

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11704

研究課題名(和文) 産業廃棄物活用を目指した有用有機酸類の合成：集積型バイオプロセスの新基盤開発

研究課題名(英文) Development of a novel bioprocess for production of useful organic acids from industrial wastes

研究代表者

山田 美和 (Miwa, Yamada)

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、これまで産業廃棄物として莫大な量廃棄されてきた不凍液や自動車エンジン冷却液の主成分であるエチレングリコールを原料とし、各種ポリマーや医薬品等の基幹化合物となる有機酸類へ微生物変換する環境低負荷型プロセスの構築を目的とした。その結果、複数の酵素反応を経て、組換え大腸菌細胞内で目的の反応系が駆動することを確認できた。続いて、細胞内のペリプラズムへ反応に必要な酵素類を集積させ、有機酸生産量の向上を目指したが、現状難航している。そこで、研究期間内では、各反応に利用している酵素の人工進化による活性向上変異体の創製を試み、野生型酵素よりも活性が向上した酵素変異体を複数種獲得することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上述したように、本研究で原料としての使用を目指しているエチレングリコールは、世界的に莫大な廃棄量となっている不凍液やロングライフクーラントの主成分である。これらの産業廃棄物を原料とし、微生物によるオールバイオプロセスの有用有機酸類合成系の基盤を構築した本研究は、SDGsの目標「12. つくる責任 つかう責任」および「13. 気候変動に具体的な対策を」と一致し社会的に強い意義を持つ。さらに、有用有機酸類の合成に必要な酵素類の進化実験を通じ、研究代表者らは、これまで独自に見出した新規酵素の構造・機能相関に迫る、酵素学的価値を持つ成果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：This research aims to utilize ethylene glycol, which is a main component of industrial wastes such as antifreezing solution and long-life coolant, for microbial production of useful organic acids. We established a pathway to produce the useful organic acids in recombinant *Escherichia coli* from ethylene glycol. In order to enhance productivity of the organic acids, we tried to accumulate all enzymes for the synthetic pathway of organic acids in periplasm. However, this challenge is currently going through difficulties. Thus, evolutionary engineering of the enzymes also carried out to enhance activity for each substrate, and we succeed to obtain some mutants with high activity.

研究分野：応用微生物

キーワード：バイオプロセス エチレングリコール グリコール酸 グリオキシル酸 微生物 物質生産

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自動車や暖房器具の普及にともない、ロングライフクーラント(LLC)や不凍液の廃棄量は世界的に莫大な量となっている。日本においても年間約 12 万トン廃棄されているが、主成分のエチレングリコールは生物毒性を有することから、環境中に放出できず、産業廃棄物として焼却や微生物処理されている。また、LLC は一部で再利用が試みられているが、ほとんどは処分されるだけの現状であり、廃棄物レスの観点から有効活用が望まれる。よって、本研究では、産業廃棄物として大量に処分される廃 LLC や不凍液の主成分であるエチレングリコールを有効活用し、有用物質へ変換することを目指す。本研究では、有用物質として、工業的に価値の高い有機酸であるグリコール酸とグリオキシル酸を対象とした。これらの有機酸は、化学工業、医薬品、食品工業分野等で幅広く利用される有用物質である。研究代表者らは、これまでエチレングリコールを原料としたグリコール酸およびグリオキシル酸を合成する酸化反応経路を提案し、各段階の反応を触媒し、基質特異性の厳密な微生物酵素を新規に見出してきた[1-3]。しかし、全ての酵素を個々に精製し、変換反応に用いるのはコストの面から望ましくない。よって、本研究では関連酵素をひとつの細胞に共発現し、基質と直接反応させる菌体反応に注目した。

2. 研究の目的

産業廃棄物由来エチレングリコールを利用し、実用化レベルの生産量を有する環境低負荷な有用有機酸類の合成系の構築を目指す。具体的には、(1) 目的有機酸類の合成に最適な高活性酵素を創製し、有機酸合成経路を組換え大腸菌の細胞質内に構築する、(2) 続いて、合成経路に関わる酵素群をペリプラズム内に移行・集積できる twin-arginine translocation (TAT) 系を利用して、基質との反応に酵素の近接効果をプラスし生成物合成量の向上を狙う、の 2 点を試みた。

3. 研究の方法

(1) 組換え大腸菌細胞質内における有機酸合成経路の構築と進化実験による高活性 alcohol oxidase (ALOD)変異体の創製

本研究では、エチレングリコールを出発原料として、グリコールアルデヒド、グリコール酸を介した 3 段階の酵素反応を経てグリオキシル酸へと変換する反応系を提案している。先行実験の結果、1,2 段階目の反応を触媒する酵素を微生物より新規に見出したものの、大腸菌等を宿主とした異種発現には成功していない。そこで、本研究では、同反応を触媒する報告がある大腸菌由来 lactaldehyde reductase (FucO)と lactaldehyde dehydrogenase (AldA)を利用する。また、最終反応においては、研究代表者らが発見した *Ochrobactrum* sp. AIU033 由来 alcohol oxidase (ALOD)の反応が律速と示唆されている[1]。ALOD は基質特異性が厳密で本系に適しているが、グリコール酸への反応性が低い。よって、進化実験によってグリコール酸へ反応性の高い ALOD へと機能改変を行った。進化実験では、遺伝子レベルでランダム変異を導入し、多数の変異体ライブラリーから、グリコール酸に対して高い活性を示す変異体を選抜した。この際、高活性変異体を簡便迅速に選抜できるスクリーニング法が必要となるが、コロニーの活性染色によって高活性変異体を目視で選抜できるアッセイ系を構築し、使用した。

(2) グリコール酸、グリオキシル酸合成に関する酵素群の組換え大腸菌ペリプラズムにおける共発現系の構築

上記 3 つの酵素遺伝子(FucO, AldA, ALOD)に Tat シグナルペプチド配列を付加し、発現を促すことで各酵素は細胞質内でフォールディング後、内膜を透過し、ペリプラズムに局在可能となる。なお、ALOD については、すでに自前の Tat シグナルペプチドを有しており、自前の Tat シグナルペプチド込みで異種発現させた際には、組換え大腸菌内で ALOD がペリプラズムに局在していることが予想されている。そこで、本研究では、自前の Tat シグナルペプチドを有していない FucO と AldA 遺伝子の N 末端に大腸菌由来の Tat シグナルペプチド配列を融合し、組換え大腸菌内で発現させ、各酵素の細胞内における局在について検討した。

4. 研究成果

(1) 組換え大腸菌細胞質内における有機酸合成経路の構築と進化実験による高活性 ALOD 変異体の創製

目的の反応系構築に必要な 3 種類の酵素を組換え大腸菌における共発現系の構築を行った。上述したように FucO, AldA, ALOD と 3 種の酵素遺伝子を組換え大腸菌で発現し、各酵素の活性測定を行った結果、粗酵素において全ての活性が確認されたため、各酵素が組換え大腸菌細胞内で発現していることが確認できた。さらに、3 種の酵素類を発現させた組換え大腸菌の休止菌体反応によって、エチレングリコールから数十 mM ではあるが、グリオキシル酸の生成が確認され、想定した合成経路が駆動していると示唆された。また、目的の反応系において 3 段階目の反応を触媒する ALOD が律速と考えられたことから、まずは ALOD の活性向上変異体の作成に着手した。本酵素遺伝子全域にランダム変異を導入後、各変異体遺伝子を導入した組換え大腸菌の粗酵素液を用いて活性測定を行い、高活性変異体の探索を行った。ランダム変異後に得られた

約 700 クローンについて、スクリーニングを行った結果、野生株の粗酵素よりも 1.2~1.5 倍程度活性が向上した 16 株の活性向上 ALOD 変異体の取得に成功した。各活性向上 ALOD 変異体におけるアミノ酸置換部位を特定した結果、 $\alpha\beta$ サブユニットのヘテロ 4 量体からなる本酵素の α サブユニットにおけるフラビン結合モチーフ周辺領域および 300~400 番目付近のアミノ酸領域が活性向上に重要であることが示唆された(図 1)。また、 α サブユニットにおける 372 番目のセリンがプロリンに置換した変異 (S372P) を有する変異酵素が、野生型酵素よりも約 1.5 倍活性が向上することを見出し、本変異が酵素の性質に与える影響についても調査した。その結果、野生型酵素の基質 (グリコール酸) に対する K_m 値が 377 ± 52.9 mM であるのに対して、S372P 変異酵素は、 87.0 ± 17.9 mM と低下しており、S372P 変異は、基質との親和性の向上に寄与していることを明らかとした。また、本変異は、酵素の安定性向上にもわずかではあるが寄与している可能性が示唆された。

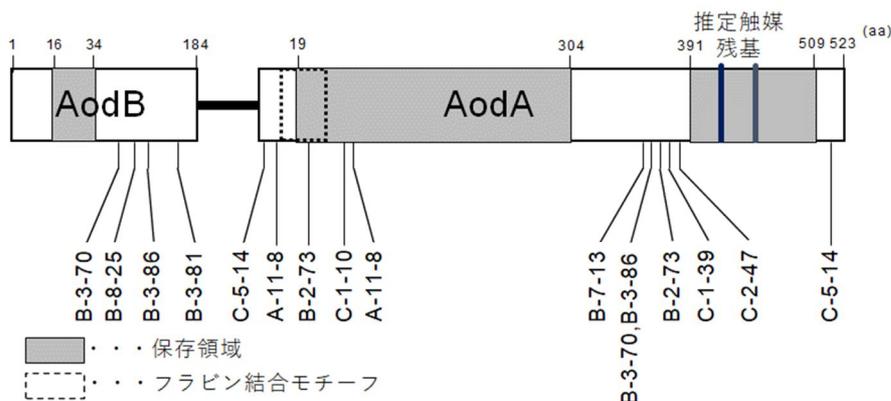


図 1 高活性 ALOD 変異体のアミノ酸置換部位マッピング

(2) グリコール酸、グリオキシル酸合成に関する酵素群の組換え大腸菌ペリプラズムにおける共発現系の構築

3 段階目の反応を触媒する ALOD は、上述したようにオリジナルの TAT シグナルを有しており、組換え大腸菌細胞内においては、すでにペリプラズムに局在していることが予想された。そこでまず、本研究では、本酵素が組換え大腸菌細胞内で発現した際もペリプラズムに局在していることを確認した(図 2) [4]。そこで、続いて 1 段階目の反応を触媒する FucO および 2 段階目の反応を触媒する AldA の N 末端に TAT シグナル配列を融合し、組換え大腸菌内における発現を試みた。その結果、FucO は、細胞質からわずかにペリプラズムへ輸送されていることが示唆された。一方で、AldA に関しては、TAT シグナル配列を付加したことで、大幅に活性が低下することが確認された。また、他のペリプラズム輸送シグナルについても検討したが、目的酵素全てをペリプラズムへ局在させることができなかった。

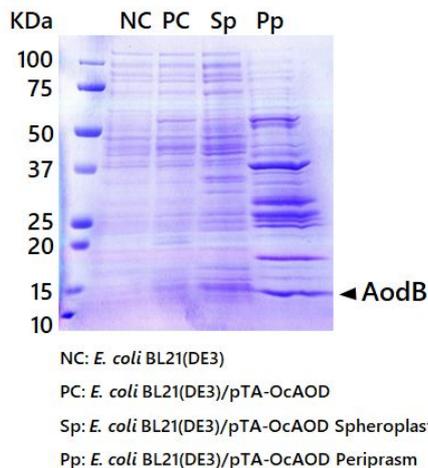


図 2 SDS-PAGE による ALOD の局在確認 [4]

(3) 進化実験による高活性 FucO, AldA 変異体の創製

そこで、当初の計画書に沿って、ALOD のみでなく、第 1, 2 段階目の反応を触媒する酵素の機能強化を行うことで生産性の向上を目指すこととした。その際に、目的の有機酸の産生にともなって、培養液中の pH が低下することに着目し、pH 指示薬を添加した寒天プレート培地で、有機酸合成量が向上するとコロニー周辺の培地の色の変化によって各高活性変異体を選抜できるアッセイ系を構築した。構築したアッセイ系を用いて、ランダム変異を導入した第 1, 2 段階目の反応を触媒する酵素遺伝子を共発現した組換え大腸菌を選抜した結果、グリコール酸産生量が検討前と比較して約 1.5 倍程度向上した大腸菌株を見出した。よって、第 1, 2 段階目の反応を触媒する酵素変異体の作成にも成功したと考えられる。現在、変異部位の特定と各酵素変異体の解析を試みている。

<引用文献>

1. 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*, 105, 2014, 41 - 48
2. 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*, 119, 2015, 410 - 415
3. Miwa Yamada, Kimiyasu Isobe, A novel microbial aldehyde oxidase applicable to production of useful raw materials, glycolic acid and glyoxylic acid, from ethylene glycol, *Fermentation Technology*, 4, 2015, 1-2
4. Kenji Matsumura, Miwa Yamada, Takeshi Yamashita, Hitomi Muto, Ken-ichi Nishiyama, Hitoshi Shimoi, Kimiyasu Isobe, Expression of alcohol oxidase gene from *Ochrobactrum* sp. AIU 033 in recombinant *Escherichia coli* through the twin-arginine translocation pathway, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 128, 2019, 13 - 21

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 0件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Matsumura Kenji, Yamada Miwa, Yamashita Takeshi, Muto Hitomi, Nishiyama Ken-ichi, Shimoi Hitoshi, Isobe Kimiyasu | 4. 巻 128 |
| 2. 論文標題 Expression of alcohol oxidase gene from <i>Ochrobactrum</i> sp. AIU 033 in recombinant <i>Escherichia coli</i> through the twin-arginine translocation pathway | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering | 6. 最初と最後の頁 13~21 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2018.12.012 | 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 - |

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 山田 美和 |
| 2. 発表標題 未利用資源からの有用物質合成を目指した微生物の探索と酸化酵素の機能改良 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部 70 周年シンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Daiki Takashima, Wataru Maeda, Takanobu Tsuchiya, Tomoko Shintani, Katsuya Gomi and Miwa Yamada |
| 2. 発表標題 Cloning and heterologous expression of protein-oxidizing enzyme gene from <i>Penicillium citrinum</i> AIU Z26-4-8 |
| 3. 学会等名 Environmental mechanisms in Plants and Animals（国際学会） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 天野一清、松村健児、下飯 仁、山田美和 |
| 2. 発表標題 <i>Ochrobactrum</i> sp. AIU 033由来アルコール酸化酵素の機能解析 |
| 3. 学会等名 平成30年度 東北・北海道合同支部大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 松村健児、山下岳士、西山賢一、下飯 仁、山田美和 |
| 2. 発表標題 組換え大腸菌におけるOchrobactrum sp. AIU 033由来アルコール酸化酵素の局在性解析とグリオキシル酸合成に対するTatABC共発現の影響 |
| 3. 学会等名 平成30年度 東北・北海道合同支部大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 松村 健児、天野 一清、下飯 仁、山田 美和 |
| 2. 発表標題 アミノ酸置換による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向上 |
| 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 村主 渉、天野 一清、松村健児、西山賢一、山田美和 |
| 2. 発表標題 エチレングリコールを原料としたグリオキシル酸合成量向上を目指した活性向上酵素変異体の創出と組換え大腸菌におけるペリプラズムへの酵素集積 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部第155回大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 林田宗記、村主 渉、杉森大助、山田美和 |
| 2. 発表標題 エタノールアミンを原料としたグリコール酸の微生物合成系構築 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部第155回大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山田美和 |
| 2. 発表標題 産業廃棄物の利活用を目指した有用物質の微生物合成に関する研究 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部第155回大会（受賞講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 村主 渉, 山下岳士, 山田美和 |
| 2. 発表標題 エチレングリコールからのグリコール酸合成量向上を目指した高活性変異酵素スクリーニング系の構築 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会 |
| 4. 発表年 2020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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|