

氏 名（本 籍）	松 井 剛（岐阜県）
学 位 の 種 類	博 士（工学）
学 位 授 与 番 号	甲第 286 号
学 位 授 与 日 付	平成 18 年 3 月 25 日
専 攻	物質工学専攻
学 位 論 文 題 目	Studies on decarboxylases catalyzing carbon dioxide fixation reaction and their application (炭酸固定反応を触媒する脱炭酸酵素とその応用に関する研究)
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 野 原 大 輔 助教授 吉 田 豊 和

論文内容の要旨

地球温暖化の温室効果ガスの一つとして二酸化炭素の可能性が危惧されている。一方、限られた資源を有効活用するという点から、二酸化炭素を回収し積極的に有用物質に変換する分子変換技術の確立が切望されている。本申請者の研究室では、数年来、微生物反応を用いた二酸化炭素の固定技術の開発が検討され、新規酵素“ピロール-2-カルボン酸脱炭酸酵素”および“インドール-3-カルボン酸脱炭酸酵素”が見いだされた。これらの脱炭酸酵素は、ピロール環や、インドール環への炭酸固定反応をも触媒することから、炭酸固定反応を触媒する脱炭酸酵素群の存在が明らかになってきた。本論文では、脱炭酸酵素の炭酸固定反応を有用物質生産のための分子変換技術として確立することを目的とし、3種類の芳香族カルボン酸脱炭酸酵素が取り上げられ、これらの酵素の炭酸固定活性が明確にされ、芳香族カルボン酸の生産への応用が検討された。

(1) 4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の特性解析

4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素を有する微生物が各種土壌サンプルを用いて探索され、嫌気条件で分離した微生物に高頻度に認められることが明らかにされた。高活性菌として通性嫌気性菌 *Enterobacter cloacae* P240 が選択され、4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素が精製単離された。本酵素は分子量 60 kDa のサブユニットからなる 6 量体であった。精製酵素は炭酸固定反応を触媒し、20 mM のフェノールから 3 mM の 4-ヒドロキシ安息香酸を生成することが明らかにされた。

遺伝子解析の結果、*E. cloacae* P240 の 4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素は既に報告されている絶対嫌気性菌 *Clostridium hydroxybenzoicum* の酵素と一次構造において 53% の相同性を示すことが明らかにされた。一方、90% 以上の相同性を示す機能未知タンパク質が微生物に広く存在し、これらのタンパク質は 4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素に相当すると推定された。50% 以上の相同性を示したタンパク質のアライメント解析が行われ、高

度に保存されているモチーフ配列が見出された。これらの成果は「第1章」に述べられている。

(2) 3,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の特性解析

3,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素はこれまでに絶対嫌気性菌 *C. hydroxybenzoicum* でのみ報告されていたが、その酵素化学的諸性質や一次構造等の知見はなかった。土壌から 3,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素を有する通性嫌気性菌 *Enterobacter cloacae* P241 が分離され、本酵素が精製され、特性が解析された。本酵素の基質特異性は極めて狭く、3,4-ジヒドロキシ安息香酸以外には作用しないことが明らかにされた。本酵素は分子量 59 kDa のサブユニットからなる 6 量体で、精製酵素は炭酸固定反応も触媒し、25 mM の 1,2-ジヒドロキシベンゼンから 5 mM の 3,4-ジヒドロキシ安息香酸を生成することが示された。

本酵素遺伝子がクローニングされ、一次構造が初めて明らかにされた。データベース上に本酵素と高い相同性を示したタンパク質は認められなかった。同じ属種である *Enterobacter cloacae* P240 の 4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素との一次構造の相同性は 24% 程度であり、基質の水酸基数を厳密に認識しており、両酵素の一次構造に顕著に反映していると推定された。これらの成果は「第2章」に述べられている。

(3) 2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の特性解析とその応用

新規酵素 2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素が *Agrobacterium tumefaciens* IAM12048 と *Pandoraea* sp. 12B-2 に見出された。両菌株からそれぞれ 2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素が精製単離された。精製酵素の分子量はそれぞれ 123 kDa、(サブユニット分子量 40 kDa)、98 kDa (サブユニット分子量 38 kDa) であった。両酵素は上述の 2 つの脱炭酸酵素とは異なり、安定性の高い酵素であることが明らかにされた。*A. tumefaciens* IAM12048 と *Pandoraea* sp. 12B-2 の 2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の一次構造は 72% の相同性を示すことが明らかにされた。これまで報告されている脱炭酸酵素で認められた高度に保存されているモチーフ配列がこれらの酵素には存在せず、2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素は新しいタイプの芳香族カルボン酸脱炭酸酵素であることが明らかにされた。

薬品、化成品の原料として有用な 2,6-ジヒドロキシ安息香酸の生産条件が高活性菌 *Pandoraea* sp. 12B-2 の炭酸固定活性を用いて検討された。密閉容器内で 3 M KHCO_3 と 3 M 1,3-ジヒドロキシベンゼンを添加し、炭酸固定反応が行われ、1.43 M (220 mg/ml) の 2,6-ジヒドロキシ安息香酸の著量蓄積が可能であった (モル変換率は 48%)。超臨界二酸化炭素条件下での炭酸固定反応が試みられ、本条件下でも炭酸固定反応が進行することが確認された。これらの成果は「第3章」に述べられている。

(4) 芳香族カルボン酸脱炭酸酵素の分類

これまでの知見をもとに、芳香族化合物の脱炭酸酵素を、3 つのグループに分類できることが提案された。

第1のグループは、これまで検討されてきたピロール-2-カルボン酸脱炭酸酵素や、インドール-3-カルボン酸脱炭酸酵素のように、酸素感受性が高く、サブユニット分子量が 50-60 kDa の脱炭酸酵素であり、本学位論文で明らかにされた 4-ヒドロキシ安息香酸、3,4-ジヒドロキシ安息香酸の両脱炭酸酵素も、このグループに含まれると提案された。これらの脱

炭酸酵素のアライメント解析から、高度に保存されたモチーフ配列が共通して存在することが確認された。

第2のグループとして、今回新たに見出された2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素と本研究室で検討中のカビ類に見出された2,3-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素があげられた。これらは酸素感受性がそれほど顕著でなく安定であり、サブユニット分子量38-40 kDaのグループであった。両者には、グループ1とは別の保存された共通モチーフ配列が認められた。またグループ1の酸素感受性の高い脱炭酸酵素群に保存されていたモチーフ配列が一切認められず、一次構造の相同性は認められなかった。

第3グループとして、サブユニット分子量が20-25 kDaの比較的小さい4-ヒドロキシ桂皮酸脱炭酸酵素、フェルラ酸脱炭酸酵素が含まれる酵素群があげられた。これらの酵素は逆反応を触媒せず、第1、第2のグループとは一次構造の相同性が認められず、異なったグループに入ると提案された。これらの成果は「結論 (conclusion)」に述べられている。

論文審査結果の要旨

地球温暖化の温室効果ガスの一つとして二酸化炭素の可能性が危惧されている。一方、限られた資源を有効活用するという点から、二酸化炭素を回収し積極的に有用物質に変換する分子変換技術の確立が切望されている。本論文において、微生物の脱炭酸酵素の炭酸固定反応を有用物質生産のための分子変換技術として確立することを目的とし、3種類の芳香族カルボン酸脱炭酸酵素が取り上げられ、これらの酵素の炭酸固定活性が明確にされ、芳香族カルボン酸の生産への応用が検討された。本論文において、以下に示したような新しい知見と意義深い研究結果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) 4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の特性解析

4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素を有する微生物が各種土壌サンプルを用いて探索され、高活性菌として通性嫌気性菌 *Enterobacter cloacae* P240 が選択され、4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素が精製単離された。本酵素は分子量 60 kDa のサブユニットからなる 6 量体であった。精製酵素は炭酸固定反応を触媒し、20 mM のフェノールから 3 mM の 4-ヒドロキシ安息香酸を生成することが明らかにされた。

遺伝子解析の結果、*E. cloacae* P240 の 4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素は既に報告されている絶対嫌気性菌 *Clostridium hydroxybenzoicum* の酵素と一次構造において 53% の相同性を示すことが明らかとなった。一方、90% 以上の相同性を示す機能未知タンパク質が微生物に広く存在し、これらのタンパク質は 4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素に相当すると推定された。50% 以上の相同性を示したタンパク質のアライメント解析が行われ、高度に保存されているモチーフ配列が見出された。

(2) 3,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の特性解析

3,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素はこれまでに絶対嫌気性菌 *C. hydroxybenzoicum* でのみ報告されているが、その酵素化学的諸性質や一次構造等の知見はない。土壌から 3,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素を有する通性嫌気性菌 *Enterobacter cloacae* P241 が分離され、本酵素が精製され、特性解析が行われた。本酵素の基質特異性は極めて狭く、3,4-

ジヒドロキシ安息香酸以外には作用しないことが明らかにされた。本酵素は分子量 59 kDa のサブユニットからなる 6 量体で、精製酵素は炭酸固定反応も触媒し、25 mM の 1,2-ジヒドロキシベンゼンから 5 mM の 3,4-ジヒドロキシ安息香酸を生成することが明らかにされた。

本酵素遺伝子がクローニングされ、一次構造が初めて決定された。データベース上に本酵素と高い相同性を示したタンパク質は認められなかった。同じ属種である *Enterobacter cloacae* P240 の 4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素との一次構造の相同性は 24% 程度であり、基質の水酸基数を厳密に認識しており、両酵素の一次構造に顕著に反映していると推定された。

(3) 2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の特性解析とその応用

新規酵素 2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素が *Agrobacterium tumefaciens* IAM12048 と *Pandoraea* sp. 12B-2 に見出された。両菌株からそれぞれ 2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素が精製単離された。精製酵素の分子量はそれぞれ 123 kDa、(サブユニット分子量 40 kDa)、98 kDa (サブユニット分子量 38 kDa) であった。両酵素は上述の 2 つの脱炭酸酵素とは異なり、安定性の高い酵素であることが明らかにされた。*A. tumefaciens* IAM12048 と *Pandoraea* sp. 12B-2 の 2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の一次構造は 72% の相同性を示すことが明らかにされた。これまで報告されている芳香族カルボン酸脱炭酸酵素で認められた高度に保存されているモチーフ配列がこれらの酵素には存在せず、2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素は新しいタイプの脱炭酸酵素であることが明らかにされた。

薬品、化成品の原料として有用な 2,6-ジヒドロキシ安息香酸の *Pandoraea* sp. 12B-2 の炭酸固定活性を用いた生産条件が検討された。3 M KHCO_3 と 3 M 1,3-ジヒドロキシベンゼンを添加し、密閉容器内で炭酸固定反応が行われ、1.43 M (220 mg/ml) の 2,6-ジヒドロキシ安息香酸の蓄積が可能であった (モル変換率は 48%)。また、超臨界二酸化炭素条件下での炭酸固定反応が試みられ、本条件下でも炭酸固定反応が進行することが確認された。

(4) 芳香族カルボン酸脱炭酸酵素の分類

これまでの知見をもとに、芳香族化合物の脱炭酸酵素を、3 つのグループに分類できることが提案された。第 1 のグループは、これまで検討されてきたピロール-2-カルボン酸脱炭酸酵素や、インドール-3-カルボン酸脱炭酸酵素のように、酸素感受性が高く、サブユニット分子量が 50-60 kDa の脱炭酸酵素であり、本学位論文で明らかにされた 4-ヒドロキシ安息香酸、3,4-ジヒドロキシ安息香酸の両脱炭酸酵素も、このグループに含まれると提案された。これらの脱炭酸酵素のアライメント解析から、高度に保存されたモチーフ配列が共通して存在することが確認された。第 2 のグループとして、今回新たに見出された 2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素とカビ類に見出された 2,3-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素があげられた。これらは酸素感受性が顕著でなく安定であり、サブユニット分子量 38-40 kDa のグループであった。両者には、グループ 1 とは別の保存された共通モチーフ配列が認められた。またグループ 1 の酸素感受性の高い脱炭酸酵素群に保存されていたモチーフ配列がなく、一次構造の相同性は認められなかった。第 3 グループとして、サブユ

ニット分子量が 20-25 kDa の比較的小さい 4-ヒドロキシ桂皮酸脱炭酸酵素、フェルラ酸脱炭酸酵素が含まれる酵素群があげられた。これらの酵素は逆反応を触媒せず、第 1、第 2 のグループとは一次構造の相同性が認められず、異なるグループに入ると提案された。

本論文において、微生物の 3 種類の芳香族カルボン酸脱炭酸酵素の反応特性が解析され、いくつかの新しい知見が明らかにされた。これらの芳香族カルボン酸脱炭酸酵素が触媒する炭酸固定反応の最適条件が詳細に検討された。2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素は極めて効率よく炭酸固定反応を触媒し、1,3-ジヒドロキシベンゼンと KHCO_3 とから著量の 2,6-ジヒドロキシ安息香酸の生産蓄積が可能であることが示された。ここに脱炭酸酵素の逆反応を用いた新しい炭酸固定化法が明らかにされ、微生物を用いた二酸化炭素の分子変換技術の新しい可能性と展開が示された。

最終試験結果の要旨

(1) 公表論文

この論文の主要部分は 4 編の審査付き論文として既に 1 編は、公表済みであり、1 編は受理され印刷中である。さらに 2 編は投稿中である。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。

(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。