

令和 3 年 6 月 12 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01802

研究課題名(和文)炭酸固定酵素による各種芳香族カルボン酸の生産および新規官能基導入酵素の探索

研究課題名(英文) The biocatalytic CO₂-fixation catalyzed by (de)carboxylases and application to the production of various aromatic carboxylic acids

研究代表者

木野 邦器 (Kino, Kuniki)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：60318764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：脱炭素化社会の実現に資するバイオプロセスの構築を目指し、非酸化的な可逆的脱炭酸酵素による芳香族化合物へのカルボキシ基などの官能基導入による機能性化成品の生産法の開発を行った。具体的には、基質特異性の異なる多様な炭酸固定酵素の探索を推進し、芳香族カルボン酸や芳香族ジカルボン酸など合成可能な化合物を拡張した。また、新たなバイオ樹脂として注目されているポリエチレンフランオートの原料となる2,5-フランジカルボン酸をフルフラールから合成するプロセスの開発にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の生活を豊かにしている多様な機能性化成品の多くは、依然として化石資源を原料とする従来型の化学工業プロセスに依存しており、二酸化炭素の純増を招く本プロセスは低炭素社会への流れに逆行している。本研究成果である微生物由来可逆的脱炭酸酵素の探索と各種芳香族カルボン酸合成法の開発は、二酸化炭素を芳香族化合物に固定する工業的にも有用かつ新規性のある学術研究として意義がある。また、未利用バイオマスであるリグニン由来の芳香族化合物に炭酸を固定化して芳香族カルボン酸を合成するバイオプロセスの導入は、脱炭素化社会の実現に大いに貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：With the aim of developing bioprocesses that will contribute to the realization of a decarbonized society, we have developed methods for the production of functionalized chemical products by introducing functional groups such as carboxy groups into aromatic compounds using non-oxidative reversible decarboxylases. In particular, we have promoted the search for a variety of carbonic anhydrase enzymes with different substrate specificities and expanded the range of compounds that can be synthesised, including aromatic carboxylic acids and aromatic dicarboxylic acids. We have also succeeded in developing a process for the synthesis of 2,5-furandicarboxylic acid, a raw material for poly(ethylene furanoate), which is attracting attention as a new bio-resin, from furfural.

研究分野：応用生物化学

キーワード：可逆的脱炭酸酵素 炭酸固定酵素 芳香族カルボン酸 芳香族ジカルボン酸 フランジカルボン酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々の生活を豊かにしている多様な機能性化成品の製造は、二酸化炭素の純増を招く化石資源を原料とする従来型の化学工業プロセスに大きく依存しており、近年の脱炭素化社会への流れに逆行している。微生物由来の可逆的脱炭酸酵素を利用すると、二酸化炭素を芳香族化合物に固定して芳香族カルボン酸が合成できる。芳香族カルボン酸は PET に代表されるように汎用ポリエステルなどのポリマー原料として用いられており、専らアルキルベンゼンの触媒酸化により化学的に合成されている。化学合成法では二酸化炭素の固定も排出もしないが、高温高压条件を要するため、炭酸固定酵素を用いた合成プロセスを開発できれば、温和な条件で芳香族カルボン酸の合成が可能となり低炭素社会の実現に貢献しうる革新的な技術となりうる。しかし、現時点では利用可能な可逆的脱炭酸酵素が少ないため、合成可能な芳香族カルボン酸の種類が限定的であることが課題となっていた。

2. 研究の目的

上記背景を踏まえ、基質特異性の異なる多様な炭酸固定酵素の探索を推進し、合成可能な芳香族カルボン酸の拡張を目的とした。またカルボキシ基以外の官能基として、例えば水酸基を導入可能な酵素の探索も検討した。本研究では、低炭素社会の実現に貢献する次世代型バイオプロセスの構築を目指しており、未利用バイオマスであるリグニンや化石資源由来の芳香族化合物を原料に汎用化成品や新規機能性素材を生産する基盤技術の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 芳香族カルボン酸合成を可能とする炭酸固定活性を有する微生物株の探索

芳香族カルボン酸を合成可能な可逆的脱炭酸酵素はいくつか発見されているが、その多様性の拡張を目指してさらなる新規酵素の探索を行った。従来研究に引き続く新規芳香族モノカルボン酸を合成可能な酵素の探索に加えて、特に報告例の少ない芳香族ジカルボン酸を合成可能な可逆的脱炭酸酵素を対象とした。芳香族ジカルボン酸を合成できれば、ポリエステルなどを合成できるポリマー原料としての用途が期待できる。

(2) 生体触媒を用いた芳香族カルボン酸合成プロセスの開発

上記(1)で取得した微生物株の染色体ゲノムから目的活性を示す遺伝子の取得および組換えタンパク質の調製を行った。そして当該精製酵素または高発現大腸菌体を用いて芳香族カルボン酸合成プロセスの開発検討を行った。

(3) 芳香族化合物に水酸基を導入する酵素の探索と解析

カルボキシ基以外の官能基である水酸基を芳香族化合物に導入する酵素の探索および遺伝子取得と解析を行った。上記の可逆的脱炭酸酵素の手法に基づき、官能基の特性や従来の関連研究の経緯などを踏まえて探索・取得および解析を行った。

4. 研究成果

(1) 4-ヒドロキシイソフタル酸 (4HIPA) の合成

これまでに、ポリケチドの一種で芳香族モノカルボン酸あるオルセリン酸に対して可逆的脱炭酸活性を示す *Arthrobacter* sp. K8 株を土壌より取得している。可逆的オルセリン酸脱炭酸酵素 (OAD) ならびにその遺伝子は同定済みであり、既知の可逆的脱炭酸酵素とは一次構造の異なる新規酵素であることを明らかにしている。ポリアミドやポリエステルなどのポリマー原料としての展開が期待できる芳香族ジカルボン酸の合成を目指した酵素探索を行った。

対象とする芳香族ジカルボン酸として、まず解熱鎮痛作用や抗酸化作用を示すと報告されている 4HIPA を選定し、4HIPA を合成可能な可逆的脱炭酸酵素 (4HIDC) の探索を行った。4HIPA の資化性を指標に土壌より目的活性を有する微生物を探索したところ、4HIDC 活性を示す *Cystobasidium slooffiae* HTK3 を取得した。HTK3 株の無細胞抽出液に対して 4HIPA 脱炭酸活性を指標として多段階のカラムクロマトグラフィーによる精製を行ったところ、約 36 kDa の単一のタンパク質画分を得た。当該タンパク質画分の N 末端配列解析によってその 15 残基を明らかにした。さらに、RACE 法を用いて当該活性を示す酵素

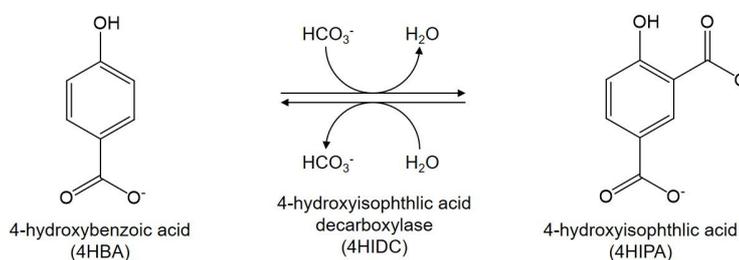


Fig. 1 HIPA の合成

を精製した。当該タンパク質画分の N 末端配列解析によってその 15 残基を明らかにした。さらに、RACE 法を用いて当該活性を示す酵素

(4HIDC) の遺伝子配列も明らかにした。この遺伝子配列を既知の可逆的脱炭酸酵素と比較したところ、その相同性は 50% 前後で、4HIDC は既知の可逆的脱炭酸酵素とは一次構造の異なる新規酵素であることを明らかにした。さらに当該遺伝子を大腸菌で高発現させて得た精製組換え酵素を用いて諸性質検討を行った。得られた生化学的特性を踏まえて 4HIPA 合成を検討したところ、まだ収量に課題はあるが、約 8% の収率で 4HIPA 合成に成功した。

(2) 2,5-フランジカルボン酸 (FDCA) の合成

近年 PET に代わるバイオポリエステルとしてポリエチレンテレフタレート (PET) が注目されており、その原料である FDCA の効率的な合成法の確立に期待が寄せられている。そこで FDCA に対する可逆的脱炭酸酵素 (FDCC) を有する微生物を、上記 (1) と同様の手法で探索したところ *Paraburkholderia fungorum* KK1 を取得した。そして目的遺伝子を同定・クローニングし、大腸菌で高発現させた組換え酵素を用いて評価したところ、FDCA 合成活性を示すことが明らかになった。さらに FDCC による炭酸固定反応の基質であるフル酸 (FA) はバイオマス資源であるフルフラールの酸化物であることから、フルフラール酸化活性を示す酵素 HMFO と組み合わせてフルフラールから FDCA の一括生産を検討した。当初 FDCA の生成量は著しく低かったが、その原因が HMFO 反応過程で生じる過酸化水素にあることを明らかにし、本反応系に還元剤を添加することで、合成量の改善が見られた。上記も含めた種々の検討の結果、さらなる改善は必要であるが、約 10% の収率でバイオマス資源フルフラールからの FDCA 合成を達成した。

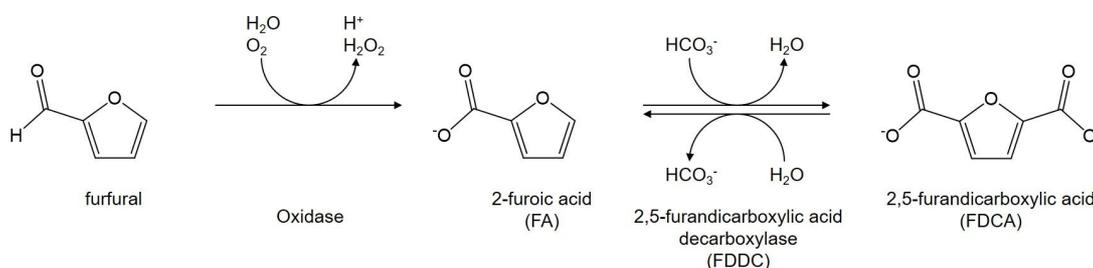


Fig.2 FDCA の合成

(3) 広い基質特異性を示す可逆的メトキシサリチル酸脱炭酸酵素 (MSD) の取得

これまでに 6-メトキシサリチル酸 (6MSA) に対する可逆的脱炭酸酵素 (MSD) を有する微生物 *Cupriavidus* sp. TK を土壌より取得し組換え型タンパク質も取得していた。当該酵素の活性評価を行ったところ、6MSA に対する脱炭酸活性は示したのに対し、炭酸固定反応において 6MSA を生成せず、その構造異性体である 4-メトキシサリチル酸を生成することを見出した。さらに基質特異性の検討を行ったところ、MSD は少なくとも 9 種類の芳香族カルボン酸に対して脱炭酸活性を示し、6 種類以上の芳香族カルボン酸を炭酸固定により合成可能であることを明らかにした。中でも 2-ナフトールから 2-ヒドロキシ-1-ナフトエ酸を合成する活性を初めて見出し、多種多様な芳香族カルボン酸の合成に寄与しうる可逆的脱炭酸酵素の発見に成功した。3

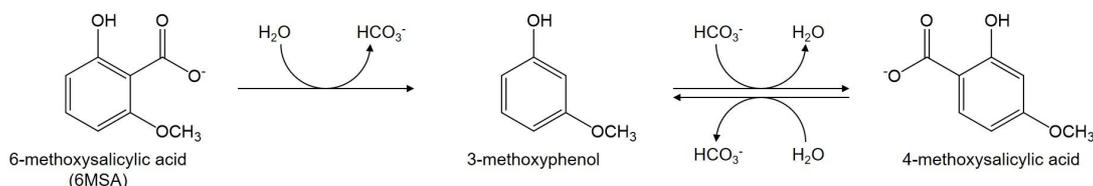


Fig. 3 MSD による可逆的脱炭酸反応

(4) 水酸基導入による 3-(2-ヒドロキシエチル)カテコール (HEC) の合成

ポリフェノールである HEC は、抗酸化作用や美白作用さらには逆転写酵素阻害活性を示すと期待されている化合物である。比較的安価な化合物である 2-フェニルエタノール (2-PE) への水酸基導入による HEC 合成を目指し、土壌より当該活性を有する *Pseudomonas* sp. K17 を取得し、目的遺伝子を同定した。当該遺伝子高発現株を作製し、2-PE からの HEC 合成を試みたが、HEC の生成は観察されなかった。酸化酵素の導入によって特異的に生成する青色色素が HEC の合成を阻害し、培地成分由来のトリプトファンに起因するインジゴ類縁体であることを明らかにした。すなわち、グルコースの添加によってこの阻害が抑制され、トリプトファン欠損変異を宿主に導入した結果、色素は生成せず HEC を合成し、2-フェニルエタノールからの HEC 合成収率 90% を達成することに成功した。本研究成果は第 21 回生体触媒化学反応シンポジウムで発表し、優秀発表賞に選定された。

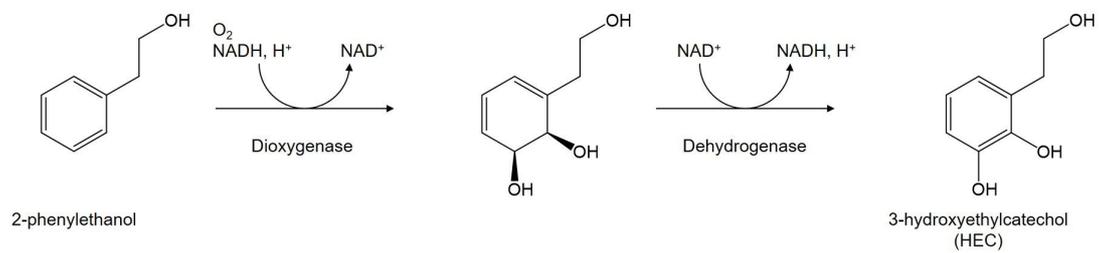


Fig. 4 水酸基導入による HEC の合成

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11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 Ryotaro Hara, Takeyuki Nishikawa, Takuya Okuhara, Kento Koketsu, and Kuniki Kino	4. 巻 103
2. 論文標題 Ectoin hydroxylase displays selective trans-3-hydroxylation activity towards L-proline	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Appl. Microbiol. Biotechnol.	6. 最初と最後の頁 5689-5698
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-019-09868-y	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 Toshiki Furuya, Naoto Imaki, Kosuke Shigei, Masahiko Sai, and Kuniki Kino	4. 巻 103
2. 論文標題 Isolation and characterization of Gram-negative and Gram-positive bacteria capable of producing poceatannol from resveratrol	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Appl. Microbiol. Biotechnol.	6. 最初と最後の頁 5811-5820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-019-09875-z	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 Satoru Umezawa, Shunsuke Konishi, and Kuniki Kino	4. 巻 83
2. 論文標題 Development of a synthesis method for orodor sesquiterpenoid, (-)-rotundone, using non-heme Fe ²⁺ chelate catalyst and ferric-chelate reductase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem.	6. 最初と最後の頁 1875-1883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1625264	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 Satoru Umezawa, Hiroko Akao, Mio Kubota and Kuniki Kino	4. 巻 84
2. 論文標題 Chemoenzymatic oxygenation method for sesquiterpenoid synthesis based on Fe-chelate and ferric-chelate reductase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem.	6. 最初と最後の頁 780-788
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1707062	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 Ryotaro Hara and Kuniki Kino	4. 巻 104
2. 論文標題 Enzymatic reactions and microorganisms producing the various isomers of hydroxyproline	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Appl. Microbiol. Biotechnol.	6. 最初と最後の頁 4771-4779
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-020-10603-1	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 Tsubasa Saito, Riku Aono, Toshiki Furuya and Kuniki Kino	4. 巻 130
2. 論文標題 Efficient and long-term vanillin production from 4-vinylguaiacol using immobilized whole cells expressing Cso2 protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biosci. Bioeng.	6. 最初と最後の頁 260-264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2020.04.012	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 Kuniki Kino, Yasutaka Hirokawa, Ryo Gawasawa, Ryota Murase, Ryohei Tsuchihashi and Ryotaro Hara	4. 巻 323
2. 論文標題 Screening, gene cloning, and characterization of orsellinic acid decarboxylase from <i>Arthrobacter</i> sp. K8 for regio-selective carboxylation of resorcinol derivatives	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biotechnol.	6. 最初と最後の頁 128-135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiotec.2020.08.011	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 木野邦器	4. 巻 99
2. 論文標題 有用微生物酵素の探索とバイオプロセス開発への応用研究	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 2-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34565/seibutsukogaku.99.1_2	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 Kazuki Kawanabe, Riku Aono and Kuniki Kino	4. 巻 132
2. 論文標題 2,5-Furandicarboxylic acid production from furfural by sequential biocatalytic reactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Biosci. Bioeng.	6. 最初と最後の頁 xx-xxx
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2021.03.001	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 Riku Aono, Tomoya Yoshihara, Hotaka Nishide and Kuniki Kino	4. 巻 x
2. 論文標題 Screening and characterization of a novel reversible 4-hydroxyisophthalic acid decarboxylase from <i>Cystobasidium slooffiae</i> HTK3	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem.	6. 最初と最後の頁 xx-xxx
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab082	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 Medumi Matsude, Himeka Okamoto, Riku Aono and Kuniki Kino	4. 巻 x
2. 論文標題 Tryptophanase gene deficiency improves the application of dioxygenase to 3-(2-hydroxyethyl)catechol production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Biosci. Bioeng.	6. 最初と最後の頁 xx-xxx
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15件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Toshiki Furuya, Masahiko Sai, and Kuniki Kino
2. 発表標題 Biocatalytic synthesis of piceatannol from reveratrol by <i>Ensifer</i> and <i>Arthrobacter</i> strains
3. 学会等名 Biotrans2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoru Umezawa and Kuniki Kino
2. 発表標題 Development of synthesis methods of odor sesquiterpenoids using ferric-chelate reductase
3. 学会等名 Biotrans2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Riku Aono, Tomoya Yoshihara, Hotaka Nishida and Kuniki Kino
2. 発表標題 A novel reversible decarboxylase towards aromatic dicarboxylic acid
3. 学会等名 Biotrans2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松出めぐみ, 岡本姫佳, 木野邦器
2. 発表標題 ジオキシゲナーゼを利用した2-phenyl ethanolからのポリフェノール類の合成
3. 学会等名 第21回生体触媒化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅澤寛, 木野邦器
2. 発表標題 ferric-chelate reductaseを利用した化学的酵素的手法によるセシキテルペノイド合成
3. 学会等名 第21回生体触媒化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原良太郎, 西川健幸, 奥原拓也, 瀧澤健人, 木野邦器
2. 発表標題 trans-3-ヒドロキシプロリンの実用生産に向けたバイオプロセス開発
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅澤寛, 木野邦器
2. 発表標題 Fe ²⁺ -chelateおよびferric-chelate reductaseを組み合わせたセスキテルペノイド合成法の開発
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青野陸, 森弘樹, 原良太郎, 木野邦器
2. 発表標題 4-メトキシサリチル酸を生成する6-メトキシサリチル酸脱炭酸酵素の発見
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木瓊花, 重井宏介, 古屋俊樹, 木野邦器
2. 発表標題 グラム陰性細菌およびグラム陽性細菌を用いたポリフェノールの生産
3. 学会等名 酵素工学会研究会第82回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳川洋晟, 勝又智哉, 中島悠太, 原良太郎, 平沢泉, 木野邦器
2. 発表標題 ヒスチジンおよびグルタミンを基質とする新規水酸化酵素による反応生成物の絶対構造解析
3. 学会等名 酵素工学研究会第82回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉原 朋矢, 青野 陸, 木野 邦器
2. 発表標題 新規可逆的脱炭酸酵素4-hydroxyisophthalic acid decarboxylaseの諸性質解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度福岡大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川鍋 一樹, 青野 陸, 木野 邦器
2. 発表標題 バイオプロセスによるフルフラールからの2,5-フランジカルボン酸生産
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度福岡大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西田穂高、青野陸、吉原朋矢、木野邦器
2. 発表標題 芳香族ジカルボン酸に対する新規可逆的脱炭酸酵素の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉原朋矢、青野陸、木野邦器
2. 発表標題 4-hydroxyisophthalic acidに対する新規可逆的脱炭酸酵素の同定と遺伝子解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木野邦器
2. 発表標題 有用微生物酵素の探索とバイオプロセス開発への応用研究
3. 学会等名 日本生物工学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 古屋俊樹、木野邦器	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報	5. 総ページ数 515
3. 書名 バイオリアクターのスケールアップと物質生産	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------