

学位論文題名

微生物の不斉認識酸化還元能を利用した
光学活性化合物の生産に関する研究

学位論文内容の要旨

光学活性体の構造を持つ医薬や農薬は溶解度や融点などの物理化学的性質が同じであるにもかかわらず、R体とS体で生理活性が著しく異なる場合が多い。現在でも合成医薬のほぼ半数が光学活性体の構造を持つが、その多くがラセミ体で製造されている。医薬はそれぞれの光学活性体の生理活性に違いがなければラセミ体でもよいが、一方の光学活性体にマイナスの要因がある場合、もう一方の光学活性体のみで製造されなければならない、光学活性体の工業的な製造が必要とされる。しかしながら、一般的な化学合成ではR体とS体が等量で混合されたラセミ体が生成される。また、特殊な化学合成で光学活性化合物を合成する場合は高価な触媒、苛酷な反応条件等が必要であり、経済的、工業規模的な観点から問題点が多く、これまで工業的生産の例も少数である。一方、微生物や酵素のような生体触媒を利用して光学活性化合物を生産する方法は、穏和な条件で反応が行われ、高い光学純度も得られ、簡便なので、目的の生産能を有する生体触媒が見出せれば非常に有望であると考えられる。

本研究では、このような背景の中で、医薬の原料や中間体となる光学活性化合物の新規な生物学的生産方法を確立するを目的として、不斉認識酸化還元能を持っている微生物を広く微生物界に探索した。

1. 4-ヒドロキシ-2-ブタノンから光学活性1,3-ブタンジオールを生産する微生物をタイプカルチャーに検索し、Candida utilis、Candida arborea、Hansenula fabianii、Hansenula polymorpha、Kluyveromyces lactis、Pichia heedi、Issatchenkia scutalata等が(R)-1,3-ブタンジオールを生産し、Candida parapsilosis、Geotrichum candidum等が(S)-1,3-ブタンジオールを生産することを見いだした。

2. ラセミ体から光学活性1,3-ブタンジオールを生産する微生物をタイプカルチャーに探索し、多くの酵母、糸状菌、細菌、放線菌が光学活性1,3-ブタンジオールを生産することを見いだした。(S)-1,3-ブタンジオール生産菌株としてKluyveromyces lactis IFO 1267を、(R)-1,3-ブタンジオール生産菌株としてCandida parapsilosis IFO 1396を選択した。それぞれがラセミ体から高い光学純度の光学活性1,3-ブタンジオールを生成することを確認した。

3. Candida parapsilosisについて安価な工業製品であるラセミ体から(R)-1,3-ブタンジオールの生産最適株の選択を行い、Candida parapsilosis IFO 1396を選択した。様々な条件の検討を基に大量調製を行い、ペネム、カルバペネム抗生物質の重要中間体であるアゼチジノンの原料となる(高い光学純度の(R)-1,3-ブタンジオールの大量生産法を確立した。

4. Candida parapsilosis IFO 1396から1,3-ブタンジオールのS体を4-ヒドロキシ-2-ブタノンに酸化する(S)-1,3-ブタンジオール脱水素酵素の精製を行い、基質特異性の検討を行った。分子量は40,000であり、2-プロパノール、(S)-2-ブタノール、(S)-2-オクタノール、2,4-ペンタンジオール、(S)-1-フェニルエタノール等の2級アルコールのS体に高い活性を持っていた。

5. ラセミ体から抗鬱剤の原料である光学活性(S)-1-フェニル-1,3-プロパンジオールを生産する新規な微生物の探索を土壌から行い、土壌からSerratia属に属する細菌を分離した。

6. Serratia sp. No.2664を用いて(S)-1-フェニル-1,3-プロパンジオール生産に関する検討を行った。培地条件の検討において、酵母エキス、ポリペプトンの濃度を高め、炭素源をグリセリンに変えた培地で培養した菌体が高い生産性を示した。ラセミ体から高い光学純度の(S)-1-フェニル-1,3-プロパンジオールを調製した。

7. 2-オキソ-4-フェニル酪酸から光学活性2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸を生産する菌株の検索をタイプカルチャーを対象に行い、多くの細菌、酵母が光学活性2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸を生産することを見いだした。Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum IFO 3349を用いて生産の検討を行った。グルコース8%、酵母エキス1%、硫酸マンガン6水塩10ppmの培地で培養した定常期の菌体を反応に用いて、高い光学純度の(R)-2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸を調製した。

8. Leuconostoc dextranicum subsp. vinarium ATCC 27310を用いて、血圧降下剤の重要中間体である(R)-2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸生産に関与する不斉還元酵素の精製と性質の検討を行った。分子量は46,000で、基質特異性はアルデヒドに対する活性が高かった。アルデヒドのアルキル基が長鎖になるほど、活性は低下した。一方、2-オキソカルボン酸にも作用するが、アルデヒドの場合とは逆にカルボン酸のアルキル基が2-オキソヘキサン酸、2-オキソオクタン酸という長鎖になるほど活性は向上した。pH5.5から6.5付近に至適pHがあり、pH5.5から7.5範囲で安定であった。40℃から50℃付近に至適温度があり、熱安定性は40℃以下で安定であった。阻害剤として塩化水銀、パラクロロ水銀により強く阻害され、SH酵素と推定された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男

副 査 教 授 千 葉 誠 哉

副 査 教 授 本 間 守

学 位 論 文 題 名

微生物の不斉認識酸化還元能を利用した 光学活性化合物の生産に関する研究

本論文は、和文96頁、図17、表21、引用文献66、3章および総括からなり、他に参考論文7編が付されている。

合成医薬のほぼ半数が光学活性体の構造を持つが、一方の光学活性体にマイナスの要因がある場合、もう一方の光学活性体のみで製造されなければならない、光学活性体の工業的な製造が必要とされている。しかしながら、一般的な化学合成ではR体とS体が等量で混合されたラセミ体が生成され、特殊な化学合成で光学活性化合物を合成する場合は高価な触媒、苛酷な反応条件等が必要であり、経済的、工業規模的な観点から問題点が多く、工業的生産の例も少数である。一方、微生物や酵素のような生体触媒を利用して光学活性化合物を生産する方法は、反応自体は穏和な条件で、高い光学純度も得られ、簡便なので、非常に有望であると考えられ、生体触媒を用いて光学活性化合物を生産する新規な方法が望まれてきた。

本研究では、微生物の不斉認識酸化還元能を利用した光学活性化合物の新規な生産に関して、様々な医薬の原料になる3種類の光学活性化合物を生産する微生物を見出し、それらの微生物を用いて光学活性化合物を調製し、更に生産に関与する酵素を精製して特性を明らかにしたものである。

第一章では様々な医薬等の原料となる光学活性1,3-ブタンジオールを生産する微生物の検索、(R)-1,3-ブタンジオールの大量生産とそれに関与する酵素の精製について述べられ、下記の内容が含まれている。

1. 4-ヒドロキシ-2-ブタノンから光学活性1,3-ブタンジオールを生産する微生物をタイプカルチャーに検索し、光学活性1,3-ブタンジオールを生産する微生物を多数見いだした。
2. ラセミ体から光学活性1,3-ブタンジオールを生産する微生物をタイプカルチャーに検索し、多くの酵母、糸状菌、細菌、放線菌が光学活性1,3-ブタンジオールを

生産することを見いだした。Kluyveromyces lactis IFO 1267が高い光学純度の(S)-1,3-ブタンジオールを生成し、Candida parapsilosis IFO 1396が高い光学純度の(R)-1,3-ブタンジオールを生成することを確認した。

3. Candida parapsilosis IFO 1396を用いて安価な工業製品であるラセミ体から高い光学純度の(R)-1,3-ブタンジオールを大量に調製した。

4. Candida parapsilosis IFO 1396から1,3-ブタンジオールのS体を4-ヒドロキシ-2-ブタノンに酸化する(S)-1,3-ブタンジオール脱水素酵素の精製を行い、基質特異性を明らかにした。

第二章では抗鬱剤の原料となる(S)-1-フェニル-1,3-プロパンジオールをラセミ体から生産する微生物の自然界からの分離、同定とその微生物を用いての(S)-1-フェニル-1,3-プロパンジオールの生産について述べられ、下記の内容が含まれている。

1. ラセミ体から光学活性1-フェニル-1,3-プロパンジオールを生産する新規な微生物の探索を土壌から行い、土壌からSerratia属に属する細菌を分離した。

2. Serratia sp. No.2664を用いてラセミ体から高い光学純度の(S)-1-フェニル-1,3-プロパンジオールを調製した。

第三章では様々な医薬に利用できる光学活性2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸を2-オキシ-4-フェニル酪酸から生産する微生物の検索、その微生物を用いての(R)-2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸の生産とそれに関与する酵素の精製と特性について述べられ、下記の内容が含まれている。

1. 2-オキシ-4-フェニル酪酸から光学活性2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸を生産する菌株の検索をタイプカルチャーを対象に行い、多くの細菌、酵母が光学活性2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸を生産することを見いだした。Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum IFO 3349を用いて(R)-2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸の調製を行った。

2. Leuconostoc dextranicum subsp. vinarium ATCC 27310をから(R)-2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸生産に関与する不斉還元酵素の精製と性質の検討を行い、基質特異性等の特性を明らかにした。

以上の様に様々な医薬の原料になる3種類の光学活性化合物を生産する微生物を見出し、それらの微生物を用いて光学活性化合物を調製し、生産に関与する酵素を精製して特性を明らかにしたことにより、微生物の不斉認識酸化還元能を利用した光学活性化合物の新規な生産に関して、基礎的及び産業的な貢献を果たした。

よって審査員一同は、別に行った学力確認試験の結果を合わせて、本論文の提出者 松山 彰取 は博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。