

称号及び氏名 博士(応用生命科学) 吉村 侑子

学位授与の日付 2021年3月31日

論文名 子囊菌由来マンガン酸化酵素に関する研究

論文審査委員
主査 川口 剛司
副査 乾 隆
副査 片岡 道彦
副査 谷 修治

論文要旨

酸化反応は、全化学工業プロセスの 30%以上を占める重要な反応の一つであるが、環境負荷の観点からは課題の多い反応である。酸化剤として工業的に大量に使用される硝酸は、温室効果ガスである亜酸化窒素や大気汚染物質である窒素酸化物を副生する問題がある。また、医薬品製造などでは、高選択酸化のために毒性の高いクロムを含む酸化剤が用いられており、目的物と同量以上の含クロム廃棄物が生じる問題がある。したがって、低環境負荷の代替法の開発が求められている。そこで本研究では、微生物が生産する酸化触媒の 1 つである Biogenic Manganese Oxides (BMOs) に注目し、BMOs の有機合成用酸化触媒としての利用を目的として、BMOs 生産菌の単離及び解析を行った。

BMOs は、微生物が可溶性の Mn(II) を酸化することで生じる不溶性の酸化物 Mn(III、IV) であり、BMOs 生産菌としては、細菌、真菌及び微細藻類が報告されている。BMOs の多くは、Mn(IV)O₆ 八面体ユニットが平面状に配列したナノシートが積層した δ-MnO₂ 構造を有する。非生物的 MnO₂ と比較して、BMOs はシート構造中の結晶欠陥が高密度で存在するため負電荷を持つことが多く、この負電荷を解消するように陽イオンが吸着する。このような特徴から、BMOs は非生物的 MnO₂ と比較して、優れた酸化活性・吸着能を持つことが報告され、環境分野では、ビスフェノール A 等の内分泌攪乱化学物質の分解や鉛等の有害金属イオンの吸着等が報告されている。一方で、有機合成分野では、非生物的 MnO₂ は酸化剤として一般的に利用されているが、BMOs の利用例はほとんどない。

芳香族アルデヒド類は、その反応性の高さから有機合成の "Building Block" として広く用いられている。しかしながら、反応性の高さは製造法の難しさにも繋がり、今日まで様々な方法の開発が試み続けられている。1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HBT) 等の *N*-ヒドロキシラジカルは、ラッカーゼ等の再酸化剤と組合せることで、温和な条件で C-H 結合を酸化することが報告されている。

以上の背景を基に、本研究では、BMOs と HBT を利用し、トルエン類からの芳香族アルデヒド類合成反応を検討した。新たに単離した Mn1 株の生産した BMOs は、非生物的 MnO₂ やラッカーゼと比較して優れた触媒活性を示し、特に中性条件下では非生物的 MnO₂ と比較して約 200 倍高い 3,4-ジメトキシベンズアルデヒド収率が得られた。

第一章 マンガン酸化微生物由来マンガン酸化酵素の生化学的研究

土壌試料より、Mn(II) を酸化し BMOs を生産する微生物をスクリーニングするため、Mn(II) を含む培地で黒褐色の沈殿を生じる微生物を 50 株単離した。次に、単離菌株の培養液を用い、HBT 存在下で、3,4-ジメトキシトルエンを酸化し 3,4-ジメトキシベンズアルデヒドを生産した菌株を選抜した。なお、HBT の添加無しに反応を触媒できる菌株は無かった。最も目的反応の触媒活性が高かった Mn1 株について、28S rDNA-D1/D2 領域の塩基配列から BLAST 解析を行ったところ、Mn1 株は、クロイボタ綱プレオスポラ目の *Roussoella* 属に近縁で、*Roussoella doimaesalongensis* とは 99.0% の相同性があった。また、BMOs の生成を確認するため、Mn1 株の培養液に生じた黒褐色の沈殿を X 線回折測定 (XRD) に供した。得られた XRD パターンは、2.4Å

及び 1.4Å にブロードなピークを示した。これは他種で報告されている BMOs の XRD パターンと良く一致し、Mn1 株が BMOs を生産することが示された。

500 μM MnSO₄ を添加した Mn1 株培養液は、3,4-ジメトキシトルエンを 3,4-ジメトキシベンズアルデヒドに 56% の収率で変換したが、MnSO₄ 未添加条件下では非常に低い収率だった。このことから、Mn1 株の培養液中で Mn(II) が酸化され、生産された BMOs が HBT を介して 3,4-ジメトキシトルエンの酸化を触媒していることが示唆された。

Mn1 株の生産した BMOs を触媒として利用した 3,4-ジメトキシトルエンの酸化を、非生物的 MnO₂ 及びトルエン類の酸化反応が報告されているラッカーゼを触媒とした場合と比較した。Mn1 由来 BMOs は非生物的 MnO₂ 及びラッカーゼと比較して、効率よく 3,4-ジメトキシベンズアルデヒドが生成され、特に中性条件下では非生物的 MnO₂ と比較して約 200 倍高い 3,4-ジメトキシベンズアルデヒドが得られた。この結果は、BMOs の特徴である構造中の結晶欠陥や電荷が寄与していると考えられる。

Mn1 株の Mn(II) 酸化酵素生産条件を検討したところ、培地へ MnSO₄、CuSO₄ 及びリグニンを添加することで、Mn(II) 酸化酵素生産が上昇することが分かった。また、Mn(II) 酸化活性は、菌体内画分と菌体外画分を比較すると、菌体内の方が高く、培養 5 日目に最も活性が高くなった。

そこで、Mn1 株の菌体内画分より、各種クロマトグラフィーを用いて Mn(II) 酸化酵素を精製し、分子量約 78,000 に電気泳動的に均一なバンドが得られた。次に、精製酵素の酵素学的性質を調べた。本酵素の至適 pH は 7.0、最適温度は 45°C であった。また本酵素は pH 7.0~8.0 で安定に存在し、耐熱性は 40°C 以下で安定であった。本酵素はアジ化ナトリウム、*o*-フェナントロリン、ジチオスレイトール、EDTA により活性が阻害された。これらの試薬に対する挙動は、精製酵素が金属酵素であることを示唆した。

得られた精製酵素の N 末端配列は、マルチ銅オキシダーゼ(MCO) に属する Mn(II) 酸化酵素として子囊菌で唯一報告されている *Acremonium strictum* KR21-2 株由来の酵素と 70% の相同性(14/20 残基)を示した。また、各種の子囊菌の遺伝子情報に基づいた推定 MCO と高い相同性を示し、本酵素のオルソログ遺伝子は子囊菌に広く分布していることが示された。精製酵素で明らかになった諸性質と合わせて、本酵素は MCO に属することが強く示唆された。

最後に、3,4-ジメトキシトルエンの酸化における Mn(II) や HBT の添加効果を、精製酵素を用いて検討した。3,4-ジメトキシトルエンは、酵素のみ及び酵素と Mn(II) を添加した試験区では酸化されず、酵素と HBT 及び酵素、Mn(II) と HBT を添加した試験区では酸化され、目的の 3,4-ジメトキシベンズアルデヒドが、それぞれ 3% と 7% の収率で得られた。以上より、本菌を利用した 3,4-ジメトキシトルエンの酸化機構は、本酵素による BMOs の生成を介する系と本酵素が直接 HBT に作用する系の 2 経路によって起こり、2 つの経路は相加効果を示すことが分かった。

第二章 Mn1 株の生産するマンガン酸化物の解析

微生物が生産する BMOs は、Mn 濃度や共存金属イオンによって、形態や組成が変

化し、反応性も異なることが報告されている。そこで、BMOs の調製条件を検討することで、BMOs の触媒活性を改善できると考え、BMOs の調製条件と性質の関係を検討した。

培地に添加する Mn(II)濃度を検討したところ、Mn(II)濃度が低い程、生成する BMOs の平均原子価が高くなることが分かった。また、生成した BMOs の形態も異なり、Mn(II)濃度が低い程 BMOs の粒子が大きくなった。調製した BMOs を 3,4-ジメトキシトルエンの酸化反応に用いたところ、Mn(II)濃度が低く平均原子価の高かった試験区で、最も高い収率が得られた。これは、酸化活性を持つ Mn(III)や Mn(IV)の含量が高いことが、高い収率に繋がったと考えられる。以上より、培地に添加する Mn(II)濃度によって、生じる BMOs の性質や酸化活性を制御できることが分かった。

次に、共存イオンとして、化学合成された二酸化マンガンや他種の細菌の生産する BMOs において結晶構造や性質に寄与することが報告されている Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 及び Zn^{2+} を培地に添加して Mn1 株を培養し、生成する BMOs の性質を調べた。その結果、 Fe^{3+} 及び Mg^{2+} を添加した場合に平均原子価が低くなる一方で、 Ca^{2+} 及び Zn^{2+} では共存イオン無添加区と平均原子価は変わらなかった。また、これらの形態を観察したところ、 Fe^{3+} 添加区は無添加区と比較して粒度が大きく、 Ca^{2+} 添加区は平面的な部分と不規則な細孔が共存する複雑な形態が観察された。また、 Mg^{2+} 添加区は細かい海綿状の形態が観察され、 Zn^{2+} 添加区では網目状の平面的な形態を示した。このことから、共存イオンの添加が BMOs の形態に影響することが分かった。調製した BMOs を 3,4-ジメトキシトルエンの酸化反応に用いたところ、 Zn^{2+} を添加した試験区で最も高い収率(83%)が得られた。それ以外の金属イオンの添加区では、金属イオンを添加しない試験区よりも収率が低くなった。収率は平均原子価が高い BMOs で高い傾向にあるが、 Ca^{2+} 添加区は平均原子価が高くても収率が低かったことから、原子価以外にも反応に寄与する性質があることが示唆された。

結論

BMOs の有機合成用酸化触媒としての利用を目的として、Mn1 株を単離し、酵素的解析及びトルエン類酸化反応の検討を行った。Mn1 株の菌体内画分より Mn(II)酸化酵素を精製し、各種解析に供した。N 末端アミノ酸配列及び阻害剤に対する挙動から、精製酵素は MCO に属することが強く示唆された。Mn1 株の生産した BMOs は、非生物的 MnO_2 やラッカーゼと比較して優れた触媒活性を示した。更に、本菌を利用した 3,4-ジメトキシトルエンの酸化機構は、本酵素による BMOs の生成を介する系と本酵素が直接 HBT に作用する系の 2 経路によって起こり、2 つの経路は相加効果を示すことが分かった。また、BMOs 調製条件によって、BMOs の性質を制御することができ、触媒活性を改善することができた。

審査結果の要旨

酸化反応は、全化学工業プロセスの 30%以上を占める重要な反応の一つである。しかし、工業的には酸化剤として硝酸や含クロム化合物が使われることが多いことが問題となっている。こういった問題を解決するため環境に優しい代替法の開発が求められている。

微生物が生産する酸化触媒の 1 つである Biogenic Manganese Oxides (BMOs) は、可溶性の Mn(II) を酸化することで生じる不溶性の酸化物 Mn(III, IV) であり、その多くは Mn(IV)O₆ 八面体ユニットが平面状に配列したナノシートが積層した δ -MnO₂ 構造を有する。非生物的 MnO₂ と比較して、BMOs はシート構造中の結晶欠陥が高密度で存在するため負電荷を持つことが多く、この負電荷を解消するように陽イオンが吸着する。この特徴から、BMOs は非生物的 MnO₂ と比較して優れた酸化活性を持つが、有機成分分野において BMOs の利用例はほとんどない。

芳香族アルデヒド類は、その反応性の高さから有機合成の "Building Block" として広く用いられているが製造法が難しく今日まで様々な方法の開発が試み続けられている。1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HBT) 等の *N*-ヒドロキシラジカルは、ラッカーゼ等の再酸化剤と組合せることで温和な条件で C-H 結合を酸化することが報告されている。

以上の背景に基づき、本論文は BMOs 生産菌の探索に始まり、Mn(II) 酸化酵素の解析、生産された BMOs によるトルエン類からの芳香族アルデヒド類合成反応について検討されたものである。

第一章では、BMOs 生産菌のスクリーニングおよび生産された BMOs の性質について、さらに Mn(II) 酸化酵素の精製と性質について検討された。まず、Mn(II) を含む培地で黒褐色の沈殿を生じる微生物を 50 株単離し、そのうち HBT 存在下で 3,4-ジメトキシトルエンを酸化し 3,4-ジメトキシベンズアルデヒドを生産する活性が最も高い株を選択した (Mn1 株)。Mn1 株の培養液に生じた黒褐色の沈殿を X 線回折測定に供したところ、2.4, 1.4Å にブロードなピークを持つ BMOs に特徴的なパターンを示した。Mn1 株の生産した BMOs による 3,4-ジメトキシトルエンの酸化は、非生物的 MnO₂ 及びラッカーゼを触媒とした場合よりも高効率で 3,4-ジメトキシベンズアルデヒドが生成され、特に中性条件下では非生物的 MnO₂ と比較して約 200 倍高かった。この結果は、BMOs の特徴である構造中の結晶欠陥や電荷が寄与していると考察している。

次に、3,4-ジメトキシトルエンの酸化における Mn(II) や HBT の添加効果を、精製した Mn(II) 酸化酵素を用いて検討した。3,4-ジメトキシトルエンは、酵素のみ及び酵素と Mn(II) を添加した試験区では酸化されず、酵素と HBT 及び酵素、Mn(II) と HBT を添加した試験区では酸化され、目的産物が、それぞれ 3% と

7%の収率で得られた。以上より、本菌を利用した 3,4-ジメトキシトルエンの酸化機構は、本酵素による BMOs の生成を介する系と本酵素が直接 HBT に作用する系の 2 経路が存在することを示した。

第二章では、Mn1 株の生産するマンガン酸化物の解析が行われた。BMOs は Mn 濃度や共存金属イオンによって形状や組成が変化し反応性も異なることが報告されている。そこで、BMOs の調製条件を変えることで触媒活性を改善できる可能性について検討された。まず、培地中の Mn(II) 濃度を検討したところ、Mn(II) 濃度が低いほど精製する BMOs の平均原子価が高くなることを示し、3,4-ジメトキシトルエンの酸化反応では高い収率が得られた。これは、酸化活性を持つ Mn(III, IV)の含量が高いことが要因であると結論づけている。次に、共存イオンとして Fe^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} を培地に添加して調製した BMOs の性質が調べられた。その結果、 Fe^{3+} , Mg^{2+} 添加では無添加区に比べて平均原子価が低くなり、 Ca^{2+} , Zn^{2+} 添加では変化がなかった。また、形態的にはそれぞれが大きく異なった。調製した BMOs を 3,4-ジメトキシトルエンの酸化反応に用いたところ、 Zn^{2+} で最も高い収率 (83%) が得られた。それ以外の金属イオンでは、金属イオン無添加区よりも収率が低くなった。収率は平均原子価が高い BMOs で高い傾向にあるが、 Ca^{2+} 添加区は平均原子価が高くても収率が低かったことから、原子価以外にも反応に寄与する性質がある可能性に言及している。

本論文は、微生物の生産する BMOs が有機合成における酸化反応に利用できることを初めて明らかにしたものであり、とりわけ化学工業における基幹化合物のひとつである芳香族アルデヒドの新たな環境調和型合成法の可能性を与えるものである。よって、本論文の審査ならびに最終試験の結果とあわせて、博士 (応用生命科学) の学位を授与することを適当と認める。