

## 酵素トルエンモノオキシゲナーゼを利用した 選択的酸化反応技術の開発

飯 田 寛  
丸 山 廣  
小 林 高  
柿 谷 均

### Selective Oxidation of Organic Compounds by Utilizing Toluene Monooxygenases

Hiroshi IIDA  
Takahiro MARUYAMA  
Hidetaka KOBAYASHI  
Hitoshi KAKIDANI

Toluene monooxygenases are known to oxidize toluene and other hydrocarbons in the environment. In this work, toluene 2-monooxygenase (T2MO) from gram-negative bacterium *Burkholderia cepacia* G4 was chosen to investigate its applicability as biocatalyst. Recombinant *Escherichia coli* strains harboring the gene for T2MO were found to perform the enantioselective epoxidation of terminal olefins besides the regioselective hydroxylation of toluene and naphthalene. Lowering reaction temperature led to an increase in enantioselectivity. Of several trichloroethylene (TCE)-degrading bacteria, *Janibacter brevis* showed higher oxidation activity and enhanced enantioselectivity in the epoxidation of 1-butene as compared with the T2MO recombinant *E. coli* strains. In addition, *J. brevis* exhibited a unique oxidation profile, suggesting its potential as an attractive source for novel monooxygenases.

#### 1. はじめに

酸化反応は工業的に重要な化学反応であるが、長年の技術開発を経た現在においてもプロセスの環境負荷や反応の選択性において課題が残されている。一方生体触媒（酵素あるいは酵素を含有する微生物）は自然界において常温常圧の穏やかな反応条件下で選択性の高い反応を行っていることから、生体触媒を酸化反応に用いることは古くから試みられてきた。1970年代に開発されたいわゆるCetusプロセスは、2種類の酵素を用いてグルコースとプロピレンからエピクロロヒドリン/プロピレンオキシドを生産させる壮大な試みであったが、併産されるフルクトースの用途と価格の問

題がクリアされず、実用化には至らなかった。その後微生物を用いた直接空気酸化によってオレフィンからエポキシドを生産する技術や直鎖状の炭化水素からジカルボン酸を生産する技術などが1980年代に開発されたが、総じて生体触媒を用いた酸化反応で実用化されたものは数少ない。

ところが近年これらとはまったく別の観点から新たな技術シーズが生み出されている。それはトリクロロエチレン（TCE）やダイオキシンなど環境中に蓄積された難分解性有機化合物を分解する新規な酸化酵素と強い酸化活性を有する微生物である。我々はそれらの中でトルエンモノオキシゲナーゼに注目した。環境中におけるトルエンの代謝分解にはいくつかの経路のある

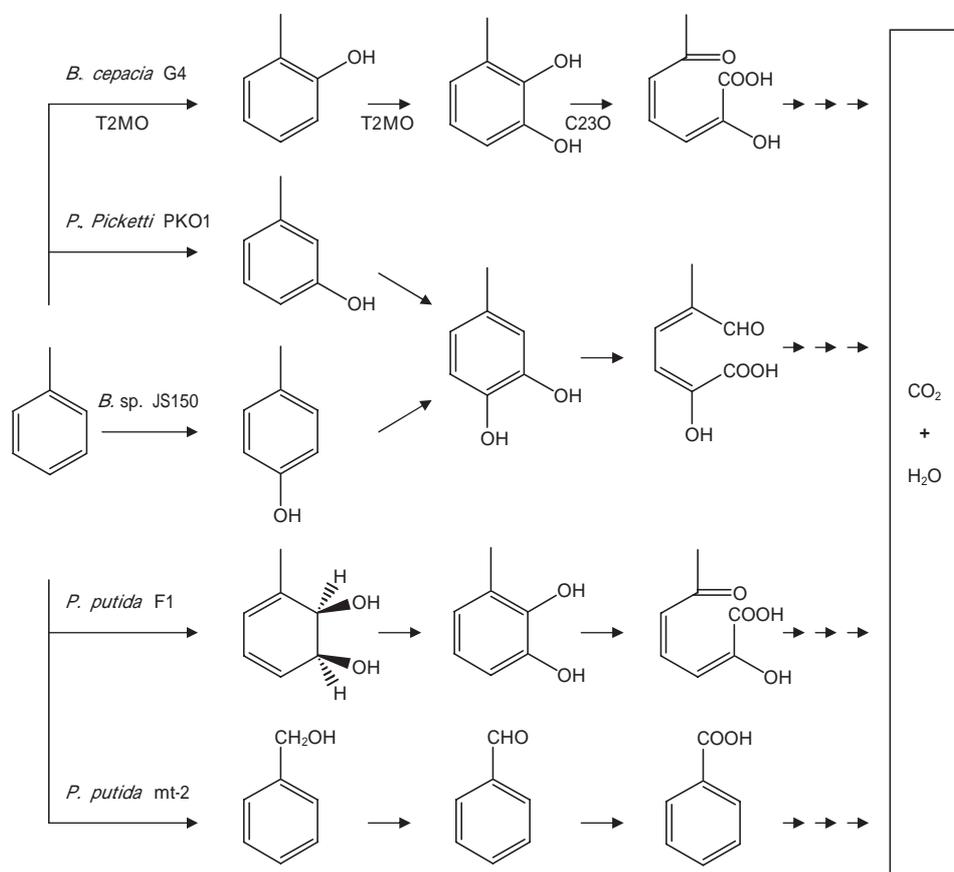


Fig. 1 Catabolic pathways of toluene by various environmental microorganisms

*B. cepacia* G4 grows on toluene as sole carbon and energy source. Initial catabolic process is hydroxylation of benzene ring by T2MO at *ortho* position, followed by another hydroxylation by T2MO. Subsequent oxidative ring opening is catalyzed by C23O.

ことが知られている (Fig. 1)。グラム陰性細菌である *Burkholderia cepacia* G4<sup>1)</sup> は TCE 分解菌として単離されたが、環境中のトルエンを単一の炭素源、エネルギー源として生育できる。この代謝の初発反応はトルエンのオルト位の水酸化であり、この反応を触媒する酵素が toluene 2-monooxygenase (T2MO) である。T2MO は生じた *o*-クレゾールをさらに水酸化して 3-メチルカテコールにする。この化合物に作用してベンゼン環を酸化的に開裂させる酵素は catechol 2,3-dioxygenase (C23O) であり、一連の酸化反応によって水溶性の増した化合物は容易に代謝されて分解し、一部はバイオマス (菌体) に固定される。T2MO はトルエン以外の芳香族化合物にも働き、ナフタレンの場合には 1-ナフトールを生成する<sup>2)</sup>。また TCE の酸化分解活性やオレフィンのエポキシ化活性<sup>3)</sup> も有する極めて興味深い酵素である。我々は T2MO のエポキシ化活性に注目し、エナンチオ選択的なエポキシ化反応に利用することを目標として研究を進めた。

T2MO などモノオキシゲナーゼは一般に分子状酸素の 1 つの酸素原子を基質に添加し、もう 1 つの酸素原

子を還元して水にする。副生物が水だけというシンプルで究極の環境調和型反応であるが、その分子機構は非常に複雑であり、まだ解明されていないところが多い。Fig.2 に T2MO の遺伝子、酵素を構成するタンパク質、酸素酸化に共役した還元力の供給過程を模式的に表した。この中でヒドロキシラーゼ・コンポーネントの  $\beta$ -サブユニットに存在する非ヘム 2 核鉄が酸素酸化の触媒活性を担っている。また  $\beta$  タンパク質と NADH-オキシドレダクターゼは NADH に由来する還元力を  $\beta$ -サブユニットに伝達する働きをしている。遺伝子 *tomA0* に相当する ORF (open reading frame) の機能は明らかにされていない。

## 2. 材料及び方法

### [1] 細菌

*Escherichia coli* JM109 および *Escherichia coli* BL21 (DE3) はタカラバイオ (株) より購入した。また以下の菌株は各微生物保存機関より入手した。

*Escherichia coli* C600 (ATCC23724)

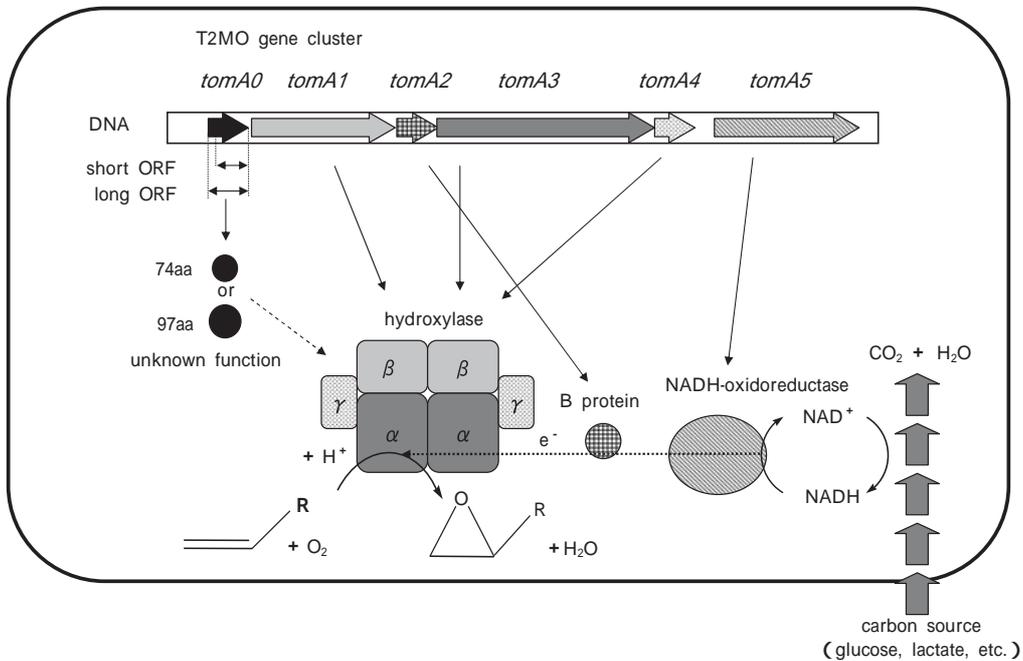


Fig. 2 Epoxidation of olefin by toluene 2-monooxygenase working in living microorganism

Toluene 2-monooxygenase (T2MO) from *Burkholderia cepacia* G4 is encoded by 4.6-kb operon *tomA012345*<sup>4)</sup> and is a three-component enzyme consisting of a 211-kDa hydroxylase (from *tomA1A3A4*) with two catalytic oxygen-bridged binuclear iron centers, a 40-kDa NADH-oxidoreductase (from *tomA5*), and a 10.4-kDa protein also called B protein (from *tomA2*) involved in electron transfer between hydroxylase and NADH-oxidoreductase<sup>5)</sup>. An ORF encoded by *tomA0* is a hypothetical protein with unknown function (74aa for short ORF, 97aa for long ORF).

*Burkholderia cepacia* E1 (MBIC3837)<sup>6)</sup>  
*Burkholderia cepacia* G4 (DSM11737)  
*Burkholderia kururiensis* KP23 (JCM10599)<sup>7)</sup>  
*Burkholderia* sp. JS150 (DSM8530)<sup>8)</sup>  
*Comamonas testosteroni* R5 (MBIC3841)<sup>9)</sup>  
*Janibacter brevis* (DSM13953)<sup>10)</sup>  
*Pseudomonas stutzeri* OX1 (ATCC BAA-172)<sup>11-12)</sup>  
*Ralstonia eutropha* JMP134 (DSM4058)<sup>3)</sup>

## [ 2 ] T2MO発現大腸菌の作製

*B. cepacia* G4の培養物から常法に従って全DNAを調製した。これを制限酵素EcoRIで完全消化し、アガロース電気泳動で9-12KbのEcoRI断片を分離、回収した後、プラスミドベクターpUC18のEcoRI部位に組み込んで大腸菌 (*Escherichia coli*) JM109に導入することによって部分ライブラリーを構築した。次にC23O (Fig. 1) の活性を指標としたスクリーニングを寒天プレート上で行うことにより、約500の組換え大腸菌コロニーから1つを選抜した。この菌を培養したところ、同時に微弱なナフタレン水酸化活性を有していたことから、T2MO遺伝子を含むことが確定された (JM109/pT2MO1、Fig. 3)。

pT2MO1からT2MOの遺伝子領域のみを取り出し、同時に酵素活性を増強させることを意図してサブクロ

ーニングを行なった。発現ベクターとしてpTrc99A (Amersham Biosciences社製) を用い、マルチクローニングサイトのEcoRI-KpnI部位に組み込んだ。より具体的にはタグ配列としてEcoRI部位を有する上流側プライマーを用いたPCR (polymerase chain reaction) を行い、*tomA0*と*tomA1*の途中までの増幅産物を得た。これをEcoRI-Sal I消化し、Sal I部位からC23O中のKpnI部位までのDNA断片とpTrc99AのEcoRI-KpnI消化物とを合わせた3-fragment ligationにより目的の組換え体を作製した。ここで*tomA0*は機能未知の配列領域であり、配列の読み取り枠であるORFが97アミノ酸残基 (long ORF) であるか74アミノ酸残基 (short ORF) であるかは明らかでなかったため (Fig. 2) 両者に対応する組換え体を設計し、さらにORFが必要でない可能性も考慮して合計3種の組換えプラスミドpT2MO11、pT2MO12、pT2MO13を作製して比較検討した。

## [ 3 ] 菌の培養方法

### (1) TCE分解菌の培養

TCE分解菌は、1.6%トリプトンペプトン、1%酵母エキス、0.5% NaCl、5 mM NaOHからなる培地 (2×YT培地) あるいは、Yeagerらの方法<sup>14)</sup>で調製したBasal Salts Medium (以下ではBSMと呼ぶ) にそれ

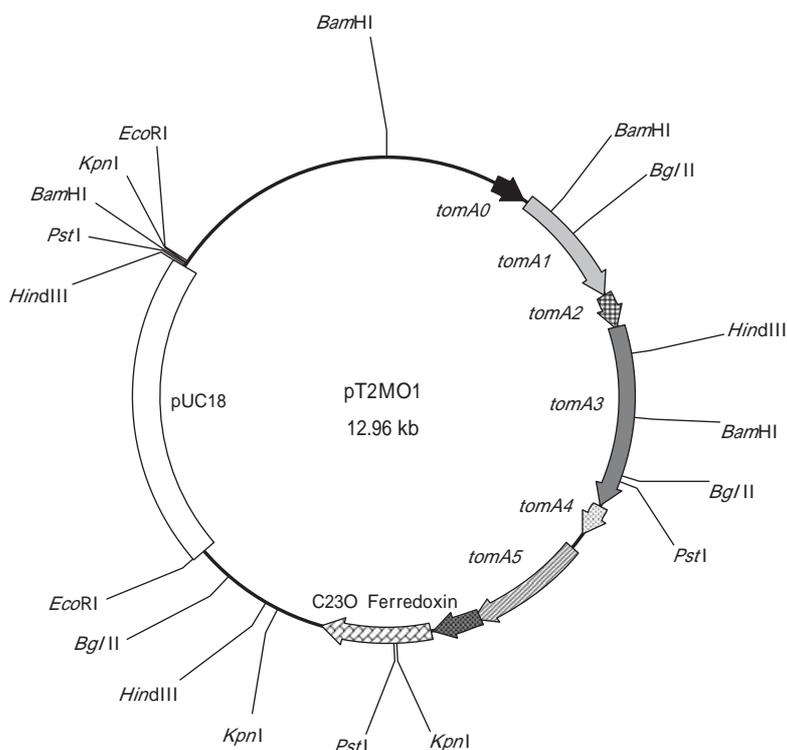


Fig. 3 Restriction map of plasmid pT2MO1

Plasmid pT2MO1 contains T2MO gene cluster (*tomA012345*), ferredoxin gene, and C23O gene from *B. cepacia* G4.

それぞれの菌の資化性に応じた炭素源を加えた培地で培養した。BSMを用いた場合の炭素源は、*P. stutzeri* OX1については20 mMリンゴ酸ナトリウム、*J. brevis*については2.5 mM乳糖、その他のTCE分解菌については20 mM L-乳酸を用いた。培養温度は*B. kururiensis* KP23では37℃、その他のTCE分解菌では30℃とした。酵素活性は菌を回収する4時間前と2時間前に、0.2 Mフェノールを培地の1/100倍容加えて誘導した。トルエンを用いて酵素活性を誘導する場合には最終濃度が2 mMになるようにトルエンを直接培養液に加えた。

## (2) 組換え大腸菌の培養

反応に用いる組換え大腸菌はBSMにチアミン塩酸塩、グルコース、カルベニシリンナトリウムをそれぞれ10 µg/ml、2 mg/ml、50 µg/mlになるように加えた培地中37℃で一晩培養したのち、新鮮な培地に植え継いで、適当な菌体密度 ( $OD_{600} = 0.6 \sim 1$ ) になるまで培養した。その後1 mM isopropyl-1-thio-β-D-galactoside (IPTG) を添加し、引き続き2時間培養を継続して酵素活性を誘導した。

活性測定以外の目的での培養には1%トリプトンペプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、5 mM NaOHからなる培地 (LB培地) あるいは2×YT培地を用いた。

## [4] 酵素活性の測定

上記の培養方法に従って調製した菌体を、組換え大腸菌の場合は1%グルコース含有50 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH7.4)、*B. cepacia* G4、*B. cepacia* E1は20 mM L-乳酸含有50 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH7.0)、*J. brevis* は20 mM酢酸ナトリウム含有50 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH7.0あるいはpH7.5)、その他については20 mM L-乳酸含有50 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) でそれぞれ2回菌体を洗浄したのち、菌密度が $OD_{600}$ の値で1から10の範囲の値になるように懸濁液を調製した。

その他の反応は125 ml容量のアルミシールバイアルに菌体懸濁液10 ml (Fig. 5)、15 ml (Table 3、Table 4、Table 5) あるいは20 ml (Table 2) を入れたのち、基質 (あるいはエタノールに溶解した基質) を添加して30℃あるいは37℃で振とうしながら行った。基質がガスの場合にはバイアルを密閉した後、ガスタイトシリンジで所定量のガスを注入した。プロピレンは、0.19 mmol (Table 2、Fig. 5) あるいは0.37 mmol (Table 5)、1-ブテンは、0.42 mmol (Table 3、Table 4、Table 5) を添加した。

反応液はガスタイトシリンジを用いて経時的にサンプリングしたのち、等容の酢酸エチルあるいはクロロ

ホルムで抽出してGC (Hewlett Packard HP5890、カラムHP-5) で分析した。

またTCE分解菌のナフタレン水酸化活性の分析は、0.1 mMナフタレンを基質にして反応を行った。生成した1-ナフトールは酢酸エチルで抽出したのちFast Blue B (*o*-dianisidine, tetrazotized Zn salt) を用いた比色法により定量した<sup>15)</sup>。

#### [5] 光学純度の測定

反応生成物の光学純度を測定する場合には、反応液を1/5倍容の酢酸エチル、ジエチルエーテルあるいはクロロホルムで抽出した後モレキュラーシーブス3Aで脱水し、キラル分析用キャピラリーカラムを接続したGC (上述) を用いて分析した。プロピレンオキシドにはChiraldex A-TA、その他のエポキシドにはChiraldex G-TA (いずれもASTEC社製) をそれぞれキラルカラムとして選択した。

### 3. 結果

#### [1] T2MO組換え大腸菌の活性測定

T2MOを構成する各サブユニットタンパク質の遺伝子は*tomA1*、*tomA2*、*tomA3*、*tomA4*であることが知られているが (Fig. 2) それらが大腸菌に組み込んで機能させた場合に、ゲノムDNAのすぐ上流にある*tomA0*遺伝子の有無がT2MO活性にどのような影響を与えるかは明らかにされていない。*tomA0*遺伝子の塩基配列からは97アミノ酸残基 (long ORF) と74アミノ酸残基 (short ORF) という2通りのORFの可能性が考えられたことから、T2MO遺伝子の上流にlong ORFあるいはshort ORFをもつプラスミドおよびORFをもたないプラスミドの3者を作製し、それぞれを組み込んだ大腸菌についてトルエンの水酸化活性を分析した。その結果、longあるいはshortのORFを含んだ大腸菌からは3-メチルカテコールが検出され、ORFを含まないものに比べて明らかに活性が高かった (Table 1)。 *B. cepacia* G4においてはトルエンは*o*-クレゾールから3-メチルカテコールへと順次水酸化されたのち代謝されてしまうため、生成物は検出されなかった (データ示さず)<sup>5)</sup>。トルエンから3-メチルカテコールへの反応は一段階の反応ではないが、見かけ上の初速度はlong ORFをもつ組換え大腸菌JM109/pT2MO11が、short ORFをもつJM109/pT2MO12と比べて1.5倍、ORFがないJM109/pT2MO13と比べて11倍高かった。いずれの菌を用いた場合にも*o*-クレゾール

は検出されなかったが、*o*-クレゾール (1.4 mM) を基質にしてJM109/pT2MO11とJM109/pT2MO12の反応性を調べたところ、反応の初速度 (mM/h/OD<sub>600</sub>) はそれぞれ0.24、0.17であったことから、組換え大腸菌においてもトルエンは*o*-クレゾールを経て3-メチルカテコールになっているものと考えられる。

Table 1 Toluene hydroxylation activity of the recombinant *E. coli* strains

<i>E. coli</i>	ORF	Initial reaction rate [mM/h/OD <sub>600</sub> ]
JM109/pT2MO11	long	0.074
JM109/pT2MO12	short	0.042
JM109/pT2MO13	absent	0.007

Thirty micromole of toluene was added to 20 ml cell suspension (OD<sub>600</sub>=5). 3-Methylcatechol was the sole detectable product.

次にプロピレンを基質にしてプロピレンオキシドの生成を調べた。その結果、ORFがないJM109/pT2MO13ではプロピレンオキシドは検出されなかったが、反応の初速度 (以下ではこれを活性と表記する) を見ると、この場合にもJM109/pT2MO11はJM109/pT2MO12と比べて1.5倍の値を示した (Table 2)。また宿主大腸菌をJM109からBL21(DE3)に変えて宿主の影響を調べたところ、pT2MO11とpT2MO12のいずれについてもJM109よりもBL21(DE3)の活性が高く、BL21(DE3)/pT2MO11の活性はBL21(DE3)/pT2MO12の約1.2倍、*B. cepacia* G4の1.6倍であった。

以上の結果より、ORFはトルエンのヒドロキシル化活性およびプロピレンのエポキシ化活性を高める作用を有することがわかった。

Table 2 Propylene epoxidation activity of the bacteria

Strain	ORF	Initial reaction rate [mM/h/OD <sub>600</sub> ]
<i>E. coli</i> <sup>a</sup>		
JM109/pT2MO11	long	0.31
JM109/pT2MO12	short	0.21
JM109/pT2MO13	absent	0.00
BL21(DE3)/pT2MO11	long	0.57
BL21(DE3)/pT2MO12	short	0.47
<i>B. cepacia</i> G4 <sup>b</sup>	(native)	0.35

Enzyme activity of each strain was induced by <sup>a</sup> IPTG or <sup>b</sup> phenol. Propylene (0.19 mmol) was added to 19 ml cell suspension (OD<sub>600</sub>=10). Propylene oxide was measured by GC.

## [ 2 ] ORFがエポキシ化反応のエナンチオ選択性に与える影響

次にORFがオレフィンのエポキシ化反応で生じる生成物の光学純度に影響しているのかどうかを調べた。上述したプロピレンを基質にした実験ではJM109/pT2MO13にプロピレンのエポキシ化活性が検出されなかったことから、BL21(DE3)を宿主に用い、また1-ブテンを基質として反応性の有無を含めて検討した。その結果、BL21(DE3)を宿主に用いた組換え体はいずれも1-ブテンから1,2-エポキシブタンを生成

した (Table 3)。BL21(DE3)/pT2MO11の活性はBL21(DE3)/pT2MO12の約1.2倍、BL21(DE3)/pT2MO13の約14倍、また、*B. cepacia* G4の約0.7~0.8倍であり、1-ブテンを基質にした場合にもORFの有無で活性に差が現れた。しかしながら生じた1,2-エポキシブタンの光学純度 (46~48% e.e.) の違いは誤差範囲であり、差は認められなかった。また同時にこの値は*B. cepacia* G4を用いた場合とも変わらなかった。以上の結果から、ORFは生成物の光学純度に対しては影響しないことがわかった。

Table 3 1-Butene epoxidation activity of the bacteria

Strain	ORF	Initial reaction rate [mM/h/OD <sub>600</sub> ]	Optical purity of the product [%e.e.] (R/S)
<i>E. coli</i> <sup>a</sup>			
BL21(DE3)/pT2MO11	long	0.31	48.3(R)
BL21(DE3)/pT2MO12	short	0.25	48.3(R)
BL21(DE3)/pT2MO13	absent	0.02	45.9(R)
<i>B. cepacia</i> G4 <sup>b</sup>	(native)	0.42	46.8(R)
<i>B. cepacia</i> G4 <sup>c</sup>	(native)	0.38	46.9(R)

Enzyme activity of each strain was induced by <sup>a</sup> IPTG, <sup>b</sup> phenol, or <sup>c</sup> toluene. 1-Butene (0.42 mmol) was added to 15 ml cell suspension (OD<sub>600</sub>=5). 1,2-Epoxybutane was measured by GC.

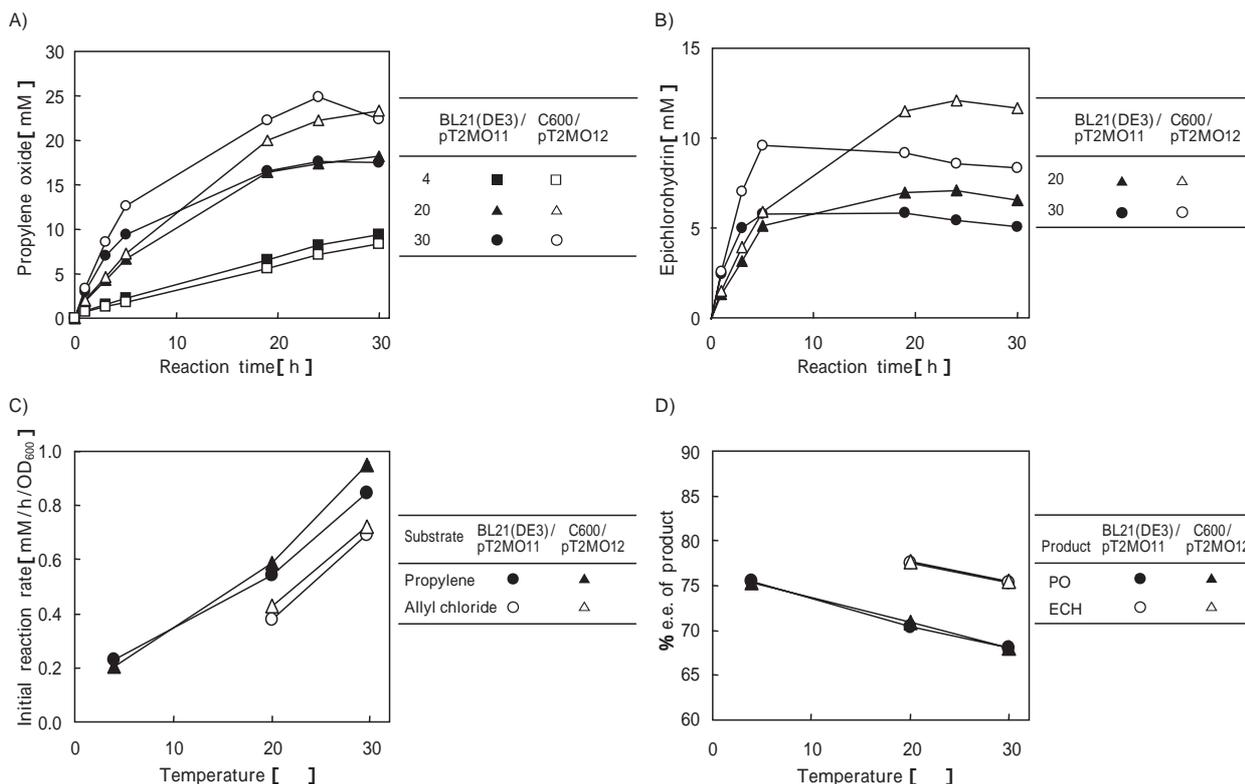


Fig. 4 Effect of temperature on the reaction rate and enantioselectivity

(A) Production of propylene oxide. (B) Production of epichlorohydrin. (C) Initial reaction rate. (D) Optical purity of the epoxides. Propylene (0.45 mmol) or allyl chloride (0.15 mmol) was added to 15 ml cell suspension (OD<sub>600</sub>=3.5) at zero hour. The same amount of each substrate was added at 3 h (reaction at 30 °C) or 5 h (reaction at 20 °C). PO; propylene oxide. ECH; epichlorohydrin.

[ 3 ] 反応温度がエポキシ化反応のエナンチオ選択性に与える影響

長らく酵素のエナンチオ選択性は反応基質ごとに固有の値を持つように思われていたが、最近反応媒体や反応温度を変えることによって変化することがリパーゼなどを用いた研究で報告されている<sup>16-19</sup>。ここでは菌体を用いた反応であるため媒体を変えることはできないが、限られた範囲であっても温度を変えることは可能である。そこで30、20 および4 での反応を行って、反応速度と生成物の光学純度を測定した (Fig. 4)。反応基質としてはプロピレンおよびアリルクロライドを用いた。その結果、Fig. 4 A), C) に示すようにプロピレンのエポキシ化においては温度を低下させることで反応性が低下したものの、Fig. 4 D) に示すように光学純度が上昇する傾向が見出された。一方アリルクロライドのエポキシ化においては20 の方が反応終点におけるエピクロロヒドリンの濃度が高かったが (Fig. 4 B) 初速度は30 の方が高く (Fig. 4 C) 生成したエピクロロヒドリン (S体過剰) の光学純度は20 の方が高い値を示した (Fig. 4 D)。

以上の結果より反応温度、反応性、生成物の光学純度の間に明瞭な関係が見出され、T2MOは反応温度を低下させることでエナンチオ選択性が上昇する酵素であると解釈される。

[ 4 ] TCE分解菌の活性測定

これまでの組換え大腸菌を用いた実験により *B. cepacia* G4のT2MOが持っている特性について多くの情報が得られた。組換え大腸菌はプロピレン、アリルクロライド、1-ブテンに対して比較的高いエポキシ化活性を示したが、エナンチオ選択性は当初期待したほどは高くなかった。そこでT2MOと類縁の酵素 (トルエンモノオキシゲナーゼあるいはフェノールヒドロキシラーゼ) を有すると推測されるTCE分解菌を各種微生物保存機関から取り寄せ、ナフタレンの水酸化活性とプロピレンのエポキシ化活性を指標にして評価を行った。その結果、*B. cepacia* G4以外にも7種類のTCE分解菌にナフタレン水酸化活性が見出され、いずれもプロピレンのエポキシ化活性を有することがわかった (Fig. 5)。その中でも *J. brevis* に高い活性が認められた。

いくつかの菌株について1-ブテンのエポキシ化活性を調べたところ、*J. brevis* が最も高い活性を示し、生成した1,2-エポキシブタン (R体過剰) の光学純度 (61% e.e.) は、Table 4に示した他の菌やTable 3に示した *B. cepacia* G4あるいはT2MO組換え大腸菌 (46~48% e.e.) と比べて有意に高かった。

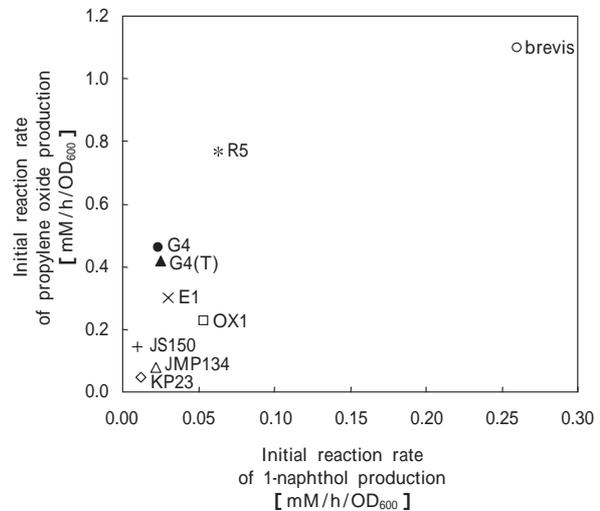


Fig. 5 Oxidation of naphthalene and propylene by TCE-degrading bacteria

Enzyme activity of each strain was induced by phenol. Additionally induction of *B. cepacia* G4 enzyme activity was performed by toluene (denoted G4(T)). Naphthalene (0.1 μmol) was added to 1 ml cell suspension (OD<sub>600</sub>=1). Propylene (0.19 mmol) was added to 10 ml cell suspension (OD<sub>600</sub>=10). Each reaction was performed at 30 °C except for *B. kururiensis* KP23 at 37 °C. Symbols: ●, *B. cepacia* G4; ×, *B. cepacia* E1; +, *B. sp.* JS150; △, *B. kururiensis* KP23; \*, *C. testosteroni* R5; ○, *J. brevis*; □, *P. stutzeri* OX1; △, *R. eutropha* JMP134.

Table 4 1-Butene epoxidation activity of the TCE-degrading bacteria

Strain	Initial reaction rate [mM/h/OD <sub>600</sub> ]	Optical purity of the product [%e.e.] (R/S)
<i>B. cepacia</i> E1	0.26	40(R)
<i>B. sp.</i> JS150	0.14	47(R)
<i>R. eutropha</i> JMP134	0.42	56(R)
<i>C. testosteroni</i> R5	0.54	57(R)
<i>J. brevis</i>	0.98	61(R)

1-Butene epoxidation reaction was performed as described in Table 3. Enzyme activity of each strain was induced by phenol.

*J. brevis*は *B. cepacia* G4と同様にフェノールによってTCE分解活性が誘導される特徴を有するが、用いた中では唯一のグラム陽性細菌である (現在は *J. terrae* と同種に分類されている)。現在までグラム陽性細菌からT2MO類縁の酵素が見出された報告はないため、観察された酸化活性が新規な酵素によるものである可能性も考えられる。そこでいくつかの化合物を基質として *J. brevis* の反応性を解析した (Table 5)。プロピレンと1-ブテンに対する反応性は高かったものの、1-ブテンよりも炭素数がひとつ増えた1-ペンテンに対してはほとんど反応しなかった。1,3-ブタジエンからブタジエンモノオキシドを生成する活性は比較的高く、ブタジエンモノオキシドからブタジエンジエポキシド

を生成する活性もわずかながら検出された。アリルプロマイドやアリルエチルエーテルは反応しなかったが、アリルクロライドやアリルアルコール、メチルアクリレート、エチルアクリレート、桂皮酸エチルには作用した。また内部オレフィン構造をもつシクロヘキセンにも作用した。スチレンに対する反応性は低かったが、スチレンオキシド (*R*体過剰) の生成が検出された。またこのときにスチレンのベンゼン環の水酸化物に相当する化合物は検出されなかった。トルエンを基質とした場合には一過的にクレゾールが検出されたが、反応生成物の蓄積は認められなかった。クレゾール (*o*-, *m*-, *p*-) を基質とした場合にも基質の減少が確認されたが、反応生成物は検出されなかった。

#### 4. 考 察

モノオキシゲナーゼは、通常の化学プロセスでは困難な、基質の燃焼を伴わない空気酸化を可能にしている興味深い酵素群である。しかしながら酸素酸化に共

役した還元力の供給が必要であり、従って生きて微生物を用いなくてはならないという制約があるため、合成化学的な研究は極めて限られている。我々は近年多くの新規な酸化酵素や酸化活性の強い微生物が見いだされ、解析されている状況に注目し、こうした生物機能を利用することによって新たな技術構築が可能であると考えた。本研究ではT2MOを材料として取り上げたが、他のトルエンモノオキシゲナーゼを含め、オレフィンのエポキシ化反応を行う酵素はいくつか知られており、より高い活性や選択性を有する酵素が見出される可能性は高い。

*B. cepacia* G4はTCE分解菌として初期に単離された細菌であり、またTCE分解活性の本体がT2MOであることが明らかになったため、T2MOに関しては比較的基礎的な知見が蓄積されている。しかしながら合成化学的な観点で利用する試みはほとんどなく、大腸菌を宿主とした遺伝子発現についても研究例が少ない。我々はまず機能未知のORFが酵素生産に与える影響に注目して研究を行い、これが酵素活性を高める働きを

Table 5 Oxidation activity of *J. brevis* toward various organic compounds

Substrate	Initial concentration of substrate [ mM ]	Product	Initial reaction rate [ mM/h/OD <sub>600</sub> ]	Optical purity of the product [ %e.e. ] ( <i>R/S</i> )
Propylene		Propylene oxide	1.2	70( <i>R</i> )
1-Butene		1,2-Epoxybutane	0.94	61( <i>R</i> )
1,3-Butadiene	10	Butadiene monoxide	0.36	
Butadiene monoxide	10	Butadiene diepoxide	0.09	
1-Pentene	10	1,2-Epoxybutane	0.01	
Allyl alcohol	10	Glycidol	0.06	
Allyl bromide	10	-	NR <sup>a</sup>	
Allyl chloride	10	Epichlorohydrin	0.56	74( <i>R</i> )
Allyl ethyl ether	10	-	NR <sup>a</sup>	
Methyl acrylate	10	Methyl glycidate	0.31 <sup>d</sup>	
Ethyl acrylate	10	Ethyl glycidate	0.46 <sup>d</sup>	
Styrene	5	Styrene oxide	0.03	38( <i>R</i> )
Cyclohexene	5	Cyclohexene oxide	0.29	
Toluene	5	Cresol <sup>c</sup>	ND <sup>b</sup>	
<i>o</i> -Cresol	5	ND <sup>b</sup>	0.42 <sup>d</sup>	
<i>m</i> -Cresol	5	ND <sup>b</sup>	0.24 <sup>d</sup>	
<i>p</i> -Cresol	5	ND <sup>b</sup>	0.34 <sup>d</sup>	
Naphthalene	1.5	1-Naphthol	0.08	
Ethyl cinnamate	1.5	ND <sup>b</sup>	> 0.15 <sup>d</sup>	

Enzyme activity of the bacterium was induced by phenol. Each substrate was added to cell suspension as follows: 15 ml cell suspension (OD<sub>600</sub>=5) for propylene (0.37 mmol), 1-butene (0.42 mmol); 20 ml cell suspension (OD<sub>600</sub>=5) for 1,3-butadiene, butadiene monoxide, 1-pentene, allyl bromide, methyl acrylate, and ethyl acrylate; 18 ml cell suspension (OD<sub>600</sub>=10) for allyl chloride, allyl alcohol, styrene, cyclohexene, toluene, cresols (*o*-, *m*- and *p*-), naphthalene, and ethyl cinnamate.

<sup>a</sup> NR, no reaction. <sup>b</sup> ND, not determined. <sup>c</sup> *ortho:meta:para*=48:3:1. <sup>d</sup> Initial rate of substrate degradation.

していることを見出した。またlong ORFあるいはshort ORFのみを発現させる組換え大腸菌(宿主BL21(DE3))を作製してSDS-PAGEで分析したところ、いずれにおいてもshort ORFに相当する大きさのタンパク質が観察された(データ示さず)。従ってshort ORFが機能領域である可能性が高いが、*B. cepacia* G4でshort ORFが機能しているかどうかは明らかでない。*Pseudomonas* sp. CF600のフェノールヒドロキシラーゼには*B. cepacia* G4のものとはアミノ酸配列が大きく異なる機能未知のORFがあり、これがサブユニットの会合に関与しているという仮説が提唱されている<sup>20)</sup>。*B. cepacia* G4のORFが同様の働きをしているのかどうかは更なる検討が必要である。

T2MO組換え大腸菌は*B. cepacia* G4と同等以上の酸化活性を示し、トルエンやナフタレンの水酸化活性、プロピレンや1-ブテンのエポキシ化活性とエナンチオ選択性、いずれにおいても*B. cepacia* G4を用いた結果と近かった。従ってT2MOが*B. cepacia* G4における主要なモノオキシゲナーゼであると推測された。一方*B. sp.* JS150や*P. stutzeri* OX1では2種類以上のモノオキシゲナーゼがトルエンの水酸化に関与しているという報告があり<sup>8,21)</sup>、*B. cepacia* G4においても同様の可能性は排除できない。

T2MOのエナンチオ選択性は当初期待していたよりも低かったため、T2MO類縁の酵素を持つ可能性が高いTCE分解菌から高いエナンチオ選択性を有する酵素を見出すことを試みた。その結果、調べたTCE分解菌の多くにナフタレンの水酸化活性とプロピレンのエポキシ化活性が見出された。その中でも*J. brevis*は両者の活性がともに高く、1-ブテンのエポキシ化において他のものよりもエナンチオ選択性が高く(61% e.e., R体過剰) グラム陽性細菌である、ことから興味を持たれた。そこで種々の化合物を用いて反応を行い、反応生成物を分析した<sup>22)</sup>。その結果、T2MOとはいくつかの点で異なる反応性が観察された。まずプロピレンのエポキシ化反応の初速度を1としたときのアリルクロライドに対する初速度の値は、JM109/pT2MO11では0.86 (Fig.4 (C)の値より算出)であるのに対して、*J. brevis*では0.47 (Table 4の値より算出)であり、反応性に違いが見られる。またスチレンに対する反応では、組換え大腸菌BL21(DE3)/pT2MO11がスチレンオキシドのほかに2-ヒドロキシスチレンや2-ヒドロキシスチレンオキシドを生成した(データ示さず)のに対して、*J. brevis*はスチレンオキシドのみを生成した。こうしたことから*J. brevis*は*B. cepacia* G4由来のT2MOとは異なるタイプの酵素を

有している可能性が高い。最近、ダイオキシン分解活性を有する細菌が*Janibacter*属あるいは近縁の*Terrabacter*属から多く報告されている<sup>23-24)</sup>。ここで分析した酸化活性がダイオキシン分解の酵素系と関係しているかどうかは今後の課題である。

酵素のエナンチオ選択性を上げたい場合に最も多くとられるアプローチは微生物のランダムスクリーニングである。歴史的には多くの成功例があるが、一般にその効率は低い。ところでリパーゼに代表されるタフな加水分解酵素は、有機溶媒中で反応させることや反応温度を極端に低下させることによってエナンチオ選択性を上げたという報告がある<sup>16-19)</sup>。我々は反応温度を下げたT2MOの反応を行ったところ、プレピレンとアリルクロライドのエポキシ化反応において明瞭なエナンチオ選択性の上昇が観察された。我々は最近アルケンモノオキシゲナーゼを用いた場合にも同様の効果があることを見出しており(データ示さず)反応温度を低下させることによって多くのモノオキシゲナーゼのエナンチオ選択性を上昇させることができるのではないかと考えている。

上記のような試みにも関わらずT2MOのエナンチオ選択性を飛躍的に上昇させることはできなかった

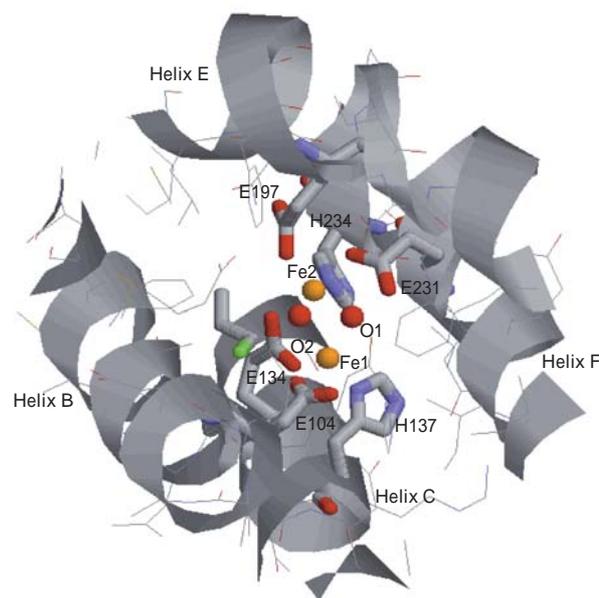


Fig. 6 Active site of ToMO along with a possible binding mode of allyl chloride

Allyl chloride molecule (represented by stick with a green end, chlorine atom) was docked with X-ray crystal structure of ToMO<sup>25)</sup> (PDB entry: 1TOQ) by Auto Dock 3.0<sup>26)</sup>. An output structure of allyl chloride with preferable position and conformation was selected for display. Six amino acid residues (Glu104, Glu134, His137, Glu197, Glu231, and His234) coordinated to two Fe atoms are highlighted. O2, an oxygen atom derived from molecular oxygen is supposed to attack C=C bond of allyl chloride in a stereoselective manner. Schematic representation of four helices (Helix B, C, E, and F) surrounding the active site are also shown.

め、我々はアミノ酸残基の置換による酵素の機能改変を次の技術課題として検討している。エナンチオ選択性はサブユニットにある基質結合ポケットの立体構造によって規定されると考えられることから、基質結合ポケット付近に的を絞ったアミノ酸置換を行えば反応性や選択性が変化するものと推測される。T2MOの立体構造はまだ明らかにされていないものの、類縁酵素であるtoluene *o*-xylene monooxygenase (ToMO)のX線結晶構造が2004年に報告された<sup>25)</sup>ことから、このアプローチがにわかに現実味を帯びてきた。我々はX線結晶構造解析によって明らかにされたToMOの活性中心にアリルクロライドを計算化学的にドッキングさせることによって (Fig. 6) 基質との相互作用に関与する酵素のアミノ酸残基を推定した。今後はこのような手法を組み合わせるによって望ましい特性を有する酵素を見出したいと考えている。

## 5. まとめ

〔1〕 *Burkholderia cepacia* G4由来のT2MOを遺伝子組換えにより大腸菌で生産させることによって、プロピレンやアリルクロライドなどのエポキシ化反応を効率よく行なうことができた。

〔2〕 反応温度を低下させることによってエポキシ化反応のエナンチオ選択性が上昇することを見出した。

〔3〕 TCE分解菌である *Janibacter brevis* は芳香族化合物の水酸化やオレフィンのエポキシ化活性が高く、また1-ブテンに対するエナンチオ選択性が高いなど興味深い特性を有していた。

## 6. 文 献

- 1) M. J. K. Nelson, S. O. Montgomery, E. J. O'Neill, P. H. Pritchard, *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 383 (1986)
- 2) L. M. Newman, L. P. Wackett, *J. Bacteriol.*, 179, 90 (1997)
- 3) K. McClay, B. G. Fox, R. J. Steffan, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 1877 (2000)
- 4) M. S. Shields, S. C. Francesconi, U. S. Patent 5,543,317 (1996)
- 5) L. M. Newman, L. P. Wackett, *Biochemistry*, 34,14066 (1995)
- 6) 二又裕之、渡辺一也、特開平11-243958
- 7) H. Zhang, S. Hanada, T. Shigematsu, K. Shibuya, Y. Kamagata, T. Kanagawa, R. Kurane, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50, 743 (2000)
- 8) G. R. Johnson, R. H. Olsen, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4047 (1997)
- 9) M. Teramoto, S. Harayama, K. Watanabe, *J. Bacteriol.*, 183, 4227 (2001)
- 10) Y. Imamura, M. Ikeda, S. Yoshida, H. Kuraishi, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50, 1899 (2000)
- 11) S. Chauhan, P. Barbieri, T. K. Wood, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3023 (1998)
- 12) D. Ryoo, H. Shim, K. Canada, P. Barbieri, T. K. Wood, *Nature Biotechnol.*, 18, 775 (2000)
- 13) A. R. Harker, Y. Kim, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1179 (1990)
- 14) C. M. Yeager, P. J. Bottomley, D. J. Arp, M. R. Hyman, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 632 (1999)
- 15) 飯田寛、柿谷均、丸山高廣、特開2004-309157
- 16) V. Kasche, B. Galunsky, A. Nurk, Piotraschke, A. Rieks, *Biotechnol. Lett.*, 18, 455 (1996)
- 17) B. Galunsky, S. Ignatova, V. Kasche, *Biochem. Biophys. Acta*, 1343, 130 (1997)
- 18) T. Sakai, I. Kawabata, T. Kishimoto, T. Ema, M. Utaka, *J. Org. Chem.*, 62, 4906 (1997)
- 19) T. Sakai, T. Kishimoto, Y. Tanaka, T. Ema, M. Utaka, *Tetrahedron Lett.*, 39, 7881 (1998)
- 20) J. Powlowski, J. Sealy, V. Shingler, E. Cadieux, *J. Biol. Chem.*, 272, 945 (1997)
- 21) V. Cafaro, V. Izzo, R. Scognamiglio, E. Notomista, P. Capasso, A. Casbarra, P. Pucci, A. Di Donato, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 2211 (2004)
- 22) 丸山高廣、飯田寛、柿谷均、特開2004-357512
- 23) H. Nojiri, M. Kamakura, M. Urata, T. Tanaka, J. Chung, T. Takemura, T. Yoshida, H. Habe, T. Omori, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 269, 233 (2002)
- 24) A. Yamazoe, O. Yagi, H. Oyaizu, *Biotechnol. Lett.*, 26, 479 (2004)
- 25) M. H. Sazinsky, J. Bard, A. Di Donato, S. J. Lippard, *J. Biol. Chem.*, 279, 30600 (2004)
- 26) G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.*, 19, 1639 (1998)

著者  
氏名 飯田 寛  
Hiroshi IIDA  
入社 昭和63年4月1日  
所属 (財)相模中央化学研究所(出向)  
酵素工学グループ  
主任研究員

著者  
氏名 丸山 高廣  
Takahiro MARUYAMA  
入社 平成10年4月1日  
所属 東ソー株式会社  
東京研究所  
新材料無機分野  
副主任研究員

著者  
氏名 小林 秀峰  
Hidetaka KOBAYASHI  
入社 平成14年4月1日  
所属 東京研究所  
バイオ有機分野  
副主任研究員

著者  
氏名 柿谷 均  
Hitoshi KAKIDANI  
入社 昭和54年10月16日  
所属 (財)相模中央化学研究所  
酵素工学グループ  
(兼)東京研究所  
企画管理グループ  
主席研究員