

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07735

研究課題名(和文) 微生物機能を利用した廃食用油からの機能性ポリマー生産系の構築

研究課題名(英文) Development of synthesis of waste edible oil-based polymers with microorganisms

研究代表者

岩木 宏明 (Iwaki, Hiroaki)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：00368200

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)：本研究では、廃食用油を原料としたポリマー生産系構築に資する遺伝子資源を獲得することを目的とし、廃食用油の主成分の1つであるオレイン酸から、シクロオクタノン、8-オクタノリドを経由し、ポリ(8-オクタノリド)を合成する系に資するシクロオクタノンモノオキシゲナーゼ遺伝子の取得・解析を試みた。さらに、オレイン酸からシクロヘキサンカルボン酸を経て4-ヒドロキシシクロヘキサンカルボン酸、4-ヒドロキシ安息香酸、プロトカテキュ酸、2-ピロン-4,6-ジカルボン酸を合成する系に資するシクロヘキサンカルボン酸分解系(芳香族化経路)遺伝子群の取得・解析を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

持続可能社会の実現には、化学製品の石油系資源依存から再生可能資源への切り替え(カーボンニュートラルの実現)は重要である。そのためには優れた物性を有し、食料とは競合しないバイオマス由来のポリマー生産系の構築が不可欠である。本研究結果により、家庭や飲食店、食品工場等から大量に出る廃食用油(廃バイオマス)を原料として利用した新規ポリマー生産系構築のための基盤技術を提供しうる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to screen genes that can be utilized to construct a polymer production system with waste edible oil as raw material. One major component of edible oil is oleic acid. We investigated genes encoding cyclooctanone monooxygenase, an enzyme that can synthesize poly(8-octanolide) from oleic acid via cyclooctanone and 8-octanolide. Additionally, we screened for cyclohexanecarboxylic acid-degrading genes from the aromatization pathway. The encoded enzymes can synthesize 4-hydroxycyclohexanecarboxylic acid, 4-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, and 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid from oleic acid via cyclohexanecarboxylic acid.

研究分野：応用微生物学

キーワード：バイオベースポリマー シクロオクタノン シクロヘキサンカルボン酸 微生物生産 廃食用油 バイオマス 廃棄物再資源化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は、Baeyer-Villiger モノオキシゲナーゼ (BVMO) に関する研究を行う過程で、植物廃油の主成分であるオレイン酸をはじめとした脂肪酸を原料とした2つのポリマー合成スキームを考案した(図1)。1つめの合成スキームの鍵過程は、シクロオクタノンから8-オクタノラクトンへのBaeyer-Villiger反応である。これまでに、多くのBVMO遺伝子のクローン化と高発現系の構築および、高発現系を利用した種々のケトンの変換について報告されているが、効率的にシクロオクタノンから8-オクタノラクトンに変換可能なBVMOの報告はなかった。2つめの合成スキームの主要部分は、シクロヘキサンカルボン酸(CHCA)の芳香族化分解経路である。シクロヘキサンカルボン酸分解系遺伝子の解析については、酸化経路において報告があったが、芳香族化経路に關与する遺伝子の報告は皆無であった。

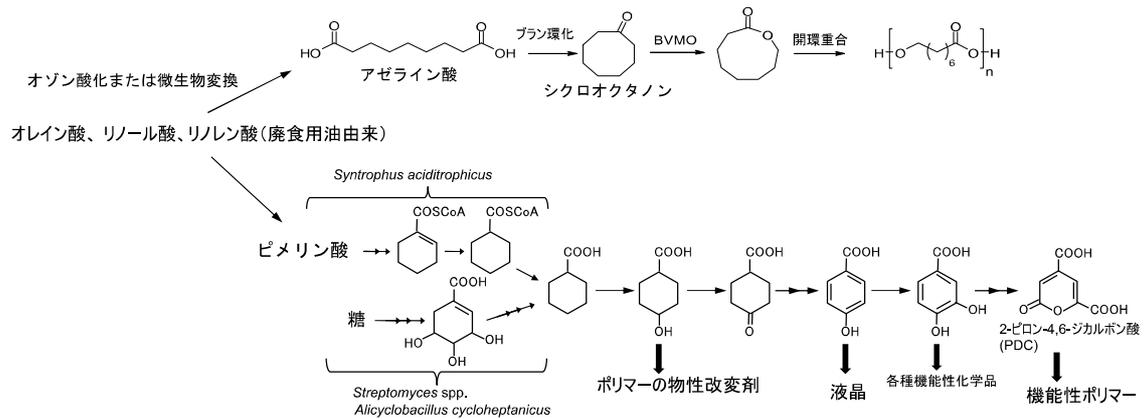


図1. 植物廃油由来脂肪酸からのポリマー原料合成系

### 2. 研究の目的

持続可能社会の実現には、化学製品の石油系資源依存から再生可能資源への切り替え(カーボンニュートラルの実現)が重要である。そのためには優れた物性を有し、食料と競合しないバイオマス由来のポリマー生産系構築が不可避である。本研究では、微生物機能を利用し、家庭や飲食店、食品工場等から大量に出る廃食用油(廃バイオマス)を原料としたポリマー生産系創出をめざし、本生産系に資する以下の遺伝子を取得・解析することを目的とする。

1. 8-オクタノラクトン生産菌構築に資するBVMO遺伝子
2. CHCA芳香族化分解経路遺伝子

### 3. 研究の方法

#### (1)シクロオクタノンモノオキシゲナーゼ高活性菌のスクリーニングとシクロアルカノンモノオキシゲナーゼ遺伝子の解析

シクロアルカノンの分解にはBVMOが重要な役割を果たしていることがわかっている。そこで、土壌・海水・研究室保存菌から、シクロオクタノン資化性菌をスクリーニングした。それら菌株のシクロアルカノンモノオキシゲナーゼ(CAMO)活性を測定し、相対的にシクロオクタノンモノオキシゲナーゼ(COMO)活性が高い菌株を選択した。

COMO活性が高いCAMOをコードする遺伝子を取得するため、既知のCAMOの保存配列をもとに設計された縮重プライマーを用いて、ゲノムDNAを鋳型として部分配列を増幅した。それら部分配列を足がかりに、インバースPCR法で全域を増幅し、塩基配列を決定した。決定した塩基配列を利用し、pETシステムにて、大腸菌異種発現系を構築した。真核微生物のCAMOにおいては、イントロンを除去するため、RT-PCR法で増幅したDNAをpETベクターに組み込んだ。

#### (2)シクロヘキサンカルボン酸(CHCA)芳香族化分解経路をコードする遺伝子の解析

CHCAを芳香族化経路で分解することが報告されているCorynebacterium cyclohexanicum MU株および、新たにCHCAを芳香族化経路で分解することが明らかとなったParaburkholderia spp.のゲノム配列を決定し、CHCA分解系遺伝子を検索した。pETシステムによる大腸菌異種発現を

構築し、CAMO 活性を確認することで標的酵素遺伝子を特定した。

#### 4. 研究成果

##### (1)COMO 高活性菌のスクリーニングと CAMO 遺伝子の解析

シクロオクタノン資化性菌の中から COMO 活性の強い菌株を選択し、*Lutimaribacter litoralis* KU5D5 株 (シクロヘキシル酢酸分解菌として単離)、*Phaeobacter* sp. KU2B3a 株を COMO 遺伝子取得の供試菌に決定した。更に、4~5 員環のシクロアルカノンラクトン化する BVMO を保持することが知られている真核微生物 *Exophiala jeanselmei* KUF1-6N 株についても遺伝子解析の対象とした。これら菌株の CAMO 遺伝子の塩基配列を決定し、推定アミノ酸配列を機能既知の BVMO のものと比較したところ、*L. litoralis* KU5D5 株および *Phaeobacter* sp. KU2B3a 株の CAMO (それぞれ、KU5D5\_CAMO, KU2B3\_CAMO) は共に、*Xanthobacter flavus* ZL5 株および *Acinetobacter* sp. NC1MB9871 株のシクロヘキサノン 1,2-モノオキシゲナーゼと最も高い類似性を示した (それぞれ 78% および 61% のアミノ酸一致率)。なお、KU5D5\_CAMO と KU2B3\_CAMO の推定アミノ酸配列は 96% のアミノ酸一致率を有していた。さらに、これら CAMO 遺伝子の周辺の塩基配列を解析した結果、シクロアルカノールの分解に関与すると考えられる遺伝子が存在し、解析した CAMO 遺伝子はシクロオクタノン分解系に関与することが強く示唆された。*E. jeanselmei* KUF1-6N 株からは、6 つの BVMO 遺伝子配列が得られ、そのうち 1 つの推定アミノ酸配列の N 末端領域が、標的酵素の N 末端配列と一致した。この BVMO を Ex\_CAMO と命名した。Ex\_CAMO の推定アミノ酸配列は、*Cylindrocarpus radialis* ATCC 11011 の CAMO のものと 54% のアミノ酸一致率であった。大腸菌で高発現したこれらの CAMO の活性を確認した結果、全ての CAMO が COMO 活性を有しており、KU2B3\_CAMO が最も高い活性を有していることが明らかとなった。さらに、Ex\_CAMO は、4 から 10 員環のシクロアルカノンをはじめとして広範囲のケトンに対して活性を有することが明らかとなった。

以上、本研究で得られた CAMO は、8-オクタノリド生産菌構築に貢献しうると考えられる。

##### (2)CHCA 芳香族化分解経路をコードする遺伝子の解析

CHCA を炭素源として培養した *C. cyclohexanicum* MU 株菌体から調製した無細胞抽出液の CO 差スペクトルを測定した結果、シトクロム P450 に特徴的な 450nm に極大をもつスペクトルが得られた。一方、グルコースを炭素源とした細胞から調製した無細胞抽出液では、このスペクトルは得られなかったことから CHCA により P450 が誘導されることが明らかとなり、CHCA の分解に P450 が関与することが示唆された。

CHCA 芳香族化分解経路をコードする遺伝子を検索するため、*C. cyclohexanicum* MU 株のゲノム配列を決定した。MU 株のゲノムは、4,413,566 bp からなる 1 つの環状染色体で構成されており、4,168 のタンパク質コード配列 (CDS) が検出された。これら CDS からシトクロム P450 遺伝子を検索した結果、7 つの P450 ホモログが検出され、そのうち一つが、CHCA 芳香族化分解経路をコードすると考えられる遺伝子群とクラスター (*chc* クラスターと命名) を形成していた。pET システムを利用し、大腸菌異種発現系を構築することで、*chc* クラスター内の遺伝子の機能を確認した結果、シトクロム P450 (ChcA) は、CHCA を水酸化する活性を有することが明らかとなった。更に、*trans*-4-ヒドロキシ CHCA デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*chcB1*)、*cis*-4-ヒドロキシ CHCA デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*chcB2*)、4-oxoCHCA desaturase 遺伝子 (*chcC*) が同定された。しかしながら、大腸菌で発現した ChcA の CHCA 変換活性、ChcC の芳香族化活性は微弱であったため、新たに CHCA 芳香族化経路を有する菌株を検索することとした。MU 株の CHCA 分解系遺伝子を問い合わせ配列とした BLAST 解析の結果、*Arthrobacter* 属細菌および *Paraburkholderia* 属細菌の一部の系統に ChcA, ChcB, ChcC のホモログが存在することが明らかとなり、これらの系統の細菌は CHCA 芳香族化経路を有することが示唆された。そこで、研究室で分離・保有していた *Paraburkholderia* 属細菌 3 株の CHCA 資化性を確認した結果、いずれの株も資化性を有しており、培養液には 4-ヒドロキシ安息香酸の蓄積が見られた。そこで、2 株 (NBA 株および DNP 株) を選択し、ゲノム配列を決定した。NBA 株のゲノムは、トータル 10.4Mbp からなる 5 つのレプリコンで構成され、9,559 の CDS が検出された。DNP 株のゲノムはトータル 10.4Mbp からなる 6 つのレプリコンで構成され、9,514 の CDS が検出された。これらのゲノム配列から *chcA*,

*chcB*, *chcC* を検索し、大腸菌異種発現により、標的酵素活性を有することを確認した。

以上、本研究で得られた遺伝子は、CHCA から各種ポリマー原料生産系構築に貢献しうると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamamoto T, Liu Y, Hasegawa Y, Iwaki, H	4. 巻 9
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of <i>Mameliella alba</i> Strain KU6B, a Cyclohexylamine-Utilizing Marine Bacterium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00273-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00273-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩木 宏明
2. 発表標題 海洋細菌からの有用機能の探索
3. 学会等名 日本防菌防黴学会 第46回年次大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本泰誠、田端美咲、岩木宏明、長谷川喜衛
2. 発表標題 大腸菌を宿主としたBaeyer-Villigerモノオキシゲナーゼ異種発現系の構築
3. 学会等名 第23回関西大学先端科学技術シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本泰誠、岩木宏明、長谷川喜衛
2. 発表標題 海洋性細菌由来シクロアルカノンモノオキシゲナーゼ遺伝子の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017年度合同大阪大会（第49回講演会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本泰誠、岩木宏明、長谷川喜衛
2. 発表標題 Exophiala jeanselmei KUF1-6N 株のシクロヘキサノンモノオキシゲナーゼ遺伝子の解析
3. 学会等名 第69回 (2017年度) 日本生物工学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----