

フェノール化合物の持続的生産を可能とするバイオプロセス開発

北海道大学 大学院工学研究院 応用化学部門

佐藤 康治

1. はじめに

近年、生物資源（バイオマス）やバイオテクノロジーを活用して、気候変動等の地球規模課題を解決し、長期的に持続可能な成長を目指す「バイオエコノミー」が注目されている。これは、2015年に国連が発表した持続可能な開発目標（SDGs）の達成にも貢献が期待されている。このような社会情勢の中で、特に微生物や酵素がもつ優れた物質変換能を活用し、バイオマスを原料とした有用物質生産法（バイオプロセス）は、代謝工学の進展や合成生物学の台頭により、世界的に注目を集めている。

チロソール（4-ヒドロキシフェニルエタノール、図1）は、オリーブオイルや醸造酒などに含まれる天然化合物で、健康増進や心疾患予防等の効果をもつ抗酸化物質として知られている。さらに、医薬品原料として使用されるほか、近年では熱硬化性樹脂の原料としても注目されている（図1）（Granado et al. 2019）。それらの天然物に含まれるチロソールの量は非常に低いため、工業用途では石油由来の原料から化学合成されてきた。しかし、近年ではバイオエコノミーやSDGsの達成に向け、バイオプロセスへの転換が進められている。本研究では、大腸菌を宿主として用いたチロソール生産バイオプロセスについて検討した。

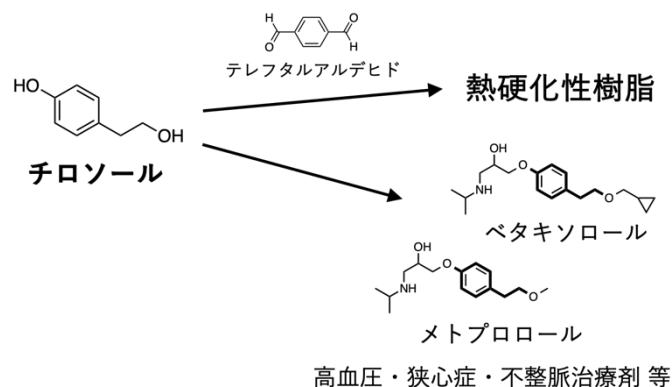


図1. チロソールとその利用

2. チロソール生産バイオプロセスの開発

チロソールは醸造酒に含まれており、醸造に用いられる酵母がその合成に関与すると考えられた。Ehrlich 博士は、タンパク質アミノ酸であるチロシン（Tyr）からチロソールが生合成される経路を解明し、この経路は現在「Ehrlich 経路」として知られている（図2 青矢印）。この経路では、Tyr がアミノ基転移酵素（AT）によって4-ヒドロキシフェニルピルビン酸（4HPPyr）に、続いてフェニルピルビン酸脱炭酸酵素（PPyrDC）により4-ヒドロキシフェニルアセトア

ルデヒド (4HPAAld) に変換された後、アルコール脱水素酵素 (ADH) やアルデヒド還元酵素 (AR) によって還元され、最終的にチロソールが生成される。しかし、上述のように、酵母のチロソール生産能は低いため、我々は大腸菌を宿主とする新たなバイオプロセスの開発について検討した。

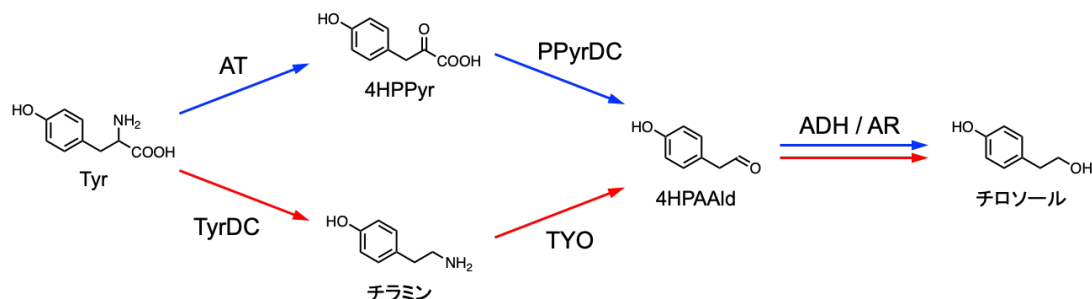


図2. チロソール生合成経路

チロシン (Tyr)、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸 (4HPPyr)、4-ヒドロキシフェニルアセトアルデヒド (4HPAAld)、アミノ基転移酵素 (AT)、フェニルピルビン酸脱炭酸酵素 (PPyrDC)、Tyr 脱炭酸酵素 (TyrDC)、チラミン酸化酵素 (TYO)、アルコール脱水素酵素 (ADH)、アルデヒド還元酵素 (AR)

大腸菌は、増殖速度が速く、ゲノムや代謝ネットワークがよく研究されているだけでなく、エンジニアリングのための様々な合成生物学的ツールが利用可能で、安価な培地での高細胞密度培養のための手法も確立されている。そのため、工業生産に適した菌株の開発に汎用されている (Hirasawa et al. in press)。しかし、大腸菌は Ehrlich 経路をもたないため、チロソール生合成経路を新たに構築する必要があった。そこで、我々は酵素情報に基づいて Ehrlich 経路とは異なるチロソール生合成経路をデザインした (Sato et al. 2012)。この経路では、Tyr は Tyr 脱炭酸酵素 (TyrDC) によってチラミンに変換された後、チラミン酸化酵素 (TYO) によって 4HPAAld に変換され、最終的にチロソールが生成される (図 2 赤矢印)。この経路を合成生物学アプローチで大腸菌に実装し、代表的なバイオマスであるグルコースを原料として生産できることを明らかにした。しかし、その生産量は 0.5 mM と非常に低かったため、生産性の向上を目指して検討を進めた。

チロソール生産には、4HPAAld からチロソールへの還元反応が必要である。この反応には NAD(P)H (生体内で酸化還元反応に関与する補酵素) が必須である。最近、我々は大腸菌内で NAD(P)H 供給が不足すると、代謝中間体である 4HPAAld がメラニン様の色素化合物に変換されることを発見した (Shen et al. 2024)。グリセロールは生体内の NAD(P)H 供給を増強できる炭素源として知られており、これまでも培地に添加していた。そこで、グリセロール添加濃度を検討したところ、予想通り高濃度条件下ではチロソール生産量は向上し、さらに培地の着色も抑制された。この際、中間体のチラミンが 1.99 g/L 蓄積しており、これを基質とする TYO が律速反応であることが判明した。

この律速を改善するため、チロソール生産に適した TYO を探索した。これまでは *Micrococcus luteus* 由来遺伝子を用いていた。その他に、*Brevibacterium casei*、*Escherichia coli*、*Klebsiella aerogenes*、および *Acinetobacter baumannii* も TYO 遺伝子をもつことが知られており、これらの遺伝子をそれぞれクローニングし、大腸菌で発現させた。各菌株から粗酵素液を調製し、チラミンを基質に in vitro で活性試験を行なった。反応液を経時的にサンプリングし、

加熱処理で反応を停止させた後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で生成物を定量した。反応 90 分後の反応液のクロマトグラムを図 3 左に示す。図 3 より、新たに検討した 4 種の遺伝子導入株には TYO 活性を確認できなかった。また、粗酵素液のラウリル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）解析の結果、すべての酵素において可溶性タンパク質の発現が確認できなかった。したがって、大腸菌での高発現が困難であると判断した。

新たな候補遺伝子を公共のゲノムデータベースに探索した。その結果、あるグラム陽性細菌に TYO 相同遺伝子（TYOx 遺伝子とする）を見出した。この遺伝子を人工合成してクローニングした。この遺伝子産物は、大腸菌で可溶性タンパク質として高発現された。上述と同様の条件で活性試験を行なったところ、反応開始からわずか反応 3 分でチラミンが完全に消費され、4HPAAld がほぼ定量的に生成された（図 3 右）。*Micrococcus luteus* 由来 TYO 遺伝子発現株より調製した粗酵素液の比活性（0.023 U/mg-protein、1 分間に 1 μ mol の生成物を生成する酵素量を 1 U と定義）と比較して、TYOx 遺伝子発現株より調製した粗酵素液（0.80 U/mg-protein 以上）の活性は 30 倍以上高かった。したがって、TYOx 遺伝子はチロソール生産性の

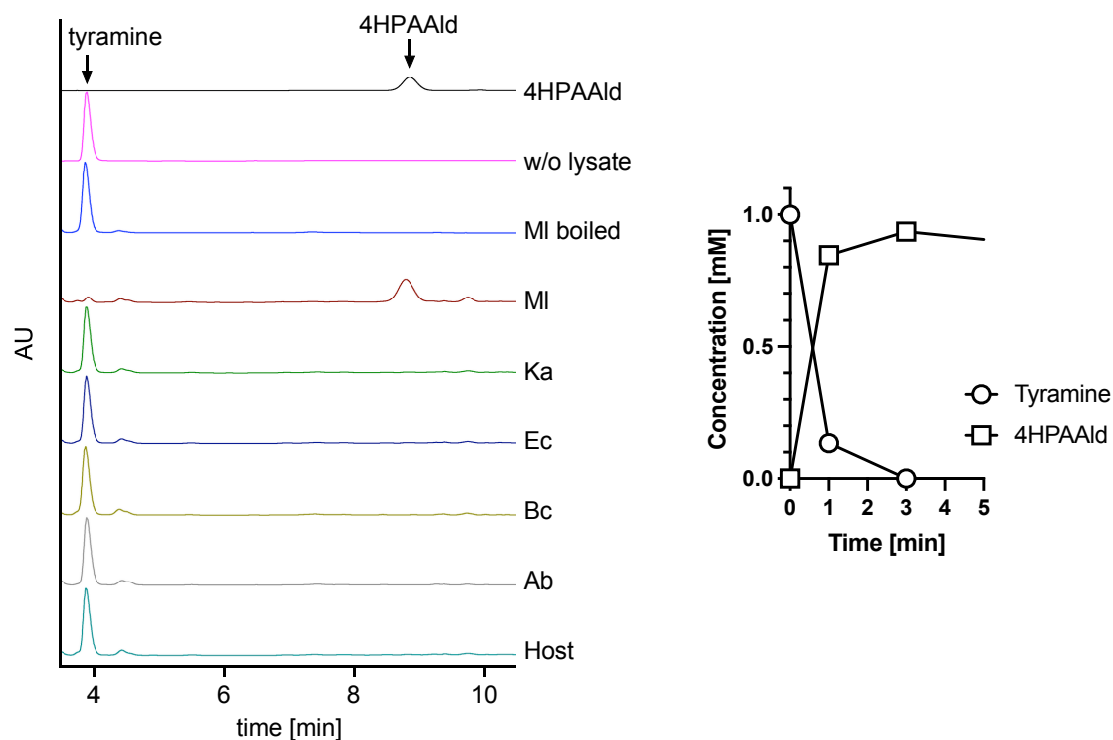


図3. TYO の in vitro 活性試験

1 mM チラミン、1 mM アスコルビン酸、0.4 mg/ml 粗酵素液を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で反応を行った。反応液を経時的にサンプリングし、加熱処理することで反応を停止させた後、HPLC で分析した。

(左) *Micrococcus luteus* (MI)、*Klebsiella aerogenes* (Ka)、*Escherichia coli* (Ec)、*Brevibacterium casei* (Bc) または *Acinetobacter baumannii* (Ab) 由来 TYO 遺伝子を発現した大腸菌から調製した粗酵素液を用いて 90 分間反応させた反応液のクロマトグラムを示す。MI については、コントロール実験として、加熱処理により失活させた粗酵素液を解析した (MI boiled)。

(右) グラム陽性細菌由来 TYOx 遺伝子を発現させた大腸菌から調製した粗酵素液を用いた解析結果を示す。

改善に有効であることが示唆された。

次に、大腸菌を宿主としたチロソール生産に対する TYOx 遺伝子の効果を検証した。上述した代謝中間体 4HPAAld の色素化合物への変換を抑制するため、TYOx 遺伝子とともに AR 遺伝子も大腸菌に導入した。生産試験にはチラミンを 30 mM 含む試験培地を用い、経時的に培養液をサンプリングし、HPLC で生成物を定量した。コントロール実験として、*Micrococcus luteus* 由来 TYO 遺伝子を導入した株も試験した。その結果を図 4 に示す。TYOx 遺伝子導入株（図 4 右）では、培養 6 時間で添加した 30 mM のチラミンがすべて消費され、4HPAAld とチロソールがそれぞれ 12.8 mM と 3.6 mM 生産された。培養 24 時間では、4HPAAld の減少が認められたが、チロソール生産量は維持された。一方、*Micrococcus luteus* 由来 TYO 遺伝子を導入した株では、4HPAAld は蓄積されず、チロソールへと変換された。チロソール生産量は経時的に増加し、培養 24 時間で 13.4 mM に達した。しかし、チラミンは 16 mM 残存していた。以上より、チラミンの 4HPAAld への変換において、TYOx 遺伝子は *Micrococcus luteus* 由来 TYO 遺伝子を凌駕することがわかった。低いチロソール生産量は、上述のように、4HPAAld の還元反応に使用される NAD(P)H 供給の不足が原因と考えられた。したがって、NAD(P)H 供給の強化が、チロソールを効率的に高生産するための新たな改善点として明らかになった。

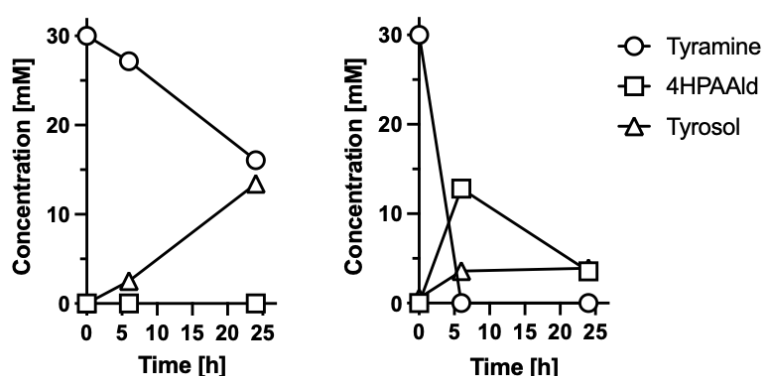


図4. 組換え大腸菌を用いたチロソール生産試験

チラミンを 30 mM 含む試験培地で、組換え大腸菌を 30℃で振盪培養した。培養液を培養 6 および 24 時間後にサンプリングし、HPLC で定量した。*Micrococcus luteus* 由来 TYO 遺伝子(左)とグラム陽性細菌由来 TYOx 遺伝子(右)を導入した株の培養試験結果を示す。

3. まとめ

現在、チロソールは石油由来の高価な原料から製造されており、大量の有害な有機溶媒や危険物を使用し、高温・高圧条件下での多段階反応を必要とする。これに対し、バイオプロセスでは、再生可能なバイオマス原料を用い、各反応ステップでの精製工程を必要としない 1 ステップ合成プロセスへの転換が可能である。それによって、環境負荷や製造コストの大幅な低減が期待でき、さらに SDGs への貢献にもつながる。そこで、本研究では、大腸菌を宿主とするチロソール生産バイオプロセスの開発を検討した。

我々は、Tyr からチラミンを経てチロソールが合成される人工的な代謝経路をデザインし、大腸菌に実装した。種々の検討の結果、中間体であるチラミンの蓄積が確認され、これを基質

とする TYO が律速反応であることを明らかにした。この律速ステップを改善するため、チロソール生産に適した TYO 遺伝子を探索した。種々の TYO 遺伝子を検討した結果、最初に使用した *Micrococcus luteus* 由来 TYO 遺伝子と比較し、チラミンを基質とする *in vitro* 活性試験で 30 倍以上高い活性を示す TYOx 遺伝子を見出すことができた。続いて、この遺伝子が大腸菌を宿主としたチロソール生産に与える影響を評価するため、30 mM チラミンを基質とする培養試験を実施した。その結果、*Micrococcus luteus* 由来 TYO 遺伝子を導入した大腸菌では、培養 24 時間後もチラミンが 16 mM 残存していた。一方、TYOx 遺伝子導入株では、培養 6 時間で添加したチラミンがすべて消費された。しかし、TYOx 遺伝子導入株のチロソール生産量 (3.6 mM) は、*Micrococcus luteus* 由来 TYO 遺伝子導入株 (13.4 mM) よりも低かった。この原因として、TYO 反応の生成物である 4HPAAld のチロソールへの還元反応に必要な NAD(P)H の供給が不足していることが考えられた。したがって、この強化によって、チロソールの効率的な高生産が達成できると期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人 天野工業技術研究所研究から多大なご支援を頂きました。ここに記して謝意を示します。

参考文献

- 1) Granado, L., Tavernier, R., Henry, S., Auke, R.O., Foyer, G., David, G., Caillol, S. (2019) Toward sustainable phenolic thermosets with high thermal performances. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 7: 7209–7217.
- 2) Hirasawa, T., Satoh, Y., Koma, D. Production of aromatic amino acids and their derivatives by *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*: in press.
- 3) Satoh, Y., Tajima, K., Munekata, M., Keasling, J.D., Lee, TS. (2012) Engineering of a tyrosol-producing pathway, utilizing simple sugar and the central metabolic tyrosine, in *Escherichia coli*. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 60: 979–984.
- 4) Satoh, Y., Fukui, K., Koma, D., Shen, N., Lee, TS. (2023) Engineered *Escherichia coli* platforms for tyrosine-derivative production from phenylalanine using phenylalanine hydroxylase and tetrahydrobiopterin-regeneration system. *Biotechnology for Biofuels & Bioproducts* 16: 115.
- 5) Shen, N., Satoh, Y., Koma, D., Ohashi, H., Ogasawara, Y., Dairi, T. (2024) Chromosomally engineered *Escherichia coli* for high tyrosol production from phenylalanine. *Journal of Bioscience & Bioengineering* 137: 115–123