

リグニンから機能性芳香族モノマーを生産する 海洋性細菌由来酵素群の反応機構解析と応用

大田ゆかり

1. はじめに

地球温暖化と石油枯渇リスクを背景として、再生可能原料を有効活用する技術の開発が極めて重要な課題となっている。とりわけ食糧と競合しないバイオマスであるリグノセルロースを包括的に利用する統合的バイオリファイナリーの確立が求められている [1]。リグノセルロース主要成分の内、セルロース、ヘミセルロースは工業規模での利用実績もあるが、リグニンの利用技術には、これから解決すべき課題もたくさん残されている[2-4]。

リグニンは地球最大の再生可能芳香族化合物資源であり、石油に由来する化学品原料の多くを代替するポテンシャルがあると推定される。リグニンからその化学的特徴を生かした低分子化合物を回収し、高付加価値の機能性分子へと変換する技術は、統合的バイオリファイナリー技術の確立に極めて重要な鍵となる。近年、リグニン内主要結合である β -O-4 結合を選択的に開裂し、特定の芳香族モノマーを選択的に生産する種々の化学的触媒法が精力的に研究されている。しかしながら、特殊で有害な試薬や高温長時間反応が必要な場合が多く、将来的には環境負荷やエネルギー消費のより少ない方法が望まれる [5]。これを解決する 1つのアプローチとして、酵素を用いてリグニンから芳香族モノマーを生産する検討が進められているが、酵素活性が不十分であったり、リグニンの特異的変換に必要な酵素反応経路やそれを触媒する酵素の一部が不明であるなど、様々な問題があり芳香族モノマーの効率的生産には至っていない。

我々はリグニンに由来するフェニルプロパン系芳香族モノマーが医薬品や機能性プラスチックなどの化学品原料として活用できるポテンシャルに注目し、フェニルプロパン系芳香族モノマーの一種であるグアヤシルヒドロキシプロパノン（以下 GHP と略記する）を生産できる微生物や酵素群を海域から探索した。その過程で、駿河湾海底から回収した腐食の進んだ沈木より、目的の活性を有する海洋性 *Novosphingobium* 属細菌を発見し、MBES04 株と命名した。本菌株のゲノム配列の解析を行い [6]、続

いて得られたゲノム配列を精査し、6種の新規タンパク質で構成される β -O-4 結合選択的開裂酵素群を特定した。本研究では、本酵素群の反応様式や基質認識機構の解析を進め、酵素の特性を解明するとともに、GHP 生産効率向上に必要な酵素反応条件に関する知見を得ることを目的とした。

2. 研究方法および結果

2-1. β -O-4 結合特異的切断酵素の pH と温度に対する反応特性解析

本研究では、上述の β -O-4 結合特異的切断に関与する MBES04 株由来酵素 6 種のうちの 4 種について反応特性の解析を進めた。図 1 に示すリグニンモデル 2 量体化合物 (GGGE、VGGE) の C α 位ヒドロキシ基の酸化活性を有する short-chain dehydrogenase/reductases (SDRs; EC 1.1.1.-) 2 種 (SDR3、SDR5) と β -O-4 結合開裂 (β -etherase) 活性を持つ glutathione S-transferases (GSTs; EC 2.5.1.18) 2 種 (GST4、GST5) の組換え酵素を用いて、pH と温度に対する活性の変化を GGGE および MPPHV (図 1、いずれもエリスロ、スレオ混合物) をそれぞれの基質として調べた。組み換え酵素は、大腸菌 BL21(DE3)pLysE 株を宿主、pRSETA を発現ベクターとして N 末端 His \times 6 タグタンパク質として作成し、ニッケルアフィニティーカラムを用いて精製した。酵素活性は、C18 逆相カラムを用いた HPLC 分析により反応生成物を定量することで評価した。被検酵素のアミノ酸配列は、DDBJ/EMBL/GenBank データベースに以下の番号で登録済である: SDR3 (GAM05523)、SDR5 (GAM05547)、GST4 (GAM05530)、GST5 (GAM05531)。

酵素反応条件検討の結果、4 種の酵素はすべて弱アルカリ域に反応最適 pH を有していた。また、SDR5、GST4、GST5 の 3 種酵素は 30-35 $^{\circ}$ C 付近に、SDR3 は 15 $^{\circ}$ C 付近に最適反応最適温度を有していた [7]。SDR3 は他の酵素と比較して熱安定性が低いことが予想され、これらの酵素群を一式的酵素セットとして利用するためには、SDR3 に耐熱

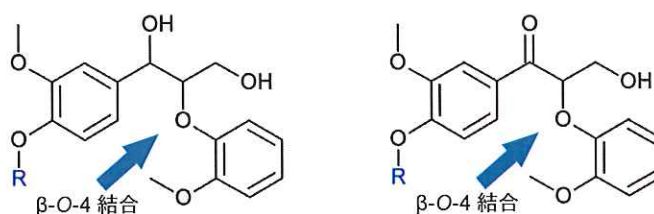


図 1. 酵素活性測定に基質として使用したリグニンモデル化合物
R=H; GGGE(左)、MPPHV(右)
R= -CH₃; VGGE(左)、GVG(右)

性を付与する改良が必要と考えられた。

2-2. β -*O*-4 結合特異的切断酵素の基質特異性と速度論的解析

2-1.において決定した反応最適条件を用いて、GGGE、VGGE (図 1、いずれもエリスロ、スレオ混合物) に対する SDR3, SDR5 の酵素反応速度定数を求めた [7]。その結果、両酵素は GGGE に対して VGGE の場合と比較してより高い活性を示した。また、SDR5 は SDR3 と比較して、その k_{cat} が 2 オーダー程度高く、 K_M が 5 倍程度小さい優れた酵素であることが分かった。

続いて MPHPV、GVG (図 1、いずれもラセミ体) に対する GST4、GST5 の酵素反応速度定数を求めた。その結果、GST4 は GVG に比べて MPHPV に対してより高い活性を、GST5 はその逆の傾向を示した。また、GST4 の MPHPV に対する k_{cat} は GST5 のそれに比べて 1 オーダー程度高かったが、GVG に対する値は約 2 倍高い値に留まった。これらの基質特異性や反応速度の違いを説明するためには、今後は結晶構造解析などから得られる基質と酵素の相互作用の正確な理解が必要と考えられる。

2-3. 農業廃棄物等に含まれる天然リグニンからの芳香族モノマー酵素生産

農業廃棄物等に含まれるリグニンの有効活用を目指して、イナワラ、スギおが粉抽出物に対する酵素反応性や反応産物を調査した。イナワラを室温にて風乾後、ワンダーブレンダー (大阪ケミカル社製) を用いて粗粉碎した。これを 0.15 mm のフルイで分粒、通過した粉末をリグニン含有画分抽出に用いた。抽出操作では、イナワラ粉末を 5w/v% の濃度で 96% 含水ジオキサンに 3 日間浸漬した後、ジオキサンを 40°C にて減圧留去し、残渣を粗リグニンを含む抽出物とした。粗リグニン抽出物を少量のジメチルホルムアミドに溶解した。スギおが粉 (微粉末処理済) を用いて同様に抽出操作を行った。

これらの抽出物に上記酵素 6 種を作用させたところ、イナワラ抽出物からは、*p*-ヒドロキシ型、スギ抽出物からはグアヤシル型のフェニルプロパノンモノマーが選択的に生産可能であった。天然バイオマスに含まれる種々の夾雑物存在下で、芳香族モノマーが特異的に生産できたことから、今後のバイオリファイナリーにおいて、本研究で解析した酵素群は、リグニンの選択的変換ツールや分析ツールとしてのポテンシャルを持つことが示された。

3. おわりに

上記研究成果の一部を Scientific Reports 誌 (Nature publishing group) に投稿し、受理された [Ohta, Y. et al. Combination of six enzymes of a marine *Novosphingobium* converts the stereoisomers of β -O-4 lignin model dimers into the respective monomers. Sci. Rep. 5, 15105; doi: 10.1038/srep15105 (2015)]. また、第 61 回リグニン討論会 (2015 年 11 月) にて成果発表 1 件を行った。

バイオマスは太陽エネルギーを植物が長時間かけて吸収して形成される貴重な資源である。バイオマスを一気に燃焼し、単に熱エネルギーとして利用するだけではなく、高付加価値物質へと転換しつつ循環利用していくことで持続的な資源となり得る。海洋微生物が進化の過程で獲得した優れた生物機能を活用し、医薬・化学工業など幅広い産業に必要な材料を環境負荷やエネルギー消費の少ない方法で効率的に生産する環境に優しい技術の推進に貢献できるよう、高機能酵素の取得と開発へ向けた研究を今後さらに進めて行きたい。

謝辞

本研究の遂行にあたりご支援頂きました一般財団法人杉山産業化学研究所および関係者の皆様に深くお礼申し上げます。

4. 参考文献

- [1] J. Ragauskas, C. K. Williams, B. H. Davison, G. Britovsek, J. Cairney, C. A. Eckert, W. J. Frederick, J. P. Hallett, D. J. Leak, C. L. Liotta, J. R. Mielenz, R. Murphy, R. Templer, T. Tschaplinski, Science 2006, 311, 484–489.
- [2] P. Gallezot, ChemSusChem 2008, 1, 734–737.
- [3] Z. Strassberger, S. Tanase, G. Rothenberg, RSC Adv. 2014, 4, 25310–25318.
- [4] T. Watanabe in Lignocellulose Conversion-Introduction: Potential of Cellulosic Ethanol, Springer, New York, 2013, pp. 1–20.
- [5] J. Zakzeski, P. C. A. Bruijninx, A. L. Jongerius, B. M. Weckhuysen, Chem. Rev. 2010, 110, 3552–3599.
- [6] Y. Ohta, S. Nishi, K. Kobayashi, T. Tsubouchi, K. Iida, A. Tanizaki, K. Kurosawa, A.

Adachi, M. Nishihara, R. Sato, R. Hasegawa, Y. Hatada, *Genome Announc.* 2015, 3, e01373-14.

[7] Y. Ohta, S. Nishi, R. Hasegawa, Y. Hatada, *Sci. Rep.* 2015, 5, 15105.