

氏 名 (本籍)	古 川 裕 考 (福岡県)
学 位 の 種 類	博 士 (工学)
学 位 授 与 番 号	甲第 209 号
学 位 授 与 日 付	平成 15 年 6 月 18 日
専 攻	物質工学専攻
学 位 論 文 題 目	Studies on Microbial Conversion of Plant Essential Oil, Eugenol (植物精油オイゲノールの微生物変換に関する研究)
学位論文審査委員	(主査) 教 授 長 澤 透 (副査) 教 授 木 内 一 壽 教 授 吉 田 敏 助教授 吉 田 豊 和

論文内容の要旨

植物精油オイゲノールやイソオイゲノールは、天然に豊富に存在する安価な再生可能な余剰資源である。微生物によるオイゲノールやイソオイゲノールの分解代謝が検討され、オイゲノールの水酸化反応を触媒する2種類の酵素オイゲノールデヒドロゲナーゼ、バニリルアルコールオキシダーゼの反応特性の解析、比較が試みられた。またオイゲノールの微生物代謝系や酵素の触媒作用を利用してオイゲノールやその関連化合物を付加価値の高い有用物質へ変換するプロセスの構築が検討された。以下に示したような新しい知見、意義深い研究結果と考察が論文にまとめられた。

(1) オイゲノールデヒドロゲナーゼの特性解析とその応用

オイゲノールの微生物分解代謝の初発ステップは、オイゲノールをコニフェリルアルコールに変換する2重結合のシフトを伴うユニークな水酸化反応であり、本論文で初めて本反応の酵素レベルでの検討が試みられた。

自然界より強力なオイゲノール分解活性を示す細菌 *Pseudomonas fluorescens* E118 株が分離され、本菌の細胞抽出液にオイゲノールをコニフェリルアルコールへ変換する酵素活性が見出された。本酵素が、硫安分画、各種クロマトグラフィーによって精製され、単一の標品が得られた。本酵素は α サブユニット 10kDa、 β サブユニット 58kDa からなる分子量 68kDa のヘテロダイマーであり、吸収スペクトルの解析から α サブユニットはヘムを、 β サブユニットはフラビンを含んでいることが示唆された。本精製酵素はフェナジンメトスルフェート (PMS) のような電子受容体が必要とし、フラボチクロームタンパク質の範疇に入る脱水素酵素であることが明らかにされた。

本酵素の反応特性が解析され、オイゲノールのコニフェリルアルコールへの変換、4-アルキルフェノールの水酸化、バニリルアルコールのバニリンへの酸化の3種類の特徴的な反応を触媒することが明らかにされた。基質特異性の詳細な検討から、本酵素の基質となるのは、*p*-アルキルフェノール類で、アルキル基の *p* 位に水酸基を、アルキル基の α 位に水素原子を有する構造を持

つことが必須であることが示された。重酸素水 (H_2^{18}O) 中での反応から、反応生成物のコニフェリルアルコールに重酸素原子が取り込まれることがマスマススペクトルで解析された。その反応機構の解析から、キノイド中間体の α 位の炭素原子からヒドリドイオンの引き抜きが起こり、水の酸素原子が水酸基に取り込まれる反応機構が提案された。これらの成果は、「第一章のセクション 1」に述べられている。

また、本酵素はプロキラルな *p*-アルキルフェノール類からキラル骨格 1-(*p*-ヒドロキシフェニル)アルキルアルコール類の合成に有用であることが示された。これらの成果は、「第一章のセクション 2」にまとめられている。

さらに、本菌のオイゲノール分解代謝系を利用してオイゲノールや安価なチョウジ油を原料にした抗酸化剤フェルラ酸の生産方法が検討された。本研究はさらに進展しつつあり、「追補(アペンディックス)」に述べられている。

(2) バニリルアルコールオキシダーゼの特性解析とその応用

オイゲノールデヒドロゲナーゼがバニリルアルコールを酸化してバニリンを生成することが明らかにされた。これまでより、本酸化反応はバニリルアルコールオキシダーゼ (E.C. 1.1.3.38) によって触媒されることが知られている。そこで、同じ基質に作用して同じ反応を触媒する両酵素の差を明らかにすることが試みられた。自然界より分離された *Byssochlamys fulva* V107 のバニリルアルコールオキシダーゼが精製単離された。本酵素はサブユニット 58kDa のホモダイマーからなり、362nm、432nm に極大吸収を示す典型的なフラビン酵素であることが明らかにされた。本酵素は PMS のような電子受容体を要求することなくオイゲノールからコニフェリルアルコールの生成を触媒した。オイゲノールデヒドロゲナーゼと類似した基質特異性を示し、キノイド中間体の α 位の炭素原子からヒドリドイオンを引き抜く極めて類似した反応機構が考えられた。これらの成果は、「第二章のセクション 1」に述べられている。

B. fulva V107 はオイゲノールのコニフェリルアルコールへの変換を触媒したが、生成したコニフェリルアルコールは本菌によっては分解代謝されず、オイゲノール分解菌 *P. fluorescens* E118 とは異なる特徴を示した。そこで、*B. fulva* V107 を使って、オイゲノールから香料、コニフェリルアルコールへの生産が試みられたところ、その顕著な生産蓄積が確認され、コニフェリルアルコールの効率的な生産プロセスとして有望であることが示された。これらの成果は、「第二章のセクション 2」に記されている。

(3) イソオイゲノールの微生物代謝

次に土壌から強力なイソオイゲノール分解活性菌 *Pseudomonas putida* I58 が分離され、本菌によるイソオイゲノール分解代謝系が解析された。イソオイゲノールの二重結合が開裂を受けてバニリンを生成する新しい酸化機構の可能性が示された。本研究はさらに進展しつつあり、「追補(アペンディックス)」に報告されている。

本学位論文において、植物精油オイゲノール、イソオイゲノールの微生物代謝に関する多くの新しい知見が得られ、オイゲノールの水酸化反応を触媒する 2 種類の酵素、オイゲノールデヒドロゲナーゼ、バニリルアルコールオキシダーゼの反応特性が解析、比較された。またこれらの基礎研究を基に、コニフェリルアルコール、フェルラ酸、キラルアルコール類の生産プロセスの構築が試みられた。これらの成果は、再生可能な余剰資源を微生物の触媒活性を利用して高付加価値の有用物質へと変換する基盤技術として、バイオインダストリーの新しい展開を示唆するものである。

論文審査結果の要旨

植物精油オイゲノールやイソオイゲノールは、天然に豊富に存在する安価な再生可能な余剰資源である。微生物によるオイゲノールやイソオイゲノールの分解代謝が検討され、オイゲノールの水酸化反応を触媒する2種類の酵素オイゲノールデヒドロゲナーゼ、バニリルアルコールオキシダーゼの反応特性の解析、比較が試みられた。またオイゲノールの微生物代謝系や酵素の触媒作用を利用してオイゲノールやその関連化合物を付加価値の高い有用物質へ変換するプロセスの構築が検討された。以下に示したような新しい知見、意義深い研究結果と考察が論文にまとめられた。審査の結果、本論文は学位論文に値するものと判定した。

(1) オイゲノールデヒドロゲナーゼの特性解析とその応用

オイゲノールの微生物分解代謝の初発ステップは、オイゲノールをコニフェリルアルコールに変換する2重結合のシフトを伴うユニークな水酸化反応であり、本論文で初めて本反応の酵素レベルでの検討が試みられた。

自然界より強力なオイゲノール分解活性を示す細菌 *Pseudomonas fluorescens* E118 株が分離され、本菌の細胞抽出液にオイゲノールをコニフェリルアルコールへ変換する酵素活性が見出された。本酵素が、硫安分画、各種クロマトグラフィーによって精製され、単一の標品が得られた。本酵素は α サブユニット 10kDa、 β サブユニット 58kDa からなる分子量 68kDa のヘテロダイマーであり、吸収スペクトルの解析から α サブユニットはヘムを、 β サブユニットはフラビンを含んでいることが示唆された。本精製酵素はフェナジンメトスルフェート (PMS) のような電子受容体を必要とし、フラボチトクロームタンパク質の範疇に入る脱水素酵素であることが明らかにされた。

本酵素の反応特性が解析され、オイゲノールのコニフェリルアルコールへの変換、4-アルキルフェノールの水酸化、バニリルアルコールのバニリンへの酸化の3種類の特徴的な反応を触媒することが明らかにされた。基質特異性の詳細な検討から、本酵素の基質となるのは、*p*-アルキルフェノール類で、アルキル基の *p* 位に水酸基を、アルキル基の α 位に水素原子を有する構造を持つことが必須であることが示された。重酸素水 (H_2^{18}O) 中での反応から、反応生成物のコニフェリルアルコールに重酸素原子が取り込まれることがマスマスペクトルで解析された。その反応機構の解析から、キノイド中間体の α 位の炭素原子からヒドリドイオンの引き抜きが起こり、水の酸素原子が水酸基に取り込まれる反応機構が提案された。また、本酵素はプロキラルな *p*-アルキルフェノール類からキラル骨格 1-(*p*-ヒドロキシフェニル)アルキルアルコール類の合成に有用であることが示された。さらに、本菌のオイゲノール分解代謝系を利用してオイゲノールや安価なチョウジ油を原料にした抗酸化剤フェルラ酸の生産方法が検討された。

(2) バニリルアルコールオキシダーゼの特性解析とその応用

オイゲノールデヒドロゲナーゼがバニリルアルコールを酸化してバニリンを生成することが明らかにされた。これまでより、本酸化反応はバニリルアルコールオキシダーゼ (E.C. 1.1.3.38) によって触媒されることが知られている。そこで、同じ基質に作用して

同じ反応を触媒する両酵素の差違を明らかにすることが試みられた。自然界より分離された *Byssoschlamys fulva* V107 のバニリルアルコールオキシダーゼが精製単離された。本酵素はサブユニット 58kDa のホモダイマーからなり、362nm、432nm に極大吸収を示す典型的なフラビン酵素であることが明らかにされた。本酵素は PMS のような電子受容体を要求することなくオイゲノールからコニフェリルアルコールの生成を触媒した。オイゲノールデヒドロゲナーゼと極めて類似した基質特異性を示し、キノイド中間体の α 位の炭素原子からヒドリドイオンを引き抜く類似した反応機構が考えられた。*B. fulva* V107 はオイゲノールのコニフェリルアルコールへの変換を触媒したが、生成したコニフェリルアルコールは本菌によっては分解代謝されず、オイゲノール分解菌 *P. fluorescens* E118 とは異なる特徴を示した。そこで、*B. fulva* V107 を使って、オイゲノールから香料、コニフェリルアルコールへの生産が試みられたところ、その顕著な生産蓄積が確認され、コニフェリルアルコールの効率的な生産プロセスとして有望であることが示された。

(3) イソオイゲノールの微生物代謝

次に土壌から強力なイソオイゲノール分解活性菌 *Pseudomonas putida* I58 が分離され、本菌によるイソオイゲノール分解代謝系が解析された。イソオイゲノールの二重結合が開裂を受けてバニリンを生成する新しい酸化機構の可能性が示された。

本学位論文において、植物精油オイゲノール、イソオイゲノールの微生物代謝に関する多くの新しい知見が得られ、オイゲノールの水酸化反応を触媒する 2 種類の酵素、オイゲノールデヒドロゲナーゼ、バニリルアルコールオキシダーゼの反応特性が解析、比較された。またこれらの基礎研究の成果を基に、コニフェリルアルコール、フェルラ酸、キラルアルコール類の生産プロセスの構築が試みられた。これらの成果は、再生可能な余剰資源を微生物の触媒活性を利用して高付加価値の有用物質へと変換する基盤技術として、バイオインダストリーの新しい展開を示唆するものである。

最 終 試 験 結 果 の 要 旨

(1) 公表論文

この論文の主要部分は 6 編の審査付き論文として既に 4 編は、公表済みであり、2 編は受理され印刷中である。またこの論文が学位論文として完成された内容を有することを確認した。指定された単位を修得していることを確認した。

(3) 審査

公聴会までに、指導教官ならびに審査委員の審問に対して十分な回答がなされた。公聴会を開催し学位審査委員会で審議の結果、申請者は最終試験に合格と判定した。