

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	
Title(English)	Purification and characterization of fluorinated ketone reductase from <i>Geotrichum candidum</i> NBRC 5767
著者(和文)	曹晨
Author(English)	Chen Cao
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9593号, 授与年月日:2014年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:松田 知子,中村 聡,三原 久和,和地 正明,福居 俊昭
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9593号, Conferred date:2014/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第		号	学位申請者氏名	Chen Cao	
論文審査 審査員		氏名		職名	氏名	職名
	主査	松田知子		講師	福居俊昭	准教授
	審査員	中村聡		教授		
		三原久和		教授		
		和地正明		教授		

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は「Purification and characterization of fluorinated ketone reductase from *Geotrichum candidum* NBRC 5767」と題し、英語で書かれ、5章から構成されている。

第1章「General Introduction」では、有機合成の効率かつ高立体選択的な触媒となる酵素（生体触媒）について概説している。また、医農薬中間体等として光学活性化合物が不可欠であるので、触媒を利用する不斉合成反応の開発が急務であることを述べている。特に、本研究の目的化合物となる光学活性含フッ素化合物の合成の重要性について示している。さらに、新たに見いだされた *G. candidum* NBRC 5767 のフルオロケトン還元酵素（FLRD）は光学活性含フッ素化合物の合成に有用であるため、本論文の目的は本酵素を単離精製し性質を解明することであると述べている。

第2章「Purification of FLRD from *Geotrichum candidum* NBRC 5767」では、*G. candidum* NBRC 5767 由来の FLRD の単離精製について述べている。これまでに報告例がない FLRD の精製に、硫酸沈殿および6ステップのクロマトグラフィーにより成功したことを示している。ゲル濾過クロマトグラフィーと SDS-PAGE の結果より、本酵素は二量体として存在していることを明らかにしている。また、酵素を触媒として光学活性化合物の合成を行う際には酵素反応の立体選択性が非常に重要であるが、精製酵素によるトリフルオロアセトフェノンの不斉還元反応の立体選択性は非常に高く、生成物の鏡像体過剰率 (e. e.) は99%以上であることを示している。

第3章「Characterization of FLRD from *Geotrichum candidum* NBRC 5767」では、*G. candidum* NBRC 5767 由来の FLRD の性質を解明したことを示している。反応条件 (pH、温度、金属イオン、添加物) の検討結果および酵素の熱安定性および pH 安定性の検討結果を示し、1.0 mM の CaCl_2 を添加することにより本酵素の相対活性は265%向上することを明らかにしている。また、還元反応の基質特異性の検討結果より、アリールメチルケトン等のケトンの不斉還元反応において、フッ素官能基により活性が大きく影響を受けることを見いだしている。例えば、アセトフェノン、2-アセチルチオフェン、および3-アセチルチオフェンの α 位の水素がフッ素で置換された、モノフルオロメチルケトン、ジフルオロメチルケトン、およびトリフルオロメチルケトンの還元反応を行い、 α 位のフッ素の数が相対反応速度に大きな影響を与えることを明らかにしている。 α 位がフッ素置換されていないアセトフェノンなどのケトンの還元反応では相対活性が極端に低くなり、また、アリール基上の水素がフッ素に置換されたペンタフルオロアセトフェノン等のケトンの還元反応には、フッ素の効果は得られないことを示している。さらに、これらの α 位のフッ素置換による活性向上の機構を推測している。フッ素は一番電気陰性度が高く水素の次に小さい原子であるためにフッ素官能基は独特の性質を有しており、本酵素には正電化を帯びているアミノ酸が並んでいてフッ素官能基とのアフィニティーが非常に高い“フッ素官能基結合部位”が存在することを提案している。

第4章「Gene Cloning of FLRD from *Geotrichum candidum* NBRC 5767」では、*G. candidum* NBRC 5767 由来の FLRD の cDNA の増幅に成功し、アミノ酸配列の一部を推定できたことを示している。*G. candidum* NBRC 5767 の mRNA から cDNA を合成し、また、単離精製した FLRD のリシルエンドペプチダーゼ消化断片の3カ所の内部アミノ酸配列をもとにプライマーの設計を行い、PCRにより遺伝子を増幅し塩基配列を決定し312残基のアミノ酸配列を明らかにしたことを示している。

第5章「General Conclusions」では、本論文の要点を総括し、今後の展望を述べている。

これを要するに、本論文は、光学活性含フッ素化合物の合成に有用である *G. candidum* NBRC 5767 由来の FLRD を単離精製し、その性質を解明したものであり、工学上および工業上貢献するところが大きい。よって本論文は、博士（工学）の学位論文として十分に価値があるものと認められる。