

氏 名	アクラニ ローズ ガンボア デラクルズ ヒダルゴ Aklani-Rose Gamboa Delacruz Hidalgo
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1298 号
学位授与の日付	平成 14 年 11 月 25 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	Biochemical and applied studies of microbial oxidoreductases (微生物の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 加 藤 暢 夫 教 授 江 崎 信 芳

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および遺伝子工学的手法を用いた基礎解析を行うとともに、グリコール酸や光学活性アルコール類などの有用化合物の効率的生産への応用を目的として行った研究結果をまとめたものである。主な内容は次の通りである。

(1) 微生物酵素による酸化反応を利用したグリコール酸生産法について検討を行った。まず、エチレングリコールの片末端のみを特異的に酸化してグリコール酸を生産する微生物の探索を行い、高活性株として *Rhodotorula* sp. 3Pr-126 を得た。本菌の培養菌体を直接触媒とし、エチレングリコール酸化反応の諸条件を検討した結果、酸化酵素活性はプロピレングリコールを培地に添加することにより誘導され、酸化反応には酸素が要求されることが判明した。最適反応条件下で反応を行うと、110 g/l のグリコール酸がモル収率92.2%で生成した。これにより、効率的なグリコール酸生産法が確立された。

(2) *Rhodotorula* sp. 3Pr-126 よりグリコール酸の生産に関与する酵素系の解明を行った。エチレングリコールおよび中間生成物と予想されるグリコールアルデヒドを基質として、本菌の無細胞抽出液中の酸化酵素並びに脱水素酵素の活性を測定した結果、いずれを基質とした場合も NAD^+ 依存性の脱水素酵素活性のみが検出された。また、これらの反応に関与する酵素を精製・単離し諸性質を解明した。

グリコール酸脱水素酵素は、サブユニット分子量約38,000のホモダイマー酵素で、反応生成物であるグリコールアルデヒドからの逆反応も進行した。アミノ酸配列解析および相同性検索の結果から、本酵素は NAD^+ 依存性アルコール脱水素酵素の一種であることが明らかとなった。一方、グリコールアルデヒド脱水素酵素は、サブユニット分子量約77,000のホモテトラマー酵素であり、グリコールアルデヒドからグリコール酸への酸化反応を触媒した。アミノ酸配列解析および相同性検索の結果から、本酵素は NAD^+ 依存性アルデヒド脱水素酵素の一種であることが明らかとなった。また、菌体を用いたグリコール酸生産反応における酸素の要求性は、これら脱水素酵素反応により生成した NADH を NAD^+ に再酸化する際に、電子伝達系等の酸化酵素反応の関与により、酸素が最終電子受容体として必要となると推定された。

(3) 光学活性アルコールの効率的生産法のひとつとして、触媒素子として遺伝子組換え型 NAD(P)H 依存性カルボニル還元酵素を用いるシステムが開発されている。このシステムに利用できる触媒素子のひとつとして、*Candida parapsilosis* IFO 0708 の生産する NADPH 依存性共役ポリケトン還元酵素 (CPR) に着目し検討を加えた。酵素精製の結果、2種のアイソザイム、新規な CPR-C1 および既知の CPR-C2、が単離された。アミノ酸配列解析と相同性検索の結果、両酵素はアルドケト還元酵素 (AKR) ファミリーに属する酵素であることが判明した。両酵素とも、AKR ファミリー酵素の最もよい基質となる *p*-ニトロベンズアルデヒド等を基質として利用しない点が特徴的であった。

(4) アミノ酸配列の情報をもとに、両還元酵素遺伝子のクローニングを行った。CPR-C1, CPR-C2 遺伝子はそれぞれ304および307アミノ酸残基をコードしていた。推定アミノ酸配列の相同性検索の結果、CPR-C1 と CPR-C2 の間では42%の相同性が認められた。また、他の AKR ファミリー酵素とも相同性が認められたが、活性中心の2アミノ酸残基が保存さ

れていないことが判明した。さらに、両酵素遺伝子を pET21a ベクターを用いて、大腸菌内で大量発現させることに成功した。また、CPR-C2 遺伝子を大量発現させた大腸菌を触媒とすることにより上記還元反応システムに適用すると、30 g/l のケトパントラクトンを定量的に D-パントラクトンに変換できることが示された。

論文審査の結果の要旨

酸化還元酵素は、様々な生物種において多種多様なものが存在しており、生体を維持していくためには必要不可欠な酵素群である。一方、最近になって酸化還元酵素の工業的生産プロセスへの利用も新しい展開を見せている。本論文では、工業的に利用価値の高いグリコール酸および光学活性アルコール類の生産に有効な微生物由来の酸化還元酵素について、その探索から基礎解析、さらに実用的生産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) 化学合成法では困難な高純度グリコール酸の生産法を確立するため、著者は、エチレングリコールの酵素的片末端酸化反応に着目し、この反応に適用可能な酸化酵素生産菌として *Rhodotorula* sp. 3Pr-126 を見出した。本菌株を用い、エチレングリコールからグリコール酸への変換条件を設定し、110 g/l という高濃度のグリコール酸を副生成物なしで効率よく生産できることを示した。

(2) *Rhodotorula* sp. 3Pr-126 株におけるグリコール酸生成反応を触媒する酵素系について詳細な検討を行い、本反応に関与する酵素として NAD^+ 依存性アルコール脱水素酵素および NAD^+ 依存性アルデヒド脱水素酵素を特定するとともに、両酵素を精製・単離し諸性質を解明した。

(3) 光学活性アルコール類の生産に有効なカルボニル還元酵素として、*Candida parapsilosis* IFO 0708 の生産する共役ポリケトン還元酵素 (CPR) に着目し、本 CPR について、タンパク質・遺伝子の両面から諸特性を解明した。まず、*C. parapsilosis* IFO 0708 は 1 種類の CPR を生産することが知られていたが、著者はこの他にアイソザイムがもう 1 種類存在することを明らかにし、その諸性質を解明した。また、CPR の一次構造およびコードする CPR 遺伝子の塩基配列を明らかにし、両酵素がアルドケト還元酵素 (AKR) ファミリーに属することを示した。さらに、一般の AKR ファミリー酵素と比較して両酵素では活性中心付近のアミノ酸配列の保存性が低いこと、基質特異性が著しく異なることなど今後の AKR ファミリー酵素研究における新たな研究展開の始点となる重要な知見を得た。

(4) CPR 大量発現大腸菌を触媒とすることにより、ケトパントラクトンを D-パントテン酸合成の中間体である光学活性アルコール、D-パントラクトンに効率よく転換できることを示した。これにより、遺伝子組換え型の CPR を様々な光学活性アルコールの生産に応用できる可能性が示された。

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、酸化還元酵素の分子レベルでの研究の進展を促進するとともに、新たな産業的利用へ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14年9月12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。