

氏名(本籍)	仙 ^{せん} 波 ^ば 尚 ^{ひさし} (茨城県)		
学位の種類	博士(生物工学)		
学位記番号	博甲第5024号		
学位授与年月日	平成21年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	ヒドロキシニトリルリアーゼを用いた実用的な光学活性シアノヒドリン合成プロセスの開発		
主査	筑波大学准教授	博士(農学)	青柳秀紀
副査	筑波大学教授	工学博士	國府田悦男
副査	筑波大学教授	農学博士	佐藤誠吾
副査	筑波大学准教授	博士(学術)	中島敏明

論文の内容の要旨

光学活性シアノヒドリンはヒドロキシニトリルリアーゼ(HNL)により、アルデヒドまたはケトンと青酸から合成でき、様々な光学活性化合物を合成する際の間体として有用である。しかしながら、HNLは植物体にわずかにしか含有されていないため、実用的に使用するためには、HNLの大量生産法の開発と高効率バイオリクターシステムの構築が求められている。この現状を踏まえ本研究では、(S)-HNLの一つであるキャッサバ(*Manihot esculenta*)由来のMeHNLを対象に、MeHNLの大量生産法、固定化MeHNLを用いた効率的な光学活性シアノヒドリン合成プロセス、および触媒機能向上を目指した改変MeHNLの開発を試みた。

はじめに、キャッサバ葉からクローニングしたMeHNL遺伝子をGAPプロモーター下流に挿入した発現カセットを構築し、これをタンデムリピート化した染色体組込み型発現プラスミドを4種類構築した。これらを段階的に酵母染色体へ導入することによりMeHNL高生産酵母を作出した。本株を培養した結果、1ℓの培養液からキャッサバ乾燥葉40kgに相当するMeHNLを生産する事ができた。

MeHNLによる光学活性シアノヒドリンの合成反応は、基質のアルデヒドおよび生産物のシアノヒドリンの水溶性が低いため、高濃度反応のためには有機溶媒系の反応が有利である。しかし、反応には青酸が解離するための水の共存が不可欠である。そこで有機溶媒系で効率的に用いることのできる固定化MeHNLとその反応系の開発を試みた。種々検討した結果、MeHNLの固定化率が高く、高い反応効率が得られる最適な固定化担体として多孔性シリカゲル微粒子を選択した。本固定化MeHNLを用い、(S)-マンデロニトリル(SMN)の繰返し回分反応合成を行った結果、反応速度や光学純度が低下することなく、20回以上の反応が実施できた。

組換え酵母でのMeHNL生産では、細胞内に蓄積したMeHNLの回収に菌体破碎が必要であるが、酵母は破碎効率が悪く、MeHNL回収率が低いという問題が生じた。そこで破碎が容易な大腸菌を用いたMeHNLの生産を試みた。MeHNL配列のレアコドン改変を行い、pETシステムでの発現を試みたところ、生産性の向上がみられたが、大部分がインクルージョンボディの状態で作成されていた。そこで、インクルージョン

ボディ形成を抑制するための手段として低温培養を試みた。37℃での培養に比べて、培養温度が低下するほど可溶性の MeHNL の割合が増え、活性型 MeHNL の生産量は大幅に増加し、同時に菌体収量も大幅に増加した。特に 17℃の低温培養では、菌体収量は 5 倍に、単位菌体量当たりの酵素活性が 170 倍に増加したため、単位培養液当たりの MeHNL 生産性は 850 倍に増大した。

MeHNL は基質であるアルデヒドの種類により、安定性に大きな違いがあった。そこで、工業生産に使用可能な耐久性の高い MeHNL を開発するため、酵素分子の改変を試みた。Error-prone PCR でランダム変異ライブラリーを構築し、独自に開発したハイスループットスクリーニング法によって変異 MeHNL を選抜した結果、ホモダイマー酵素である MeHNL のサブユニット会合部位に位置するアミノ酸が置換された耐熱性変異酵素を得ることができた。耐熱変異 MeHNL は、野生型酵素に比べ耐熱性が約 5℃高く、さらに変異部位を複合したところ耐熱性は相加的に向上し、耐熱性変異 2 箇所を複合したものでは約 10℃の耐熱性向上が見られ、反応寿命および有機溶媒に対する安定性が向上した。

以上の成果を応用し、(S)-マンデロニトリル生産のスケールアップを試みた。耐熱変異 MeHNL を組み込んだ大腸菌を 90 ℓスケールで培養したところ、天然型 MeHNL と同等の生産性が得られた。さらに、耐熱変異 MeHNL を固定化し、繰返し回分反応を試みた結果、反応速度や光学純度が低下することなく 40 回以上の反応を実施することができた。

審査の結果の要旨

本研究は、光学活性体の医薬品や農薬を合成する際の中間体として有用な光学活性シアノヒドリンを、有機合成法ではなく、酵素 (S-体選択性のヒドロキシニトリルリアーゼ [(S)-HNL]) を用いる事で高効率かつ実用的に生産する基盤技術の構築を目指したものである。研究対象であるキャッサバ (*Manihot esculenta*) 由来の MeHNL は、植物組織中にわずかな量しか含有されていないため実用面での使用は困難であったが、本研究では、MeHNL をクローニングし、酵母染色体へ導入することにより MeHNL 高生産酵母を作製し、適切な条件下で培養する事で多量の MeHNL を生産することを可能にした。さらに、MeHNL を用いて HCN とベンズアルデヒドを反応させ、光学活性シアノヒドリンの 1 種である (S)-マンデロニトリルを高効率で合成するために、固定化操作が簡便で、有機溶媒系で長期間安定して使用できる固定化 MeHNL を開発した。固定化 MeHNL を用いる事により反応速度や光学純度を低下させることなくことなく、20 回以上にわたり (S)-マンデロニトリルの繰返し回分反応を行う事が可能となった。また、MeHNL の実用生産を目指す過程で、更なる生産性の向上が求められ、組換え酵母に代わり、破碎が容易な組換え大腸菌による MeHNL の生産を試みた。当初、本系では大部分の MeHNL が不活性なインクルージョンボディの状態で生産されたが、低温培養により活性型 MeHNL の生産量と菌体収量を大幅に増加できる事を見出し、最適条件を設定する事で実用生産に耐えうるレベルにまで MeHNL の生産性を向上させた。本研究で達成された生産性は既報の研究の中で最高値を示した。さらに、MeHNL のサブユニット会合部位に位置するアミノ酸が置換された耐熱性変異酵素を作製することで、酵素の反応寿命と有機溶媒に対する安定性を向上させる事に成功した。本研究で得られた成果を活用し、90 ℓ、17℃で組換え大腸菌を培養する事で耐熱変異 MeHNL を高効率で生産できた。また、耐熱変異 MeHNL を固定化し繰返し回分反応を行う事で、反応速度や光学純度が低下することなく 40 回以上にわたり (S)-マンデロニトリルの生産が可能であった。本研究で開発された、MeHNL および耐熱変異 MeHNL の大量生産法、有機溶媒系で長期間安定して使用できる固定化酵素の作製法、固定化酵素を用いる効率的バイオリクターシステムにより、(S)-マンデロニトリルの実用生産が実現されており、社会への貢献度も高く実学的研究として高く評価できる。

よって、著者は博士 (生物工学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。