

氏名	ウォロ トリアルシ スリスティアニンディヤ Woro Triarsi Sulistyanningdyah
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第1447号
学位授与の日付	平成16年9月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	農学研究科応用生命科学専攻
学位論文題目	Screening and applied studies of novel microbial oxidoreductases (微生物由来新規酸化還元酵素の生化学的および応用研究)
論文調査委員	(主査) 教授 清水 昌 教授 池田 篤治 教授 加藤 暢夫

### 論文内容の要旨

本論文は、微生物が生産する酸化還元酵素に関して、酵素化学的手法や遺伝子工学的手法を用いた基礎的諸特性の解明を行うとともに、臨床分析、有害物質分解、物質生産など様々な産業分野への応用を目的として行った研究成果をまとめたものである。主な内容は次の通りである。

(1)臨床分析に有用な酵素に関して、血中肝機能マーカーであるビリルビンに作用する酵素の探索を行い、糸状菌 *Aspergillus ochraceus* IB-3 に新規酵素ビリルビンデヒドロゲナーゼを見いだした。本酵素は膜結合型酵素であり、*A. ochraceus* の膜画分から本酵素を可溶化・精製するとともに、諸性質を解明した。本酵素はフェナジンメソサルフェートなどの電子受容体の存在下、ビリルビンおよびジタウロビリルビンをそれぞれビルベルジンおよびジタウロビルベルジンへと変換する一段階の酸化反応を触媒した。また、ビリルビン誘導体に特異的に作用し、他のヘム関連化合物には作用せず、既知のビリルビン酸化酵素とは異なりラッカーゼ活性を示さなかった。また、酸性条件下では、ジタウロビリルビンに特異的に作用した。さらに、ビリルビンデヒドロゲナーゼ反応におけるビルベルジンおよびジタウロビルベルジンの生成に由来する 660nm 付近の吸光度の上昇を利用し、 $\mu\text{M}$  オーダーの各ビリルビン分子種を pH 条件の制御下にて選択的に測定しうる高感度な酵素的分析法を開発した。

(2)アルカリ性条件下でのパルプ・繊維の漂白、洗濯時の色移り防止、アルカリ産業廃液の処理などに有用な酸化酵素を探索し、*Myrothecium verrucaria* 24G-4 の培養液上清にアルカリ領域に至適反応 pH を有する新規ラッカーゼを見いだした。本酵素を単離精製し、N 末端アミノ酸配列を解読した結果、ビリルビンオキシダーゼと高い相同性を示すことが判明した。しかし、フェノール性化合物を良好な基質とすること、アルカリ領域でメディエーターによる活性化を受けることなど、ビリルビンオキシダーゼとは異なる機能性を示した。

一方、アルカリ性条件下で高い反応性を示すペルオキシダーゼ活性を *Bacillus* sp. No. 13 の培養液上清に見だし、その活性本体が新規なシトクローム *c* およびカタラーゼ-ペルオキシダーゼであることを明らかにした。本シトクローム *c* は、他起源由来のシトクローム *c* より約 50 倍高いペルオキシダーゼ活性を示した。本シトクローム *c* をコードする遺伝子の解読を行った結果、他の *Bacillus* 属由来シトクローム *c* とアミノ酸配列において高い相同性を示す一方、N 末端膜結合部位を欠く特徴的な構造を有していることが判明した。また、カタラーゼ-ペルオキシダーゼは、アルカリ領域で高い反応性を示すペルオキシダーゼ活性を有し、過酸化水素に対し高い親和性を示す特徴を有していた。

(3)多機能水酸化触媒として期待されるシトクローム P450 に関して、進化工学的手法による機能性の拡大、活性の向上を試みた。細菌 *Bacillus megaterium* 由来のシトクローム P450 BM-3 を題材に、各種変異型酵素を構築し機能性を評価した。その結果、変異型酵素 AL4V が 3-塩素置換までの多塩素置換ダイオキシンに対して高い水酸化活性を示すことを認めた。また、変異型酵素 F87V が、種々の多環式芳香族炭化水素の水酸化を触媒すること、および、フェノール誘導体のパラ位特異的水酸化反応を触媒することを見いだした。さらに、変異型酵素 F87V の示す高いパラ位特異的水酸化活性を、2-ベン

ジロキシフェノールからの2-ベンジルオキシヒドロキノンの生産に応用した。

## 論文審査の結果の要旨

様々な生物種に多種多様な酸化還元酵素が存在し、それらは生命活動において多彩な機能を発揮している。最近、これら酸化還元酵素の機能を、様々な産業分野に応用する研究が活発化してきている。本論文では、臨床分析、有害物質分解、物質生産などに利用可能な酸化還元酵素、特に酸化反応を得意とする酵素について、その探索から基礎的解析、さらに応用に向けた検討の結果がまとめられている。以下に示す点が成果として評価できる。

- (1) 血中肝機能マーカーであるビリルビンの測定には、ビリルビンオキシダーゼの触媒する多段階酸化反応に基づいた酵素的分析法が適用されているが、選択性、分析感度において様々な難点が指摘されている。本研究では、ビリルビンに作用する新規酵素の探索・開発が展開され、糸状菌 *Aspergillus ochraceus* IB-3 に新規酵素ビリルビンデヒドロゲナーゼが見いだされ、諸性質が解明された。また、本酵素が電子受容体の存在下にてビリルビンの一段階酸化反応を触媒すること、pH 条件の制御により各ビリルビン分子種に対する特異性が変化することを利用し、 $\mu\text{M}$  オーダーのビリルビン分子種を選択的に測定しうる高感度分析法が開発された。
- (2) ラッカーゼ、ペルオキシダーゼは分子状酸素、過酸化水素を電子受容体とした非特異的酸化反応を触媒する酵素であり、パルプや繊維の漂白、洗濯時の色移り防止、産業廃液の処理などに利用される産業用酵素である。これら利用技術の中には、高 pH 条件下で操作されるものも多く、アルカリ条件下で高い反応性を示す酵素が求められていた。本研究では、アルカリ条件で生育する微生物を対象にラッカーゼおよびペルオキシダーゼ活性の探索が行われ、*Myrothecium verrucaria* 24G-4 の培養液上清にアルカリ領域に至適反応 pH を有する新規ラッカーゼが見いだされた。本ラッカーゼは、ビリルビンオキシダーゼとの構造上の類似性を示したが、フェノール性化合物を効率的に酸化すること、アルカリ領域でメディエーターによる活性化を受けることなど、ユニークな機能を示した。また、アルカリ性条件下で高い反応性を示すペルオキシダーゼ活性が *Bacillus* sp. No. 13 の培養液上清に見いだされ、その活性本体が新規なシトクロム *c* およびカタラーゼ-ペルオキシダーゼであることが明らかにされた。
- (3) シトクロム P450 は、様々な基質への酸素添加反応を触媒することから、難分解性物質の酸化分解や、位置選択的・立体選択的水酸化反応に有用な触媒として期待されている。本研究では、*Bacillus megaterium* 由来のシトクロム P450 BM-3 と、それから進化工学的に創成した変異型酵素に関して種々の機能が評価された。その結果、ダイオキシン酸化活性が向上した変異型酵素が構築された。また、パラ位特異的水酸化活性が向上した変異型酵素が構築され、2-ベンジルオキシフェノールからの有用医薬中間体2-ベンジルオキシヒドロキノンの生産に応用された。

以上のように、本論文は微生物由来の酸化還元酵素について基礎・応用両面にわたって検討を加えたものである。得られた結果は、酸化還元酵素の新たな機能を提示するものであり、様々な産業的利用の可能性を示しており、応用微生物学、応用酵素学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、平成16年7月8日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。