

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21580091

研究課題名（和文） 炭酸固定反応を触媒する脱炭酸酵素群のライブラリー化と各種芳香族カルボン酸生産

研究課題名（英文） Library construction of decarboxylases catalyzing carbon dioxide fixation and their application for the production of various aromatic 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（和文）：

Kolbe-Schmitt 反応を触媒する微生物酵素を系統的に探索し、数種の複素環あるいは芳香環カルボン酸の脱炭酸酵素にその活性を認めた。これらの酵素群の反応特性の解析、遺伝子解析、高活性菌株の造成、炭酸固定反応の最適条件等の検討と得られた知見を総括しライブラリー化した。これら酵素はヘテロオリゴマーのサブユニット構造を成し、その低分子サブユニットが酵素の安定性に寄与していることを明らかにした、今後の酵素応用に際しての重要な知見を得た。

研究成果の概要（英文）：

We have found several aromatic or heterocyclic carboxylic acid decarboxylases catalyze Kolbe-Schmitt reaction. We characterized them and the high expression of each gene and the optimization of reaction conditions of carbon dioxide fixation were studied. We constructed the library of these enzymes and proposed the production process of various carboxylic acids. These enzymes compose of hetero-oligomer and a small molecule subunit participates as a stable factor, which were very important for the further application of these enzymes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
平成 22 年度	800,000	240,000	1,040,000
平成 23 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：発酵生産

## 1. 研究開始当初の背景

地球温暖化の主な原因とされている二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) の排出量増加の問題、またバイ

オプロセスの化学工業への導入によるグリーンケミストリー達成の点からも微生物の

新規CO<sub>2</sub>固定反応の研究は極めて重要な研究課題である。最近になり、微生物の新しい多彩なCO<sub>2</sub>固定化反応が明らかになりつつある。例えば、ドイツのFuchらのグループは、*Thauera aromatica*による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、カルボキシ化(CO<sub>2</sub>固定)され、次にコエンザムAと結合した後にベンゼン環が還元される経路を提案した(A. Lack et al. Arch. Microbiol. 161, 132-139, (1994))。またアメリカのEnsignらのグループは、エポキシドへのCO<sub>2</sub>付加反応を触媒する酵素エポキシドカルボキシラーゼ(J. R. Allen et al. J. Biol. Chem. 272, 32121-32128, (1997))とアセトンカルボキシラーゼ(M. K. Sluis et al. J. Bacteriol. 184, 2969-2977, (2002))の2種類の新規CO<sub>2</sub>固定化反応を*Xanthobacter*に見出し、酵素複合体の解析や、その反応特性、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”をそれぞれ*Bacillus megaterium*と*Arthrobacter nicotinae*に見出した。これらの脱炭酸酵素は反応条件によっては、それぞれピロール、インドール環へのCO<sub>2</sub>固定活性を効率よく触媒できる新しいタイプの脱炭酸酵素であることを明らかにした(Omura et al. Eur. J. Biochem., 253, 480-484, (1998)), Yoshida et al. Biosci. Biotechnol. Biochem., 66, 2388-2394, (2002))。これまで、脱炭酸酵素による炭酸固定反応は不可逆とされてきたが、炭酸固定活性を発揮する芳香環、複素環脱炭酸酵素群の存在が明らかとなり、CO<sub>2</sub>固定によるC-C結合の生成は学術的な新規性のみならず応用面からも高いポテンシャルを示した。

これまでに有機合成において、ベンゼン環への直接的なCO<sub>2</sub>固定反応は、Kolbe-Schmitt反応として知られている。高温高压条件下(100-200℃、0.1-3.0 MPa)でアルカリフェノキシドにCO<sub>2</sub>を固定する反応で、サリチル酸、4-ヒドロキシ安息香酸、4-アミノサリチル酸、ヒドロキシナフトエ酸等の芳香族ヒドロキシ酸の工業生産に実用化されている。これらの芳香族ヒドロキシカルボン酸は、高分子液晶、食品添加剤、医薬品、化粧品等に汎用されている。Kolbe-Schmitt反応は、長年にわたって用いられてきたが、その反応選択性に問題がある。反応時に副生する構造異性体が目的生成物に夾雑するため、精製工程が煩雑であり、収率の点で問題がある。高温高压条件下での反応は、省エネルギー、安全性の点からも問

題が残る。従来の環境負荷の大きい化学合成法を、環境適応型に改良して行く点で、温和な条件下で位置選択的なCO<sub>2</sub>固定を触媒する脱炭酸酵素を用いる“微生物のKolbe-Schmitt反応の利用”は高いポテンシャルを秘めた新規合成法と成りうると思った。そこで、我々は芳香族、複素環カルボン酸脱炭酸酵素群のCO<sub>2</sub>固定化活性に注目して、系統的なCO<sub>2</sub>固定遺伝子資源ライブラリーを作成し、それぞれの特性解析を目指した。

## 2. 研究の目的

### (a) 耐熱性を示す4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の探索

これまでに4-ヒドロキシ安息香酸の脱炭酸酵素が逆反応でフェノールへの炭酸固定反応をも触媒することを見出し、4-ヒドロキシ安息香酸の酵素合成法への活用を検討してきた。本研究では、新しい反応場として超臨界二酸化炭素に注目し、炭酸固定反応を触媒する脱炭酸酵素の適用性を検討した。

### (b) 超臨界二酸化炭素下での炭酸固定反応

超臨界二酸化炭素下での酵素反応の検討は少なく、超臨界流体中での酵素の安定性が求められる。二酸化炭素の臨界点は72.9気圧、31.0℃であり(Fig. 1)、超臨界二酸化炭素下で4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素を用いて炭酸固定反応を検討するためには、高い温度域において安定で、かつ高活性を示す酵素が必要である。このような特性を示す4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素は見出されず、本研究では50℃での集積培養を行い、耐熱性を示す酵素の探索を進めた。

### (c) 炭酸固定を触媒する脱炭酸酵素の構造特性

これまでに、4-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、ピロール-2-カルボン酸脱炭酸酵素などが細菌に発見され、酵素反応特性の解明、酵素遺伝子・一次構造解析と、炭酸固定機能を活用した芳香族カルボン酸の酵素合成が検討されてきた。2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸では、酵素遺伝子を高発現させた組換え大腸菌が作成され、酵素高次構造の解明も進展している。しかしながら、4-ヒドロキシ安息香酸やピロール-2-カルボン酸の脱炭酸酵素については、大腸菌における酵素の高発現には至っておらず、活性型の酵素には未同定の酵素サブユニットが関与することが考えられる。そこで本研究では、4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素遺伝子の近傍領域に見出したORFがコードするタンパク質を大腸菌において発現させ、本酵素の活性発現に関与する可

能性を検討した。

(d) ピロール-2-カルボン酸脱炭酸酵素については、酵素遺伝子下流領域が取得されていないため、野生型酵素を精製し、新たな酵素サブユニットの関与を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

4-ヒドロキシ安息香酸を単一炭素源として培地を用い、土壌を分離源として50°Cでの集積培養を行った。約600種類の土壌サンプルから424株の微生物を分離し、8菌株に4-ヒドロキシ安息香酸の脱炭酸活性が認められた。この中で安定に高活性を示した2菌株(314Y4-1, 313N10-2)を以後の検討に用いた。

タンパク質データベース中には本脱炭酸酵素と有意な相同性を示すタンパク質が多数認められ、その遺伝子近傍領域にそれぞれ相同性を示すタンパク質をコードするORFが存在することが分かった。そこで、*E. cloacae* P240の4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素遺伝子の上下流に存在する2つのORFに着目し、大腸菌における発現と活性型酵素の構築を検討した。

### 4. 研究成果

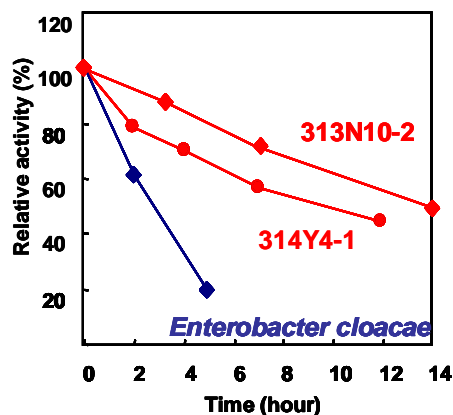
(a) 耐熱性を示す4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の探索と菌株同定

菌株同定のために、ゲノムDNAを調製して16S rDNA解析を行った。いずれの菌株も*B. subtilis*と99%以上の相同性を示し、*Bacillus*属の中温菌であることが明らかとなった。研究室保存の*Bacillus*属細菌を50°Cで培養し、4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸活性を評価した結果、5株で強い活性が認められた。

土壌分離株*Bacillus* 314Y4-1, 313N10-2の培養特性を検討した。いずれの菌株も30°Cではほとんど生育せず、40~50°Cが最適生育温度であった。酵素活性を高めるために培養条件を検討したところ、酵素活性は4-ヒドロキシ安息香酸、4-アセトアミド安息香酸によって強く誘導されることが判明した。4-アセトアミド安息香酸を添加した培地を最適化し、酵素活性を当初の約15倍に高めた。

*Bacillus* 314Y4-1, 313N10-2の休止菌体を用いて、4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の熱安定性と最適温度を検討した。両菌株の酵素は0~50°Cで30分間の処理では活性を保持し、60°Cでは完全に失活した。最大活性は50°Cで認められ、30°Cではその50%の相対活性を示した。本研究室で炭酸固定活性を検討してきた*Enterobacter cloacae* P240の酵素

は非常に不安定で、氷上で保存しても5時間で残存活性は20%に低下するが、今回分離した*Bacillus*属の酵素は12時間の保存後も約50%の活性を保持していた。(図1)



(図1)

(b) 超臨界二酸化炭素下での炭酸固定反応

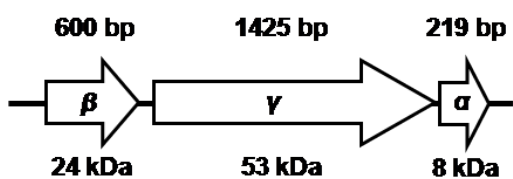
休止菌体懸濁液、フェノール、緩衝液を耐圧反応容器に入れ、HPLCポンプで液化二酸化炭素を容器内に流入させ、50°C、9.0 MPaの超臨界条件下で、炭酸固定反応を検討した。pH10.0のGly-NaOH緩衝液100 mMを用いた場合に、微量ながらも4-ヒドロキシ安息香酸の生成が認められた。安定に炭酸固定反応は進行せず、超臨界二酸化炭素下でのpHの低下が炭酸固定反応に影響を及ぼしていると考えられた。

(c) 4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の活性発現

4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素はこれまでに*Clostridium hydroxybenzoicum*と*Enterobacter cloacae* P240の精製酵素を用いて反応特性が解明されている。極めて酸素感受性が強く、還元剤の非存在下では速やかに失活する酵素で、大腸菌において高発現させた報告はない。タンパク質データベース中には本脱炭酸酵素と有意な相同性を示すタンパク質が多数認められ、その遺伝子近傍領域にそれぞれ相同性を示すタンパク質をコードするORFが存在することが分かった。そこで、*E. cloacae* P240の4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素遺伝子の上下流に存在する2つのORFに着目し、大腸菌における発現と活性型酵素の構築を検討した。4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の既知サブユニット

( $\gamma$ )をコードする遺伝子上下流の解析を行い、上流に24.1 kDa ( $\beta$ )、下流に8.1 kDa ( $\alpha$ )のタンパク質をコードするORFを見出した(図2)。 $\alpha$   $\beta$   $\gamma$ 遺伝子を同時に発現さ

せた組換え大腸菌を作成した結果、酵素活性の発現を初めて確認した。また、3つのサブユニットを個別に大腸菌で発現させ、無細胞抽出液を混合した場合にも酵素活性が認められた。無細胞抽出液を混合した直後には酵素活性は低いものであったが、徐々に活性が高まってプラトーに達したことから、3つのサブユニットの会合が時間の経過にしたがってゆっくりと進行したと考えられる。この会合状態を形成させた酵素溶液を数週間保存しても活性は保持されていた。

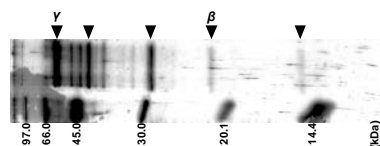


(図 2)

(d) ピロール-2-カルボン酸脱炭酸酵素を構成するサブユニットの探索

ピロール-2-カルボン酸脱炭酸酵素は *Bacillus megaterium* PYR2910 および *Serratia* 属細菌に活性が分布しており、特に、*B. megaterium* PYR2910 の酵素は補因子として有機酸を要求するユニークな特徴を示す。4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素と同様に、大腸菌において既知サブユニットを著量に発現させた場合でも酵素活性はほとんど認められない。そこで、4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素を用いた実験で得た知見にもとづき、未同定サブユニットの探索を進めた。

ピロール-2-カルボン酸脱炭酸酵素の既知サブユニットをコードする遺伝子の上下流領域を解析した結果、下流に4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素のβ-サブユニットと相同性を示す 21 kDa のタンパク質をコードする ORF を見出した。しかしながら、α-サブユニットに相当するタンパク質をコードする ORF は認められなかった。既知サブユニットとβ-サブユニットを同時に発現させた大腸菌を作成したが、強い酵素活性は認められなかった。そこで、遺伝子解析からのサブユニット同定が困難であったため、*B. megaterium* PYR2910 から酵素精製を行い、解析を進めた。部分精製標品を SDS-PAGE 後、銀染色を行ったところ、遺伝子解析から判明した 21 kDa のβ-サブユニットが確認された。また、幾つかの明瞭なバンドが検出され (図 3)、β-サブユニット以外の未知サブユニットの関与が示唆された。



1 Purified Enzyme  
2 Marker proteins

(図 3)

終わりに

コルベ・シュミット反応を触媒する酵素群は様々な微生物種に分布していることが、これまでの研究で明らかとなってきた。この中で、2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素とピロール-2-カルボン酸脱炭酸酵素は、極めて効率的に位置選択的な炭酸固定反応を触媒し、2,6-ジヒドロキシ安息香酸とピロール-2-カルボン酸の高濃度生産を達成している。このような微生物(酵素)触媒を用いたコルベ・シュミット反応は、芳香族化合物に位置選択的にカルボキシル基を導入でき、芳香族化合物を高機能化するための新しいツールとして注目できる。しかし、これまでに見いだされている芳香族カルボン酸の脱炭酸酵素はいずれも、基質特異性が狭く、さまざまな芳香族化合物への炭酸固定反応には用いることができない。今後、さらに新たな芳香族カルボン酸の脱炭酸酵素の発見が待たれる。また、炭酸固定機能をより有効に活用するためには、反応平衡をカルボン酸の生成方向に偏らせる技法の開発が課題と考えられる。

## 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 2 件)

(1) Toyokazu Yoshida, Yuki Inami, Toru Nagasawa, Regioselective carboxylation by 3, 4-dihydroxybenzoate decarboxylase of *Enterobacter cloacae* P241, *Biotechnology Letters*, 査読有り, 32 巻, 2010, 701-705

(2) Tomoko Matsuda, Toru Nagasawa, Novel continuous decarboxylation using pressurized carbon dioxide by immobilized decarboxylase, *Tetrahedron Letters*, 査読有り, 31 巻, 2009, 6019-6020

[学会発表] (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 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

### (3) 連携研究者

松田知子 (MATSUDA TOMOKO)  
東京工業大学大学院・生命理工学研究科・  
講師  
研究者番号：10319494