

平成 21 年 10 月 21 日現在

研究種目：若手(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19780082
 研究課題名（和文） 芳香族化合物のバイオリファイナリーのための基盤技術の開発
 研究課題名（英文） Fermentative production of aromatic compounds for biorefinery

研究代表者
 駒 大輔 (KOMA DAISUKE)
 地方独立行政法人大阪市立工業研究所・研究員)
 研究者番号：80443547

研究成果の概要：地球温暖化や石油資源の不安定性の要素から、石油製品をバイオ由来製品へと転換することは重要な課題である。本研究課題では、芳香族化合物に焦点を絞り、バイオプラスチックの原料となるような様々な芳香族化合物を、バイオマス（グルコース）を原料として発酵生産するための基盤技術を確立した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	300,000	3,500,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：生物学、バイオリファイナリー

1. 研究開始当初の背景

(1)バイオリファイナリーは省エネルギーな環境調和型プロセスであり、地球温暖化およびエネルギー・資源問題に対する長期的かつ根本的解決方法として期待されている。主要なバイオリファイナリー技術として、エタノールや乳酸をはじめとした C3-C6 の単純な化合物（12 基幹化合物）を生産するための基盤技術がすでに確立されていた。今後はこれらの基盤技術をさらに発展させることに加えて、＜バイオリファイナリーでいかにして多様な化合物を効率的に生産するか＞ということが重要な研究課題のひとつであり、そのための基盤技術の開発が必要であった。

(2)脂肪族化合物については、バイオリファイナリーを見据えた生産のための基盤技術が数多く開発されていた。一方、芳香族化合物については、バイオコンバージョンに関する研究の報告は多数あったが、それらは既存の石油由来の芳香族化合物の比較的単純な修飾や分解に関するものであった。芳香族化合物を合成するためのバイオプロセスの開発をバイオリファイナリーの観点から捉えた研究例は非常に少なかった。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子工学および代謝工学的な手法を取り入れて、芳香族化合物のバイオリ

ファイナリーのための基盤技術を開発することを目的とした。具体的には以下に挙げる3点を目標とした。

(1)大腸菌のシキミ酸経路を改良し、フェニルアラニンやチロシンを生産する大腸菌を作製する。

(2)フェニルアラニンやチロシン、またはそれらから派生する芳香族化合物に作用する遺伝子を収集する。具体的に生産目標とする芳香族化合物は、次の16種類とする：フェニルエタノール、ヒドロキシフェニルエタノール、フェニル乳酸、ヒドロキシフェニル乳酸、フェニルアセトアルデヒド、ヒドロキシフェニルアセトアルデヒド、フェニル酢酸、ヒドロキシフェニル酢酸、チラミン、フェニルエチルアミン、桂皮酸、クマル酸、フェニルプロピオン酸、ヒドロキシフェニルプロピオン酸、スチレン、ヒドロキシスチレン。これらを生産するための酵素遺伝子を収集する。

(3)フェニルアラニンやチロシンを生産する大腸菌に収集した遺伝子を導入することで、さまざまな芳香族化合物の生産を行う。

3. 研究の方法

(1)芳香族アミノ酸生産菌の作製

多様な芳香族化合物の大量生産のために、前駆体となるフェニルアラニンまたはチロシンの高生産株を作製した。そのために、シキミ酸経路中の各遺伝子をクローニングし、さまざまに組み合わせて発現させることでフェニルアラニン生産性に与える影響を評価した。最終的に、大腸菌の *tyrR* 遺伝子破壊株にフィードバック阻害を脱感作した *aroF* および *pheA* 遺伝子 (フェニルアラニン生産菌) または *aroF* および *tyrA* 遺伝子 (チロシン生産菌) を過剰発現するように、プラスミドベクターを用いて導入した。*tyrR* 遺伝子の破壊は、 λ -ファージの red recombinase と酵母の flipase を用いた手法で行った (Datsenko *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6640-5, 2000)。また、大腸菌のゲノム DNA に同様の遺伝子と *aroA* 遺伝子を導入したものを作製した。

(2)芳香族化合物変換酵素遺伝子の収集

KEGG や BRENDA などのデータベースから情報を収集し、Blast などを用いて解析を行い、pET 系ベクターを用いて、最終的に 28 種類の遺伝子を大腸菌でクローニングした。それらの酵素を大腸菌で発現させた後、SDS-PAGE による発現量の解析と、各種酵素アッセイによる酵素活性の測定を行った。酵素アッセイは、1ml のリン酸緩衝液 (100 mM, pH7.2) 中で、基質濃度 2 mM (チロシンのみ 1 mM), 無細胞抽出液 10 μ l-100 μ l、30 で 5-60 分間反応を行った。また必要に応じ

で、2 mM の補酵素 (PLP、Thiamine-2P、NADH、NAD) および 0.2 mM の補因子 (Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+}) を添加した。50 μ l の 2N HCl を加えて反応を停止させて後、200 μ l のメタノールを加えて HPLC のサンプルとした。酵素反応により生成した各種芳香族化合物は、HPLC で定量した。

(3)芳香族化合物生産菌の作製と評価

桂皮酸、クマル酸、およびヒドロキシスチレンの発酵生産について検討した。フェニルアラニン生産性の大腸菌に、pET ベクターを用いて *Aspergillus oryzae* 由来のフェニルアラニン-アンモニリアーゼ遺伝子を導入し、桂皮酸生産性大腸菌を作製した。一方、チロシン生産性の大腸菌に、pET ベクターを用いて *Pseudomonas fluorescens* 由来のチロシン-アンモニリアーゼ遺伝子を導入し、クマル酸生産性の大腸菌を作製した。また、チロシン生産性の大腸菌に、pETDuet ベクターを用いてチロシン-アンモニリアーゼ遺伝子と *Bacillus licheniformis* 由来のフェニル酸デカルボキシラーゼ遺伝子を導入し、ヒドロキシスチレン生産性の大腸菌を作製した。菌株を 0.5% のグルコースと薬剤を含む M9 培地を用いて 30 で 48 時間培養し、作製した各菌株の芳香族化合物の生産性を HPLC で定量した。

4. 研究成果

(1)芳香族アミノ酸生産菌の作製

大腸菌 BW25133 を用いて、フェニルアラニンまたはチロシン生産性の大腸菌の作製を試みた。はじめに pET ベクターを使用可能とするために、BW25113 株を λ -DE3 ファージに感染させて、BW25113(DE3) を作製した。つぎに、Datsenko らの手法により、 λ -ファージの recombinase を用いて *tyrR* 遺伝子を欠失させた (BW25113(DE3) *tyrR*)。つぎに pET ベクターに連結したシキミ酸経路中の各種遺伝子を用いて作製した大腸菌を形質転換し、M9 培地中でのフェニルアラニンの生産性について検討した。その結果、*pheA* 遺伝子または阻害脱感作した *pheA(pheA^{fbr})* 遺伝子を導入した場合にのみフェニルアラニンの生産が確認された。阻害脱感作した遺伝子を導入した方が、生産性は高かった。つぎに、BW25113(DE3) *tyrR* /pRSFDuet-*pheA^{fbr}* 株を各遺伝子を含むプラスミドで同様に形質転換した。その結果、*aroF* 遺伝子または阻害脱感作した *aroF (aroF^{fbr})* 遺伝子を導入した場合にフェニルアラニンの生産量が 2 倍になった。さらに BW25113(DE3) *tyrR* /pRSFDuet-*pheA^{fbr}aroF^{fbr}* 株を、各遺伝子を含むプラスミドで同様に形質転換した結果、*aroA* 遺伝子を導入することでフェニルアラ

ニンの生産性は 1.5 倍に向上した。また、*pheA^{fbr}* 遺伝子の代わりに *tyrA^{fbr}* 遺伝子を用いることで、チロシン生産性の大腸菌を作製することが可能であった。

最終的に、フェニルアラニンまたはチロシン生産性の大腸菌として、以下の 4 株を作製した。

フェニルアラニン生産性

BW25113(DE3) *tyrR* / pRSFDuet-
pheA^{fbr}aroF^{fbr}

BW25113(DE3) *tyrR acs pheA^{fbr}*
aroF^{fbr}aroA

チロシン生産性

BW25113(DE3) *tyrR* / pRSFDuet-
tyrA^{fbr}aroF^{fbr}

BW25113(DE3) *tyrR acs tyrA^{fbr}*
aroF^{fbr}aroA

これらのうち、 と はプラスミドにより遺伝子を大量発現するタイプの菌株 (カナマイシン耐性) である。一方の と は T7 プロモータ下流に連結した 3 種類の遺伝子を大腸菌ゲノム上に導入した菌株である。ゲノム上への遺伝子の導入は Datsenko らの手法を改良して行った。

(2) 芳香族化合物変換酵素遺伝子の収集

18 種類の反応を触媒する酵素遺伝子の候補として 28 種類を選択し、大腸菌を用いてクローニングした。これらの遺伝子を下記に記載する (各項目は一行目が遺伝子略号、二行目がアノテーション、三行目が由来菌株)。

1. *PfTAL*
Phenylalanine/tyrosine-ammonia lyase
Pseudomonas fluorescens
2. *AoPAL1*
Phenylalanine/tyrosine-ammonia lyase
Aspergillus oryzae
3. *AoPAL2*
Phenylalanine/tyrosine-ammonia lyase
Aspergillus oryzae
4. *AoPAL3*
Phenylalanine/tyrosine-ammonia lyase
Aspergillus oryzae
5. *AoPAL4*
Phenylalanine/tyrosine-ammonia lyase
Aspergillus oryzae
6. *LbTyrDC*
Glutamate decarboxylase
Lactobacillus brevis
7. *ReTyrDC*
Tyrosine decarboxylase
Cupriavidus necator
8. *PpAroDC*
Aromatic-L-amino-acid decarboxylase
Pseudomonas putida
9. *BsPAD*
Phenolic acid decarboxylase

- Bacillus subtilis*
10. *BIPAD*
Phenolic acid decarboxylase
Bacillus licheniformis
11. *LbPAD*
Phenolic acid decarboxylase
Lactobacillus brevis
12. *PfPAAD*
Phenylacrylic acid decarboxylase
Pseudomonas fluorescens
13. *RePAAD*
Phenylacrylic acid decarboxylase
Cupriavidus necator
14. *BsPAAD*
Phenylacrylic acid decarboxylase
Bacillus subtilis
15. *EcPAAD*
Phenylacrylic acid decarboxylase
Escherichia coli
16. *CkER1*
2-Enoate reductase
Clostridium kluyveri
17. *CkER2*
2-Enoate reductase
Clostridium kluyveri
18. *TtER*
NADH:flavin oxidoreductase
Thermoanaerobacter tengcongensis
19. *ReIPD*
Indole-3-pyruvate decarboxylase
Cupriavidus necator
20. *AbPPDC*
Phenylpyruvate decarboxylase
Azospirillum brasilense
21. *ReADH2*
Lactate dehydrogenase
Cupriavidus necator
22. *PpADH1*
2-Hydroxyacid dehydrogenase
Pseudomonas putida
23. *PpADH2*
2-Hydroxyacid dehydrogenase
Pseudomonas putida
24. *ReADH3*
Lactate dehydrogenase
Cupriavidus necator
25. *LbADH*
Zn-dependent alcohol dehydrogenase
Lactobacillus brevis
26. *BIALDH*
Aldehyde dehydrogenase
Bacillus licheniformis
27. *EcTO*
Thiamine oxidase
Escherichia coli
28. *EcPAALDH*
Phenylacetaldehyde dehydrogenase

Escherichia coli

つぎに、クローニングした遺伝子の*E. coli* Rosetta 2 株での発現および発現について解析した。SDS-PAGE で可溶性および不溶性の画分を解析した結果、明らかに可溶性タンパク質として発現した遺伝子は 20 種類であり、ほとんど可溶化していないもしくは全く可溶化していないものは 8 種類であった(先の番号の 2, 3, 4, 5, 16, 17, 27, および 28)。しかしながら、8 種類の遺伝子のうち、後の活性解析により 4 種類(5, 17, 27, および 28)は活性が確認されたことから、わずかながらに可溶性タンパク質として発現していることが明らかとなった。

つぎに、各酵素(粗酵素液)の活性について検討した。28 種類の酵素のうち、活性の確認できたものは 15 種類であった。15 種類の酵素を用いて、意図する 18 種類の反応のうち、16 種類をカバーすることが可能であった。また、この 16 種類の反応をカバーすることで、目標とした芳香族化合物 16 種類(図 1)のうち、15 種類を少なくとも酵素的に合成することが可能であった。

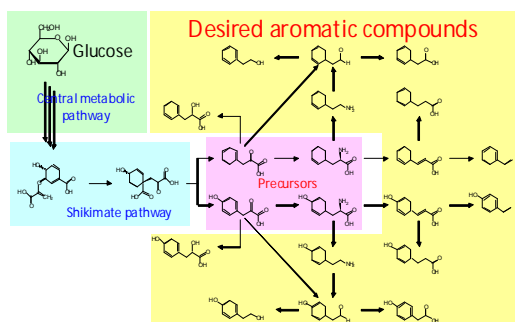


図 1 発酵生産を目指す芳香族化合物

各芳香族化合物合成のための反応(基質と生物)と関与する酵素を以下に示す。

1. 基質 : Phenylpyruvate
生成物 : Phenylacetaldehyde
酵素 : AbPPDC
2. 基質 : Hydroxyphenylpyruvate
生成物 : Hydroxyphenylacetaldehyde
酵素 : AbPPDC
3. 基質 : Phenylpyruvate
生成物 : Phenyllactic acid
酵素 : ReADH2, ReADH3
4. 基質 : Hydroxyphenylpyruvate
生成物 : Hydroxyphenyllactic acid
酵素 : ReADH2, ReADH3
5. 基質 : Phenylalanine
生成物 : Phenylethylamine
酵素 : LbTyrDC, PpAroDC
6. 基質 : Tyrosine
生成物 : Tyramine
酵素 : LbTyrDC
7. 基質 : Phenylalanine
生成物 : Cinnamic acid
酵素 : AoPAL4, PfTAL
8. 基質 : Tyrosine
生成物 : Coumaric acid
酵素 : PfTAL
9. 基質 : Phenylacetaldehyde
生成物 : Phenylacetic acid
酵素 : EcPAALDH, BIALDH
10. 基質 : Hydroxyphenylacetaldehyde
生成物 : Hydroxyphenylacetic acid
酵素 : EcPAALDH, BIALDH
11. 基質 : Phenylacetaldehyde
生成物 : Phenylethanol
酵素 : LbADH
12. 基質 : Hydroxyphenylacetaldehyde
生成物 : Hydroxyphenylethanol
酵素 : LbADH
13. 基質 : Cinnamic acid
生成物 : Styrene
酵素 : None
14. 基質 : Coumaric acid
生成物 : Hydroxystyrene
酵素 : BsPAD, BIPAD, LbPAD
15. 基質 : Cinnamic acid
生成物 : Phenylpropionic acid
酵素 : CkER2
16. 基質 : Coumaric acid
生成物 : Hydroxyphenylpropionic acid

酵素：CkER2

17. 基質：Phenylethylamine

生成物：Phenylacetaldehyde

酵素：None

18. 基質：Tyramine

生成物：Hydroxyphenylacetaldehyde

酵素：EcT0

(3)芳香族化合物生産菌の作製と評価

フェニルアラニン生産性大腸菌 (BW25113(DE3) *tyrR* / pRSFDuet-*pheA^{fabr}aroF^{fabr}*)を宿主として pET-AoPAL4 プラスミドで形質転換し、桂皮酸生産性大腸菌を作製した。一方、チロシン生産性大腸菌 (BW25113(DE3) *tyrR* / pRSFDuet-*tyrA^{fabr}aroF^{fabr}*)を宿主として、pET-PfTAL プラスミドまたは pETDuet-PfTAL-BIPAD プラスミドで形質転換し、クマル酸またはヒドロキシステレン生産性の大腸菌を作製した。これらの菌株を M9 培地で培養し、各芳香族化合物の生産を HPLC で解析した。その結果、それぞれの株において、目的の芳香族化合物を選択的に培養液中に蓄積していることが確認された。

(4)国内外における位置づけおよびインパクト

本研究では芳香族化合物のバイオリファイナリー技術の基盤を確立することを目的とした。そのためのベースとなる菌株の作製とさまざまな遺伝子の収集を行った。また実際に、グルコースから3種類の芳香族化合物について発酵生産に成功した。このように芳香族化合物を包括的に生産するための基盤整理を行っている研究は例がなく斬新的であると考えている。また、近年のバイオベースポリマーの研究において、乳酸に芳香族化合物を混合することで、より有望なポリマーを作製することが可能であることが示されている。このような観点からも、本研究を進展させることで、将来的な脱石油社会の一助になるものと考えている。

(5)今後の展望

現在までに酵素生産と発酵生産により、15種類の芳香族化合物がグルコースより生産可能となった。今後は15種類すべてを発酵生産することを試みる。また、実際にスケールアップを行い、大量生産の可能性について検討する。さらに将来的には、生産物のポリマー化や膜分離の技術などを統合したバイオプロセスとして完成させることを目指す。

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)

[学会発表](計2件)

駒大輔ら、組換え大腸菌によるグルコースからの桂皮酸の生産、日本農芸化学会、2008年3月、名城大学
駒大輔ら、芳香族化合物を生産する大腸菌の作製、日本農芸化学会、2008年3月、マリンメッセ福岡

6. 研究組織

(1)研究代表者

駒大輔 (KOMA DAISUKE)
地方独立行政法人大阪市立工業研究所
研究員
研究者番号：80443547

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：