

## 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) アコニット酸イソメラーゼを利用したクエン酸からのトランス-アコニット酸生産

アコニット酸は、米国エネルギー省 (DOE) のトップ 30 のバイオマスベース基幹化合物の 1 つに選定されているが、バイオベース生産法は未だ確立されていない。トランス-アコニット酸は 3 価カルボン酸で、そのエステル体は高分子化合物の可塑剤として利用されている。近年は、高機能光学樹脂や生分解性樹脂の原料 (モノマー) としても期待されており、需要の増大が見込まれている。一方、クエン酸を原料とした従来の合成法では収率が低く環境負荷が大きいことから、環境負荷低減型のトランス-アコニット酸の新規な生産法の確立が求められている。本研究では、非可食バイオマスから得られるセルロースやヘミセルロースを利用可能なクエン酸生産糸状菌 *A. niger* (クロコウジカビ) を利用したクエン酸発酵 (発酵法) と、極めて新奇な酵素としてのアコニット酸イソメラーゼ (EC 5.3.3.7) を利用した酵素変換法を融合し、トランス-アコニット酸およびそれから誘導される新規なヒドロキシカルボン酸の生産法を開発することを目的とした (図 1 参照)。本年度は、アコニット酸イソメラーゼを利用した酵素変換法の要素技術開発について、アコニット酸イソメラーゼ遺伝子を導入した組換え大腸菌を作製し、当該組換え大腸菌を使用してクエン酸からのトランス-アコニット酸の生産について検討した。

我々は、トランス-アコニット酸を唯一の炭素源として利用可能な微生物の探索により、アコニット酸イソメラーゼ活性を有する *Pseudomonas* sp. WU-0701 を単離した。さらに、*Pseudomonas* sp. WU-0701 からアコニット酸イソメラーゼを精製し、その諸性質を決定するとともに、当該酵素遺伝子を取得した (4.1 (1))。精製したアコニット酸イソメラーゼは、SDS-PAGE およびゲルろ過による分子量決定から、25 kDa のモノマー酵素であった。至適 pH は 6.0、至適温度は 37 °C であった。また、当該酵素遺伝子は、262 個のアミノ酸残基をコードする 786 bp の ORF から成り、N 末端 22 残基に推定ペリプラズム移行シグナル配列を有していた。当該酵素のアミノ酸配列は、*Pseudomonas*

*psychrotolerans* および *Xanthomonas albilineans* の molybdenum ABC transporter substrate-binding protein とそれぞれ 90%と 74%の相同性を示した。当該酵素の精製ならびに酵素遺伝子の同定に関する報告は、世界で初めてである。さらに、当該アコニット酸イソメラーゼ（以下 AI）遺伝子と大腸菌由来のアコニット酸ヒドラーターゼを導入した組換え大腸菌を作製し、両酵素を共発現させた組換え大腸菌を使用してクエン酸からのトランスアコニット酸の生産に世界で初めて成功し、120 分の反応で 400mM クエン酸から 91mM のトランスアコニット酸の生産（15.8 g/L）を可能にした（論文投稿中）。

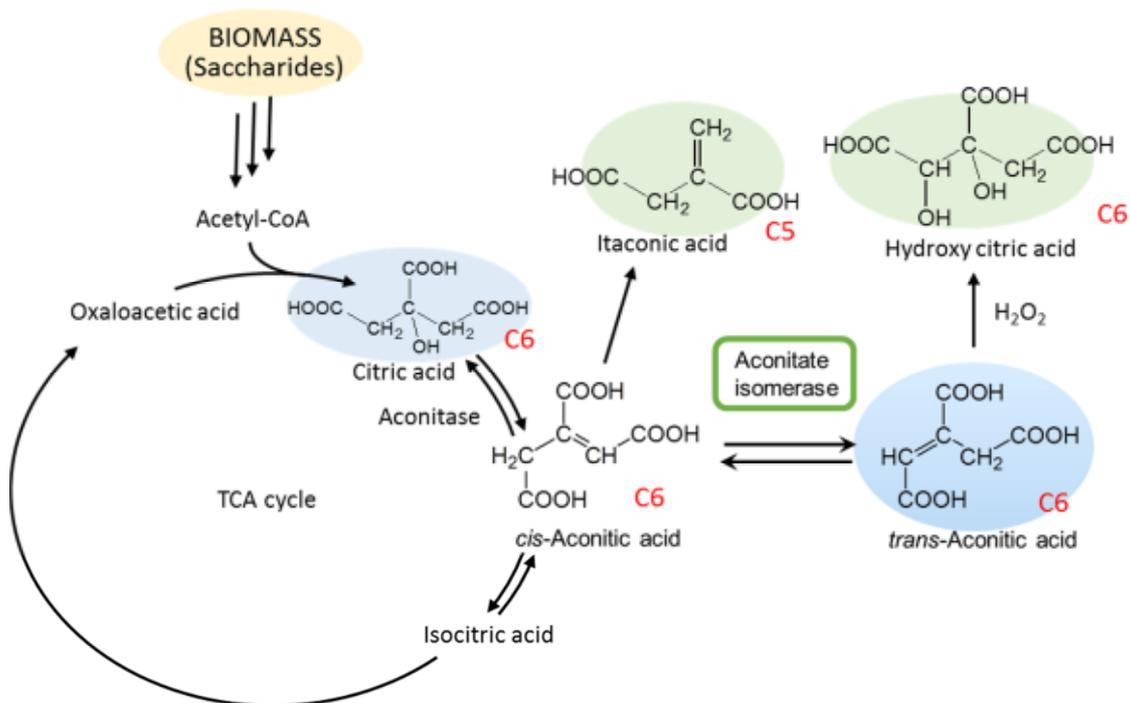


図1 発酵法と酵素変換法を融合した有用有機酸生産

## (2) レブリン酸分解菌の単離とレブリン酸の微生物変換

レブリン酸 (LA) は、固体酸触媒の作用によりセルロース系バイオマスから得られる基幹物質であり、DOE のトップ 12 のバイオマスベース基幹化合物の 1 つに選ばれている。日本では、ハイブリッド酸触媒が開発され、高効率でセルロースから LA とギ酸が生産可能になっている。このため、原料としての LA 利用性の拡大は、多種多様な有用化合物の生産における重要な基盤となる。本研究では、LA からの付加価値の高い有用化合物への微生物変換の可能性を検討した。とくに、LA を利用可能な微生物に関する知見は極めて少ないことから、LA を炭素源として利用可能な（資化性のある）細菌を単離、同定し、LA からの有用化合物への変換活性を試験した。

土壌試料を用いた微生物探索を通して、6 株の LA 資化性微生物を単離した。6 つの単離株のうち、*Pseudomonas* sp. LA18T および *Rhodococcus hoagie* LA6W は、高細胞密度系で 70 g/L の LA を分解した。両株は LA 分解に伴い酢酸を蓄積し、LA6T 株および LA6W 株による酢酸の最大蓄積は、4 日間の培養後にそれぞれ 13.6 g/L および 9.1 g/L であった (4. 1. (2))。また、他の単離株として *Burkholderia stabilis* LA20W が、40 g/L の LA 存在下で約 2 g/L のトレハロースを細胞外に生産した (4. 1. (3))。

以上より、新規な LA 資化性細菌が複数取得され、LA からの酢酸やトレハロース等への変換活性

を見出した。すなわち、セルロース系バイオマスから安価に得られた LA を微生物変換により付加価値の高い有用化合物に変換することに可能性が見出され、将来的な展望が拓けたことになる。

### 3. 共同研究者

木野 邦器 (先進理工学部・応用化学科・教授)

古屋 俊樹 (先進理工学部・応用化学科・助教)

小林 慶一 (先進理工学部・応用化学科・助手)

### 4. 研究業績

#### 4.1 学術論文

- (1) Enzymatic Characterization and Gene Identification of Aconitate Isomerase, an Enzyme Involved in Assimilation of *trans*-Aconitic Acid, from *Pseudomonas* sp. WU-0701, K. Yuhara, H. Yonehara, T. Hattori, K. Kobayashi, K. Kirimura, FEBS J., **282** (22), 4257-4267 (2015).
- (2) Bacterial Production of Short-chain Organic Acids and Trehalose from Levulinic Acid: a Potential of Cellulose-Derived Building Block as a Feedstock for Microbial Production, H. Habe, S. Sato, T. Morita, T. Fukuoka, K. Kirimura, D. Kitamoto, Biores. Technol., **177** (9), 381-386 (2015).
- (3) Isolation and Characterization of Bacterial Strains with the Ability to Utilize High Concentrations of Levulinic Acid, a Platform Chemical from Inedible Biomass, H. Habe, S. Sato, T. Morita, T. Fukuoka, K. Kirimura, D. Kitamoto, Biosci. Biotechnol. Biochem., **79** (9), 1552-1555 (2015).

#### 4.2 総説・著書

なし

#### 4.3 招待講演

なし

#### 4.4 受賞・表彰

なし

#### 4.5 学会および社会的活動

- (1) 遺伝子改変によるメチルサリチル酸への活性を示す可逆的サリチル酸脱炭酸酵素の作製, 熊倉 匠, 秋山 智寛, 小林 慶一, 桐村 光太郎, 第 67 回日本生物工学会大会 (鹿児島), 講演要旨集 2P-048, 2015 年 9 月.
- (2) 好アルカリ性細菌 *Cellvibrio* sp. WU-0601 由来ネオアガロビオース加水分解酵素の酵素的性質の決定と遺伝子の同定, 渡辺 輝彦, 榎村 佳奈, 小林 慶一, 桐村 光太郎, 第 67 回日本生物工学会大会 (鹿児島), 講演要旨集 1P-068, 2015 年 9 月.
- (3) *Pseudomonas* sp. WU-0701 由来アコニット酸イソメラーゼの諸性質検討と遺伝子の同定, 丸海老 純也, 油原 かほり, 小林 慶一, 桐村 光太郎, 第 67 回日本生物工学会大会 (鹿児島), 講

演要旨集 1P-034, 2015 年 9 月.

- (4) クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* におけるクエン酸輸送体遺伝子の機能解析, 小林 慶一, 上田 由佳, 桐村 光太郎, 第 67 回日本生物工学会大会 (鹿児島), 講演要旨集 3P-084, 2015 年 9 月.
- (5) 可逆的サリチル酸脱炭酸酵素の改変と酵素的 Kolbe-Schmitt 反応によるメチルサリチル酸生産, 熊倉 匠, 桐村 光太郎, 第 5 回 CSJ 化学フェスタ 2015 (東京), 講演要旨集 P8-061, 2015 年 9 月.
- (6) *trans*-Aconitic Acid from Citric Acid by Whole-Cell Reactions of *Escherichia coli* Heterologously Expressing Aconitate Isomerase Gene (*ais*), K. Kobayashi, K. Yuhara, H. Yonehara, J. Maruebi, T. Hattori, K. Kirimura, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015, Honolulu, Hawaii, USA), Abstract Poster No.862, 2015 年 12 月.
- (7) Circularly Permuted Fluorescent Protein-Based Indicators for Citrate, Y. Honda, K. Kirimura, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015, Honolulu, Hawaii, USA), Abstract Poster No.287, 2015 年 12 月.
- (8) アコニット酸イソメラーゼ遺伝子を異種発現させた組換え大腸菌の細胞反応によるクエン酸からの *trans*-アコニット酸生産, 丸海老 純也, 油原 かほり, 小林 慶一, 桐村 光太郎, 日本農芸化学会 2016 年度大会 (札幌), 講演要旨集 4F182, 2016 年 3 月.
- (9) クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* におけるミトコンドリア膜局在型クエン酸輸送体遺伝子破壊株の作成, 小林 慶一, 上田 由佳, 桐村 光太郎, 日本農芸化学会 2016 年度大会 (札幌), 講演要旨集 4F120, 2016 年 3 月.
- (10) 非海洋性細菌由来ネオアガロビオース加水分解酵素の諸性質検討と遺伝子解析, 樫村 佳奈, 渡辺 輝彦, 小林 慶一, 桐村 光太郎, 日本農芸化学会 2016 年度大会 (札幌), 講演要旨集 4D007, 2016 年 3 月.

## 5. 研究活動の課題と展望

発酵法と酵素変換法を融合した有用有機酸生産については、トランス-アコニット酸のバイオベース生産法をモデルとしてさらなる研究を展開する。すなわち、今回取得した *Pseudomonas sp.* WU-9701 由来のアコニット酸イソメラーゼ遺伝子を導入した組換え大腸菌を用いて、クエン酸発酵液 (終了時で pH 2) を直接原料としたトランス-アコニット酸の生産を検討する。さらに、アコニット酸イソメラーゼを生産する微生物探索を継続し、生産に適した新規アコニット酸イソメラーゼを取得するとともに、クエン酸生産糸状菌へのアコニット酸イソメラーゼ遺伝子導入による (非可食バイオマス由来の) 糖質原料からのトランス-アコニット酸の生産を検討する。

レブリン酸分解菌の単離とレブリン酸の微生物変換については、今後もレブリン酸分解菌の単離を継続するとともに、その生成物の分析を通して、有用物質生産への可能性について検討を進める。