

バイオプロダクション

研究代表者 桐村 光太郎
(先進理工学部 応用化学科 教授)

1. 研究課題

バイオテクノロジーは 21 世紀の基盤技術であり、とくに環境負荷低減型のプロセスにより選択的に有用物質生産を行うために必要不可欠な要素技術として認識されている。本プロジェクトは、資源循環型社会の構築に資する新規なバイオテクノロジーによるものづくりを基礎と応用の両面からの研究展開により構築することを目的としている。より具体的には、有用物質生産を支える技術として、圧倒的に高い生産効率を示す「スーパー生体触媒」さらにはマイクロ生産工場といえる「細胞型反応装置 (セルファクトリ)」の開発を軸に、再生可能資源である植物系バイオマスからの有用物質生産技術体系の構築を図る。

2. 主な研究成果

(1) 可逆的脱炭酸酵素の機能改変による「スーパー生体触媒」の開発

現行のサリチル酸類生産の工業的製法では、金属を触媒として高温高压条件下でフェノール類に二酸化炭素を反応させる Kolbe-Schmitt 反応が利用されている。しかし、副生成物を伴うなど環境負荷低減のために改善すべき点も多く、代替法が求められている。我々は、新規な可逆的脱炭酸酵素として salicylate decarboxylase (EC 4.1.1.91、以下 Sdc と略) を世界で初めて発見し、Sdc によるフェノールからサリチル酸への「酵素的 Kolbe-Schmitt 反応」が可能なことを示した。さらに、これまでに改変型 Sdc を作製し酵素的諸性質の検討を行った。本研究では、「スーパー生体触媒」の開発を目指し、酵素活性中心近傍以外の場所への変異導入による改変型酵素での基質特異性の拡大の検討を行った。

Sdc は 40 kDa の単一サブユニット 4 量体から成る酵素で、すでに数種の基質を使用して酵素的諸性質や速度論的パラメータ (k_{cat} や K_m 値等) を決定している。また、1050 bp から成る遺伝子も同定し、大腸菌を宿主とした高発現にも成功している。そこで、本研究では、医薬中間体や機能性高分子モノマーとしての用途がある 3-メチルサリチル酸をモデル化合物とし、部位特異的変異により基質および生成物の出入り口を拡大した改変型 Sdc を作製し、 α -クレゾールから 3-メチルサリチル酸の合成について検討した (図 1 参照)。データベースに登録された情報を基盤として Sdc のモデリング (SWISS-MODEL 等による推定立体構造) を構築し、Sdc の基質が活性中心へ到達する前の段階で通る入口に位置すると考えられた 23 番目のリジン残基 (K) に部位特異的変異を導入することとした。部位特異的変異導入の妥当性を評価するため、23 番目のリジン残基 (K) をアラニン残基 (A) に置換した K23A-Sdc の構造について SWISS-MODEL を用いて推定した。予想した設計通り、Sdc と比較すると基質の入口と考えられる構造が K23A-Sdc において拡張されていることを確認した (図 2 参照)。本来の基質であるサリチル酸およびフェノールに対する脱炭酸活性および炭酸固定活性

の比活性を評価し、K23A-Sdc では両活性ともに野生型 Sdc の 1.6 倍に向上していることを明らかにした。さらに、野生型 Sdc では *o*-クレゾールに対する 3-メチルサリチル酸の合成活性は検出されなかったが、改変型酵素 K23A-Sdc においては *o*-クレゾールに対する 3-メチルサリチル酸の合成活性が検出された。以上より、従来の活性中心近傍への部位特異的変異導入ではなく「基質流入口の拡張による Sdc の機能改変」の新規な発想に基づく基質特異性の拡大の成功例を提示しえたものと考えている。

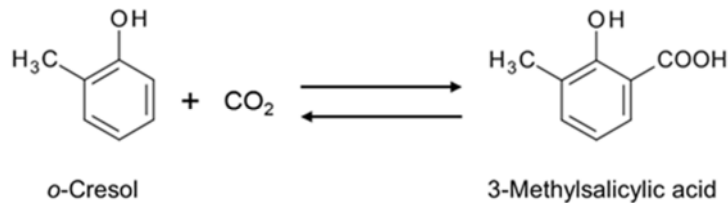


図1 *o*-クレゾールから 3-メチルサリチル酸の合成

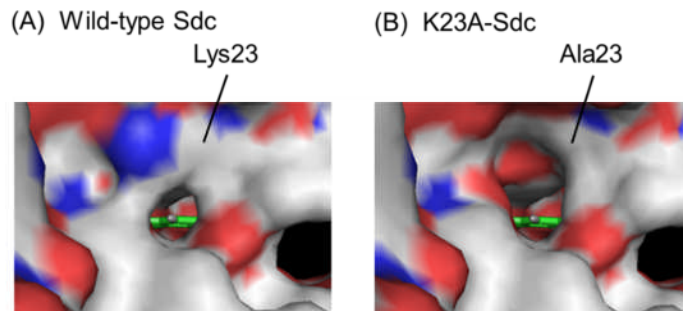


図2 Sdc および改変型酵素 K23A-Sdc の基質入り口付近の立体構造

(2) 寒天分解酵素 β -アガラーゼの精製と諸性質の検討

近年、寒天オリゴ糖の様々な生理活性機能が明らかになり、医薬品や機能性食品などへの利用が盛んになっている。寒天の主成分であるアガロースは、D-ガラクトースと 3,6-アンヒドロ-L-ガラクトースが β -1,4 結合と α -1,3 結合で交互に結合した直鎖構造を有する。アガロース中の α -1,3 結合を切断して得られるオリゴ糖はアガロオリゴ糖と呼ばれる。一方、 β -1,4 結合を切断して得られるオリゴ糖は、ネオアガロオリゴ糖と呼ばれる (図3参照)。これらの寒天オリゴ糖のうち、ネオアガロオリゴ糖は、デンプン老化防止作用が強く、加熱処理により静菌作用を生じることや、低カロリー性等の面から食品分野で高機能性食品の原料として有用であるに加え、高い保湿性と美白作用を兼ね備え、化粧品素材として有用である。また、ネオアガロオリゴ糖を酵素的に加水分解して得られる 3,6-アンヒドロ-L-ガラクトースは、キシリトールに代わる抗う食性糖質として有用である。ネオアガロオリゴ糖の製法には、 β -アガラーゼを用いた酵素加水分解法でネオアガロオリゴ糖を選択的に生成することが可能であるが、酵素の基質特異性の問題から 1 種類の酵素でアガロースから低分子量のアガロオリゴ糖を生成するのは困難であり、その生産量も未だ工業生産レベルには至っていない。本研究では、寒天あるいは未利用の寒天成分を含む海藻残渣から寒天オリゴ糖の生産技術の開発を目指し、特に β -アガラーゼおよびネオアガロオリゴ糖加水分解酵素、あるいはその生産微生物を利用して、ネオアガロオリゴ糖、ネオアガロビオースおよび 3,6-アンヒドロ-L-ガラクトースの生産技術の開発を目的とする。前年度

までに、寒天オリゴ糖の生産技術の要素技術開発について、ネオアガロオリゴ糖加水分解酵素の 1 つであるネオアガロビオース加水分解酵素 (NAH) の諸性質について検討し、当該組換え大腸菌を使用したネオアガロビオースからの 3,6-アンヒドロ-L-ガラクトースの生産について検討した。本年度は、寒天からネオアガロオリゴ糖を生成する寒天分解酵素 β -アガラーゼの精製ならびに諸性質について検討した。

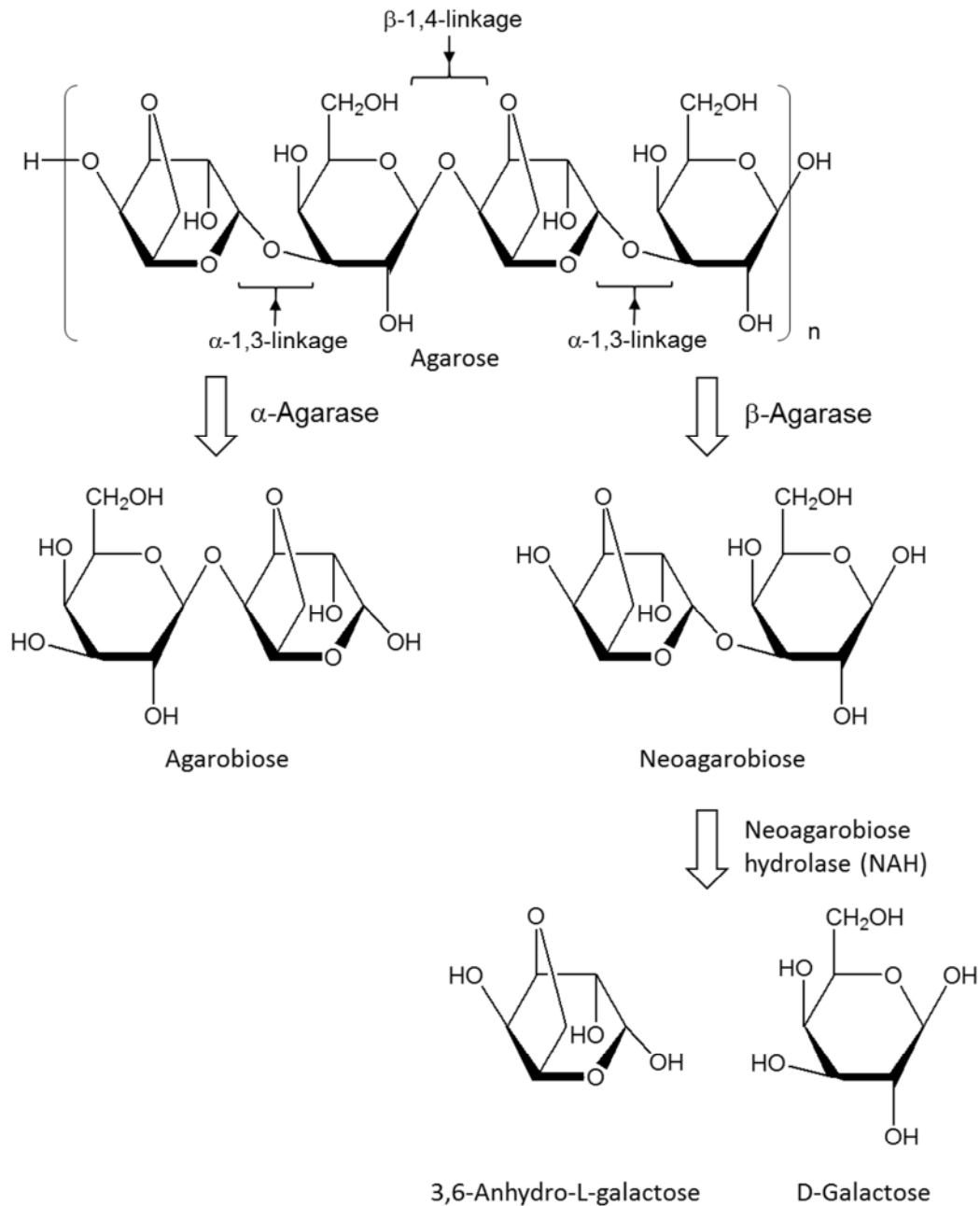


図3 寒天からの寒天オリゴ糖および関連有用物質生産

我々は、寒天を唯一の炭素源として利用可能な微生物の探索により、 β -アガラーゼおよび NAH 活性を有する *Cellvibrio* sp. WU-0601 を単離した。今回、*Cellvibrio* sp. WU-0601 から 4 段階の精製工程を経て、ネオアガロビオース (NA2) 生成型 β -アガラーゼ (AgaX) を SDS-PAGE で単一のバン

ドになるまで精製し、諸性質を検討した。さらに、得られた精製酵素の N-末端アミノ酸配列情報を基に、AgaX をコードする遺伝子を取得した。精製した AgaX は、SDS-PAGE およびゲルろ過による分子量はそれぞれ約 82kDa および約 87kDa であり、モノマー酵素であることを確認した。至適 pH は 7.5、至適温度は 40°C であった。また、当該酵素遺伝子は、798 残基のアミノ酸をコードする 2,394 bp の ORF から成る配列を有していた。しかし、遺伝子開始コドン(ATG)から 31 番目のアミノ酸残基を精製酵素は欠失しており、この領域は疎水性アミノ酸に富むシグナルペプチドで、切断されて成熟型となり活性を示すものと考えられる。当該酵素のアミノ酸配列は、*Saccharophagus degradans* 2-40 の Aga50A および *Vibrio* sp. strain JT0107 の AgaB とそれぞれ 48%と 41%の相同性を示した。

3. 共同研究者

木野 邦器 (先進理工学部・応用化学科・教授)

石井 義孝 (理工学研究所・バイオプロダクション研究プロジェクト・招聘研究員)

4. 研究業績

4.1 学術論文

- (1) Purification, characterization and gene identification of a α -neogaroooligosaccharide hydrolase from an alkaliphilic bacterium *Cellvibrio* sp. WU-0601, T. Watanabe, K. Kashimura, and K. Kirimura, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **133**, S328-S336(2017).
- (2) Electrodialytic separation of levulinic acid catalytically synthesized from woody biomass for use in microbial conversion, H. Habe, S. Kondo, Y. Sato, T. Hori, M. Kanno, N. Kimura, H. Koike, and K. Kirimura, *Biotechnol Prog.*, **33**(2), 448-453 (2017).

4.2 総説・著書

- (1) Enzymatic Kolbe-Schmitt reaction for the syntheses of value-added compounds: use of biocatalysts for carboxylation of organic compounds and bioproduction in “Future Directions in Biocatalysis, 2nd ed.”, (T. Matsuda ed), K. Kirimura, and Y. Ishii, pp.135-147, Elsevier, London (2017).
- (2) 食品に添加する有機酸をつくる微生物,「食と微生物の事典」(北本勝ひこ編), 桐村光太郎, p.158-159, 朝倉書店, 東京 (2017).

4.3 招待講演

4.4 受賞・表彰

4.5 学会および社会的活動

- (1) シアン非感受性呼吸系酵素遺伝子とオキサロ酢酸加水分解酵素遺伝子を高発現させた *Aspergillus niger* によるシュウ酸生産, 吉岡 育哲, 小林 慶一, 桐村 光太郎, 日本農芸化学会 2018 年度大会 (名古屋), 講演要旨集 2A07a14, 2018 年 3 月.
- (2) 比較トランスクリプトーム解析による *Pseudomonas* 属細菌由来レブリン酸代謝系酵素遺伝子

の取得と機能解析, 羽部 浩, 小池 英明, 佐藤 由也, 飯村 洋介, 稲葉 知大, 堀 知行, 菅野 学, 木村 信忠, 桐村 光太郎, 日本農芸化学会 2018 年度大会(名古屋), 講演要旨集 2A12p06, 2018 年 3 月.

- (3) *Xanthomonas campestris* WU-9701 由来のグルコース転移酵素を利用した ethyl α -D-glucopyranoside の高収量生産, 恩田 裕, 渡邊 理沙, 中里 美穂, 桐村 光太郎, 日本農芸化学会 2018 年度大会 (名古屋), 講演要旨集 3A10a11, 2018 年 3 月.
- (4) 好アルカリ性細菌 *Cellvibrio* sp. WU-0601 由来ネオアガロビオース生成型 β -アガラーゼの精製と酵素的諸性質の検討および遺伝子の同定, 榎村 佳奈, 岡本 真歩, 石井 義孝, 桐村 光太郎, 日本農芸化学会 2018 年度大会 (名古屋), 講演要旨集 3A26a06, 2018 年 3 月.
- (5) *Pseudomonas* 属細菌の *trans*-アコニット酸資化性に必須なアコニット酸イソメラーゼ, 滝口 有沙, 平磯 一輝, 桐村 光太郎, 日本農芸化学会 2018 年度大会(名古屋), 講演要旨集 3A26a09, 2018 年 3 月.
- (6) *Pseudomonas* 属細菌の ABC 輸送体基質結合タンパクと推定されていた新規なアコニット酸イソメラーゼの発見, 平磯 一輝, 滝口 有沙, 丸海老 純也, 桐村 光太郎, 第 69 回日本生物工学会大会 (東京), 講演要旨集 4P-G008, 2017 年 9 月.
- (7) *Xanthomonas campestris* WU-9701 由来 α -グルコース転移酵素を用いた ethyl α -D-glucopyranoside の選択的な高収量生産, 恩田 裕, 中里 美穂, 桐村 光太郎, 第 69 回日本生物工学会大会 (東京), 講演要旨集 4P-G009, 2017 年 9 月.
- (8) 糸状菌 *Aspergillus niger* における alternative oxidase 遺伝子高発現によるシュウ酸生産速度の向上, 吉岡 育哲, 小林 慶一, 桐村 光太郎, 第 69 回日本生物工学会大会 (東京), 講演要旨集 4P-G062, 2017 年 9 月.

5. 研究活動の課題と展望

可逆的脱炭酸酵素の機能改変による「スーパー生体触媒」の開発については、立体構造モデリングを駆使して活性向上に有効な変異箇所をさらに選定し、多重変異を導入した「超」優良型の改変型 Sdc を作製する。一方、今回取得した *Cellvibrio* sp. WU-0601 由来の寒天加水分解酵素 β -アガラーゼ (AgaX) 遺伝子を導入した組換え大腸菌を用いて、寒天からのネオアガロビオース生産について検討を継続する。 β -アガラーゼ AgaX のアガロース分解様式の解析などの諸性質の検討も継続する。さらに、以前取得した *Cellvibrio* sp. WU-0601 由来のネオアガロビオース加水分解酵素を利用することで、寒天あるいは未利用寒天を含む海藻残渣からのネオアガロオリゴ糖および 3,6-アンヒドロ-L-ガラクトース生産について検討する。