

平成22年6月3日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20880001  
 研究課題名（和文） テレフタル酸合成を目的としたバイオ法による芳香族カルボン酸合成能効率化因子の探索  
 研究課題名（英文） Screening of the effective microbial functions for the sustainable resin production  
 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

研究成果の概要（和文）：本研究では、汎用樹脂原料である *p*-ヒドロキシ安息香酸(HBA)とテレフタル酸(TPA)のバイオ合成を確立するために、効率的な遺伝子組換え技術の確立と微生物機能の同定を目的とした。(i) *Pseudomonas putida* JCM6156 株ゲノム DNA への特異的な遺伝子挿入技術の効率化に成功した。(ii) HBA バイオ合成の効率化には、チロシンアンモニアリアーゼの発現効率化が重要であることを明らかにした。(iii) TPA 合成反応の同定に向けて2,5-ジヒドロキシテレフタル酸(DHTPA)分解微生物探索を実施し、DHTPA 分解に関わる数株の分解菌を同定した。

研究成果の概要（英文）：This study was focused on the establishment of effective homologous recombination and the identification of essential microbial function for *p*-hydroxybenzoate (HBA) and terephthalate (TPA) production. The results showed that (i) the effective homologous recombination in *Pseudomonas putida* JCM6156, (ii) importance of effective expression of tyrosine ammonia lyase, (iii) identification of bacteria involved in 2,5-dihydroxyterephthalate degradation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学 / 応用微生物学

キーワード：テレフタル酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸、相同組換え、サイクロセリン、チロシンアンモニアリアーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

近年、世界的に非食系バイオマス（リグノセルロース）からの燃料・化学品生産を行うバイオリファイナリーが推し進められてお

り、セルロース由来糖質を効率的に獲得する技術やセルロース由来糖質を多様な化学品へと変換する技術が求められ、盛んに研究開発が行われている。特に石油化学に立脚する

合成樹脂産業は、原油の高騰や供給の不安定も重なり、バイオマス由来糖質から樹脂などポリマー原料の合成に対して積極的な開発を進めている。現在発酵生産がすすめられている化合物としては、乳酸、コハク酸、プロパンジオールなどが挙げられるが、ポリマー材料として多用されている芳香族カルボン酸のバイオ合成に関する研究例は少なく、*p*-ヒドロキシ安息香酸(HBA)や桂皮酸(CA)などの芳香族カルボン酸を生産する代謝系を導入した組換え微生物の作出例は報告されているものの生産性が低く、収率を向上させる取り組みは十分に行われていない。さらに、汎用化学品の中で最も広く普及しているテレフタル酸(TPA)については、化学反応によるエタノールからのTPA合成が検討されているが収率は低く、バイオ法によるTPA合成に関する報告はない。

## 2. 研究の目的

本研究では、汎用化学品の中で重合してポリマー化した際に、耐熱性に寄与するベンゼン環構造を保持する芳香族カルボン酸(HBA、TPA)のバイオ合成に焦点をあてる。

課題1として、*Pseudomonas putida*種を宿主として芳香族カルボン酸、特にHBA合成微生物を育種し、合成能向上に関わる因子を明らかにする。

課題2として、これまでのスクリーニングの欠点を解消したスクリーニング法を用いてテレフタル酸(TPA)合成に関わる微生物機能を探索する。

## 3. 研究の方法

### (1) HBA合成微生物の育種

#### 供試菌

*Pseudomonas putida* JCM6156 株

*Escherichia coli* DH5 株

*Rhodobacter sphaeroides* NBRC12203 株

チロシンアナログ耐性変異株の作出

*P. putida* JCM 6516 株をLB液体培地5 mLに植菌し、一晚振盪培養した。培養液の2% (100  $\mu$ L) を新たなLB液体培地5 mLに植菌し、2.5時間振盪培養した。培養後、6000  $\times$  gで5分間遠心分離し菌体を回収したのち、0.1 Mクエン酸 buffer (pH 5.5) 1 mLを加え、懸濁したのち6000  $\times$  gで5分間遠心分離し、上清を廃棄した。これを2回繰り返した。洗浄後、クエン酸 buffer 1 mLに菌体を懸濁し、

最終濃度が50  $\mu$ g/mLになるように、2 mg/mL NTG 溶液を25  $\mu$ L加え混合し、30  $^{\circ}$ Cにて10分静置した。菌体を遠心分離により回収した後、無機塩培地 (pH7.0) を1 mL加え、十分に懸濁して再度遠心分離を行う操作を繰り返し、菌体を洗浄した。洗浄後の菌体を無機塩培地1 mLに懸濁し、懸濁液の100  $\mu$ Lを新しいLB液体培地5 mLに植菌し、一晚振盪培養した。培養後、 $10^0 \sim 10^{-5}$ に段階希釈した溶液を調製し、それぞれ100  $\mu$ Lを1% Glucoseと100  $\mu$ M 3-Fluoro-tyrosineを含む無機塩寒天培地に展開し、良好に生育するコロニーをチロシンアナログ耐性変異株とした。

tyrosine ammonia lyase (*tal*) 遺伝子のクローニング

*tal* 遺伝子を保持する *R. sphaeroides* NBRC 12203 株のゲノム DNA を鋳型として、*tal* 領域増幅のためのPCRを行った。プライマーは *tal*F (5' - ATCGTCTAGATTAAGAGGAGAAATTAAC TATGAAGCCAATGCTCGCCAT -3') と *tal*R (5' - ATCGTCTAGATTAGCTGATCGCCATCGAGGTC -3') を使用した。得られた *tal* 遺伝子を挿入したプラスミドを保持する形質転換体を用いて、休止菌体 Tyr 変換試験を行った。分析には HPLC Agilent 1200 system を使用し、カラムは Agilent Eclipse XDB-C18 (4.6  $\times$  150 mm) を使用した。検出波長は280nm、カラム温度は30  $^{\circ}$ C、移動相流量は1 mL/min、0-2分: A液 (15% CH<sub>3</sub>OH、1% CH<sub>3</sub>COOH) 100%、6-7分: B液 (50% CH<sub>3</sub>OH、1% CH<sub>3</sub>COOH) 100%の移動相グラジェント条件で行った。

*p*-hydroxybenzoate hydroxylase (*pobA*) 遺伝子破壊株の作出

*pobA* 遺伝子を含む約2.2 kbp DNA断片を *pob*AF (5' -AGCTGAATTCGGCAGTACCAAAGGTCAGG A-3') と *pob*AR (5' - AGCTGGATCCAGATCTGCT TTGGCGTGTCT -3') を使用したPCRにより増幅し、pK19*mobsacB*ベクターにクローニングした。挿入断片中に *Pst*I サイトにpHP45 Tcプラスミド由来の *tetA* 遺伝子を含む約2.0 kbp断片を挿入した(pK*pobA*-Tc)。

*P. putida* JCM6156 株へのpK*pobA*-Tcの導入は三親接合伝達法により行った。*pobA* 遺伝子破壊株を単離するために、得られた形質転換体群をD-サイクロセリン (50  $\mu$ g/mL) と0.2%の

HBA を含む無機塩培地に懸濁し、一晚振盪培養した。遠心分離により回収された菌体をテトラサイクリン (Tc) を含む LB 培地に塗抹し、得られた Tc 耐性株について PCR 法によりゲノム DNA 上の *pobA* 遺伝子への *tetA* 遺伝子の挿入を確認した。

(2) TPA 合成に関わる微生物機能の探索  
2,5-ジヒドロキシテレフタル酸(DHTPA)分解微生物のスクリーニング

日本各地 64 ヶ所より採取した土壌・湖沼水に含まれる微生物群から DHTPA 分解微生物の探索を行った。液体培地を調製した。日本各地から採取した土壌 1 g または湖沼水 1 mL を、0.2% の DHTPA を含む無機塩液体培地を入れた試験管に混合し、30 で培養した。定期的に分光光度計を用いて 200-400 nm の波長における吸光度を測定した。基質の消費に伴う吸光度の減少が確認されたサンプルは、さらに 2 回の集積培養を行った。集積後、0.2% の DHTPA を含む寒天培地上で純化し、16S rDNA 配列解析から、近縁種を推定した。

4. 研究成果

(1) HBA 合成基本微生物の作出

*P. putida* JCM6156 株の代謝経路内にはコリスミ酸から HBA を合成する chorismate pyruvate-lyase をコードする *ubiC* 遺伝子が存在するが、chorismate pyruvate-lyase は非常に強い生成物阻害を示すことが報告されており、*ubiC putative* 遺伝子の発現強化による HBA の生産性向上は困難である。そこで本研究では Tyr を代謝中間体として HBA を合成する代謝経路を検討した。Tyr を *p*-クマル酸への変換に関わる *tal* 遺伝子は、フェニルプロパノイドなどの二次代謝産物の合成が行われている植物に存在する遺伝子であり、*P. putida* JCM6156 株など原核生物には存在しないとされてきた。しかしながら近年 *Rhodobacter sphaeroides* NBRC12203 株に *tal* 遺伝子が存在し、 $K_m$  値が他の *Rhodobacter* 属と比較して低い値を示すことが報告されたため *P. putida* JCM6156 株へ、*R. sphaeroides* NBRC12203 株由来 *tal* 遺伝子の導入を検討した。*P. putida* と同じグラム陰性細菌である大腸菌において発現させ、酵素機能を評価したところ、*R. sphaeroides* NBRC12203 株由来

の *Tal* タンパク質は、酵素活性が非常に弱く (変換率 18%)、高発現系の構築や Codon usage の最適化などの効率化が求められる。これまでに HBA バイオ合成に関する取り組みはなされているものの、高生産された事例は少ない。本研究では、その原因が *tal* 遺伝子の発現・活性に有ることを見出した。

*P. putida* 種は芳香族化合物に対する耐性が高いことが知られており、多様の工業原料生産の有用な宿主として期待されている。しかしながら、特異的な遺伝子破壊や遺伝子挿入を行った育種例は少ない。これは *P. putida* 種においては非特異的な組換えが起こりやすいことに起因する。本研究では、上記 3 (1)

に示すような、特異的な組換えが生じた組換え体のみを濃縮するという改良を加えた *P. putida* の遺伝子組換え技術を確認することに成功した (図 1)。

今後、*tal* 遺伝子の改良を行い、確立した遺伝子組換え技術を活用することで HBA 合成基本微生物の作出が期待できる。

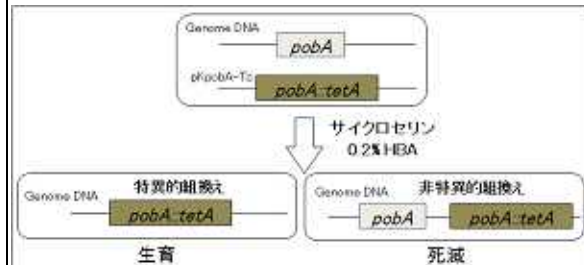


図 1 サイクロセリンを活用した特異的遺伝子組換え株の選抜

(2) TPA 合成に関する微生物機能の探索

TPA のバイオ合成反応は、安息香酸のカルボキシル化反応が想定される。そのため自然界から安息香酸を TPA に変換する微生物機能を同定することにより、TPA バイオ合成反応を確立できると考えられる。しかしながら、これまでに報告されているカルボキシル化芳香族化合物 (HBA、3,4-ジヒドロキシ安息香酸など) の合成酵素に関する報告によれば、「合成酵素は  $CO_2$  分圧が高い条件では合成反応を進行し、大気環境のように  $CO_2$  分圧が低い条件では逆の分解反応を進行するという、 $CO_2$  分圧に依存した可逆反応性の酵素」である (図 2)。

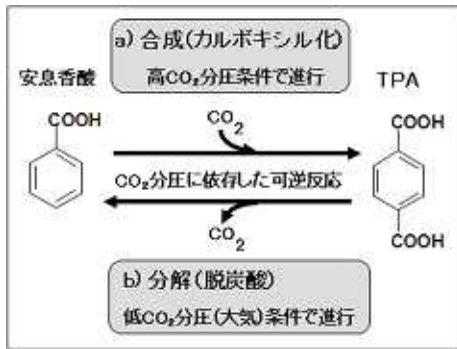


図2 想定する可逆的TPA合成反応

そのためTPA合成反応の確立には、上述のような安息香酸をTPAに変換する微生物機能ではなく、自然界からTPAの分解(脱炭酸)反応を有する微生物群を単離することが重要であり、その中からCO<sub>2</sub>分圧が高い条件でTPA合成反応を触媒できる可逆反応を同定するというプロセスが考えられる。しかしながらTPA脱炭酸反応を有する微生物の報告例はない。この理由として、TPA脱炭酸反応産物である安息香酸は水溶性が非常に低いためTPAを基質とした分解菌スクリーニングは、たとえTPA脱炭酸反応を保持する微生物が存在しても、細胞内での溶解性に乏しいために代謝速度が遅く、優位に選抜されないことが考えられた(図3)。

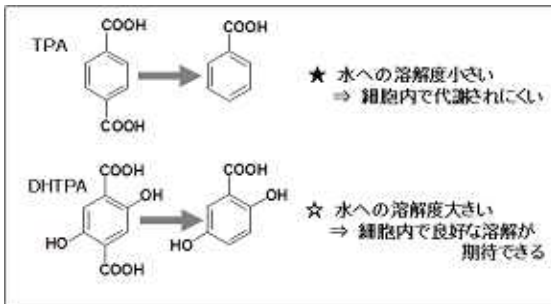


図3 TPA脱炭酸反応とDHTPA脱炭酸反応の比較

この要因を回避するために、TPAに化学構造が類似し、かつ脱炭酸反応産物の水溶性が高いDHTPAを基質とした分解菌スクリーニングを行った。3回の集積培養を繰り返した試料の中から、培養液中に含まれる微生物の純化を行い、単離源が異なる27種類の微生物を純化した(表1)。

単離した27種類の株についてDHTPAの分解能を評価したが、単一微生物によるDHTPA分解は確認できず、DHTPAの分解は複数の微生物による複合的な反応に

より進行していることが明らかになった。これまでにTPAバイオ合成に向けた微生物反応探索および改良の取り組みは報告されていないが、この反応の重要性は高い。今後、単離段階の培養条件や分解基質などを検討し、TPA合成に関する微生物機能同定に向けたスクリーニングを進めていく。

表1 単離微生物の近縁種と相同性

菌株番号	近縁種	相同性(%)
126-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain DM1	99
127-1	<i>Ochrobactrum</i> sp. SOTS14	99
128-1a	<i>Ochrobactrum anthropi</i> strain RFNB9	99
128-1d	<i>Microbacterium natoriense</i> strain TNJL143-2	99
128-1e	<i>Shinella</i> sp. 3-2	100
129-2	<i>Ochrobactrum</i> sp. LJJS1-2	99
130-1	<i>Bacillus</i> sp. HXG-C6	100
133-1a	<i>Bacillus coagulans</i> strain C1H	99
134-1	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain B7	99
138-1	<i>Bacillus</i> sp. BEN2C-01d	99
142-1	<i>Rhodococcus globerulus</i> strain AZ1-15	99
145-1b	<i>Bacillus</i> sp. MHS001	100
148-1	<i>Bacillus</i> sp. B31	96
158-1c	<i>Bacillus</i> sp. BEN2C-01d	99
161-1	<i>Rhodococcus globerulus</i> strain AZ1-15	99
166-1b	<i>Bacillus cereus</i> isolate FM10	97
173-1	<i>Arthrobacter</i> sp. YM-M-25	99
199-1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain Y1	99
209-1	<i>Pseudomonas geniculata</i> strain XJUH-12	99
256-1	<i>Bacillus cereus</i>	94
260-1	<i>Achromobacter</i> sp. ALB1	99
KG4L-1a	<i>Sphingobacterium</i> sp. cxd-8	85
KG4L-1b	<i>Pseudomonas</i> sp. F5-2	99
KG10L-1	<i>Microbacterium oxydans</i> strain 187	99
KG10L-2b	<i>Alcaligenes</i> sp. CGBAU 10750	99
KG10L-2c	<i>Microbacterium esteraromaticum</i> strain PA4	98
KG10L-3	<i>Pseudomonas</i> sp. L-3	99

## 5. 主な発表論文等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし