

# 博士論文概要

## 論文題目

Characterization of Novel Enzymes  
Converting Aromatics and Their Application  
to Production of Valuable Aromatics

新規な芳香族化合物変換酵素の機能解析と  
有用芳香族化合物生産への応用

申請者

氏名

岩崎	勇一郎
Iwasaki	Yuichiro

専攻・研究指導  
(課程内のみ)

応用化学専攻 応用生物化学研究

2006年 11月

分子内にベンゼン環を含む有機化合物は芳香族化合物と総称されており、石炭や石油などの化石燃料中に多く含まれている。芳香族化合物から得られる各種の誘導体は、化学製品あるいは医薬品の原料として重要であり、その合成（化学的変換）には有機化学的方法が用いられることが多い。しかし、従来の有機合成プロセスでは高温高压条件下での反応が利用されることが多く、目的物質への選択的な変換が困難であるため廃熱や不要な副生成物の発生といった環境への負荷が大きな問題となっている。

一方、酵素や微生物を生体触媒として利用した芳香族化合物の変換は、常温常圧条件下で目的物質への選択的な変換が可能であることから、環境調和型の新規な方法として重要視されている。すなわち、従来の有機合成プロセスに代替可能な方法として、酵素による芳香族化合物の変換により新規な有用物質の生産方法を構築することは極めて重要である。また、芳香族化合物の混合物から不要な成分を酵素を利用して選択的に除去する方法を構築することも極めて重要である。これらの実現によって環境調和型かつ効率的な芳香族化合物変換プロセスの新展開が期待できる。

本論文では、環境調和型な芳香族化合物の微生物変換プロセスの構築を目的とした研究を行い、その成果をまとめた。すなわち、新規な芳香族化合物変換酵素を発見し諸性質を明らかにするとともに、遺伝子クローニングおよび機能解析を行った。また、遺伝子工学的手法により各種遺伝子を高発現させた微生物細胞を生体触媒として利用することによって新規な微生物変換プロセスを構築した。具体的には、石油中には多くの芳香族硫黄化合物とくにジベンゾチオフェン（DBT）類が含まれており、エネルギーとして燃焼することで硫黄酸化物を生成するため、酸性雨や大気汚染の原因となっている。そこで、DBT脱硫活性の向上を目的として、好熱性脱硫細菌由来のDBT脱硫酵素遺伝子をクローニングするとともに、好熱性脱硫細菌の細胞内における当該遺伝子のコピー数を増大させた組換え体を作製しDBT脱硫能力を評価した。一方、 $\gamma$ -レゾルシン酸およびサリチル酸は、染料、香料、医薬品原料など多方面で利用されているが、従来の有機合成プロセスでは高温高压を必要とするKolbe-Schmitt法によって生産されており、環境への負荷が大きい。そこで、 $\gamma$ -レゾルシン酸とサリチル酸についての新規な代謝経路を有する微生物を取得するとともに、それぞれに対応する新規な可逆的脱炭酸酵素の存在を明らかにした。さらに、これらの酵素をコードする遺伝子について大腸菌における高発現を可能として、当該酵素の新規性を遺伝子レベルで解明した。また、当該酵素遺伝子を高発現させた組換え大腸菌を利用し、レゾルシノールからの $\gamma$ -レゾルシン酸とフェノールからのサリチル酸の選択的生産に応用した。

本論文は9章より構成されている。

第1章では、芳香族化合物の微生物変換について概説した。芳香族化合物の微

生物変換と芳香族化合物変換酵素の報告例についてまとめ、芳香族化合物に関する微生物変換を従来の有機合成法や金属触媒を用いた反応と比較し、その特徴について述べた。これらを背景として、本研究の意義と目的を明らかにした。

第2章では、本研究で用いた主な実験方法について説明した。すなわち、各種微生物の培養方法、芳香族化合物の微生物変換に関する方法、酵素の分析方法、遺伝子工学的手法、ならびに代謝産物の分析方法などについて述べた。

第3章では、新規な好熱性 DBT 脱硫細菌 *Mycobacterium phlei* WU-F1 由来の DBT 脱硫酵素遺伝子をクローニングし、その機能を解析した。プラークハイブリダイゼーション法により、*M. phlei* WU-F1 から DBT 脱硫酵素遺伝子をクローニングした。さらに、CUGA シーケンス法により当該遺伝子上流領域 2 kb および下流領域 1 kb の塩基配列を決定した。DBT 脱硫に関わる DNA の塩基配列を解析し、*Bacillus subtilis* WU-S2B 由来の DBT 脱硫酵素遺伝子 (*bdsABC*) と比較したところ、両株は属種が異なり系統的に離れているにも関わらず、塩基配列は同一であった。以上の結果は、脱硫遺伝子群 *bdsABC* が進化系統学的に遠距離に位置する菌種にまで水平伝達された可能性を示唆した。

第4章では、*M. phlei* WU-F1 の遺伝子組換えによる DBT 脱硫能力の強化について検討した。*Mycobacterium phlei*-*Escherichia coli* シャトルベクターを作製し、WU-F1 の宿主 - ベクター系を構築した。*bdsABC* と DBT の酸化反応に関与するフラビンレダクターゼ遺伝子 (*frm*) をシャトルベクターに連結し、*M. phlei* WU-F1 の細胞内に導入することにより、当該遺伝子のコピー数を増大させた組換え体 *M. phlei* WU-F1/pUALSABCD を作製した。さらに、*M. phlei* WU-F1/pUALSABCD を用いた休止菌体反応による DBT 脱硫を検討し、野生株の *M. phlei* WU-F1 と比較して 45°C における DBT 脱硫活性が約 2 倍 (0.67 nmol/min/mg-dry-cell-weight) に向上したことを示した。

第5章では、レゾルシノールから  $\gamma$ -レゾルシン酸を合成する能力を示す新規酵素を発見し、その解析を目的として、*Rhizobium radiobacter* WU-0108 由来の可逆的  $\gamma$ -レゾルシン酸脱炭酸酵素 (Rdc) をコードする遺伝子 (*rdc*) をクローニングし機能を解析した。 $\gamma$ -レゾルシン酸を唯一の炭素源として増殖可能な微生物として *R. radiobacter* WU-0108 を取得した。WU-0108 の休止菌体はレゾルシノールをカルボキシル化して、選択的に  $\gamma$ -レゾルシン酸を合成する能力を示した。当該反応に関与する酵素として Rdc を精製し、酵素的諸性質を検討した。Rdc は、従来の脱炭酸酵素とは異なり補酵素や ATP 等を必要とせず、酸素存在下でも反応が進行する実用性に優れた能力を有することを明らかにした。精製酵素の N 末端アミノ酸配列を基に作成したプローブを用いて、WU-0108 の部分 DNA ライブラリーから目的の遺伝子 (*rdc*) をクローニングした。*rdc* は、327 個のアミノ酸残基から成る 37.4 kDa のタンパク質をコードしており、従来の脱炭酸酵素とは相同性が低く、新規な酵素であることをアミノ酸配列から明らかにした。さらに、*rdc*

への部位特異的変異導入により、Rdcにおいては164番目と218番目のHis残基が活性に関与していることを明らかにした。

第6章では、*rdc*を高発現させた組換え大腸菌細胞を利用した $\gamma$ -レゾルシン酸生産について検討した。pETベクターを利用して*rdc*を高発現させた組換え大腸菌 *E. coli* BL21 (DE3)/pENS10 を作製した。無細胞抽出液を用いてレゾルシノールのカルボキシル化活性を検討したところ、組換え大腸菌 *E. coli* BL21 (DE3)/pENS10 について比活性は0.93 U/mgで、原株 WU-0108 のそれと比較して約3.6倍のカルボキシル化活性を示した。さらに、*E. coli* BL21 (DE3)/pENS10 の休止菌体反応を利用したレゾルシノールの位置選択的カルボキシル化反応を最適化した。反応は、*E. coli* BL21 (DE3)/pENS10 の細胞懸濁液にレゾルシノールと炭酸水素カリウムを混合し、30℃で7時間振とうすることによって行い、8.8 mM の $\gamma$ -レゾルシン酸を20 mM のレゾルシノールから最大収率44%で生産することに成功した。

第7章では、フェノールからサリチル酸を合成する能力を示す新規酵素を発見し、その解析を目的として、*Trichosporon moniliiforme* WU-0401 由来の可逆的サリチル酸脱炭酸酵素 (Sdc) をコードする遺伝子 (*sdc*) をクローニングし機能を解析した。サリチル酸を唯一の炭素源として増殖可能な微生物として *T. moniliiforme* WU-0401 を取得した。WU-0401 の休止菌体はフェノールをカルボキシル化して、選択的にサリチル酸を合成する能力を示した。当該反応に関与する酵素として Sdc を精製し、酵素的諸性質を検討した。Sdc は、Rdc と同様に、補酵素や ATP 等を必要とせず、酸素存在下でも反応が進行する実用性に優れた能力を有することを明らかにした。精製酵素の内部アミノ酸配列を基に作成したプライマーを用いて、逆転写 PCR と 5'-RACE および 3'-RACE 法を利用して目的の遺伝子 (*sdc*) をクローニングした。*sdc* は、349 個のアミノ酸残基から成る 39.7 kDa のタンパク質をコードしており、従来の脱炭酸酵素とは相同性が低く、新規な酵素であることをアミノ酸配列から明らかにした。

第8章では、*sdc*を高発現させた組換え大腸菌細胞を利用したサリチル酸生産について検討した。pETベクターを利用して*sdc*を高発現させた組換え大腸菌 *E. coli* BL21 (DE3)/pSDC を作製した。組換え大腸菌の無細胞抽出液にはフェノールのカルボキシル化活性が検出され、選択的なサリチル酸の生産が可能であった。さらに、*E. coli* BL21 (DE3)/pSDC の休止菌体反応を利用したフェノールの位置選択的カルボキシル化反応を最適化した。

第9章では、本研究を総括した。本研究成果により得られた新規な芳香族化合物変換酵素 (BdsABC、Rdc、Sdc) を利用した各種芳香族化合物に対する微生物変換能力を評価し、実用化へ向けてさらに解決すべき点などについて述べた。

# 研 究 業 績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
1. 論文	
○（報文）	1. Regio-selective and Enzymatic Production of $\gamma$ -Resorcylic Acid from Resorcinol Using Recombinant <i>Escherichia coli</i> Cells Expressing a Novel Decarboxylase Gene, <i>Biotechnol. Lett.</i> , (印刷中) <u>Y. Iwasaki</u> , K. Kino, H. Nishide and K. Kirimura.
○（報文）	2. Novel Metabolic Pathway for Salicylate Degradation in the Genus <i>Trichosporon</i> , <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> , (投稿中) <u>Y. Iwasaki</u> , H. Gunji, K. Kino and K. Kirimura.
(報文)	3. Gene Cloning and Characterization of <i>Mycobacterium phlei</i> Flavin Reductase Involved in Dibenzothiophene Desulfurization, <i>J. Biosci. Bioeng.</i> , Vol. 99, No. 6, 577-585, October 2005. T. Furuya, S. Takahashi, <u>Y. Iwasaki</u> , Y. Ishii, K. Kino, and K. Kirimura.
(報文)	4. Reversible and Nonoxidative $\gamma$ -Resorcylic Acid Decarboxylase: Characterization and Gene Cloning of a Novel Enzyme Catalyzing Carboxylation of Resorsinol, 1,3-Dihydroxybenzene, from <i>Rhizobium radiobacter</i> , <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , Vol. 324, No. 2, 611-620, August 2004. Y. Ishii, Y. Narimatsu, <u>Y. Iwasaki</u> , N. Arai, K. Kino, and K. Kirimura.
(報文)	5. Identification and Functional Analysis of the Genes Encoding Dibenzothiophene-desulfurizing Enzymes from Thermophilic Bacteria, <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> , Vol. 65, No. 6, 703-713, May 2004. K. Kirimura, K. Harada, H. Iwasawa, T. Tanaka, <u>Y. Iwasaki</u> , T. Furuya, Y. Ishii, and K. Kino.
2. 講演	
	1. 可逆的脱炭酸酵素遺伝子 ( <i>rdc</i> ) を高発現した大腸菌による レゾルシノールからの選択的 $\gamma$ -レゾルシン酸生産、 第9回生体機能関連化学・バイオテクノロジー部会合同シンポジウム、京都（講演要旨集 p. 251）、2006年9月。 <u>岩崎勇一郎</u> 、石井義孝、木野邦器、桐村光太郎。
	2. 新規な可逆的サリチル酸脱炭酸酵素の精製と遺伝子クローニング、 日本生物工学会大会、大阪（講演要旨集 p. 97）、2006年9月。 若山瑠美子、郡司裕朗、 <u>岩崎勇一郎</u> 、石井義孝、木野邦器、 桐村光太郎。

## 研 究 業 績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
2. 講演	<p>3. 微生物変換によるフェノールからのサリチル酸の選択的合成、日本生物工学会大会、大阪（講演要旨集 p. 97）、2006年9月。郡司裕朗、<u>岩崎勇一郎</u>、石井義孝、木野邦器、桐村光太郎。</p> <p>4. Expression Analysis of the Alternative Oxidase Gene (<i>aox1</i>) by the Visualization of EGFP Fusion Protein in Citric Acid-producing <i>Aspergillus niger</i>, 10th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, Prague, Czech Republic (Abstract p. 153), June 2006. T. Hattori, <u>Y. Iwasaki</u>, S. Ogawa, K. Kino, and K. Kirimura.</p> <p>5. 可逆的脱炭酸酵素遺伝子 (<i>rdc</i>) を高発現させた大腸菌による<math>\gamma</math>-レゾルシン酸の選択的高生産、日本農芸化学会大会、京都（講演要旨集 p. 236）、2006年3月。<u>岩崎勇一郎</u>、石井義孝、木野邦器、桐村光太郎。</p> <p>6. Molecular Analysis of the Novel Reversible <math>\gamma</math>-Resorcylic Acid Decarboxylase Gene and its Application to <math>\gamma</math>-Resorcylic Acid Production, International Chemical Congress of Pacific Basin Society, Honolulu, USA (Program number BIOL 0339), December 2005. <u>Y. Iwasaki</u>, Y. Ishii, K. Kino, and K. Kirimura.</p> <p>7. Characterization of a Novel Reversible <math>\gamma</math>-Resorcylic Acid Decarboxylase Catalyzing Regio-selective Carboxylation of Resorcinol, International Chemical Congress of Pacific Basin Society, Honolulu, USA (Program number BIOL 0333), December 2005. Y. Ishii, <u>Y. Iwasaki</u>, K. Kino, and K. Kirimura.</p> <p>8. Characterization and Gene Cloning of the <math>\gamma</math>-Resorcylic Acid Decarboxylase for Application to Selective Production of <math>\gamma</math>-Resorcylic Acid, 12th European Congress on Biotechnology, Copenhagen, Denmark (Abstract p. 101), August 2005. <u>Y. Iwasaki</u>, Y. Ishii, K. Kino, and K. Kirimura.</p> <p>9. <i>Rhizobium radiobacter</i> WU-0108 由来可逆的<math>\gamma</math>-レゾルシン酸脱炭酸酵素の遺伝子クローニングと生産への応用、日本農芸化学会大会、札幌（講演要旨集 p. 69）、2005年3月。<u>岩崎勇一郎</u>、石井義孝、木野邦器、桐村光太郎。</p> <p>10. 新規な可逆的脱炭酸酵素の精製および遺伝子解析と<math>\gamma</math>-レゾルシン酸の選択的生産への応用、日本化学会大会、神奈川（講演番号 2F1-08）、2005年3月。<u>岩崎勇一郎</u>、石井義孝、木野邦器、桐村光太郎。</p>

## 研 究 業 績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
2. 講演	<p>11. <i>Rhizobium radiobacter</i> WU-0108 由来の可逆的 <math>\gamma</math> - レゾルシン酸脱炭酸酵素遺伝子のクローニング、 日本生物工学会大会、名古屋（講演要旨集 p. 197）、2004年9月。 <u>岩崎勇一郎</u>、石井義孝、木野邦器、桐村光太郎。</p> <p>12. Enzymatic Synthesis of <math>\gamma</math>-Resorcylic Acid by Regio-selective Carboxylation of Resorcinol, 2nd International Congress on Biocatalysis, Hamburg, Germany (Abstract p. 143), August 2004. Y. Ishii, <u>Y. Iwasaki</u>, K. Kino, and K. Kirimura.</p> <p>13. Enhancement of Dibenzothiophene-desulfurizing Activity by Genetic Engineering of a Thermophilic Desulfurizing Bacterium <i>Mycobacterium phlei</i> WU-F1, 2nd International Congress on Biocatalysis, Hamburg, Germany (Abstract p. 79), August 2004. <u>Y. Iwasaki</u>, T. Furuya, Y. Ishii, K. Kino, and K. Kirimura.</p> <p>14. Characterization of <i>Mycobacterium phlei</i> WU-F1 as a Biocatalyst Applicable to Thermophilic Biodesulfurization of Light Gas Oil, 2nd International Congress on Biocatalysis, Hamburg, Germany (Abstract p. 262), August 2004. T. Furuya, Y. Ishii, <u>Y. Iwasaki</u>, S. Krishnan, K. Kino, and K. Kirimura.</p> <p>15. 遺伝子組換えを利用した好熱性ジベンゾチオフェン脱硫細菌 <i>Mycobacterium phlei</i> WU-F1 の脱硫活性の向上、 日本農芸化学会大会、広島（講演要旨集 p. 41）、2004年3月。 <u>岩崎勇一郎</u>，古屋俊樹，石井義孝，木野邦器，桐村光太郎。</p> <p>16. 好熱性ジベンゾチオフェン脱硫細菌 <i>Mycobacterium phlei</i> WU-F1 の遺伝子組換えによる脱硫能力の強化、 日本生物工学会大会、熊本（講演要旨集 p. 204）、2003年9月。 <u>岩崎勇一郎</u>，古屋俊樹，石井義孝，木野邦器，桐村光太郎。</p>
3. 特許	なし
4. その他	<p>1. （総説）廃水中に含まれる各種フェノール類の微生物変換、 水処理技術、Vol. 47、No. 9、397-402、2006年、 <u>岩崎勇一郎</u>、石井義孝、木野邦器、桐村光太郎。</p> <p>2. （受賞）新規な可逆的脱炭酸酵素の精製および遺伝子解析と <math>\gamma</math> - レゾルシン酸の選択的生産への応用、日本化学会、 第 85 春季年会学生講演賞、2005年4月。</p>