

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2007 ~ 2009  
 課題番号：19380050  
 研究課題名 (和文) 新規な微生物触媒によるキナ酸からシキミ酸への高速・高効率変換法の開発  
 研究課題名 (英文) Development of microbial catalyst catalyzing high shikimate production from quinate  
 研究代表者  
 足立収生 (ADACHI OSAO)  
 山口大学・名誉教授  
 研究者番号：20027189

**研究成果の概要 (和文)：**タミフル製造に重要な原料であるシキミ酸の製造法には幾多の隘路があった。研究代表者はこれを克服するために、糸状菌と酢酸菌の酵素系を利用することを目的に研究を始めた。その結果、コーヒー粕からキナ酸を大量に得て、キナ酸は新規な酢酸菌触媒によって、高速・高効率にシキミ酸へ変換される系を完成させた。

**研究成果の概要 (英文)：**A novel strategy preparing high shikimic acid with high efficiency with developed microbial enzymes from fungi and acetic acid bacteria has finally completed during three years of investigation supported by this grant. Coffee pulp *kōji* facilitated strong formation of chlorogenic acid hydrolase and yielded quinic acid from coffee pulp easier than any other methods so far reported. Quinic acid was converted by two enzyme systems of acetic acid bacteria, oxidative fermentation of 3-dehydroshikimate from quinic acid and asymmetric reduction yielding shikimic acid from 3-dehydroshikimate were so successful. The fruitful outcomes in this project must help people from pandemic flu through plentiful supply of Tamiflu synthesized from shikimic acid provided in this project.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2008 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

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：酢酸菌、酸化発酵、シキミ酸、コーヒー麩、タミフル

#### 1. 研究開始当初の背景

抗インフルエンザウイルス剤として知られているタミフル合成には、シキミ酸が必須な原料である。しかしながら、タミフルの世界的備蓄を実現して、人々をインフルエンザから守るには、原料となるシキミ酸の供給法が最大の隘路となっていた。研究代表者らは、

この問題の解決のために、酸化発酵によってキナ酸からシキミ酸を製造する全く新規な技術開発を目指した。さらに、キナ酸の給源としてクロロゲン酸を多量に含む農産食品産業廃棄物のコーヒー粕に着目して、キナ酸の円滑な供給も視野に入れた研究によって、この難局を克服することができると考えた。

## 2. 研究の目的

コーヒー粕から効率よくキナ酸を製造して、それを酢酸菌の酸化発酵系で3-デヒドロシキミ酸(DSA)へ変換する。次に、DSAを同じ酢酸菌の細胞質のシキミ酸脱水素酵素(GDH)によってシキミ酸へ変換することを目的として、3年間の研究が開始された。

## 3. 研究の方法

上記の研究目的は図1に示すように、3つに分けられる。(1) コーヒー粕からキナ酸を製造する。(2) キナ酸をDSAへ酸化発酵によって変換する。(3) DSAからシキミ酸を不斉還元酵素法によって製造する。研究を始めるまでに、上記の3つの方法への準備は既に十分にできていた。

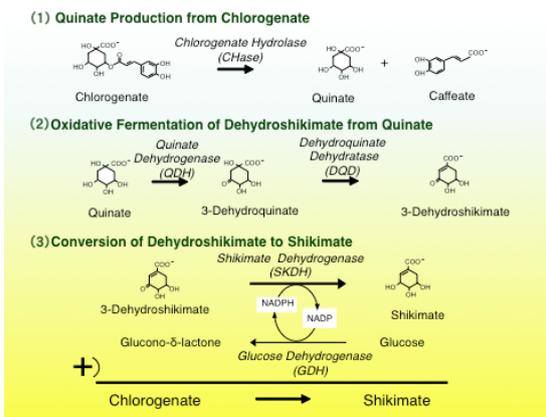


図1 本研究を構成する3つの反応

## 4. 研究成果

### (1) コーヒー粕からキナ酸の製造

我が国の伝統的な麴技術をコーヒー粕に応用した。コーヒー粕に生育できる多数の微生物を探索して、*Aspergillus sojae* AKU 3012 を選択した。図2には *A. sojae* によるコーヒー粕麴を示した。選ばれた菌株は強力なクロロゲン酸加水分解酵素(CHase)を生産



図2 調製されたコーヒー粕麴

し、コーヒー粕や適宜使用したインスタント

コーヒー粉末に作用させると、キナ酸とカフェ酸を生成した。両者は容易にイオン交換クロマトグラフィーによって分けることができた。特筆されることは、コーヒー粕麴を摂氏60度で30分熱処理しても、CHase活性は損なわれないが、カビの繁殖力や胞子の発芽力は停止して、コーヒー粕粒子の表面にCHaseが活性な状態で付着した、一種の固定化微生物触媒となった。コーヒー粕麴によるコーヒー粕を対象としたキナ酸の製造において、処理するコーヒー粕の量が多ければ多いほど、コーヒー粕麴は真価を発揮することとなり、未利用のまま放置されていたコーヒー粕の有効利用へ道が開かれた。

### (2) 酸化発酵によるキナ酸からDSAの製造

酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* IFO 3244 の細胞膜に存在するPQQを補酵素とするキナ酸脱水素酵素(QDH)と、同じ細胞膜に存在するデヒドロキナ酸デヒドラターゼ(mDQD)の作用で、キナ酸をDSAへ変換する。この反応は、微酸性域ではmDQDが作用しないために、キナ酸の酸化反応物としてDQAが蓄積される。しかし、反応のpHを中性〜微塩基性に保つと、mDQDが良好に作用して、DQAを蓄積することなく全てDSAへ変換され、反応液中に蓄積される(図3)。生成した反応生成物が一挙に消費されることなく、培養液中や反応液中に安定に蓄積されるのが酸化発酵の最大の特徴である。

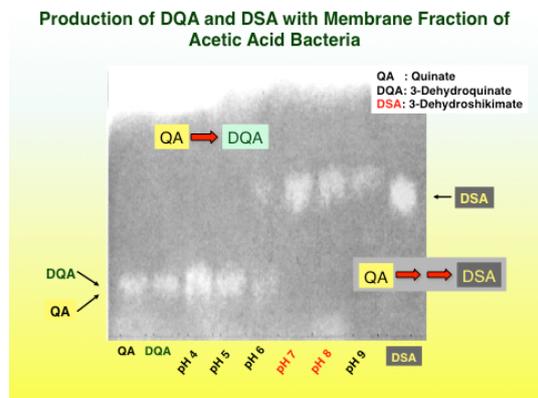


図3 さまざまなpHでの反応液のペーパークロマトグラフィーによる解析結果

上記の結果をもとにキナ酸からDSAの大量かつ高速・高効率製造法を開発するために、酢酸菌細胞膜を固定化触媒として試験した。反応装置と結果を図4に示したように、キナ酸の高濃度仕込みが可能になり、約36時間の反応語、収率100%でキナ酸からDSAが生成された。反応液の分離もナイロンネットで固定化触媒をすくいあげるといった簡便な操作で達成され、高価な遠心分離機を稼働させ

る必要もなかった。触媒濃度を高め、通気攪拌するだけで理論値の DSA が製造できることが判明した。本研究の最終目的はシキミ酸の製造にあるが、この段階で生成された DQA と DSA それら自体、アジア・アフリカで勢いを取り戻して蔓延している結核やマラリアの新規な薬剤として利用できることから、研究代表者へ世界各国の医療・製薬研究機関から試料提供の依頼が今なお続いている状況にある。DQA と DSA の大量生成法が確立されていなかったために、重要な用途がありながら、市販されていないこれら二つの代謝中間体の製造供給も可能な状況になってきたことは、本研究の大きな副産物である。

#### Conversion of Quinate to 3-Dehydroshikimate

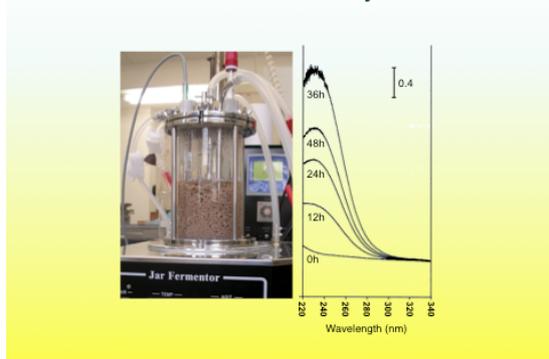


図 4 固定化細胞膜による DSA の生成反応の外観と反応時間による DSA 生成経過

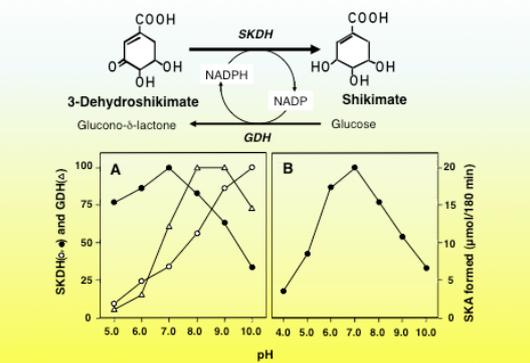
#### (3) 不斉還元酵素系による DSA からシキミ酸の製造

同じ *G. oxydans* IFO 3244 の細胞質に存在する NADP-依存性シキミ酸脱水素酵素 (SKDH) を NADPH 存在下に作用させて、DSA をシキミ酸へ変換する工程である。SKDH によって NADPH は NADP へ酸化され、DSA はシキミ酸へ還元される。ここで NADP を再び NADPH へ再生する系がなければ、シキミ酸生成は不可能になる。

ここで、同じ酢酸菌の細胞質に存在する NADP-依存性グルコース脱水素酵素 (GDH) を高濃度グルコース及び微量の NADP と共存させることで、図 5 に図示したように円滑な NADPH の連続的供給を考えた。SKDH と GDH の反応特性を図 5-A に示したように、SKDH による DSA の還元反応による NADP 生成の至適 pH と、GDH によるグルコースの酸化反応による NADPH 生成の至適 pH は中性 pH 付近に見られた。そこで、この不斉還元酵素系による DSA からシキミ酸の製造を試験した結果、図 5-B に示すように、pH7 にシキミ酸生成の至適 pH が存在することを明らかにした。上記の結果をさま

図

#### Conversion of 3-Dehydroshikimate to Shikimate by Coupling Reaction



5 不斉還元反応による NADPH 再生系とその反応の至適 pH

ざまな観点から検証した結果を図 6 に示した。反応液を経時的にペーパークロマトグラフィーによって分析すると同時に、反応液中に生成したシキミ酸量を SKDH によって別途に定量した結果を図 6 の左上と右下に示した。さらに、さまざまな DSA の仕込み量によってシキミ酸の生成が定量的に進行・完了することも明らかになった(図 6 の右)。

#### SKA Production by Coupling Reaction of GDH and SKDH

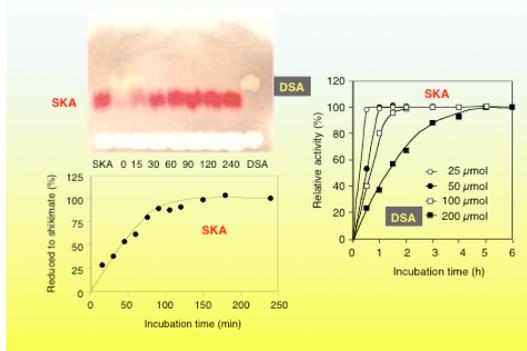


図 6 不斉還元酵素系による DSA からシキミ酸の製造試験

上記の通り、DSA からシキミ酸が高収率で得られることが明らかになったので、この不斉還元酵素系の固定触媒化によるシキミ酸製造の一層の効率化を目指した。表 1 に結果を要約したように、親和性結合、イオン結合、包括法、包埋法、及び物理的吸着法などで試験した。イオン交換体やアパタイトを担体としてクロマトカラムに充填して行くと、その反応効率は 60% に低下したが、反応液を循環させることで、仕込んだ DSA は全てシキミ酸へ変換された。反応液のイオン強度が 0.15 を超えない限り、酵素の絡むからの漏出は起きないし、酵素活性が低下して来ると、酵素を新規にカラムに追加することで、酵素活性を補強することができた。また、固定化触媒が不要になれば、高い塩を含む緩衝液を通す

ことで、結合していた酵素は無傷のまま回収できる利点も判明した。近年性能が向上してきた分子篩膜を使用すると、遊離の酵素液と同じ反応速度でシキミ酸が得られた。SKDHとGDHはともにBlue Dextran 2000 (BD)ゲルに親和性を示すことを利用して酵素を精製したことを、固定化触媒の調製にも応用した。その結果、両酵素とも低濃度BD(例えば0.15 µg/ml)で容易に固定化酵素に変換できて、その酵素活性は遊離の酵素液と同等

Catalytic Efficiency of Immobilized SKDH/GDH

Carriers/Conditions	Efficiency (%)	Remarks
Free enzymes	100	
Affinity binding to BD <sup>1)</sup>	100	
Batch	100	
Affinity binding		
BD-Sepharose 4B		
Batch	100	mixing
Column	60	circulation
Encapsulation		
Dialysis tube	variable	circulation <sup>2)</sup>
Mol Filter	100	
Ionic binding		
DEAE-cellulose		
Batch	100	mixing
Column	60	circulation
DEAE-Sephadex A-50		
Batch	100	mixing
Column	60	circulation
Lattice entrapment	variable	enzyme release <sup>3)</sup>
Physical adsorption <sup>4)</sup>		
Batch	100	mixing
Column	60	circulation

<sup>1)</sup> Blue Dextran 2000; <sup>2)</sup> Lag time before equilibrated; <sup>3)</sup> Inevitable; <sup>4)</sup> Hydroxyapatite

表1 固定化した不斉還元共役反応によるシキミ酸製造試験結果の要約

であった。BDの分子量は2,000,000であるため、反応液をpore sizeの大きな分子篩で濾過しても、反応液中への酵素の漏出は見られず、化学量論的収量で得られたシキミ酸のみ回収できる優れた実験結果を与えた。BDによって固定化した触媒から酵素を回収するにも、高い塩を含む緩衝液と混合するだけで、固定化に使用した酵素は無傷な状態で回収された。また、この不斉還元酵素系に投入される基質はDSAに限定されているので、使用する細胞質由来の酵素の純度が不十分であっても、シキミ酸生成反応には何の悪影響も及ぼさないことは、多くの高濃度不純物の共生・混在が不可避な発酵法や合成法など他のシキミ酸製造系には見られない特筆されるべき特徴である。特に有機合成法では、シキミ酸に3つの不斉点があるために、雑多な異性体の副生は避けられないし、発酵法では本来の多段階の代謝系からなるシキミ酸代謝経路を経由するために、深刻な代謝調節が働いて期待通りのシキミ酸収量を達成することは不可能に近い。しかし、本研究で得られた結果は、シキミ酸経路を経由しない新規な作戦で達成されたものであり、関係した3つの反応系には、代謝調節による負の効果は見られなかった。

New Strategy for Shikimate Production from Coffee Pulp

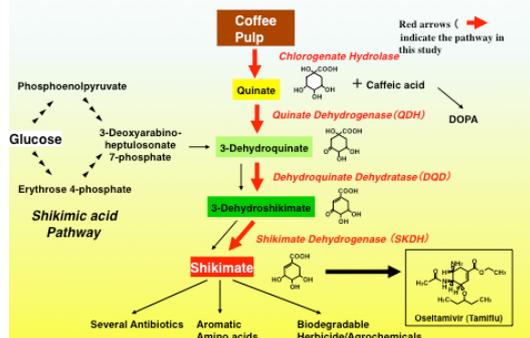


図7 本研究の要約

本研究の結果を図7に要約した。本研究の結果、研究代表者らの小さな設備で行った場合でも、SKDHを100 mg(酵素活性を低く見積もっても100 units/mgとすると)、固定化した不斉還元系を1日稼働させると、2 kg以上のシキミ酸を容易に作るができる。

このようにして、典型的な未利用農産食品廃棄物であるコーヒー粕から、3段階の単純な反応系で、高速・高効率にシキミ酸が製造できるようになった。また、これまで入手不能であった、DQAやDSAのような重要な用途が期待されている代謝中間体も大量に供給できる道が開かれたことの意義も大きい。

本研究成果は国際会議でも高く評価され、発表論文等もインターネットサイトで幾多の切り口から容易に検索できる状況を到来させた。大きな社会的意義を擁した潜在的に重要な問題の解決に立ち向かった本研究課題を採択された、科研費配分審査委員諸氏の慧眼に、研究代表者は深甚の謝意と敬意を表する。

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17件、全て査読あり)

1. E. Shinagawa, O. Adachi, Y. Ano, T. Yakushi, & K. Matsushita, Purification and characterization of membrane-bound 3-dehydroshikimate dehydratase from *Gluconobacter oxydans* IFO 3244, a new enzyme catalyzing extracellular protocatechuate formation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74** in press (2010).
2. W. Kanchanarach, G. Theeragool, T. Yakushi, H. Toyama, O. Adachi, & K. Matsushita, Characterization of thermotolerant *Acetobacter pasteurianus* strains and their quinoprotein alcohol dehydrogenases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **85**, 741-751 (2010).

3. I. Saichana, D. Moonmangmee, O. Adachi, K. Matsushita, & H. Toyama, Screening of thermotolerant *Gluconobacter* strains for production of 5-keto-D-gluconic acid and disruption of flavin adenine dinucleotide-containing D-gluconate dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 4240-4247 (2009).
  4. E. Shinagawa, Y. Ano, T. Yakushi, O. Adachi, & K. Matsushita, Solubilization, purification, and properties of membrane-bound D-glucono-d-lactone hydrolase from *Gluconobacter oxydans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 241-244 (2009).
  5. K. Matsushita, Y. Kobayashi, M. Mizuguchi, H. Toyama, O. Adachi, K. Sakamoto, & H. Miyoshi, A tightly bound quinone functions in the ubiquinone reaction sites of quinoprotein alcohol dehydrogenase of an acetic acid bacterium, *Gluconobacter suboxydans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 2723-2731 (2008).
  6. O. Adachi, Y. Ano, Y. Akakabe, E. Shinagawa, & K. Matsushita, Coffee pulp koji of *Aspergillus sojae* as stable immobilized catalyst of chlorogenate hydrolase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **81**, 143-151 (2008).
  7. O. Adachi, Y. Ano, E. Shinagawa, & K. Matsushita, Purification and properties of two different dihydroxyacetone reductases in *Gluconobacter suboxydans* grown on glycerol. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 2124-2132 (2008).
  8. O. Adachi, Y. Ano, H. Toyama, & K. Matsushita, A novel 3-dehydroquinate dehydratase catalyzing extracellular formation of 3-dehydroshikimate by oxidative fermentation of *Gluconobacter oxydans* IFO 3244. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 1472-1482 (2008).
  9. Y. Ano, H. Toyama, O. Adachi, & K. Matsushita, Energy metabolism of a unique acetic acid bacterium, *Asaia bogorensis*, that lacks ethanol oxidation activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 989-997 (2008).
  10. E. Shinagawa, H. Toyama, K. Matsushita, P. Tuitemwong, G. Theeragool, & O. Adachi, Formaldehyde elimination with formaldehyde and formate oxidase in membrane of acetic acid bacteria, *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 292-295 (2008).
  11. W. Promden, A.S. Vangnai, P. Pongsawasdi, O. Adachi, K. Matsushita, & H. Toyama, Disruption of quinoprotein ethanol dehydrogenase gene and adjacent genes in *Pseudomonas putida* HK5. *FEMS Microbiol. Lett.*, **280**, 203-209 (2008).
  12. W. Soemphol, O. Adachi, K. Matsushita, & H. Toyama, Distinct physiological roles of two membrane-bound dehydrogenases responsible for D-sorbitol oxidation in *Gluconobacter frateurii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 842-850 (2008).
  13. E. Shinagawa, Y. Ano, O. Adachi, & K. Matsushita, The occurrence of a novel NADH dehydrogenase, distinct from the old yellow enzyme, in *Gluconobacter* strains. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 260-264 (2008).
  14. H. Toyama, N. Furuya, I. Saichana, Y. Ano, O. Adachi, & K. Matsushita, Membrane-bound, 2-keto-D-gluconate-yielding D-gluconate dehydrogenase from *Gluconobacter dioxyacetonicus* IFO 2171: Molecular properties and gene disruption. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 6551-6556 (2007).
  15. I. Saichana, Y. Ano, O. Adachi, K. Matsushita, & H. Toyama, Preparation of enzymes required for enzymatic quantification of 5-keto-D-gluconate and 2-keto-D-gluconate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2478-2486 (2007).
  16. W. Soemphol, H. Toyama, D. Moonmangmee, O. Adachi, & K. Matsushita, L-Sorbose reductase and its transcriptional regulator involved in L-sorbose utilization of *Gluconobacter frateurii*. *J. Bacteriol.*, **189**, 4800-4808 (2007).
  17. H. Toyama, E. Nishibayashi, M. Saeki, O. Adachi, & K. Matsushita, Factors required for the catalytic reaction of PqqC/D which produces pyrroloquinoline quinone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **354**, 290-295 (2007).
- [学会発表] (計 6 件)
1. 品川恵美子、足立収生、阿野嘉孝、薬師寿治、松下一信。膜結合型デヒドロシキミ酸デヒドラターゼの発見、酵素の精製と性質。日本農芸化学会大会、平成 22 年 3 月 27-30 日、東大駒場キャンパス、東京。
  2. 足立収生、阿野嘉孝、品川恵美子、薬師寿治、松下一信。酢酸菌の固定化酵素を用いたシキミ酸製造法の検討。日本農芸化学会大会、平成 22 年 3 月 27-30 日、東大駒場キャンパス、東京。
  3. O. Adachi, T. Yakushi, & K. Matsushita, Quinic acid production from coffee pulp by fungal enzyme and subsequent conversion of quinic acid to shikimic acid by two enzymatic systems of acetic acid bacteria. The 15<sup>th</sup> German-Japanese Workshop on Enzyme Technology, Sept. 25-26, 2009, Rostoc University, Germany.

4. O. Adachi & K. Matsushita, The Japanese traditional applied microbiology may contribute to the Argentine, Japan-Argentina Workshop “Bioscience and Biotechnology for the promotion of Agriculture and Food Production”, Aug. 3-7, 2009, Buenos Aires, Argentina.

([http://www.jst.go.jp/sicp/ws2009\\_argentina/presentation/day1\\_08.pdf](http://www.jst.go.jp/sicp/ws2009_argentina/presentation/day1_08.pdf))

5. 足立収生、阿野嘉孝、品川恵美子、松下一信、糸状菌のクロロゲン酸水解酵素の誘導、酵素の精製とキナ酸製造への応用。日本農芸化学会大会、平成 21 年 3 月 26-29 日、名城大学、名古屋市。
6. 松下一信、足立収生、コーヒー粕からシキミ酸およびシキミ酸経路代謝中間体の高速・高効率製造法。科学技術振興機構新技術開発説明会、平成 20 年 10 月 23 日、(独)科学技術振興機構、東京。

[図書] (計 1 件)

1. O. Adachi, Y. Ano, H. Toyama, & K. Matsushita: Biooxidation with PQQ- and FAD-dependent dehydrogenases. In “Modern Biooxidations --Enzymes, Reactions and Applications” ed. by R.D. Schmid and V. Urlacher, Wiley-VCH, 2007, p. 1-41.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称:

「コーヒー粕麩による有用物質の製造法」

発明者: 松下一信、足立収生

権利者: 山口大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2009-000403

出願年月日: 2009 年 2 月 3 日

国内外の別: 外国特許

○取得状況 (計 0 件)

[その他] ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立収生 (ADACHI OSAO)

山口大学・名誉教授

研究者番号: 20027189

(2) 研究分担者

赤壁善彦 (AKAKABE YOSHIHIKO)

山口大学・農学部・准教授

研究者番号: 20274186

品川恵美子 (SHINAGAWA EMIKO)

宇部工業高等専門学校・物質工学科・教授

研究者番号: 20116726

(3) 連携研究者

なし