

# 博士論文審査報告書

## 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

2007 年 3 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圧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ている。芳香族化合物の微生物変換と使用される特徴的な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、その特徴について記述している。これらを背景として、本研究の意義と目的を明らかにしている。

第2章では、本研究で用いた主な実験方法について記述している。

第3章では、バイオ脱硫を目的として新規な好熱性ジベンゾチオフェン (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、その機能を解析している。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 脱硫酵素遺伝子のクローニングを行い、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ている。DBT 脱硫に関わる DNA の塩基配列を解析し、並行して使用した *Bacillus subtilis* WU-S2B 由来の DBT 脱硫酵素遺伝子 (*bdsABC*) と 100% の相同性を示すことを明らかにしている。両株は属種が異なり系統的に離れているにも関わらず、DBT 脱硫酵素遺伝子の塩基配列が同一なことから、この事実は脱硫遺伝子群 *bdsABC* が進化系統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ており、微生物学的にも極めて興味深い成果である。

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ている。*Mycobacterium-Escherichia coli* シャトルベクターを作製し、WU-F1 の宿主 - ベクター系の構築に成功している。*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 を作製している。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 脱硫活性を約 2 倍 (0.67 nmol/min/mg-dry-cell-weight) 向上させることに成功している。すなわち、好熱性脱硫細菌の形質転換系の構築と遺伝子組換えによる DBT 脱硫能力の強化に成功している。これまでに好熱性脱硫細菌の育種に関する報告例はなく、バイオ脱硫の実用化を想定した場合に極めて有意義な成果として高く評価できる。

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、機能を解析している。土壌から新規に単離した *R. radiobacter* WU-0108 から、レゾルシノールに位置選択的にカルボキシル化し  $\gamma$ -レゾルシン酸を合成可能な酵素 (Rdc) を発見し、これを精製、酵素的諸性質を検討している。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ている。コロニーハイブリダイゼーション法により Rdc をコードする遺伝子 (*rdc*) をクローニングするとともに、当該遺伝子が 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アミノ酸配列における相同性も低く、新規な酵素であることを明らかにしている。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ている。レゾルシノールから  $\gamma$ -レゾルシン酸を選択的に合成可能な酵素に関する初めての報告であり、その新規性を酵素的性質と遺伝子の特徴の両面から明らかにした内容は、新規かつ独創的な成果と高く評価できる。

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ている。*rdc* を高発現させた組換え大腸菌 *E. coli* BL21 (DE3)/pENS10 を作製している。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ている。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°C 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ている。従来の有機化学的な変換プロセスでは困難な、常温常圧条件下におけるレゾルシノールからの  $\gamma$ -レゾルシン酸の選択的生産に成功しており、極めて有意義な実用的成果を示した内容として高く評価できる。

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*) をクローニングして、その機能を解析している。土壌から新規に単離した *T. moniliiforme*

WU-0401 から、フェノールに位置選択的にカルボキシル化してサリチル酸の合成反応を触媒する酵素 (Sdc) を発見し、これを精製、酵素的諸性質を検討している。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ている。逆転写 PCR と 5'-RACE および 3'-RACE 法を利用して Sdc をコードする遺伝子 (*sdc*) をクローニングするとともに、当該遺伝子が 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の点から明らかにしている。フェノールからサリチル酸を選択的に合成可能な酵素に関する初めての報告であり、その新規性を酵素的性質と遺伝子の特徴の両面から明らかにした内容は、新規かつ独創的な成果と高く評価できる。

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ている。*sdc* を高発現させた組換え大腸菌 *E. coli* BL21 (DE3)/pSDC を作製し、そ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ている。反応は、*E. coli* BL21 (DE3)/pSDC の細胞懸濁液にフェノールと炭酸水素カリウムを混合し、30°C で 9 時間振とうすることによって行い、サリチル酸を 40 mM のフェノールから最大収率 27% で生産することに成功している。すなわち、従来の有機化学的な変換プロセスでは困難な、常温常圧条件下におけるフェノールからのサリチル酸の選択的生産に成功しており、極めて有意義な実用的成果を示した内容として高く評価できる。

第 9 章では、本研究を総括している。

以上のように、本論文では新規な芳香族化合物変換酵素を利用して、既往の有機化学的な変換プロセスでは到達困難な、常温常圧条件下で副生成物の発生しない選択的な芳香族化合物の変換プロセスを構築しており、その成果は極めて意義深い。また、各酵素を遺伝子レベルで詳細に明らかにしており、その成果は生物化学の分野に有用な基礎的知見をもたらすばかりでなくバイオプロセスの実用化へ向けた応用的側面からも極めて重要である。本研究では、今日の化学工業で重要視されている環境調和型プロセスを視野に入れ、創造的な発想のもとに新規かつ重要な知見をまとめており、応用化学の分野において極めて意義深い成果を示している。よって本論文を博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。

2007 年 2 月

審査員

(主査) 早稲田大学教授	工学博士 (早稲田大学)	桐村光太郎
早稲田大学教授	工学博士 (早稲田大学)	木野邦器
早稲田大学教授	工学博士 (早稲田大学)	西出宏之