

令和元年5月21日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04732

研究課題名(和文)人工的な代謝酵素複合体(人工メタボロン)の構築と分子設計基盤の確立

研究課題名(英文) Assembly of synthetic metabolon and establishment of structural basis of molecular design

研究代表者

平野 展孝 (HIRANO, NOBUTAKA)

日本大学・工学部・准教授

研究者番号：10409089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：メタボロンとは、生合成経路を構成する酵素群が集合した酵素複合体である。代謝酵素の集積化は、局所的な酵素濃度を上昇させるため、各酵素間における基質と生成物の受け渡しを加速し、酵素発現量が少ない環境下であっても、生合成反応を促進すると考えられている。本研究では、植物バイオマス分解酵素複合体の骨格・酵素間相互作用を利用して、人工的な代謝酵素複合体を構築し、生合成効率の改善に取り組んだ。部位特異的組換え酵素を用いて、大腸菌ゲノムへポリケチド生合成経路の遺伝子導入を行った結果、酵素発現量は低下したが、代謝酵素の複合体化によって生合成効率を改善できることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長鎖DNAが導入可能な大腸菌ゲノムを対象に、ポリケチド生合成系の遺伝子導入を行った。生合成経路をゲノム遺伝子導入した場合、代謝酵素の発現量は低下するが、代謝酵素を人工的に複合体化することで、酵素発現量が少ない環境下であっても、生合成効率を改善できることを示した。本研究結果により、ゲノム遺伝子導入が必要な長鎖DNAから成る生合成系に対しても、代謝酵素の複合体化によって、効率的な物質生産が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Metabolon is a multi-enzyme complex assembled with metabolic enzymes that constitute a biosynthetic pathway. Clustering metabolic enzymes increases the in vivo local concentration of metabolic enzymes and accelerates flux of the substrates and products between metabolic enzymes, which is thought to enhance biosynthesis even under the condition of low expression levels of metabolic enzymes. In this study, we addressed to the improvement of the efficiency of biosynthesis by the assembly of synthetic metabolon, which is artificially assembled with utilizing interactions between the scaffolds and enzymes of plant biomass-degrading multi-enzyme complex. The biosynthetic pathways of polyketides were integrated into the Escherichia coli genome using a site-specific recombinase. Although the expression levels of metabolic enzymes decreased by the genomic integration of biosynthetic pathways, the results indicated that clustering metabolic enzymes can improve the efficiency of biosynthesis.

研究分野：合成生物学

キーワード：インテグラゼ ゲノム工学 合成生物学 セルロソーム タンパク質工学 メタボロン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

代謝酵素複合体(メタボロン)とは、代謝経路を構成する酵素群が集合した酵素複合体である。代謝酵素が集積・近接化することで、酵素の局所的濃度が高くなり、各酵素間で基質と生成物が円滑に受け渡される基質チャネリング効果により、代謝中間体が細胞質中に拡散することなく、酵素発現量が少ない環境下でも、代謝反応が効率良く進行できると考えられている。メタボロン形成を伴う二次代謝産物の生合成系としては、植物ポリケチド生合成系が有名である。植物ポリケチドには、ウコンのクルクミン(抗腫瘍作用)、ブドウのレスベラトロール(抗酸化作用)等、生理活性を持つものが数多く存在する。近年のバイオテクノロジー分野では、これらの生理活性物質の誘導体を、遺伝子工学が容易な大腸菌で生産する手法が注目されている。しかし、植物ポリケチド生合成酵素群を異種細胞内で共発現しても自発的なメタボロン形成が起こらない場合が多く、合成生物学分野で設計される人工的な代謝経路では、異なる生物種由来の酵素を組み合わせるため、自発的なメタボロン形成は更に起こり難いと考えられる。また、従来から用いられているプラスミド DNA への遺伝子導入では、導入 DNA 鎖長に限界があるため、多種多様な代謝酵素が関与する長鎖 DNA から成る生合成系への適応が困難である。

2. 研究の目的

本研究では、植物バイオマス分解酵素複合体(セルロソーム)の複合体形成機構(骨格タンパク質・酵素間相互作用)を利用して、人工的な代謝酵素複合体(人工メタボロン)を試験管内・細胞内において構築し、そのメタボロン形成効果を調べることを目的とした。また、大腸菌を対象に、長鎖 DNA が導入可能なゲノム DNA へ生合成経路を導入することで、長鎖 DNA から成る生合成系にも対応できる遺伝子導入法の確立と、大腸菌へゲノム遺伝子導入した生合成経路からの効率的な物質生産法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、ポリケチド生合成系を対象に、植物バイオマス分解酵素複合体(セルロソーム)骨格を用いた人工的な代謝酵素複合体の細胞内形成を行い、細胞内においてメタボロン形成効果の解析を行った。研究対象の生合成系として、比色定量可能な放線菌由来フラビオリン生合成系(RppA, MomA)、植物ポリケチドであるウコンのクルクミン生合成系(4CL, CUS)、及びブドウのレスベラトロール生合成系(4CL, STS)を選定した(図

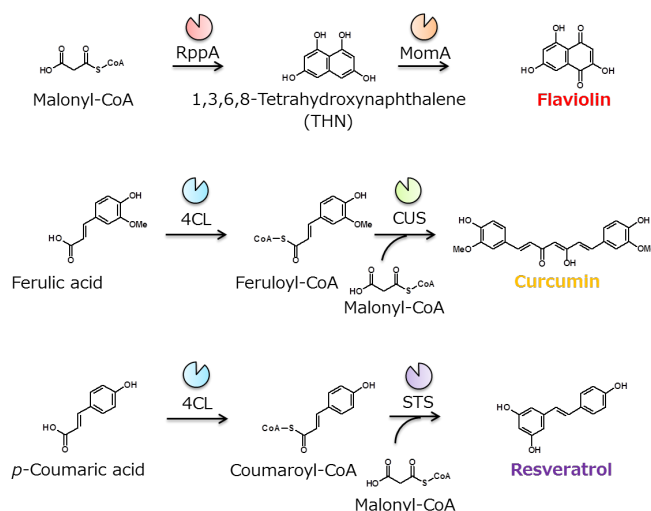


図 1. ポリケチド生合成系

1)。セルロソームの骨格結合ドメイン(ドックリンドメイン)を付加した代謝酵素の構築を行い、更に、セルロソームの酵素結合ドメイン(コヘシンドメイン)が連なった骨格タンパク質を導入した(メタボロン形成した)細胞での生合成量と、骨格タンパク質を導入していない(メタボロン形成していない)細胞での合成量の比較から、メタボロン形成効果を測定した。各大腸菌株での生合成量は、フラビオリンは吸光度測定と逆相 HPLC、クルクミンとレスベラト

ールは逆相 HPLC を用いて測定した。尚、大腸菌ゲノムへの生合成経路の導入には、放線菌ファージ TG1 由来部位特異的組換え酵素 (TG1 インテグラーゼ) を用いたゲノム遺伝子導入法を用いた。ファージ由来インテグラーゼとは、ファージ感染時にファージゲノムの宿主細菌ゲノムへの組み込みを触媒する酵素である。本酵素は、ファージゲノム上に存在する *attP* 部位と、宿主細菌ゲノム上に存在する *attB* 部位間でのみ、部位特異的な DNA の組換え反応を触媒する。

4. 研究成果

TG1 インテグラーゼを用いて、大腸菌を対象に、放線菌由来フラビオリン生合成系 (RppA, MomA) のゲノム遺伝子導入を行った。Tn5 トランスポゾンによって、あらかじめゲノム上に TG1 インテグラーゼの組換え部位 (*attP* 部位) が導入された大腸菌株 5 種類 (*yabP::Tn5attP*, *ysgA::Tn5attP*, *fecA::Tn5attP*, *oxyR::Tn5attP*, *dinD::Tn5attP*) に対し、T5 プロモーター制御下のフラビオリン生合成系オペロンの導入を行った。大腸菌培養上清の吸光度を測定した結果、いずれのゲノム部位へ左右いずれ向きで生合成経路を導入しても、プラスミド DNA へフラビオリン生合成経路を導入した菌株と比較して、50%程度に生合成量が低下した(図2)。この結果は、生合成経路遺伝子のゲノム発現時では、プラスミド発現時と比較して、大量発現プロモーターの一つである T5 プロモーターを用いても、遺伝子発現量が大きく低下し、生合成量も大きく低下することを示唆

している。そのため、ゲノム遺伝子導入された生合成経路からの物質生産では、代謝酵素の発現量が少ない場合であっても、効率良く生合成反応を進行させられる仕組みが必要であると考えられた。

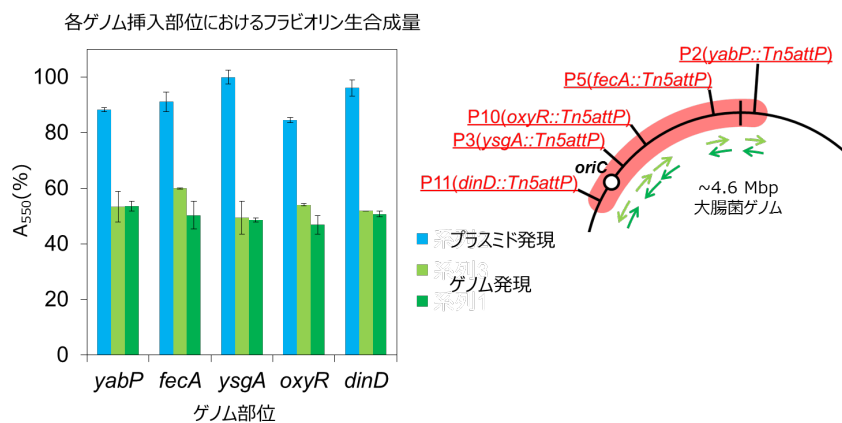


図 2. ゲノム遺伝子導入による生合成量の変化

代謝酵素の発現量が少ない条件であっても、効率良く生合成反応を進行させるため、植物バイオマス分解酵素複合体 (セルロソーム) の複合体形成機構 (骨格タンパク質・酵素間相互作用) を利用して、人工的な代謝酵素複合体 (人工メタポロン) の構築を行った。まず、短鎖の骨格タンパク質 (酵素 2 個結合) を用いて、フラビオリン生合成酵素 (RppA, MomA) の複合体化を行った。TG1

インテグラーゼの組換え部位 (*attP* 部位) が導入された大腸菌株 3 種類 (*yabP::Tn5attP*, *ysgA::Tn5attP*, *dinD::Tn5attP*) に対し、セルロソームの骨格結合ドメイン (ドックリンドメイン) を

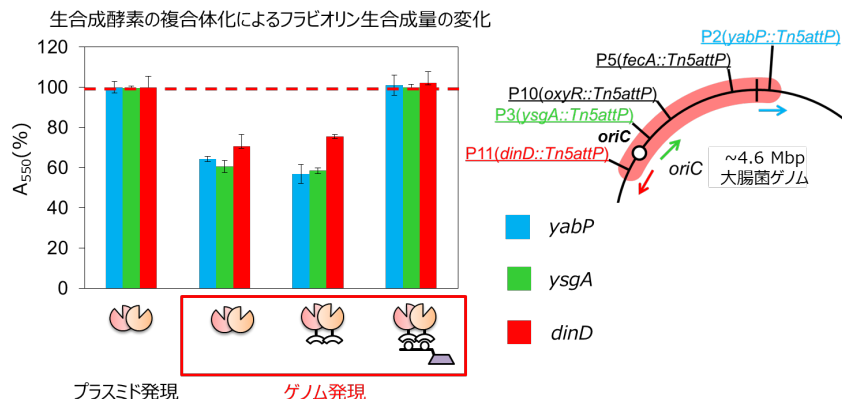


図 3. ゲノム遺伝子導入と酵素複合体化による生合成量の変化

付加した代謝酵素、並びに、セルロゾームの酵素結合ドメイン（コヘシンドメイン）が2個連なった短鎖骨格タンパク質（酵素2個結合）のゲノム遺伝子導入を行った。大腸菌培養上清の吸光度を測定した結果、いずれのゲノム部位に遺伝子導入しても、プラスミド DNA へ合成経路を導入した場合と比較して、上述の通り、50%程度まで生成量が低下した。また、フラビオリン生成酵素に対するセルロゾームの骨格結合ドメイン（ドックリンドメイン）の付加は、生成量に影響しないことが分かった。また、いずれのゲノム部位においても、更に、短鎖骨格タンパク質（酵素2個結合）をゲノム遺伝子導入した場合、プラスミド DNA へ合成経路を導入した場合と同等まで生成量が回復した（図3）。これらの結果から、いずれのゲノム部位へ遺伝子導入した場合でも、代謝酵素の複合体化によって、生成量が改善できることが示された。

次に、生成量をより詳細に検討するため、*ysgA* 部位にフラビオリン生成経路が導入された大腸菌株を対象に、生成量の変化を逆相 HPLC によって測定した。大腸菌培養上清の酢酸エチル抽出画分を逆相 HPLC によって解析した結果、プラスミド DNA へ合成遺伝子を導入した場合の生成量を 100%とした場合、生成遺伝子をゲノム DNA へ導入した際には 50%程度まで生成量が低下し、代謝酵素にドックリンドメインを付加した場合、40%程度まで生成量が低下した。しかし、短鎖骨格タンパク質（酵素2個結合）で代謝酵素を複合体化した場合、100%まで生成量が回復した。また、その際の生成酵素（RppA）の発現量を、ウエスタン・プロットングによって解析した結果、プラスミド DNA からの酵素発現量を 100%とした場合、ゲノム DNA からの酵素発現量は 20%程度まで低下し、代謝酵素にドックリンドメインを付加した場合、更に酵素発現量は低下した。また、短鎖骨格タンパク質（酵素2個結合）によって代謝酵素を複合体化した場合、若干酵素発現量は改善したものの、プラスミド発現時と比較して 20%程度の酵素発現量であった。これらの結果から、ゲノム発現時の代謝酵素を複合体化した場合、酵

素発現量は、プラスミド発現時と比較して大きく低下するが、生成量は、プラスミド発現時と同等まで改善できることが示された（図4）。よって、ゲノム発現時の酵素発現量が少ない場合（細胞内酵素濃度が薄い環境）であっても、人工的なメタボロン形成によって、効率良く生成反応を進行できることが示された。

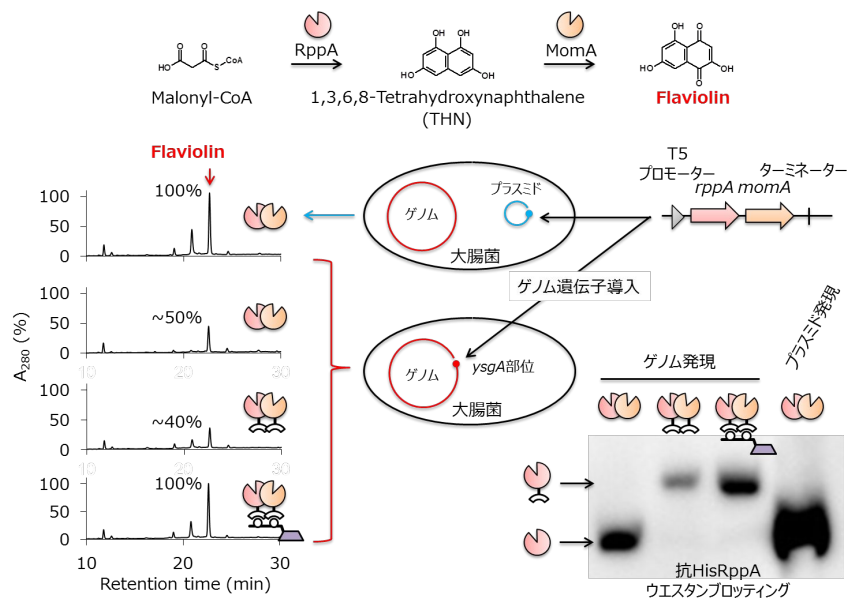


図4. ゲノム遺伝子導入と酵素複合体化による生成量と酵素発現量の変化

次に、酵素複合体化による生成量の改善効果の汎用性を検討するため、植物ポリケチドの一つであるウコンのクルクミン合成系（4CL, CUS）へ本手法を適用した場合の生成量を解析した。フラビオリン合成系に対して行った手法と同様の手法を検討した結果、プラスミ

ド DNA へ生合成経路を導入した際の生合成量を 100%とした場合、生合成経路をゲノム DNA へ導入すると 40%程度まで生合成量が低下し、代謝酵素にドックリンドメインを付加した場合、20%程度まで生合成量が低下した。しかし、短鎖骨格タンパク質（酵素 2 個結合）によって生合成酵素を複合体化した場合、30%程度までしか生合成量は回復しなかった。これらの結果から、他のポリケタイド生合成系においても酵素複合体化によって生合成量の改善は見られるものの、酵素複合体化による生合成量の改善効果は、生合成経路の種類によって大きく異なることが示唆された。

今後は、酵素複合体化による生合成量の更なる改善を目的として、よりサイズの大きな複合体の形成に向けて、コヘシンドメインが 9 個連なった長鎖骨格タンパク質（酵素 9 個結合）による複合体形成を試みる予定である。また、複合体化による生合成量の改善効果の汎用性を検討するため、ブドウのレスベラトロール（抗酸化作用）生合成系（4CL, STS）を対象に、複合体化を検討する予定である。既に、生合成遺伝子を導入した大腸菌によるレスベラトロールの生合成と、長鎖骨格タンパク質（酵素 9 個結合）の大腸菌への遺伝子導入を完了している。また今後は、ポリケタイド生合成系に限らず、バイオマスプラスチック原料の生合成経路など、更に多様な生合成経路に対して、本手法の汎用性を検討してゆく予定である。また、メタボロン形成効果をより詳細に解析するため、生合成反応の試験管内再構成を試みる予定である。既に、フラビオリン生合成系については、試験管内でのフラビオリン生合成を確認しているため、今後、より詳細なメタボロン形成効果と基質チャネリング効果の解析を行ってゆく予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Shinoda, S., Kurosaki, M., Kokuzawa, T., Hirano, K., Takano, H., Ueda, K., Haruki, M., and Hirano, N.
Comparative Biochemical Analysis of Cellulosomes Isolated from *Clostridium clariflavum* DSM 19732 and *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 Grown on Plant Biomass
Appl. Biochem. Biotechnol. (2019) 187, 994-1010. 査読有
DOI: 10.1007/s12010-018-2864-6
2. 平野 展孝
植物バイオマスからの有用物質生産に向けた取り組み
財界ふくしま (2019) 第48巻 第5号 119-125. 査読無
3. Hirano, K., Kurosaki, M., Nihei, S., Hasegawa, H., Shinoda, S., Haruki, M., and Hirano, N.
Enzymatic Diversity of the *Clostridium thermocellum* Cellulosome Is Crucial for the Degradation of Crystalline Cellulose and Plant Biomass.
Sci. Rep. (2016) 6, 35709. 査読有
DOI: 10.1038/srep35709

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 齋藤 翼, 高橋 美帆, 富田 溪介, 篠田 優, 平野 勝紹, 春木 満, 平野 展孝
好熱嫌気性細菌 *Clostridium thermocellum* 由来セルロソーム構成セルラーゼの結晶性セルロース分解に対する相乗効果

2019年度日本農芸化学会、2019年3月27日、東京農業大学

2. 吉越 健輔, 石澤 崇昭, 篠田 優, 平野 勝紹, 鮎 信学, 春木 満, 平野 展孝
大腸菌ゲノムに遺伝子導入された人工的な代謝酵素複合体によるクルクミンの生産
2018年度日本農芸化学会、2018年3月17日、名城大学
3. 吉越 健輔, 石澤 崇昭, 篠田 優, 平野 勝紹, 鮎 信学, 春木 満, 平野 展孝
人工的な代謝酵素複合体のゲノム遺伝子導入によるポリケチド化合物の微生物生産
2017年度日本農芸化学会、2017年3月19日、京都女子大学

〔その他〕

ホームページ等

1. 日本大学工学部生命応用化学科酵素学研究室
<http://ch.ce.nihon-u.ac.jp/~hirano/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：吉越 健輔

ローマ字氏名：(YOSHIKOSHI, kensuke)

所属研究機関名：日本大学

部局名：工学部

職名：博士研究員

研究者番号(8桁): 10792054