

氏名（本籍）	長谷川 守（岐阜県）
学位の種類	博士（工学）
学位授与番号	甲第 318 号
学位授与日付	平成 19 年 3 月 25 日
専攻	物質工学専攻
学位論文題目	Studies on Microbial Cleavage of Side-chain Double Bond of Aromatic Compounds (微生物による芳香族化合物の側鎖二重結合開裂に関する研究)
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

再生可能なバイオマスを利用した循環型社会の構築が叫ばれている。オイゲノールやイソオイゲノールを含むクローブ油は、丁子(*Syzygium aromaticum*)から得られる植物精油であり、古くから香料、薬として用いられてきた。これらは、天然に豊富に存在する再生可能な植物性余剰資源であり、安価な供給が可能である。オイゲノールやイソオイゲノールの微生物分解代謝の中間体であるバニリンは香料として幅広い用途がある。食品業界では天然物を原料とした微生物変換による産物は天然物として扱われることから、オイゲノール、イソオイゲノールの微生物変換の試みは食品、医薬品化学工業において注目されてきた。オイゲノールの微生物分解代謝は、酵素・遺伝子レベルでの検討が行われてきたが、バニリンの有効な生産法は未だ確立されていない。一方イソオイゲノールの微生物代謝については、バニリン、バニリン酸を経て分解することは報告されているが、酵素レベルでの検討はない。本論文ではイソオイゲノールを出発原料として、微生物変換によるバニリン生産法の確立が検討された。また、本イソオイゲノールからバニリンの生成反応、即ち芳香族側鎖二重結合開裂反応を触媒する新規酸素添加酵素の反応特性の解析および遺伝子解析を試みられた。また微生物による芳香族側鎖二重結合の開裂反応に関連し、スチルベンや 3-ピリジンプロピオン酸の微生物分解代謝についても検討が加えられた。

### (1) *Pseudomonas putida* IE27 菌体によるイソオイゲノールのバニリンへの微生物変換に関する研究

イソオイゲノールを単一炭素源とした集積培養を行い、イソオイゲノール分解菌が分離された。イソオイゲノールの分解代謝の初発ステップは、2-プロペニル側鎖二重結合の開裂反応であり、バニリンを生成する。最も高いバニリン生成活性を示した土壌分離菌 IE27 株が取得され、16S rDNA 塩基配列の解析から *Pseudomonas putida* と同定された。イソオイゲノールからのバニリンへの変換活性は、イソオイゲノールにより誘導生成され

た。本休止菌体は 1mg (dry cells weight 当たり)は、1 時間で 0.105mg のバニリンを生成し、24 時間反応では、モル変換収率 71%で反応液 1L 当たり 16.1 g のバニリンを蓄積した。基質および抽出溶媒としてイソオイゲノールを 60% (v/v) 添加した条件下で変換反応を行うと、バニリン生成量は 20.7 g/L に高まった。しかしながら、反応液の粘度が高まるため、この反応系に等量の酢酸エチルが加えられたところ、バニリン生成量は 24 時間後、29.1 g/L の蓄積に達した。

本イソオイゲノール側鎖開裂反応を触媒する酵素が *P. putida* IE27 の菌体破碎液から、硫安分画、各種カラムクロマトグラフィーにより、単一標品に精製された。本酵素のサブユニット分子量は、SDS ゲル電気泳動で 55kDa、HPLC を用いたゲル濾過法で 69kDa を示すモノマー酵素であった。本酵素反応は至適 pH 9.0、至適温度は 30℃であり、活性に特に補酵素やコファクタ-を要求しなかった。本酵素はイソオイゲノールから等モルのバニリンとアセトアルデヒドを化学量論的に生成した。 $^{18}\text{O}_2$ あるいは $\text{H}_2^{18}\text{O}$ を用いた反応系でイソオイゲノール分解反応を行い、生成したバニリンの mass 分析を行ったところ、何れの場合にも  $^{18}\text{O}$  がバニリンに取り込まれることが明らかになった。よって、イソオイゲノールの 2-プロペニル基の炭素二重結合に酸素添加がおり  $\text{C}\alpha\text{-C}\beta$  エポキシ体を生成、これが加水分解により生じるジオール体を経て、開裂してバニリンとアセトアルデヒドを生成する反応機構が想定された。このようなモノオキシダーゼによる同様の二重結合開裂反応は、最近、 $\beta$ -カロテン-15,15'-モノオキシゲナーゼで報告された。本酵素をコードする遺伝子をクローニングし、隣接領域にプロモーター領域とバニリン脱水素酵素遺伝子と相同性を示す領域が見出された。またイソオイゲノール分解酵素遺伝子の高発現組換え大腸菌を造成し、バニリンの生産が検討されたところ、バニリン生成量は、6 時間後、28.3 g/L の蓄積に達した。

### (2) *Arthrobacter* sp. SL3 菌体による *trans*-スチルベン分解に関する研究

*Arthrobacter* SL3 は *trans*-スチルベンを分解し、安息香酸、*cis,cis*-ムコン酸を生成した。*trans*-スチルベンの  $\text{C}\alpha\text{-C}\beta$  エポキシ体やジオール体が本反応基質にはならず、安息香酸、ヒドロキシ安息香酸が本菌によって速やかに代謝されることから *trans*-スチルベンの 2 個のベンゼン環の一つが水酸化等の変換を受けた後、 $\text{C}\alpha=\text{C}\beta$  の二重結合が開裂される代謝経路の可能性が示された。

### (3) *Ralstonia* sp. PR9 による 3-ピリジンプロピオン酸の分解に関する研究

*Ralstonia* sp. PR9 は 3-ピリジンプロピオン酸を 3-(3-ピリジル)アクリル酸を経てニコチン酸へと分解した。その中間体 3-(3-ピリジル)アクリル酸は、反応液に 13.6 mM 程度まで生成蓄積した。本菌は 3-フェニルプロピオン酸にも作用し桂皮酸を経て、安息香酸を生成した。PR9 株による 3-ピリジンプロピオン酸の側鎖分解は脂肪酸の $\beta$ 分解に類似する経路で代謝されるが、3-(3-ピリジル)アクリル酸や桂皮酸が培養液や反応液に遊離してくる点が特徴的であった。芳香族あるいは複素環の側鎖に二重結合を導入する微生物変換の新しい手法としての可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

再生可能なバイオマスを利用した循環型社会の構築が叫ばれている。オイゲノールやイソオイゲノールを含むクローブ油は、丁子(*Syzygium aromaticum*)から得られる植物精油であり、古くから香料、薬として用いられてきた。これらは、天然に豊富に存在する再生可能な植物性余剰資源であり、安価な供給が可能である。オイゲノールやイソオイゲノールの微生物分解代謝の中間体であるバニリンは香料として幅広い用途がある。食品業界では天然物を原料とした微生物変換による産物は天然物として扱われることから、オイゲノール、イソオイゲノールの微生物変換の試みは食品、医薬品化学工業において注目されてきた。オイゲノールの微生物分解代謝は、酵素・遺伝子レベルでの検討が行われてきたが、バニリンの有効な生産法は未だ確立されていない。一方イソオイゲノールの微生物代謝については、バニリン、バニリン酸を経て分解することは報告されているが、酵素レベルでの検討は無い。本論文ではイソオイゲノールを出発原料として、微生物変換によるバニリン生産法の確立が検討された。また、本イソオイゲノールからバニリンの生成反応、即ち芳香族側鎖二重結合開裂反応を触媒する新規酸素添加酵素の反応特性の解析および遺伝子解析を試みられた。また微生物による芳香族側鎖二重結合の開裂反応に関連し、スチルベンや3-ピリジンプロピオン酸の微生物分解代謝についても検討が加えられた。

### (1) *Pseudomonas putida* IE27 菌体によるイソオイゲノールのバニリンへの微生物変換に関する研究

イソオイゲノールを単一炭素源とした集積培養を行い、イソオイゲノール分解菌が分離された。イソオイゲノールの分解代謝の初発ステップは、2-プロペニル側鎖二重結合の開裂反応であり、バニリンを生成する。最も高いバニリン生成活性を示した土壌分離菌 IE27 株が取得され、16S rDNA 塩基配列の解析から *Pseudomonas putida* と同定された。イソオイゲノールからのバニリンへの変換活性は、イソオイゲノールにより誘導生成された。本休止菌体は 1mg (dry cells weight 当たり)は、1 時間で 0.105mg のバニリンを生成し、24 時間反応では、モル変換収率 71%で反応液 1L 当たり 16.1 g のバニリンを蓄積した。基質および抽出溶媒としてイソオイゲノールを 60% (v/v) 添加した条件下で変換反応を行うと、バニリン生成量は 20.7 g/L に高まった。しかしながら、反応液の粘度が高まるため、この反応系に等量の酢酸エチルが加えられたところ、バニリン生成量は 24 時間後、29.1 g/L の蓄積に達した。

本イソオイゲノール側鎖開裂反応を触媒する酵素が *P. putida* IE27 の菌体破碎液から、硫酸分画、各種カラムクロマトグラフィーにより、単一標品に精製された。本酵素のサブユニット分子量は、SDS ゲル電気泳動で 55kDa、HPLC を用いたゲル濾過法で 69kDa を示すモノマー酵素であった。本酵素反応は至適 pH 9.0、至適温度は 30℃であり、活性に特に補酵素やコファクターを要求しなかった。本酵素はイソオイゲノールから等モルのバニリンとアセトアルデヒドを化学量論的に生成した。 $^{18}\text{O}_2$ あるいは $\text{H}_2^{18}\text{O}$ を用いた反応系でイソオイゲノール分解反応を行い、生成したバニリンの mass 分析を行ったところ、何れの場合にも  $^{18}\text{O}$  がバニリンに取り込まれることが明らかになった。よって、イソオイゲノ

ールの 2-プロペニル基の炭素二重結合に酸素添加がおり  $C\alpha-C\beta$  エポキシ体を生成、これが加水分解により生じるジオール体を経て、開裂してバニリンとアセトアルデヒドを生成する反応機構が想定された。このようなモノオキシゲナーゼによる同様の二重結合開裂反応は、最近、 $\beta$ -カロテン-15,15'-モノオキシゲナーゼで報告された。本酵素をコードする遺伝子をクローニングし、隣接領域にプロモーター領域とバニリン脱水素酵素遺伝子と相同性を示す領域が見出された。またイソオイゲノール分解酵素遺伝子の高発現組換え大腸菌を造成し、バニリンの生産が検討されたところ、バニリン生成量は、6 時間後、28.3 g/L の蓄積に達した。

### (2) *Arthrobacter* sp. SL3 菌体による *trans*-スチルベン分解に関する研究

*Arthrobacter* SL3 は *trans*-スチルベンを分解し、安息香酸、*cis,cis*-ムコン酸を生成した。*trans*-スチルベンの  $C\alpha-C\beta$  エポキシ体やジオール体が本反応基質にはならず、安息香酸、ヒドロキシ安息香酸が本菌によって速やかに代謝されることから *trans*-スチルベンの 2 個のベンゼン環の一つが水酸化等の変換を受けた後、 $C\alpha=C\beta$  の二重結合が開裂される代謝経路の可能性が示された。

### (3) *Ralstonia* sp. PR9 による 3-ピリジンプロピオン酸の分解に関する研究

*Ralstonia* sp. PR9 は 3-ピリジンプロピオン酸を 3-(3-ピリジル)アクリル酸を経てニコチン酸へと分解した。その中間体 3-(3-ピリジル)アクリル酸は、反応液に 13.6 mM 程度まで生成蓄積した。本菌は 3-フェニルプロピオン酸にも作用し桂皮酸を経て、安息香酸を生成した。PR9 株による 3-ピリジンプロピオン酸の側鎖分解は脂肪酸の $\beta$ 分解に類似する経路で代謝されるが、3-(3-ピリジル)アクリル酸や桂皮酸が培養液や反応液に遊離してくる点が特徴的であった。芳香族あるいは複素環の側鎖に二重結合を導入する微生物変換の新しい手法としての可能性が示唆された。

本論文において、イソオイゲノールの側鎖二重結合開裂反応を触媒する新規モノオキシゲナーゼの発見とその反応特性および遺伝子解析、本酵素を利用したバニリンの著量生産法の確立、また芳香族側鎖二重結合の開裂反応に関連し、スチルベンや 3-ピリジンプロピオン酸の微生物分解代謝についても検討が加えられ、いくつかの新しい知見が明らかにされた。これらの成果は、微生物分子変換技術の新しい展開と実用化の可能性を強く示唆するものであった。

## 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 1 編は投稿中であり、さらに残る 1 編は投稿準備中である。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。