

セルロース系バイオマスを原料とした基幹化学品(カテコール)発酵の効率化

園木 和典

弘前大学 農学生命科学部

研究の目的

本研究では農薬、医薬品、抗酸化剤、重合防止剤などの合成原料として幅広く利用できる基幹化学品であるカテコール (CL) 発酵の効率化について取り組んだ。カテコール発酵は、シキミ酸合成経路の代謝中間体である 3-dehydroshikimate (DHS) から脱水反応-脱炭酸反応へと分岐させることで可能であることが 90 年代から提案されてきた (図 1)¹⁾。しかし PCA 脱炭酸酵素 (AroY) 反応がボトルネックであり、その解決法はこれまでに見出されていない。本研究ではこのボトルネックを解消する方法を見出し、CL 発酵の効率を向上させることを目的とした。

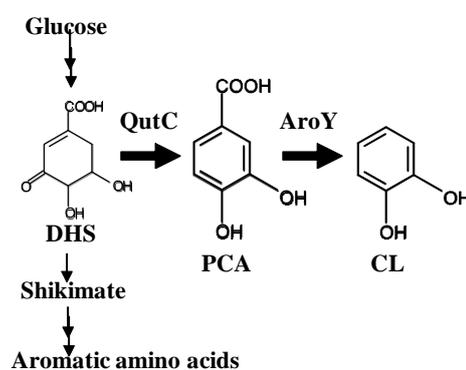


図 1 シキミ酸経路を経由した CL 発酵経路

方法

Pdc 反応活性化因子の同定と高活性化 Pdc の酵素活性評価

AroY と、4-hydroxybenzoate decarboxylase (KpdBCD) のデリーションクローンを共発現する *Escherichia coli* XL-1Blue 株の組換え体を調製し、休止菌体反応により PCA 脱炭酸能力を評価した。また、AroY と KpdB を共発現させた組換え大腸菌細胞は、酸化アルミニウムと氷冷した乳鉢を用いて破砕し、100 mM リン酸バッファー (pH7.5) に懸濁することで酵素を抽出した。遠心分離後(12,000g, 5 min) の上清を粗酵素液として、酵素活性を評価した。

高活性化 Pdc を発現する CL 生産株の作製と CL 発酵試験

aroF^{FBR}, *qutC* をクローニングした pTS066 (pUC118 由来) を用いて、*pheA* を欠失させた *E. coli* JD23488 株 (KP7600 株由来) を形質転換した。*aroY* をクローニングした pTS036 (pMCL200 由来) または、*aroY* と *kpdB* をクローニングした pTS052 (pMCL200 由来) を用いて、JD23488/pTS066 株を形質転換した。得られた形質転換体、JD23488/pTS066+pTS036 株および JD23488/pTS066+pTS052 株を、それぞれ単一炭素源としてグルコースを添加した M9 液体培地 (1 mM IPTG, 10 μ M Phe を含む) を用いて培養し、CL 発酵に対する高活性化 Pdc の効果を評価した。

結果

Pdc 反応活性化因子の同定

Pdc と同様に、芳香族化合物の脱炭酸酵素である vanillate demethylase (VdhBCD) や 4-hydroxybenzoate decarboxylase (BsdBCD) は、3つのサブユニットから構成されるヘテロオリゴマー型の酵素である。これに対し Pdc は、ホモオリゴマー型の酵素であると報告されてきた。しかしその酵素活性は小さく^{1,2,3}、物質生産の効率化に向けて高活性化が求められてきた。本研究では、Pdc は他酵素のサブユニットとヘテロオリゴマー型のタンパク質複合体を形成し、高活性化するのではないかと仮説を立て、検討を進めた。

AroY のアミノ酸配列は、*K. pneumoniae* 由来の 4-hydroxybenzoate decarboxylase (KpdBCD) のサブユニット C (KpdC) と 24%の相同性を示した。そこで AroY と KpdC を置換し、KpdB-AroY-KpdD が相互作用することにより、高活性化するのではないかと考え、KpdBCD をコードする遺伝子領域のデリーションクローンを調製し、それらの発現が Pdc 活性に影響するかを検討した (図 2)。Pdc 活性は、予想した通り AroY-KpdB-KpdD を共発現させたことにより、上昇した。また興味深いことに、Pdc 活性は KpdB を共発現させただけでも上昇することが示された。

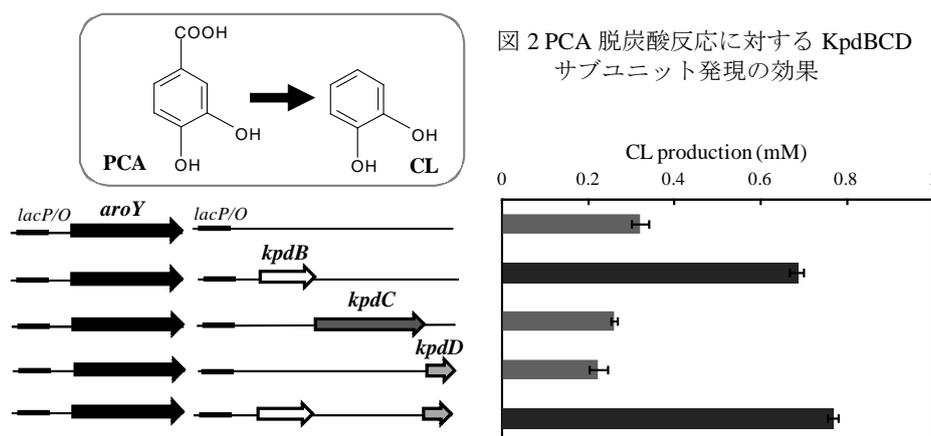


図 2 PCA 脱炭酸反応に対する KpdBCD サブユニット発現の効果

高活性化 Pdc の生化学的性質の初期評価

KpdB と AroY を発現させた大腸菌粗酵素液と、AroY を発現させた大腸菌粗酵素液中の Pdc 活性について、pH と温度に対する Pdc 活性の変化を図 3a, 3b に示した。KpdB 共発現の有無に関わらず、Pdc 活性の最適 pH は 5.5、最適温度は 35°C であった。また高活性化 Pdc を含む大腸菌粗酵素液を DEAE イオン交換クロマトグラフィーに供した結果、AroY と KpdB は異なる塩濃度で溶出された。これらの結果から AroY と KpdB は、上述の VdcBCD や BdcBCD のようなヘテロオリゴマー型の酵素複合体を形成しているのではなく、新規の機構により Pdc 活性が上昇していることが示唆された。

カテコール発酵に対する高活性化 Pdc 発現の効果

組換え大腸菌 JD23488/pTS066+pTS036 株, JD23488/pTS066+pTS052 株を用いたカテコール発酵試験の結果を図 3c に示した. 高活性化 Pdc の発現により, PCA の蓄積は大幅に抑制され, CL 収率は約 2 倍に上昇した.

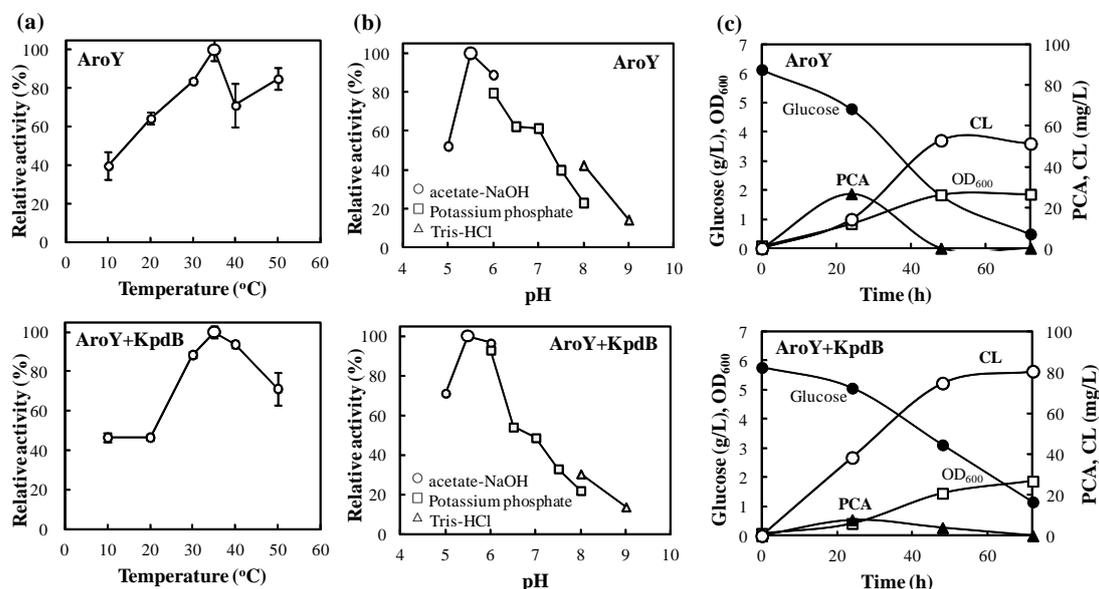


図 3 Pdc 活性 (a, pH, b, 温度) と CL 発酵 (c) に対する KpdB 発現の効果.

結論

本研究では基幹化学品の 1 つであるカテコール発酵の効率化に資する酵素機能の活性化因子を同定し, その効果を評価した. カテコールは *ortho* 開裂反応を経てさらに, ムコン酸に変換することができる. ムコン酸はアジピン酸やテレフタル酸などポリアミドやポリエステル合成原料へと展開可能な基幹化学品の 1 つである⁴⁾. 本研究の成果はカテコールだけでなくムコン酸発酵の効率化にも寄与するものである.

文献

- 1) Draths, K.M. and Frost, J.W. Biocatalytic synthesis of catechol from glucose. US 5272073, 1993.
- 2) He, Z.Q., Wiegel, J. Purification and characterization of an oxygen-sensitive, reversible 3,4-dihydroxybenzoate decarboxylase from *Clostridium hydroxybenzoicum*. J. Bacteriol. 178, 3539–3543, 1996.
- 3) Yoshida, T., Inami, Y., Matsui, T., Nagasawa, T. Regioselective carboxylation of catechol by 3,4-dihydroxybenzoate decarboxylase of *Enterobacter cloacae* P. Biotechnol. Lett. 32, 701–705, 2010.
- 4) Anon. Myriant Corporation. <http://www.myriant.com/products/product-pipeline.cfm>.