

6. 可逆的脱炭酸酵素の特性解析と芳香族カルボン酸の合成について

吉田豊和, 長澤 透

岐阜大学工学部

はじめに

経済発展の枠組みのなかに CO₂ 排出量の規制など環境への配慮を具体的に盛り込むことが求められる近況である。一方、グリーンケミストリーを目指し、高純度、高品質の製品を得るために、微生物反応を用いた高度の精密分子変換技術が期待されている。このような状況下、我々は、CO₂ の資源化を目指し、微生物の芳香族カルボン酸脱炭酸酵素の CO₂ 固定活性に注目した研究に取り組んで来た。

種々の脱炭酸酵素が動植物・微生物に存在し、多くの生化学的・酵素化学的知見が蓄積されており、脱炭酸酵素は一般的に逆反応によって炭酸固定反応を触媒しないとされてきた。しかし、我々は、可逆的脱炭酸・炭酸固定反応を触媒する新規酵素として“ピロール-2-カルボン酸脱炭酸酵素”を見出した。本酵素は反応条件を制御すると効率良くピロールへの炭酸固定を触媒する。さらに類似した酵素活性の存在を予想し、スクリーニングを行うことにより、我々は新規酵素“インドール-3-カルボン酸脱炭酸酵素”を発見した。これらの酵素の反応特性を解析することにより、これらは脱炭酸酵素でありながら、それぞれピロール、インドールの複素環に CO₂ を固定す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。最近、ドイツのグループにより、*Clostridium* 属細菌によるフェノールやカテコールの嫌氣的代謝の過程で、芳香環がカルボキシル化 (CO₂ 固定) されて分解代謝される経路が明らかにされた。即ち、これまで脱炭酸反応は不可逆とされてきたが、可逆的脱炭酸反応を触媒する酵素群の存在とその生理的な役割が明らかになってきた。

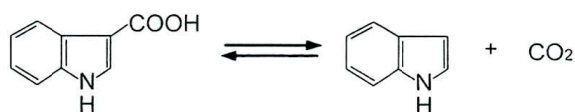
これらの成果は、他にも効率良く炭酸固定を触媒する酵素群が微生物界に潜在する可能性を強く示唆するものであり、CO₂ を資源とした物質変換プロセスに応用できると期待される。我々は、可逆的脱炭酸酵素群の炭酸固定機能を利用した様々な芳香族化合物への位置選択的なカルボキシル基導入法を検討し、機能性ポリマーなどの合成に利用される種々の芳香族ヒドロキシカルボン酸の生産法を開発することを目指している。

(1) ピロール-2-カルボン酸脱炭酸酵素



ピロール-2-カルボン酸脱炭酸酵素は土壌分離菌 *Bacillus megaterium* PYR2910 の他に *Serratia* 属細菌にも酵素活性が分布しており、*B. megaterium* PYR2910, *S. grimesii* IFO 13537 を用い、本酵素を精製単離して反応特性を検討した。これらの脱炭酸酵素は 52kDa のサブユニットからなる 2 量体酵素 (分子量 98kDa) であった。これらの酵素は酸素感受性が強く、活性の安定化には高濃度の還元剤の添加が不可欠であった。*B. megaterium* PYR2910 の酵素は反応因子として有機酸を要求し、酢酸、ギ酸などが存在しないと活性は認められなかった。一方、*S. grimesii* IFO 13537 の酵素は有機酸を必要とせず、酵素タンパク質に内在するカルボキシル基が代替して、反応を触媒することが推定された。いずれの酵素においても脱炭酸反応だけでなく、ピロールと KHCO₃ を炭酸源とした炭酸固定反応が進行し、反応平衡が存在していた。炭酸固定反応は密閉容器内で炭酸ガスの漏出を防いだ条件下 (容器内圧力は 1.38 atm) で効率的に進行し、炭酸ガスの反応液への溶解度と関連する。*B. megaterium* PYR2910 の休止菌体および酵素を用いて、3 M KHCO₃ を炭酸源とし、400 mM のピロールから 81% のモル変換率で 325 mM (36.1 g/L) のピロール-2-カルボン酸の合成が可能であった。*S. grimesii* IFO 13537 を用いた場合も同様 (モル変換率、約 80%) であった。

(2) インドール-3-カルボン酸脱炭酸酵素



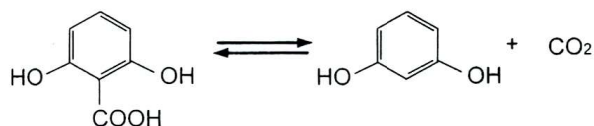
インドール-3-カルボン酸の脱炭酸活性を有する土壌分離菌を得た。高活性を示す菌株を *Arthrobacter nicotianae* F11612, *Fusarium subglutinans* F131 と同定した。インドール-3-カルボン酸脱炭酸酵素は 60kDa のサブユニットからなる 4 量体酵素 (分子量 258kDa) であった。ピロール-2-カルボン酸脱炭酸酵素と極めて似通った反応特性を示し、インドールへの炭酸固定活性を示した。炭酸固定反応によって 20 mM のインドールから 5 mM のインドール-3-カルボン酸が生成したが、ピロール-2-カルボン酸脱炭酸酵素に比べると炭酸固定効率は劣り、これは、インドールの溶解度が低いことが原因であると考えられる。*A. nicotianae* F11612 の酵素はインドール以外に 2-メチルインドールの 3 位、キノキサリンの 2 位への炭酸固定反応も触媒した。

(3) 4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素



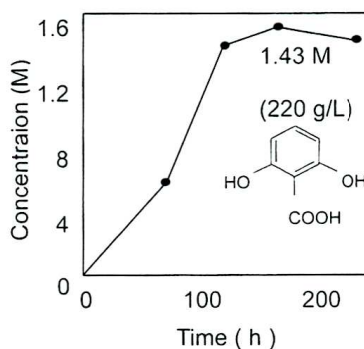
嫌気条件下で高活性を示す 4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素生成菌を土壌より 86 株分離し、その中で最も高活性を示した *Enterobacter cloacae* P240 を選択した。嫌気条件下で分離した菌株であるが、振とう培養条件下で高い脱炭酸酵素活性を示した。本酵素は強い酸素感受性を示し、速やかに失活したが、還元剤を添加することによって安定化させた。精製酵素は 60 kDa の同一のサブユニットからなる 6 量体(分子量 372 kDa)と推定された。基質特異性を検討したところ、4-ヒドロキシ安息香酸の他に、3,4-ジヒドロキシ安息香酸に対して僅かな(相対活性 3%)脱炭酸反応を触媒した。フェノール 20 mM, CO₂源として 3M KHCO₃を添加して炭酸固定反応を pH 7.0, 20°Cで検討したところ、フェノールへの炭酸固定反応は変換率 12%で進行した。基質フェノールは、酵素タンパク質の失活を引き起こすため、添加濃度の上昇に伴い活性は減少した。カテコールへの炭酸固定反応は 18%変換率で進行した。

(4) 2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素



集積培養および研究室保存菌を用いたスクリーニングによって *Agrobacterium tumefaciens* IAM12048 と *Pandoraea* 属菌株に 2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素を見いだした。これらの酵素は酸素感受性を示さず、精製酵素は 37.4kDa の同一のサブユニットからなり(分子量 100kDa)、上述の脱炭酸酵素に比べて、サブユニット

分子量に大きな差違が認められた。精製酵素は 2,6-および 2,3-ジヒドロキシ安息香酸の脱炭酸反応とその逆反応を触媒した。活性菌体を用いて炭酸固定反応を最適化した結果、1,3-ジヒドロキシベンゼンへの炭酸固定反応が変換率 48%で進行し、220 g/L の 2,6-ジヒドロキシ安息香酸の生成蓄積を認めた。



(5) 可逆的脱炭酸酵素の一次構造解析

酵素遺伝子をクローニングし、一次構造の比較解析を進めた。可逆的脱炭酸酵素は脱炭酸および炭酸固定反応のみを触媒する既知酵素とは相同性を示さない。ピロール-2-カルボン酸、インドール-3-カルボン酸、4-ヒドロキシ安息香酸の脱炭酸酵素間では、一次構造上での相関が認められるが、2,6-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素との類似性は見られず、2つの酵素群に大別される。微生物由来の機能未同定タンパク質の中には、可逆的脱炭酸酵素と有意な相同性を示すものが数多く見られ、幅広い微生物種が芳香族カルボン酸に作用する可逆的脱炭酸酵素を持つと考えられる。

本研究の一部は、経済産業省の産業科学技術プロジェクト『生物機能を活用した生産プロセスの基盤技術開発』の一環として、新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)から委託を受けて実施したものである。