

5-ケトグルコン酸の安定な生産のための微生物生化学的研究

外山 博英

(琉球大学農学部生物資源科学科)

研究の目的

5-ケトグルコン酸 (5KGA) は、ビタミンCや酒石酸などの工業的生産の中間原料となることが報告されている¹⁾。*Gluconobacter* 酢酸菌が 5KGA と 2-ケトグルコン酸 (2KGA) を生産し、さらにいくつかの菌株は 2KGA をさらに酸化して 2,5-ジケトグルコン酸 (25DKGA) を生産することが報告されている。*Gluconobacter* 酢酸菌の中で、*G. suboxydans* IFO12528 が 5KGA を大量に生産する一方、2KGA 生産量は低いことが報告されている。しかし、その 5KGA 生産の至適温度は 20°C 付近であった²⁾。そのため、耐熱性 *Gluconobacter* 酢酸菌で 5KGA 生産株を得ることができれば、工業生産上有利である。

この研究の目的は、より高い温度で 5KGA を生産することのできる耐熱性酢酸菌を単離して、さらに 5KGA 生産性を向上させることである。また、5KGA や 2KGA を簡単に定量するのに 5KGA レダクターゼ (5KGR) と 2KGA レダクターゼ (2KGR) が有用であるが、それらを酢酸菌から精製することは大変労力のかかることであった。そこで、これらの酵素を大腸菌で大量発現させることも行った。

方法

(1) 耐熱性 *Gluconobacter* 酢酸菌からの 5KGA 生産株のスクリーニング

タイから既に分離された耐熱性 *Gluconobacter* 酢酸菌³⁾ を使用した。1 次スクリーニングとして 2% グルコース、2% グルコン酸ナトリウム、0.3% ペプトン、0.3% 酵母エキスを含む培地 (G-GA 培地) に植菌して 30°C 48 時間または 37°C 60 時間培養した。培地を褐変させた菌株は 25DKGA 生産株として除外した。200 μ l の培地上清を 1 ml のレゾルシノール試薬 (49 ml の 0.5% (w/v) resorcinol, 168 ml の塩酸と蒸留水 273 ml の混合液) と 80°C 20 分間反応させた。グルコースと 5KGA はそれぞれ赤色と褐色がかかった緑色を生じたが、グルコン酸や 2KGA は無色のままであった。5KGA を生産している菌株を選び、ポテト培地で 1 日前培養したもの 10 μ l を 1 ml の G-GA 培地に植菌し、30°C 36 時間または 37°C 48 時間培養した。培地上清をレゾルシノール試薬で定性して、37°C で 5KGA を生産する菌株 4 株を得た。5KGA と 2KGA の生産は薄層クロマトグラフや 5KGR や 2KGR を使った酵素法でも確認した^{4,5)}。

(2) 5KGR の大量発現

G. suboxydans IFO12528 (*G. oxydans* ATCC621 と同株) のゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、*gno* 遺伝子 (GOX2187) を得た。リボソーム結合部位 (SD 配列) を含む遺伝子を増幅するようにプライマーを設計した。得られた PCR 産物を pGEM-T Easy ベクターにクローン化して配列を確認した。次に pUC119 に *lac* プロモーターで発現されるようにクローン化し、プラスミド pUC-*gno* を得た。pUC-*gno* を導入した *E. coli* DH5 α は 37°C 培養で弱い 5KGR 活性を示したが、*E. coli* JM109 や TG1 では活性は見られなかった。

30℃培養ではいずれの菌株でも活性は見られなかった。次に、pET-28a(+)ベクターに *gno* 遺伝子を導入し、pET-*gno* を得た。pET-*gno* を導入した *E. coli* BL21(DE3)は弱い 5KGR 活性を示した。

最後に、SD 配列を含まない *gno* 遺伝子を PCR で増幅した。*Nco*I 認識部位を導入したため、2 番目のアミノ酸がセリンからアラニンへと置換された。pET-28a(+)にプラスミド上の SD 配列を利用するように *gno* 遺伝子をクローン化して、pET-*gno*-NB を得た。このプラスミドを *E. coli* BL21(DE3)に導入して 5KGR 高生産株として使用した。

(3) 2KGR の大量発現

2KGR は *G. suboxydans* IFO12528 から部分精製した。PVDF 膜にタンパク質を転写して、島津プロテインシーケンサー PPSQ21 で N 末端アミノ酸配列を決定し、GOX0417 であると決定した。

G. suboxydans IFO12528 のゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、SD 配列を含む遺伝子 GOX0417 を得た。pGEM-T Easy ベクターにクローン化して配列を確認した。このプラスミド pGEM-GOX0417 を導入した *E. coli* DH5 α は *G. suboxydans* IFO12528 の約 20 倍の 2KGR 活性を示したが、発現量は低かった。次に、pET-28a(+)ベクターに GOX0417 遺伝子を導入し、pET-GOX0417 を得た。pET-GOX0417 を導入した *E. coli* BL21(DE3)は pGEM-GOX0417 を導入した *E. coli* DH5 α よりも若干強い 2KGR 活性を示した。

最後に翻訳効率を上げる目的で、GOX0417 の上流配列を AATGGA から GAAGGA へと、*Dpn*I を使った部位特異的変異導入により置換し、プラスミド pET-GOX0417 M6 を得た。このプラスミドを *E. coli* BL21(DE3)に導入して 2KGR 高生産株として使用した。

結果

(1) 耐熱性 *Gluconobacter* 酢酸菌からの 5KGA 生産株のスクリーニング

タイから単離された耐熱性酢酸菌 84 菌株を、G-GA 培地で 5KGA 生産性を調べた。29 菌株が 25DKGA から生じる褐色の沈殿物を生じないで 5KGA を生産する菌株として選抜されたが、37℃で生産量の高い菌株として最終的に 4 株が選抜された。この 4 株のうち 3 株は、30℃でも 37℃でも、5KGA 生産量が 2KGA 生産量よりも低かった (図 1)。残りの 1 株は、37℃での 2KGA 生産が 30℃の時よりも低くなるにもかかわらず、5KGA 生産量は 30℃と 37℃で変わらなかった。4 株とも 30℃では 2 相性の生育を示した。5KGA と 2KGA の生産はともに最初の生育とともに起こり、生育が遅くなっても継続していた。ゆっくりした生育が 5KGA と 2KGA の減少とともに観察された。ところが、このような 5KGA と 2KGA の減少は 37℃では観察されなかった (図 1)。

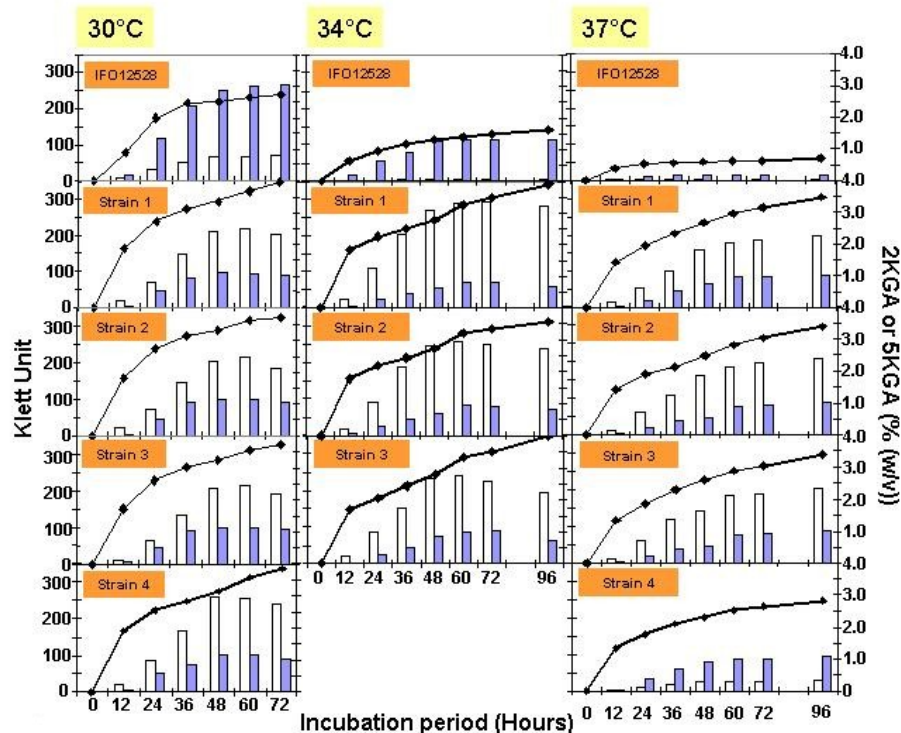


図1 異なる温度での耐熱性 *Gluconobacter* 酢酸菌の生育と 5KGA と 2KGA の生産
 それぞれの菌株は G-GA 培地で培養した。生育 (ひし形) はクレット光度計で測定した。培地上清中の 2KGA 量 (白バー) と 5KGA 量 (グレイバー) はそれぞれ 2KGR と 5KGR を使った酵素法で定量した。

(2) 5KGR の大量発現

5KGRの構造遺伝子 gno は*G. oxydans* DSM3503 から報告されていて⁶⁾、それは*G. oxydans* ATCC621Hのゲノム⁷⁾中のGOX2187に相当する。GOX2187をクローン化したプラスミドをいくつか構築したが、最終的に得られたプラスミドpET- gno -NBを導入した*E. coli* BL21(DE3)は5KGRを高生産し、可溶性タンパク質の50%かそれ以上が5KGRであった。しかし、高生産株は不安定で、何回か培養したものや、1週間寒天培地上で保存したものでは活性が著しく減少した。新しく調製したコンピテントセルにプラスミドを導入したばかりの菌株が高い発現レベルを示した。

この菌株から調製した可溶性画分をDEAEセルロースに吸着させ、0-0.3MのKClで溶出した。この部分精製5KGRはほぼ単一であり、5KGAの定量に十分であった。

(3) 2KGR の大量発現

2KGRの遺伝子は同定されていなかったもので、まず、*G. oxydans* IFO12528から部分精製した2KGRのN末端アミノ酸配列を調べた。もっとも太いバンド(52 kDa)のN末端アミノ酸配列はAYATTNPYTGETXXTFXEATで、ゲノム配列中のGOX1122のMAYATINPYTGETLKTPEATとほぼ一致した。GOX1122はputative NAD-dependent aldehyde dehydrogenaseとアノテーションされていて、実際クローン化したGOX1122を導入した大腸菌の細胞抽出液は2KGR活性を示さず、NADP依存性のアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を示した。一方33 kDaのタンパク質のN末端アミノ酸配列はSSXPDLAIDで、ゲノム配列中のGOX0417のMSSKPDILTIDとほぼ一致した。この遺

伝子は putative 2-hydroxyacid dehydrogenase とアノテーションされていた。

GOX0417 を含むいくつかのプラスミドを構築し、最終的に pET-GOX0417 M6 を得た。このプラスミドを持つ大腸菌は、指数増殖期に IPTG を添加して 5 時間かそれ以上培養することで、2KGR を高発現した。可溶性タンパク質の 10% 程度が 2KGR と見積もられたが、同時に inclusion body を形成していることが観察された。30°C での発現量よりは 37°C のほうが高かった。5KGR 高発現株のときと同様に、高発現株は不安定であった。

2KGR 高生産株の可溶性画分を硫酸沈殿し、DEAE セルロースカラムを素通りさせた。この部分精製 2KGR は 2KGA 定量に十分であった。

結論

- (1) 耐熱性 *Gluconobacter* 酢酸菌の中から 37°C で 5KGA を生産できる菌株を 4 株得た。
- (2) 5KGR を大腸菌で高発現させることに成功した。
- (3) 2KGR の構造遺伝子を決定した。2KGR の大腸菌での高発現にも成功した。

文献

1. Salusjarvi, T., Povelainen, M., Hvorsley, N., Eneyskaya, E. V., Kulminskaya, A. A., Shabalin, K. A., Neustroev, K. N., Kalkkinen, N., Miasnikov, A. N. Cloning of a gluconate/ polyol dehydrogenase gene from *Gluconobacter suboxydans* IFO 12528, characterization of the enzyme and its use for the production of 5-ketogluconate in a recombinant *Escherichia coli* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 306-314, 2004.
2. Shinagawa, E., Matsushita, K., Toyama, H., Adachi O. Production of 5-keto-D-gluconate by acetic acid bacteria is catalyzed by pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent membrane-bound D-gluconate dehydrogenase. *J. Mol. Catal. B* **6**, 341-350, 1999
3. Moonmangmee, D., Adachi, O., Ano, Y., Shinagawa, E., Toyama, H., Theeragool, G., Lotong, N., Matsushita, K. Isolation and characterization of thermotolerant *Gluconobacter* strains catalyzing oxidative fermentation at higher temperatures. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 2306-2315, 2000.
4. Ameyama, M., Adachi, O. 5-Keto-D-gluconate reductase from *Gluconobacter suboxydans*, *Methods Enzymol.* **89**, 198-202, 1982.
5. Ameyama, M., Adachi, O. 2-Ketogluconate reductase from acetic acid bacteria, *Methods Enzymol.* **89**, 203-209, 1982.
6. Klasen R, Bringer-Meyer S, Sahn H. Biochemical characterization and sequence analysis of the gluconate:NADP 5-oxidoreductase gene from *Gluconobacter oxydans*. *J Bacteriol.* **177**, 2637-2643, 1995.
7. Prust, C., Hoffmeister, M., Liesegang, H., Wiezer, A., Fricke W. F., Ehrenreich, A., Gottschalk, G., Deppenmeier, U. Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Nature Biotechnol.* **23**, 195-200, 2005.