

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：24403
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2012～2014
課題番号：24658085
研究課題名(和文)新規アクリル酸変換酵素の機能解明とその応用

研究課題名(英文)Microbial hydration of acrylic acid

研究代表者

片岡 道彦 (KATAOKA, Michihiko)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：90252494

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)：本研究では、アクリル酸資化性菌として単離した2種のアクリル酸変換菌(3-ヒドロキシプロピオン酸生成菌)について、アクリル酸から3-ヒドロキシプロピオン酸への変換を触媒する水和酵素の詳細を解明するため、休止菌体および細胞抽出物によるアクリル酸水和反応の基礎解析、および酵素の精製を行った。その結果、本反応はCoA体を介したものであることが明らかとなり、アクリル酸水和反応の機構解明に向けた成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Acrylic acid is one of the short-chain unsaturated fatty acids, and widely used as a basic compound of flexibility polymers such as paints, adhesives and functional materials. Although research on the microbial conversion of compounds carrying C=C bond has been advanced, there are few reports about conversion of acrylic acid. In this study, microorganisms showing acrylic acid conversion activity were isolated, and the reaction mechanisms and enzymatic functions were examined.

研究分野：応用微生物学

キーワード：水和酵素 アクリル酸 微生物変換 微生物酵素

1. 研究開始当初の背景

自然界に存在する有機化合物には、C=C 結合を含む不飽和化合物が無数に存在しており、生命の営みにも重要な役割を果たしている。また、石油化学製品の中にも数多くの C=C 結合を有する化合物が存在している。C=C 結合を含む化合物は、自然界において様々な生物化学的反応により代謝(合成・分解)されていく。例えば、C=C 結合への水素添加による飽和化反応、酸素添加によるエポキシ化反応、水付加による水酸化反応等が知られている。また化学製品としては、ポリマー原料となるエチレン、プロピレン、アクリル酸等があり、現代社会では必要不可欠な化合物となっている。このように我々の身の回りに無数に存在し、重要な役割を果たしている C=C 結合を含む化合物であるが、その微生物代謝や微生物変換に関する研究についても近年いくつかの研究が進展してきている。例えば、我々の研究グループが 2002 年に初めて報告した旧黄色酵素の C=C 結合不斉水素添加触媒能は、非常に有効な産業用触媒と認識され、国内外含めて様々な研究者により現在も精力的な研究がなされている。

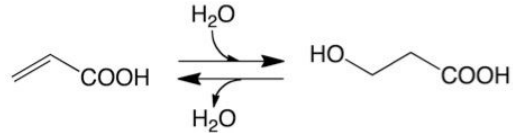
このような状況の下、C=C 結合に作用する新たな酵素触媒を求めて、我々の研究グループでは様々な C=C 結合含有化合物の微生物変換の探索を行った。その結果、アクリル酸の C=C 結合を水和し 3-ヒドロキシプロピオン酸 (3HPA) に変換する 2 種の微生物 (*Acremonium strictum* FA547 株および *Fusarium* sp. No. 17 株) を見出した。これらの菌株の培養菌体を、アクリル酸を含む反応液中で反応させると 3HPA が検出されたことから、見かけ上は単純な酵素的水和反応が進行しているように思われるが、実際にはどのような経路・メカニズムで変換反応が起こっているのか不明であった。一見単純な水和反応とも考えられるが、これまでアクリル酸を直接 3HPA へと水和変換する酵素の報告は意外にもなかった。

2. 研究の目的

アクリル酸は最も単純な構造を持つ不飽和脂肪酸であり、汎用性ポリマーの基本物質として広く使用されている。現在のアクリル酸製造は石油化学に依存しているが、昨今の地球温暖化対策や石油資源枯渇などの観点から、バイオマスのような再生可能原料を用いた微生物による発酵生産が期待されている。

我々が見出したアクリル酸水和活性を持つ微生物が生成する 3HPA は、すでにグルコース等のバイオマスからの発酵生産経路が確立しているため、このアクリル酸から 3HPA への変換反応の逆反応を利用すれば、バイオマスから 3HPA を介したアクリル酸の発酵生産が可能となると考えられる。しかし、これらの微生物が触媒するアクリル酸水和反応の反応機構や酵素特性などの詳細につ

いては未解明なままであった。そこで、本研究では、糖などの再生可能資源からのアクリル酸発酵生産を最終的な目標として、単離した 2 種のアクリル酸変換菌 (3HPA 生成菌) が有するアクリル酸水和酵素の詳細を解明するため、アクリル酸水和反応の休止菌体と細胞抽出物による基礎解析、および酵素の精製に取り組んだ。



3. 研究の方法

(1) 休止菌体を用いた 3HPA 高生産条件の検討

アクリル酸の水和酵素系の解明を行うにあたり、高い水和活性を持つ菌体の獲得を目的として、各菌株について培養条件・反応条件を変化させて、菌体あたりの水和活性の評価を行った。具体的には、培養日数、反応日数、培地へのアクリル酸添加の有無、反応に用いる菌体量等について検討を行った。

(2) 細胞抽出物によるアクリル酸変換反応

アクリル酸水和反応およびその触媒酵素のさらなる解析のため、両菌株の菌体破砕物を上清 (CFE) と沈殿物 (CD) に分け、それぞれを用いてアクリル酸変換反応を行った。また、様々な化合物を反応液に添加して、アクリル酸変換反応への影響を調べた。

(3) *Sulfolobus tokodaii* 由来 3HP-CoA シンターゼによるアクリル-CoA 合成と反応

アクリル-CoA と 3HP-CoA の入手が困難であるため、*S. tokodaii* 由来 3HP-CoA シンターゼを用いて各 CoA 体を合成した。合成した CoA 体を基質とした、CFE を用いた反応を行った。

(4) アクリル酸水和酵素の精製

アクリル酸を基質として、アセチル-CoA 添加を行うと各菌株の CFE による 3HPA 生成が検出できたことから、CFE から各種クロマトグラフで分画を行った酵素液を用いて、酵素生成を試みた。

4. 研究成果

(1) 休止菌体を用いた 3HPA 高生産条件の検討

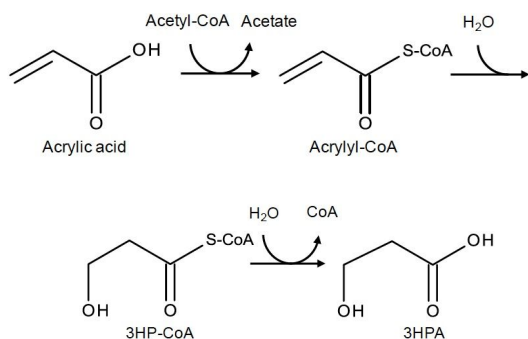
休止菌体によるアクリル酸変換反応において、菌体あたりの 3HPA 生成量の評価に適した使用菌体量を 12.5 mg/ml と決定した。培地中のアクリル酸添加による酵素の発現誘導について検証した結果、培養時のアクリル酸添加による影響は見られなかった。さらに菌体の培養日数を 7 日間と決定した。これらの条件を、活性の高い菌体を得るための最適な培養条件として定めた。また、培地中の

アクリル酸による酵素誘導が見られなかったことから、2種のアクリル酸変換菌株はこれまで報告されている微生物とは異なるアクリル酸変換酵素や発現機構を有することが示唆された。

(2) 細胞抽出物によるアクリル酸変換反応

菌体反応時と同様の反応液に、各菌株から調製した CFE あるいは CD を添加し、アクリル酸を基質とした反応を行った結果、両菌株とも CFE および CD いずれの場合も、アクリル酸からの 3HPA 生成は見られなかった。この結果から、アクリル酸変換反応には何らかの補因子が必要であると考えられた。生体内で行われている様々な反応のうち、脂肪酸を初めとするカルボン酸の代謝に関しては、CoA とのチオエステル体が基質として機能する 경우가多くある。そこで、遊離 CoA またはその誘導体であるアセチル-CoA を添加した反応液を用いて上記と同様の反応を行った結果、アセチル-CoA を添加した場合のみ両菌株とも CFE との反応時に 3HPA の生成が確認できた。

通常、カルボン酸と CoA の間に酵素触媒下でチオエステル体を形成させるためには、反応に ATP が必要となる。しかし、上記の反応系では、CoA および ATP 存在下で CFE をアクリル酸と反応させても 3HPA 生成は認められなかった。一方、アセチル-CoA および ATP 存在下で CFE をアクリル酸と反応させた場合は、3HPA 生成が認められた。さらに、この条件下では反応液への ATP 添加は不要であることも明らかとなった。ATP 非存在下で反応させた場合、添加するアセチル-CoA の濃度に比例して、生成する 3HPA の濃度が増加することが分かった。この結果から、下図に示すようなアクリリル-CoA と 3HP-CoA を介する多段階のアクリル酸変換経路を推測した。目的とするアクリル酸水和酵素は、細胞質内に局在する可溶性タンパク質であり、数種の異なる酵素群あるいは数種の機能を持つ複合酵素であることが示唆された。このような反応機構を持つアクリル酸水和酵素はこれまでに報告されておらず、新規の酵素である可能性が示された。



(3) *Sulfolobus tokodaii* 由来 3HP-CoA シンテターゼによるアクリリル-CoA 合成と反応

S. tokodaii 由来 3HP-CoA シンテターゼを用いて合成したアクリリル-CoA を基質として、2種のアクリル酸変換菌の CFE を用いた変換反応を行った結果、両菌株ともアクリリル-CoA のピークが減少した。しかし、生成物と推測される 3HP-CoA の蓄積は認められなかった。2種の菌株の CFE は、アクリリル-CoA を基質とした何らかの変換活性を有することが示唆されたが、現段階ではその変換産物や推定したような中間経路が存在するのかな等の詳細は不明である。

(4) アクリル酸水和酵素の精製

(3)の検討では、アクリリル-CoA から 3HP-CoA への変換は検出できなかったが、アセチル-CoA 存在下での CFE によるアクリル酸を基質とした変換反応を行った結果、アクリリル-CoA と 3HP-CoA の蓄積、さらに 3HPA の生成が認められた。この結果から、両菌株ともにアクリル酸から 3HPA への水和変換経路中の各 CoA 体 (アクリリル-CoA および 3HP-CoA) の存在が明らかとなった。また、この反応中にはアセチル-CoA の消費も認められた。そこで、各菌株の CFE に対して、DEAE 担体を用いた陰イオン交換バッチクロマトグラフィーならびに MonoQ を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによる酵素精製を行い、分画された酵素液中の活性の指標として、アクリリル-CoA、3HP-CoA、3HPA の生成、およびアセチル-CoA の減少を測定した。その結果、それぞれの菌株で活性の高いタンパク質画分を獲得することに成功した。この画分中には推定経路中の 3つの触媒活性、すなわちアセチル-CoA からアクリル酸への CoA 転移活性 (アセチル-CoA 消費およびアクリリル-CoA 生成)、アクリリル-CoA から 3HP-CoA への水和活性 (3HP-CoA 生成)、3HP-CoA から 3HPA への CoA 脱離活性 (3HPA 生成) が存在することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. 片岡道彦、浦野信行：次世代バイオポリマー生産を目指すプロパノール発酵技術の開発、化学工業 (査読なし)、64、2013、472-478

〔学会発表〕(計4件)

1. 片岡道彦：微生物機能を利用した有用物質生産プロセスの開発、第17回関西大学先端科学技術シンポジウム(招待講演)、2013年1月30日、関西大学(大阪府・吹田市)
2. 片岡道彦：組換え微生物による有用物質生産プロセスの開発、新化学技術推進協会ライフサイエンス技術部会 反応分科会講演会「遺伝子発現と代謝工学」(招待講演)、2013年5月28日、新化学技術推進協会会議室(東京都・千代田区)
3. M. Nishikawa, N. Urano, R. Fuji, M.

Kataoka : Microbial hydration of acrylic acid by newly isolated fungi、Active Enzyme Molecule 2014、2014 年 12 月 17 日～19 日、富山国際会議場(富山県・富山市)

4. 西川恵美、浦野信行、富士亮介、西本菜津紀、片岡道彦 : 微生物によるアクリル酸水和反応に関する研究、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 26 日～29 日、岡山大学(岡山県・岡山市)

[図書](計 1 件)

1. 片岡道彦、浦野信行 : シーエムシー出版、リサイクルバイオテクノロジーの最前線(共著) 2013、239 (26-33)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

片岡 道彦 (KATAOKA Michihiko)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号 : 9 0 2 5 2 4 9 4