

## 二核鉄型酸化酵素を利用した高選択酸化プロセスの開発

早稲田大学理工学術院 先進理工学部応用化学科 古屋 俊樹

二核鉄型酸化酵素は、活性中心に存在する 2 つの鉄イオンを利用して一酸素添加反応を触媒するタンパク質で、微生物界に広く存在し有機化合物の酸化分解等において重要な役割を担っている。二核鉄型酸化酵素はメタンをメタノールに変換するメタン酸化酵素で研究が進んでおり、結晶構造も明らかにされている。一方、放線菌由来の当該酵素は、二核鉄型酸化酵素ファミリーにおいてサブファミリーを形成しており、配列・構造のみならず触媒する反応もユニークである。例えば、*Nocardia corallina* B-276 と *Mycobacterium* sp. M156 由来の酵素はアルケンのエポキシ化反応を、*Gordonia* sp. TY-5 と *Pseudonocardia* sp. K1 由来の酵素はそれぞれプロパンとテトラヒドロフランの酸化反応を触媒する。これらの酸化酵素は、化学触媒では困難なかつ有用な反応を触媒するため工業プロセスへの応用に期待が寄せられている。触媒として実用化するためには、自然界から分離したままの株では活性が低いので、これらの酸化酵素を遺伝子工学的に異種細胞内で高発現させて高活性を有する細胞を開発することが有効である。しかしながら、放線菌由来の当該酸化酵素は異種発現が非常に困難であり、このことが実用化への道を閉ざしている原因のひとつになっている。

我々は最近、放線菌 *Mycobacterium goodii* 12523 および *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 の有する二核鉄型酸化酵素遺伝子 *mimABCD* を同定することに成功している[1]。*mimA*、*mimB*、*mimC*、*mimD* はそれぞれオキシゲナーゼラージサブユニット、レダクターゼ、オキシゲナーゼスモールサブユニット、カップリングプロテインをコードしている。本酵素は生理的にはアセトンやプロパンの酸化分解に関わっているが、フェノールをパラ位選択的に酸化してヒドロキノンに変換する活性も有していることを明らかにした[2]。フェノールの位置選択的酸化は化学触媒では困難であるため、本酵素のヒドロキノン生産への応用について企業との共同研究も行ないながら検討している。我々は *MimABCD* の異種発現を試みたが、本酵素においても上述のように困難を極めた。ところが最近、*mimABCD* の異種発現に本遺伝子クラスターの下流に存在する *mimG* と命名した遺伝子の共発現が必要なことを突き止めた。さらに詳細な解析を実施し、*MimG* はオキシゲナーゼラージサブユニット *MimA* の可溶化発現、立体構造形成を補助するシャペロン様タンパク質であることを明らかにした[3]。

*MimG* の発見は、二核鉄型酸化酵素の異種発現、応用に大きなブレークスルーをもたらす可能性を秘めており、現在、2 つの観点から研究の展開を試みている。まず、フェノールの高選択酸化プロセスの開発である。酸化酵素遺伝子 *mimABCD* とシャペロン様タンパク質遺伝子 *mimG* を大腸菌等の異種細胞内で高発現させることにより、ヒドロキノン生産プロセスに適用可能な高活性生体触媒の開発を目指している[4]。次に、当該発現システムの他の二核鉄型酸化酵素への応用である。オキシゲナーゼラージサブユニットに特異的なシャペロンを共発現させることにより、これまで異種発現が困難であった多様な二核鉄型酸化酵素の機能開発研究も可能となり、その応用にも道が拓かれるものと考えている。

本研究の遂行においてご教示いただいた木野邦器教授(早稲田大学)、仙波尚博士((株)日本触媒)、および研究に携わられた方々に感謝申し上げます。また、微生物株、ベクターを分譲いただいた大竹久夫教授、本田孝祐准教授(大阪大学)、田村具博教授(産総研)に御礼申し上げます。

### 参考文献

1. T. Furuya, et al., Appl. Environ. Microbiol., 77, 1214–1220 (2011).
2. T. Furuya, et al., J. Bacteriol., 193, 5817–5823 (2011).
3. T. Furuya, et al., FEBS J., 280, 817–826 (2013).
4. T. Furuya, et al., Appl. Environ. Microbiol., 79, 6033–6039 (2013).