

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：11201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25820395

研究課題名(和文)新規酵素探索による未利用資源を利用したグリコール酸の微生物合成系構築

研究課題名(英文) Construction of the metabolic pathway for microbial production of glycolic acid from unutilized resources by an enzyme screening

研究代表者

山田 美和 (Yamada, Miwa)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：90586398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：有用なグリコール酸(GA)の環境調和型生合成プロセスを構築するため、本研究では、未利用資源のエチレングリコールを原料としたGAの微生物合成を目指した。GA合成に関するグリコールアルデヒド酸化酵素産生微生物の探索を行い、見出した酵素は、基質への活性が高くGA合成に適した新規酵素であった。さらに、GA合成経路にGA酸化酵素を組み合わせ有用なグリオキシル酸も合成可能なことから、GA酸化酵素産生微生物も探索し、グリオキシル酸合成に適した基質特異性を有する新規酵素を発見した。本酵素の遺伝子を取得し組換え大腸菌発現系を構築後、アミノ酸変異を導入し、粗酵素の比活性が約1.2倍向上した変異体作成に成功した。

研究成果の概要(英文)：To establish an eco-friendly method for obtaining useful materials from inexpensive raw materials, we focused on a microbial production of glycolic acid from ethylene glycol. We isolated a bacterial strain, Burkholderia sp. AIU 129, that produces an enzyme catalyzing the oxidation of glycolaldehyde into glycolic acid. The enzyme was the first aldehyde oxidase which oxidizes glycolaldehyde and consists of three heterosubunits. Furthermore, we also found Ochrobactrum sp. AIU 033 which produces a novel alcohol oxidase (ALOD) that catalyzes the oxidation of glycolic acid to glyoxylic acid. The ALOD is expected to be useful to produce glyoxylic acid by combining with the pathway for glycolic acid production from ethylene glycol. The cloned ALOD gene was expressed as an active product in recombinant Escherichia coli. We succeeded in creating the ALOD mutant which the crude enzyme solution showed 1.2-fold higher activity than that of wild-type ALOD.

研究分野：応用微生物学

キーワード：グリコール酸 エチレングリコール グリオキシル酸 酸化酵素 微生物合成

### 1. 研究開始当初の背景

グリコール酸(GA)は、最もシンプルな化学構造を有する  $\alpha$ -ヒドロキシ酸である。GA は、化学工業、食品工業など多岐の用途にわたって活用されている有用な物質である。また、GA を高分子化することによって、高付加価値なポリグリコール酸を合成することができる。現在 GA は、主にクロロ酢酸と水酸化ナトリウムの反応で化学合成される、または植物内に蓄積している GA を抽出することにより得られている。これらの GA 合成プロセスにおいて、化学合成法では、GA 以外の副反応生成物が生成され収率が低下してしまう問題がある。さらに、高温、高圧条件下での反応が必要であるため環境に負荷をかける恐れがある。また、植物生体内で合成される GA を抽出する場合、植物には GA を速やかにグリオキシル酸、シュウ酸へと変換する代謝経路が存在するため、高度に GA を蓄積している原料であるとは限らない。よって、本研究では、従来よりも生産性の高い GA 合成系の構築を目指し、微生物による GA 合成に着目した。

### 2. 研究の目的

多岐の用途に利用されている GA の環境に調和した生合成プロセスを構築するため、本研究では、エチレングリコールを原料とした GA の微生物合成を目指した。エチレングリコールは、処理が課題となっている廃不凍液の主成分であるため、本研究で提案する GA 合成系は、低コストなものづくり技術および環境浄化に貢献できる可能性が高い。本研究では、GA 合成に関与するグリコールアルデヒド酸化酵素を産生する微生物を自然界よりスクリーニングし、当該酵素を精製、遺伝子を取得することにより、大腸菌をプラットフォームとした生産性の高い GA 微生物合成系を構築することを目的とした。さらに、GA 合成系に他の酵素を組み合わせることで、GA 以外の有用物質(本研究ではグリオキシル酸に注目)についても微生物合成可能な代謝経路の構築を目指した。

### 3. 研究の方法

グリコールアルデヒド酸化酵素を産生する微生物を自然界より探索した。スクリーニングには、基質を含んだ反応液を、培養したプレート上のコロニーに添加し、コロニーの赤呈色の有無で判断するという当研究室で実績のある方法を用いた。次いで、当該微生物からグリコールアルデヒド酸化酵素を精製し、基質特異性や最適反応温度、pH、反応動力学定数など、酵素学的な性質を解明した。得られた N 末端アミノ酸配列情報より縮退プライマーを設計し、ゲノム DNA を鋳型としてグリコールアルデヒド酸化酵素遺伝子を PCR 増幅し、得られた遺伝子を組換え大腸菌内に導入して微生物細胞内に GA 合成経路を構築することを試みた。さらに、本研究では、目

的としている GA 合成経路を利用してさらなる有用物質合成へと展開するべく、GA 酸化酵素産生菌の探索も上記と同様の方法を用いて行った。

### 4. 研究成果

(1) *Burkholderia* sp. AIU 129 由来アルデヒド酸化酵素  
グリコールアルデヒドを GA へと変換するグリコールアルデヒド酸化酵素を産生する微生物のスクリーニングを行った。2-methoxyethanol を主な炭素源とした培地による集積培養と、菌株のコロニーに基質と発色液の混合液を滴下し赤呈したものを候補菌として選抜するプレートアッセイを組み合わせスクリーニングを行い、グリコールアルデヒド酸化能を有するアルデヒド酸化酵素を産生する *Burkholderia* sp. AIU 129 を見出した。得られた菌株より目的酵素の精製を行い、諸性質を明らかとした。結果、本酵素はグリコールアルデヒドへの活性が高く、GA には活性を示さなかったため、目指す GA 酸合成において副反応生成物を合成せず、有効であることがわかった。また、本酵素のようにヘテロ三量体構造を有するアルデヒドオキシダーゼが、グリコールアルデヒドに活性を示す報告はなく、本酵素は新規酵素であると推定された。しかしながら、本酵素の遺伝子取得には至らず、今後は本酵素の遺伝子クローニングと組換え菌における発現系構築による GA 合成経路の構築が求められる。

(2) *Ochrobactrum* sp. AIU 033 由来アルコール酸化酵素  
本研究で構築を目指すエチレングリコールから GA の合成経路に GA 酸化酵素を組み合わせることで、有用物質のグリオキシル酸も合成可能なことから GA 酸化酵素を産生する微生物についても併せてスクリーニングを行った。結果、1,2-propanediol を主な炭素源とする培地を用いた集積培養とプレートアッセイにより *Ochrobactrum* sp. AIU 033 を選抜した。選抜した菌体から目的酵素を精製し、基質特異性を検討した結果、本酵素はグリコール酸、乳酸、および C2-C10 の炭素鎖を有する第一級アルコールに作用したが、グリオキシル酸には作用せず、グリオキシル酸合成系に有効と確認できた。また、本酵素の GA に対する  $K_m$  値は、第一級アルコールに対する  $K_m$  値よりも著しく高いことから、本酵素は当初考えていた GA 酸化酵素ではなく、アルコール酸化酵素に分類されると推定された。さらに、本酵素のサブユニット構造や補因子は、既知のアルコール酸化酵素だけでなく GA 酸化酵素とも異なっており、本酵素についても、物質生産に有用であるのみでなく、新規酵素であると示唆された。また、(1) で得られたアルデヒド酸化酵素に関しては、研究期間内で目的酵素遺伝子のクローニングを達成することはできなかったが、本酵素

に関しては、遺伝子クローニングおよび組換え大腸菌における発現系を構築し、アミノ酸変異導入を行うことによって、粗酵素レベルではあるが、GA に対する比活性が約 1.2 倍程度向上した活性向上変異体の創製に成功した。

5. 主な発表論文等  
〔雑誌論文〕(計 3 件)

Miwa Yamada, Kimiyasu Isobe, A novel microbial aldehyde oxidase applicable to production of useful raw materials, glycolic acid and glyoxylic acid, from ethylene glycol, OMICS International, Fermentation Technology, 査読有, Vol. 4, No. 4, 2015, pp. 1-2, <http://dx.doi.org/10.4172/2167-7972.1000116>

Miwa Yamada, Keika Adachi, Natsumi Ogawa, Shigenobu Kishino, Jun Ogawa, Michihiko Kataoka, Sakayu Shimizu, Kimiyasu Isobe, A new aldehyde oxidase catalyzing the conversion of glycolaldehyde to glycolate from *Burkholderia* sp. AIU 129, Journal of Bioscience and Bioengineering, 査読有, Vol. 119, No. 4, 2015, pp. 410-415, <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.09.005>

Miwa Yamada, Takanori Higashiyama, Shigenobu Kishino, Michihiko Kataoka, Jun Ogawa, Sakayu Shimizu, Kimiyasu Isobe, Novel alcohol oxidase with glycolate oxidase activity from *Ochrobactrum* sp. AIU 033, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 査読有, Vol.105, 2014, pp. 41-48, <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.03.022>

〔学会発表〕(計 2 件)

山田 美和, 微生物による生分解性プラスチック合成 および微生物由来有用酵素に関する研究, 日本農芸化学会 2017 年度大会(招待講演), 2017 年 3 月 17 日~2017 年 3 月 20 日, 京都女子大学

山下 岳士, 山田 美和, 下飯 仁, 磯部 公安, 組換え大腸菌におけるエチレングリコールを原料としたグリオキシル酸合成経路の構築, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 3 月 17 日~2017 年 3 月 20 日, 京都女子大学

松村 健児, 山田 美和, 西山 賢一, 下飯 仁, 磯部 公安, *Ochrobactrum* sp. AIU 033 由来アルコール酸化酵素の高機能化, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 3 月 17

日~2017 年 3 月 20 日, 京都女子大学

Miwa Yamada, Hitomi Muto, Kimiyasu Isobe, Hitoshi Shimoi, Glyoxylic acid production from glycolic acid by resting cells of recombinant *Escherichia coli* harboring a novel alcohol oxidase gene from *Ochrobactrum* sp. AIU 033, 1st UGAS, Iwate University International Symposium, 2016, 2016 年 12 月 17 日~2016 年 12 月 18 日, 岩手大学

高橋 迪子, 山田 美和, 磯部 公安, 進化学による *Ochrobactrum* sp. AIU 033 由来アルコール酸化酵素のグリコール酸酸化活性の向上, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016 年 3 月 27 日~2016 年 3 月 30 日, 札幌コンベンションセンター

山田 美和, 物質生産を目指した新規オキシダーゼの活用~微生物スクリーニングから人工進化まで~, 2015 年度日本生物工学会北日本支部札幌シンポジウム(招待講演), 2016 年 3 月 26 日, 北海道大学

Miwa Yamada, Hitomi Muto, Kimiyasu Isobe, Expression of a cloned alcohol oxidase gene from *Ochrobactrum* sp. AIU 033: Glyoxylate production from glycolate using resting cells of recombinant *Escherichia coli*, 2015 環太平洋国際化学会議 (PACIFICHEM 2015), 2015 年 12 月 15 日~2015 年 12 月 18 日, ホノルル国際会議場

武藤 瞳, 山田 美和, 磯部 公安, *Ochrobactrum* sp. AIU 033 由来アルコール酸化酵素のクローニングと組換え発現系の構築, 農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月 26 日~2015 年 3 月 29 日, 岡山大学

Miwa Yamada, Keika Adachi, Natsumi Ogawa, Shigenobu Kishino, Jun Ogawa, Michihiko Kataoka, Sakayu Shimizu, Kimiyasu Isobe, A new aldehyde oxidase catalyzing conversion of glycolaldehyde to glycolate from *Burkholderia* sp. AIU 129, Active Enzyme Molecule 2014, 2014 年 12 月 17 日~2014 年 12 月 19 日, 富山国際会議場

山田 美和, 東山 貴紀, 岸野 重信, 片岡道彦, 小川 順, 清水 昌, 磯部 公安, グリコール酸酸化活性を有する *Ochrobactrum* sp. AIU 033 由来アルコール酸化酵素, 第 11 回 21 世紀大腸菌研究会, 2014 年 6 月 5 日~2014 年 6 月 6 日, 繋温泉ホテル大観

山田 美和, 東山 貴紀, 岸野 重信, 片岡道彦, 小川 順, 清水 昌, 磯部 公安, グリコール酸酸化活性を有する *Ochrobactrum* sp. AIU 033 由来アルコール酸

化酵素の諸性質解明，日本農芸化学会 2014  
年度大会，2014年3月27日～2014年3月30  
日，明治大学生田キャンパス

山田 美和，微生物酵素を利用したもの  
づくり～生体触媒の利点を生かした物質生  
産を目指して～，第9回震災復興チャリテ  
ィーセミナー（招待講演），2013年11月1日，  
岩手大学

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

山田 美和（YAMADA, Miwa）

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：90586398