

Title	The production of useful compounds by whole-cell catalyst with thermostable enzyme
Author(s)	Hibino, Aiko
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/26256
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

[題 名] The production of useful compounds by whole-cell catalyst with thermostable enzyme
(好熱菌酵素を用いたwhole-cell catalystによる有用物質の生産)

学位申請者 日比野 愛子

第1章 緒言

現在、環境問題への取り組みから環境負荷が小さく、持続可能な化学合成(Green Sustainable Chemistry)が推奨されている。医薬品、香料、機能性食品素材、化成品合成に酵素触媒を利用するバイオプロセスは温和な条件での反応が可能であり、基質、位置、立体特異性の高さといった特徴から工業的に有用であるとされている。

好熱菌由来の酵素(thermozyme)は高熱環境下という通常のタンパク質変性状態で活性をもつためにfoldingが強くてきている。このことから過酷な環境(高pH、低pH、界面活性剤や有機溶媒がある環境)でも活性をもつことが知られている。また、高温での反応は、生成時、反応時においてコンタミネーションしづらく、基質の粘度の低減、基質の溶解度の上昇といった点から工業的利用に向いている。この好熱菌酵素を宿主細胞で発現させ、熱処理により、宿主由来のタンパク質を失活させ宿主で発現された好熱菌由来の酵素のみが活性を持つ、つまり、副反応が起こらない反応環境で生産実験を行った。

第2章

好熱菌酵素由来のアルコール脱水素酵素を発現させた疎水性細 *Rhodococcus rhodochrous* NBRC15564 を whole-cell catalyst として用いた溶媒を使わない有機溶媒中での反応

今回、有機溶媒一層系における反応を行うために、有機溶媒への分散・吸着が可能な疎水性および両親媒性、親水性の細菌を宿主とすることで溶媒のない環境での変換反応を検討した。このうち、有機溶媒中での反応効率が良い、現在調べられている中でもっとも疎水性の高い *R. rhodochrous* NBRC15564 をもちいて溶媒のない環境での難水溶性物質の変換反応を行った。

本研究では2,2,2-Trifluoroacetophenone (TFAP)から(*R*)-(Trifluoromethyl)benzylalcohol (TFMBA) へのアルコール脱水素酵素(ADH_{T1})を用いた変換反応をモデル反応とし、補酵素NADH再生のカップリング反応としてCyclohexanolからCyclohexanoneへの別のアルコール脱水素酵素(ADH_{T2})を用いた変換反応を行った。それぞれ1mlのTFAPとCyclohexanol、基質の約1/1000molの補酵素NADH、800mgの熱処理をしたwet cellsを用いて生産実験を行った。つまり、この反応系には溶媒が含まれていない。この生産実験により約1ml(3.7M)約98%のTFAPが変換されたことを報告する。

第3章

好熱菌酵素を発現させた大腸菌を用いた5-aminolevulinic acidからテトラピロールの共通前駆体uroporphyrinogen III(Urogen III)の合成

ポルフィリンはピロールが4つ組み合わさって出来た環状構造を持つ有機化合物の総称である。生体内では酸素輸送(ヘム)や植物の光合成(クロロフィル)、酵素機能(Vitamin B₁₂)など、生命活動に欠かせない化合物である。ポルフィリンの光学特性や安定な酸化還元特性が注目され、人工的にポルフィリン異性体の開発が研究されているほか、色素や触媒として多様に用いられている。しかし、その複雑さから、化学的合成では反応の収率が非常に悪く、時間、コストもかかる。例えば、現在、Vitamin B₁₂合成に用いられている発酵法では遺伝子組み換えによりVitamin B₁₂合成に関わる酵素を過剰発現させることにより、Vitamin B₁₂の収率をあげている。ただ、単純に酵素を過剰発現させるだけではこれ以上Vitamin B₁₂合成に関わらない副産物も多く合成されてしまうことも報告されている。これらの副産物なしにより多くのVitamin B₁₂を合成することは産業において大きな役割を果たすことが期待される。本研究では *Thermus thermophilus* HB 8 由来の 5-aminolevulinic acid dehydratase, porphobilinogen deaminase, uroporphyrinogen III synthase を大腸菌でそれぞれ発現させ、5-aminolevulinic acid からヘム、Vitamin B₁₂ などの最後の共通前駆体である

Urogen IIIを合成した。この反応において、発酵法で過剰生産される副産物の生産を抑えることに成功した。

第4章 総括

好熱菌酵素を発現させた宿主細胞を用いたwhole cell catalysisを行った。有機溶媒中での反応では熱処理を行った菌は熱処理を行わなかった菌よりも反応効率が良かった。また、Urogen IIIの反応では熱処理により膜透過性の上がったため、菌それぞれに1酵素ずつ発現させ、多段階反応が行われた。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (日比野 愛子)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教 授 大竹 久夫
	副 査	教 授 金谷 茂則
	副 査	教 授 清水 浩

論文審査の結果の要旨

微生物機能を活用した化成品製造プロセスは、環境に優しい工業プロセスとして注目を集めている。本論文では、好熱菌由来の酵素を疎水性細菌や大腸菌などの中温菌で発現させ、加熱処理により宿主酵素を失活させて製造する生体触媒が、非水系環境下での難水溶性の化成品製造に有効であり、化学合成法では製造することが難しい複雑な構造をもつ化成品の製造にも利用できることを、具体的な事例を示しながら論じている。

第一章では、化成品製造に生体触媒を用いることの利点について要約し、中でも微生物細胞を生体触媒としてそのまま用いる whole-cell catalyst 法が、単離精製した酵素を用いる方法に比べて優れている点を概説している。また、難水溶性の化成品を有機溶媒を使わずに製造するバイオプロセスの構築を念頭において、好熱菌由来酵素および難水溶性の化学原料に親和性の高い疎水性細菌の特性と、加熱処理による宿主酵素の選択的失活方法を活用する副産物の生産を抑えた化成品製造の可能性について述べている。

第二章では、好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 由来の 2 種類のアルコール脱水素酵素(ADH_{Tt1} および ADH_{Tt2}) を、疎水性細菌 *Rhodococcus rhodochrous* NBRC15564 において発現させ、この形質転換体を 70 °C の温度で 10 分加熱処理することにより宿主 *R. rhodochrous* 由来の酵素を失活させ、非水系の環境下で機能する whole-cell catalyst が簡便に製造できることを述べている。具体的には、有機溶媒を使わずに難水溶性の化学原料のみを含む反応系に、好熱菌 *T. thermophilus* HB27 由来の 2 種類のアルコール脱水素酵素を発現させた後に加熱処理した疎水性細菌 *R. rhodochrous* NBRC15564 細胞を、2,2,2-Trifluoroacetophenone (TFAP) および Cyclohexanol のみを体積比 1 : 1 に混合した溶液中に分散させ、TFAP からの TFMBA への変換反応が可能であることを明らかにしている。*T. thermophilus* HB27 由来のアルコール脱水素酵素 (ADH_{Tt1}) は TFAP からの TFMBA への変換反応を触媒するが、この反応により補酵素 NADH が消費される。このため NADH を再生する必要があり、*T. thermophilus* HB27 アルコール脱水素酵素(ADH_{Tt2})を用いた Cyclohexanol から Cyclohexanone への変換反応により NADH の再生を行わせている。この反応系は 1 ml の TFAP、1 ml の Cyclohexanol、TFAP に対して約 1/1000 モル比となる補酵素 NADH および 800 mg の加熱処理した *R. rhodochrous* 細胞のみを含み、通常非水系の反応に用いられる有機溶媒は一切含まれていない。この実験により、1 ml(3.7M) の TFAP が 48 時間の反応時間内に約 97% の収率で TFMBA に変換された。この結果は、好熱菌酵素を疎水性細菌を宿主として発現させ、加熱処理後に whole-cell catalyst として利用することが、有機溶媒を使わずに難水溶性の化成品を製造するバイオプロセスの構築に有効であることを示唆している。

第三章では、好熱菌 *T. thermophilus* HB8 由来の 3 種類の酵素を大腸菌で発現させ、5-Aminolevulinic acid(ALA) からテトラピロールの共通前駆体である Uroporphyrinogen III(Urogen III)の合成を試みている。具体的には、ALA を Porphobilinogen (PBG)に変換する酵素 ALA dehydratase (ALAD)、PBG を Hydroxymethylbilane (HMB)に変換

する酵素 porphobilinogen deaminase (PBGD) および HMB を Urogen III に変換する酵素 Urogen III synthase(UROS)を、それぞれ大腸菌 BL21(DE3)内で発現させた後に 70 °C で 10 分加熱処理を行い生体触媒を製造し、ALA からヘム、Vitamin B₁₂ などの最後の共通前駆体である Urogen III を合成している。各酵素のもつ最適温度、最適 pH を参考に、3 種類の生体触媒を混合した場合の最適反応条件を決定した後、温度 60 °C、pH8.0 で 4 時間反応させることにより、原料として用いた 10mM の ALA から 1.1 mM の Urogen III が生産されている。この反応においては、化学量論的に 1 モルの Urogen III の合成に 8 モルの ALA が必要であることから、88% の ALA が Urogen III に変換されたことが示唆されている。また、この反応における副産物である Uroporphyrinogen I は殆ど生成しておらず、Urogen III に変換されなかった ALA は、熱分解を受け反応には利用されなかったと考えられた。

ALA からの構造が複雑な Urogen III を化学合成することは、反応の収率が非常に悪く時間もコストも掛かることが知られている。また、生きた細胞を用いる発酵法では、副産物の生産を抑えることが難しく ALA からの Urogen III の収率が大きく低下してしまう。本研究で得られた結果は、好熱菌酵素を大腸菌で発現させた後に、加熱処理により宿主由来の酵素を失活させて用いる whole-cell catalyst 法が、Urogen III の様な複雑な化学品の合成にも有効であることを示している。

第四章では、以上の結果を総括するとともに、好熱菌の酵素を様々な中温宿主細菌で発現させた後に加熱処理して宿主由来の酵素を失活させて用いる生体触媒法が、疎水性化成品を有機溶媒を用いずに製造するプロセスや構造的に複雑で化学合成が困難な化成品の合成に有効であると結論づけている。

以上のように、本論文は環境に優しい工業プロセスとして注目を集めている微生物機能を活用した化成品製造プロセスに新しい生体触媒利用技術を提案するとともにその応用の可能性を明示したものであり、その成果は生物工学の発展に大いに寄与するものと評価できる。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。