

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K07706

研究課題名(和文) ムコン酸ラクトン化酵素変異による代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) Influence of the expression of cis,cis-muconate isomerase mutant on aromatic compounds metabolism

研究代表者

園木 和典 (SONOKI, TOMONORI)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：20502264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：基幹化合物であるムコン酸(ccMA)を生産する能力が高い微生物株の分子育種に向けて、まず安息香酸からccMAを培養温度に依存して蓄積するムコン酸ラクトン化酵素変異株のRNA-seq解析を行った。その結果、ccMAを温度依存的に蓄積する表現型には生育必須遺伝子と考えられるPP\_0036とPP\_4349の関わりが推測された。またccMA生産の効率化に関わる因子の探索を進め、RNA pyrophosphohydrolaseと高いアミノ酸配列相同性を持つ酵素遺伝子の発現が、*Pseudomonas putida* KT2440株組換え体によるccMA生産速度を20%向上させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ムコン酸は、アジピン酸やテレフタル酸など化石資源から合成され広く使用されているポリマー原料へと展開できる基幹化合物である。低炭素社会の実現に向けて、非可食バイオマス由来を原料としたポリマー原料生産の重要性は今後より一層高まると予想される。本研究の成果は、非可食バイオマスからムコン酸を生産する効率を高めるものであり、持続可能なバイオポリマー原料生産技術の創出に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Aiming molecular breeding of a muconate-producing bacterial strain, RNA-seq analyses of the strain expressing a mutated-ccMA cycloisomerase that accumulates muconate from benzoate in a temperature-dependent manner were conducted. It was expected that PP\_0036 and PP\_4349, which are considered to be essential genes, are involved in the phenotype of temperature-dependent growth on benzoate. In addition, a gene, nudH, whose deduced amino acid sequence shows high identity with that of RNA pyrophosphohydrolase from *Escherichia coli*, was identified as a dimethylallylpyrophosphate phosphorylase. The expression of nudH improved ccMA productivity of the engineered *Pseudomonas putida* KT2440-based strain. It is suggested that the supply of dimethylallylmonophosphate, a substrate for synthesizing prenylated flavin mononucleotide that is a critical cofactor for protocatechate decarboxylation, a rate-limiting step in ccMA production was increased by means of the expression of nudH.

研究分野：応用微生物学

キーワード：cis,cis-muconic acid lignin *Pseudomonas putida* DMAPP phosphorylase Nudix hydrolase

## 1. 研究開始当初の背景

*cis, cis*-ムコン酸 (ccMA) はポリアミド、ポリエチレン、ポリエステルなど様々なポリマーの合成原料へと展開可能な基幹化合物である。これまでに微生物代謝を利用して植物バイオマス由来の糖質を原料とした ccMA 生産が検討されてきたが、糖質は既に微生物を利用した燃料や多くの基幹化合物生産の原料として利用されているため、糖質以外の有機物からの生産方法を検討し、バイオ生産における糖質への依存度を低減させる取り組みも並行して進めることが望まれる。研究代表者はこれまでに、リグノセルロースに物理化学的処理を施して得られるリグニン由来の芳香族化合物から ccMA を生産できる微生物触媒の創出に取り組んできた。リグニン由来の多様な芳香族化合物を利用して増殖できる *Pseudomonas putida* KT2440 株のプロトカテク酸 (PCA) と ccMA の分解能を欠損させ、高活性化した PCA 脱炭酸酵素 (Sonoki *et al*, *J. Biotechnol.*, 2014) を発現させることで、リグニン由来の芳香族化合物から ccMA を生産する微生物株を作出した (園木ら, *BIOINDUSTRY*, 2018)。この微生物株が生産する ccMA は、リグニン由来の芳香族化合物から作られているため、糖質への依存度を一定程度低減することができた。しかし、本来リグニン由来の芳香族化合物を利用して増殖する過程の代謝中間体である ccMA を蓄積させるため、増殖には糖質を利用する必要があった。

## 2. 研究の目的

本研究では、リグニン由来の芳香族化合物を利用して増殖しながら ccMA を生産する新たな微生物触媒の創出に向けて、培養条件依存的に ccMA 分解活性が変化する ccMA ラクトン化酵素 (ccMA cycloisomerase, CatB) の作出とその機構を明らかにすること、そして ccMA 生産のさらなる効率化に向けた新たな因子の探索を行うこととした。

## 3. 研究の方法

### (1) 安息香酸資化性を利用した温度感受性 *catB* 変異体 (*catB*-mut) のスクリーニング

CatB-mut の ccMA 分解活性評価

5'-CATGATTACGCGGCCTTAAAGAGGAGAAATTAAGCAAGCGTGCTGATTG-3' と 5'-TCT GGTACCGCGGCCTTACGTGGAACAACATGG-3' のプライマーセットを用いた Error-prone PCR 法によって変異導入した *catB* を含む約 1.2 kbp の DNA 断片を pTS093 (pJB866-derivative, *P<sub>lac</sub>*, Tc<sup>r</sup>) にクローニングし、*catB* 変異体ライブラリを作製した。Error-prone PCR には Diversify™ PCR Random Mutagenesis Kit (TaKaRa Bio Co.) を使用し、突然変異の導入率が 1,000 bp につき 2.0 bp から 2.7 bp となる反応条件にて PCR を実施した。作製した *catB* 変異体ライブラリを用いて IDPC 株 (KT240-derivative, *pcaHG::Gm*, *catB::Km*, Gm<sup>r</sup>, Km<sup>r</sup>) を形質転換した。ナリジクス酸 (Nal) 25 mg/L, ゲンタマイシン (Gm) 50 mg/L, カナマイシン (Km) 25 mg/L, テトラサイクリン (Tc) 20 mg/L を含む LB 寒天培地上で生育した複数のコロニーを新しい LB 寒天培地 (同濃度の抗生物質を含む) に接種し、30°C で一晩静置培養した。コピープレートを用いて各コロニーを 0.9% NaCl 水溶液 100 μL に懸濁し、10 mM 安息香酸 (BA) もしくは 10 mM グルコース (Glc) を炭素源とした MM 寒天培地 (34.2 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 6.0 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0 g/L NaCl, 2.0 g/L NH<sub>4</sub>Cl, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 14.7 mg/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 5.0 mg/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O。上記の抗生物質を同濃度で含む) に接種し、3つの異なる温度 (25°C, 30°C, 32°C) で静置培養した。野生型の *catB* (*catB*-wt) で形質転換した IDPC 株と比較して、BA を含む MM 寒天培地上での生育が、25°C および 30°C では同等であり、かつ 32°C では大きく抑制されたクローンを選抜した。目的の温度感受性を示した IDPC 形質転換体からプラスミド DNA (pTS103, pTS093-derivative expressing *catB*-mut, Tc<sup>r</sup>) を抽出し、*catB* 塩基配列に生じた変異点を同定した (pTS103 上の *catB* 変異体を *catB*-mut と命名した)。

pTS093, pTS095 (pTS093-derivative expressing *catB*-wt, Tc<sup>r</sup>), pTS103, pUC118, pTS104 (pUS118-derivative expressing *catB*-wt, Amp<sup>r</sup>), pTS105 (pUC118-derivative expressing *catB*-mut, Amp<sup>r</sup>) をそれぞれ用いて、*E. coli* JM109 株を形質転換した。JM109/pTS093 株, JM109/pTS095 株, JM109/pTS103 株は Tc 15 mg/L を, JM109/pUC118 株, JM109/pTS104 株, JM109/pTS105 株はアンピシリン (Amp) 50 mg/L を含む LB 液体培地 10 mL に接種し、30°C で一晩振盪培養した。得られた培養液を前述の抗生物質と 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside を含む LB 液体培地 10 mL に 100 μL 接種し、OD<sub>600</sub>≒0.8 に達するまで 30°C で振盪培養した。得られた細胞を MM 液体培地で洗浄した後、1 mM ccMA を含む MM 液体培地 1 mL で懸濁し、25°C もしくは 30°C で振盪培養した。

### (2) RNA-seq 解析から選抜した遺伝子群が培養温度依存的な増殖に与える効果の評価

IDPC/pTS093 株, IDPC/pTS095 株, IDPC/pTS103 株を Nal 25 mg/L, Gm 50 mg/L, Km 25 mg/L, Tc 20 mg/L を含む LB 液体培地 10 mL に接種し、30°C で一晩振盪培養したものを前培養液とした。前培養液を、上記の抗生物質を同濃度で含む LB 液体培地 10 mL に 100 μL (1%) 接種し、

OD<sub>600</sub>=0.4~0.5 に達するまで 30°C で振盪培養した。MM 液体培地で 2 回洗浄してから、10 mM BA を含む MM 液体培地 1 mL で懸濁し、25°C、30°C または 32°C で振盪培養した。15 時間後に SV Total RNA Isolation System (Promega Corp.) を用いて total RNA を回収し、さらに TURBO DNA-free Kit (Invitrogen Corp.) を用いて混入した DNA を除去した。Total RNA の濃度と純度は NANODROP 2000c (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて測定し、Macrogen Japan Corp. に RNA-seq 解析を委託した。RNA-seq 解析結果から、*PP0036*, *PP1550*, *PP4349*, *PP5701* について遺伝子破壊株を、*PP2121* と *vacJ* について遺伝子発現株を作出した。pTS103 を用いて NLPB 株 (KT2440-derivative,  $\Delta$ *pcaHG*,  $\Delta$ *catB*), NLPB $\Delta$ *PP1550::Km* 株, NLPB $\Delta$ *PP5701::Km* 株を、また pTS192 (pTS103-derivative expressing *PP2121*, Tc<sup>r</sup>), pTS193 (pTS103-derivative expressing *vacJ*, Tc<sup>r</sup>) を用いて NLPB 株を形質転換した。全ての形質転換体は Nal 25 mg/L, Tc 20 mg/L を含む培地を使用し、NLPB $\Delta$ *PP1550::Km* 株形質転換体, NLPB $\Delta$ *PP5701::Km* 株形質転換体を培養するときは Nal と Tc に加えて Km を終濃度 25 mg/L になるよう添加した。(2) 記載の方法と同様に各形質転換体の BA と Glc の資化性を評価した。

#### (3) Nudix hydrolase 遺伝子の破壊と発現が ccMA 生産能に与える効果の評価

pTS052 [pMCL200-derivative expressing *aroY* (a PCA decarboxylase) and *kpdB* (a flavin prenyltransferase), Cm<sup>r</sup>] を用いて BW25113 株, JW3002 株 (BW25113-derivative,  $\Delta$ *nudF::Km*), JW1854 株 (BW25113-derivative,  $\Delta$ *nudB::Km*), KP7600 株, JD22191 株 (KP7600-derivative, *nudJ::Km*), JD24022 株 (KP7600-derivative, *nudF::Km*) を形質転換した。全ての形質転換体はクロラムフェニコール (Cm) 10 mg/L を含む培地を使用し、JW3002 株, JW1854 株, JD22191 株および JD24022 株の形質転換体を培養するときは Cm に加えて Km を終濃度 25 mg/L になるよう添加した。各形質転換体を LB 液体培地 5 mL (各抗生物質を含む) に接種し、30°C で一晚振盪培養した。得られた培養液を各抗生物質と 1 mM IPTG を含む LB 液体培地 10 mL に 100-200  $\mu$ L 接種し、OD<sub>600</sub>=0.8 に達するまで 30°C で振盪培養した。得られた細胞を M9 液体培地で洗浄した後、1 mM PCA を含む M9 液体培地 1 mL で懸濁し、30°C, 180 rpm で振盪培養した。

pTS111 (pTS093-derivative expressing *aroY* and *kpdB*, Tc<sup>r</sup>) を用いて NLPB 株, NLPB $\Delta$ *PP0260::Km* 株, NLPB $\Delta$ *PP0565::Km* 株, NLPB $\Delta$ *PP1348::Km* 株, NLPB $\Delta$ *PP\_4013::Km* 株, NLPB $\Delta$ *PP\_4919::Km* 株, NLPB $\Delta$ *PP\_5146::Km* 株をそれぞれ形質転換した。また pTS173 (pTS111-derivative expressing *PP4919* in addition to *aroY* and *kpdB*, Tc<sup>r</sup>), pTS174 (pTS111-derivative expressing *PP4013* in addition to *aroY* and *kpdB*, Tc<sup>r</sup>), pTS175 (pTS111-derivative expressing *PP5146* in addition to *aroY* and *kpdB*, Tc<sup>r</sup>), pTS176 (pTS111-derivative expressing *PP0260* in addition to *aroY* and *kpdB*, Tc<sup>r</sup>), pTS177 (pTS111-derivative expressing *PP1348* in addition to *aroY* and *kpdB*, Tc<sup>r</sup>), pTS178 (pTS111-derivative expressing *PP0565* in addition to *aroY* and *kpdB*, Tc<sup>r</sup>) をそれぞれ用いて、NLPB 株を形質転換した。形質転換体の培養には Nal 25 mg/L, Tc 20 mg/L を含み、必要に応じてさらに Km 25 mg/L を含む培地を使用した。各形質転換体を LB 液体培地 10 mL (各抗生物質を含む) に接種し、30°C で一晚振盪培養した。得られた培養液を、各抗生物質を含む LB 液体培地 10 mL に 200  $\mu$ L 接種し、OD<sub>600</sub>=0.8 に達するまで 30°C で振盪培養した。細胞を M9 液体培地で 2 回洗浄してから、1 mM PCA を含む M9 液体培地 1 mL で懸濁し、30°C で振盪培養した。

NLPB/pTS111 株と NLPB/pTS175 株を Nal 25 mg/L, Tc 20 mg/L, グルコース (Glc) 10 g/L を含む発酵培地 [6.0 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3.9 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 22.2 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 2.9 g/L Yeast extract, 0.1 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5.0 mg/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10.8 mg/L MgO, 2.0 mg/L CaCO<sub>3</sub>, 5.0 mg/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.4 mg/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.1 mg/L MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.3 mg/L CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.3 mg/L CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 mg/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>] 5 mL に接種し、30°C で一晚振盪培養した。得られた培養液 5 mL を発酵培地 45 mL (終濃度がそれぞれ Nal 25 mg/L, Tc 20 mg/L, Glc 10 g/L になるように含む) に接種した。300 mL 容バツフルフラスコを用いて 30°C で回転培養し、開始 8 時間後に PCA (終濃度 1 g/L, 1.5 g/L または 2 g/L) を添加した。

#### (4) 分析方法

培養液の OD<sub>600</sub> は、mini photo 518R (TAITEC corporation) または BIO master (TOMY SEIKO Co., Ltd.) を、Glc 濃度は BF-5i (王子計測機器株式会社) を、BA, PCA, カテコールおよび ccMA の濃度は HPLC (1200 series, Agilent Technologies, Inc.) を使用して測定した。分析カラムは ZORBAX Eclipse Plus C18 (粒径 5  $\mu$ m,  $\phi$ 4.6  $\times$  150 mm, Agilent Technologies, Inc.) を用い、カラムオープンの温度は 40°C に設定した。移動相は、1% 酢酸を含む 5% メタノール水溶液 (A 溶液) と 1% 酢酸を含む 50% メタノール水溶液 (B 溶液) を用いたグラジエントモードで行った。A 溶液でカラムを平衡化してから分析試料を注入し、その後 8 分間かけて B 溶液の割合を 20% に増加させ、さらにその後 5 分間かけて B 溶液の割合を 100% まで増加させた。この状態で 5 分間維持した後、5 分間かけて再び A 溶液の割合を 100% に戻し、カラムを平衡化した。移動相の流速は 1.0 mL/min, 検出波長は 280 nm に設定した。

### 4. 研究成果

#### (1) *catB*-mut のスクリーニングと ccMA 分解活性評価

IDPC 株は、リグニン由来フェノール類から効率的にムコン酸を生産可能にするために PCA

を分解する PcaHG とムコン酸を分解する CatB を不活化した株であり、バニリン酸 (VA), 4-ヒドロキシ安息香酸 (HBA), BA などの芳香族化合物の資化能を失っている。この株に KT2440 株由来の *catB-wt* を相補した結果, VA と HBA の資化性は回復しなかったが, BA の資化性は回復した。同株は 25°C, 30°C, 32°C のいずれの培養条件下でも BA の資化性を失うことはなく, CatB-*wt* 活性は 25°C - 32°C の範囲では BA での増殖に著しい影響を及ぼすような温度感受性を保持していないことを示唆された。CatB 活性に温度感受性を付与することができれば, 温度感受性 CatB を発現する IDPC 株形質転換体は, 例えば培養温度が上昇すると BA を利用した増殖が出来なくなることが想定できる。そこで本研究では, IDPC 株で *catB* の変異体を発現させ, 温度に依存して BA での増殖能が変化する形質転換体の単離を検討した。

Error-prone PCR により調製した *catB* 変異体ライブラリを IDPC 株に導入し, BA の資化性を評価した。 *catB* を発現しない IDPC/pTS093 株は, 25°C, 30°C, 32°C いずれの温度でも Glc では増殖するものの, BA では増殖しなかった。 *catB-wt* を発現する IDPC/pTS095 株は, 25°C, 30°C, 32°C いずれの温度でも, Glc を利用した増殖および BA を利用した増殖を示した。 *catB* 変異体を発現する IDPC 株形質転換体約 3,000 クローンについて BA の資化性を観察した結果, Glc では 25°C, 30°C, 32°C いずれの温度でも増殖したものの, BA を単一炭素源として含む MM 寒天培地上では, 培養温度の上昇に伴って増殖が抑制された 3 クローンを単離した。それぞれの形質転換体からプラスミド DNA を抽出して *catB* 領域の変異点を解析した結果, いずれの遺伝子も開始コドンから 20 番目のアデニンがチミンに, 659 番目のチミンがシトシンに置換されていた。温度依存的な BA 資化性には CatB アミノ酸配列上の E7V および I220T の変異が関わることを示唆された。次に休止菌体反応により, *catB-mut* 発現株の ccMA 生産能に対する温度の影響を評価した。 *catB* を発現しない IDPC/pTS093 株は, 反応開始 40 時間後に, 25°C では添加した BA のうち約 60 mol% を ccMA に, 30°C では約 40 mol% を, そして 32°C では約 40 mol% を ccMA に変換し, 残りの BA は変換されずにそのまま残存した。 *catB-wt* を発現する IDPC/pTS095 株は, 25°C, 30°C, 32°C いずれの温度でも ccMA を蓄積することなく, 反応開始から 20 時間以内に全ての BA を分解した。 *catB-mut* を発現する IDPC/pTS103 株は, いずれの温度でも反応開始 40 時間後までに BA を全て消費し, 25°C では BA の約 45 mol%, 30°C では約 65 mol%, 32°C では約 75 mol% に相当する ccMA を蓄積した。これらの結果から, BA から生成された ccMA の一部は CatB-*mut* の CatB 活性により muconolactone へと変換, さらに代謝されたことが推測され, 温度の上昇に伴って CatB-*mut* の CatB 活性が抑制されていることが示唆された。

次に, ccMA の分解能を持たない *E. coli* を宿主として *catB-mut* を発現し, CatB-*mut* の生化学的な解析を検討した。しかし *catB-wt* を発現する JM109/pTS095 株は 25°C および 30°C で ccMA を変換したのに対して, *catB-mut* を発現させた JM109/pTS103 株はいずれの温度でも ccMA 変換能を示さなかった。高コピープラスミド DNA である pUC118 を用いて *catB-wt* と *catB-mut* をそれぞれ発現させた JM109/pTS104 株, JM109/pTS105 株を用いても, *catB-wt* を発現する JM109/pTS104 株は 25°C, 30°C いずれの温度でも ccMA を変換したのに対して, *catB-mut* を発現する JM109/pTS105 株はいずれの温度でも ccMA を変換できなかった。以上の結果から, IDPC 株への *catB-mut* 発現による温度依存的な BA 資化性という表現型は, 温度依存的な CatB 活性の変化に起因するものではないことが強く示唆された。

## (2) RNA-seq 解析から選抜した遺伝子群が培養温度依存的な増殖に与える効果

CatB-*mut* は CatB 活性を失っていたにも関わらず, IDPC 株に対して BA 資化性を与えた。このことは *catB-mut* の発現により, CatB 反応を経ることなく BA を利用して増殖する代謝経路の誘導が想定できる。そこで IDPC/pTS103 株と, IDPC/pTS095 株および IDPC/pTS093 株に BA を添加して発現変動する遺伝子群を比較し, IDPC/pTS103 株で特異的に発現変動した遺伝子群を抽出した。RNA-seq 解析の結果, *PP0036* (LysR family transcriptional regulator), *PP1550* (Cro/CI family transcriptional regulator), *PP4349* (hypothetical protein), *PP5701* (hypothetical protein) の発現量が有意に 2 倍以上増加しており, *PP2121* (lipoprotein), *vacJ* (lipoprotein) の発現量が 0.5 倍以下に減少していた。そこで 4 遺伝子 (*PP0036*, *PP1550*, *PP4349*, *PP5701*) それぞれの破壊株と 2 遺伝子 (*PP2121*, *vacJ*) それぞれの発現株を作出を進めた。しかし *PP0036* と *PP4349* の破壊株は得られず, これら 2 遺伝子は必須遺伝子と考えられた。 *catB-mut* を発現することで表現型として観察できる温度依存的な BA 資化性への効果を, NLPBΔ*PP1550::Km*/pTS103 株, NLPBΔ*PP5701::Km*/pTS103 株と NLPB/pTS192 株, NLPB/pTS193 株を用いて評価した結果, いずれの株でも BA 資化性に変化は観察されなかった。遺伝子破壊ができなかった 2 遺伝子 (*PP\_0036*, *PP\_4349*) を, アンチセンス法によって mRNA レベルで発現抑制を行い BA 代謝への関与を検証することを進めることで新規 BA 代謝機構の解明が考えられる。

## (3) Nudix hydrolase 遺伝子の破壊と発現が ccMA 生産能に与える効果

ccMA 生産の律速反応は PCA 脱炭酸反応であり, 研究代表者はこれまでに PCA decarboxylase (AroY) の補因子である prenylated flavin mononucleotide (prFMN) を合成する flavin prenyltransferase (KpdB) を同定した。 *aroY* と *kpdB* を共発現することで, *in vitro* での PCA decarboxylase 活性はおよそ 20 倍に上昇するものの (Sonoki *et al.*, 2014), ccMA 生産においては未だ PCA が蓄積しやすく, さらなる律速反応の強化が求められていた。prFMN

は FMNH<sub>2</sub> と dimethylallylmonophosphate (DMAP) から合成されるので、このうち DMAP の合成強化に関わる因子を探索した。DMAP は MEP (2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate) 経路を経て合成されるジメチルアリルピロリン酸 (DMAPP) を脱リン酸化して合成され、近年、Nudix (Nucleoside diphosphate linked to some other moiety X) hydrolase である dATP pyrophosphohydrolase (NudB), ADP-ribose pyrophosphatase (NudF), ADP-ribose diphosphatase (NudE), Pyrimidine (deoxy) nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase (NudG), nucleotide hydrolase (NudH), predicted Nudix hydrolase (NudI), Bifunctional thiamin pyrimidine pyrophosphate hydrolase (NudJ), nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase (MutT), predicted Nudix hydrolase (YfcD) が DMAPP 脱リン酸化活性を示し、特に NudB, NudF, NudI, NudJ が高い活性を持つことが報告された。そこで、*E. coli* BW25113 株系統の *nudB* 変異株 (JW1854 株) と *nudF* 変異株 (JW3002 株) に *aroY* と *kpdB* を組み込み、休止菌体反応により Pdc 活性を測定した結果、約 30% の減少が測定された。このことから、NudB または NudF 以外の Nudix hydrolase の働きにより DMAP の合成は行われるものの、NudB や NudF による DMAP の十分な供給が AroY による Pdc 反応には必要であることが示唆された。しかし、*E. coli* KP7600 株系統の *nudF* 変異株 (JD24022 株) と *nudJ* 変異株 (JD22191 株) では反対に Pdc 活性が約 60% 増加した。すなわち、遺伝的背景により DMAPP 脱リン酸化に関わる比活性が異なることや、*nudF* や *nudJ* の欠損に伴って別の Nudix hydrolase 遺伝子の発現量が増加し DMAP 合成活性を補うような機構が存在することも示唆された。既知の報告では優れた DMAPP phosphorylase を明らかにすることはできていなかったため、*P. putida* KT2440 株が持つ Nudix hydrolase を直接評価し、PCA decarboxylase 活性の向上に寄与する DMAPP phosphorylase を同定することとした。ccMA 生産株の親株である *P. putida* KT2440 株は *E. coli* と同じく MEP 経路により DMAPP を合成する。そのため KT2440 株においても Nudix hydrolase により DMAPP から DMAP が生成すること、そしてその酵素遺伝子の発現制御により Pdc 活性を制御できることが推測される。そこで、KT2440 株で Pdc 活性を向上させるために機能する DMAPP phosphorylase を新たに同定するためにゲノム DNA 配列から Nudix hydrolase 遺伝子と考えられる配列を全て抽出し、そしてそれらの欠失・発現の Pdc 活性に対する効果を評価することで、Pdc 反応強化に寄与する DMAPP phosphorylase 遺伝子を明らかにすることとした。

*E. coli* 由来の 15 の Nudix hydrolase それぞれとアミノ酸配列レベルで 10% 以上の相同性を示す酵素遺伝子を *P. putida* KT2440 株のゲノム DNA 配列から 15 遺伝子抽出した。これらのうち 14 遺伝子は Nudix hydrolase domain (130 前後のアミノ酸で構成) を保持していたことから、Nudix hydrolase をコードする遺伝子であることが推測された。Nudix hydrolase の基質特異性はアミノ酸配列の影響を強く受けるため、14 遺伝子のうち DMAPP 分解活性が報告された *E. coli* 由来 Nudix hydrolase とアミノ酸配列レベルで特に高い相同性を示した 6 遺伝子 (*PP0260*, ADP compounds hydrolase; *PP0565*, Nudix hydrolase; *PP1348*, thiamine phosphate pyrophosphorylase; *PP4013*, MutT/nudix family protein; *PP4919*, ADP-ribose/sugar pyrophosphatase; *PP5146*, RNA pyrophosphohydrolase) を、DMAPP phosphorylase として機能する可能性が高いものとして選抜した。選抜した 6 Nudix hydrolase 遺伝子をそれぞれ破壊した NLPB 株の変異株を作製し、それぞれの変異株に *aroY* と *kpdB* を組み込んだ。これらの形質転換体を用いた休止菌体反応を行い、Pdc 活性に対するそれぞれの Nudix hydrolase 欠損の影響を評価した結果、いずれの形質転換体においても Pdc 活性の有意な変化は見られなかった。次に、選抜した 6 遺伝子それぞれを高発現させた NLPB 株の形質転換体を作製して Pdc 活性に対する効果を評価した結果、*PP5146* を組み込んだ NLPB/pTS175 株においてのみ Pdc 活性が約 20% 増加した。*PP5146* は *E. coli* 由来の *nudH* とアミノ酸配列レベルで 65% の相同性を示した。NudH は KT2440 株細胞中で他の Nudix hydrolase よりも高い DMAPP 脱リン酸化活性を保持し、同酵素を高発現したことで DMAP 合成量が増加し、その結果 KpdB による prFMN 合成量が増加し、AroY による Pdc 反応の促進に寄与したことが考えられる。

#### (4) *nudH* 高発現株の ccMA 生産能力

NLPB/pTS111 株と NLPB/pTS175 株の ccMA 生産能力をフラスコ培養試験により評価した。NLPB/pTS175 株の PCA 消費速度は約 0.13 g/L/h、ccMA 生産速度は約 0.09 g/L/h であり、NLPB/pTS111 株 (それぞれ 0.10 g/L/h、0.07 g/L/h) と比べて約 20% 増加した。PCA の投入量を終濃度 1.5 g/L、2 g/L と増やしたところ、NLPB/pTS111 株は培養開始後 24 時間が経過しても PCA が培養液中に残存したのに対し、NLPB/pTS175 株は投入した PCA のほぼ全てを ccMA に変換した。*nudH* 高発現による AroY 活性の増強効果は休止菌体反応レベルだけでなく、フラスコ培養レベルでも実証された。*nudH* 発現を既存の ccMA 生産株に適用することで、中間代謝物である PCA の蓄積を改善し、より速やかにリグニン由来の芳香族化合物から ccMA を生産することが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akutsu M, Abe N, Sakamoto C, Kurimoto Y, Sugita H, Tanaka M, Higuchi Y, Sakamoto K, Kamimura Y, Kurihara H, Masai E, Sonoki T	4. 巻 in Press
2. 論文標題 Pseudomonas sp. NGC7 as a microbial chassis for glucose-free muconate production from a variety of lignin-derived aromatics and its application to the production from sugar cane bagasse alkaline extract	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioresource Technology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biortech.2022.127479	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kikuchi A, Sugita H, Hatamura M, Akutsu M, Sonoki T	4. 巻 n/a
2. 論文標題 Engineered Pseudomonas putida Strains Producing cis,cis-Muconic Acid from Lignin-Related Phenols.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the 9th International Conference on Environmental Engineering, Science and Management	6. 最初と最後の頁 397-404
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 栗本祐樹、田中誠、園木和典
2. 発表標題 プロトカテク酸脱炭酸反応を促進するジメチルアリルピロリン酸脱リン酸化酵素遺伝子の同定
3. 学会等名 第65回リグニン討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akihiro Kikuchi, Haruka Sugita, Minami Hatamura, Miho Akutsu, Tomonori Sonoki
2. 発表標題 Engineered Pseudomonas putida Strains Producing cis,cis-Muconic Acid from Lignin-Related Phenols.
3. 学会等名 The 9th International Conference on Environmental Engineering, Science and Management（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗本祐樹、田中誠、園木和典
2. 発表標題 プロトカテク酸脱炭酸反応を促進するジメチルアリルピロリン酸脱リン酸化酵素遺伝子の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗本祐樹、尾形拓哉、園木和典
2. 発表標題 ジメチルアリルモノリン酸合成系の探索によるcis,cis- $\mu$ コン酸合成の効率化
3. 学会等名 日本農芸化学会東北・北海道合同支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗本祐樹、尾形拓哉、坂元君年、園木和典
2. 発表標題 Flavin prenyltransferase発現によるプロトカテク酸脱炭酸酵素の活性化
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗本祐樹、尾形拓哉、園木和典
2. 発表標題 基幹化合物生産の効率化に向けたProtocatechuate decarboxylase反応機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会第152回東北支部大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/staff/tomonori-sonoki/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------