

平成 21 年 5 月 10 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007-2008
 課題番号： 19580087
 研究課題名 (和文) 微生物の脱炭酸酵素を用いたコルベ・シュミット反応と芳香族ヒドロキシ酸の生産
 研究課題名 (英文) Studies on Kolbe・Schmitt Reaction catalyzed by microbial decarboxylases and its application for the production of aromatic hydroxy carboxylic acids.
 研究代表者
 長澤 透 (NAGASAWA TORU)
 岐阜大学・工学部・教授
 研究者番号 60115904

研究成果の概要 環境適応型の化学工業の確立をめざし、化成品や医薬品などの合成に生体触媒を積極的に導入すること目指し、本研究では炭酸固定機能を備えた脱炭酸酵素群を利用した酵素的コルベ・シュミット反応を用いて、機能性ポリマー・液晶・医薬品の原料として汎用される芳香族ヒドロキシ酸の合成法を検討した。本炭酸固定を触媒する脱炭酸酵素群の充実とライブラリー化を図った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：脱炭酸酵素、炭酸固定反応、コルベ・シュミット反応、芳香族ヒドロキシカルボン酸、

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化の主要原因とされている二酸化炭素の排出量の問題、バイオプロセスの導入による環境適応型の化学工業の確立の点から、微生物の新規炭酸固定反応の研究は、極めて重要な課題である。最近になり、微生物の新しい多彩な二酸化炭素固定化反応が明らかになりつつある。ドイツの Fuck らのグループは、フェノールの嫌気代謝の過程で、フェノールがリン酸化された後、カルボキシル化される経路を明らかにした。またアメリカの Ensign らのグループは、エポキシドへ

の二酸化炭素の付加反応を触媒する新規酵素エポキシカルボキシラーゼとアセトンカルボキシラーゼの2種類の二酸化炭素固定化反応を見出し、酵素複合体の特性解析や遺伝子解析を行った。我々は、新規脱炭酸酵素ピロール-2-カルボン酸脱炭酸酵素とインドール-2-カルボン酸脱炭酸酵素を微生物に見出した。これらの脱炭酸酵素は反応条件の設定によっては、炭酸固定反応を触媒できることを明らかにした。ここに炭酸固定活性を発揮する芳香族、複素環カルボン酸の脱炭酸酵素群の存在が明らかになり、新しい二酸化炭

素固定の学術的な新規性と応用面での高いポテンシャルを明らかにした。

2. 研究の目的

これまで、有機化学合成において芳香環への直接的な二酸化炭素固定反応はコルベ・シュミット反応として知られている。高温、高圧、強アルカリ条件下で二酸化炭素を固定する反応でサリチル酸、4-ヒドロキシ安息香酸などの芳香族カルボン酸の工業生産に長年にわたって実用化されてきた。しかし、この反応は、反応選択性の問題、即ち副生成物から目的物の精製工程が要求される。さらに苛酷な反応条件と強アルカリ廃液の処理など環境への負荷と安全性が深刻な問題である。従来からの環境負荷の大きい化学合成法を温和な条件下で位置選択的に二酸化炭素固定を触媒できる脱炭酸酵素を用いる”微生物のコルベ・シュミット反応の応用”の試みは、高いポテンシャルを秘めた課題である。本研究では、炭酸固定反応を触媒する脱炭酸酵素を用いた芳香族ヒドロキシカルボン酸の生産法を開発するとともに、この新しいタイプの酵素群の遺伝資源のライブラリー化を目指している。

これまでに、4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素、3,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素、2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素、2,3-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素を有する微生物群を見出し、酵素・遺伝資源ライブラリー化を進めてきた。さらに3,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素遺伝子のクローニングを行ない、一次構造を解明した。また、昨年度に見出した2,3-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の酵素精製と炭酸固定反応の機能評価を進めた。

3. 研究の方法

3,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の高活性菌として選択した土壌分離菌 *Enterobacter cloacae* P241 を用い、酵素遺伝子のクローニングを行った。2,3-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素に関しては、*Rhodotorula parida* IF00715、*Penicillium variable* IAM13762 からそれぞれ精製酵素を調製し、反応特性を検討した。

(1) 微生物の培養と活性測定法

2,3-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素: *Rhodotorula parida* IF00715、*Penicillium variable* IAM13762 の培養には以下に示す基本培地を用い、それぞれの培養条件を最適化した。1 L あたり、1 g 2,3-ジヒドロキシ安息香酸、1 g 酵母エキス、1 g 塩化ナトリウム、2 g リン酸水素二アンモニウム、0.5 g 硫酸マグネシウム七水和物、5 ml 金属溶液、5 ml ビタミン溶液を入れた。休

止菌体を用いた活性評価では、10 ml 培養液から得られた菌体を生理食塩水に懸濁し、20 mM 2,3-ジヒドロキシ安息香酸、100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を含む 1 ml の反応液に入れ、30°C で 24 時間反応を行い、0.5 ml のメタノールを添加して反応を停止させた。脱炭酸反応で生成するカテコールを HPLC で分析した。炭酸固定活性の評価では、10 mM カテコール、3 M 炭酸水素カリウム、100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0)、10 mM ジチオスレイトールを含む反応液 2 ml を用い、20°C で 2 時間反応を行い、1 ml のメタノールを添加して反応を停止させ、2,3-ジヒドロキシ安息香酸の生成を HPLC 分析した。

酵素反応は以下の条件で行った。反応液体積は 1 ml とし、酵素を 20 mM 2,3-ジヒドロキシ安息香酸、100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 中で、30°C で 10 分間反応をさせ、0.1 ml の 1N HCl を添加して反応を停止させた。脱炭酸反応で生成する 1,2-ジヒドロキシベンゼンを HPLC で分析した。酵素 1 unit は 1 分間に 1 μ mol の 1,2-ジヒドロキシベンゼンを生成する酵素量と定義した。

(2) 酵素精製および遺伝子クローニング

3,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の遺伝子クローニング: *E. cloacae* P240 から精製した酵素の 28 アミノ酸残基からなる N 末端配列を利用し、酵素遺伝子クローニングに用いるプローブ DNA を調製した。ツゲノミックサザンブロット解析にもとづき作成したゲノムライブラリーから 3,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素遺伝子領域を含む約 4.4 kbp の *Hind*III 断片を得た。

2,3-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の精製: 炭酸固定化活性に注目し、これらの酵素群の特性解析と遺伝子ライブラリーの作成を目的とした。種々の芳香族カルボン酸脱炭酸酵素生成微生物を探索し、酵素の精製と二酸化炭素の固定活性の評価、特性解析、さらに遺伝子解析を行い、有用遺伝子資源のライブラリー化を図ることを目的とした。*Rhodotorula parida* IF00715 の培養菌体を 1 mM ジチオスレイトールを含む 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、高圧細胞破碎処理を行った。遠心分離して得られた上清を無細胞抽出液とし、硫安分画 (50-90%)、熱処理 (50°C、30 分間)、DEAE-Sephacel (50 mM リン酸カリウム緩衝液で溶出)、phenyl-Sepharose CL-4B (10% 飽和硫安分画で溶出)、butyl-Toyopearl 650M (20% 飽和硫安分画で溶出) カラムクロマトグラフィーを用いて酵素精製を行った。

Penicillium variable IAM13762 の培養菌体を 20 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ および 10% (v/v) グリ

セロールを含む100 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、高圧細胞破碎処理を行った。遠心分離して得られた上清を無細胞抽出液とし、硫酸分画 (30-60%)、DEAE-Sephacel (120 mM リン酸カリウム緩衝液で溶出)、phenyl-Sepharose CL-4B (10% 飽和硫酸分画で溶出)、butyl-Toyopearl 650M (25% 飽和硫酸分画で溶出) カラムクロマトグラフィーを用いて精製酵素標品を得た。

(3) HPLC による分析

2,3-ジヒドロキシ安息香酸と1,2-ジヒドロキシベンゼンの分析には、Waters Spherisorb S50DS2 (4.6×150 mm) カラムを用いて、移動相を10 mMリン酸緩衝液 (pH 2.8) / アセトニトリル=8 / 1を移動相とした。検出は210 nmとし、流速は1 ml / minとした。

4. 研究成果

(1) *E. cloacae* P241 の3,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素遺伝子のクローニング

精製酵素のN末端アミノ酸配列 (MQNPINDLRSAIALLQRHPGHTIETDHP) は以前に解析した *E. cloacae* P240 の4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素のN末端アミノ酸配列と相同性を示した。しかし、これまでに3,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の遺伝子クローニングと一次構造に関する報告はない。そこで、N末端領域内でPCR用プライマーをデザインし、増幅断片をプローブとしてゲノムライブラリーから3,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素遺伝子領域をコードしている約4.4 kbpの *Hind*III 断片を得、塩基配列から酵素一次造を決定した。タンパク質一次構造データベースに対して相同性検索を行った結果、高い相同性を示したのは3-オクタプレニル-4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素と推定されるタンパク質群であった。30%前後の相同性を示すタンパク質が多く認められたが、いずれも機能同定されていない4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素およびそのホモログであった。我々が平成15年度に解析した *E. cloacae* P240 の4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素との相同性も24%と低い値であり、3位の水酸基を厳密に認識していると考えられる。

(2) 2,3-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の精製と反応特性の解明

Rhodotorula parida IF00715 から2,3-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素を最終比活性3.06 units/mgで約23倍に精製した。サブユニット分子量は38 kDa、TSK G-2000SW カラムを用いて酵素分子量は67 kDaと算出され、同一サブユニットからな

る2量体と推定された。酵素の吸収スペクトルを測定したところ、280 nm以外に吸収極大は認められなかった。基質特異性を検討したところ、脱炭酸反応では2,3-ジヒドロキシ安息香酸の他に2,4-ジヒドロキシ安息香酸、2,6-ジヒドロキシ安息香酸などの脱炭酸反応も触媒した。2,3-ジヒドロキシ安息香酸に対する K_m 値は25.5 μ Mであった。脱炭酸反応の最大活性は50°Cで見られ、30分間の処理で50°Cまで活性は安定であった。熱安定に優れた点は、前年度までに見出した2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素と似通っていた。*Penicillium varoabile* IAM13762についても2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の精製を行った。20 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ および10% (v/v) グリセロールを緩衝液系に添加して酵素を安定化させ、最終比活性2.3 units/mgで約60倍に精製し、単一標品を得た。*P. varoabile* IAM13762の2,3-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素のサブユニット分子量は38 kDaで、3量体からなる酵素であると示唆された。活性がSH阻害剤によって強く阻害され、酵素活性あるいは酵素構造にSH基が重要であると考えられる。2,3-ジヒドロキシ安息香酸に対する K_m 値は24.4 μ Mであった。N末端アミノ酸配列は *Aspergillus niger* および *A. oryzae* で報告されている酵素と似ていた (これらの酵素では炭酸固定機能は報告されていない)。基質特異性は *Rhodotorula parida* IF00715 から精製した酵素と同じ傾向を示した。N末端アミノ酸配列における相同性、酵素サブユニット分子量に関する知見から、2,3-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素は2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素と分子進化的に近縁であると推定される。

(3) 2,3-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の炭酸固定能の評価

P. varoabile IAM13762 の2,3-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の炭酸固定活性は、休止菌体反応では極めて弱く、基質および生成物の細胞透過性に問題があると考えた。そこで、物質変換に関する実験は無細胞抽出液および精製酵素で検討した。炭酸水素カリウムを CO_2 源とし、カテコールへの炭酸固定能を密閉容器内で評価した結果、モル変換率28%で炭酸固定反応の進行が認められた。物質変換系の構築のために、カテコール濃度が炭酸固定活性に及ぼす影響を調べたところ、100 mM程度までは基質阻害が生じず、2,3-ジヒドロキシ安息香酸を合成した。しかし、2,5-ジヒドロキシ安息香酸が微弱ながら副生する (2,3-ジヒドロキシ安息香酸 : 2,5-ジヒドロキシ安息香酸 = 16 : 1) ため、位置選択性が厳密でないこと

が判明した。カテコールから2,3-ジヒドロキシ安息香酸への炭酸固定反応は2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素も触媒し、2,5-ジヒドロキシ安息香酸は副生しない(平成16年度に報告済み)ことが判明しており、両酵素間で位置選択性の厳密さが異なっていた。

(4) 総括

今年度までに、4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素、3,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素、2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素、2,3-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素を持つ微生物ライブラリーが構築でき、酵素遺伝子の取得もほぼ終えた。それぞれの脱炭酸酵素の分子特性の解析によって、グループ1：4-ヒドロキシおよび3,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素、グループ2：2,6-および2,3-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素、の2つに炭酸固定を触媒する脱炭酸酵素を分類できることが分かってきた。グループ1には最初に炭酸固定機能を見出したピロール-2-カルボン酸脱炭酸酵素やインドール-3-カルボン酸脱炭酸酵素も含まれる。一次構造からは2つに大別されるが、炭酸固定反応に関する特性は似通っており、ともにCO₂の分子変換法に活用できる酵素と位置づけられる。グループ2の酵素の中には特に熱安定性が高いものが多く見られる傾向があった。一方、グループ1の酵素は精製酵素の最終比活性が高く、高活性菌体を調製すれば効果的に炭酸固定反応に活用できると考えられた。

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 1 件)

T. Matsuda, R. Marukado, S. Koguchi, T. Nagasawa, M. Mukouyama, T. Harada, K. Nakamura, Novel continuous decarboxylation using pressurized carbon dioxide by immobilized decarboxylase. Tetrahedron Letters, 査読有り、49 巻、2008 年 6019-6020.

[学会発表] (計 1 件)

小坂拓也ら、4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の構造と機能の相関、日本生物工学会、2008年8月27日、東北学院大学(仙台)

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長澤 透 (NAGASAWA TORU)
岐阜大学・工学部・教授
研究者番号 60115904

(2) 研究分担者

吉田豊和 (YOSHIDA TOYOKAZU)
岐阜大学・工学部・准教授
研究者番号 90220657

満倉浩一 (MITSUKURA KOICHI)
岐阜大学・工学部・助教
研究者番号 70324283