

氏 名 (本籍)	内 田 玲 (岐阜県)
学 位 の 種 類	博 士 (工学)
学 位 授 与 番 号	甲第 211 号
学 位 授 与 日 付	平成 15 年 9 月 10 日
専 攻	物質工学専攻
学 位 論 文 題 目	Studies on Regioselective Hydroxylation of <i>N</i> -Heterocyclic Compounds by Microorganisms (微生物による含窒素複素環化合物の位置選択的水酸化に関する研究)
学位論文審査委員	(主査) 教 授 長 澤 透 (副査) 教 授 西 川 一 八 教 授 北 出 幸 夫 助教授 吉 田 豊 和

## 論 文 内 容 の 要 旨

種々の含窒素複素環化合物が、医薬・農薬の合成中間体として汎用されている。化学合成法による複素環化合物の位置選択的な水酸化は容易でない場合があり、微生物触媒を用いた温和な条件下での効率的な合成法の導入が望まれるケースが多々ある。微生物触媒の化学工業へのより広範な応用展開を目指し、本学位論文において微生物によるピリジンおよびピラジン誘導体の水酸化反応が着目された。まず、ピリジンジカルボン酸、シアノピラジンの水酸化活性を有する微生物の検索が行われ、数種の新規水酸化反応が見出され、それぞれの反応特性が明らかにされた。

### (1) ピリジンジカルボン酸の新規水酸化反応

3 種類のピリジンジカルボン酸、キノリン酸 (ピリジン-2, 3-ジカルボン酸)、ルチジン酸 (ピリジン-2, 4-ジカルボン酸)、イソシンコメロン酸 (ピリジン-2, 5-ジカルボン酸) が取り上げられ、それぞれの化合物の新規水酸化反応を触媒する微生物の分離が試みられた。種々の土壌標品を用いて、これらのピリジンジカルボン酸を単一炭素源、窒素源とした集積培養を行うことにより、自然界から 3 種類のピリジンジカルボン酸の水酸化反応を触媒する微生物が分離され、*Alcaligenes* sp. UK21、*Rhizobium* sp. LA17 および *Hydrogenophaga* sp. IMA01 株と同定された。それぞれの水酸化酵素の基質特異性は異なるが、いずれの場合もピリジン環の窒素原子に隣接した炭素原子に水酸基が導入されることが明らかにされた。*Rhizobium* sp. LA17、*Hydrogenophaga* sp. IMA01 株は、ルチジン酸、イソシンコメロン酸を、それぞれ 6-ヒドロキシルチジン酸と 6-ヒドロキシイソシンコメロン酸へと変換した。これらの成果は、「第1章」に述べられている。

### (2) *Alcaligenes* sp. UK21 によるキノリン酸水酸化反応

*Alcaligenes* sp. UK21 はキノリン酸だけでなく、ピラジン-2, 3-ジカルボン酸を良い基質とすることが明らかにされた。反応の最適条件下では、乾燥重量 400 mg の休止菌体にピラジ

ン-2,3-ジカルボン酸を経時的に添加することにより、24 時間の反応で反応液 10 ml 当たり 84.6 mM (15.6 g/L、モル変換率 94%) の 5-ヒドロキシピラジン-2,3-ジカルボン酸の生産蓄積が可能であった。

*Alcaligenes* sp. UK21 によるキノリン酸から 6-ヒドロキシピコリン酸への変換反応を触媒する酵素系の解析により、本反応は水酸化反応と脱炭酸反応の 2 段階の酵素反応から成ることが明らかにされた。すなわち、キノリン酸は膜結合性水酸化酵素によってその 6 位に水酸基が導入され 6-ヒドロキシキノリン酸を生成し、次いで、可溶性画分の脱炭酸酵素によって、6-ヒドロキシピコリン酸の生成が明らかにされた。

キノリン酸水酸化酵素が精製され、諸性質が明らかにされた。本酵素はフェナジンメソサルフェイトを電子受容体とする水酸化酵素であり、重酸素水 ( $H_2^{18}O$ ) の存在下で反応を行うと、水分子の酸素原子が反応生成物の水酸基に取り込まれることがマスマススペクトル分析によって明らかにされた。すなわち、キノリン酸水酸化酵素はオキシゲナーゼではなく、呼吸鎖電子伝達系とカップリングした新規膜結合性脱水素酵素であることが明らかにされた。6-ヒドロキシキノリン酸脱炭酸酵素は単一酵素標品に精製され、諸性質が明らかにされた。本酵素は 36 kDa のサブユニット 6 個からなる新規脱炭酸酵素であった。これらの成果は、「第 2 章」に述べられている。

### (3) 微生物によるシアノピラジンの新規水酸化反応

5-ヒドロキシ-2-シアノピラジンはピラジン骨格を有する医薬などの合成に適した出発物質であることから、シアノピラジンの 5 位水酸化反応を触媒する微生物が系統的に探索された。

*Serratia fonticola* IAM13541 と *Micrococcus roseus* IAM1315 がシアノピラジン水酸化活性を示し、シアノピラジンを 5-ヒドロキシ-2-シアノピラジンに変換することが見出された。

培養条件および反応条件の最適化が検討され、5-ヒドロキシ-2-シアノピラジンの生産性を高めることが試みられた。両菌株のシアノピラジンの水酸化活性はニコチン酸によって誘導されなかった。*S. fonticola* (乾燥重量 506 mg) と *M. roseus* (乾燥重量 702 mg) の休止菌体を 10 ml の反応系に添加して 5-ヒドロキシ-2-シアノピラジン生産が検討された。それぞれ 128 mM (16 g/L、64%モル変換率) と 95 mM (12 g/L、48%モル変換率) の 5-ヒドロキシ-2-シアノピラジンの生産蓄積が可能であった。

次に、それぞれのシアノピラジン水酸化酵素の反応特性の解析が試みられた。*S. fonticola* のシアノピラジン水酸化酵素はキサンチン、ヒポキサンチンを良好な基質とすることから、キサンチンオキシダーゼである可能性が示唆された。そこで、市販の *Arthrobacter* 属細菌およびバターミルク由来のキサンチンオキシダーゼの基質特異性が検討されたところ、共に顕著なシアノピラジン水酸化活性が認められた。ここに、キサンチンオキシダーゼがシアノピラジンの水酸化活性を示すという新しい知見が得られた。

一方、*M. roseus* のシアノピラジン水酸化酵素はキサンチン、ヒポキサンチンに作用せず、*S. fonticola* とは異なった基質特異性を示した。そこで、本酵素が精製され、諸性質が検討された。精製酵素は 79、60 kDa の 2 種類のサブユニットからなっていた。本酵素はフラビンに特徴的な吸収スペクトルを示し、NAD を電子受容体とした。また、重酸素水 ( $H_2^{18}O$ ) の存在下で水酸化反応を行うと、反応生成物に重酸素が取り込まれた。したがって、シアノピラジン水酸化酵素はオキシゲナーゼではなく、新規脱水素酵素であることが明らかされた。N 末

端アミノ酸配列は、これまでに報告されているいずれのタンパク質とも相同性を示さなかった。以上の検討から、微生物によるシアノピラジンの水酸化反応はニコチン酸脱水素酵素に加えて、キサンチンオキシダーゼ、シアノピラジン脱水素酵素の 3 種類の酵素が触媒することが明らかにされた。これらの成果は「第 3 章」で述べられている。

本論文において、含窒素複素環化合物の位置選択的水酸化反応を触媒する微生物が見出され、その反応特性の解析により、いくつかの新しい知見が明らかにされた。ここに含窒素複素環化合物の水酸化酵素の新しい遺伝子資源ライブラリーの充実が行われた。これらの基礎研究の成果は、今後、水酸化酵素による有用物質生産への応用研究に活用でき、将来的に本学位論文のバイオインダストリーへの貢献度は極めて大きいと思われる。

## 論文審査結果の要旨

種々の含窒素複素環化合物が、医薬・農薬の合成中間体として汎用されている。化学合成法による複素環化合物の位置選択的な水酸化は容易でない場合があり、微生物触媒を用いた温和な条件下での効率的な合成法の導入が望まれるケースが多々ある。微生物触媒の化学工業へのより広範な応用展開を目指し、本学位論文において微生物によるピリジンおよびピラジン誘導体の水酸化反応が着目された。まず、ピリジンジカルボン酸、シアノピラジンの水酸化活性を有する微生物の検索が行われ、数種の新規水酸化反応が見出され、それぞれの反応特性が明らかにされた。本論文において、以下に示したように、新しい重要な研究結果と知見がまとめられた。審査の結果、この論文は学位論文に値するものと判定した。

### (1) ピリジンジカルボン酸の新規水酸化反応

3 種類のピリジンジカルボン酸、キノリン酸（ピリジン-2,3-ジカルボン酸）、ルチジン酸（ピリジン-2,4-ジカルボン酸）、イソシンコメロン酸（ピリジン-2,5-ジカルボン酸）が取り上げられ、それぞれの化合物の新規水酸化反応を触媒する微生物の分離が試みられた。種々の土壌標品を用いて、これらのピリジンジカルボン酸を単一炭素源、窒素源とした集積培養を行うことにより、自然界から 3 種類のピリジンジカルボン酸の水酸化反応を触媒する微生物が分離され、*Alcaligenes* sp. UK21、*Rhizobium* sp. LA17 および *Hydrogenophaga* sp. IMA01 株と同定された。それぞれの水酸化酵素の基質特異性は異なるが、いずれの場合もピリジン環の窒素原子に隣接した炭素原子に水酸基が導入されることが明らかにされた。*Rhizobium* sp. LA17 はルチジン酸を *Hydrogenophaga* sp. IMA01 株は、イソシンコメロン酸を、それぞれ 6-ヒドロキシルチジン酸と 6-ヒドロキシイソシンコメロン酸へと変換した。

### (2) *Alcaligenes* sp. UK21 によるキノリン酸水酸化酵素と 6-ヒドロキシキノリン酸の脱炭酸酵素

*Alcaligenes* sp. UK21 はキノリン酸の水酸化反応を触媒し、6-ヒドロキシピコリン酸を生成した。基質特異性の検討から、ピラジン-2,3-ジカルボン酸も良い基質となることが明らかにされた。反応の最適条件下では、乾燥重量 400 mg の休止菌体にピラジン-2,3-ジカルボン

酸を経時的に添加することにより、24時間の反応で反応液 10 ml 当たり 84.6 mM (15.6 g/L、モル変換率 94%) の 5-ヒドロキシピラジン-2, 3-ジカルボン酸の生産蓄積が可能であった。

*Alcaligenes* sp. UK21 によるキノリン酸から 6-ヒドロキシピコリン酸への変換反応を触媒する酵素系の解析により、本反応は水酸化反応と脱炭酸反応の 2 段階の酵素反応から成ることが明らかにされた。すなわち、キノリン酸は膜結合性水酸化酵素によってその 6 位に水酸基が導入され 6-ヒドロキシキノリン酸を生成する。次いで、可溶性画分の脱炭酸酵素によって、6-ヒドロキシピコリン酸の生成が明らかにされた。ピラジン-2, 3-ジカルボン酸を基質とした場合、水酸化酵素によって 5-ヒドロキシピラジン-2, 3-ジカルボン酸が生成するが、この化合物は脱炭酸酵素の基質とはならないため、休止菌体による反応では 5-ヒドロキシピラジン-2, 3-ジカルボン酸が蓄積することが明らかにされた。

キノリン酸水酸化酵素が精製され、特性の解析が検討された。本酵素はフェナジンメソサルフェイトを電子受容体とする水酸化酵素であり、重酸素水 ( $H_2^{18}O$ ) の存在下で反応を行うと、水分子の酸素原子が反応生成物の水酸基に取り込まれることがマスマススペクトル分析によって明らかにされた。すなわち、キノリン酸水酸化酵素はオキシゲナーゼではなく、呼吸鎖電子伝達系とカップリングした新規膜結合性脱水素酵素であることが明らかにされた。6-ヒドロキシキノリン酸脱炭酸酵素は単一酵素標品に精製され、諸性質が明らかにされた。本酵素は 36 kDa のサブユニット 6 個からなる新規脱炭酸酵素であった。

### (3) 微生物によるシアノピラジンの新規水酸化反応

5-ヒドロキシ-2-シアノピラジンはピラジン骨格を有する医薬などの合成に適した出発物質であることから、シアノピラジンの 5 位水酸化反応を触媒する微生物が系統的に探索された。これまでの研究において、ニコチン酸脱水素酵素はシアノピラジンから 5-ヒドロキシ-2-シアノピラジンへの水酸化反応を触媒することが明らかである。そこで、本検討ではニコチン酸脱水素酵素によらない新規のシアノピラジン水酸化反応に焦点が当てられた。

*Serratia fonticola* IAM13541 と *Micrococcus roseus* IAM1315 がシアノピラジン水酸化活性を示し、シアノピラジンを 5-ヒドロキシ-2-シアノピラジンに変換することが見出された。培養条件および反応条件の最適化が検討され、5-ヒドロキシ-2-シアノピラジンの生産性を高めることが試みられた。両菌株のシアノピラジンの水酸化活性はニコチン酸によって誘導されなかった。*S. fonticola* (乾燥重量 506 mg) と *M. roseus* (乾燥重量 702 mg) の休止菌体を 10 ml の反応系に添加して 5-ヒドロキシ-2-シアノピラジン生産が検討された。それぞれ 128 mM (16 g/L、64%モル変換率) と 95 mM (12 g/L、48%モル変換率) の 5-ヒドロキシ-2-シアノピラジンの生産蓄積が可能であった。

次に、それぞれのシアノピラジン水酸化酵素の反応特性の解析が試みられた。*S. fonticola* のシアノピラジン水酸化酵素はキサンチン、ヒポキサンチンを良好な基質とすることから、キサンチンオキシダーゼである可能性が示唆された。そこで、市販の *Arthrobacter* 属細菌およびバターミルク由来のキサンチンオキシダーゼの基質特異性が検討されたところ、共に顕著なシアノピラジン水酸化活性が認められた。ここに、キサンチンオキシダーゼがシアノピラジンの水酸化活性を示すという新しい知見が得られた。

一方、*M. roseus* のシアノピラジン水酸化酵素はキサンチン、ヒポキサンチンに作用せず、

*S. fonticola* とは異なった基質特異性を示した。そこで、本酵素が精製され、諸性質が検討された。精製酵素は 79、60 kDa の 2 種類のサブユニットからなっていた。本酵素はフラビンに特徴的な吸収スペクトルを示し、NAD を電子受容体とした。また、重酸素水 ( $\text{H}_2^{18}\text{O}$ ) の存在下で水酸化反応を行うと、反応生成物に重酸素が取り込まれた。したがって、シアノピラジン水酸化酵素はオキシゲナーゼではなく、新規脱水素酵素であることが明らかされた。N 末端アミノ酸配列は、これまでに報告されているいずれのタンパク質とも相同性を示さなかった。以上の検討から、微生物によるシアノピラジンの水酸化反応はニコチン酸脱水素酵素に加えて、キサンチンオキシダーゼ、シアノピラジン脱水素酵素の 3 種類の酵素が触媒することが明らかにされた。

本論文において、含窒素複素環化合物の位置選択的水酸化反応を触媒する微生物が見出され、それぞれの反応特性の解析により、いくつかの新しい知見が明らかにされた。ここに含窒素複素環化合物の水酸化酵素の新しい遺伝子資源ライブラリーの充実が行われた。これらの基礎研究の成果は、今後、水酸化酵素による有用物質生産への応用研究に活用でき、本学位論文のバイオインダストリーへの貢献度は極めて大きいと思われる。

## 最終試験結果の要旨

### (1) 公表論文

この論文の主要部分は 2 編の審査付き論文として既に公表済みである。さらに 1 編は投稿中である。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。

### (2) 修得単位

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。