

氏 名	Rungruedee Thiwthong ルングルウディ ティウソン
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1472 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 23 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	Studies on microbial oxidoreductases useful for the production of glyoxylic acid and chiral intermediates (グリオキシル酸およびキラル中間体の生産に有用な微生物酸化還元酵素に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 清 水 昌 教 授 江 崎 信 芳 教 授 喜 多 恵 子

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、微生物の生産する数種類の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い、さらに産業的に重要なグリオキシル酸やキラル中間体の効率的生産への応用を目指して遂行し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) グリオキサールの片末端のみを酸化してグリオキシル酸を生産する微生物の探索を行い、高活性株として *Pseudomonas* sp. MX-058 株を見出した。本菌よりグリオキサール酸化反応に関与する酵素の単離を行い、関与する酵素がグリオキサールからグリオキシル酸と過酸化水素を生成するアルデヒドオキシダーゼ (AIOD) の一種であることを明らかにした。また、サブユニット構造の異なる 2 種のアイソザイムが単離され、これまでに報告されている微生物由来の AIOD とは異なるサブユニット構造 (4 量体および 5 量体) を有すること、および両アイソザイムはほぼ同等の性質を示すことを認めた。基質特異性の検討から、本酵素はグリオキシル酸のアルデヒド基を酸化する能力は低く、グリオキサールを酸化してグリオキシル酸に変換するための触媒として利用できる可能性が示された。

(2) *Candida macedoniensis* 由来の旧黄色酵素は、NAD(P)H を補酵素としてケトイソフォロン (KIP) の炭素二重結合の不斉水素化反応を触媒し、キラル化合物である (6*R*)-レボジオンを生成する。そこで、本菌株より旧黄色酵素遺伝子のクローニングを行った。クローニングされた酵素遺伝子は、403 アミノ酸残基をコードしており、*Saccharomyces cerevisiae* 等の旧黄色酵素と高い相同性を示した。本酵素遺伝子を T7 プロモーター下流に挿入した組換えプラスミド pETOYE を構築し、大腸菌内で大量発現させることに成功した。さらに、補酵素 NAD(P)H 再生系酵素としてグルコース脱水素酵素 (GDH) 遺伝子を共発現させた組換え大腸菌を調製することに成功した。この共発現大腸菌を触媒とすることにより、100 g/l の KIP をほぼ定量的に (6*R*)-レボジオンに変換することに成功した。

(3) (6*R*)-レボジオンのカルボニル基を不斉還元して、2 つのキラル中心を持つ化合物 (4*R*,6*R*)-アクチノールに変換する NADH 依存性レボジオン還元酵素が *Corynebacterium aquaticum* からすでに単離されている。そこで、本酵素遺伝子と GDH 遺伝子との共発現大腸菌を調製し、(4*R*,6*R*)-アクチノール生産プロセスへの導入を試みた。共発現大腸菌を触媒として (6*R*)-レボジオンの不斉還元を行うと、目的の (4*R*,6*R*)-アクチノールの生成と同時に (4*S*,6*R*)-体が生成することが明らかとなった。これは、一旦生成した (4*R*,6*R*)-体が酵素的に立体反転し (4*S*,6*R*)-体に変換されるためであり、有機溶媒の添加によりこの立体反転を抑えることも可能となった。旧黄色酵素あるいはレボジオン還元酵素遺伝子を、GDH 遺伝子とともに大腸菌内で共発現させた 2 種類の共発現大腸菌を触媒として、2 段階不斉還元反応により 100 g/l の KIP をほぼ定量的に (4*R*,6*R*)-アクチノールに変換できることを示した。

(4) *C. macedoniensis* が KIP のカルボニル基を不斉還元して、(4*S*)-ヒドキシイソフォロンを生成する酵素活性を有することから、本酵素の単離および諸性質の解明を行った。その結果、本酵素は同菌株より以前に単離されていた NADPH 依存性のカルボニル還元酵素と同一酵素であることが明らかとなった。本酵素はカルボニル還元反応において広い基質特異性

と高い立体選択性を示した。本酵素遺伝子のクローニングを行い、塩基配列の解析を行った。本酵素遺伝子は345アミノ酸残基をコードし、ジヒドロフラボノール還元酵素ファミリーに属することを認めた。次に、本酵素遺伝子と GDH 遺伝子を共発現させた大腸菌を触媒として、4-クロロアセト酢酸エチルの不斉還元反応を行うと、約 300 g/l の (S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルを効率的に生産できることが判明した。

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に存在しており、生体を維持するためには必要不可欠な酵素群である。また近年、酸化還元酵素の工業的生産プロセスへの利用も新たな展開を見せている。本論文では、産業的に重要なグリオキシル酸およびキラル化合物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、さらに実用生産に向けた検討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) 各種化合物の工業原料となるグリオキシル酸のバイオプロセスによる生産法を確立するため、著者は、安価なグリオキサ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 *Pseudomonas* sp. MX-058 を見出した。本菌株におけるグリオキシ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、過酸化水素生成を伴うアルデヒドオキシダーゼが本反応に関与することを明らかにした。本酵素はグリオキサールと比較して、グリオキシル酸に対する酸化活性が低く、グリオキシル酸の効率的生産への応用が期待できる。また、本酵素について2種のアイソザイムの存在を認め、いずれもこれまでに報告のないサブユニット構造を有する新規なアルデヒドオキシダーゼであることを示している。
- (2) エノン化合物の炭素二重結合の不斉水素化反応を触媒する旧黄色酵素遺伝子を、*Candida macedoniensis* よりクローニングし、全塩基配列およびアミノ酸配列を明らかにした。さらに、本酵素遺伝子および補酵素再生系酵素（グルコース脱水素酵素）遺伝子の共発現大腸菌を調製し、これを触媒としてエノン化合物の一種であるケトイソフォロンの炭素二重結合を不斉水素化することにより、キラル化合物である (6*R*)-レボジオンを効率よく生産できることを示した。旧黄色酵素は最初に発見されたフラビン酵素であり長年生化学的な研究対象とされてきたが、これを初めて物質生産の場に応用した点で画期的な研究と言える。
- (3) *Corynebacterium aquaticum* 由来のレボジオン還元酵素遺伝子とグルコース脱水素酵素遺伝子を共発現させた組換え大腸菌を調製し、これを触媒として (6*R*)-レボジオンから2つのキラル中心を有する化合物 (4*R*,6*R*)-アクチノールを生産することに成功した。さらに、この過程で (4*R*,6*R*)-アクチノールの酵素的立体反転反応の発見や有機溶媒添加による立体反転反応の抑制等、酵素触媒による立体選択性制御のための鍵となる重要な知見を得ている。さらに、上記の旧黄色酵素触媒反応との組み合わせにより、プロキラルなケトイソフォロンからの効率的な (4*R*,6*R*)-アクチノール生産プロセスの確立を行い、工業生産への可能性を示した。
- (4) *C. macedoniensis* から NADPH 依存性カルボニル還元酵素遺伝子のクローニングを行い、本酵素がジヒドロフラボノール還元酵素ファミリーに属することを明らかにしている。本酵素は、高い立体選択性と幅広い基質特異性を示すことからキラルアルコール生産の触媒素子としての利用価値が高い。本酵素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、(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルを 300 g/l という高濃度で生産できることを示した。これにより、本酵素を様々なキラル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17年1月13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。