

環境分子科学研究 第 期 Ecomolecular Science Research (Phase)

研究代表者 前 田 瑞 夫
MAEDA, Mizuo
(前田バイオ工学研究室)
(Bioengineering Laboratory)

1. 環境分子の合成科学研究

(1) 生物活性物質の迅速合成法の開発・新規反応場の生体分子精密合成への応用 (伊藤、眞鍋、松尾、石渡、久保田*1、武田*1、宮川*1、森*1、Lee*1、Amin*1 (伊藤細胞制御化学研究室))

1) 糖鎖の分子機能を解明する上で種々の分子プローブを創製することは極めて有用である。当研究室では多種多様な糖鎖を自在に合成するための手法の開発を目指して多面的な研究を行っている。我々は既に可溶性高分子を用いることにより高分子担体上での糖鎖伸長反応をリアルタイムでモニターし、望む生成物を特異的に樹脂で釣り上げる手法を開発している。さらに簡略化したストラテジーにより、一連の糖鎖伸長反応の後 1 回の釣り上げ操作を行うだけで純粋な糖鎖を得る事が可能となった。また、アルコールの保護基として、トリフルオロアセチル (TFA) 及び、ペンタフルオロプロピオニル (PFP) エステル、そして *t*-ブチルジメチルシリル (TBS) エーテルを利用した簡便な糖鎖合成を開発した。以上の手法を応用し糖タンパク質品質管理機構に関与する高マンノース型糖鎖部分構造、合わせてフッ素誘導体を用いチオール基を介して金電極上に固定した。水晶共振子マイクロバランス (QCM) 法を用いて小胞体関連レクチン、カルレティキュリン (CRT) との相互作用解析を行い、構造活性相関を検証したところ、いくつかの水酸基がレクチンの基質糖鎖認識に重要であることを見いだした。

2) グラム陰性菌 *Campylobacter jejuni* より見いだされた新規 *N*-結合型糖タンパク質糖鎖の合成研究を行った。これは、真核生物にはみられない、4,6-diacetamido-2,4,6-trideoxy- D-glucose (bacillosamine, Bac) を含み、ほ乳類とは全く異なる $\text{Glc}_1\text{GalNAc}_5\text{Bac}_1$ であり、Bac を介した糖タンパク質側の Asn と結合している。PFP基の電子的性質を利用した立体選択的 1,2-*cis*- \square -GalNAc 構築法を見だし、反応条件を最適化した結果、低反応性の糖供与体とのグリコシル化においても収率よく糖鎖伸長可能となった。その応用として、簡便に合成したBac誘導体を出発原料とし、新規 *N*-結合型糖タンパク質糖鎖7糖誘導体の立体選択的化学合成に初めて成功した。

3) 糖鎖合成における難題の一つである 1,2-*cis*結合形成において、効率高いより直接的なストラテジーの開発を行っている。まず、1,2-*cis*- \square -結合を有するグルコサミンの合成において、*N*-ベンジル-2,3-*trans*-オキサゾリジノン環を持つ糖供与体のグリコシル化は、高い \square 選択性を示すことを見いだしている。本法を利用し、抗 *Helicobacter pylori* 作用を有する 6 糖の合成に初めて成功した。また、当研究室ではすでに保護基に重水素標識した化合物を用い、NMR及びMALDI-TOF質量分析計を利用した、グリコシル化の微量迅速解析系を構築している。本系を利用した迅速最適化を行い、高マンノース型糖鎖の非還元末端の 3 連続の 1,2-*cis*- \square -グルコシド結合 (Glc_3Man_1) の高効率立体選択的構築を達成した。さらに、免疫活性化作用を有する 1,2-*cis*- \square -ガラクトシルセラミド類 (KRN7000、OCH) の簡便な収斂的合成にも成功している。

(2) クラスタ錯体を触媒とする反応開発 (千原 (化学分析チーム))

ハライドクラスタは、6 個の金属原子にハロゲンが配位した $[\text{M}_6\text{X}_8]$ または $[\text{M}_6\text{X}_{12}]$ (M=金属、X=ハロゲン) を構成単位とする化学的に安定な無機金属錯体である。これを 200 °C 以上に加熱処理すると触媒活性が出現し、400 °C 以上の高温に耐える触媒であることを我々は見出し既に報告してきた。この化合物とは別に、7 族元素レニウムは硫黄を配位子とする一連のクラスタ、例えば $\text{Eu}_2[\text{Re}_6\text{S}_8]\text{S}_{6/2}$ が知られている。これらの合成は 800-1450 °C の高温で行われることから、熱的に安定な物質であることが予想された。そこでこれらのクラスタを、気相中水素を流しながら加熱することにより、配位子の一部を硫化水素として除去し活性化することにより、高温安定な触媒の開発を行うと共に、その触媒活性に付いての特徴付けを行った。

水素気流下 $\text{Eu}_2[\text{Re}_6\text{S}_8]\text{S}_{6/2}$ を徐々に温度を上げながら加熱すると、250 °C で硫黄の一部が失われ、組成式が $\text{Eu}_{2.0}\text{Re}_{6.0}\text{S}_{10.3}$ となわり、架橋硫黄約一個分が抜けた物質に相当する物質が得られた。XRD やラマン分光、XPS により調べたが、原料との変化が見られなかった。従って、活性化により得られた物質は、元の結晶構造やクラスタ骨格をそのまま保持し、架橋配位子がひとつ分抜けた $\text{Eu}_2[\text{Re}_6\text{S}_8]\text{S}_{4/2}$ と考えられた。

これを触媒にして進行する反応の探索を行った。その結果、触媒活性は 250 °C 以上で出現し、シクロヘキサノールを原料にするとシクロヘキサンノンからシクロヘキセノンを経てフェノール生成する脱水素活性を有することが分かった。一方、フェニルアセチレンを原料にすると、スチレンが生成する水素化活性も有することが分かった。この反応の選択性は白金族金属のそれと同じで、白金族金属代替触媒になる可能性を明らかに出来た。また、触媒活性は 500 °C 以上でも維持され、これは上記元素分析や XRD、ラマン分光、XPS の結果からもクラスタの構造維持が確認され、高温安定型触媒であることも明らかとなった。

(3) エタノールを還元剤とする触媒的不斉共役還元反応の開発 (袖岡、濱島 (袖岡有機合成化学研究室))

これまでに我々の研究室では、カチオン性パラジウム-BINAP 錯体とエタノールからパラジウムヒドリド種が生成することを見出し、これを用いた不飽和カルボニル化合物の触媒的不斉共役還元反応を開発している。本年度は、より反応性の高い触媒の開発を目指し、パラジウム錯体の配位子の電子密度に注目した配位子の検討を行った。その結果、パラジウムトリアルキルホスフィン錯体が不飽和ケトンおよび不飽和エステルに対して高い活性を示すことが分かった。この触媒を用いる場合、モレキュラーシーブスを添加剤として加えることが必須であった。これは、触媒前駆体であるパラジウム- \square -ヒドロキソ錯体の生成が促進されたためと考えている。本反応は安全性の高いエタノールを還元剤および溶媒として用いることができ、環境調和性に優れている。更に、本触媒はアリルアルコールの異性化反応も促進することが分かった。現在、本異性化反応の最適化を検討中である。

*1 協力研究員

2. 環境分子の材料科学 (阿部、山下(化学分析チーム); 藤田(前田バイオ工学研究室); 久野(城生体金属科学研究室); 伊藤*(高田構造科学研究室))

本研究チームでは、再生可能な天然資源から作られるバイオベースポリマー(ポリエステル、多糖類、ポリアミノ酸など)と環境中の微生物の力により分解される生分解性ポリマーから、高性能・高機能な高分子材料を創出するための基礎研究を行っている。特に本研究チームでは、バイオポリエステルの高性能材料化技術や生分解性制御技術の開発を目指し、バイオベースポリマーの高次構造解析と機能予測、高分子加水分解酵素の構造解析と新規酵素の創製、新規バイオベースポリマーの開発を推進している。また大型放射光(SPring-8)を用い、高分子材料の成形過程におけるミリ秒かつナノオーダーでの固体構造変化などの動的構造解析や酵素タンパク質の精密構造解析など、新たな高分子科学研究分野の創出を目的としている。本年度は、4つの課題について精力的に研究を進めた。

(1) 生分解性ポリエステル材料の高強度化技術の開発

微生物により糖や植物油から合成されたバイオベースポリマーの一つであるポリ[(R)-3-ヒドロキシブチレート](P(3HB))およびその共重合体の高強度材料の開発を推進している。本年度は、高強度繊維の発現メカニズムを解明を目的に、繊維の空間不均一性を解析するための局所構造解析手法の開発を進めており、ミクロンサイズのX線ビーム生成技術の確立およびマイクロビーム広角・小角X線散乱同時測定装置を開発した。繊維1本のからの小角・広角散乱像の同時測定を行うことに成功した。

(2) 生分解性ポリエステルの分子鎖末端修飾による高機能化技術の開発

分子鎖末端に炭素数の異なるアルキル基を導入したポリ乳酸(PLA)を合成し、その構造と加水分解性についての評価を行った。特にポリエステル加水分解酵素を用いた分解試験において、炭素数12~14のアルキル基を導入したPLAにおいてのみ著しい分解速度の抑制が認められることを見出した。分解後のフィルム表面・断面の観察結果より、アルキル基の炭素数に依存して、三つの異なる分解様式にしたがって反応が進行することも明らかにした。アルキル基の炭素数とフィルム表面・内部における末端官能基の分散状態との相関を議論し、酵素分解反応におよぼす末端官能基の構造効果を明らかにした。さらには、アルブミンなどの生体タンパク質の吸着試験より、PLA表面へのタンパクの吸着量が末端官能基の導入によって定量的に制御できることも見出した。

(3) 分解酵素の吸着機構に関する研究

ポリエステル加水分解酵素による分解反応は、材料表面への吸着と加水分解の二段階で進行すると言われている。本年度は、ドメイン構造の異なる2種類の分解酵素を用いて、酵素の構造と分解様式の相関を調べた。基質吸着ドメインを持つ酵素と持たない酵素いずれにおいても、P(3HB)単結晶は分解され繊維状に形態変化するが、酵素の吸着様式には相違が認められ、基質吸着ドメインの存在によって、酵素分子が結晶表面に不可逆的に吸着できることを明らかにした。

(4) 周期共重合ポリエステルによる機能性発現技術の開発

ポリエステル加水分解酵素の基質認識において、連続する3つのモノマーユニットの構造を同時に認識することに着目し、連鎖構造を周期的に精密制御した共重合ポリエステルの合成に着手した。構成単位となるエステルユニットとして、3HBユニットとβ-リンゴ酸ユニットを選択した。共重合ポリエステルのビルディングブロックとしての利用を計画している、2種類のモノマーが規則的に連結した数種のオリゴエステルの調製に成功した。

*協力研究員

3. 環境分子の反応科学研究 (侯、坂本、鈴木(俊彰)、瀧本、西浦、島*¹、李*¹、張(文)*¹(侯有機金属化学研究室); 鈴木(俊法)、高口、西澤(鈴木化学反応研究室))

(1) 原子効率の高い環境調和型有機合成反応の開発

トリス(アルキル)希土類金属錯体 $[\text{Ln}(\text{CH}_2\text{SiMe}_3)_3(\text{thf})_2]$ ($\text{Ln}=\text{Y}, \text{Yb}, \text{and Lu}$)と1当量のアミノ(2,3,4,5-テトラメチルシクロペンタジエニル)ジメチルシラン $\text{Me}_2\text{Si}(\text{C}_5\text{Me}_4\text{H})\text{NHR}'$ ($\text{R}'=\text{Ph}, 2,4,6\text{-Me}_3\text{C}_6\text{H}_2, \text{tBu}$)の反応により、対応するハーフサンドイッチ型希土類金属アルキル錯体 $[\{\text{Me}_2\text{Si}(\text{C}_5\text{Me}_4)(\text{NR}')\}\text{Ln}(\text{CH}_2\text{SiMe}_3)(\text{thf})_n]$ ($1: \text{Ln}=\text{Y}, \text{R}'=\text{Ph}, n=2; 2: \text{Ln}=\text{Y}, \text{R}'=2,4,6\text{-Me}_3\text{C}_6\text{H}_2, n=1; 3: \text{Ln}=\text{Y}, \text{R}'=\text{tBu}, n=1; 4: \text{Ln}=\text{Yb}, \text{R}'=\text{Ph}, n=2; 5: \text{Ln}=\text{Lu}, \text{R}'=\text{Ph}, n=2$)が高収率で得られた。これらの錯体、中でも特にイットリウム錯体1-3は種々の一級および二級アミンのカルボジイミド $\text{R}''\text{N}=\text{C}=\text{NR}''$ への触媒的付加反応の非常に優れた触媒前駆体として働き、一連のグアニジン誘導体がほぼ定量的に得られた。芳香環上にシアノ基、アルキル基やハロゲンが置換している基質にも適用可能であった。この触媒系では、一級アミンと二級アミンの反応性に差があるため、1,2,3,4-tetra-hydro-5-aminoisoquinolineと $\text{tPrN}=\text{C}=\text{NtPr}$ の反応は段階的に進行し、まず一級のアミノ基が反応してモノ(グアニジン)が選択的に生成し、続いて環状二級アミノ基が反応してビス(グアニジン)が得られた。この反応は、不要な副生成物が全く生成しない原子効率100%の環境調和型反応である。

また、この反応の鍵中間体や真の触媒活性種と考えられるアミド錯体 $[\{\text{Me}_2\text{Si}(\text{C}_5\text{Me}_4)(\text{NPh})\}\text{Y}(\text{NR}^1\text{R}^2)(\text{thf})_2]$ ($\text{NR}^1\text{R}^2=\text{NEt}_2, \text{NHC}_6\text{H}_4\text{Br-4}$)およびグアニジネート錯体 $[\{\text{Me}_2\text{Si}(\text{C}_5\text{Me}_4)(\text{NPh})\}\text{Y}\{\text{PrNC}(\text{NR}^1\text{R}^2)(\text{NtPr})\}(\text{thf})]$ ($\text{NR}^1\text{R}^2=\text{NEt}_2, \text{NHC}_6\text{H}_4\text{Br-4}$)を単離し、X線結晶構造解析により構造を決定した。これらの錯体の反応性を調べた結果、グアニジンは、希土類金属アルキル錯体とアミンの反応により生成したアミド種がカルボジイミドに求核付加し、生成したグアニジネート種がアミンのプロトンリシスを受けることにより生成すると考えられる。

(2) 新しい重合触媒と新規ポリマー材料の開発

トリス(アミノベンジル)スカンジウム錯体 $[\text{Sc}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NMe}_2)_3]$ とシクロペンタジエン誘導体 $\text{Cp}'\text{H}$ ($\text{Cp}'=\text{C}_5\text{Me}_4\text{SiMe}_3, \text{C}_5\text{Me}_5, \text{C}_5\text{Me}_4\text{H}$)の反応により容易に得られるハーフサンドイッチ型スカンジウムビス(アミノベンジル)錯体 $[\text{Cp}'\text{Sc}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NMe}_2)_2]$ は、アミノ基が配位しているため、THFのようなルイス塩基がなくても、高いルイス酸性の中心金属が安定化されている。 $[(\text{C}_5\text{Me}_4\text{SiMe}_3)\text{Sc}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NMe}_2)_2]$ と $[\text{PhMe}_2\text{NH}][\text{B}(\text{C}_6\text{F}_5)_4]$ から得られるカチオン性錯体 $[(\text{C}_5\text{Me}_4\text{SiMe}_3)\text{Sc}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NMe}_2)_2(\square^2\text{F-C}_6\text{F}_5)\text{B}(\text{C}_6\text{F}_5)_3]$ の単離に成功し、X線結晶構造解析の結果、THFが配位しておらず、ポレート²の2つのフッ素原子が配位した構造を有していることが分かった。この錯体は、ルイス塩基が配位していないカチオン性ハーフサンドイッチ型スカンジウムヒドロカルビル錯体の最初の例である。

このカチオン性錯体は、アミノベンジル基がキレート配位しているが、エチレン、1-ヘキセン、スチレン、ノルボルネン、ジシクロペンタジエン(DCPD)の重合に触媒活性を示した。さらに、カチオン性錯体単独あるいは中性の

[Cp*Sc(CH₂C₆H₄NMe₂-o)₂]と[Ph₃C][B(C₆F₅)₄]を組み合わせた触媒系は、1-ヘキセンとノルボルネンやDCPDの共重合反応に高い活性を示し、従来の触媒系では合成することのできないランダム共重合体が得られた。1-ヘキセン-DCPD共重合体中の1-ヘキセン含有量は、モノマーの仕込み比を変えることにより、32-70 mol % の範囲で調整可能であり、また、共重合体のガラス転移温度は、1-ヘキセン含有量に対して、直線的な相関関係を示した。

(3) 新しい触媒の開発と重合反応への適用

モノ(シクロペンタジエニル)希土類金属錯体は、有機合成反応や重合反応において高い活性を示すことから注目を集めているが、シクロペンタジエニル環の1つの炭素をヘテロ原子に置換した場合に、そのヘテロ原子がオレフィン重合活性に及ぼす影響について報告された例はない。YCl₃またはSmI₃(THF)_{3.5}と1当量のカリウム2,5-ジ t -ブチル-3,4-ジメチルホスホリド[K(2,5- t Bu₂-3,4-Me₂PC₄)](以下[K(Dtp)])をTHF溶媒中で反応させ、続いて2当量の σ -ジメチルアミノベンジルカリウム[K(CH₂C₆H₄NMe₂-o)]を反応させると、溶媒の配位していないモノ(ホスホリル)希土類金属ビス(ベンジル)錯体[(Dtp)Ln(CH₂C₆H₄NMe₂-o)₂](Ln = Y, Sm)が得られた。同様の方法ではスカンジウム錯体は得られず、K(Dtp)とScCl₃の反応では溶媒のTHFが配位し、二核錯体[Sc(η -O(CH₂)₄(Dtp))Cl₂(THF)₂]₂が得られたが、溶媒をトルエン/ピリジン混合物に置き換えると[(Dtp)ScCl₂(pyridine)]が得られ、この錯体をトルエン中で[K(CH₂C₆H₄NMe₂-o)]と反応させるとスカンジウム錯体[(Dtp)Sc(CH₂C₆H₄NMe₂-o)₂]が得られた。このスカンジウム錯体は、Dtp-Hとスカンジウムトリス(ベンジル)錯体[Sc(CH₂C₆H₄NMe₂-o)₃]をトルエン中で反応させることによって得られた。これらのDtp配位錯体は、触媒活性のあるモノ(ホスホリル)希土類金属ビス(ヒドロカルビル)錯体の最初の例である。これらの錯体を1当量の[Ph₃C][B(C₆F₅)₄]と組み合わせてスチレン重合に用いると、サマリウム錯体は活性を示さなかったが、スカンジウムおよびイットリウム錯体は高活性を示し、シジオタクチックポリスチレンが得られた。

*1協力研究員

4. 環境分子の光科学研究(和田,大沢,池田,青山,佐々,川本,伊藤*1,武藤*2,渡邊*3,福地*3,志賀*3(和田超分子科学研究室);田原(田原分子分光研究室);渡邊(ビームアプリケーションチーム))

(1) 光電変換素子の構造化

高効率なエネルギー変換システムを構築するためには、高いキャリア発生効率やキャリア輸送能が要求されるが、それらの特性は分子単体の化学構造だけではなく、分子のパッキングや配列構造に強く影響を受ける。我々は、螺旋構造の持つ秩序性や配向性、またその機能性に注目して研究を行っている。一分子にアゾベンゼンと軸性キラル分子であるピナフルを環状に結合した光学活性化合物を合成し、その光応答性を検討した。その結果、環状化合物は光異性化反応によってピナフルの二面角が可逆的に変化した。さらにその化合物を液晶分子へ1 wt%ドープすると、ピナフルのもつキラリティーに由来するキラルネマチック相(液晶らせん構造)を発現した。このサンプルへ光を照射したところ、アゾベンゼンの光異性化反応に伴い、液晶らせん長はおよそ40%可逆的に変化した。ここでは、1つのアゾベンゼン分子の光スイッチにより、1000の液晶分子を制御できることを示した。

さらに我々は、材料開発に加えて、有機材料の特徴である配向性、可撓性、会合性などを利用した素子の構造化による研究も行っている。有機太陽電池として注目されているバルクヘテロ接合型太陽電池は相分離したドナー/アクセプター(D/A)で形成されており、非常に実効界面面積が広いという利点がある。しかし、均一な分散膜であるためにキャリアパスが制御されおらず、キャリアがトラップされやすいという欠点がある。そこで我々はバルクヘテロ型素子のD/A空間分布を制御して、キャリアパスを整備することを目指した。光重合性のカルバゾール誘導体(VCz(CHO))とフラーレン誘導体(PCBM)を利用した光電変換素子に、干渉露光による局所的な光重合を利用した“構造化”を行ったところ、光電変換特性が向上した。そこで、走査型ケルビンプローブフォース顕微鏡(KPFM)を用いて構造化型バルクヘテロ太陽電池の表面構造と表面電位イメージを測定し、光電変換特性向上の要因として考えられるD/A空間分布を検討した。ITO基板上にVCz(CHO):PCBM(80:20 wt%)フィルムをスピコート法により作製し、フィルム上で波長532 nmのレーザー光を交差させて干渉露光を行い、フィルムに格子を形成させて構造化を施した。原子間力顕微鏡(AFM)の測定で、深さ160 nm,周期2.9 μ mの表面レリーフグレーティングの形成を確認した。KPFM観察から格子の凸部が凹部に比べて表面電位が高いことが分かった。すなわち、試料の仕事関数が凸部と凹部で異なっており、D/Aの相対密度が空間的に分布していることが確認できた。以上のように、D/Aの空間分布を制御し、その分布のイメージングに成功した。このD/A分布はキャリアパスが整備されたことを示唆しており、光電流増大効果の一因として考えられる。

*1基礎科学特別研究員、*2協力研究員、*3研修生

5. 環境分子の情報科学研究

研究担当者:前田、細川、平石、宝田、座古、大城*1、小笠原*1、小川*1、佐々木*1、佐藤*1、鈴木*1、金山*2、(前田バイオ工学研究室);伊藤(伊藤ナノ医工学研究室)

環境ホルモンやダイオキシンなどの問題を始めとする環境分子の、生態圏への重篤な影響が明らかとなりつつある。これからの環境計測は、毒性が明らかになった分子を単に高感度に検知・監視するだけでなく、生態系に対する潜在的な危険を未然に察知し警告することも可能な、環境分子の情報科学とも言うべき領域に進化・発展する必要がある。本研究では、化学種から生物種にいたる様々な環境影響物質を、オンサイト・リアルタイムで高感度かつ迅速に検知・計測・評価し、環境情報を的確に出力することのできるマイクロ分析システムの開発を行っている。

(1) 植物病原菌の薬剤耐性が、ある特定の遺伝子の一塩基変異によって獲得されることが報告されている。この一塩基変異を簡単に定量検出することを目指して、ポリエチレングリコール(PEG)とDNAのブロック共重合体を移動度シフト試薬に用いたフィニチーキャピラリー電気泳動を開発している。本年度は、サンプルDNAの電気泳動移動度と、PEG- b -DNAとサンプルDNAの結合定数の相関関係を明らかにした。これにより、任意の配列のサンプルDNAについて、移動度シフト試薬を適切に分子設計することが可能になった。

(2) 免疫学的測定法は、抗体の特異的結合を利用した化学分析法であり、環境計測などに広く応用されている。本研究では、独

自の自律駆動マイクロチップを用いることにより、簡便で迅速な免疫学的測定法を実現した。本年度はマイクロチップに複数の抗体を固定化することにより、検体に含まれる複数の抗原を同時に検出する実験を行った。具体的にはC反応性タンパク質（CRP）と血管内皮細胞増殖因子（VEGF）の抗体を同じガラス基板上にパターンニングした後、双方のパターンと交差するようにマイクロ流路を作成した。CRPとVEGFを様々な比率で含む検体をこのマイクロチップで測定したところ、最大10%程度の相互干渉が見られたものの、原理的には同時測定が可能であることが示された。

(3) バイオセンサ用基板の開発において、種々の基板表面に高分子材料薄膜を作製し、機能性膜と分子の相互作用を計ることが行われている。ポリアスパラギン酸は、側鎖に官能基であるカルボキシル基を有している上、天然に存在するアスパラギン酸を構成成分とする生体適合性に優れた機能性高分子材料である。本研究では、酵素の基質特異性を利用したポリアスパラギン酸の構造制御系の構築を目指している。本年度は、酵素の基質認識機構を調べるとともに、その基質認識を利用した非天然ポリアミノ酸合成を行った。本酵素によるポリアスパラギン酸分解産物を解析した結果、本酵素はポリアスパラギン酸中に含まれる非天然型構造である□-□ペプチド結合を特異的に認識し、オリゴマーを生成することを明らかにした。次いで、本酵素による酵素触媒重合を行ったところ、□-□ユニットのみからなる非天然型ポリアスパラギン酸の合成に成功した。

*1 基礎科学特別研究員、*2 協力研究員

6. 環境分子の分解科学研究（大熊、飯田、堀之内、本山、工藤、本郷*1、野田*1、小田切*1、林*2（環境分子生物学研究室）

バイオマスなどの環境資源分子やダイオキシン類のような環境ホルモン様物質を、自然界の微生物の持つ多様な機能や環境適応能力、共生機構を解明して活用し、これら環境分子の分解と変換・再資源化技術の開発をめざして研究を推進している。

(1) バイオマス資源の効率的な利用をめざし、シロアリ腸内の共生系を題材に高効率の分解・共生機構の解明を目的としている。セルロース分解に重要な腸内原生物群については、網羅的な発現遺伝子解析を進めている。数種のグループに大別されるセルロース分解関連酵素遺伝子群の他、クリーンなエネルギーとして期待される水素の生成酵素（鉄型ヒドロゲナーゼ）を同定した。異種発現によって酵素を解析した結果、水素取込よりも水素生成により高い反応性を有する応用上も期待される酵素であることを明らかにした。また、原生物が生産する水素は、その原生物の細胞内共生細菌が利用することを明らかにし、水素を積極的に利用することにより分解を促進する共生関係と考えられた。この細胞内共生細菌は宿主のシロアリならびに原生物と階層をもった3者間共生関係において互いに共種分化をしてきたものであることを見出した。

(2) ジベンゾフラン（DF）資化性放線菌のDF代謝酵素遺伝子群の発現制御に関する解析を行った。DF資化性放線菌 *Rhodococcus* sp. YK2株において、DF分解の第一階を触媒する酵素の遺伝子、*dfdA1*~*A4*は、DF存在下転写が誘導される。本研究ではその転写制御メカニズムの解明を目指した。ノーザン解析により、YK2株の*dfdA1*の転写活性化が、DFの代謝中間産物である2,2',3-trihydroxybiphenylやサリチル酸では起こらず、DFによってのみ誘起されることを示し、この転写活性化が疎水性の芳香族化合物であるDFを誘導基質とすることが示された。YK2株の*dfd*遺伝子クラスター内に、DNA結合ドメインを擁するものの、配列相同性からその機能推定が困難な遺伝子、*dfdR*を見出した。ドメイン構造解析により、DfdR推定アミノ酸配列中にGAFドメイン様構造の存在が示唆された。この遺伝子を破壊したYK2株は、DF資化性及び*dfdA*転写誘導能が消失したが、*dfdR*遺伝子の相補により両形質は復帰した。*dfdA1*プロモーター領域とレポーター遺伝子*luxAB*の融合組換え体に*dfdR*遺伝子を組み込み、*R. erythropolis* JCM 2892株に導入したところ、DF依存性の*dfdA1*プロモーターの活性化が確認されたことから、新規DNA結合タンパク質DfdRが、疎水性芳香族化合物であるDF依存性に*dfdA*遺伝子群の転写を活性化する転写因子であることが示された。

(3) 古くからステロイド分解菌として知られてきた *Comamonas testosteroni* TA441株のステロイド分解経路の解析を行い、細菌はステロイド分解においてA環を芳香環化して芳香族化合物分解と類似の経路で分解する事、およびそのA,B環開裂に関わる遺伝子をほぼ明らかにしてきたが、本年度は、これまで不明であったC,D環の分解経路の解析を行った。C,D環は主に酸化により分解が進んでD環、C環の順に開裂し、関与する遺伝子のほとんどはクラスターを構成することが明らかとなった。相同性検索ではステロイド分解遺伝子と推測される遺伝子が多く細菌に見いだされる一方、菌の属によりその構成が異なっていた事から、この遺伝子が細菌の進化上、古い時期に獲得された、細菌にとって重要な意味を持つ遺伝子である可能性が予想された。

(4) 植物根圏糸状菌の根圏環境適応メカニズムの解明と、ダイオキシン類等のファイトレメディエーションへの応用を目指している。植物根圏生態系中では植物根圏バクテリアが抗菌物質を生産して近隣の植物根圏糸状菌をコントロールしている。このような抗菌物質の主要なターゲットである二成分情報伝達系の解析を行った。二成分情報伝達系のグループIIIヒスチジンキナーゼ（HK III）を発現する酵母は抗菌物質に感受性になる。この系を用いることにより、土壌バクテリア *Sorangium cellulosum* 由来のポリケチド化合物 ambruticin がHK IIIを標的とすることを明らかにした。ambruticinは、特異的作用を示す医薬や農薬として利用できる可能性がある。更に、二成分情報伝達系のレスポンスレギュレーター遺伝子のノックアウト株では宿主植物への寄生能の低下が認められたことから、この情報伝達系が植物との相互作用に関与することが明らかになった。

*1 協力研究員、*2 業務嘱託

1. Synthetic Science for Ecomolecules

(1) Development of methodologies for rapid synthesis and application of novel environment for the synthesis of biologically active molecules.

1) In order to analyze functional roles of glycan chains systematically, facile access to various oligosaccharides and glycoconjugates is important. To achieve this, our investigations are directed to the development of polymer-support oligosaccharide synthesis. We have developed novel methods for the real-time monitoring of both solution-phase oligosaccharide synthesis employing chemoselective color test. This method should be highly reliable for the critical monitoring of chain elongation and selective deprotection, because it allows for the simultaneous detection of both consumption of starting material (glycosyl acceptor) and product (glycoside). As an extension of these achievements, we developed methodology that enables to fish-up the correctly assembled oligosaccharides by one-step capture-release. Also we developed the effective strategy for the synthesis of oligosaccharide by using trifluoroacetyl (TFA) and the pentafluoropropionyl (PFP) esters, and *t*-butyldimethylsilyl ether as protecting group for alcohols.

Using their techniques, we achieved the synthesis of oligosaccharide fragment and its fluorine-substituted derivatives of high mannose-type *N*-glycan related to glycoprotein quality control. They were immobilized on Au-coated chips through thiol-containing linker. Affinity of their glycans to calreticulin in ER was evaluated by quartz-crystal microbalance and the structure-activity relationship suggested that some hydroxyl groups are very important for the substrate recognition of calreticulin.

2) Synthetic study on novel *N*-glycan in asparagine (Asn)-linked glycoproteins from Gram-negative bacterium, *Campylobacter jejuni* was carried out. It has been revealed that certain prokaryotes, such as *C. jejuni*, however, the structures of their glycans are distinct from those of eukaryotic origin. They consist of a 4,6-diacetamido-2,4,6-trideoxy-D-glucose (bacillosamine, Bac) residue linked to Asn, α -1,4-GalNAc repeat, and branching α -Glc residue, namely GalNAc- α (1,4)-GalNAc- α (1,4)-[Glc- α (1,3)-]GalNAc- α (1,4)-GalNAc- α (1,4)-GalNAc- α (1,3)-Bac. We developed PFP strategy for the stereoelectronically controlled synthesis of α (1,4)-GalNAc repeating motifs using 4-*O*-pentafluoropropionyl (PFP) protected donors with high stereoselectivity. Starting from concisely synthesized Bac derivative, the chemical synthesis of the novel *N*-glycan, a heptasaccharide (GlcGalNAc₅Bac) was first accomplished stereoselectively.

3) We developed an effective direct strategy for the syntheses of 1,2-*cis*-glycoside. We found that *N*-benzyl-2,3-*trans*-oxazolidinone-fused glycosyl donor exhibits high α -selectivity to give the 1,2-*cis*- α -glucosamine derivatives. It was applied to the first synthesis of anti-*Helicobacter pylori* hexasaccharide.

We have reported a high through-put screening of *O*-glycosylation using deuterium-labeled Bn ether-protected substrates by ¹H NMR and MALDI-TOF MS. We achieved the highly efficient and stereoselective synthesis of a three continuous 1,2-*cis*- α -linkages (Glc₃Man₁) in non-reducing end of high mannose-type *N*-glycan.

On the other hand, we achieved concise syntheses of immunostimulating 1,2-*cis*- α -galactosyl ceramides (KRN7000 and OCH) by convergent approach.

(2) Utilization of cluster complexes in catalysis

Halide clusters, which contain [M₆X₈] or [M₆X₁₂] (M = metal, X = halogen) unit, are stable complexes and had no catalytic activity. However, we have reported that treatment above 200 °C leads to catalytic activity. These catalysts are stable up to 400 °C. On the other hand, a series of rhenium sulfide clusters e.g. Eu₂[Re₆S₈]S_{6/2} has been reported. These clusters are synthesized by heating at as high as 800-1450 °C, and hence they were assumed to be thermally stable compounds. Application of these complexes to catalysis was made. When these clusters were treated in a stream of hydrogen above 250 °C, catalytic activities of dehydrogenation of cyclohexanol to phenol by way of cyclohexanone and cyclohexenone was observed. Phenylacetylene was hydrogenated to styrene. This behavior is the same as that of the platinum group metals.

(3) Development of the catalytic asymmetric conjugate reduction with EtOH as a hydride source.

Last year, we reported a novel catalytic asymmetric conjugate reduction of enones using a Pd-H species as the key intermediate based on the observation that Pd(II)-BINAP complex can transfer a hydrogen atom from ethanol. The main drawback of this reaction is the narrow scope of the substrate, and α,β -unsaturated esters were not available. To address this issue, we examined various phosphine ligands, focusing on the electron density of the phosphorous atom. A Pd(II) complex having an electron-rich trialkylphosphine displayed higher reactivity, and the reaction of unsaturated esters proceeded smoothly. In these reactions, the addition of molecular sieves facilitated the reaction, which might be important for the in situ generation of the Pd- α -OH complex. Importantly, since safe and clean EtOH can be used as a solvent and a hydride source, this reaction is environmentally advantageous. We also found that this new Pd complex was able to promote asymmetric isomerization of allylic alcohols. Further investigation on this isomerization reaction is under way.

2. Materials Science for Ecomolecules

There is a growing demand for bio-based and biodegradable polymers as a solution to problems concerning the global environment and solid waste management. Research on bio-based and biodegradable polymers has been carried out worldwide with the aim of achieving harmony between human activities and natural environments. The R&D of processing technologies for high-functional materials, the control of biodegradation, the surface and crystal structure analyses of polymers, and the structure and functional analyses of biosynthetic and biodegrading enzymes are steadily progressing. This team aims to establish a new field in polymer science research by using synchrotron radiation for elucidating dynamic structural changes and to produce nano-controlled bio-based and biodegradable materials.

(1) We have developed biodegradable poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate] (P(3HB)) and its copolymer fibers and films with high strength. In order to clarify nondestructively a micro-texture of the high-strength fibers, we have developed the micro-texture analysis method for spatial nonuniformity of polymer materials in this year. The production of micron-size X-ray beam and the simultaneous microbeam SAXS/WAXD measurement apparatus have been established. A SAXS and WAXD images from a single polymer fiber were collected successfully by using the developed measurement apparatus.

(2) Poly(L-lactide) (PLA) with various alkyl ester chain-end groups were synthesized, and the structural effect of chain-end groups on the rate of enzymatic degradation were investigated. The degradation rates of PLA samples with alkyl ester chain-end with carbon numbers of 12–14 were much slower than those of the other samples. It was found that the difference in degradation manner among the PLA samples with different alkyl ester chain-ends be related to the dispersing state of alkyl ester chain-ends in PLA phase.

(3) Enzymatic degradation of P(3HB) and its copolymers by P(3HB) depolymerase is a two-step reaction that the adsorption of enzyme and the hydrolysis of polymer. The enzymatic degradation processes of P(3HB) by two types of P(3HB) depolymerases with different domain structure were investigated. It was found that the adsorption process of enzyme on the polyester crystals was differed between two enzymes due to the function and role of the domains of enzyme.

(4) The active site of catalytic domain in P(3HB) depolymerase recognizes at least three monomeric units as substrate. We have tried to synthesize the aliphatic copolyesters with different sequential structure composed of 3HB and β -malic acid units. Several oligoesters of two monomeric units were obtained by condensation reaction, and these compounds will be used as a building block of periodic copolyesters.

3. Catalytic Science for Ecomolecules

(1) Atom-economic organic synthesis reaction catalyzed by organometallic complexes

Reaction of $[\text{Ln}(\text{CH}_2\text{SiMe}_3)_3(\text{thf})_2]$ ($\text{Ln}=\text{Y}, \text{Yb}, \text{and Lu}$) with one equivalent of $\text{Me}_2\text{Si}(\text{C}_5\text{Me}_4\text{H})\text{NHR}'$ ($\text{R}' = \text{Ph}, 2,4,6\text{-Me}_3\text{C}_6\text{H}_2, \text{tBu}$) affords straightforwardly the corresponding half-sandwich rare-earth metal alkyl complexes $\{[\text{Me}_2\text{Si}(\text{C}_5\text{Me}_4)(\text{NR}')] \text{Ln}(\text{CH}_2\text{SiMe}_3)(\text{thf})_n\}$ (**1**: $\text{Ln} = \text{Y}, \text{R}' = \text{Ph}, n = 2$; **2**: $\text{Ln} = \text{Y}, \text{R}' = \text{C}_6\text{H}_2\text{Me}_3\text{-}2,4,6, n = 1$; **3**: $\text{Ln} = \text{Y}, \text{R}' = \text{tBu}, n = 1$; **4**: $\text{Ln} = \text{Yb}, \text{R}' = \text{Ph}, n = 2$; **5**: $\text{Ln} = \text{Lu}, \text{R}' = \text{Ph}, n = 2$) in high yields. These complexes, especially the yttrium complexes **1-3**, serve as excellent catalyst precursors for the catalytic addition of various primary and secondary amines to carbodiimides, efficiently yielding a series of guanidine derivatives with a wide range of substituents on the nitrogen atoms. Functional groups such as $\text{C}\equiv\text{N}$, $\text{C}\equiv\text{CH}$, and aromatic C-X ($\text{X}: \text{F}, \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$) bonds can survive the catalytic reaction conditions. A primary amino group can be distinguished from a secondary one by the catalyst system, and therefore, the reaction of 1,2,3,4-tetrahydro-5-aminoisoquinoline with $i\text{PrN}=\text{C}=\text{N}i\text{Pr}$ can be achieved stepwise first at the primary amino group to selectively give the monoguanidine, and then at the cyclic secondary amino unit to give the biguanidine. Some key reaction intermediates or true catalyst species, such as the amido complexes $\{[\text{Me}_2\text{Si}(\text{C}_5\text{Me}_4)(\text{NPh})\text{Y}(\text{NR}^1\text{R}^2)(\text{thf})_2\}$ ($\text{NR}^1\text{R}^2 = \text{NEt}_2, \text{NHC}_6\text{H}_4\text{Br-}4$) and the guanidinate complexes $\{[\text{Me}_2\text{Si}(\text{C}_5\text{Me}_4)(\text{NPh})\text{Y}\{i\text{PrNC}(\text{NR}^1\text{R}^2)(\text{N}i\text{Pr})\}(\text{thf})\}$ ($\text{NR}^1\text{R}^2 = \text{NEt}_2, \text{NHC}_6\text{H}_4\text{Br-}4$) have been isolated and structurally characterized. Reactivity studies on these complexes suggest that the present catalytic formation of a guanidine compound proceeds mechanistically through nucleophilic addition of an amido species, formed by acid-base reaction between a rare-earth metal alkyl bond and an amine N–H bond, to a carbodiimide, followed by amine protonolysis of the resultant guanidinate species.

(2) Development of new polymerization catalysts and new polymer materials

The scandium complexes bearing mono(cyclopentadienyl) ligands, $[\text{Cp}'\text{Sc}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NMe}_2\text{-}o)_2]$ ($\text{Cp}' = \text{C}_5\text{Me}_4\text{SiMe}_3, \text{C}_5\text{Me}_5, \text{C}_5\text{Me}_4\text{H}$), can be easily prepared by reaction of the tris(aminobenzyl) scandium complexes, $[\text{Sc}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NMe}_2\text{-}o)_3]$, with the corresponding cyclopentadiene ligands. Because of the intramolecular coordination of the amino group, external Lewis bases (such as THF) are not required for the stabilization of the highly Lewis-acidic metal center. This has enabled the isolation and structural characterization of the THF-free cationic aminobenzyl–scandium complex $[(\text{C}_5\text{Me}_4\text{SiMe}_3)\text{Sc}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NMe}_2\text{-}o)(\square^2\text{F}^2\text{C}_6\text{F}_5)\text{B}(\text{C}_6\text{F}_5)_3]$, the first example of an external-Lewis-base-free cationic half-sandwich rare earth metal hydrocarbyl complex. More remarkably, the aminobenzyl group in the cationic complex, even though in a chelating form, is active enough to initiate the polymerization of a variety of olefins such as ethylene, 1-hexene, styrene, norbornene and dicyclopentadiene (DCPD). Because of the absence of an external Lewis base and the sufficient activity of the benzyl unit, the cationic complex or $[\text{Cp}'\text{Sc}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NMe}_2\text{-}o)_2]/[\text{Ph}_3\text{C}][\text{B}(\text{C}_6\text{F}_5)_4]$ showed unprecedented catalytic activity for the copolymerization of 1-hexene with DCPD to afford the copolymer materials with a wide range of 1-hexene contents (32–70 mol %) unavailable previously.

(3) Development of new catalysts and application to polymerization

Monocyclopentadienyl rare earth metal complexes have recently attracted growing interest due to their high potential in organic transformations and polymerization catalysis, however, no study has been reported on the influence of heteroatom-containing cyclopentadienyl ligands on the olefin polymerization activity of half-sandwich rare earth metal complexes. Reaction of YCl_3 or $\text{SmI}_3(\text{THF})_{3.5}$ with 1 equiv of 2,5-di-*tert*-butyl-3,4-dimethylphospholide potassium $[\text{K}(\text{Dtp})]$ in THF followed by reaction with 2 equiv of *o*-dimethylaminobenzylpotassium $[\text{K}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NMe}_2\text{-}o)]$ afforded the solvent-free mono(phospholy) rare earth metal bis(benzyl) complexes $[(\text{Dtp})\text{Ln}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NMe}_2\text{-}o)_2]$ ($\text{Ln} = \text{Y}, \text{Sm}$). The Sc analogue could not be obtained under these conditions, as the reaction between $\text{K}(\text{Dtp})$ and ScCl_3 in THF led to the THF-ring-opened product $\{[\text{Sc}\{\square\text{-O}(\text{CH}_2)_4(\text{Dtp})\}\text{Cl}_2(\text{THF})_2\}_2$. Replacing THF by a mixture of toluene/pyridine gave $[(\text{Dtp})\text{ScCl}_2(\text{pyridine})]$, which on further reaction with $[\text{K}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NMe}_2\text{-}o)]$ in toluene afforded $[(\text{Dtp})\text{Sc}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NMe}_2\text{-}o)_2]$, which could also be obtained from the reaction between the protonated Dtp-H and $[\text{Sc}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NMe}_2\text{-}o)_3]$ in toluene. These Dtp-ligated complexes constitute the first examples of catalytically active mono(phospholy)-ligated rare earth metal bis(hydrocarbyl) complexes. The Sc and Y complexes showed high activity for the syndiospecific polymerization of styrene when treated with 1 equiv of $[\text{Ph}_3\text{C}][\text{B}(\text{C}_6\text{F}_5)_4]$, although Sm complex did not show any activity.

4. Photoscience for Ecomolecules

(1) Structured photovoltaic devices

Toward the development of efficient light-energy-conversion systems, the control of the molecular packing and their structure is important to obtain high carrier generation efficiency and carrier mobility. We focus on the helical structure showing ordered structures and unique chiral functionalities. The new chiral cyclic compounds containing an azobenzene

moiety as a photoresponsive part and a binaphthyl moiety as a chiral part were synthesized. It was clear that the chiral cyclic compound shows reversible change in a dihedral angle of the binaphthyl moiety by means of photoisomerization of the azobenzene moiety. The cyclic compound was added to a nematic liquid-crystalline host at a concentration of 1 wt% to induce a chiral nematic phase with a helical structure. The helical pitch length of 40 μm was reduced by a change in the twisting motion of the cyclic compound with the aid of *trans-cis* photoisomerization. We found that the cyclic compound possesses an ability of a chiral dopant, especially, liquid-crystalline alignment behavior based on the reorientation and photomanipulation processes upon UV irradiation is an interesting phenomenon.

We are trying to develop the structured photovoltaic devices with aggregated, aligned, or organized organic materials, which take the advantage of softness and flexibility in organic materials, in addition to the development of new organic compounds. In this research, we discuss a new type of bulk heterojunction photovoltaic device with grating structures induced by periodic photopolymerization. The spin-coated film of photopolymerizable 3-formyl-9-vinylcarbazole (VCz(CHO)) doped with phenyl C₆₁-butyric acid methyl ester (PCBM) was periodically polymerized by an interference pattern of two laser beams. We observed the larger photocurrent when the grating area was illuminated. This result indicates that the photocurrent was enhanced by the formation of the grating. The formation of a surface grating was confirmed by atomic force microscopy (AFM) observation. The regular relief structure could be acquired with a grating spacing of 2.9 μm and a depth of about 160 nm. Kelvin probe force microscopy (KPFM) imaging also showed that the surface potential of top regions on the grating structure is larger than that of bottom regions. The spatial distribution of the surface potential means that the local work function was distributed in the structured film. We could successfully obtain the spatial distribution images of the electron donor and acceptor (D/A). The spatial D/A distribution of D/A in the organic photovoltaic device was achieved by combination of periodic photopolymerization and the liquid carbazole.

5. Bioinformation Science for Ecomolecules

In this research project, we are developing novel analytical microsystems, which enable us to rapidly and sensitively detect ecomolecules including both chemical and biological species, and to acquire accurate bioinformation on the environment. The analytical methods are based on our original technologies such as colloidal nanoparticles and power-free microfluidic devices, and take advantage of deoxyribonucleic acids, proteins and cells as recognition devices.

(1) Towards a facile quantitative detection of fungicide-resistant pathogens, we have been developing an affinity capillary electrophoresis using a DNA-polyethylene glycol block copolymer (DNA-*b*-PEG) as a mobility shift reagent. In this fiscal year, we clarified the relationship between the electrophoretic mobility of target ssDNA, and the association constant of the complex via hybridization of target ssDNA and PEG-*b*-DNA, whereby an appropriate base number of DNA-*b*-PEG can be predetermined to sufficiently retard the migration of target ssDNA with a given sequence

(2) We have been developing immunoassay methods on our original microchip which does not need pumps or tubes. We have achieved simultaneous detection of multiple antigens by immobilizing the corresponding antibodies onto the microchip. Specifically, we immobilized the antibodies of C-reactive protein (CRP) and vascular endothelial growth factor (VEGF), and measured the contents of CRP and VEGF in mixed samples. We were able to measure them with slight (< 10%) interference.

(3) Polymer thin film is prepared as a functional membrane on the substrate surface of biosensor to measure the interaction between the membrane and molecules. Poly(aspartic acid) (PAA), which has functional carboxyl groups, shows the high biocompatibility and biodegradability. We are studying the enzymatic synthesis of PAA with well-controlled structure. In this study, we investigated the substrate recognition by PAA hydrolase-1 of *Pedobacter* sp. KP-2 and synthesized an unnatural polypeptide by taking advantage of its substrate recognition. We purified approximately 120 mg of the enzyme with high purity from the recombinant *E. coli* cells grown in 1 L culture medium. Analyses of the degradation products of thermally synthesized PAA (tPAA) by the enzyme revealed that this enzyme cleaves α -amide linkage in tPAA with endo-mode and degrades tPAA to oligo(aspartic acid). For the production of a novel functional polypeptide, we carried out enzyme-catalyzed polymerization using the hydrolase. MALDI-TOF-MS and NMR analyses of the products revealed that unnatural poly(α -aspartate) with polymerization degree of 15 was successfully synthesized.

6. Biorecycling Science for Ecomolecules

We are studying the mechanisms of degradation of ecomolecules such as recalcitrant lignocellulose and environmental pollutants by microorganisms and the roles of symbioses for efficient utilization and recycling of these ecomolecules.

(1) In order to understand highly efficient systems of lignocellulose utilization, we are studying structure and function of symbiotic microbial community in termite guts. Genes encoding Fe-hydrogenase were identified in gut protists by preliminary analysis of their expressed sequence tags, and the recombinant enzymes preferentially catalyzed hydrogen evolution. The endosymbiotic bacteria of a gut protist showed strong hydrogen uptake activity, suggesting that the symbiotic relationship enhances cellulose degradation via inter-species hydrogen transfer. We also showed the evidence for speciations of the triplex symbiotic partners: gut protist, their endosymbionts, and their host termites.

(2) We are investigating microbial degradation of dioxins for bioremediation. Dibenzofuran (DF) is one of the carbon-skeletal compounds of dioxins used as a model to study microbial degradation of dioxins. This study analyzes the transcriptional regulation of the DF dioxygenase genes *dfdA1-A4* in the DF-utilizing actinomycetes *Rhodococcus* sp. YK2. A gene encoding DNA binding protein that designated *dfdR* was found in the *dfd* gene cluster. The central part of the DfdR amino acid sequence indicates significant homology to GAF-domain sequences by domain search analysis. A *dfdR*-disrupted derivative of YK2 lost the abilities of DF utilization and DF-dependent *dfdA1* transcriptional induction, and these dysfunctions were compensated by the introduction of *dfdR*. Promoter analysis of *dfdA1* in *R. erythropolis* JCM 2892 indicated that the *dfdA1* promoter (P_{dfdA1}) activation was dependent on *dfdR* and DF, and not a metabolite of the DF pathway. These results indicated that the *dfdR* gene product is involved in the DF-dependent transcriptional activation of

the *dfdA* genes in *Rhodococcus* sp. YK2.

(3) *Comamonas testosteroni* TA441 is known for the ability of utilizing certain steroids. We identified the degradation pathway and most the genes involved in the degradation. TA441 degrades steroids via aromatization of A-ring followed by degradation similar to bacterial aromatic compound degradation. Remaining BCD-ring, 9,17-dioxo-1,2,3,4,10,19-hexanorandrostan-5-oic acid, is degraded through a pathway similar to the beta-oxidation pathway of fatty acid degradation after addition of CoA. A lot of possible steroid degradation genes, which are similar but not identical to those of TA441, are found in the data base, indicating that steroid degradation has somewhat important role in certain bacteria.

(4) In bioremediation by plants, rhizosphere-colonizing microorganisms have an important role. Ambruticin is a bacterial polyketide compound that can control rhizosphere fungi. We found that ambruticin targets the group III histidine kinase in the two-component signal transduction system (TCS) of rhizosphere fungi. Knockout mutants of response regulator genes in the TCS were reduced in parasitic ability, suggesting that the TCS is involved in interaction between a host plant and a rhizosphere fungus.