



Title	Chemical and Biotechnological Strategies to Enhance the Catalytic Efficiency and Utility of Hemoprotein-Based Biocatalysis for Aldoxime Dehydration
Author(s)	阿部, 美笛
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105420
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (阿 部 美 笛)	
論文題名	Chemical and Biotechnological Strategies to Enhance the Catalytic Efficiency and Utility of Hemoprotein-Based Biocatalysis for Aldoxime Dehydration (アルドキシム脱水反応におけるヘムタンパク質を基盤としたバイオ触媒の高活性化とその応用拡張をめざした化学的・生物工学的戦略)
論文内容の要旨 近年、持続可能な社会の実現に向けて環境調和型の化学プロセスの開発が強く求められており、温和な条件下で高い選択性を示す酵素触媒は、産業的・学術的に大きな注目を集めている。中でもヘムタンパク質は、金属補因子の改変やタンパク質工学的手法の導入により多様な反応性を付与でき、非天然反応を含む幅広い反応への応用が期待される触媒である。しかしながら、基質適応範囲の制限、過剰発現時における細胞内ヘム供給不足、ならびに水系条件への依存等の課題が、実用化に向けた大きな障壁となっている。本博士論文に記載した研究では、これらの課題の克服を目的とし、ヘムタンパク質を基盤とするバイオ触媒の高活性化とその応用拡張を図るために、以下に示す化学的および生物工学的アプローチを適用している。具体的には、人工金属酵素の構築、代謝工学的手法、ならびに最適な反応系設計を模索し、ヘムタンパク質に基づくアルドキシム脱水反応の触媒活性および適用範囲の拡充を実現している。 第一章では、アルドキシムデヒドラターゼが有する基質適用範囲の制限を克服するため、ミオグロビンにポルフィセン鉄錯体を人工補因子として再構成し、得られたタンパク質が人工アルドキシムデヒドラターゼとして機能することを示した。本人工金属酵素は、触媒回転数が最大9300を達成するとともに、天然酵素では変換不可能な低反応性の<i>O</i>-アルキルアルドキシムに対しても触媒活性を示し、幅広くアルドキシム誘導体からニトリルへの変換が可能であった。さらに、アルドキシムデヒドラターゼの反応機構に着目し、ミオグロビンのヘムポケット内のアミノ酸残基をセリン、スレオニン、チロシンに置換する部位特異的変異導入を行うことで、触媒効率が大幅に向上した。この酵素設計により、天然酵素ではアクセスできない基質も変換可能となり、高い基質多様性を有する人工金属酵素の構築に成功した。 第二章では、大腸菌におけるヘム<i>b</i>の過剰生産を目的として、C4型ヘム生合成経路を菌内へ導入した。具体的には、<i>Paracoccus denitrificans</i>由来の5-アミノレブリン酸合成酵素をヘムタンパク質と共発現させることで、細胞内ヘム供給効率が向上した。その結果、高価な5-アミノレブリン酸を外部添加することなく、高収率でホロタンパク質を得ることが可能となった。特筆すべきことに、本手法によって得られたヘム生産量は、従来の培養法を上回るものであった。さらに、複数のヘムタンパク質においても触媒活性の向上が確認され、本手法が汎用的なヘム生産プラットフォームとして有効であることを明らかにした。 第三章では、酵素反応が水系条件に制限される課題に対処するため、有機溶媒耐性細菌である <i>Rhodococcus erythropolis</i> L88をホールセル触媒の宿主として選定し、有機溶媒中でのアルドキシムからニトリルへの変換反応について報告した。アルドキシムデヒドラターゼの活性を従来の大腸菌をベースとしたホールセル触媒と比較したところ、大腸菌ベースのホールセル触媒はヘキサン中で活性を失うのに対し、<i>Rhodococcus erythropolis</i> L88をベースとしたホールセル触媒は5 mg/mLの低い触媒濃度においてもヘキサン中で活性を保持した。さらに基質適用範囲の評価により、本反応系が多様なアルドキシムに対応するニトリルへと変換が可能であり、フラスコスケールでの反応にも適用可能であることを確認した。 以上より、本研究は、(i) 人工補因子の導入による触媒機能の拡張、(ii) 代謝工学的手法を用いた細胞内ヘム生産量の増強、ならびに (iii) 非水系条件下での反応を可能とする反応系設計を体系的に実施することにより、ヘムタンパク質触媒の有用性を大きく高め得ることを明らかにした。本研究において達成された触媒効率および基質適用範囲の拡大、ヘムタンパク質生産コストの低減、ならびにフラスコスケールにおける有機溶媒環境下での高い堅牢性は、ヘムタンパク質が生体触媒としてより広範な化学分野へ展開可能であることを示している。以上の成果は、ヘムタンパク質に基づく持続可能なバイオ触媒システムのさらなる発展に資する基礎的知見を提供するものである。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (阿 部 美 笛)			
論文審査担当者		(職)	氏 名
	主 査	教授	林 高史
	副 査	教授	南方 聖司
	副 査	教授	藤内 謙光
	副 査	教授	上松 太郎
	副 査	教授	櫻井 英博
	副 査	教授	菅 大介
	副 査	教授	宇山 浩
	副 査	教授	佐伯 昭紀
	副 査	教授	中山 健一
	副 査	教授	古川 森也
	副 査	教授	古澤 孝弘 (産業科学研究所)
	副 査	教授	能木 雅也 (産業科学研究所)
論文審査の結果の要旨			
ヘムタンパク質はポルフィリン鉄錯体を補因子として有し、生体内で多様な触媒反応を担う重要なタンパク質群である。近年、アルドキシムを脱水してニトリルへと変換するアルドキシムデヒドラターゼ (Oxd) と呼ばれる新規ヘムタンパク質 (酵素) が発見されている。しかし、この酵素の反応機構や実用化に向けた研究は、いまだ初期段階にとどまっている。本博士論文の著者は、このOxdの生体触媒反応に着目し、酵素設計・代謝工学・反応系設計の三方向からヘムタンパク質を基盤としたバイオ触媒開発とその高機能化を図り、得られた成果を以下のようにまとめている。 第一章では、天然酵素Oxdの基質選択性の制約を克服するため、酸素貯蔵ヘムタンパク質であるミオグロビンに対して、天然のヘムの代わりにポルフィセン鉄錯体 (FePc) を導入した再構成ミオグロビン (rMb-FePc) を用いて、人工アルドキシムデヒドラターゼを開発したことを記述している。このrMb-FePc は天然ミオグロビンや FePc 単独では達成できない高い触媒活性を有している。また、rMb-FePcはOxdが反応しない非天然基質に対しても顕著な触媒能を発揮する興味深い知見を得ている。さらに、rMb-FePcの活性部位近傍に 部位特異的変異導入を行うことで触媒回転数 (TOF) が大幅に向上し、人工金属酵素の合理的設計に有効であることも報告されている。 第二章では、ヘムタンパク質の発現におけるボトルネックであるヘム補因子供給不足に着目し、大腸菌内で真核生物由来の 5-アミノレブリン酸合成酵素を共発現させることで C4 経路を導入し、ヘム合成を強化する代謝工学的アプローチの展開が提案されている。これにより、外部から高価な 5-アミノレブリン酸を添加することなく、細胞内でのヘム供給を強化し、Oxdをはじめ様々なヘムタンパク質においてホロ体収率が向上することが明らかになっている。さらに、得られたヘムタンパク質を用いたニトリル合成や、ナイトレン転移反応、シクロプロパン化反応において、それぞれの触媒活性が向上することを実証し、本手法が汎用的なヘムタンパク質生産基盤として有効である興味深い知見が示されている。 第三章では、酵素反応の溶媒が本来水系条件に制限される課題に対し、有機溶媒耐性菌 <i>Rhodococcus erythropolis</i> L88 をホールセル触媒の宿主として用いることにより、有機溶媒中でのアルドキシム脱水反応へと展開する戦略が示されている。従来広く用いられている大腸菌ベースのホールセル触媒は、ヘキサン中ではその触媒活性が喪失するが、上記の微生物を用いたホールセル触媒系では、ヘキサン中でも高い触媒活性を保持する画期的な結果が記述されている。さらに、スケールアップ実験においても高収率でニトリル生成物が得られ、疎水性基質に対しても実用的なホールセル触媒系として機能することが明らかとなっている。 以上のように、本博士論文は、補因子化学・タンパク質工学・代謝工学・反応工学を統合した多階層的アプロー			

チにより、ヘムタンパク質を基盤としたバイオ触媒の反応性・適用範囲・実用性を大きく拡張した点に独創性がある。人工金属酵素の設計指針、ヘム供給経路の代謝工学、さらには有機溶媒中で機能するホールセル触媒の構築に至るまで、基礎から応用にわたる幅広い知見を提供しており、今後の持続可能な化学プロセスの発展に寄与するものと期待される。よって、本論文は博士論文として高い価値があるものと認める。