

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870136

研究課題名(和文) アルカン合成酵素群の革新的活性評価法開発と高速人工進化

研究課題名(英文) Development of evaluation methods for enzyme activities for alkane biosynthesis

研究代表者

林 勇樹 (HAYASHI, Yuuki)

東京大学・総合文化研究科・助教

研究者番号：90444059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：微生物によるアルカン生産の実用化には、アルカン生成に関わる酵素(AARとAD)の高活性化が必要である。本研究では、進化分子工学により2つの酵素の高活性化を目指した。そのためには、2つの酵素の活性を迅速、簡便に評価できる系の開発が必要である。ナイルレッドによるアルカン検出を利用したAD活性検出系の開発では、変異体間の活性の有意差を検出できず、新たな検出系の構築が必要となった。一方で、菌体内でのAARの生成量(AARの活性)を生物発光に変換し非破壊的に外部から評価できる系の開発に成功した。1000種以上に変異体AARの活性を同時に評価でき、進化分子工学によるAARの高活性化の準備が整った。

研究成果の概要(英文)：It is too low for activities of enzymes (AAR and AD), to produce alkane by microorganisms, practically. Therefore, in this study, we proposed that the enzyme activities were improved by directed evolution. Directed evolution is a method to improve and/or change characteristics and activities of enzymes, and require a high-throughput method to evaluate AD and AAR activities of mutants, quickly and simply.

At first, using Nile red, we tried to detect amount of alkane produced by co-expression of AD and AAR as *s in vivo* AD activity, however, we did not discriminate activities among AD mutants. Thus, we needed to change a strategy to elucidate *in vivo* AD activity. On the other hand, we successfully established a method to evaluate *in vivo* AAR activity directly as bioluminescence by coexpressed bacterial luciferase. Using this method, we can simultaneously compare *in vivo* AAR activity among over 1000 AAR mutants, resulting in accelerating improvement of AAR activity by directed evolution.

研究分野：進化分子工学

キーワード：アルカン合成 進化分子工学 蛋白質工学 アシル-ACP還元酵素 アルデヒド脱ホルミル化酸化酵素

1. 研究開始当初の背景

東日本大震災以後、国内の原子力発電所は全て停止し、日本の化石燃料へのエネルギー依存度がさらに増大した。しかし、化石燃料の枯渇は地球規模の問題であり、持続可能な代替エネルギーの開発は喫緊の課題である。

らん藻の生成するアルカン（軽油に相当）は、光合成を利用して作られるため、カーボンニュートラルなバイオエネルギーとして注目されている。2010年には、アルカン生成に関わる2つの酵素、アシル-ACP還元酵素(AAR)、アルデヒド脱ホルミル化酸化酵素(AD)、が同定され、遺伝子工学を使った微生物によるアルカン生産が可能となった。AARは、大腸菌の脂肪酸合成経路の代謝産物である脂肪酸アシル-ACPを基質として脂肪酸アルデヒドへと還元し、ADがこれをアルカンへと変換する。しかし、このいずれの酵素の活性も非常に弱く、微生物によるバイオエネルギーとしてのアルカン生産を実用化するには、これら2つの酵素を高活性化することが必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、アルカン合成を担う2つの酵素(AARとAD)の迅速、簡便な活性評価法を開発し、本評価法を用いた進化分子工学により、2つの高活性化を実現することを目的とする。得られた高活性化変異体AARとADを用いて、大腸菌によるアルカンの大量生産を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、進化分子工学を用いて、2つの酵素の高活性化を実現する。進化分子工学とは、多数の変異体を作成し、各変異体の活性を評価する。その中から高活性化変異体を選択する。この変異と選択からなる進化サイクルを繰り返すことで高活性化変異体を創出する方法である。通常、アルカン合成を担う2つの酵素(AARとAD)の活性を測定する方法は、各タンパク質を精製し、試験管内で基質と反応させ、生成物を抽出し、ガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS)で定量する方法と、AAR、あるいはAARとADを大腸菌で発現し、大腸菌培養液から各酵素の生成物を抽出し、GC-MSで定量する方法がある。いずれの方法も多段階のプロセスを経るため、時間と手間を要する。そのため、進化分子工学を用いて、AARとADの高活性化変異体を創出するためには、さらに多数の変異体の活性を迅速、簡便に評価できる系を構築しなければならない。そこで、進化分子工学を用いて、ADとAARの高活性化を実現するために、

(1) ADの活性を、迅速、簡便に評価できる系の構築、(2) ADの変異体ライブラリの調製、(3) AARの活性を、迅速、簡便に評価できる

系の構築、(4) AAR変異体ライブラリの構築を行った。最後に(5)進化分子工学によるAARとADの高活性化を目指した。

4. 研究成果

(1) ADの活性を、迅速、簡便に評価する系の構築

大腸菌でAARとADを共発現することで、菌体内にアルカンを生成し、培養液中に分泌する。すでにAARとADの共発現ベクターは研究室で構築済みである。そこで、ナイルレッドを用いて、大腸菌の生成するアルカンを検出することを目指した。ナイルレッドは、脂溶性分子に結合し、蛍光を発する。ナイルレッドとAARとADの発現誘導剤を塗布した寒天培地でAARとADの共発現を行った。コントロールとして活性の低い変異体のADを用いた。コロニー形成後、寒天培地に励起光を当て、活性の異なるAD由来のコロニー間で蛍光の差が見える条件を検討した。しかし、野生型と活性の弱い変異体間での蛍光強度の有意な差は見られなかった。また、液体培地でも同様の実験を試みたが、有意な差は見られなかった。おそらく、大腸菌の膜成分に代表されるような脂溶性分子が多く存在するのに対し、アルカンの生成量は微量であるため、蛍光強度として有意な差は見られなかったと考えられる。アルカン分子選択的に検出できる新たな系の構築が必要であることがわかった。

(2) ADの変異体ライブラリの構築

ADの迅速活性検出法の構築と並行して、AD変異体ライブラリの構築を進めた。研究室で構築済みであるAARとADの共発現ベクターを鋳型DNAとして、error-prone PCR法により、ADにのみ、無作為に変異を導入した共発現ベクターを調製した。変異導入率は、鋳型DNAの量、PCRのサイクル数、PCRの基質である塩基の濃度バイアス、マンガンイオンの濃度に大きく依存している。ADのタンパク質1分子あたりのアミノ酸置換数が3個ほどになるように鋳型DNAの量とサイクル数を調節しAD変異体ライブラリを調製することができた。

(3) AARの迅速、簡便な活性検出法の開発

AARは、大腸菌の脂肪酸合成経路の代謝産物である脂肪酸アシル-ACPを基質として、脂肪酸アルデヒドを生成する。菌体内で生成した脂肪酸アルデヒドは、大腸菌の内在性アルデヒド分解酵素により、アルコールへと還元されるため、その定量は難しかった。そこで、本研究では、AARとバクテリアルシフェラーゼ(BL)を共発現することで、菌体内でAARが生成した脂肪酸アルデヒドを直ちにBLが脂肪酸へと変換し、同時にBLからの生物発光を検出する。AARの反応を律速段階となるよう、AARとBLの発現量を調節することで、

AAR の生成物の量を、菌体（培養液）の発光量として外部から測定することが可能となり、AAR の活性を非破壊的に定量できる革新的な方法を開発した。本検出法は、寒天培地上の大腸菌コロニーの発光を X 線フィルムで検出（定量性に検討の余地あり）が可能であり（図 1）、液体培養の発光をプレートリーダーでモニターするだけで AAR の活性（脂肪酸アルデヒドの生成量）を定量できる（図 2）。大腸菌の破碎や、生成物の抽出、GC-MS による測定といった多段階のプロセスが不要であり、非常に簡便である。また、1000 種以上の変異体 AAR の活性を同時に、かつ、迅速に評価することができる。さらに、BL は、AAR の生成物（脂肪酸アルデヒド）を選択的に触媒するため、非特異的な検出の危険性も低く、感度も高い。本評価法の確立により、変異体 AAR ライブラリの活性測定が飛躍的に迅速、簡便となったため、進化分子工学による AAR の高活性化が実現可能となった。

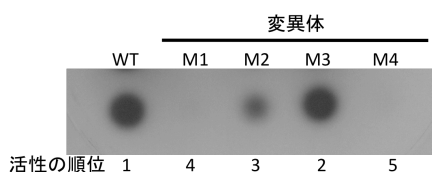


図1
バクテリアルシフェラーゼの発光による変異体AARの活性検出。大腸菌コロニーからの発光をX線フィルムにより検出。黒いスポットにより発光を検出している。

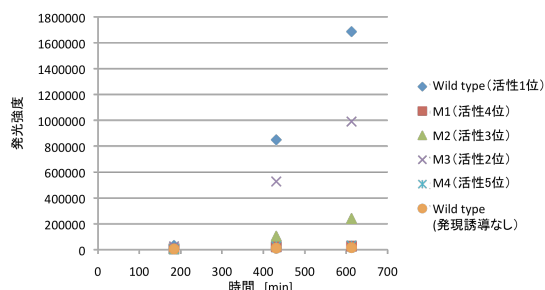


図2
液体培地を用いたバクテリアルシフェラーゼの発光による変異体AARの活性検出。大腸菌培養液からの発光の経時変化をプレートリーダーで検出。

(4) AAR の変異体ライブラリの構築

発光による AAR の迅速活性評価法の開発と並行して、AAR の変異体ライブラリの構築を行った。(1) AD の変異体ライブラリの構築で error-prone PCR の条件が決まっていたので、その方法にならい、AAR の鋳型 DNA の濃度、サイクル数を最適化することで、アミノ酸置換数が 3 個程度となる変異体 AAR ライブラリを構築した。

(5) 進化分子工学に AAR と AD の高活性化

AD の迅速、簡便な活性検出法において、ナイルレッドによるアルカンの検出を試みたが、細胞膜に由来する脂質成分の非特異的な検出が見られたため、新たな活性検出法の構築が必要となった。現在、AD の触媒反応に特

異的に活性を検出する方法を進めている。本手法では確立できれば、すぐに進化分子工学による AD の高活性化を進めたい。

AAR の活性を発光で検出する画期的、かつ迅速、簡便な活性評価の構築に成功した。現在、本評価法を用いた進化分子工学による AAR の高活性化を進めている。

その他に、AD の進化分子工学による高活性化を進めるにあたり、AD の有する 3 つのシステイン残基の重要性について前もって調べた。AD の 3 つのシステイン残基を組合せてアラニンに置換した変異体を作成し、可溶性、熱安定性、構造安定性、活性について調べた。その結果、71 番目のシステインは活性に非常に重要なアミノ酸残基であることがわかった。上記結果を発表論文 (1) として報告した。

(3) で開発したバクテリアルシフェラーゼを使った菌体内脂肪酸アルデヒドの迅速、簡便な活性測定を改良し、AAR の基質であるアシル-ACP を供給する反応を律速段階にすることで、菌体内のアシル-ACP の生成量をモニターすることも可能となる。大腸菌を使った脂肪酸合成、アルカン合成に関わる代謝工学への応用可能であり、本手法の他分野へのインパクトは計りしれない。

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 2 件)

(1) 林 勇樹

大腸菌の菌株の特徴を知ろう、
生物工学会誌、94 巻 1 号、2016/05/30、15-20、
https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/files/sbj/9401/9401_yomoyama.pdf
査読無

(2) Yuuki Hayashi, Fumitaka Yasugi, & Munehito Arai,

Role of cysteine residues in the structure, stability, and alkane producing activity of cyanobacterial aldehyde deformylating oxygenase.
PLoS ONE 10(4), e0122217 (2015),
doi: 10.1371/journal.pone.0122217.
査読有

[学会発表] (計 30 件)

(1) 工藤恒、名和良太、林勇樹、渡辺麻衣、池内昌彦、新井宗仁

「ラン藻由来アルカン合成関連酵素の構造機能解析とバイオエネルギー生産への応用」
第 5 回日本生物物理学会関東支部会
2016 年 3 月 11 日 (金) 桐生地域地場産業振興センター (群馬県桐生市)

(2)岡芳樹、澤田泰平、渡辺尚大、林勇樹、
新井宗仁

「合理的設計による抗体精製用リガンド FPA
の開発」

第 5 回日本生物物理学会関東支部会

2016 年 3 月 11 日 (金) 桐生地域地場産業振
興センター (群馬県桐生市)

(3)和田愛未、野村芳弘、林勇樹、稲富純一、
工藤恒、河合秀信、岡芳樹、宮田真人、新井
宗仁

「マイコプラズマ Gli49 タンパク質の立体構
造解析」

第 5 回日本生物物理学会関東支部会

2016 年 3 月 11 日 (金) 桐生地域地場産業振
興センター (群馬県桐生市)

(4) 梶原朋子、林勇樹、工藤恒、河合秀信、
岡芳樹、新井宗仁

「燃変性タンパク質 HIV-1 Tat の立体構造解
析」

第 5 回日本生物物理学会関東支部会

2016 年 3 月 10 日 (木) 桐生地域地場産業振
興センター (群馬県桐生市)

(5)張マリ、榛葉啓悟、林勇樹、新井宗仁

「ラン藻でのアルカン合成に必要な 2 つの酵
素間の結合部位の探索」

第 5 回日本生物物理学会関東支部会

2016 年 3 月 10 日 (木) 桐生地域地場産業振
興センター (群馬県桐生市)

(6)工藤恒、名和良太、林勇樹、渡辺麻衣、
池内昌彦、新井宗仁

「シアノバクテリア由来アルカン合成関連
酵素の機能解析及びバイオエネルギー生産
への応用」

藍藻の分子生物学 2015

2015 年 11 月 16 日 (月) かずさアカデミアホ
ール (千葉県木更津市)

(7)工藤恒、名和良太、林勇樹、渡辺麻衣、
池内昌彦、新井宗仁

「シアノバクテリア由来アルカン合成関連
酵素の機能解析及びバイオエネルギー生産
への応用」

光合成若手&植物脂質若手ジョイントセミ
ナー2015

2015 年 10 月 10 日 (土) 東京大学 (東京都文
京区)

(8)Junichi Inatomi, Yuuki Hayashi,
Yoshihiro Nomura, Yoshito Kawakita,

Masaru Yabe, Makoto Miyata, Munehito Arai

"Structural analysis of repeat fragments
consisting of the gliding protein Gli349
from Mycoplasma mobile" (英語)

第 53 回日本生物物理学会年会

2015 年 9 月 15 日 (火) 金沢大学 (石川県金
沢市)

(9)Yuuma Suematsu, Yuuki Hayashi,
Munehito Arai

"Structural dynamics of a cyanobacterial
alkane-producing enzyme, aldehyde
deformylating oxygenase, studied by NMR
and MD simulations" (英語)

第 53 回日本生物物理学会年会

2015 年 9 月 14 日 (月) 金沢大学 (石川県金
沢市)

(10)Hisashi Kudo, Ryota Nawa, Yuuki
Hayashi, Mai Watanabe, Masahiko Ikeuchi,
Munehito Arai

"Functional analysis of the
cyanobacterial enzyme for alkane
biosynthesis and its application for
bioenergy production" (英語)

第 53 回日本生物物理学会年会

2015 年 9 月 14 日 (月) 金沢大学 (石川県金
沢市)

(11)Tomoko Kunihara, Yuuki Hayashi,
Munehito Arai

"pH-dependent conformational changes in
the intrinsically disordered HIV-1 Tat
protein" (英語)

第 53 回日本生物物理学会年会

2015 年 9 月 14 日 (月) 金沢大学 (石川県金
沢市)

(12)Mari Chang, Yuuki Hayashi, Munehito
Arai

"The search for the binding sites between
two enzymes essential for cyanobacterial
alkane biosynthesis" (英語)

第 53 回日本生物物理学会年会

2015 年 9 月 13 日 (日) 金沢大学 (石川県金
沢市)

(13)Keigo Shimba, Fumitaka Yasugi, Yuuki
Hayashi, Munehito Arai

"Residues essential for the alkane
producing activity of aldehyde
deformylating oxygenase revealed by
alanine scanning mutagenesis" (英語)

第 53 回日本生物物理学会年会

2015 年 9 月 13 日 (日) 金沢大学 (石川県金
沢市)

(14)Daisuke Tashiro, Yuuki Hayashi,
Munehito Arai

"Herstatin, an antitumor drug candidate,
is an intrinsically disordered protein"
(英語)

第 53 回日本生物物理学会年会

2015 年 9 月 13 日 (日) 金沢大学 (石川県金
沢市)

(15)Taihei Sawada, Yoshiki Oka, Takahiro

Watanabe, Yuuki Hayashi, Munehito Arai
"Rational design to improve the pH-sensitive antibody dissociation of FPA, a ligand for antibody purification" (英語)

第 53 回日本生物物理学会年会
2015 年 9 月 13 日 (日) 金沢大学 (石川県金沢市)

(16) 工藤 恒、名和良太、林勇樹、新井宗仁
「シアノバクテリア由来アルカン合成関連酵素の変異解析」

第 16 回日本蛋白質科学会年会
2015 年 6 月 25 日 (木) あわぎんホール (徳島県徳島市)

(17) 梶原朋子、林勇樹、新井宗仁
「天然変性タンパク質 HIV-1 Tat と転写コアクチベーター CBP の KIX ドメインとの相互作用」

第 16 回日本蛋白質科学会年会
2015 年 6 月 24 日 (水) あわぎんホール (徳島県徳島市)

(18) 稲富純一、林勇樹、川北祥人、矢部優、宮田真人、新井宗仁
「マイコプラズマ Gli349 タンパク質の立体構造解析」

新学術領域「運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性」第 3 回全体会議
2015 年 6 月 10 日 (水) 金沢商工会議所会館 (石川県金沢市)

(19) 梶原朋子、林勇樹、新井宗仁
「天然変性タンパク質 HIV-1 Tat による標的分子認識機構」

第 4 回日本生物物理学会関東支部会
2015 年 3 月 10 日 (火) 日本大学 (東京都世田谷区)

(20) Tomoko Kuniyama, Yuuki Hayashi, Munehito Arai
"Interaction of the intrinsically disordered HIV-1 Tat protein with the KIX domain of the transcriptional coactivator CBP" (英語)

第 52 回日本生物物理学会年会
2014 年 9 月 27 日 (土) 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

(21) Daisuke Tashiro, Yuuki Hayashi, Munehito Arai
"Structural analysis of the intron-encoded domain of herstatin" (英語)

第 52 回日本生物物理学会年会
2014 年 9 月 27 日 (土) 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

(22) Taihei Sawada, Takahiro Watanabe,

Yuuki Hayashi, Munehito Arai
"Mechanism and improvement of pH-sensitive antibody dissociation by FPA, a ligand for antibody purification" (英語)

第 52 回日本生物物理学会年会
2014 年 9 月 27 日 (土) 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

(23) Junichi Inatomi, Yuuki Hayashi, Yoshito Kawakita, Masaru Yabe, Makoto Miyata, Munehito Arai

"Structural analysis of the gliding protein Gli349 from Mycoplasma mobile" (英語)

第 52 回日本生物物理学会年会
2014 年 9 月 27 日 (土) 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

(24) Fumitaka Yasugi, Yuuki Hayashi, Munehito Arai
"Alanine scanning mutagenesis of cyanobacterial aldehyde decarboxylase that synthesizes alkanes" (英語)

第 52 回日本生物物理学会年会
2014 年 9 月 27 日 (土) 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

(25) Yuuki Hayashi, Munehito Arai
"Development of a high-throughput method to evaluate catalytic activity of fatty acyl-ACP reductase" (英語)

第 52 回日本生物物理学会年会
2014 年 9 月 27 日 (土) 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

(26) 稲富純一、林勇樹、川北祥人、矢部優、宮田真人、新井宗仁
「X線小角散乱によるマイコプラズマ Gli349 タンパク質のリピート構造の解析」

第 14 回日本蛋白質科学会年会
2014 年 6 月 26 日 (木) ワークピア横浜 (神奈川県横浜市)

(27) 八杉文隆、林勇樹、新井宗仁
「アルカンを合成するラン藻由来アルデヒド脱カルボニル化酵素のアラニンスキャン変異解析」

第 14 回日本蛋白質科学会年会
2014 年 6 月 26 日 (木) ワークピア横浜 (神奈川県横浜市)

(28) 澤田泰平、渡辺尚大、林勇樹、新井宗仁
「穏やかな pH で抗体を精製するための新規アフィニティーリガンドの開発」

第 14 回日本蛋白質科学会年会
2014 年 6 月 26 日 (木) ワークピア横浜 (神奈川県横浜市)

(29) 稲富純一、林勇樹、新井宗仁

「マイコプラズマ Gli349 タンパク質の立体構造解析」

新学術領域「運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性」第2回全体会議

2014年6月16日（月）旭川大雪クリスタルホール（北海道旭川市）

(30) 澤田泰平、渡辺尚大、林勇樹、新井宗仁

「穏やかな pH で抗体を精製するための新規アフィニティーリガンドの開発」

第14回東京大学生命科学シンポジウム

2014年4月26日（土）東京大学（東京都文京区）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 勇樹 (HAYASHI, Yuuki)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：90444059