

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：14501
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2015～2016
課題番号：15K14236
研究課題名(和文) 補酵素を必要としないモノマー重合酵素の創製

研究課題名(英文) Development of polymerase without cofactor

研究代表者
近藤 昭彦 (Akihiko, Kondo)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授

研究者番号：40205547
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：モノマー重合酵素はその反応にアセチルCoAなどの補酵素を必要とするものが多い。本研究では補酵素を必要としないモノマー重合酵素の開発を行った。タンパク質発現系を構築し、またそれを表層提示系に拡張することに成功した。しかし、その酵素の活性は不十分であり、タンパク質改変にはさらなる検討が必要であることが示された。今後は発現系の最適化と人工進化系を組み合わせることで、新たな酵素を作り出すことができると期待される。

研究成果の概要(英文)：Most of polymerase using basic compounds as a substrate requires co-factors such as acetyl-CoA. Here, we tried to develop a novel enzyme working without cofactors. Protein expression systems have been established and expanded into cell surface display system. However, the activity of displayed enzyme was not enough for further evolution, another strategy should be needed to improve protein function as well as optimization of protein expression and directed evolution.

研究分野：生物化学工学

キーワード：細胞表層工学

1. 研究開始当初の背景

低炭素社会の構築、エネルギー問題の解決に向け、再生可能な資源であるバイオマスの有効利用法の開発が急務である。バイオリファイナリーは、様々な利点を持つグリーン・イノベーションであり、社会からの要請は非常に強い。

代謝改変微生物を用いた有用物質生産は、上記バイオリファイナリーの重要分野の一つである。一方で、発酵生産物それ自身が目的生産物となるバイオ燃料と異なり、高級アルコールや有機酸の多くは、精製された後に化学プロセスを経て機能性ポリマー、バイオプラスチック等へと変換される。これらの酵素反応の多くは補酵素を必要としており、その供給がネックであることが多い。グルコースは解糖系を経てピルビン酸にまで分解され、その後アセチル CoA へと変換される。このアセチル CoA はクエン酸回路へ流入し、生体の増殖やエネルギー生産に利用される。このアセチル CoA 量は厳密に制御されており、アセチル CoA を用いた酵素反応はその量の少なさが問題となることが多い。また、アセチル CoA などの補酵素は分子量が大きいものが多く、培地への添加が不可能である場合がほとんどであり、菌体内へ取り込まれることもない。この点も酵素反応を *in vitro* で行おうとした時に問題点として取り上げられることが多い。補酵素を使うことなく酵素反応を行うことができれば、その利用範囲は大きく広がる事が予想される。

進化分子工学やタンパク質工学技術を用いた改変技術は数多くあるが、この補酵素を必要とする酵素に対するプラットフォームはそれほど多くはない。そこで本研究では、補酵素を必要としない酵素の創製にむけた発現系の構築を行った。

2. 研究の目的

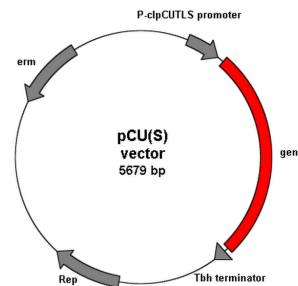
本研究では補酵素を必要としない酵素の創製にむけた発現系の構築及びそれらを用いた酵素進化の可能性について検討を行った。乳酸合成酵素に着目し、乳酸生産能を持つ乳酸菌での発現系の構築を試みることで、新しいタンパク質改変基盤の確立を目指した。

3. 研究の方法

乳酸はポリマー原料として広く知られているモノマーであり、バイオマスからの生産量が多い。この乳酸を重合する酵素はすでに知られているため、その発現系の構築を行った。大腸菌を用いた発現系がいくつか報告されているが、大腸菌は元来乳酸を生産しないため、乳酸合成経路を導入する必要がある。そこで本研究では、もともと乳酸生産能力が高い乳酸菌での発現系の構築を試みた。乳酸合成酵素である propionyl-CoA transferase 及び PHA synthase を発現するベクターを構築し、それぞれ乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* に

導入した(下図)。SDS-PAGE 及びウエスタンブロッティングでタンパク質発現系を評価した。また、最適な表層提示系を構築するために表層提示アンカータンパク質のスクリーニングも合わせて行った。これらの発現系を用いて酵素活性の評価も行った。

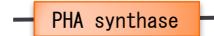
使用した菌
Lactobacillus plantarum ΔldhL1株



遺伝子導入プラスミドの構造

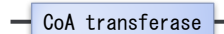
① PHA synthase 導入型

Pseudomonas sp. MBEL 6-19由来



② CoA transferase 導入型

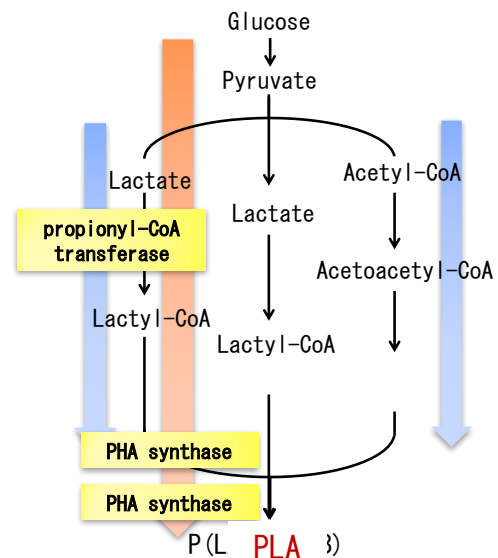
Clostridium propionicum 由来



③ PHA synthase、CoA transferase 連結導入型



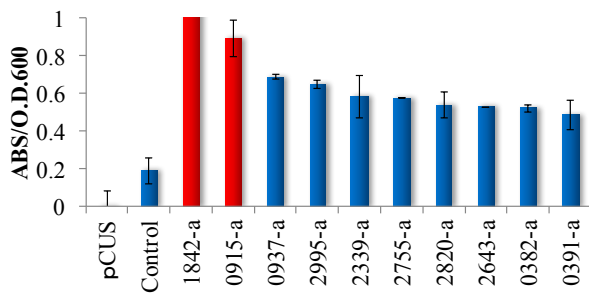
4. 研究成果



構築したベクターの代謝経路を上図に示す。乳酸菌を宿主としているため、原料の供給は十分量あると考えられる。上述の発現ベクターを導入した乳酸菌を培養し、菌体内画分を

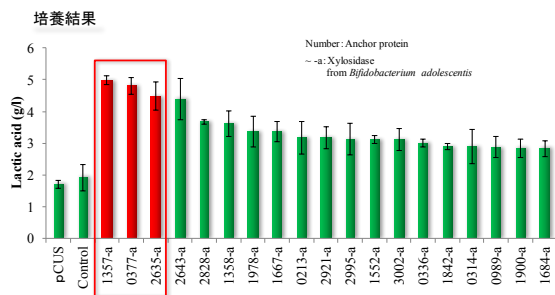
SDS-PAGE 及びウエスタンブロッティングで評価したところ、ごくわずかに発現が確認された。しかし、酵素活性の確認までは至らなかった。乳酸菌は異種微生物由来のタンパク質の発現実績があまりなく、発現しにくい傾向にあることが原因の1つと考えられる。そこで、プロモータの変更、分泌シグナル等の検討、コドン最適化、培養条件の検討を合わせて行った。いずれの場合においても発現量の増加は認められず、菌体内での発現は困難であることが示唆された。そこで、表層提示系の構築を行った。表層提示とは、目的タンパク質と足場となるアンカータンパク質を遺伝子的に融合して発現させることで、目的タンパク質を微生物表層に提示できる優れた技術である。この技術を用いて酵素を提示することができれば、タンパク質進化に大きく貢献できると期待される。

乳酸菌におけるアンカータンパク質の探索を行った。活性を用いて評価のしやすいキシロシダーゼをモデルタンパク質とし、乳酸菌の菌体表層に局在していると予測されるタンパク質をリストアップしてこのキシロシダーゼとの融合タンパク質として発現させた。その酵素活性をモデル基質を用いて評価した結果を下図に示す。評価したアンカータンパク質の中でいくつか活性の高いものを見出すことに成功した。



図：アンカータンパク質のスクリーニング

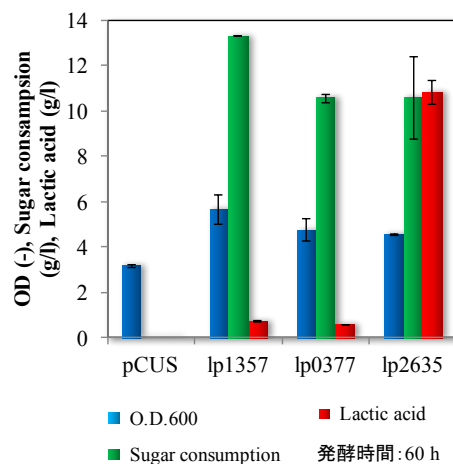
上記のアンカータンパク質を用いてキシロオリゴ糖からの乳酸生産についても検討を行った。表層に提示されている酵素は小分子基質に対して酵素活性を示すが、通常の基質に対して活性を示さない場合も稀に見られる。その結果を下図に示す。



図：表層提示乳酸菌を用いた乳酸生産

これより、表層提示乳酸菌を用いてキシロオリゴ糖を分解しつつ乳酸を生産できることが示された。つまり、表層に提示した酵素はキシロオリゴ糖などの大きな基質もターゲットとして酵素活性を發揮できることが示された。

続いてこれらの改変乳酸菌を用いた乳酸醗酵についても同様に検討を行った。ジャーファメンターを用いて培養を行い、培養挙動及び他の有機酸などの副生成物についても検討を行った。その結果を下図に示す。これより、アンカータンパク質を用いて表層提示することで、酵素の機能及び微生物の代謝のどちらも維持したまま物質生産を行うことができることが示された。また、アンカータンパク質の違いによりその活性の違いが出ることも明らかとなった。



	pCUS	lp1357	lp0377	lp2635
O.D.600 (-)	3.16 ± 0.06	5.66 ± 0.66	4.73 ± 0.49	4.54 ± 0.01
糖消費量 (g/l)	0.00 ± 0.00	13.3 ± 0.00	10.6 ± 0.18	10.6 ± 1.82
乳酸濃度 (g/l)	0.00 ± 0.00	0.73 ± 0.04	0.59 ± 0.01	10.8 ± 0.54

図：表層提示乳酸菌を用いた乳酸生産

この表層提示系を乳酸重合酵素に適用したところ、その酵素活性及び発現を確認することはできなかった。その原因としてキシロシダーゼに最適なアンカータンパク質と乳酸重合酵素に適したアンカータンパク質が異なるという可能性が考えられる。今後は、これまで見出したアンカータンパク質に対して更に検討を進めることで、表層提示系を構築することができると期待される。またこの提示系を用いて乳酸重合酵素の改変を進めていくことで、補酵素を必要としない酵素の創製に向けたプラットフォームの構築が同様に期待できる。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

加留由美子、田中勉、近藤昭彦「キシロオリゴ糖からの乳酸生産プロセスの開発」スマートバイオデザイン研究会 2015. 9.16-17 神戸大学

〔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

近藤 昭彦 (Kondo, Akihiko)

神戸大学科学技術イノベーション研究科 教授

研究者番号：40205547

(2) 研究分担者

田中 勉 (Tanaka, Tsutomu)

神戸大学大学院工学研究科 准教授

研究者番号：90436551

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()