

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850041

研究課題名(和文) プロトカテク酸脱炭酸酵素の活性向上機構の解明と植物バイオマスからのムコン酸生産

研究課題名(英文) Characterization of the enhanced protocatechuate decarboxylase and bio-based muconic acid 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物バイオマスから基幹化学品であるcis,cis-ムコン酸(ccMA)を生産するためのボトルネックとされてきたプロトカテク酸脱炭酸酵素(Pdc)の活性化に資するメカニズムを明らかにし、この機能を利用して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の分子育種を達成した。Pdc活性を向上させるKpdBを発見し、KpdBはflavin prenyltransferaseであり、prenylated FMNがPdcの補酵素であることを明らかにした。またリグニン由来芳香族化合物モデルだけでなく稲わらリグニン由来の芳香族化合物からもccMAを生産できる微生物株を分子育種した。

研究成果の概要(英文)：In this work, the mechanism of protocatechuate decarboxylation was investigated to develop an efficient production of a platform chemical, cis,cis-muconic acid (ccMA). The expression of KpdB, annotated as a 4-hydroxybenzoate decarboxylase subunit B, with protocatechuate decarboxylase (Pdc) could enhance Pdc activity, and it was revealed that KpdB is a flavin prenyltransferase and produces prenylated flavin mononucleotide as a cofactor of Pdc. By using the enhanced Pdc activity, a new ccMA producing bacterial strain that can produce ccMA from not only lignin model compounds but also rice straw lignin-derived aromatics was developed.

研究分野：応用微生物学

キーワード：muconic acid protocatechuic acid decarboxylase bio-based monomer lignin

1. 研究開始当初の背景

本研究では多様な化学構造を有するリグニン由来の低分子フェノール類 (リグニン由来芳香族化合物) を効率よく *cis, cis*-ムコン酸 (ccMA) へ変換できる微生物反応の創出に取り組む。ccMA は安息香酸やカテコールの代謝経路に位置する化合物であり、水素添加によりナイロン原料となるアジピン酸 (270 万トン/年) へと容易に変換でき、ポリアミドやポリウレタン等の樹脂原料として幅広く利用できる。また非常に汎用性の高い樹脂原料であるテレフタル酸 (7000 万トン/年) の合成原料としても利用できる基幹化学品である。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その収率は低い。収率向上には代謝中間体であるプロトカテク酸 (PA) の脱炭酸反応の高活性化が必要であるという共通の考察がなされてきたが、未だ解決には至っていない。また糖質は、微生物を利用したエタノールや乳酸に代表される燃料や多くの基幹化学品生産の原料でもあることから、糖質以外の有機物を原料として生産する技術の開発も並行して進めるべきである。そこで本研究では、リグノセ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芳香族化合物を原料とした ccMA のバイオ生産に焦点をあてる。*Pseudomonas putida* や *Sphingobium* sp. などリグニン由来芳香族化合物を分解代謝する細菌は、多様なリグニン由来芳香族化合物を側鎖 (C-C) 開裂反応、脱メチル化反応、水酸化反応などを介して PA 代謝経路へと収斂する。この PA を脱炭酸してカテコール (CL) 代謝経路に誘導することができれば、リグニン由来芳香族化合物から ccMA を生産することが可能となる。しかし前述のようなリグニン由来芳香族化合物を分解する細菌では PA 脱炭酸酵素 (Pdc) は同定されていない。そのため、他の微生物由来の Pdc を導入しなければならないが、*pdc* の同定例は少なく、上述の糖質を原料とした ccMA 生産において高活性化が必要とされてきた *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* または *Enterobacter cloacae* 由来のものしかない。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに、*K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* A170-40 株由来の Pdc 活性の強化方法について検討を重ね、Pdc の活性化に効果的な遺伝子領域を同定した。そこで本研究では、脱炭酸活性が向上した高活性化 Pdc の生化学的諸性質および活性向上のメカニズムを解明すること、そして、高活性 Pdc を発現し、かつ多様なリグニン由来芳香族化合物から ccMA を生産できる微生物株を作出することを目的とした。

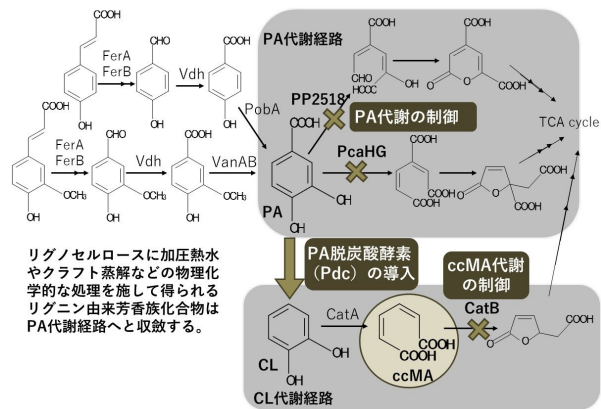


図 1 *P. putida* が有するリグニン由来芳香族化合物の主要代謝経路と ccMA 生産微生物の育種戦略

3. 研究の方法

(1) 供試菌およびプラスミド 供試菌

Escherichia coli

XL-1Blue *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZAM15 Tn10 (Tet^r)*].

BW25113

(*araD-araB*)567, (*rhaD-rhaB*)

568, *lacZ4787 (::rrnB-3), hsdR514, rp h-1*

JW2308 BW25113 derivative, *ubiX::Km*

Pseudomonas putida

KT2440 ATCC47054

IDPC KT2440 derivative, *pcaH -pcaG::aacC1-gfp, catB::Km*

プラスミド

pTS039 pUC118 derivative expressing 4-hydroxybenzoate consisting of *kpdB*, *kpdC* and *kpdD*, Amp^r

pTS036 a pMCL200 derivative expressing *pdc*, Cm^r

pTS052 pMCL200 derivative expressing *pdc* and *kpdB*, Cm^r

pTS094 pJB866 derivative harboring *Plac*, his-tagged *vanA*, *vanB*, *pobA*, *catA*, *pdc* and *kpdB*, Tet^r

pTS046 pUC118 derivative expressing *kpdB*, Amp^r

pTS106 pUC118 derivative expressing *ubiX*, Amp^r

(2) Pdc 活性化に関わる遺伝子領域の同定

pTS039 のデリベーションクローンを各種作成し、それらを用いて、*E. coli* XL-1Blue/pTS036 株を形質転換した。得られた形質転換体をそれぞれ、10 mg/L クロラムフェニコール (Cm) と 50 mg/L アンピシリン (Amp) を含む LB 液体培地 5 mL にそれぞれ接種し、30 °C で一晩振盪培養した。培養液を一部をそれぞれ 10 mg/L Cm, 50 mg/L Amp, 1 mM IPTG を含む新しい LB 液体培地 10 mL に接種し、OD₆₀₀ 0.8 となるまで 30 °C で振盪培養した。冷却遠心分離により培養液から細胞

を回収し、得られた細胞を氷冷した M9 液体培地で十分に洗浄した。得られた細胞を 1 mM PA を含む M9 液体培地に懸濁し、30 °C で振盪培養した。反応開始 1 h 後に、培養液中の PA および CL 濃度を HPLC (Agilent 1200 series, Agilent Technologies Ltd) 分析により定量した。

(3) Pdc の生化学的性質の評価

pTS036, pTS052 をそれぞれ用いて *E. coli* XL1-Blue 株を形質転換した。得られた形質転換体を LB 液体培地に接種して、OD₆₀₀ 0.8 となるまで 30 °C で振盪培養した。冷却遠心分離により細胞を回収し、得られた細胞を氷冷した 10 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.0) で十分に洗浄した。乳鉢・乳棒および細胞と等量の酸化アルミニウムを用いて細胞をすり潰し、5 mM Dithiothreitol (DTT) を含む 10 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.0) を用いて酵素を抽出した。冷却遠心分離により得られた上清を粗酵素液とし、Bradford Dye Reagent (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いてタンパク質濃度を測定した。粗タンパク質 1 mg, 5 mM DTT, 30 mM PA を含む 100 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.0) 1000 μL を調製して、Pdc 活性の最適温度を測定した。PA と CL は HPLC 分析により定量した。CL の生成速度が最大となった温度を最適温度とした。最適 pH の測定には、100 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 3.0-6.0), 100 mM リン酸カリウムバッファー (6.0-8.0), 100 mM トリス 塩酸バッファー (8.0-9.0) を使用して、上記と同様に基質を除いた反応液 900 μL を調製し、35 °C で 10 分間保温した。あらかじめ加温しておいた 300 mM PA 水溶液 100 μL を添加して酵素反応を開始し、その後の操作は前述の操作と同様に行い、CL 生成速度が最大となった pH を最適 pH とした。最適温度、pH 条件下で PA, *p*-Hydroxybenzoic acid (HBA), Gallic acid (GA), Vanillic acid (VA), Syringic acid (SA), 3-*O*-methylgallic acid (3MGA) に対する脱炭酸活性を測定し、基質特異性を評価した。

(4) *ubiX* 破壊株を利用した KpdB の機能評価

JW2308/pTS036 + pUC118, JW2308/pTS036 + pTS046, JW2308/pTS036+pTS106 を 10 mg/L Cm と 50 mg/L Amp を含む LB 液体培地 5 mL にそれぞれ接種し、30 °C で一晩振盪培養した。それぞれの培養液の一部を 10 mg/L Cm と 50 mg/L Amp を含む新しい LB 液体培地 10 mL に接種し、OD₆₀₀ 0.8 となるまで 30 °C で振盪培養した。IPTG を終濃度 1 mM になるように添加し、さらに 30°C で 3 時間振盪培養した。氷冷遠心分離により細胞を回収し、得られた細胞を氷冷した M9 液体培地で十分に洗浄した。細胞を 1 mM PA を含む M9 液体培地に懸濁し、30 °C で振盪培養した。反応開始 1 h 後に、培養液中の PA および CL 濃度を HPLC を用いて測定した。

BW25113/pUBC118, JW2308/pUC118, JW2308/pTS046, JW2308/pTS106 をそれぞれ 50 mg/L Amp を含む LB 液体培地 5 mL に植菌し 30°C で一晩振盪培養した。50 μL の培養液を 50 mg/L Amp, 1 mM IPTG を含む新しい LB 液体培地 5 mL にそれぞれ接種し、30°C で OD₆₀₀ 1.0 に達するまで振盪培養した。生理食塩水で 10 倍希釈した培養液 100 μL を、50 mg/L Amp, 1 mM IPTG を含む新しい 10 mL の LB 液体培地にそれぞれ接種し、30°C, 180 rpm で振盪培養し OD₆₀₀ の変化を OD-MonitorC&T (TAITEC Co.) を用いて測定した。

(5) ccMA 生産微生物株の作製と ccMA 生産能力の評価

P. putida KT2440 株のゲノム DNA を鋳型として、5' -ATGAATTCCTGATTCTGTCAGGGGTTAT-3' と 5' -GCTTCACCTCAGAAGAGCTCGGGCATGCCGGTTCTCTC-3' からなるプライマーセットを用いた PCR 法によって、protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit 遺伝子 (*pcaH*) の上流領域約 1.2-kbp の DNA 断片を増幅した。当該 DNA 断片を EcoRI と SacI で消化し、EcoRI と SacI で消化した pEX18Amp プラスミド DNA と連結した (pVTS003)。同じく KT2440 株のゲノム DNA を鋳型として、5' -GAGCTCTTCTGAGGTGAAGCTTGGG-3' と 5' -ATGGATCCTCCATCCTGTTCTCATCAA-3' からなるプライマーセットを用いた PCR 法によって、protocatechuate 3,4-dioxygenase alpha subunit 遺伝子 (*pcaG*) の下流約 1.2-kbp の DNA 断片を増幅した。当該 DNA 断片を SacI と BamHI で消化し、同じく SacI と BamHI で消化した pVTS003 プラスミド DNA と連結した (pVTS004)。pPS858 を SacI で消化して得られたゲンタマイシン (Gm) 耐性遺伝子を含む約 1.8-kbp の DNA 断片を、SacI で消化した pVTS004 プラスミド DNA と連結した (pVTS007)。pVTS007 を用いて *P. putida* KT2440 株を形質転換し、ナリジクス酸 (NaI) 25 mg/L, Gm 50 mg/L を含む LB 寒天培地で生育可能な形質転換体を選抜した。得られた NaI および Gm 耐性株を NaI 25 mg/L, Gm 50 mg/L, 10% (w/v) ショ糖を含む LB 液体培地に接種し、30 °C で 16 時間振盪培養した。培養液の一部を NaI 25 mg/L, Gm 50 mg/L, 10% (w/v) ショ糖を含む LB 液体培地に接種し、30 °C で振盪培養する操作を 2 回繰り返した。得られた培養液を NaI 25 mg/L, Gm 50 mg/L を含む LB 寒天培地上に塗抹し、30 °C で一晩静置培養した。生育した複数のコロニーから、ゲノム DNA をそれぞれ抽出し、PCR 法とサザンハイブリダイゼーション法により、*pcaG* 座および *pcaH* 座に Gm 耐性遺伝子を含む約 1.8-kbp の DNA 断片が挿入されていることが確認できた形質転換体を、*pcaHG* 破壊株とした。次に、*P. putida* PpY1100 株のゲノム DNA を鋳型として、5' -ACAAGCTTGCATGCCGATGCA CACCATGCAGCAG-3' と 5' -CCGGGATCCTCTAGACAGCTCTGTACCCAGGTG-3' からなるプライマ

ーセットを用いた PCR 法によって *cis,cis*-ムコン酸サイクロイソメラーゼ遺伝子 (*catB*) の一部を含む約 1.0-kbp の DNA 断片を増幅し, PstI と XbaI で消化した pK19*mobsacB* プラスミド DNA に Infusion cloning システムを用いて連結した (pTS073) .pUC4K プラスミド DNA を SalI で消化し, Km 耐性遺伝子を含む約 1.2-kbp の DNA 断片を, SalI で消化した pTS073 プラスミド DNA と連結した (pTS76) .pTS076 を用いて, 前述の *pcaHG* 破壊株を形質転換し, NaI 25 mg/L, Gm 50 mg/L, Km 25 mg/L を含む LB 寒天培地上で生育可能な形質転換体を選抜した. 得られた NaI, Gm および Km 耐性株を NaI 25 mg/L, Gm 50 mg/L, Km 25 mg/L, 10% (w/v) ショ糖を含む LB 液体培地に接種し, 30 で振盪培養した. 培養液の一部を NaI 25 mg/L, Gm 50 mg/L, Km 25 mg/L, 10% (w/v) ショ糖を含む LB 液体培地に接種し, 30 で振盪培養する操作をさらに 2 回繰り返した. 得られた培養液を NaI 25 mg/L, Gm 50 mg/L, Km 25 mg/L を含む LB 寒天培地上に塗抹し, 30 で静置培養した. 生育した複数のコロニーから, ゲノム DNA をそれぞれ抽出し, PCR 法とサザンハイブリダイゼーション法により, ゲノム DNA 上の *catB* へ Km 耐性遺伝子の挿入が確認できた形質転換体を, *pcaHG* と *catB* の両方を破壊した変異株とし, *P. putida* IDPC 株と命名した.

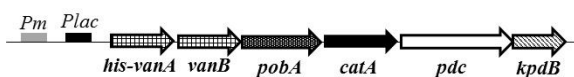


図 2 pTS094 が保持する遺伝子コンストラクト

pJB866 のマルチクローニングサイトに, *E. coli* 由来の lactose プロモーター配列 (*Plac*), pQE30 由来の Histidine tag が付加された *vanA* (*his-vanA*), *vanB*, *pobA*, *pdc*, *kpdB*, *catA* を連結し (図 2, pTS094), pTS094 を用いて IDPC 株を形質転換した. IDPC/pTS094 株を, 20 mg/L テトラサイクリン (Tc), 25 mg/L NaI, 50mg/L Gm, 25mg/L Km, 10 g/L Glucose を含む 50 mL の発酵培地 (6.025 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.875 g/L KH_2PO_4 , 22.1875 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2.9 g/L yeast extract, 100 mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 9.5 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.75 mg/L MgO, 2.0 mg/L CaCO_3 , 1.44 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.12 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.25 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.28 mg/L $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.06 mg/L H_3BO_3 , 51.3 mg/L conc. HCl) を入れた 300 mL 容バツフル付フラスコに接種し, 30 で回転培養した. 培養液 50 mL を 15 g/L Glucose, Antifoam 204 (Sigma-Aldrich Co. LLC.) 1 mL, 20 mg/L Tc, 25 mg/L NaI, 50 mg/L Gm, 25 mg/L Km を含む 1 L の発酵培地に接種し, 2 L 容ミニジャーファーマンター (ABLE Corp.) を用いて培養した (30, pH 7, 650 rpm, 2 L air/min). 培養開始 8 h 後に, Glucose 溶液と, リグニン由来芳香族化合物モデル (パニリン酸 (VA) または *p*-ヒドロキシ安息香酸

(HBA) またはフェルラ酸 (FA) または *p*-クマル酸 (CA) の水溶液 (それぞれ pH 8 に調整した) を添加した. FA または CA をそれぞれ 10 g 添加する条件では, 1.0 g/h の流加速度で, 20 g 添加する条件では 2.0 g/h の流加速度で添加した. また 10 g の基質を添加した培養では, 培養開始 15 h 後から Glucose を 1 g/h となるように流加を開始し, 20 g の基質を添加した培養では培養開始後 15 h 後から Glucose を 1 g/h, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を 132.14 mg/h となるように流加を開始した.

(6) 稲わらリグニン由来フェノール類を基質とした ccMA 生産

1% (w/v) NaOH 溶液を用いて, 稲わらを 170 で 10 分間加水分解処理した. 得られた上清を酸性化し, 酢酸エチルで抽出された画分を水に溶解して, 基質溶液とした. 基質溶液に含まれる芳香族化合物は, 酸性化した基質溶液から酢酸エチルで抽出される化合物を BSTFA (*N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) を用いて TMSi 化した後に, GC-MS (QP2010, 島津製作所) 分析および GC (7890A, Agilent Technologies Ltd.) 分析により同定および定量した.

IDPC/pTS094 株を, 20 mg/L Tc, 25 mg/L NaI, 50mg/L Gm, 25mg/L Km, 10 g/L Glucose を含む 50 mL の発酵培地を入れた 300 mL 容バツフル付フラスコに接種し, 30 で回転培養した. 培養開始 8 h 後に, 基質溶液を 1, 2, 5, 6, 8 または 10 mL 添加し, 計時変化を HPLC 分析により測定した.

4. 研究成果

(1) Pdc 活性化に関わる遺伝子領域の同定

3-(2)記載の方法で, pTS039 にクローン化された遺伝子断片のうち, Pdc 反応の強化に必須の領域を休止菌体反応により評価した. その結果, Pdc 反応を強化するためには *kpdB* の発現が必須であることを明らかにした.

(2) Pdc の生化学的性質の評価

3-(3)記載の方法で Pdc または Pdc と KpdB を含む大腸菌粗酵素液を調製し, Pdc 活性の最適温度・pH を評価した. その結果, KpdB 発現の有無にかかわらず, Pdc 活性の最適温度は 35, 最適 pH は 5.5 であることを明らかにした. 最適条件下では, KpdB の発現により酵素活性が約 20 倍に向上した. 次に Pdc の基質特異性を評価した. 基質には PA, HBA, GA, VA, SA, 3MGA を用い, PA を基質とした Pdc 活性の最適条件下で脱炭酸活性を評価した (表 1). Pdc は PA よりも GA に対して高い脱炭酸活性を示し, 3MGA に対しても脱炭酸活性を示すことが明らかとなった. 興味深いことに HBA に対しては脱炭酸活性を示さなかったことから, 安息香酸骨格の 3 位に位置する水酸基が, Pdc の基質認識に重要な官能基であることを明らかにした.

表 1 Pdc の基質特異性

Substrates	Relative activity (%)
PA	100
HBA	nd
GA	306.9
VA	nd
SA	nd
3MGA	49.4

高活性化した Pdc を精製して反応速度論的解析による Pdc の諸性質を明らかにするために、DEAE-イオン交換クロマトグラフィーによる Pdc の精製を行ったが、その比活性は、粗酵素中の比活性に対して約 1/2 に減少していた。Pdc が失活しやすい性質であるのか、安定性を評価したが、氷上で粗酵素液の調製から 24 時間以上経過しても、大きな Pdc 活性の減少は観察されなかったことから、Pdc は不安定ではなく、IEC によって Pdc 活性に必要な因子が分画されたことが示唆された。IEC で分画された各画分について SDS-PAGE を行った結果、Pdc と KpdB が同じ画分に溶出されてくると想定していたが、AroY (約 54 kDa) と KpdB (約 21.5 kDa) の推定分子量に相当する位置のシグナルは異なる画分で検出された。それぞれのシグナルに位置するタンパク質が Pdc と KpdB であることは、各シグナルからタンパク質を抽出し、MALDI-TOF-MS 分析に供し、Peptide Finger Print により解析した。得られたマススペクトルデータを用いて、Mascot software を使用した PMF 法により NCBI データベースに登録されているタンパク質を理論的に断片化したペプチド配列と比較した。その結果、約 54 kDa の位置から抽出されたタンパク質から得られたペプチド配列は、Pdc の推定アミノ酸配列と一致し、約 21.5 kDa の位置から抽出されたタンパク質から得られたペプチド配列は、KpdB の推定アミノ酸配列と一致した。Pdc と KpdB は DEAE-IEC により別の画分へと分画され、また IEC により得られた Pdc を含む画分と KpdB を含む画分を再度混合しても減少した Pdc 活性は回復しなかったことから、KpdB 発現による Pdc 活性の向上は、Pdc-KpdB タンパク質複合体形成というような直接的な相互作用ではない、何らかの間接的な相互作用であることが示唆された。

(3) KpdB 機能の解析

アミノ酸配列が KpdB と 49% の相同性を有する UbiX は、これまで 3-octaprenyl-4-hydroxy-benzoate decarboxylase と考えられていたが、flavin prenyltransferase であり、3-octaprenyl-4-hydroxy-benzoate decarboxylase (UbiD) の補酵素として prenylated FMN (prFMN) を合成することが報告された (White MD et al, Nature, 522, 502-506, 2015 他)。このことから Pdc も prFMN を補酵素として要求する decarboxylase であり、その prFMN が KpdB により合成された結果、Pdc 活

性が上昇したことが考えられた。そこで *ubiX::Km* 遺伝子型を保持する *E. coli* JW2308 株を用いて、この可能性を検討した (図 3)。Pdc を発現する JW2308 株形質転換体は Pdc 反応を進行しなかった。しかし、Pdc と UbiX を発現した JW2308 株形質転換体においては Pdc 反応が進行したことから、Pdc 反応は UbiX により合成される prFMN を要求する反応であることが明らかとなった。また、Pdc と KpdB を発現した JW2308 株形質転換体においても Pdc 活性が確認されたことから、KpdB は UbiX と同様に prFMN を合成することが示唆された。さらに、JW2308 株は親株である BW25113 株と比較して μ_{max} が約 1/2 に低下したが、UbiX または KpdB の発現によって μ_{max} が回復したことから、KpdB は UbiX と同様の Flavin prenyltransferase であることが強く示唆された。

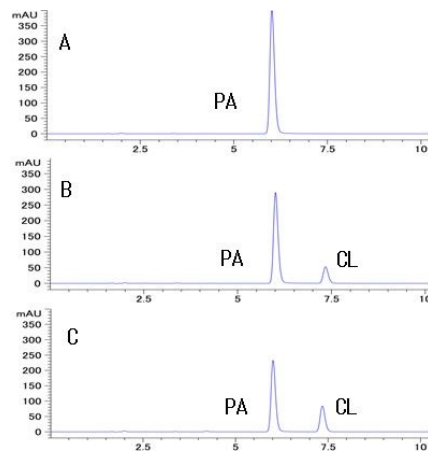


図 3 JW2308 株形質転換体による Pdc 反応

(A) *pdc* のみ発現, (B) *pdc* と *ubiX* を発現, (C) *pdc* と *kpdB* を発現

(4) ccMA 生産微生物株の ccMA 生産能力評価
初期濃度が 1 g/L となるように *p*-CA, FA, VA, HBA をそれぞれ添加し、ccMA の生産能力を評価した結果、*p*-CA, FA, VA, HBA それぞれから理論収量の ccMA が生産された。初期基質濃度を 2.5 g/L へと変更しても、*p*-CA, FA, VA, HBA それぞれの基質からの理論収量の ccMA が得られ、初期基質濃度をそれぞれ 5.0 g/L とした条件においても、理論収量の ccMA が得られた。基質の供給量を増大させるにつれて、PA や CL などの代謝中間体が一時的に蓄積する傾向が確認され、これらの濃度は基質添加量の増加に伴い増加したが、ccMA 生産率が低下することは見られなかった。さらに培養液 1L に対して添加する基質の量を 10 g, 20 g へと増やしても、特に代謝中間体である PA の一時的な蓄積が観察されたものの、理論収量の ccMA が得られた。以上の結果から、本研究で作出した IDPC/pTS094 株は、多様なリグニン由来芳香族化合物モデルから、理論収量の ccMA 生産を達成できる微生物株であることを明らかにした。

(5) 稲わらリグニン由来の芳香族化合物を原料とした ccMA 生産

基質溶液を 1, 2 または 5 mL 添加した条件は 2 回, 6 mL 添加した条件は 4 回, 8 または 10 mL 添加した条件は 3 回の繰り返し試験を行い, 以下はそれらの平均値を示した. 基質溶液を 1 mL 添加した条件では, ccMA の生産濃度は 99.4 mg/L, 2 mL 添加した条件では 176.7 mg/L, 5 mL 添加した条件では 350.0 mg/L, 6 mL 添加した条件では 376.6 mg/L として基質溶液を 8 mL 添加した条件では 454.5 mg/L と, 順調に基質添加量に比例して ccMA 生産が行われた. 以上の結果から, バイオマスから抽出されるリグニン由来芳香族化合物を基質とした ccMA 生産は可能であることを明らかにした.

しかし基質溶液を 10 mL 添加した条件では, ccMA 生産速度が小さくなり, ccMA 生産に対する阻害作用が観察された. この阻害作用を最小限にするための培養方法や基質の調製方法および耐性の高い微生物株の育種が, さらなる ccMA 高生産に向けた課題として挙げられた.

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1) Sonoki T, Morooka M, Sakamoto K, Otsuka Y, Nakamura M, Jellison J, Goodell B. Enhancement of protocatechuate decarboxylase activity for the effective production of muconate from lignin-related aromatic compounds. *Journal of Biotechnology*. 192:71-77. 2014. 査読有.
DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.10.027
- 2) 今仁志, 園木和典. 非可食バイオマスから有用基幹化合物を生産する微生物触媒の開発. *ケミカルエンジニアリング*. 60 (10):35-39. 2015. 査読無.

[学会発表] (計 7 件)

- 1) 園木和典. リグニン由来の芳香族化合物を原料としたポリマー原料生産. 第 26 回日本 MRS 年次大会 横浜市開港記念会館 (神奈川県横浜市) 2016 年 12 月 19-22 日
- 2) 菊地晃弘, 杉田晴佳, 顔昊, 高橋健司, 上村直史, 政井英司, 園木和典. リグニン由来のフェノール類を原料としたムコン酸生産. 日本生物工学会 2016 年大会 富山国際会議場 (富山県富山市) 2016 年 9 月 28-30 日.
- 3) Tomonori Sonoki, Akihiro Kikuchi, Takuya Ogata, Kenji Takahashi, Naofumi Kamimura, Eiji Masai. Enhancement of protocatechuate decarboxylation for the effective production of muconic acid from

renewable feedstocks. *Metabolic Engineering* 11, Awaji Yumebutai International conference center, Hyogo, June 26-30, 2016.

- 4) 菊地晃弘, 諸岡深雪, 尾形拓哉, 園木和典. リグニン由来フェノール類を原料としたムコン酸生産. 日本農芸化学会 2016 年大会 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市) 2016 年 3 月 27-30 日
- 5) 尾形拓哉, 今仁志, 菊地晃弘, 諸岡深雪, 園木和典. ムコン酸生産効率化に寄与する Protocatechuate decarboxylase 活性化機構の解析. 日本農芸化学会 2016 年大会 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市) 2016 年 3 月 27-30 日
- 6) 今仁志, 尾形拓哉, 菊地晃弘, 諸岡深雪, 園木和典. 4-ヒドロキシアニソキシムコン酸脱炭酸酵素サブユニットの発現が *cis, cis*-ムコン酸生産に及ぼす促進効果. 日本生物工学会 2015 年大会 城山観光ホテル (鹿児島県鹿児島市) 2015 年 10 月 26-28 日
- 7) 諸岡深雪, 今仁志, 園木和典. プロトカテキユ酸脱炭酸反応の強化とリグニン由来芳香族化合物を原料とした *cis, cis*-ムコン酸生産へのアプローチ. 日本農芸化学会 2015 年大会 岡山大学 (岡山県岡山市) 2015 年 3 月 26-29 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

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

(4) 研究協力者
なし