

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	Amr Mohammed Hassan Hassan Awad
論文題目	Studies of Novel Enzymes Involved in Metabolism of 2-Chloroacrylic Acid (2-クロロアクリル酸の代謝に関与する新規酵素の研究)		
(論文内容の要旨)			
有機ハロゲン化合物は化学工業の基幹をなす化合物群であり、その酵素的変換法の開発はグリーンケミストリー実現に向けた鍵として注目される。一方、有機ハロゲン化合物の中には環境汚染の原因物質として問題となるものも多く、その分解菌や代謝酵素は環境浄化に有用と考えられる。こうした観点から有機ハロゲン化合物に作用する種々の酵素が単離され機能解析されてきた。しかしながら、その大部分は飽和脂肪族有機ハロゲン化合物または芳香族有機ハロゲン化合物に作用するものであり、不飽和脂肪族有機ハロゲン化合物に作用する酵素に関する知見はきわめて限られている。本研究は不飽和脂肪族有機ハロゲン化合物の一種である 2-クロロアクリル酸 (2-CAA) を資化する細菌を対象とし、これらの細菌が生産する 2-CAA 代謝酵素の触媒特性の解明、反応機構の解析、応用面の開発を行ったものであり、その成果は以下のように要約される。			
1. 2-CAA 資化性細菌である <i>Pseudomonas</i> sp. YL は 2-CAA を炭素源として生育するとき、フラビンタンパク質 CAA67_YL を誘導生産する。CAA67_YL の遺伝子は、547 アミノ酸残基からなる分子量 59,301 のタンパク質をコードしていた。本タンパク質を組換え大腸菌で高生産し、均一に精製した。本タンパク質の 2-CAA に対する作用を調べた結果、嫌気条件で還元型 FAD を添加した場合に 2-CAA をピルビン酸に変換する反応を触媒することが示された。本酵素反応は還元型 FAD の消費を伴わずに進行した。還元型 FAD の代わりに還元型 FMN を添加した場合や、アポ酵素を用いた場合には活性が見られなかったことから、本酵素活性は還元型 FAD に依存することが示された。H₂¹⁸O 中の反応では [¹⁸O]ピルビン酸が生成したことから、本酵素は水付加反応を触媒することが明らかとなった。2-CAA の炭素-炭素二重結合への水付加によって 2-クロロ-2-ヒドロキシプロピオン酸が生成し、ここから塩化水素が脱離することでピルビン酸が生成するものと考えられた。2-ブロモアクリル酸に対して同様の活性を示す一方、アクリル酸やメタクリル酸には作用しなかったことから、本酵素を 2-ハロアクリル酸ヒドラターゼと命名した。本酵素は還元型 FAD 依存的な水付加反応を触媒する点でユニークなフラビン酵素である。			
2. 2-ハロアクリル酸ヒドラターゼの反応に要求される FADH₂ の生成機構を調べた。一次構造解析の結果、CAA67_YL の 205 番目から 211 番目のアミノ酸残基の配列が、NAD(P)H 結合モチーフと考えられる AXXGXXG であることが見いだされた。そこで、本酵素が NADH または NADPH による FAD の還元活性をもつか調べた。その結果、NADH の存在下、FAD の還元を触媒することが示された。一方、NADPH は本酵素の補酵素とはならなかった。CAA67_YL は NADH 依存的な FAD 還元活性と、FADH₂ 依存的な 2-ハロアクリル酸への水付加活性をあわせもつ二機能性酵素であることが明らかとなった。			

3. 2-ハロアクリル酸ヒドラーゼの反応機構を解析した。反応液の紫外可視吸収スペクトル解析により、酵素と還元型 FAD を含む反応液に 2-CAA を添加した際にフラボセミキノン生成を示すと考えられるスペクトル変化が生じることを見いだした。また、スピントラップ剤 3,5-ジブromo-4-ニトロソベンゼンスルホン酸 (DBNBS) を用いた ESR スペクトル解析により、本酵素反応中にラジカルが生成することを明らかにした。DBNBS 添加によって本酵素反応が阻害されることも見いだした。一方、FAD アナログを用いた反応解析を行った。二電子の授受はできるが一電子の授受ができない 5-デアザ FAD を用いた場合、2-CAA に対するヒドラーゼ活性は見られなかったが、一電子授受が可能な 1-デアザ FAD を用いた場合、ヒドラーゼ活性が見られた。以上の結果、反応の過程において FADH₂ と基質の間で一電子の授受が行われ、これにより生成する基質由来ラジカルに水が付加するという機構で反応が進行するものと考えられた。

4. *Burkholderia* sp. WS 由来の NADPH 依存性酵素 2-ハロアクリル酸レダクターゼを用い、2-CAA の不斉還元によって、除草剤原料として有用な (S)-2-クロロプロピオン酸を生産するシステムを構築した。*Bacillus subtilis* 由来のグルコースデヒドロゲナーゼと本酵素を共発現した大腸菌を用い、2-CAA の不斉還元反応によって消費される NADPH をグルコースデヒドロゲナーゼの反応で再生しつつ目的物を生産した。385 mM 2-CAA を添加した場合、30 時間の反応で 346 mM (37.4 g/l) の (S)-2-クロロプロピオン酸が生成した。収率は 89.8% であり、生成物の光学純度は 99.9% e.e. 以上であった。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

有機ハロゲン化合物の変換反応を触媒する酵素は有用物質生産や環境浄化への応用などの観点から注目される。種々の微生物から有機ハロゲン化合物に作用する酵素が単離され、機能解析や応用開発が行われてきたが、不飽和脂肪族有機ハロゲン化合物に作用する酵素の例はきわめて限られている。本研究は、不飽和脂肪族有機ハロゲン化合物の一種である 2-CAA に作用する酵素の機能解析と応用開発を行ったものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. 2-CAA 資化性細菌 *Pseudomonas* sp. YL が FADH_2 依存的に 2-CAA および 2-ブromoアクリル酸の脱ハロゲン反応を触媒する新規酵素を生産することを見いだした。基質への水付加によって脱ハロゲン反応が進行することを示し、本酵素を 2-ハロアクリル酸ヒドラターゼと命名した。通常、酸化還元反応に関与する FADH_2 が、非酸化還元反応である水付加反応に関与することを示した研究成果であり、特筆に値する。

2. 2-ハロアクリル酸ヒドラターゼが、 FADH_2 依存的な 2-ハロアクリル酸への水付加反応以外に、 NADH 依存的な FAD 還元反応をも触媒する二機能性酵素であることを明らかにした。水付加反応に要求される FADH_2 が、同一酵素の触媒作用によって生成することを見いだしたものであり、酵素化学的に意義深い研究成果といえる。

3. 2-ハロアクリル酸ヒドラターゼによる 2-CAA の変換反応中にラジカルが生成することを見いだした。また、一電子授受が可能な 1-デアザ FAD を FAD の代わりに反応系に添加した場合、部分的に活性が回復することを見いだした。反応過程で FADH_2 と基質の間で一電子の授受が行われ、これにより生成する基質由来ラジカルに水が付加する機構で反応が進行することを示唆している。他に類例のない FADH_2 依存的な水付加反応のメカニズム解明につながる意義深い研究成果といえる。

4. 2-CAA 資化性細菌 *Burkholderia* sp. WS 由来の NADPH 依存性酵素である 2-ハロアクリル酸レダクターゼを用い、除草剤の合成前駆体として有用な (S)-2-クロロプロピオン酸を合成する方法を開発した。高価な NADPH を安価なグルコースの還元力を利用して再生するグルコースデヒドロゲナーゼの反応と共役させ、基質濃度などの反応条件を最適化することにより、従来法を上回る収率で (S)-2-クロロプロピオン酸を合成する方法を確立した。本研究成果は応用微生物学的に高く評価される。

以上のように本論文は、不飽和有機ハロゲン化合物に作用する新しい脱ハロゲン酵素を見だし、その触媒特性を明らかにするとともに、不飽和有機ハロゲン化合物の不斉還元酵素を利用した光学活性化合物生産法を開発したものであり、分子微生物科学、酵素化学、応用微生物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 22 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。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。
要旨公開可能日： 年 月 日以降