

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。本研究では、「スーパー生体触媒」の開発を目的として、改変型 Sdc を作製し酵素的諸性質を検討するとともに、X 線回折により立体構造の解析を行った。

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 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、抗結核薬や医薬中間体としての用途がある p-アミノサリチル酸 (PAS) や 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 PAS 生産に最適化した改変型 Sdc を作製した。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 の活性中心近傍にある Y64 位と F195 位は基質 (フェノール類) の周辺に位置するアミノ酸残基と予想されたため、これらの箇所に基質との相互作用が大きくなるように部位特異的変異を導入した。作製した改変型 Sdc の PAS 生産活性を評価し、PAS 生産比活性それぞれ 4.1 倍と 3.1 倍に増大した改変型 Y64T-Sdc や F195Y-Sdc を取得した。さらに、部位特異的変異を 2 点導入した Y64T-F195Y-Sdc では 12 倍に増大した。一方、Sdc の立体構造の解析のため、再現性良く精製 Sdc を結晶化する条件を決定し、高精度の X 線回折像を得ることに成功した (未発表)。

(2) III型 PKS を利用した有用有機酸の生産技術の開発

ポリフェノールやフラボノイドを代表例とするポリケタイドは、抗生物質や抗がん剤など医薬品素材として幅広く利用されており、ポリケタイド合成酵素(PKS)によって合成される。PKS は構造上の相違から I, II, III 型の 3 種類に分類されるが、III 型 PKS は広範な基質特異性を示す酵素で、ピロン骨格やレゾルシノール骨格を有する種々のポリケタイドを合成する (図 1 参照)。現在までに植物や細菌由来の III 型 PKS は多く発見されているのに対して、糸状菌由来の III 型 PKS は極めて希少だが、クエン酸生産糸状菌である *Aspergillus niger* NRRL 328 由来の III 型 PKS ホモログ遺伝子 (*An-csyA*) の存在を当研究室で明らかにした。本研究では、*A. niger* NRRL 328 由来の新規 III 型 PKS である An-CsyA の機能解析を目的として、LC-Q-TOFMS を用いた An-CsyA による反応生成物の構造決定を行った。さらに、当該酵素の広範な基質特異性を利用して新規ポリケタイドを創出した。

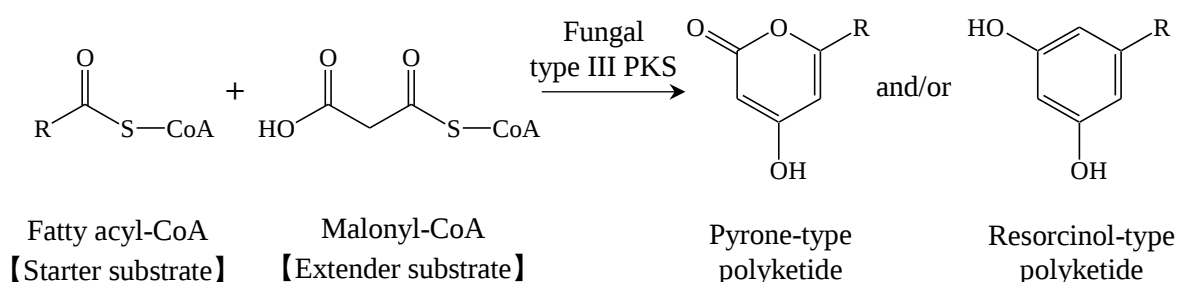


図 1 糸状菌由来 III 型 PKS によるポリケタイド合成

Aspergillus niger NRRL 328 由来の III 型 PKS ホモログ遺伝子 (*An-csyA*) を導入した大腸菌を用いて、組換え An-CsyA を生産し、 Ni^{2+} -アフィニティクロマトグラフィーにより精製した。本組換え An-CsyA を用いて、開始基質を種々のアシル CoA、伸長基質を Malonyl-CoA として酵素反応を行い、反応生成物について LC-Q-TOFMS を用いた構造決定を行った。Acetyl-CoA, Acetoacetyl-CoA, Malonyl-CoA, Methylmalonyl-CoA, Isobutyryl-CoA, Benzoyl-CoA, Butyryl-CoA, Hexanoyl-CoA, Octanoyl-CoA, Decanoyl-CoA, Lauroyl-CoA, Myristoyl-CoA を開始基質として用いた場合において複数の生成物が確認された。これらの生成物について構造決定を行うと、Triketide pyrone, Acetyl-CoA, Acetoacetyl-CoA, Malonyl-CoA, Isobutyryl-CoA, Benzoyl-CoA, Butyryl-CoA, Hexanoyl-CoA, Octanoyl-CoA, Decanoyl-CoA から Tetraketide pyrone, Decanoyl-CoA, Lauroyl-CoA, Myristoyl-CoA から Pentaketide resorcinol が合成可能なことがわかり、An-CsyA の基質特異性と生成物の構造的特徴を初めて明らかにした。An-CsyA により合成される 3 種類のポリケタイドは既報の糸状菌由来 III 型 PKS でも報告されているが、An-CsyA の詳細な機能は大きく異なっている。放線菌 (細菌) 由来の III 型 PKS などは Malonyl-CoA のみからポリケタイドを合成可能であるが、糸状菌由来 III 型 PKS が Malonyl-CoA を開始基質として認識することは困難である。しかし、An-CsyA は Malonyl-CoA のみから Triketide pyrone と Tetraketide pyrone を合成することが可能で、Malonyl-CoA を開始基質として利用可能なことが示された。また、一般的に Tetraketide pyrone は糸状菌由来 III 型 PKS によって長鎖脂肪酸アシル CoA から合成されている。しかし、An-CsyA によって Acetyl-CoA, Butyryl-CoA, Hexanoyl-CoA, Octanoyl-CoA から Tetraketide pyrone が合成されており、短鎖および中鎖 (C2~C10) の脂肪酸アシル CoA から Triketide pyrone だけでなく Tetraketide pyrone も合成可能なことが示された。以上より、既報の糸状菌由来 III 型 PKS とは

異なる特異性を示す新奇酵素としての An-CsyA の特徴を明らかにした。

さらに、新規ポリケタイドの創出を目的として、開始基質を種々のアシル CoA, 伸長基質を Methylmalonyl-CoA として酵素反応を行い、反応生成物について LC-Q-TOFMS を用いた構造決定を行った。Acetyl-CoA, Acetoacetyl-CoA, Malonyl-CoA, Methylmalonyl-CoA, Isobutyryl-CoA, Benzoyl-CoA, Butyryl-CoA, Hexanoyl-CoA, Octanoyl-CoA, Decanoyl-CoA を開始基質として用いた場合において複数の生成物が確認された。これらの生成物について構造決定を行うと、Lauroyl-CoA, Myristoyl-CoA, Palmitoyl-CoA, Stearoyl-CoA を除くすべてのアシル CoA から Triketide pyrone と Tetraketide pyrone の合成が確認された。糸状菌由来 III 型 PKS が Methylmalonyl-CoA を伸長基質として用いた報告は本研究が初めてであり、An-CsyA の新規な性質の一端を明らかにすることができた (論文投稿中)。

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) Oxalic Acid Production by Citric Acid-Producing *Aspergillus niger* Overexpressing the Oxaloacetate Hydrolase Gene *oahA*, K. Kobayashi, T. Hattori, Y. Honda, K. Kirimura, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., **41** (5), 749-756 (2014).
- (2) Overexpression of the NADP⁺-Specific Isocitrate Dehydrogenase Gene (*icdA*) in Citric Acid-Producing *Aspergillus niger* WU-2223L, K. Kobayashi, T. Hattori, R. Hayashi, K. Kirimura, Biosci. Biotechnol. Biochem., **78** (7), 1246-1253 (2014).

4.2 総説・著書

なし

4.3 招待講演

- (1) 可逆的脱炭酸酵素を利用した酵素的 Kolbe-Schmitt 反応による有用芳香族化合物の生産, 桐村 光太郎, 日本農芸化学会 関東支部 2014 年度第 2 回例会受賞講演・シンポジウム「ユニークな酵素の研究の最前線」, 講演要旨集 p.1-6, 2014 年 11 月, 横浜 (神奈川).

4.4 受賞・表彰

なし

4.5 学会および社会的活動

- (1) 酵母 *Trichosporon moniliiforme* の細胞反応を利用した安息香酸からの *p*-ヒドロキシ安息香酸の酵素的生産, 吉野 周平, 安藤 拓也, 小林 慶一, 桐村 光太郎, 第 66 回日本生物工学会大会 (札幌), 講演要旨集 1P-254, p.81, 2014 年 9 月.
- (2) オキサロ酢酸加水分解酵素遺伝子の高発現による糸状菌 *Aspergillus niger* を利用したシュウ

酸の高収率生産, 小林 慶一, 渡邊 昭太郎, 桐村 光太郎, 第 66 回日本生物工学会大会 (札幌), 講演要旨集 1P-147, p.54, 2014 年 9 月.

- (3) 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破壊株の表現型, 上田 由佳, 小林 慶一, 桐村 光太郎, 第 66 回日本生物工学会大会 (札幌), 講演要旨集 1P-036, p.26, 2014 年 9 月.
- (4) セルロース由来基幹化学品レブリン酸の微生物変換, 羽部 浩, 佐藤 俊, 森田 友岳, 福岡 徳馬, 小林 慶一, 桐村 光太郎, 北本 大, 日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山), 講演要旨集 3B33a13, 2015 年 3 月.
- (5) 濃度レブリン酸分解菌の単離と解析, 羽部 浩, 佐藤 俊, 森田 友岳, 福岡 徳馬, 小林 慶一, 桐村 光太郎, 北本 大, 日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山), 講演要旨集 3B33a14, 2015 年 3 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、取得した X 線回折像を基に、今後 Sdc の立体構造を解き、機能改変に応用する予定である。さらに、活性中心ではなく「基質の出入口」に注目した酵素改変を実施していくとともに、Y64T-F195Y-Sdc 等の改変型 Sdc についても結晶化し、X 線回折により立体構造を解き、活性向上の理由を明確にする。最終的に、結晶解析データを駆使して活性向上に有効な変異箇所をさらに選定し、多重変異導入した「超」優良型の改変型 Sdc を作製する。

Ⅲ型 PKS を利用した有用有機酸の生産技術の開発については、伸長基質にアルキル化したマロニル CoA を含む種々の脂肪酸アシル CoA の標品を使用することで、新規化合物の合成に挑戦する。また、安価かつ効率的なポリケタイドの合成には脂肪酸アシル CoA の供給系が重要となることから、種々の脂肪酸アシル CoA の供給源となる酵素や微生物の探索を行う。

新規な有用有機酸のバイオベース生産法の開発にも着手している。これまでの研究で取得された「スーパー生体触媒」に加え、「細胞型反応装置 (セルファクトリ)」の開発を進め、これらの組合せによってバイオプロダクションによる有用化合物生産技術体系を構築する。