

## 廃食用油からのポリマー原料生産系に資する微生物機能の基盤構築 [論文要旨及び審査の要旨]

著者	山本 泰誠
発行年	2022-03-31
学位授与機関	関西大学
学位授与番号	34416甲第870号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10112/00026817">http://hdl.handle.net/10112/00026817</a>

[18]

氏名	やまもと たいせい 山本 泰誠
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学位記番号	理工博第93号
学位授与の日付	2022年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	廃食用油からのポリマー原料生産系に資する 微生物機能の基盤構築
論文審査委員	主査教授 岩木 宏明 副査教授 長谷川 喜衛 副査教授 松村 吉信

## 論文内容の要旨

持続可能社会の実現には、バイオマス由来のポリマーが不可欠であるが、その一方で、その原料が、食料と競合しないことも重要となる。本研究では、食料と競合しない廃食用油を原料としたポリマー合成経路を考案し、その実現に必要な微生物機能の基盤構築を行った。

緒論（第1章）では、バイオプラスチック利用の現状とバイオプラスチックの原料として非可食バイオマスを利用することの重要性を述べるとともに、非可食バイオマスである廃食用油からポリマー原料である 8-オクタノラクトンおよび 2-ピロン-4, 6-ジカルボン酸を合成する経路を提案した。

第2章では、第1章で提案した 8-オクタノラクトン合成系の鍵反応であるシクロオクタノンから 8-オクタノラクトンへの変換を触媒する Baeyer-Villiger 型モノオキシゲナーゼ産生菌候補株をスクリーニングした。シクロオクタノン資化性菌をはじめ、代謝経路に環状ケトンの Baeyer-Villiger 反応を含むと考えられる化合物を資化する菌株をスクリーニングし、土壌細菌 4 株と海洋性細菌 3 株を選択した。さらに、4~10 員環ケトンの Baeyer-Villiger 反応を触媒する酵母様真核微生物についても有力な候補株として選択した。

第3章では、第2章でスクリーニングした候補株から Baeyer-Villiger モノオキシゲナーゼ遺伝子をクローニング・大腸菌で異種発現し、シクロオクタノンを基質とした際の相対活性を指標に標的酵素を選択した。複数の高活性 Baeyer-Villiger モノオキシゲナーゼを見出し、その中でも酵母様真核微生物由来の Baeyer-Villiger モノオキシゲナーゼはシクロオクタノンに対する高活性を有することを見出した。

第4章では、第3章で選択した酵母様真核微生物の Baeyer-Villiger モノオキシゲナーゼの特性を詳細に解明するため、酵素科学的特性解析、変異解析を行った。本酵素は単量体

酵素であり、近縁の Baeyer-Villiger モノオキシゲナーゼと比較し、安定な酵素であること、4~12員環ケトンを含む幅広い基質に対して活性を有し、広範のシクロアルカノンに対して高い触媒活性を有することを明らかにした。また、本酵素では、既報のシクロアルカノンモノオキシゲナーゼにおいて高度に保存されている配列モチーフの一部残基が保存されていないこと、既報のシクロアルカノンモノオキシゲナーゼには存在しない9残基からなるループ構造が存在することを見出し、部位特異的変異、デレーション変異解析により、これらのアミノ酸残基が触媒特性に重要な因子であることを示した。さらに、本酵素を異種発現した大腸菌は、実際にシクロオクタノンを8-オクタノラクトンへ変換可能であり、本ポリマー合成系へ適用可能であることを示した。

第5章では、第1章で考案した2-ピロン-4,6-ジカルボン酸合成系実現のために、*Sinomonas cyclohexanicum* ATCC 51369株がシクロヘキサンカルボン酸を芳香族化後、プロトカテキュ酸を経由して分解する特異な経路を有することに着目し、その経路に関与する遺伝子情報および遺伝子産物の機能解析を行った。ゲノム配列解析、RT-PCR解析、大腸菌異種発現解析等により、初発反応はシトクロム P450 モノオキシゲナーゼによるシクロヘキサンカルボン酸の *trans* 4位の水酸化であること、2段階目は可逆的脱水素反応による4-オキシシクロヘキサンカルボン酸の生成であること、4-オキシシクロヘキサンカルボン酸は2つの酵素（デサチュラーゼ I および II）により4-ヒドロキシ安息香酸に芳香族化されることを示した。更に、デサチュラーゼ I は相同酵素とは異なり補因子である FAD が共有結合していることを明らかにした。一方で、本章で解析した菌株および酵素遺伝子をポリマー合成系に用いるにあたっての問題点についても論じた。

第6章では、第5章で解析した分解系の問題点を解決するため *in silico* 解析とウェットな実験系での解析を組み合わせることで新規なシクロヘキサンカルボン酸芳香族化分解菌および分解系遺伝子のスクリーニングと解析を行った。*in silico* 解析の結果から、*Paraburkholderia* 属細菌の一部が、シクロヘキサンカルボン酸芳香族化分解経路を保持していることを推定し、研究室が保有する近縁株（KU-64株）を用いて、実際に KU-64株がシクロヘキサンカルボン酸を芳香族化経路で分解することを実証した。さらに、分解の第1段階がこれまでに報告のない新奇な Self-sufficient 型シトクロム P450（P450水酸化酵素ドメインとレドックスパートナードメインが単一ポリペプチドに存在）によって触媒されることを明らかにした。また、本 P450 の酵素科学的特性を解析し、第5章で解析した *Sinomonas* 由来のシトクロム P450 よりも優れた触媒特性を持つことを明らかにした。さらに、KU-64株のプロトカテキュ酸ジオキシゲナーゼ遺伝子欠損株は、シクロヘキサンカルボン酸からプロトカテキュ酸を1対1で生成することを確認し、既に確立されているプロトカテキュ酸から2-ピロン-4,6-ジカルボン酸合成経路を組み合わせることで、シクロヘキサンカルボン酸から2-ピロン-4,6-ジカルボン酸の合成が可能であることを示した。

総括において、2章から6章の結果を総括するとともに、本研究により、廃食用油からポリマー原料生産系に資する微生物機能の基盤が構築されたことを述べた。

## 論文審査結果の要旨

持続可能社会実現のためには優れた物性を有するバイオマス由来ポリマーが必要不可欠である。論文提出者は、廃食用油を原料とした2つのバイオマス由来ポリマー原料(8-オクタノラクトンと2-ピロン-4,6-ジカルボン酸)の合成系を考案し、その実現のために必要な微生物機能基盤を構築した。8-オクタノラクトン合成系においては、鍵反応となるシクロオクタノンから8-オクタノラクトンへのBaeyer-Villiger酸化を触媒するシクロアルカノンモノオキシゲナーゼを検索し、その機能解析を行った。既報のシクロアルカノンモノオキシゲナーゼは、5~7員環のケトンに活性を有するグループと11員環以上のケトンに活性を有するグループの2グループに分類されるが、8~10員環ケトンに対して活性を有するものは報告されていない。本研究の結果、真核微生物から初めて8員環ケトンに高活性を有し、既知の2グループの酵素の基質スペクトルを併せ持つ新規なシクロアルカノンモノオキシゲナーゼを見出した。更に、既報のシクロアルカノンモノオキシゲナーゼと比較して、工業利用に有利な特性を有すること、本酵素を発現した大腸菌を用いて、8-オクタノラクトンの合成が可能に示した。2-ピロン-4,6-ジカルボン酸合成系においては、2-ピロン-4,6-ジカルボン酸がプロトカテキュ酸の4,5開裂経路で生成されること、*Sinomonas cyclohexanicum* ATCC 51369株がシクロヘキサンカルボン酸を芳香族化し、プロトカテキュ酸を経由して分解するという特異な経路を有することに着目した。シクロヘキサンカルボン酸の芳香族化経路に関しては、これまで遺伝子レベルでの解析がなされておらず、分解の全容は解明されていなかった。まず、ATCC 51369株がシクロヘキサンカルボン酸の分解にシトクロムP450モノオキシゲナーゼを利用することを解明し、その情報とゲノム配列情報を組み合わせることで、シクロヘキサンカルボン酸分解系遺伝子座を推定した。その後、RT-PCR解析、大腸菌異種発現解析等により、その遺伝子座が実際にシクロヘキサンカルボン酸芳香族化分解系をコードすることを解明した。さらに*in Silico*解析と実験系での解析を組み合わせることで、シクロヘキサンカルボン酸芳香族化分解菌候補菌を見出し、実際にその微生物がシクロヘキサンカルボン酸を芳香族化経路で分解すること、初発の水酸化を担う酵素が新規な構造を有するself-sufficient型シトクロムP450であることを見出した。

本研究の成果は、バイオマス由来ポリマー合成に資する微生物機能基盤を提供するとともに、微生物分解の研究分野において貴重な知見を提供し、特にオキシゲナーゼの研究分野に新しい局面をもたらすものである。よって、本論文は博士論文として価値あるものと認める。