

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450094

研究課題名(和文) 分子内ケトンをもつ新規な酸化糖の酸化発酵の基盤解析

研究課題名(英文) Biochemical analysis of oxidative fermentation of novel oxidized sugars having an intramolecular ketone

研究代表者

足立 収生 (ADACHI, OSAO)

山口大学・その他部局等・名誉教授

研究者番号：20027189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：古典的な2-ケトグルコン酸、5-ケトグルコン酸、2,5-ジケトグルコン酸、L-ソルボースが酢酸菌の酸化発酵生産物の例であった。アルゼンチンでGluconacetobacter liquefaciens RCTMR株を単離したのが端緒となって、4-ケトアラボン酸、2-デオキ-4-ケトリボン酸や、4-ケトリボン酸などが誰も知らなかった酸化発酵産物であることを指摘した。その全貌を明らかにするために、5-ケトフルクトースや5-ケトブシコースの生産を実証した。また、地球規模な産業廃棄物となったグリセリンから、ヒドロキシビルビン酸やヒドロキシマロン酸などの分子内ケトンをもつ酸化糖の製造について検討した。

研究成果の概要(英文)：A novel oxidation of pentonates to 4-keto-pentonates was analyzed with Gluconobacter thailandicus NBRC 3258. Pentonate 4-dehydrogenase activity in the membrane fraction was readily inactivated by EDTA and it was reactivated by the addition of PQQ and Ca<sup>2+</sup>. The enzyme oxidized pentonates to 4-keto-pentonates at the optimum pH of 4.0. In addition, the enzyme oxidized fructose to 5-keto-fructose, psicose to 5-keto-psicose, including the other polyols such as, glycerol, ribitol, arabitol, and sorbitol. Thus, pentonate 4-dehydrogenase was found to be identical with glycerol dehydrogenase (GLDH). The reaction versatility of quinoprotein GLDH was notified in this study. Oxidative fermentation of hydroxypyruvate was examined and two oxidizing systems have been indicated: System 1: Glycerol - Dihydroxyacetone - Hydroxypyruvic aldehyde - Hydroxypyruvic acid. System 2: Glycerol - Glyceric acid - Hydroxymalonaldehyde - Hydroxymalonic acid

研究分野：応用微生物学

キーワード：酸化発酵 酢酸菌 分子内ケトンをもつ酸化糖 5-ケトブシコース 4-ケトペント酸 Ga. liquefaciens

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者による分子内ケトンをもつ新規な酸化糖の酢酸菌による酸化発酵の研究は、2010年に学振の特定国派遣研究者計画に採択され、アルゼンチンへ派遣された機会に *Gluconacetobacter liquefaciens* RCTMR 株を単離したのが端緒となった。それまでは古典的な 2-ケトグルコン酸、5-ケトグルコン酸、2,5-ジケトグルコン酸、L-ソルボースなどが酢酸菌の酸化発酵生産物の例であった。また、過去 50 年にわたって 2,5-ジケトグルコン酸がグルコース酸化系の最終産物とする認識が定着しており、2,5-ジケトグルコン酸以降の代謝系に関する研究や報告は見られていなかった。

以来、4-ケトアラボン酸、2-デオキ-4-ケトリボン酸や、4-ケトリボン酸などが誰も知らなかった酸化発酵産物であることを報告した。その基盤の全貌を明らかにするために、本研究では 5-ケトフルクトースや 5-ケトブシコースなどを実証した。本研究の対象となる酵素及び酵素反応を図 1 に示した。

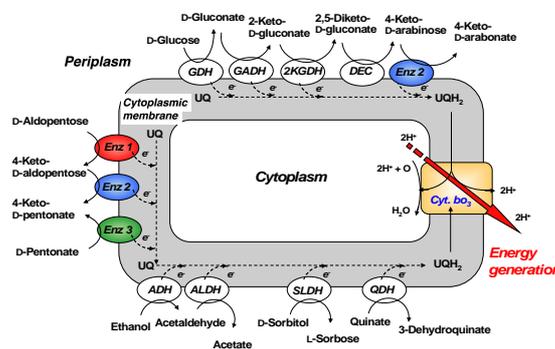


図 1. 本研究の対象となる膜酵素  
これまで確認されている膜酵素と区別するために、赤、青、緑色で識別した。

酢酸菌にはグリセリンからジヒドロキシアセトン(DHA)またはグリセリン酸(GYA)を酸化生成物として、細胞外に蓄積する二つの酸化発酵経路が知られている。それらは酢酸発酵、グルコン酸発酵や、ソルボース発酵とともに、酸化発酵の典型例として知られていて、古くから産業や人々の生活に利用されてきた。しかし、グリセリンの酸化系に関する従来の研究において、DHA や GYA 以降の酸化やそれらの反応を触媒する酵素についての情報は乏しく、詳細な検討は行われていない。近年、パームオイルなど植物油を原料にしたバイオディーゼル燃料の製造が盛んになってきた。植物由来の地球・環境に優しい燃料と称され、石油代替燃料として、大規模工場が各地に稼働している。その結果、副産物として発生する大量の廃グリセリンが新たに地球規模で未利用産業廃棄物となりつつある。この難題解決の一助とするために、酢酸菌細胞膜のグリセリン酸化系について検討した。

## 2. 研究の目的

酢酸菌の酸化発酵において、未だ知られていない酸化糖、特に分子内にケトンをもつものについては、ケトグルコン酸、L-ソルボースなどが知られていたが、体系的な理解に到っていなかった。研究代表者は 2010 年以来、4-ケトアラボン酸、4-ケトリボン酸、2-デオキシ-4-ケトペント酸などが新規な分子内ケトンをもつ酸化糖であることを、その生成機構を含めて提唱してきた。本研究では、この着想を一層発展させるために、系統的な研究を行った。また、新規な分子内ケトンをもつ酸化糖の用途にも考察を試みた。

一方、新たな地球規模な産業廃棄物となってきた廃グリセリンから有用物質の製造・開発について、その製造方法が確立されていない分子内ケトンをもつ酸化糖の一つ、ヒドロキシピルビン酸(HPY)を酢酸菌の酸化力によって製造する方法を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究に使用した酢酸菌

糖質酸化力が強いことで知られている酢酸菌のうち、*Gluconobacter oxydans*、*Gluconacetobacter liquefaciens* NBRC 株、および研究代表者が 2010 年にアルゼンチンで単離した *Gluconacetobacter liquefaciens* RCTMR 株などを主として使用した。種々な糖質を含む培地での培養から生成される分子内ケトンをもつ物質の検出には、簡便な薄層クロマトを用いて、triphenyltetrazolium chloride (TTC)に感応する物質を優先的に選択した。

### (2) 培養条件と酵素活性測定法

使用した酢酸菌は、グリセリンと酵母エキスからなる簡単な培地での生育から開始した。糖質を酸化する酵素活性についての検討では、細胞膜や精製酵素を使用した。酵素活性測定には K-フェリシアニドまたは、フェナジメトスルフェート-2,6-ジクロロフェノールインドフェノールを電子受容体として用いる方法で行った。凍結乾燥した細胞膜画分とアラボン酸、リボン酸を反応させて、酸化生成物の確認から開始した。標的酵素のアポ化は 20 mM EDTA で細胞膜を洗浄する方法で行った。後述の果糖及びブシコースからの酸化生成物の確認にもほぼ同様の方法で行った。研究に使用したペント酸は市販品の入手が困難で、アラボン酸はアラビノースの 1 位をヨウ素酸化して調製した。リボン酸は市販のリボノラク톤を化学的に開環して調製した。

### (3) 反応生成物の分離・検出法

分子内ケトンをもつ酸化糖の分離・精製は Dowex 1 x 4 を用いたカラムクロマトによって行った。イオン交換樹脂は酢酸型に活性化して、試料吸着後は HCl や NaCl 濃度の違いから溶出を行った。さらに、対象物の pKa よりも低い pH の緩衝液で選択的に溶出を行った。

#### (4) 固定化酢酸菌触媒の調製

凍結乾燥した酢酸菌細胞を Ca-アルギン酸でビーズ状に固定化し、これをさらに室温で乾燥したものを触媒として使用した (図 2)。

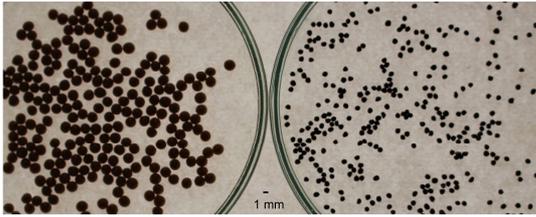


図 2. 酢酸菌を Ca-アルギン酸で固定化したのち乾燥して得られた固定化酢酸菌触媒。左: 乾燥前。右: 乾燥後

#### 4. 研究結果

##### (1) ペント酸の酸化と酸化生成物の同定及び酵素反応への EDTA の効果

細胞膜画分とペント酸との反応液は TTC に陽性反応を示した。これは分子内ケトンをもつ反応生成物の形成を示している。その細胞膜を EDTA 処理したものはペント酸酸化力が著しく低下した。酵素活性が低下した細胞膜画分に Ca を 5 mM、PQQ を 5 μM 添加することで、酵素活性は元の状態へ復帰した。これらの結果から、ペント酸の酸化には PQQ 酵素が触媒していると判定した。詳細は 2017 年刊行の研究論文に表示した。

##### (2) 酢酸菌による果糖とプシコースの酸化

果糖の 5-ケト-果糖への酸化は唯一 FAD を補酵素とする膜結合型果糖脱水素酵素(EC 1.1.99.11, *Methods Enzymol.*, **89**, 154-159 (1982))が知られていた。このような知見に対して、本研究で選択した酢酸菌によって果糖を酸化した反応液の TLC が TTC に陽性な反応生成物を与えた。その酸化生成物は 5-ケト-果糖であることが容易に証明された。さらに、果糖を酸化している酵素が Ca と PQQ に依存することも明らかとなつて、果糖を酸化する酵素には FAD 依存性酵素と PQQ 依存性酵素が存在することが 30 数年ぶりに証明された。特筆に値する新発見である。果糖に化学構造が類似のプシコースを酢酸菌で酸化すると、5-ケト-プシコースを生成することも明らかになった。5-ケト-プシコースは市販されていない分子内ケトンをもつ新規な酸化糖である。詳細は 2017 年刊行の研究論文に表示した。

##### (3) 酢酸菌細胞膜からペント酸および果糖酸化酵素の可溶化と精製、その性質

酢酸菌細胞膜を 1% マイドール 10 で可溶化して、可溶化液を CM-Toyopearl C650 カラムに吸着させ精製を試みた。詳細は 2017 年に発表した研究業績に述べているが、共存する膜酵素を含まない精製酵素を得た。驚くべきことに、精製酵素の諸性質は既存のグリセリン脱水素酵素に酷似していた。そこで、

Gluconobacter 属酢酸菌に最も大量に存在するグリセリン脱水素酵素(GLDH)欠損株ではペント酸や果糖の酸化が起きない。GLDH 欠損株に遺伝学的に GLDH を再構成させると、当該酵素活性が回復することなどから、ここで取り上げた新規な糖類の酸化が GLDH によって触媒されていることが明らかになった。

これらの結果を要約すると、図 3 に示す反応となり、分子内ケトンを形成する酸化糖の生成も GLDH の基質特異性と認識された。

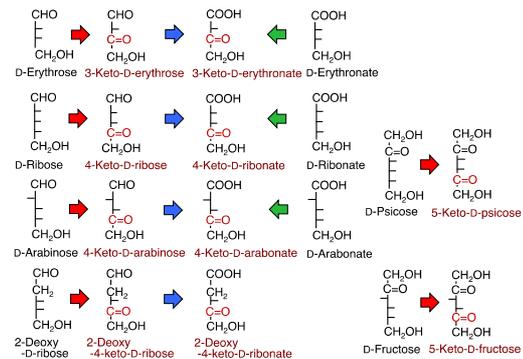


図 3. 本研究の要約

##### (4) ヒドロキシビルピン酸、新たな分子内ケトンをもつ酸化糖、の発酵生産

酢酸菌にはグリセリンからジヒドロキシアセトン(DHA)またはグリセリン酸(GYA)を酸化生成物として、細胞外に蓄積する二つの酸化発酵経路が知られている。それらは酢酸発酵、グルコン酸発酵や、ソルボース発酵とともに、酸化発酵の典型例として知られていて、古くから産業や人々の生活に利用されてきた。しかし、グリセリンの酸化系に関する従来の研究において、DHA や GYA 以降の酸化やそれらの反応を触媒する酵素についての情報は乏しく、詳細な検討は行われていない (図 4)。

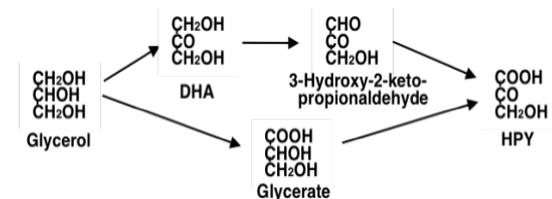


図 4. 想定されるグリセリンの 2 つの酸化系

近年、パームオイルなど植物油を原料にしたバイオディーゼル燃料の製造が盛んになってきた。植物由来の地球・環境に優しい燃料と称され、石油代替燃料として、大規模工場が各地に稼働している。その結果、副産物として発生する大量の廃グリセリンが新たに地球規模で未利用産業廃棄物となりつつある。この難題解決の一助とするために、酢酸菌細胞膜のグリセリン酸化系について検討した。

*G. thailandicus* NBRC 3258 は DHA には生育できるが、D,L-GYA には生育はやや困難であった。一方、*Ga. liquefaciens* RCTMR 10 は DHA にも D,L-GYA にも生育した。両菌株の細胞膜にはグリセロール脱水素酵素に加え、DHA 及び GYA に対する酸化活性が見られ、その最適反応 pH は 4~5 にあった。細胞膜から当該酵素を精製した結果、両化合物ともに酢酸菌に特徴的な PQQ-アルコール脱水素酵素(QADH)と同一と考えられる酵素によって酸化された。さらに、DHA 及び GYA の QADH による酸化生成物は、酢酸菌細胞膜のアルデヒド脱水素酵素(ALDH)によってさらに酸化されて、対応するカルボン酸を生成すると考えられる結果が得られた。培養中に蓄積される生成物のクロマト分離による確認や、酵素活性に対応する反応生成物の検出・同定を行った。上記の実験結果から、未解決な点は残るものの、二つのグリセリン酸化系は以下のように推定される。

#### 酸化系 1 :

グリセリン → ジヒドロキシアセトン(DHA)  
→ ヒドロキシピルビンアルデヒド → ヒドロキシピルビン酸

#### 酸化系 2 :

グリセリン → グリセリン酸(GYA) → ヒドロキシマロンアルデヒド酸 → ヒドロキシマロン酸

#### 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 5 件)

1. Y. Ano, R.A. Hours, Y. Akakabe, N. Kataoka, T. Yakushi, K. Matsushita, O. Adachi. Membrane-bound glycerol dehydrogenase catalyzes oxidation of D-pentones to 4-keto-D-pentones, D-fructose to 5-keto-D-fructose, and D-psicose to 5-keto-D-psicose. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **81**, 411-418 (2017). (査読有) doi.org/10.1080/09168451.2016.1254535
2. AP. Butiuk, MA. Martos, O. Adachi, RA. Hours. Study of the chlorogenic acid content in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): effect of plant fraction, processing step and harvesting season. *J. Appl. Res. Medici. Arom. Plants.* **3**, 27-33 (2016). (査読有) doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.12.003
3. AP. Butiuk, O. Adachi, HA. Hours. Yerba mate as a novel inducer for fungal chlorogenate hydrolase production. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, **4**, 327-334 (2015). (査読有) doi.org/10.1016/j.bab.2015.06.002

4. MT. Castenada, O. Adachi, RA. Hours. Reduction of L-phenylalanine in protein hydrolysates using L-phenylalanine ammonia-lyase from *Rhodospiridium toruloides*. *J. Ind. Microbial Biotechnol.*, **42**, 1299-1307 (2015). (査読有) doi 10.1007/s10295-015-1664-z
5. N. Saichana, K. Matsushita, O. Adachi, I. Frebort, J. Frebortova. Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.*, **33**, 1260-1271 (2015). (査読有) doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.001

[学会発表](計 9 件)

1. 寺田優花、尾崎聖士郎、片岡尚也、足立収生、赤壁善彦、薬師寿治、松下一信、Glucanobacter 属酢酸菌キノプロテイン・グリセロール脱水素酵素における新たな基質の発見とその反応メカニズムの提唱、平成29年3月19日。日本農芸化学会2017年度(平成29年度)大会、京都女子大学(京都府京都市東山区)。
2. 薬師寿治、平田花織、松谷峰之介、足立収生、片岡尚也、松下一信、酢酸菌 *Glucanobacter thailandicus* におけるジヒドロキシアセトン代謝に関する研究：ジヒドロキシアセトン・リン酸化酵素の遺伝学的・生化学的解析、平成29年3月19日。日本農芸化学会2017年度(平成29年度)大会、京都女子大学(京都府京都市東山区)。
3. 平田花織、松谷峰之介、足立収生、片岡尚也、薬師寿治、松下一信、酢酸菌 *Glucanobacter thailandicus* のジヒドロキシアセトン代謝に関する研究：ジヒドロキシアセトン・リン酸化酵素、平成28年3月28日。日本農芸化学会2016年度(平成28年度)大会、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市白石区)。
4. 足立収生、Hours RA、赤壁善彦、阿野嘉孝、品川恵美子、片岡尚也、薬師寿治、松下一信、酢酸菌における複数の新規なPQQ-酵素の同定、平成28年3月28日。日本農芸化学会2016年度(平成28年度)大会、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市白石区)。
5. 足立収生、Hours RA、赤壁善彦、阿野嘉孝、品川恵美子、片岡尚也、薬師寿治、松下一信、膜結合型デキストラン合成酵素の発見とその機能解析、平成27年3月27日。日本農芸化学会2015年度(平成27年度)大会、岡山大学(岡山県岡山市北区)。
6. 小松和貴、吉原 望、今村志穂美、片岡尚也、薬師寿治、足立収生、松下一信。酢酸

菌 *Gluconobacter oxydans* の膜結合型キナ酸脱水素酵素の高発現。平成27年3月27日。日本農芸化学会2015年度(平成27年度)大会、岡山大学(岡山県岡山市北区)。

7. Butiuk AP, Maidana AS, Adachi O, Hours RA, Caracterizacion de una clorogenato hydrolase de *Aspergillus niger* AKU 3302 inducida con extractos de yerba mate, VI The World Congress of Yerba Mate, 平成26年5月8-10日, Montevideo Convention Center, Montevideo (Uruguay).
8. Butiuk AP, Maidana AS, Adachi O, Hours RA, Optimizacion de la actividad clorogenato hydrolase de *Aspergillus niger* para la bioconversion del acido clorogenico de la yerba mate, VI The World Congress of Yerba Mate, 平成26年5月8-10日, Montevideo Convention Center, Montevideo (Uruguay).
9. Butiuk AP, Maidana AS, Adachi O, Hours RA, Chlorogenic acid from yerba mate, VI The World Congress of Yerba Mate, 平成26年5月8-10日, Montevideo Convention Center, Montevideo (Uruguay).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
足立 収生 (ADACHI OSAO)  
山口大学・その他部局等・名誉教授  
研究者番号：20027189

(2) 研究分担者  
赤壁 善彦 (AKAKABE YOSHIHIKO)  
山口大学・創成科学研究科・教授  
研究者番号：20274186