

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15370

研究課題名（和文）新奇酵素の合理的デザインによる芳香族化合物合成プラットフォームの拡張

研究課題名（英文）Aromatic Compound Synthesis Platform by Rational Design of Novel Enzymes

研究代表者

野田 修平（Noda, Shuhei）

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：30710131

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、産業的に有用な基幹化合物を微生物合成するプラットフォームを構築するため、従来にない反応を触媒する新奇酵素・従来と比較して大幅に高い活性を有する新奇酵素を合理的に創製する基盤技術の開発を行った。開発した新奇酵素を申請者が過去に報告した高収率・高生産量で芳香族化合物を合成可能なプラットフォームに適用することにより、芳香族化合物に留まらず、ジカルボン酸・ジオールなども微生物合成可能なプラットフォームの開発を目指した。アジピン酸合成酵素の変異体作成を通じて、グルコースからアジピン酸を合成可能な大腸菌の作製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの酵素開発研究においては、鑄型となる酵素の結晶構造が既知になっていなければ手の施しようがないという問題点があった。しかしながら、本申請で提案する酵素ホモロジーモデリングを用いた酵素改変では、詳細な結晶構造が明らかになっていない酵素に対しても応用可能な技術を開発する点において学術的意義がある。また、アジピン酸はヘキサメチレンジアミンの原料である莫大な市場規模をもつバルクケミカルの一つであり、社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, in order to construct a platform for microbial synthesis of industrially useful key compounds, we developed a basic technology to rationally create novel enzymes that catalyze unconventional reactions and have significantly higher activity compared to conventional enzymes. By applying the developed novel enzymes to the platform for the synthesis of aromatic compounds with high yield and production, which was previously reported by the applicant, we aimed to develop a platform for microbial synthesis of not only aromatic compounds but also dicarboxylic acids, diols, etc. Through the creation of a mutant adipic acid synthase, we succeeded in producing *E. coli* capable of synthesizing adipic acid from glucose.

研究分野：代謝工学

キーワード：アジピン酸 大腸菌 酵素改変

1. 研究開始当初の背景

近年、代謝工学、合成生物学の発展に伴い、微生物を菌体触媒に用いた有用化合物生産に関する研究が世界中で幅広く行われている。申請者は過去の微生物による物質生産研究において、様々な芳香族化合物を高収率・高生産性量で生産するプラットホーム技術を開発している (Noda et al, 2016, *Metab Eng.*)。また、このプラットホームを拡張し、産業的に莫大な市場規模を持つマレイン酸をグルコースから合成する技術を世界で初めて報告している (Noda et al, 2017, *Nat Commun.*)。これまでの微生物によるモノ作り研究においては、天然に存在する酵素や代謝経路の一部を組み合わせ、グルコースからの新奇合成経路を開通させる、という手法を取っていた。しかしながら、どのようにして、(1)極めて高い収率で化合物を合成するのか？、(2)合成可能な化合物のバリエーションを拡充するのか？という本研究分野の核心をなす2つの究極的な「問い」を実現するためには、望みの反応を触媒する・望みの活性値を有する新奇酵素を合理的にデザインし開発する技術の必要性が生じてくる。

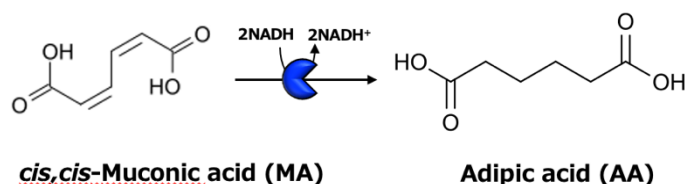
2. 研究の目的

本研究の最終目的は、合理的な新奇酵素開発技術を確立することにより、申請者が保有する芳香族化合物合成プラットホームの高機能化、汎用性の拡張を行うことである。その過程で得られた知見は、微生物を用いたモノ作り研究における新たな一手となる。

3. 研究の方法

本研究における微生物開発は、一般的な遺伝子組み換えや、CRISPR-Cas9によるゲノム編集技術を用いて行なった。微生物の培養は主に試験管を用いて5mLの培養系で行なった。生成物の評価には市販の定量キット、HPLCやGCMSを用いた。

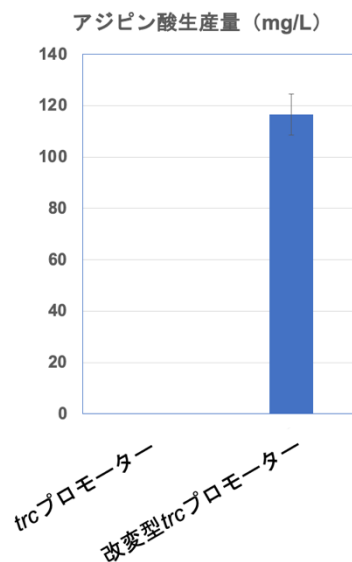
4. 研究成果



本研究では、ムコン酸をアジピン酸に変換する高活性酵素の開発を行った。アジピン酸は6,6-ナイロンの原料となり、産業的に莫大な市場規模を持つ有用ジカルボン酸化合物である。本研究では、まず、ムコン酸をアジピン酸へ変換する酵素の候補として、クロストリジウム属、ロドバクテリウム属、バチルス属などの様々な微生物手ゲノム中より、複数の2-エン酸レダクターゼを採用した。ムコン酸をアジピン酸に変換する反応を図1に示す。

遺伝子発現用のベクターとしては、pZE12MCSのlacプロモーターをtrcプロモーターに置換したpZE12-Ptrcを用いた。このtrcプロモーターの一部を削除することにより、*Bacillus coagulans*由来2-エン酸レダクターゼ(Bcoa_0725)にムコン酸をアジピン酸に変換する活性を確認することに成功した。次に、グルコースからのアジピン酸合成を確認するために、この株に、pSAK_MCSというローコピープラスミドにムコン酸合成遺伝子である、aroZ, aroY, catAという3つの遺伝子を運ぶpSAK-ZYCというプラスミドを導入した。それぞれの遺伝子に関しては、*Bacillus thuringiensis*由来の3-デヒドロシキミ酸脱水酵素(AroZ)、*Klebsiella pneumoniae*由来のプロトカテク酸脱炭酸酵素(AroY)、*Pseudomonas putida* DOT-T1E由来のカテコール酸化的開裂酵素(CatA)を示す。

作製したムコン酸合成遺伝子とムコン酸をアジピン酸に変換する酵素をコードした遺伝子を保有する大腸菌をTB+4%グルコース培地で培養し、培養液をHPLCにより分析した。尚、培養には15mLの密閉バイアルを用い、液量は1mL



で行なった。

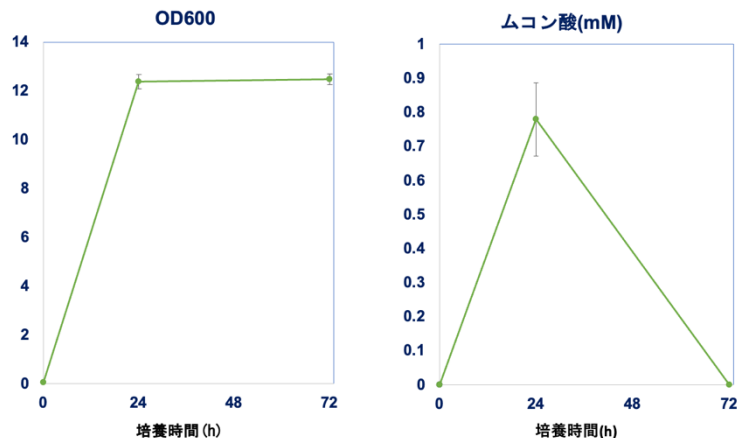
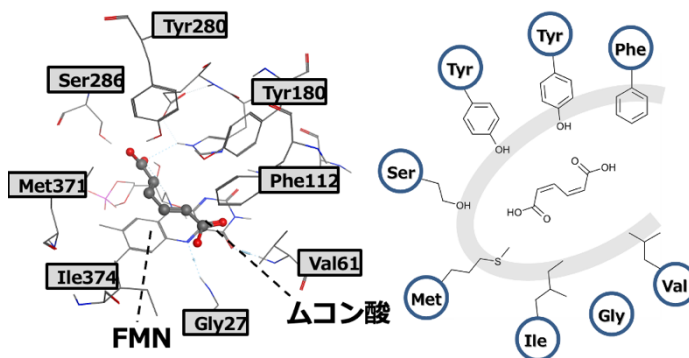
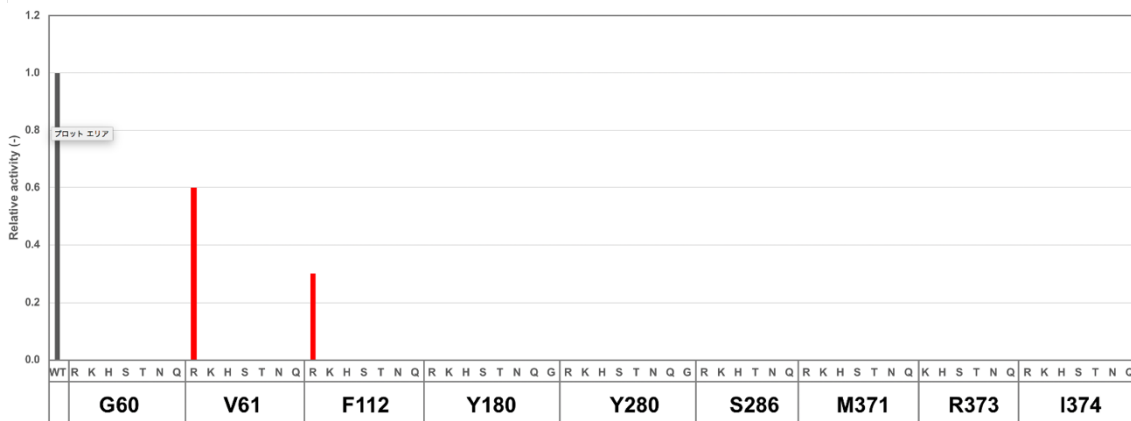


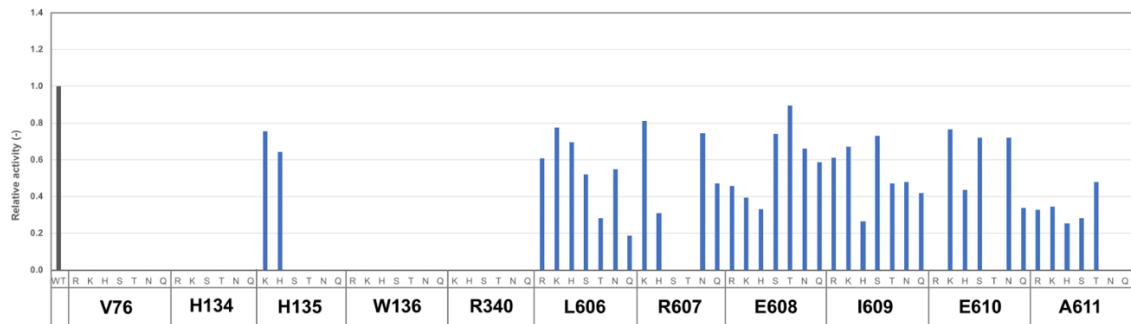
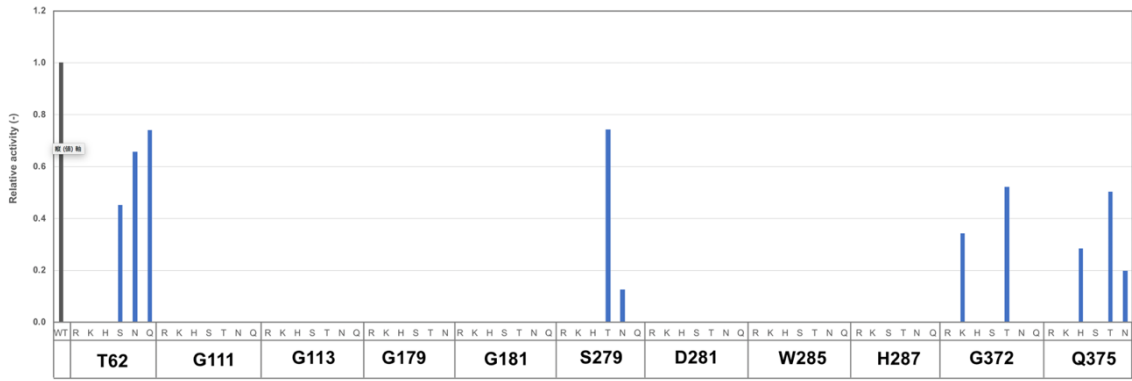
図3に細胞増殖とムコン酸生産量の経時変化を示す。また、培養72時間において、62mg/Lのアジピン酸の生産に成功した。

ここで、ムコン酸からアジピン酸への変換活性を向上させるため、Bcoa_0725 のホモロジーモデルを作製し、酵素変異体の作製の検討を行なった。基質であるムコン酸の結合ドメイン周辺を可視化したモデルを図4に示す。このモデルを基に複数の Bcoa_0725 変異体を作製し、ムコン酸



からアジピン酸への変換をアジピン酸の最終生産量により評価した。その結果を図5に示す。





様々な変異体を作製したものの、現時点では野生株を凌駕する Bcoa_0725 変異体の作製には至っていない。しかしながら、活性の消失が確認される変異点、ある程度活性を保持することができる変異点のフィードバックにより、現在更なる変異体の作製及び評価を継続中であり、良好な結果を取得できている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujiwara Ryosuke, Nakano Mariko, Hirata Yuuki, Otomo Chisako, Nonaka Daisuke, Kawada Sakiya, Nakazawa Hikaru, Umetsu Mitsuo, Shirai Tomokazu, Noda Shuhei, Tanaka Tsutomu, Kondo Akihiko	4. 巻 72
2. 論文標題 G6P-capturing molecules in the periplasm of Escherichia coli accelerate the shikimate pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Metabolic Engineering	6. 最初と最後の頁 68 ~ 81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymben.2022.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Noda Shuhei, Mori Yutaro, Fujiwara Ryosuke, Shirai Tomokazu, Tanaka Tsutomu, Kondo Akihiko	4. 巻 67
2. 論文標題 Reprogramming Escherichia coli pyruvate-forming reaction towards chorismate derivatives production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metabolic Engineering	6. 最初と最後の頁 1 ~ 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymben.2021.05.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara Ryosuke, Noda Shuhei, Tanaka Tsutomu, Kondo Akihiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Metabolic engineering of Escherichia coli for shikimate pathway derivative production from glucose-xylose co-substrate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 279-290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-14024-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mori Yutaro, Noda Shuhei, Shirai Tomokazu, Kondo Akihiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Direct 1,3-butadiene biosynthesis in Escherichia coli via a tailored ferulic acid decarboxylase mutant	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2195-2206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22504-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------