

## 助成年度：平成 2 年度

[所属] 京都大学 化学研究所  
[役職] 教授  
[氏名] 左右田健次 (他計 5 名)

[課題]

### 環境上有害なハロ酸の酵素的分解と応用

[内容]

難分解性ハロ酸、2-クロロアクリル酸を唯一の炭素源及びエネルギー源として利用する微生物を単離した。2-クロロアクリル酸を資化し、高濃度の塩素イオンを培地中に蓄積する細菌 3 株を単離し、それぞれ WL、YL 及び WS と命名した。これら 3 菌株の抽出液中に 2-クロロアクリル酸脱ハロゲン活性が見いだされたが、活性はいずれも非常に微弱であり、また非常に不安定であった。2-クロロアクリル酸で生育した菌は必ず 2-クロロプロピオン酸脱ハロゲン活性を示し、逆に 2-クロロプロピオン酸で生育した菌も 2-クロロアクリル酸脱ハロゲン活性を示すことから、これら 2 種のハロ酸は代謝上密接に関連していると考えられる。

YL 菌を 2-クロロアクリル酸あるいは DL-2-クロロプロピオン酸を唯一の炭素源とする培地に生育させ、菌体抽出液の D-2-クロロプロピオン酸、L-2-クロロプロピオン酸、DL-2-クロロプロピオン酸あるいは 2-クロロアクリル酸に対する脱ハロゲン活性を調べた。2-クロロアクリル酸で生育した菌は、L-2-クロロプロピオン酸よりも D 体に対して高い脱ハロゲン活性を示した。逆に、DL-2-クロロプロピオン酸に生育した菌は、D-2-クロロプロピオン酸よりも L 体に対して高い脱ハロゲン活性を示した。これらの結果より、本菌には 2 種の相異なる 2-ハロ酸デハロゲナーゼが存在すると考えられる。2-クロロアクリル酸に生育した菌は 2-クロロプロピオン酸の D 及び L 異性体両者に作用し、いずれの場合にも立体反転をとまって脱ハロゲン反応が進行し、それぞれ L 及び D-乳酸を与えた。本酵素は、以前われわれが *Pseudomonas* sp. 113 株に見いだした DL-2-ハロ酸デハロゲナーゼと類似している。*Pseudomonas* sp. 113 株の酵素に対しては、L-2-クロロプロピオン酸が D 体よりも約 2 倍良好な基質となる。一方、YL 菌の酵素に対しては D 体の方が若干良好な基質となる。このように、両菌株の酵素は、2-クロロプロピオン酸の各立体異性体に対する相対活性が全く異なる。2-クロロプロピオン酸に生育した菌は、2-クロロプロピオン酸の D 体を基質にした場合にも、L 体を基質にした場合にも D-乳酸が生成する。即ち、D 体を基質にした場合には立体保持で反応が進行し、L 体を基質にした場合には立体反転で反応が進行する。本酵素は、用いる基質異性体によって反応の立体特異性が異なる酵素の最初の例である。

YL 菌より染色体 DNA を抽出し、Sau3AI によって部分的に切断した後、*puc19* の BamHI 部位に挿入した。生成した組換えプラスミドで *E. coli* を形質転換し、ブromo酢酸を含む培地に生育する菌を選択した。大腸菌はブromo酢酸を含む培地に生育できないが、デハロゲナーゼ遺伝子が発現すれば本酵素がブromo酢酸を分解するのでクローン株のみが生育できる。ブromo酢酸培地に生育できる *E. coli* クローン株 1 株が得られ、本菌の粗抽出液はデハロゲナーゼ活性を示した。本クローン株の持つデハロゲナーゼは 2-クロロプロピオン酸の DL 両異性体に作用し、いずれの異性体からも D-乳酸が生成した。従って、YL が 2-クロロプロピオン酸に生育した際に生成してくるデハロゲナーゼ遺伝子がクローン化された。

L-2-ハロ酸デハロゲナーゼは炭素鎖が 4 までの各種の L-2-ハロ酸に作用し、それぞれ対応する D-2-ヒドロキシ酸を生成する。しかし、L-2-ブromo桔草酸などを長鎖のハロアルカンは全く作用しない。また、芳香族側鎖を持つ 2-ハロ酸にも作用しない。しかし、ジメチルスルフォキシドをはじめとする各種の有機溶媒中で酵素反応を行うと、酵素の基質特異性が変化し、長鎖の 2-ハロアルカン酸や、芳香族 2-ハロ酸が良好な基質となり、それぞれ対応する 2-ヒドロキシ酸を与えた。本反応を利用し、光学活性な 2-ヒドロキシ酸を特異的

に合成する方法を検討した。本法は有機化学的な方法では合成の困難な長鎖のヒドロキシ酸の調製に役立つと考えられる。

われわれは既に、L 及び DL-2-ハロ酸デハロゲナーゼを用いて、2-クロロプロピオン酸から D 及び L-乳酸を個別に生産する方法を開発している。しかし、ラセミ体の 2-クロロプロピオン酸を 1 種の乳酸エナンチオマーに完全に変換する方法は確立されていない。本研究では、酵素的及び化学的脱ハロゲン反応を組み合わせることにより、ラセミ体の 2-クロロプロピオン酸を D-乳酸に完全転換する方法を開発した。即ち、L-2-クロロプロピオン酸を L-2-ハロ酸デハロゲナーゼを用いて D-乳酸に完全に変換した後、ラセミ体原料中に未反応のまま残存している D-2-クロロプロピオン酸を化学的に脱ハロゲンし、D 及び L-2-クロロプロピオン酸を全量 D-乳酸に変換する方法である。D-乳酸亜鉛を結晶状に単離した。収率は約 87%であった。純度は 99%以上、光学純度は 94%であった。生成物の NMR 及び IR スペクトルはそれぞれ、標品のスペクトルと一致した。上述したように、有機溶媒中で L-2-ハロ酸デハロゲナーゼ反応を行えば、長鎖の 2-ハロ酸を D-2-ヒドロキシ酸に転換できる。従って、本法と組み合わせることにより、各種鎖長のラセミ 2-ハロ酸を反応する D-2-ヒドロキシ酸に変換できる。