

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15741

研究課題名（和文）芳香族ジカルボン酸に対する可逆的脱炭酸酵素の探索

研究課題名（英文）Screening of aromatic dicarboxylic acid decarboxylases

研究代表者

青野 陸 (Aono, Riku)

早稲田大学・理工学術院・講師（任期付）

研究者番号：80777938

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：芳香族ジカルボン酸に対する可逆的脱炭酸活性を示す微生物を土壌より探索したところ、4-ヒドロキシソフタル酸およびフランジカルボン酸に対して活性を示す菌株をそれぞれ取得し、それらの菌株より当該活性を示す酵素を同定した。さらには組換え型タンパク質を調製し、その酵素学的諸性質の検討を行うとともに当該酵素を用いた炭酸固定による芳香族ジカルボン酸の合成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年炭酸固定により有用な芳香族カルボン酸を合成しうる酵素として可逆的脱炭酸酵素が注目されている。一方、これまでに発見・解析されている可逆的脱炭酸酵素は主にカルボキシ基を1つ有する芳香族モノカルボン酸を基質とし、カルボキシ基を2つ有する芳香族ジカルボン酸を基質とする酵素の報告例は少ない。本研究では芳香族ジカルボン酸に対する可逆的脱炭酸酵素を取得するとともに、当該酵素を利用した有用物質生産の可能性を提示した。

研究成果の概要（英文）：In order to obtain reversible decarboxylases which recognize aromatic dicarboxylic acid, we cultivated microorganisms in soil samples using the compounds as the sole carbon source. We obtained microorganisms which showed activity towards 4-hydroxyisophthalic acid and 2,5-furandicarboxylic acid, respectively. We identified the corresponding proteins, prepared the recombinant proteins, and synthesized the aromatic dicarboxylic acids using the proteins.

研究分野：応用微生物学

キーワード：芳香族ジカルボン酸 可逆的脱炭酸酵素

1. 研究開始当初の背景

現在、我々の生活を豊かにしている汎用化成品の多くは化石資源由来の化合物を原料に合成されている。しかし化石資源の量には限度があり、近年その枯渇が問題視されている。また化石資源は燃料としても利用されており、その際に生じる二酸化炭素などの温室効果ガスも問題となっている。そのため脱炭素社会実現に資する技術開発が望まれており、炭酸固定による有用化合物合成技術の開発や光合成により二酸化炭素を吸収して生育したバイオマスを用いた有用化合物合成法の開発が必要である (Fig. 1)。

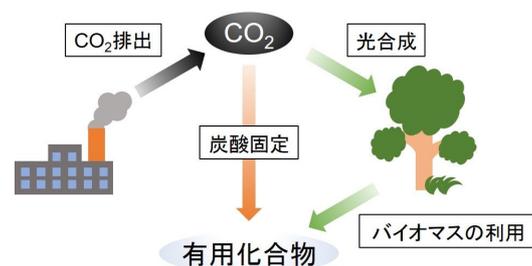


Fig. 1. 二酸化炭素を固定する技術開発

芳香族カルボン酸は医薬原料、化成品やポリマー原料として知られている。芳香族カルボン酸は主に化石資源を由来とするアルキルベンゼンの酸化により化学合成されており、その合成反応には高温、高压を要する。そのため、炭酸固定酵素を用いた芳香族カルボン酸合成システムを開発できれば、温和な条件下で化成品を合成できるのみならず、脱炭素社会の実現に貢献すると期待される。

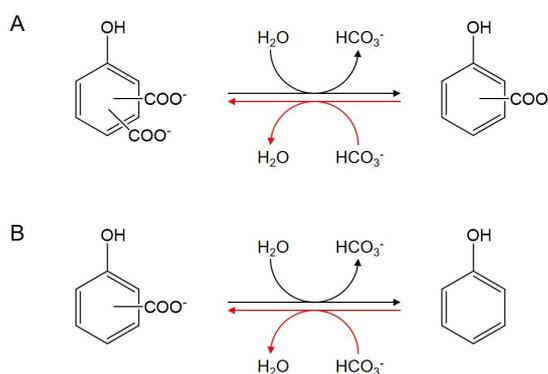


Fig. 2. 可逆的脱炭酸酵素

A. 芳香族モノカルボン酸脱炭酸酵素

B. 芳香族ジカルボン酸脱炭酸酵素

炭酸固定により有用な芳香族カルボン酸を合成する酵素として可逆的脱炭酸酵素が注目されている (Fig. 2)。可逆的脱炭酸酵素は脱炭酸のみならず、逆反応である炭酸固定による芳香族カルボン酸の合成も可能な酵素である。そして位置選択性の高さや反応条件の観点から、化学合成法と比べて環境調和型の炭酸固定による有用芳香族カルボン酸合成法として期待されている。一方、これまでに発見・解析されている可逆的脱炭酸酵素は主にカルボキシ基を1つ有する芳香族モノカルボン酸を基質としている (Fig. 2A)。カルボキシ基を2つ有する芳香族ジカルボン酸を基質とする酵素として 5-carboxyvanillic acid decarboxylase が知られているが、本酵素は脱炭酸活性は示すのに対し、炭酸固定活性は報告されていない。芳香族ジカルボン酸は PET を構成するテレフタル酸に代表されるようにポリマー原料などとして期待される。したがって様々な芳香族ジカルボン酸を合成可能な可逆的脱炭酸酵素を発見できれば、芳香族カルボン酸合成にとどまらず、それを用いたポリマー生産への応用も期待される (Fig. 2B)。

2. 研究の目的

芳香族ジカルボン酸として、解熱鎮痛作用や抗酸化作用を示すと報告されている 4-hydroxyisophthalic acid (4HIPA) および PET に代わるポリエステルとして期待されるポリエチレンフタレート (PET) の原料である 2,5-furandicarboxylic acid (FDCA) を対象とし、これらに対する可逆的脱炭酸酵素を取得し、当該酵素を用いた合成システムの開発を目的とした (Fig. 3)。

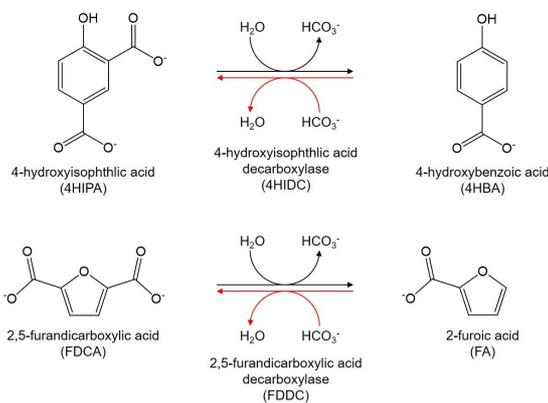


Fig. 3. 対象とする可逆的脱炭酸酵素

3. 研究の方法

(1) 目的活性を有する微生物の取得

目的の可逆的脱炭酸酵素が対象とする芳香族ジカルボン酸の分解経路を構成している可能性を予想し、芳香族ジカルボン酸の資化性を指標としたスクリーニングにより目的活性を有する微生物を土壌から探索した。対象とする芳香族ジカルボン酸を唯一の炭素源とした培地を用いて土壌中の微生物を探索・

探索・

単離し、取得した微生物株が目的活性を有するかを検討した。

(2) 組換え型タンパク質の調製

目的活性を示した微生物より目的酵素の取得を試みた。4HIPA に対する脱炭酸酵素 (4HIDC) については、取得菌株の細胞抽出液に対して多段階のカラムクロマトグラフィーによる活性を指標とした精製・分画により目的タンパク質を取得した。N 末端アミノ酸配列を解析し、その配列をもとに構築したプライマーを用いて逆転写により目的遺伝子発現ベクターを構築し、大腸菌を用いて組換え型タンパク質を調製した。FDCC については、取得株と同族同種のゲノム解析株の情報をもとにプライマーを作製し、目的遺伝子の増幅およびクローニングを行い、大腸菌を用いて組換え型タンパク質を調製した。

(3) 芳香族ジカルボン酸の合成

上記(2)で調製した目的酵素発現菌体または精製酵素を用いて対象とする芳香族ジカルボン酸の合成を試みた。

4. 研究成果

(1) 4HIPA の合成

4HIPA を唯一の炭素源として土壌中の微生物を培養し、4HIDC 活性を有する *Cystobasidium slooffiae* HTK3 を取得した。さらに本菌株の細胞抽出液を多段階のクロマトグラフィーにより精製・分画し、目的の精製タンパク質を取得した。N 末端配列解析の結果をもとに目的遺伝子をクローニング、大腸菌を用いて組換え型タンパク質を調製し、Ni アフィニティーカラムを用いて精製した。精製タンパク質を用いて反応条件を検討したところ、4HIDC は pH6.5-8.0, 30-40°C において高い活性を示すことを明らかにした。また炭酸固定反応における基質濃度の影響を検討したところ、4-hydroxybenzoic acid (4HBA) に対しては濃度依存的な活性の向上が観察されたのに対し、KHCO₃ による基質阻害が観察された (Fig. 4)。現在のところ原因を結論付けることは難しいが、芳香族モノカルボン酸に対する可逆的脱炭酸酵素とは異なり 4HIDC はカルボキシ基を受容するポケットが存在し、KHCO₃ がこれを埋めることで活性が阻害される可能性を考えており、4HIPA 合成時にはあまり高濃度の KHCO₃ を添加しない方がいいことが示唆された。今回の検討により得られた知見に基づいて、今後は効率的な 4HIPA 合成プロセスの開発を検討する。

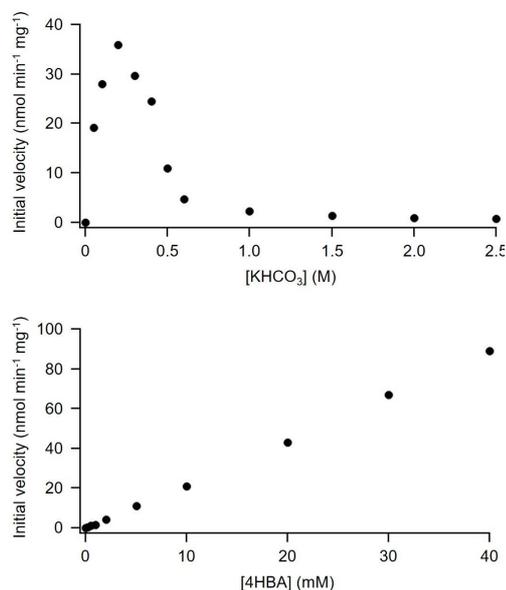


Fig. 4. 4HIDC の炭酸固定活性に対する基質濃度の影響

(2) FDCA の合成

4HIPA の場合と同様に土壌中の微生物を培養し、FDCC 活性を有する *Paraburkholderia fungorum* KK1 を取得した。さらにゲノム解析が完了している同族同種株の遺伝子情報をもとに、KK1 株より目的遺伝子をクローニングした。FDCC はその一次構造から活性に補酵素 prenylated flavin mononucleotide (prFMN) が必要であると予想されたため、大腸菌由来 prFMN 合成酵素 (UbiX) と FDCC との共発現プラスミドを構築し、FDCC-UbiX 共発現大腸菌株を作製した。本菌株を用いた炭酸固定反応を検討したところ、目的の FDCA 合成活性が観察された。FDCC による炭酸固定反応の基質である 2-furoic acid (FA) はバイオマス資源である furfural の酸化物である。そのため furfural から FA を生成する酸化酵素と FDCC とを組み合わせることで、バイオマス資源からの FDCA 合成をできると考え、その酸化酵素の探索を行った。KK1 株が furfural 酸化活性も示したため、当該株由来 furfural 酸化酵素の利用を検討したが、大腸菌内で不溶化してしまった。そこで大腸菌での可溶性発現の報告例があり、furfural の構造類似体である hydroxymethylfurfural に作用する *Methylovorus* sp. MP688 由来酸化酵素 HMFO の適用を試みた。検討の結果、HMFO は furfural に対しても活性を示し、FDCC と組み合わせることで furfural からの FDCA 合成を達成した。

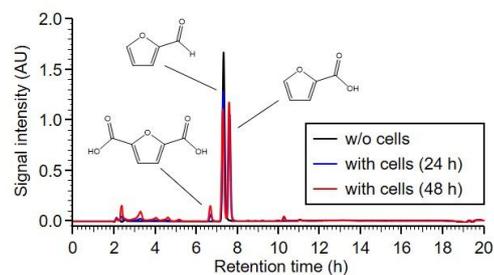


Fig. 5. Furfural からの FDCA 合成

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Kazuki Kawanabe, Riku Aono, Kuniki Kino	4. 巻 -
2. 論文標題 2,5-Furandicarboxylic acid production from furfural by sequential biocatalytic reactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2021.03.001	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 -

1. 著者名 Riku Aono, Tomoya Yoshihara, Hotaka Nishida, Kuniki Kino	4. 巻 -
2. 論文標題 Screening and characterization of a novel reversible 4-hydroxyisophthalic acid decarboxylase from <i>Cystobasidium slooffiae</i> HTK3	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbab082	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Aono, R., Yoshihara, T., Nishida, H. and Kino, K.
2. 発表標題 A novel reversible decarboxylase towards aromatic dicarboxylic acid
3. 学会等名 14th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉原 朋矢, 青野 陸, 木野 邦器
2. 発表標題 新規可逆的脱炭酸酵素4-hydroxyisophthalic acid decarboxylaseの諸性質解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川鍋 一樹, 青野 陸, 木野 邦器
2. 発表標題 バイオプロセスによるフルフラールからの2,5-フランジカルボン酸生産
3. 学会等名 日本農芸化学会2020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