

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580108

研究課題名(和文)炭酸固定反応を触媒する脱炭酸酵素の機能発現解析とその応用

研究課題名(英文)Structural and functional analysis and application of decarboxylases catalyzing reverse carboxylation

研究代表者

吉田 豊和 (YOSHIDA, Toyokazu)

岐阜大学・工学部・教授

研究者番号：90220657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：2,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素は、これまで存在は示唆されていたが、活性を持つ微生物株の分離と酵素の精製は報告されていなかった。土壌から集積培養によって、本酵素活性を示す微生物を分離した。酵素を単一に精製し、反応特性と分子特性を検討したところ、新規性の高い脱炭酸酵素であることが判明した。逆反応による炭酸固定反応では、副生成物が生じずに位置選択的な炭酸固定反応が進行した。

研究成果の概要(英文)：The existence of 2,4-dihydroxybenzoate decarboxylase had been suggested in anaerobic microorganisms. However, microorganisms had not yet been isolated. Therefore, the decarboxylase had not been characterized. In the present study, microorganisms showing 2,4-dihydroxybenzoate decarboxylase activity have been isolated through enrichment culture under semi-anaerobic conditions. The decarboxylase was purified to homogeneity and characterized. In the point of substrate specificity and subunit structure, the present enzyme was different from various hydroxybenzoate decarboxylases reported previously. The reverse carboxylation reaction proceeded regioselectively to form 2,4-dihydroxybenzoate without any by-product.

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 炭酸固定機能 酵素変換

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は炭酸固定機能を備えた新しい脱炭酸酵素を見だし、炭酸固定機能を活用したカルボン酸の合成法を開発してきた。すでに見出した脱炭酸酵素の中で、ヒドロキシ安息香酸の脱炭酸酵素は大きく2つのグループに分類でき、カルボキシル基のオルト位に水酸基を持つヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素は酸素感受性が強く、ホモダイマー構造をとっている。パラ位に水酸基を持つヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素は、酵素が酸素感受性で不安定であり、3種類のサブユニットからなるヘテロオリゴマーである。この知見にもとづくと、オルト位とパラ位の両方に水酸基を持つ2,4-ジヒドロキシ安息香酸の脱炭酸酵素がどのような特性を持つかが興味深い。研究開始当初までに、この脱炭酸酵素を持つ微生物の存在は示唆されていたが、活性菌の分離さえ報告されておらず、酵素の精製や性質の解明は全く行われていなかった。

### 2. 研究の目的

これまでに発見してきたヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の反応・分子特性にもとづき、逆反応で炭酸固定機能を発揮する脱炭酸酵素群の一般化を図ってきた。しかしながら、既知の脱炭酸酵素に関する知見のみでは、その共通項を見いだすことは困難である。タンパク質一次構造データベースには、ある程度の相同性を示すものの、本来の基質が分からないために、機能未知タンパク質、あるいは、推定状の脱炭酸酵素と記載されたタンパク質が無数に存在している。

このような背景にもとづき、新たなヒドロキシ安息香酸基質として2,4-ジヒドロキシ安息香酸に着目した。これは上述のオルト位とパラ位の両方に水酸基を持つ構造であり、2つのグループに大別される既知脱炭酸酵素のいずれに属するのかという学術的解明と関連している。また、パラ位へのカルボキシル化を触媒する酵素が不安定であるため、安定性の高い酵素が得られる可能性があり、位置選択的カルボキシル化が達成できれば、酵素利用工学的な観点から有用な反応と考えられる。よって、新規酵素として2,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素を持つ微生物の探索し、酵素活性を高めた後、休止菌体反応レベル、精製酵素レベルで、その反応特性と構造特性を解明することを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)集積培養による2,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素を持つ微生物の分離：2,4-ジヒドロキシ安息香酸を添加した栄養培地を調製し、土壌試料を入れ、振とうおよび静置培養で集積培養を行った。培地のリフレッシュを数回繰り返し、同じ組成の平板培地に画線して生育したコロニーをピックアップした。

(2)休止菌体による活性評価：微生物株を培養し、遠心分離で得られた菌体を生理食塩水に懸濁し、休止菌体を調製した。2,4-ジヒドロキシ安息香酸を含むリン酸緩衝液中で反応させ、生成するレゾルシノールをTLCおよびHPLCで分析した。

(3)活性菌からの2,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の精製：培養菌体を超音波破碎して無細胞抽出液を調製した。50℃で30分間の熱処理をした後、硫酸分画(30-60%飽和)し、その後、イオン交換カラム、疎水性カラムを用いて酵素精製を行った。精製後の酵素の純度検定とサブユニット分子量はSDS-PAGEで評価した。

(4)反応特性の検討：酵素の誘導基質の検討は、休止菌体反応で行った。基質特異性の検討では、2,4-ジヒドロキシ安息香酸を誘導物質として培養した菌体を用い、反応生成物は全てHPLCで分析した。

(5)炭酸固定機能の評価：休止菌体を密閉可能な容器に入れ、リン酸緩衝液、レゾルシノールと混合した、炭酸源として3M量に相当する粉末の炭酸水素カリウムを添加した。反応中に二酸化炭素が発生するため、容器を密閉して30℃で6時間加温した。反応停止は遠心分離で菌体を除去することで、行った。生成する2,4-ジヒドロキシ安息香酸をHPLCで分析した。

### 4. 研究成果

(1)集積培養による2,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素を持つ微生物の分離：予備的検討で2,4-ジヒドロキシ安息香酸を単一炭素源とした集積培養では活性菌は得られなかった。そこで、栄養源を補助した培地を設定したところ、静置培養条件でレゾルシノールの生成が確認された。

しかしながら、集積培養における混合培養系から活性を持つ微生物株を平板培地で分離することは当初はできなかった。これは、ベンゼン環を開裂する微生物と競合しており、それらの微生物株の生育の速度が目的株よりもはるかに速いためであった。そこで、集積培養からの微生物の分離時に、さまざまな希釈系を作成し、平板培地に塗布し、混合系においてマイナーな存在であった目的の活性菌を初めて分離できた。過去の論文で活性の存在が示唆されていたにも関わらず、微生物株の分離が報告されていなかった理由が、微生物代謝の競合に由来することと分かった。

(2)休止菌体による活性評価：活性を示す菌株が合計10株得られ、これらの活性の強さを休止菌体で行った。まず、安定に高い活性を示す微生物株を選抜し、生育に適する栄養条件の設定をし、当初の前活性を数倍にまで

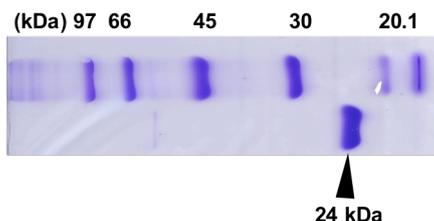
高めることができた。

2,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素は誘導酵素であり、培地に添加した基質の濃度変化と培養時間によって大きく酵素活性が変動した。長時間の培養では顕著に活性が低下するため、適切なインデューサーの検索を行った。2-ヒドロキシ安息香酸、4-ヒドロキシ安息香酸を比較すると、4-ヒドロキシ安息香酸の方が酵素活性をより強く誘導し、パラ位の水酸基がインデューサーには重要であることが分かった。また、パラ位にアミノ基を持つアミノ安息香酸も同等の活性を誘導するという知見が得られた。ただし、活性菌に複数のヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素が存在し、幅広い基質特異性を示す可能性が考えられるため、本来の基質である2,4-ジヒドロキシ安息香酸を用いて酵素活性を誘導することが適切であると判断した。

上記内容に配慮するために、休止菌体レベルで予備的な基質特異性の検討が必要と考え、さまざまなヒドロキシ安息香酸を基質として反応性を調べた。その結果、活性菌が有する脱炭酸酵素は2,4-ジヒドロキシ安息香酸に最も作用し、他のヒドロキシ安息香酸類への反応性は劣っており、新規酵素として2,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素を有することが明らかになった。

(3) 2,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の精製と特性解析：オルト位に水酸基がある2,3-ヒドロキシおよび2,6-ジヒドロキシ安息香酸の脱炭酸酵素は研究代表者の以前の研究において、酸素感受性がなく熱安定性に優れていることが明らかとなっている。酵素精製に先立って熱安定性を評価した結果、50℃で30分間の熱処理後に全く活性を失わないことが分かり、酵素精製過程に熱処理を施すこととした。

熱処理後に硫安分画および各種のカラムクロマトグラフィーを行い、低濃度の還元剤の存在下で安定に目的の酵素を精製が可能であった。SDS-PAGEでサブユニット分子質量を測定したところ、約24 kDaのホモダイマーであると考えられる。これまでのオルト位水酸基保有基質に作用するヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素のサブユニット分子質量に比べると、かなり小さく一次構造に相違があると考えられる。



#### (4) 一次構造の部分解析

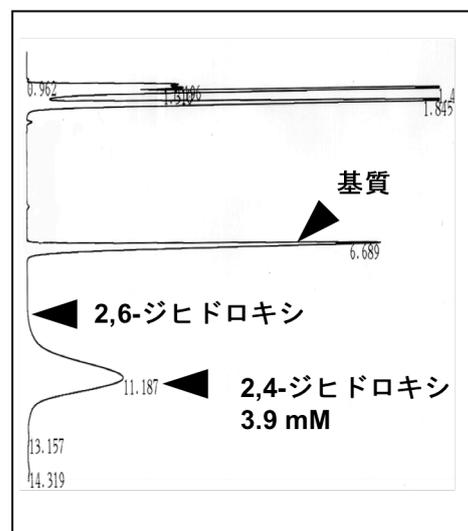
アミノ末端の配列(10アミノ酸残基)を解析し、データベースで相同性を示すタンパク

質を検索した。既知のヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の一次構造と相同性は認められず、腸内細菌科の機能未知タンパク質のアミノ末端10残基が完全に一致した。オルト位に水酸基を持つ基質に作用する脱炭酸酵素は主に好気条件下で生育する細菌、カビなどで見いだされ、パラ位型の脱炭酸酵素が腸内細菌科で検出されており、以上の結果から想定すると、これまでに2つに大別してきた脱炭酸酵素群と反応・構造特性に相違があることが示唆される。

(5) 2,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の炭酸固定機能の評価：逆反応で炭酸固定反応を触媒するこれまでの脱炭酸酵素は、炭酸水素カリウムを添加すると、水系で平衡状態で溶解している二酸化炭素分子をベンゼン環に位置選択的に導入される。レゾルシノール(1,3-ジヒドロキシベンゼン)を基質とすると、オルト位型酵素では2,6-ジヒドロキシ安息香酸が一部生成するという報告もある。よって、反応性と副生成物の生成パターンから、今回の酵素の反応特性が位置づけられると考えた。

密閉容器内で飽和濃度の炭酸水素カリウムを炭酸源として添加すると、レゾルシノールへの速やかな炭酸固定反応が進行した。10 mMのレゾルシノールから6時間後には39%の変換率で2,4-ジヒドロキシ安息香酸が生成していた。平衡状態にまで達していない反応条件のため、今後、高濃度のレゾルシノールを添加した反応系を設定し、変換効率の調査が必要である。

反応後に2,6-ジヒドロキシ安息香酸やその他の副生成物の生成があるかをHPLCで分析したところ、いずれのヒドロキシ安息香酸も検出されず、位置選択的なカルボキシル化が可能な脱炭酸酵素であることを確認した。



(6) 2,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の生理的役割：2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素については、酵素遺伝子近傍領域の解

析から、一連の分解代謝経路が存在すると報告されている。本研究での2,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素については、微生物代謝経路はこれまでに提唱されていない。また、微生物細胞内における生理的存在意義は、本酵素の脱炭酸反応あるいは炭酸固定反応であるかも不明である。

活性菌の培養時における2,4-ジヒドロキシ安息香酸およびレゾルシノールの分解と生成の挙動を調べた結果、培地に添加した2,4-ジヒドロキシ安息香酸の分解に伴って、レゾルシノールが生成し、長時間の培養を継続してもレゾルシノールの分解は観察されなかった。よって、レゾルシノールのさらなる分解酵素は存在しないと考えられる。

本研究で精製した脱炭酸酵素は、研究代表者が取り扱ってきたいずれの可逆的脱炭酸酵素に比べても精製酵素の比活性（脱炭酸反応）が極めて低く、脱炭酸反応における生理的な基質が別に存在している可能性があり、酵素遺伝子近傍領域などの解析が今後必要であろう。

(7)2,4-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と組換え大腸菌の作成：精製酵素のアミノ末端のアミノ酸配列がデータベース中の機能未知タンパク質と完全に一致したことから、データベースの塩基配列にもとづき、2,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素遺伝子のPCRによる増幅を進め、塩基・アミノ酸配列の解析を進めた。

野生株の菌体を酵素変換反応に用いた場合、酵素が誘導されていても酵素比活性が極めて小さなため、炭酸固定機能を利用した物質変換系に応用することが困難なため、反応性が低いと考えられる炭酸固定基質の数値的評価が困難である。よって、大腸菌における酵素遺伝子の高発現を検討し、さまざまなヒドロキシ安息香酸およびそのアナログへの位置選択的なカルボキシル化を検討する必要がある。

(8)今後の課題：上記の(6)での検討課題に加え、本研究で初めて見いだした新規酵素2,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素は、既知の可逆的脱炭酸酵素と構造および反応特性が大きく異なっている。すなわち、新たに適切な反応基質を選定すれば、データベースにおいて機能未知（基質未知）とされているタンパク質が可逆的脱炭酸酵素と同定されることを意味している。

ヒドロキシ安息香酸の脱炭酸酵素を研究代表者は先駆的に幅広く探索してきたが、視野を広げて、複素環カルボン酸や、ジカルボン酸の一方を脱炭酸する酵素反応などの新規探索を進めることで、酵素の応用性の拡張が期待されると考えている。ゲノム・タンパク質データベースを起点とする研究展開が盛んとなっている近年であるが、新規の酵素反応の発見（発掘）も継続していくべき課題

と捉えている。

## 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）

〔学会発表〕（計 2件）

- ① 吉田拓矢、満倉浩一、吉田豊和、2,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の特性解析、日本農芸化学会大会、2014年3月28日。明治大学生田キャンパス
- ② 吉田拓矢、大村信人、満倉浩一、吉田豊和、2,4-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の探索、日本生物工学会大会、2013年9月19日、広島国際会議場

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 豊和 (YOSHIDA, Toyokazu)  
岐阜大学・工学部・教授  
研究者番号：90220657