Na ₂ HPO ₄ | 6g |
| | KH ₂ PO ₄ | 3g |
| | NaCl | 0.5g |
| | NH ₄ Cl | 1g |
| | agar | 15g/liter |
| | *1 M MgSO ₄ | 1ml |
| | *2 M glucose | 5.6ml |
| | *1 % vitaminB1(Thiamine) | 1ml |
| | *1 M CaCl ₂ | 0.1ml |
| | *別殺菌 (Thiamineは無菌濾過) | |

3) 機器分析

NMR分析はJEOL EX-270を用いた。溶媒として重クロロホルムを用い、テトラメチルシランをreferenceとして用い、¹Hは 270MHz、¹³Cは 68MHzで測定した。質量スペクトル分析は、Hewlett Packard G1800A GCD systemを用い、70eVで測定した。旋光度の測定は、Horiba SEPA-200 high-sensitivity polarimeterを用いた。

各章の実験

1、第1章の実験

1) 染色体DNAの調製

① 試薬

TEG buffer (25 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 50 mM Glucose, pH 8.0)

Lysozyme soln. (10 mg/ml in TEG buffer)

12.5 % Sodium dodecyl sulfate(SDS)

5 M Sodium perchlorate

Chloroform / isoamyl alcohol (24/1 v/v)

10 x SSC (1.5 M NaCl, 0.15 M Na₃-citrate)

0.1 x SSC

Acetate-EDTA (3 M Na-acetate, 0.01M EDTA, pH 7.0)

RNase (2 mg/ml, 0.15M NaCl, pH 5.0, 90°Cで5 min 熱処理し、DNase 活性のみを失活させたもの)

② 操作

P. putida MR-2068株を50 mlのLB 培地の入った500 ml容の坂口フラスコに植菌し、30 °C、24時間振とう培養した。5000 × gの遠心分離で集菌し、50 mlのTEG bufferで洗浄した。得られた洗浄済み菌体ペレット3 gを24 mlのTEG bufferに懸濁し、1 mlの塩化リゾチーム溶液を加え、32 °Cにて、30分 incubateした。次に、2 mlの12.5 % SDSを加え、よく混合し、得られた溶菌液に6.75 mlの過塩素酸ソーダを加え、混合した。さらに33.8 mlのクロロホルム-イソアミルアルコールを加え、室温にて約30分緩やかに振とうした。4000 rpm, 5 min, 15 °Cの遠心分離により得られた上清に、2 vol. の冷エタノールを静かに加え、染色体DNAを殺菌済みガラス棒に巻き付けた。余分のエタノールを除いた後、9 mlの0.1 x SSCに溶解し、1 mlの10 x SSCを加えた。このDNA溶液に、0.2 mlのRNaseを加え、37 °C、20分 incubateし、10.2 mlのクロロホルム-イソアミルアルコールを加え、さらに20分 incubateした。4000 rpm, 5 min, 15 °Cの遠心分離により得られた上清に、1 mlのAcetate-EDTAを加え、殺菌済みガラス棒で攪拌しながら5.4 mlのイソプロパノールを滴下し、染色体DNAをガラス棒に巻き付けた。得られた染色体DNAを80 % エタノールで一晩殺菌し、1.8 mlの0.1 x SSCに溶解し、

0.2 ml の 10 x SSC を加え、DNA 溶液とした。得られた DNA 溶液の OD_{260nm} を測定し、次式より濃度を求め、エステラーゼ遺伝子のクローニングに用いた。

$$\text{DNA 濃度 } (\mu\text{g/ml}) = 50 \times OD_{260nm} \times (\text{希釈率})$$

2) プラスミド DNA の調製

① 試薬

Sol. I 2 mg/ml lysozyme in TEG buffer

Sol. II 1 % SDS, 0.2N NaOH

Sol. III 3 M Na-acetate, pH 4.8

Phenol-Chloroform 1 : 1 saturated with H_2O

DNA buffer II 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5

② 操作

プラスミド保有菌株を LB 培地で培養し、このうち 100 μl をとり、12000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 5 min の遠心分離により集菌した。得られた菌体ペレットを TEG buffer で洗浄し、140 μl の Sol. I に懸濁し、氷中に 30 min 静置した。280 μl の Sol. II を加え、よく攪拌し、氷中に 5 min 静置した後、210 μl の Sol. III を加え、さらに氷中に 1 hr 静置した。12000 rpm, 5 $^{\circ}\text{C}$, 10 min の遠心分離により得られた上清に、等量のフェノール/クロロホルムを加え、よく攪拌した。12000 rpm, 15 $^{\circ}\text{C}$, 15 min の遠心分離により得られた上清に、0.8 vol. の冷イソプロパノールを加え、室温で 15 分静置した。12000 rpm, 5 $^{\circ}\text{C}$, 10 min の遠心分離により得られたペレットを冷 80 % エタノールで洗浄し、減圧乾燥した後、20 μl の DNA buffer II に溶解し、プラスミド溶液とした。

この操作を必要に応じてスケールアップし、プラスミド DNA を調整した。

3) 制限酵素による DNA の切断

① 試薬

各種制限酵素は、宝酒造 (株) より購入した。反応条件、反応バッファーは、メーカーの取扱説明書に従った。

② 操作

DNA の制限酵素による切断は、1.5 ml 容エッペンドルフマイクロチューブ中

で行った。試料DNA 0.1~2 µg、必要量の制限酵素、反応用濃縮バッファー、粗精製DNAの場合は1 µlのRNaseを混合し、総量を20~30 µlとして各反応至適温度で1~3時間反応させた。反応終了液に等量のフェノール-クロロホルムを加え、よく混合し、12000 rpm, 15 °C, 5 minの遠心分離により上清を得た後、0.1 vol. の3 M sodium acetate (pH 5.2)を加え、さらに2.5 vol. 冷エタノールを加え、-80 °Cにて30 min 静置した12000 rpm, 5 °C, 10 minの遠心分離により得られたペレットを冷80 %エタノールで洗浄し、減圧乾燥した後、20 µlのDNA buffer IIに溶解し、DNA溶液とした。

4) アガロースゲル電気泳動及びDNA断片の回収

① 試薬

Agarose, Agarose L (低融点タイプ) ナカライ (株) より購入

TBE buffer 89 mM Tris.OH, 89 mM Boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.3

dye solution 0.1% Bromocresol blue, 0.1 M EDTA, 0.25% SDS, 50 % glycerol

Ethidium bromide溶液 0.5 mg/ml

TE buffer 10 mM Tris/HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0

Phenol saturated with TE buffer

Chloroform-Isoamylalcohol = 24/1 v/v

3 M Sodium acetate pH 5.2

λ-Hind III (λ ファージ DNA の Hind III 消化物で、23.1 kb, 9.4 kb, 6.6 kb, 4.4 kb, 2.3 kb, 2.0 kb, 0.56 kb, 0.13 kbの断片を含む) 宝酒造 (株) より購入

② 操作

・アガロースゲル電気泳動

0.8 ~ 1.2 % 濃度となるようにアガロースをTBE bufferに加熱溶解し、最終濃度 0.5 µg/ml となるように Ethidium bromide溶液を加えて固化させた。電気泳動用サンプルに 1/4 vol. のdye solutionを加え、ゲルのスロットに loadし、80 ~ 120 Vで2 ~ 3 時間泳動した。この際、λ-Hind IIIを分子量マーカーとして用いた。

・Agarose LからのDNA断片の回収

Agarose の代わりにAgarose Lを用いて上記と同様に電気泳動し、必要なバ

ンドを確認後切り出し、1.5 ml 容遠心チューブに移した。切り出したゲル片と等量のTE buffer を加え、65 °C で5 min保温し、ゲルを完全に溶解した。溶解液と等量のフェノール (TE buffer 飽和) を加えて混合し、12000 rpm, 15 °C, 5 minの遠心分離により抽出し、得られた上清を新しいチューブに移した。フェノール抽出を3回繰り返す、等量のクロロホルム-イソアミルアルコールで2回抽出し、得られた上清に1/10 vol. の3 M 酢酸ナトリウムを加え、2.5 vol. の冷エタノールを加え、-80 °C で30 min 静置した。12000 rpm, 5 °C, 5 minの遠心分離によりDNAを回収し、80 % エタノールで洗浄し、減圧乾燥後、TM buffer に溶解し、Ligation反応に用いた。

5) プラスミドベクターのCIP処理及びT4 DNA Ligaseによる連結

① 試薬

CIP (Alkaline phosphatase from calf intestine) 東洋紡 (株) より購入

CIP buffer 50 mM Tris/HCl pH 8.0

DNA Ligation Kit 宝酒造 (株) より購入

TM buffer 100 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.6

② CIP 処理

プラスミドベクターを適当な制限酵素で切断し、反応終了液に等量のフェノール (TE bufferで飽和したもの) を加え、よく混合し、12000 rpm, 15 °C, 5 minの遠心分離で得られた上清を新しいチューブに移した。フェノール層に等量のDNA buffer IIを加え、抽出し、先の上清と合わせ、2 vol. のエーテル (TE bufferで飽和したもの) を加え、12000 rpm, 15 °C, 1 minの遠心分離で上清を除いた。エーテル抽出を3回繰り返す、水相に1/10 vol. の3 M 酢酸ナトリウムを加え、2.5 vol. の冷エタノールを加え、エタノール沈殿によりDNAを回収した。得られた20 µlのCIP buffer に溶解し、同bufferで希釈したCIP (1 unit/µl) を1 µl加えた。37 °C で30 min間保温した後、さらに1 µlのCIPを加え、30 min間保温を続けた。先と同様にフェノール処理、エタノール沈殿によりDNAを回収し、Ligation用サンプルとした。

③ Ligation Kit を用いたDNA断片の連結

プラスミドベクター及びDNA fragmentを合わせて7.5 µlのTM bufferに溶解

し、4倍量のA液(30 μ l)を加え、混合した。次に7.5 μ lのB液を加え、混合し、15°Cで30 min保温した。このLigation mixtureを形質転換に用いた。

6) 大腸菌competent cellの調製及び形質転換

① 試薬

50 mM CaCl_2

LB 培地

100 mM IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)

アンピシリン水溶液 10 mg/ml

2% X-gal in DMF (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)

② 大腸菌competent cellの調製

大腸菌type cultureをスラントより5 mlのLB培地に植菌し、37°Cで一晩培養した。このうち、0.5 mlを50 mlのLB培地に接種し、菌濃度が 10^7 /mlとなるまで37°Cで培養した。このうち20 mlを8000 rpm, 3 min, 4°Cの遠心分離により集菌し、等量の冷50 mM CaCl_2 で洗浄し、等量の冷50 mM CaCl_2 に懸濁し、0°Cで30 min静置した。集菌後、1 mlの冷50 mM CaCl_2 に懸濁し、0°Cで1 hr以上静置し、competent cellとした。

③ 大腸菌の形質転換

200 μ lのcompetent cell溶液に20 μ lのDNA ligation mixtureを加え、氷中に30 min静置した。42°Cで2 minのheat shock処理をした後、1 mlのLB培地を加え、37°Cで1 hr incubateした。このうち、150 μ lずつをLB agar plate (100 μ g/ml ampicillin, 1 mM IPTG, 0.02% X-gal)上に広げ、37°Cで12時間培養した。発現した白色コロニーを選択し、insertion領域を含むプラスミドを保有している株とした。

7) エステラーゼ活性株のスクリーニング

① 試薬

基質溶液 1% DL-ester, 0.01% Bromocresol purple, 10 mM Tris/HCl pH 7.5

② 操作

基質溶液を濾紙にしみこませ、6)-③で得られた形質転換株を濾紙上にload

し、30 °Cで3 hr静置した。コロニー周辺の色調を青紫色から黄色に変化させるコロニーを選択し、目的の遺伝子を持つ株とした。

8) サブクロンの調製

7)-②で得られたエステラーゼ活性菌株の保有するプラスミドのinsertion領域(約1.3 kbの Sma I - Cla I DNA fragment) を種々の制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動後、ゲル断片より回収した。各フラグメントを M13 mp 18 または mp 19に連結し、全ての断片をカバーするように各種クローンを調製した。

9) 鋳型一本鎖DNAの調製

① 試薬

H soft agar 10 g polypeptone, 5 g agar in 1L water

Indicator cell 大腸菌タイプカルチャーをLB培地で一晚培養したもの

X-gal plate 10 g polypeptone, 2.5 g NaCl, 15 g agar, 1 ml of 40 mg/ml X-gal in DMF in 1L water

PEG 溶液 20 % PEG 6000, 2.5 M NaCl

② プラーク形成

8)で調製した各種M13 mp18 または mp19由来のRF DNAを*E. coli* JM109のコンペテントセルと混合し、0 °C, 60 min静置した。42 °C, 2 minのヒートショック後、インジケーターセル 200 µl, 100 mM IPTG 20 µl, H soft agar 2.5 ml (55 °C)とともにX-gal plate上に広げた。37 °C, 8 hr培養し、生じたプラークを一本鎖DNAの調整に用いた。

③ 鋳型一本鎖DNAの調製

宿主菌(*E. coli* JM109)をLB培地で一晚培養したものを前培養液とした。2 x YT培地に 1/100 vol. の前培養液を接種し、37 °C で2~3 時間培養した(OD₅₅₀ = 0.2 ~ 0.3)。そのうち3 ml ずつを殺菌済み試験管に分注し、②で得られたプラークを接種し、37 °C で約8 hr培養した。12000 rpm, 4 °C, 10 minの遠心分離で沈殿を除き、さらに上清を12000 rpm, 4 °C, 30 minの遠心分離で沈殿が混入ないように上清を得た。得られた上清に 1/5 vol. のPEG溶液を加え、攪拌後、

室温に30 min 静置した。12000 rpm, 15 °C, 10 minの遠心分離で上清を完全に除いき、得られた沈殿を100 µlのTE bufferに溶解した。1/2 vol. のフェノール（水で飽和したもの）を加え、攪拌し、12000 rpm, 15 °C, 1 minの遠心分離で上清を得た。得られた上清より、エタノール沈殿によりDNAを回収し、20 µlのTE bufferに溶解し、一本鎖DNA溶液とした。

1 0) シークエンス反応

① 試薬

Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (United States Biochemical corporation) 東洋紡 (株) より購入

[α - ^{32}P] dCTP 10 µCi/µl or 10µM (100 Ci/mmol)

② アニールング反応

Primer 1 µl, Reaction buffer 2 µl, DNA soln. 7 µl (approx. 1µg) の反応組成液を65 °Cで5 min保温した後、室温に30 min 静置した。30 °C以下に下がればアニールングは完了する。反応終了液は、氷中保存した。

③ ラベリング反応

ラベリングミックスを純水で5倍に希釈した。Sequenase溶液を希釈液で5~8倍に希釈し、以下の反応液組成でラベリング反応を行った。

| | |
|-------------------------------------|---------|
| Annealing mix | 10.0 µl |
| 0.1 M DTT | 1.0 µl |
| Diluted labeling mix | 2.0 µl |
| [α - ^{32}P] dCTP | 0.5 µl |
| Diluted Sequenase | 2.0 µl |

上記組成の反応液をよく混合し、室温で5 min反応を行った。

④ ターミネーション反応

4本のチューブに2.5 µlのddGTP, ddATP, ddCTP, ddTTP termination mixを分注し、③のラベリング反応液を3.5 µlずつ分注し、37 °Cで5 min保温した。その後、それぞれのチューブに4 µlのstop solutionを加え、氷中に保存した。

1 1) 変成ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びオートラジオグラフ

① ポリアクリルアミドゲルの作成

ガラス製ゲル板の1面をシリコン処理（ジメチルジクロロシラン溶液処理）し、風乾させた。生化学用尿素 42 g, 40% アクリルアミド溶液（アクリルアミド；ビスアクリルアミド = 39；1）15 ml, 10x TBE buffer 10 mlを脱イオン水に溶解し、100 mlとした。尿素を溶解し、濾過後、脱気し、過硫酸アンモニウム 60 μ g, TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) 50 μ l を加え、よく混合し、ゲル板に流し込んでゲルを作成した。

② ポリアクリルアミドゲル電気泳動

10) -④の反応終了液を 95 °C, 5 min 熱処理し、氷中に移して急冷した。あらかじめ pre run させたゲルに、2.5 μ l のサンプルを apply し、1800~2000 V で電気泳動した。泳動後のゲルは、10% MeOH-10% Acetic acid で 10 min 固定化し、濾紙上に移し取り、ゲル乾燥機で乾燥させた。乾燥したゲルをフィルム (Kodak XAR-5) に一晩露光させ、現像後、塩基配列を解析した。

2、第2章の実験

1) エステラーゼの精製

① 無細胞抽出液の調製

E. coli C600 / pPE117の培養液 6 L より得られた湿菌体 (約160 g) を 200 ml buffer A (20 mM Phosphate buffer, 1 mM EDTA, pH7.0) に懸濁し、超音波細胞破碎機で処理した。13000rpm, 5 °C, 20 min の遠心分離で得られた上清を無細胞抽出液 (cell free extract) とした。

② 硫酸分画

無細胞抽出液 200 ml に 35 % 飽和となるように硫酸アンモニウム (硫酸) を加えた。13000rpm, 5 °C, 20 min の遠心分離で沈殿を除去し、得られた上清に 60 % 飽和となるように硫酸を加え、13000rpm, 5 °C, 20 min の遠心分離で沈殿を回収した。得られた沈殿を少量の buffer A に溶解し、透析チューブにいれ、同 buffer にて透析した。

③ DEAE Sephadexカラムクロマトグラム

buffer A で平衡化した DEAE-Sephadex A-50 カラム (2.6 x 25cm) に、透析サンプルを吸着させた。NaCl の 0 ~ 0.4 M linear gradient で、タンパク質を溶出し、エステラーゼ活性を示す画分を集めて硫酸濃縮した。

④ ゲル濾過

Sephadex G-100 カラム (2.6 x 50 cm) に、③の濃縮サンプルをかけ、buffer A で溶出させた。エステラーゼ活性を示す画分を集めて硫酸濃縮した。

2) タンパク質濃度の測定

タンパク質濃度の測定は、A 280 によるモニタリングまたは、Folin-Lowry 法により測定した。⁸⁵⁾

① 試薬

A 液 ; 2 % Na_2CO_3 (0.1 N NaOH)

B 液 ; 0.5 % $\text{CuSO}_4/5\text{H}_2\text{O}$ (1 % 酒石酸カリウム)

C 液 ; A 液 50 ml + B 液 1 ml

D 液 ; フェノール試薬

② 操作

2.5 ml のC液に、0.5 ml のサンプルを加え、室温で 10 min 静置した。D 液 0.2 ml を加え、30 min 後に OD_{750nm} を測定した。アルブミンを用いた検量線を作成し、タンパク質濃度を測定した。

3) ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びゲル濾過

① SDS PAGE

タンパク質濃度が 500 µg/ml となるように調製し、10 µl のサンプルに 1 µl の 11% SDS を添加し、沸騰水中に 5 min 静置した。得られた変性タンパク液を Pharmacia Phastsystem を用い、SDS PAGEを行った。

② IEF (Isoelectric focusing)

Pharmacia Phastsystem を用いて IEF (Isoelectric focusing) を行い、エステラーゼの等電点を測定した。

③ HPLCによるゲル濾過

未変性状態のエステラーゼの分子量は、HPLCによるゲル濾過により求めた。TSK-gel G4000SW と G3000SW (7.8 x 450 mm 共に東ソー (株) 製) をタンデムに連結し、0.2 M リン酸バッファー (pH 6.8) を 1 ml/min で流出させた。分子量既知のマーカールとの比較により、分子量を求めた。

4) エステラーゼ活性の測定

20 ml の 50 mM リン酸 buffer (pH 7.0) に 50 mM 濃度となるように DL-ester を添加した。適当量の酵素溶液を添加し、30 °C で酵素反応を行った。0.05 N NaOH で滴定し、初期 10 分間の加水分解速度より酵素活性を求めた。酵素活性 1 U (unit) は、1 分間に 1 µm の DAT を生成する酵素量とした。

5) エステラーゼの pH 安定性及び至適 pH

① 試薬

| Mcllvaine buffer | pH | 20 mM Citric acid | 40 mM Na ₂ HPO ₄ |
|------------------|-----|-------------------|--|
| | 3.0 | 79.45 ml | 20.55 ml |
| | 4.0 | 61.45 | 38.55 |
| | 5.0 | 48.50 | 51.50 |

| | | |
|-----|-------|-------|
| 6.0 | 36.85 | 63.15 |
| 7.0 | 17.65 | 82.35 |

50 mM Tris/HCl pH 7.0, 8.0, 9.0

② 操作

各buffer 20ml に酵素溶液 100 μ l (5 mg/ml) を添加し、5 $^{\circ}$ C にて 24 hr 静置した。静置後、各buffer を pH 7.0 に調整し、基質を添加し、酵素活性を測定し、pH 安定性とした。

各pH における酵素活性を測定し、反応至適pHとした。

6) エステラーゼの熱安定性及び反応至適温度

① 熱安定性

酵素溶液を 40~80 $^{\circ}$ C で 30 min 熱処理し、残存活性を測定した。

② 反応至適温度

30~80 $^{\circ}$ C の各温度における酵素活性を測定した。

7) 各種メタルイオンの酵素活性に及ぼす影響

酵素溶液を PD-10 カラムで溶出し、EDTA フリーとした。20 ml の 50 mM リン酸バッファー (pH 7.0) に、最終濃度 1 mM となるように各種金属塩を添加し、酵素溶液を加え、室温で 20 min 静置した。その後、基質を添加し、酵素活性を測定した。

8) 各種界面活性剤及び有機溶剤の酵素活性に及ぼす影響

20 ml の 50 mM リン酸バッファー (pH 7.0) に、各最終濃度となるように各種界面活性剤または有機溶剤を添加し、基質、酵素溶液を添加して酵素活性を測定した。

9) ミカエリス定数の測定

20 ml の 50 mM リン酸バッファー (pH 7.0) に、各最終濃度となるように DL-エステルを溶解した。酵素溶液を添加して酵素活性を測定し、酵素反応速度と基質濃度の逆数を Lineweaver-Burk プロットし、 K_m 及び V_{max} を求めた。

1 0) ハロパーオキシダーゼ活性の測定

ハロパーオキシダーゼ活性の測定は、Hager らの方法⁵³⁾にしたがった。すなわち、3 ml の 0.5 M sodium acetate buffer (pH 5.5) に、monochlorodimedon (50 mM), H₂O₂(7.8 mM), potassium bromide (100 mM) を加えた。適当量の酵素溶液を加えてアッセイを開始し、290 nm の吸光度の変化を測定した。ブランクに対する吸光度の変化より、酵素活性を求めた。酵素活性の 1 U (unit) は、1 分間に 1 μm ol の monobromomonochlorodimedon を生成する酵素量と規定した。

monochlorodimedon ; $\epsilon = 20.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 290 nm

monobromomonochlorodimedon ; $\epsilon = 0.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 290 nm

1 1) ハロパーオキシダーゼ活性の至適 pH の測定

pH 3.0 ~ 5.8 の 0.5 M sodium acetate buffer を調製し、pH の異なる各バッファー中におけるハロパーオキシダーゼ活性を 1 0) と同様に求めた。

3、第3章の実験

1) DATの化学純度の測定

DATの化学純度の測定は、HPLCを用いた。試料を1.0 g量り、移動相で希釈して100 mlとし、以下の条件でHPLC分析し、ピーク面積比を化学純度とした。

カラム： TOSOH ODS 120 A
移動相： $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/85\% \text{H}_3\text{PO}_4 = 55/45/0.1$
流速： 0.7 ml/min
検出： 220 nm

2) DATの光学純度の測定

DATの光学純度の測定は、ジアステレオマー法を用いた。

① 試薬

- ・ 10% (v/v) 塩化チオニル溶液： 0.5 ml の塩化チオニルに 0.5 μl DMF を加え、ヘキサンで希釈し、総量を 5 ml とした。
- ・ 8% (v/v) (s)-(+)-2-オクタノール： 0.4 ml の (s)-(+)-2-オクタノールをトルエンで希釈し、総量を 5 ml とした。

② 操作

1 ml の 10% (v/v) 塩化チオニル溶液に、15 μl のサンプルを入れ、よく攪拌し、室温で 30 min 静置した。過剰の試薬をトッピングで除去し、1 ml の 8% (v/v) (s)-(+)-2-オクタノールを加え、100 °C で 1 時間保温した。反応液を室温まで冷却し、下記の条件でガスクロ分析した。

カラム： キャピラリーカラム DB-5 1162235

カラム温度： 200 °C

インジェクション/検出温度： 220 °C

検出器： FID

H_2 1.8 kg/cm², Air 2.4 kg/cm², He 3.8 kg/cm²

③ 計算式

$$\text{光学純度 (\% e.e.)} = \frac{(\text{D体のピーク面積} - \text{L体のピーク面積}) \times 100}{\text{D体のピーク面積} + \text{L体のピーク面積}}$$

4、第4章の実験

1) メチルコハク酸ジメチルの光学分割

50 ml の 50 mM リン酸 buffer (pH 7.0) に 5 g のラセミ体メチルコハク酸ジメチルを懸濁し、0.5 ml の MR-2103 株培養菌体懸濁液 (菌体乾燥重量として約 7%含有) を加えた。30 °C, pH 7.0 にて酵素反応を行い、この間、10 % (w/w) NaOHを用いて pH をコントロールした。反応終了後、30 ml の酢酸エチルで 2 回抽出した。有機相をあわせ、無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧濃縮し、2.1 g の未反応ジエステルを得た。抽残水相に 30 % (w/w) H₂SO₄ を加え、pH 2.0 に調整し、30 ml の酢酸エチルで 2 回抽出した。有機相をあわせ、無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧濃縮し、1.9 g のモノエステルを得た。¹H および ¹³C NMR 分析の結果、酵素反応生成物は、(R)-3-カルボキシ酪酸メチルであった。光学純度は、下記の条件で HPLC 分析により決定した。モノエステルは、HCl/MeOH 処理でジエステルに誘導後、分析した。残存ジエステルは、(S)-Dimethyl methylsuccinate であり、光学純度は 100 % e.e. であった。酵素反応生成物の光学純度は 98.8 % e.e. であった。

カラム： Chiralcel OD

移動相： Hexane/Isopropanol/Trifluoroacetic acid = 90/10/0.1

流速： 0.5 ml/min

検出： 220 nm

(R)-Methyl 3-carboxybutyrate; ¹H NMR (CDCl₃) δ=1.27 (3H, J=7.2 Hz, d), 2.44 (1H, J=5.67, 16.7 Hz, dd), 2.75 (1H, J=8.37, 16.7 Hz, dd), 2.95 (1H, dqd), 3.69 (3H, s), 10.58 (1H, s); ¹³C NMR (CDCl₃) δ=16.57 (CH₃), 35.31 (CH), 36.66 (CH₂), 51.43 (CH₃), 172.11 (C, ester), 181.20 (C, acid). MS m/z (%): 128 (29), 115 (94), 100 (54), 87 (90), 74 (77), 59 (65), 43 (100), 41 (60).

2) メチルコハク酸-4-*t*-ブチル-1-メチルエステルの光学分割

① ラセミ体メチルコハク酸-4-*t*-ブチル-1-メチルエステルの合成

イタコン酸-1-メチルエステル 50 g を 100 ml のトルエンに溶解し、ガラス製オートクレーブに仕込み、20 g のイオン交換樹脂 (RCP-160H、三菱化学) を添加した。29 g のイソブチレンを冷却下、添加し、室温にて 5 時間反応した。反応終了液よりイオン交換樹脂を濾過し、等量の 10 % 炭酸ソーダ水溶液で 2 回

洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、濃縮し、48.9 g のイタコン酸-4-*t*-ブチル-1-メチルエステルを得た。

得られたイタコン酸-4-*t*-ブチル-1-メチルエステル全量を 50 ml のメタノールに溶解し、0.25 g の 5% パラジウム/カーボン（和光純薬）を添加した。これに 1 kg/cm² となるように水素を添加し、2 時間反応した。反応終了後、触媒を濾別し、減圧濃縮することにより、44.2 g のラセミ体メチルコハク酸-4-*t*-ブチル-1-メチルエステルを得た。

② メチルコハク酸-4-*t*-ブチル-1-メチルエステルの光学分割

基質としてラセミ体メチルコハク酸-4-*t*-ブチル-1-メチルエステルを用いた以外は全て 1) と同様にエステラーゼにより光学分割した。5 g のラセミ体エステルより、2.2 g の光学活性メチルコハク酸-4-*t*-ブチル-1-メチルエステル及び 1.9 g の光学活性メチルコハク酸-4-*t*-ブチルエステルを得た。得られた光学活性メチルコハク酸-4-*t*-ブチル-1-メチルエステルをトリフルオロ酢酸で処理したのち、3 倍モルの水酸化ナトリウム水溶液で加水分解し、光学活性メチルコハク酸とし、5-1) と同様に光学純度を測定したところ、(*S*)-体 95.5% e.e. であった。酵素反応生成物である光学活性メチルコハク酸-4-*t*-ブチルエステルを上記と同様に処理し、光学純度を測定したところ、(*R*)-体 99.5% e.e. であった。

(*S*)-4-*t*-Butyl-1-methyl methylsuccinate; ¹H NMR(CDCl₃) δ=1.20 (3H, d, -CH₃), 1.44 (9H, s, -*t*-Bu), 2.34 (1H, dd, -CH₂-), 2.65 (1H, dd, -CH₂-), 2.83-2.91 (1H, m, -CH-), 3.69 (3H, s, -COOCH₃); ¹³C NMR(CDCl₃) δ=16.90 (CH₃), 28.05 (*t*-Bu), 35.76 (CH₂), 39.06 (CH), 51.77 (CH₃), 171.00 (C,*t*-Bu-ester), 175.84 (C, Me-ester);

$[\alpha]_D^{25} = -2.11$ (neat).

(*R*)-4-*t*-Butyl methylsuccinate; ¹H NMR (CDCl₃) δ=1.24 (3H, d, -CH₃), 1.44 (9H, s, -*t*-Bu), 2.36 (1H, dd, -CH₂-), 2.64 (1H, dd, -CH₂-), 2.86-2.93 (1H, m, -CH-), 9.80 (1H, s, -COOH); ¹³C NMR(CDCl₃) δ=16.69 (CH₃), 28.02 (*t*-Bu), 35.91 (CH₂), 38.75 (CH), 81.01 (*t*-Bu), 170.98 (C,*t*-Bu-ester), 181.53 (C, acid);

$[\alpha]_D^{25} = +4.74$ (c=2.30, EtOH).

3) 2-メチルグルタル酸ジメチルの光学分割

基質としてラセミ体 2-メチルグルタル酸ジメチルを用いた以外は全て5-1)と同様にエステラーゼにより光学分割した。5 g のラセミ体エステルより、2.3 g の光学活性 2-メチルグルタル酸ジメチル及び 1.8 g の光学活性 2-メチルグルタル酸モノメチルエステルを得た。¹H および ¹³C NMR 分析の結果、酵素反応生成物は、(R)-4-カルボキシ吉草酸メチルであった。光学純度は、下記の条件で GLC 分析により決定した。モノエステルは、HCl/MeOH 処理でジエステルに誘導後、分析した。残存ジエステルは、(S)-Dimethyl 2-methylglutarate であり、光学純度は 99.0% e.e. であった。酵素反応生成物の光学純度は 98.0% e.e. であった。

カラム： CP-Chirasil Dex CB (0.25mm x 25m)

カラム温度： 105 °C

インジェクション/検出温度： 230 °C

検出器： FID

H₂ 1.8 kg/cm², Air 2.4 kg/cm², He 3.8 kg/cm²

(R)-methyl 4-carboxyvalerate; ¹H NMR (CDCl₃) δ=1.23 (3H, J=7.2Hz, d), 1.79-1.87 (1H, m), 1.96-2.04 (1H, m), 2.40 (2H, t), 2.54 (1H, ddq), 3.68 (3H, s), 11.58 (1H, s); ¹³C NMR (CDCl₃) δ=17.02 (CH₃), 28.59 (CH₂), 31.64 (CH₂), 38.65 (CH), 51.70 (CH₃), 173.69 (C, ester), 182.21 (C, acid). MS m/z (%): 142 (7), 129 (48), 114 (87), 101 (53), 87 (55), 74 (53), 55 (100), 43 (42), 41 (26).

4) ジメチル2-メチル-5-メチレンアジピン酸の光学分割

基質としてラセミ体ジメチル2-メチル-5-メチレンアジピン酸を用いた以外は全て5-1)と同様にエステラーゼにより光学分割した。5 g のラセミ体エステルより、2.4 g の光学活性ジメチル2-メチル-5-メチレンアジピン酸及び 2.0 g の光学活性モノメチルエステルを得た。¹H および ¹³C NMR 分析の結果、酵素反応生成物は、(R)-5-カルボキシ-2-メチレンヘキサン酸メチルであった。光学純度は、5-3)と同じ条件で GLC 分析により決定した。モノエステルは、HCl/MeOH 処理でジエステルに誘導後、分析した。残存ジエステルは、(S)-Dimethyl 2-methyl-5-methyleneadipate であり、光学純度は 99.0% e.e. であった。酵素反応生成物は (R)-methyl 5-carboxy-2-methylenehexanoate であり、光学純度は 98.0% e.e. であった。

(*S*)-Dimethyl 2-methyl-5-methyleneadipate; $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ $\delta=1.18$ (3H, d, $-\text{CH}_3$), 1.61, 1.87 (2H, ddd, $-\text{CH}_2-$), 2.32 (2H, dd, $-\text{CH}_2-$), 2.40-2.55 (1H, m, $-\text{CH}-$), 3.68 (3H, s, $-\text{COOCH}_3$), 3.75 (3H, s, $-\text{COOCH}_3$), 5.56, 6.16 (2H, s, $\text{CH}_2=$); $^{13}\text{C NMR}(\text{CDCl}_3)$ $\delta=17.12$ (CH_3), 29.59 (CH_2), 32.30 (CH_2), 38.95 (CH), 51.57, 51.84 (COOCH_3), 125.42 ($\text{CH}_2=$), 139.87 ($-\text{C}=\text{C}$), 167.49 ($\text{C}=\text{O}$), 176.88 ($\text{C}=\text{O}$);

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +16.0$ ($c=2.0$, CHCl_3).

(*R*)-methyl 5-carboxy-2-methylenehexanoate; $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ $\delta=1.24$ (3H, d, $-\text{CH}_3$), 1.64, 1.90 (2H, ddd, $-\text{CH}_2-$), 2.37 (2H, dd, $-\text{CH}_2-$), 2.46-2.54 (1H, m, $-\text{CH}-$), 3.76 (3H, s, $-\text{COOCH}_3$), 5.59, 6.18 (2H, s, $\text{CH}_2=$), 8.00-10.00 (1H, br, $-\text{COOH}$); $^{13}\text{C NMR}(\text{CDCl}_3)$ $\delta=17.08$ (CH_3), 29.50 (CH_2), 32.02 (CH_2), 38.84 (CH), 51.91 (COOCH_3), 125.47 ($\text{CH}_2=$), 139.72 ($-\text{C}=\text{C}$), 167.58 ($\text{C}=\text{O}$), 180.72 ($\text{C}=\text{O}$);

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -10.4$ ($c=2.0$, CHCl_3).

5) β -ヒドロキシイソ酪酸メチルの光学分割

基質としてラセミ体 β -ヒドロキシイソ酪酸メチルを用いた以外は全て5-1)と同様にエステラーゼにより光学分割した。5 g のラセミ体エステルより、1.9 g の光学活性 β -ヒドロキシイソ酪酸メチルを得た。比旋光度を測定したところ、 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +24.9$ ($c=2.0$, CH_3OH) であり、残存するエステルは(*S*)体で光学純度はほぼ 100% e.e. であった。しかしながら、酵素反応生成物である β -ヒドロキシイソ酪酸の水相中からの回収は困難であった。

6) α -クロロ- β -ヒドロキシプロピオン酸メチルの光学分割

基質としてラセミ体 α -クロロ- β -ヒドロキシプロピオン酸メチルを用いた以外は全て5-1)と同様にエステラーゼにより光学分割した。ただし、酵素反応温度は 15 °C, 中和には 14% アンモニア水を用いた。5 g のラセミ体エステルより、1.7 g の光学活性 α -クロロ- β -ヒドロキシプロピオン酸メチル及び 2.0 g の光学活性カルボン酸を得た。光学純度は、5-3)と同じ条件で GLC 分析により決定した。カルボン酸は、 HCl/MeOH 処理でエステルに誘導後、分析した。残存エステルは、(*S*)-methyl 3-chloro-2-hydroxypropionate であり、光学純度は 99.0% e.e. であった。酵素反応生成物は (*R*)-2-chloro-3-hydroxypropionic acid であり、光

学純度は 30.0 % e.e. であった。

(*S*)-methyl 2-chloro-3-hydroxypropionate; $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ $\delta=3.79$ (1H, s, -OH), 3.83 (3H, s, -COOCH₃), 3.98-4.03 (2H, m, -CH₂-), 4.43 (1H, t, -CH-); $^{13}\text{C NMR}(\text{CDCl}_3)$ $\delta=53.31$ (-CH₃), 56.88 (-CH-), 64.14 (-CH₂-), 169.08 (C=O);

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -6.74$ (neat)

7) N-アセチル-β-アミノイソ酪酸メチルの光学分割

基質としてラセミ体 N-アセチル-β-アミノイソ酪酸メチルを用いた以外は全て5-1)と同様にエステラーゼにより光学分割した。5 g のラセミ体エステルより、2.0 g の光学活性 N-アセチル-β-アミノイソ酪酸メチルを得た。光学純度は、5-3)と同じ条件で GLC 分析により決定した。残存するエステルは(*R*)体で光学純度はほぼ 100 % e.e. であった。しかしながら、酵素反応生成物である光学活性 N-アセチル-β-アミノイソ酪酸の水相中からの回収は困難であった。

(*R*)-methyl 3-acetylaminoisobutyrate; $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ $\delta= 1.20$ (3H, d, -CH₃), 1.95 (3H, s, -COCH₃), 2.62-2.78 (1H, m, -CH-), 3.20-3.60 (2H, m, -CH₂-), 3.70 (3H, s, -COOCH₃), 6.00 (1H, br, -NH-); $^{13}\text{C NMR}(\text{CDCl}_3)$ $\delta= 14.9$ (-CH₃), 23.3 (-COCH₃), 39.5 (-CH-), 41.6 (-CH₂-), 51.9 (-COOCH₃), 170.2 (C=O), 176.1 (-COO-);

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +53.12$ (c = 2.9, MeOH)

参考文献

- 1) 山田靖宙, 岡田弘輔, 非環状炭化水素の微生物変換反応, 有合化, **41**, 1000 (1983).
- 2) 太田博道, 微生物及び酵素による有機化合物の酸化、還元反応とその有機合成への応用, 有合化, **41**, 1018 (1983).
- 3) 大石武, 秋田弘幸, 微生物を利用した二個のキラル中心を含む光学活性シントンの合成, 有合化, **41**, 1031 (1983).
- 4) 森謙治, 須貝威, 天然物合成における微生物や酵素の利用, 有合化, **41**, 1044 (1983).
- 5) 折谷隆之, 山下恭平, 微生物による不斉加水分解を用いる(±)-テルペンアルコール類の光学分割, 有合化, **41**, 1054 (1983).
- 6) 清水昌, 山田秀明, 酵素法によるアミノ酸の生産, 有合化, **41**, 1064 (1983).
- 7) 宇多川隆, 廣瀬義夫, 微生物酵素によるヌクレオシド系生理活性物質の生産, 有合化, **41**, 1076 (1983).
- 8) 長谷川淳三, 微生物による光学活性 β -ヒドロキシ酸の生産とその有機合成への利用, 発酵工学, **62**, 341 (1984).
- 9) 大橋武久, 長谷川淳三, 微生物、酵素反応により得られた光学活性物質を利用する生理活性物質の新規合成法の開発, 有合化, **45**, 331 (1987).
- 10) 太田博道, 微生物および酵素の有機合成への応用, 有合化, **46**, 726 (1988).
- 11) 中村薫, 大野惇吉, 微生物を用いた光学異性体の作り分け, 有合化, **49**, 110 (1991).
- 12) 須貝威, 土屋滋夫, 望月直樹, 太田博道, 生体触媒を用いる光学活性ヒドロキシ酸類の調製法, 有合化, **53**, 48 (1995).
- 13) K.Krisch, in "The Enzymes," Vol.5, 3rd Ed., ed. by P. D. Boyer, Academic Press, New York, 43 (1971).
- 14) Y. Amaki, E. E. Tulin, S. Ueda, K. Ohmiya, T. Yamane, Purification and properties of a thermostable esterase of *Bacillus stearothermophilus* produced by recombinant *Bacillus brevis*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 238 (1992).
- 15) K. Meghji, O. P. Ward, A. Araujo, Production, purification, and properties of extracellular carboxyl esterase from *Bacillus subtilis* NRRL 365. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 3735 (1990).
- 16) A. Sugihara, Y. Shimada, T. Nagao, T. Iizumi, K. Nakamura, T. Fukase, Y. Tominaga, Purification and characterization of a carboxylesterase from *Pseudomonas sp.* KWI-56. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 752 (1994).
- 17) A. Nakagawa, T. Tsujita, H. Okuda, Purification and some properties of intracellular esterase from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biochem.*, **95**, 1047 (1984).
- 18) M. Iwai, S. Okumura, E. L. de Leal, Y. Tsujisaka, Purification of four esterase from *Aspergillus niger* NRRL 337. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1869 (1983).
- 19) G. Sierra, Dissociation of esterase from proteinase activity of *Bacillus subtilis* spores. *Can. J. Microbiol.*, **13**, 673 (1967).

- 20) A. Matsunaga, N. Koyama, Y. Nosoh, Purification and properties of esterase from *Bacillus stearothermophilus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **160**, 504 (1974).
- 21) K. Drauz, (ed.): Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, VCH, Weinheim, (1995).
- 22) C. T. Goodhue, J. R. Schaeffer, Preparation of L(+)-β-Hydroxyisobutyric acid by bacterial oxidation of isobutyric acid. *Biotechnol. Bioeng.*, **13**, 203 (1971).
- 23) J. Hasegawa, M. Ogura, S. Hamaguchi, M. Shimazaki, H. Kawaharada, K. Watanabe, Stereoselective conversion of isobutyric acid to β-hydroxyisobutyric acid by microorganisms. *J. Ferment. Technol.*, **59**, 203 (1981).
- 24) M. Shimazaki, J. Hasegawa, K. Kan, K. Nomura, Y. Nose, H. Kondo, T. Ohashi, K. Watanabe, Synthesis of captopril starting from an optically active β-hydroxy acid. *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 3139 (1982).
- 25) M. A. Ondetti, D. W. Cushman, Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme- New class of orally active antihypertensive agents. *Science*, **196**, 441 (1977).
- 26) M. A. Ondetti, D. W. Cushman, *USP* 4,105,776 (1978).
- 27) D. W. Cushman, H. S. Cheung, E. F. Sabo, M. A. Ondetti, Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme- carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl Amino-Acids. *Biochemistry*, **16**, 5487 (1977).
- 28) M. A. Ondetti, D. W. Cushman, *USP* 4,046,889 (1977).
- 29) T. Sawayama, M. Tsukamoto, T. Sasagawa, S. Naruto, J. Matsumoto, H. Uno, An improved optical resolution of 3-acetylthio-2-methylpropionic acid by use of a new chiral amine, N-isopropyl phenylalaninol. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1382 (1989).
- 30) V. H. M. Elferink, J. G. T. Kierkels, M. Kloosterman, J. H. Roskam, *EP Application*, 369,553 (1990).
- 31) A. Sakimae, A. Hosoi, E. Kobayashi, N. Ohsuga, R. Numazawa, I. Watanabe, H. Ohnishi, Screening of microorganisms producing D-β-acetylthioisobutyric acid from methyl DL-β-acetylthioisobutyrate. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1252 (1992).
- 32) A. Sakimae, R. Numazawa, H. Ohnishi, A newly isolated microorganism producing D-β-acetylthioisobutyric acid from methyl DL-β-acetylthioisobutyrate. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1341(1992).
- 33) A. Sakimae, Y. Kobayashi, N. Ohsuga, R. Numazawa, H. Ohnishi, Chemical racemization of methyl L-β-acetylthioisobutyrate. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 17 (1993).
- 34) A. Sakimae, E. Ozaki, H. Toyama, N. Ohsuga, R. Numazawa, I. Muraoka, E. Hamada, H. Ohnishi, Process conditions for production of D-β-acetylthioisobutyric acid from methyl DL-β-acetylthioisobutyrate with the cells of *Pseudomonas putida* MR-2068. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 782 (1993).
- 35) J. K. Kristjansson, Thermophilic organisms as sources of thermostable enzymes. *Trends Biotechnol.*, **7**, 349 (1989).
- 36) B. L. Zamost, H. K. Nielsen, R. S. Starnes, Thermostable enzymes for industrial applications. *J. Industrial Microbiology*, **8**, 71 (1991).

- 37) J. Marmur, Procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J.Mol.Biol.*, **3**, 208 (1961).
- 38) H. C. Birnboim, J. Doly, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513 (1979).
- 39) J. Norrander, T. Kempe, J. Messing, Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene*, **26**, 101 (1983).
- 40) F. Sanger, S. Nickler, A. R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **74**, 5463 (1977).
- 41) A. Ben-Bassat, K. Bauer, S. Chang, K. Myambo, A. Boosman, S. Chang, Processing of the initiation methionine from proteins: properties of the *Escherichia coli* methionine aminopeptidase and its gene structure. *J.Bacteriology*, **169**, 751 (1987).
- 42) A. Ben-Bassat, K. Bauer, Amino-terminal processing of proteins. *Nature*, **326**, 315 (1987).
- 43) J. Shine, L. Dalgarno, Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 1342 (1974).
- 44) I. Tinoco Jr., P. N. Borer, B. Dengler, M. D. Levine, O. C. Uhlenbeck, D. M. Crother, J. Gralla, Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids. *Nature -Biol*, **246**, 40 (1973).
- 45) J. G. Belasco, J. T. Beatty, C. W. Adams, A. von Gabain, S. N. Cohen, Differential expression of photosynthesis genes in R-capsulate results from segmental differences in stability within the polycistronic *rxca* transcript. *Cell*, **40**, 171 (1985).
- 46) J. G. Belasco, G. Nilsson, A. von Gabain, S. N. Cohen, The stability of *Escherichia coli* gene transcripts is dependent on determinants localized to specific messenger-RNA segments. *Cell*, **46**, 245 (1986).
- 47) M. N. Hall, J. Gabay, M. Debarbouille, M. Schwartz, A role for mRNA secondary structure in the control of translation initiation. *Nature*, **295**, 616 (1982).
- 48) A. Spena, E. Krause, B. Dobberstein, Translation efficiency of zein messenger-RNA is reduced by hybrid formation between the 5'-untranslated and 3'-untranslated region. *EMBO.J.*, **4**, 2153 (1985).
- 49) S. Brenner, The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. *Nature*, **334**, 528 (1988).
- 50) C. Wolframm, F. Lingens, R. Mutzel, K. -H. van Pee, Chloroperoxidase-encoding gene from *Pseudomonas pyrocinia*: sequence, expression in heterologous hosts, and purification of the enzyme. *Gene*, **130**, 131 (1993).
- 51) W. Wiesner, K. -H. van Pee, F. Lingens, Purification and characterization of a novel bacterial non-heme chloroperoxidase from *Pseudomonas pyrocinia*. *J. Biol. Chem.*, **263**, 13725 (1988).
- 52) K. Arima, H. Imanaka, M. Kousaka, A. Fukuda, G. Tamura, Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 575 (1964).

- 53) W. D. Hewson, L. P. Hager, Bromoperoxidase and halogenated lipids in marine algae. *J. Phycol.*, **16**, 340 (1980).
- 54) I. Pelletier, J. Altenbuchner, A bacterial esterase is homologous with non-haem haloperoxidases and displays brominating activity. *Microbiology*, **141**, 459 (1995).
- 55) I. Pelletier, J. Altenbuchner, R. Mattes, A catalytic triad is required by the non-heme haloperoxidases to perform halogenation. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1250**, 149 (1995).
- 56) F. Bjorlking, S. E. Godtfredsen, O. Kirk, Lipase-mediated formation of peroxy-carboxylic acids used in catalytic epoxidation of alkenes. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1301 (1990).
- 57) F. P. Cuperus, S. Th. Bouwer, G. F. H. Kramer, J. T. P. Derksen, Lipase used for the production of peroxycarboxylic acids. *Biocatalysis*, **9**, 89 (1994).
- 58) F. Bjorlking, H. Frykman, S. E. Godtfredsen, O. Kirk, Lipase catalyzed synthesis of peroxycarboxylic acids and lipase mediated oxidations. *Tetrahedron*, **48**, 4587 (1992).
- 59) R. Bantleon, J. Altenbuchner, K. -H. van Pee, Chloroperoxidase from *Streptomyces lividans*: isolation and characterization of the enzyme and corresponding gene. *J. Bacteriol.*, **176**, 2339 (1994).
- 60) G. Bongs, Enzymatic chlorination using bacterial nonheme haloperoxidases. *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 53 (1993).
- 61) L. P. Hager, D. R. Morris, F. S. Brown, H. Eberwein, Chloroperoxidase. II. Utilization of halogen anions. *J. Biol. Chem.*, **241**, 1769 (1966).
- 62) D. R. Morris, L. P. Hager, Chloroperoxidase I. Isolation and properties of the crystalline glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **241**, 1763 (1966).
- 63) K. -H. van Pee, F. Lingens, Purification of bromoperoxidase from *Pseudomonas aureofaciens*. *J. Bacteriol.* **161**, 1171 (1985).
- 64) T. Dairi, T. Nakano, K. Aisaka, R. Katsumata, M. Hasegawa, Cloning and nucleotide sequence of the gene responsible for chlorination of tetracycline. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1099 (1995).
- 65) 伊藤伸哉, 生物界におけるハロゲン化酵素の多様性とその働き, 蛋白質 核酸 酵素, **41**, 256 (1996).
- 66) Lister K. P. Lam, Raymond A. H. F. Hui, and J. Bryan Jones, Enzymes in organic synthesis. 35. Stereoselective Pig Liver Esterase catalyzed hydrolysis of 3-substituted glutarate diesters. Optimazation of Enantiomeric excess via reaction conditions control. *J. Org. Chem.*, **51**, 2047 (1986).
- 67) Jiri Zemlicka and Leslie E. Craine, Enantiselective hydrolysis of dimethyl 2 α ,3 α -[(Dimethylmethylene)dioxy]-5 β -hydroxy-1 β ,4 β -cyclopentanedicarboxylate with Pig Liver Esterase. Stereoselective synthesis of methyl 2(R),3(S)-[(Dimethylmethylene)dioxy]-5(R)-hydroxy-1(S)-carboxy-4(R)-cyclopentanecarboxylate. A cyclopentane synthesis with all ring atoms chiral. *J. Org. Chem.*, **53**, 937 (1988).
- 68) Eric J. Toone, Michael J. Werth, and J. Bryan Jones, Active-site model for interpreting and

- predicting the specificity of Pig Liver Esterase. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 4946 (1990).
- 69) Zhuo-Feng Xie, Pseudomonas fluorescens lipase in asymmetric synthesis. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2**, 733 (1991).
 - 70) Philip G. Hultin, Franz-Josef Mueseler, and J. Bryan Jones, Enzymes in organic synthesis. 48. Pig Liver Esterase and Porcine Pancreatic Lipase catalyzed hydrolyses of 3,4-(Isopropylidenedioxy)-2,5-tetrahydrofuran diesters. *J. Org. Chem.*, **56**, 5375 (1991).
 - 71) M. Tanaka, M. Yoshioka, and K. Sakai, Highly asymmetric enzymatic hydrolysis and transesterification of meso-Bis(acetoxymethyl)- and Bis(hydroxymethyl)cyclopentane derivatives: an insight into the active site model of Rhizopus delemar lipase. *Tetrahedron: Asymmetry*, **4**, 981 (1993).
 - 72) R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, and L. A. Cuccia, A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reaction catalyzed by cholesterol esterase, lipase from Pseudomonas cepacia, and lipase from Candida rugosa. *J. Org. Chem.*, **56**, 2656 (1991).
 - 73) A. J. M. Janssen, A. J. H. Klunder, and B. Zwanenburg, Resolution of secondary alcohols by enzyme-catalyzed transesterification in alkyl carboxylates as the solvent. *Tetrahedron*, **47**, 7645 (1991).
 - 74) E. Guibe-Jampel, G. Rousseau, J. Salaun, Enantioselective hydrolysis of racemic diesters by Porcine Pancreatic Lipase. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1080 (1987).
 - 75) C.-S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, and C. J. Sih, Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 7294 (1982).
 - 76) B. Rigo, D. Fasseur, P. Cauliez, D. Couturier, Reaction of trimethylsilyl derivatives with Meldrum's acid: a new and easy monofunctionalization of malonic acid. *Tetrahedron Lett.*, **30**, 3073 (1989).
 - 77) K. Matoba, T. Yamazaki, An easy synthesis of monomethyl malonate derivatives. *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2955 (1983).
 - 78) H. Ogawa, T. Chihara, S. Teratani, K. Taya, Selective monoesterification of the longer carbon chain in a mixture of dicarboxylic acids by adsorbing and aligning the acids on alumina. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **17**, 1337 (1986).
 - 79) M. Lobell, M. P. Schneider, Enzyme-assisted preparation of pure alkanedicarboxylic acid monoesters: chain-length dependence of Porcine Liver Esterase (PLE)-catalyzed hydrolysis. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **15**, 1713 (1993).
 - 80) L. Brady, A. M. Brzozowski, Z. S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J. P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Høge-Jensen, L. Norskov, L. Thim, U. Menge, A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*, **343**, 767 (1990).
 - 81) M. Cygler, P. Grochulski, R. J. Kazlauskas, J. D. Schrag, F. Bouthillier, B. Rubin, A. N. Serregei, and A. K. Gupta, A structural basis for the chiral preferences of lipases. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 3180 (1994).

- 82) K. Achiwa, Highly effective catalytic asymmetric hydrogenation of itaconic acid with new cationic chiral pyrrolidinephosphine-rhodium complexes. *Chem. Lett.*, 561 (1978).
- 83) I. Ojima, T. Kogure, and N. Yoda, Asymmetric hydrogenation of prochiral olefins catalyzed by rhodium complexes with chiral pyrrolidinodiphosphines. Crucial factors for the effective asymmetric induction. *J. Org. Chem.*, 45, 4728 (1980).
- 84) 渡辺順次, 高分子液晶－高分子効果とその機能化について, 化学工業, 40, 854 (1989).
- 85) M. Abo, K. Mori, Synthesis of (*R*)-Callosobruchusic acid from methyl (*R*)-3-carboxybutanoate. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 265 (1993).
- 86) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).

本論文の基礎となる原著

- 1, Eiji Ozaki, Akihiro Sakimae, and Ryozo Numazawa,
Cloning and Expression of *Pseudomonas putida* Esterase Gene in *Escherichia coli* and Its Use
in Enzymatic Production of D- β -Acetylthioisobutyric Acid,
Biosci. Biotech. Biochem., **58** (9), 1745-1746, 1994.
- 2, Eiji Ozaki, Akihiro Sakimae, and Ryozo Numazawa,
Nucleotide Sequence of the Gene for a Thermostable Esterase from *Pseudomonas putida*
MR-2068,
Biosci. Biotech. Biochem., **59** (7), 1204-1207, 1995.
- 3, Eiji Ozaki, Toshitaka Uragaki, Keiichi Sakashita, and Akihiro Sakimae,
Enzymatic Preparation of Alkanedicarboxylic Acid Monoesters,
Chem. Lett., 539-540, 1995.
- 4, Eiji Ozaki and Akihiro Sakimae,
Purification and Characterization of Recombinant Esterase of *Pseudomonas putida* MR-2068
and Application to Optical Resolution of Dimethyl Methylsuccinate,
J. Ferment. Bioeng., **83**, 535-539, 1997.
- 5, Eiji Ozaki and Keiichi Sakashita,
Esterase Catalyzed Regio- and Enantio-selective Hydrolysis of Substituted Carboxylates,
Chem. Lett., 741-742, 1997.

参考原著

- 1, Akihiro Sakimae, Eiji Ozaki, Hiroko Toyama, Naoto Ohsuga, Ryozo Numazawa, Itsumi
Muraoka, Eiichi Hamada, and Hisao Ohnishi,
Process Conditions for Production of D- β -Acetylthioisobutyric Acid from Methyl
DL- β -Acetylthioisobutyrate with the Cells of *Pseudomonas putida* MR-2068,
Biosci. Biotech. Biochem., **57** (5), 782-786, 1993.
- 2, 尾崎英司, 浦垣俊孝, 坂下啓一, 崎前明宏,
酵素による不斉加水分解反応を利用した光学活性カルボン酸の合成とその応用.
有機合成化学協会誌, **55** (7), 642-650, 1997.

謝辞

本研究に対し、御懇篤なる御指導と御助言を賜り、さらに本論文の御校閲を賜りました広島大学医学部総合薬学科 杉山政則教授に謹んで感謝の意を表します。

また、本論分を作成するに際し、御指導と御助言を賜りました広島大学医学部総合薬学科 太田茂教授、木村榮一教授、山崎和男教授に深く感謝致します。

本研究の機会を与えて頂き、御指導下さいました三菱レイヨン株式会社 中央技術研究所 岸田一夫所長、進藤瑞生 前副所長、中井芳雄副所長、同社豊橋事業所 寺田擴事業所長（前中央研究所長）に謹んで御礼申し上げます。さらに本研究の遂行にあたり、終始有益な御指導と御協力を頂きました三菱レイヨン株式会社 崎前明宏博士、坂下啓一博士をはじめ、多くの共同研究者に厚く御礼申し上げます。