

平成 22 年 3 月 9 日現在

研究種目：若手研究（A）
 研究期間：2006～2008年度
 課題番号：18686066
 研究課題名（和文） 新規分子の効率的探索と選択生産のための進化分子工学
 研究課題名（英文） Directed evolution as a tool for the systematic creation of novel metabolites.

研究代表者

氏名（ローマ字）：梅野 太輔（Daisuke Umeno）
 所属機関・部局・職：千葉大学・大学院工学研究科・共生応用化学専攻・准教授
 研究者番号：00400812

研究成果の概要：

自然界が創り得る広大な化合物空間を、高速に、組織的に、そして効率よく探索する方法として、代謝「進化」工学を提案する。カロテノイド色素の基本骨格構造を合成する酵素類の進化学、そして下流酵素のコンビナトリアルな共発現により様々な新規化合物をシリーズ創出した。また、創りだした新規代謝経路を、副産物の少ない選択的な経路に鍛え上げるための進化学的手法、その他のテルペノイドの代謝進化学法も開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	10,300,000	3,090,000	13,390,000
2007年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2008年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
総計	19,400,000	5,820,000	25,220,000

研究分野：工学

科研費の分科：プロセス工学

細目：生物機能・バイオプロセス

キーワード：進化学、代謝工学、生合成、特異性、カロテノイド、テルペノイド

1. 研究開始当初の背景

自然界には膨大な化合物が存在するが、これらは、本来自然が作りうる化合物空間のごく一部にすぎない。ほとんど無限に近いこの空間を、高速、組織的、効率的に探索できれば、今まで手の届かなかった多くの生理（薬理）活性や分子機能を創出できる。本研究は、生物が探し漏らしてきた化合物空間を実験室内で効率よく探索する方法に関するものである。

最近提唱されたコンビナトリアル生合成では、さまざまな酵素遺伝子を組み合わせ、人工的に生合成経路を構築する。異なる代謝経路からとってきた酵素遺伝子を「非天然な組み合わせで」共発現させることにより、新規な化合物への生合成経路が

生まれ得る（図1の青領域）。

一方、自然界には存在しない新規な酵素活性を創出することによってのみ探索できる化合物空間も存在する（図1橙領域）。その領域の探索法として、代謝進化学なるものを提案する。代表者は、大腸菌に再現したカロテノイド生合成経路の実験室進化の研究を行い、単純な代謝系も、ごく僅かな遺伝的变化でその出力を大変化させること、その結果、他では決して創り得ない数多くの分子構造を沢山創り出せること、を世界に先駆けて示してきた（Umeno ら, *Microbiol Mol Biol Rev.*, 2005）。残る課題は、この2つの方法論を相補的に用いて、更に広大な化合物空間（図1黄領域）を探索すること、そしてそれぞれを、副産物なく選択的に生産すること、

であった。

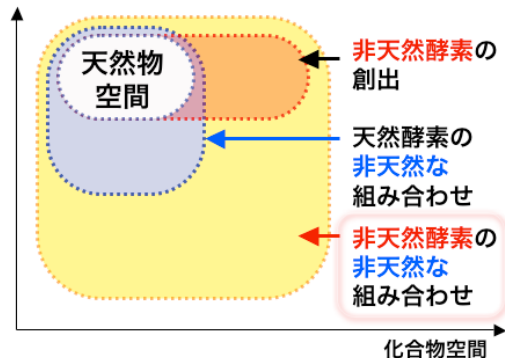


図 1. 代謝進化学で探す化合物空間。

2. 研究の目的

本研究の目的は、2つある。

ひとつは、天然色素カロテノイドの生合成経路をモデル経路に設定し、その組織的な実験室内進化を行い、未踏の化合物空間（図 1 黄領域）を探索する手法を確立することである。非天然なカロテノイドの細胞生産を実現してみせることにより、研究代表者が提唱してきた「代謝進化学」(Directed Pathway Evolution) の、化合物のシリーズ創成法としての有効性を実証することが、本研究の第一に目指すところである。

2つめは、上の手法で創出した数々の新規分子への生合成経路を、産業界において意味のあるかたちで供給できる技術に関わるものである。単純に言えば、新規化合物だけを、選択的につくる代謝経路を「進化」させる技術への挑戦である。実験室内で人為的に生み出された代謝経路も、そしておそらくは自然界で生まれた代謝経路も、その誕生の瞬間は、もともと創っていた化合物とともに、僅かな量の新規物質を与えるのみである。しかるに自然界には、しばしば完璧ともいえる反応選択性を示す代謝経路がみられる。この「代謝経路の選択性」はいかにして生まれ得のだろうか。この新規化合物の生産経路を、副産物なく効率の良いものに「進化」させる手法の模索が、本研究の第二の目標である。

本研究の方法論は、その他の物質生産系にも拡張できる。本研究の後半で述べるように、コレステロール経路に属するスクアレン合成酵素も、同じ原理で機能進化することに成功した。これは、ステロイド系トリテルペンのシリーズ合成に道を拓く成果である。また、その他のテルペノイド経路に対しても、代謝進化学を適用するための手法を開発した。生物生産できるイソプレノイド/テルペノイドの飛躍的な拡

張が、本研究の最終目標である。

3. 研究の方法

(1) カロテノイドの大腸菌生産：

カロテノイド生合成経路は、各種カロテノイド遺伝子を、常時発現プロモータ下に直列に配置した人工オペロンを作製 (pACYC/ pUC系プラスミドを使用)、大腸菌に形質転換することによって確立した。

(2) カロテノイド酵素の進化学：

オペロンを形成する遺伝子の一部を、変異 PCR によってライブラリ化し、さまざまな生合成経路のコンテキストにおいて機能スクリーニングした。それぞれの機能をスコア化するために、コロニ色の定量化 (Sigma Scan を用いた画像解析)、培養液からの抽出脂溶性成分の吸光スペクトル分析 (本課題予算で購入したプレートリーダーを使用) した。

(3) 進化型酵素の解析：

得た変異体の遺伝子型は、ダイデオキシ法による配列解析によって行った。変異体の細胞機能は、さまざまな人工オペロンのコンテキストにおける生産物 (脂溶性画分) 解析によって行なった。細胞が創る生成物の同定は、日本医科大学の高市真一博士のご指導のもと、HPLC-PDA/MS や TLC-MS によって行なった。

4. 研究成果

(1) 骨格合成酵素の機能進化

天然に存在する多種多様なカロテノイドは全て炭素数 30 (以下 C30) または C40 となる骨格をもつ。どちらの生合成経路においても、まず骨格合成酵素 (C30 では CrtM, C40 では CrtB) により骨格がつけられ、その骨格にさまざまな修飾 (不飽和化・酸化・環化など) が施され、700 を超える多様なカロテノイドが生み出されてゆく (図 2)。

自然界には、C30・C40 骨格をもつカロテノイドを共に生合成する生物は存在しない。これは、骨格合成酵素の高い特異性に由来する：CrtM は C30 骨格のみを、CrtB は C40 骨格のみを厳密に合成するからである (Umeno ら, *J Bacteriol.* 2002)。一方で、経路下流の修飾酵素は、C30・C40 骨格のどちらのカロテノイドに対しても作用できることが知られている (Lee ら, *Chem. Biol.*, 2003)。

上のことから、新たなカロテノイド骨格を合成することができれば、修飾酵素の多く作用し、多様な新規カロテノイドをシリーズ合成できると期待される。そこで我々は、まず、C30 骨格合成酵素 CrtM (黄色ブドウ球菌由来) の実験室内進化を行い、より大きなサイズの骨格を合成する変異体を探索した。

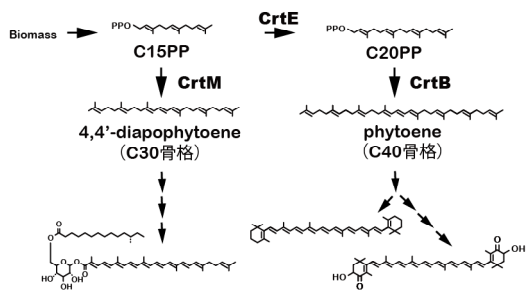


図 2. 2つの天然カロテノイド経路. 左は黄色ブドウ球菌のスタフィロザンチン (C30色素), 右は植物/海洋微生物にみられるβカロテン/アスタキサンチンの生合成経路

具体的には, 変異 PCR を用いて CrtM にランダム変異を導入し, CrtM ライブラリを作製した。これらを CrtE (C40 前駆体合成酵素) と CrtI (C40 不飽和化酵素) を発現する大腸菌に導入した。このとき, C40 合成能を有する CrtM 変異体を持つ宿主細胞は, 赤いコロニを与える。このスクリーニング法を用いて, 2つの異なるタイプのサイズ変異体を得た (図 3)。ひとつ (CrtM_{F26A}) は基質選択性のシフトタイプ: C40 合成能をもつが C30 合成能を殆ど示さない「C40 specialist」である。もうひとつ (CrtM_{W38A}) は, C30 と C40 合成のどちらも行うことのできる, 「C30 & C40 generalist」であった。

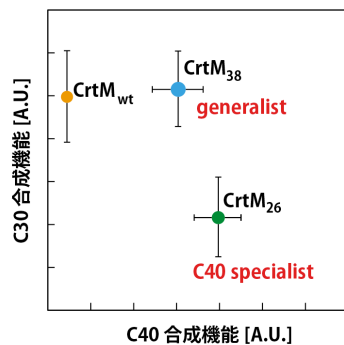


図 3. CrtM の野生型, およびサイズ変異体の C30 および C40 機能. C30 (元の機能) および C40 機能 (新規機能) を規格化し, それぞれ Y 軸および X 軸に対してプロットした。

(2) 下流酵素のコンビナトリアル発現による新規カロテノイドのシリーズ合成

CrtM のサイズ変異体を, C25PP を合成する酵素 (*Bacillus srtearothermophilus* 由来のファルネシル二リン酸合成酵素のサイズ変異体, FDS_{Y81A}) と大腸菌に共発現させると, C35 (C15 + C20), C45 (C20 + C25),

C50 (C25 + C25) などの, 自然界には存在しない骨格をもつフィトエン型カロテノイドの蓄積がみられた。個々の発現系の組織的な検討により, 主生成物として得られるカロテノイドの骨格サイズの分布は, カロテノイド合成酵素とイソプレノイド伸長酵素との相対的な活性比によって決まることが明らかとなった。こうして, ある程度ならば, 細胞のつくる C_x 骨格を発現チューニングのみによって創り分けられることが分った。

上で得た非天然骨格型フィトエン合成経路に, 自然界の C40 あるいは C30 経路に属する天然酵素を共発現させると, 多様な新規カロテノイドを与えた。たとえば, FDS_{Y81A}, CrtM₂₆ に CrtI と CrtY (環化酵素) の 2 つを加えると, イオノン環を有するβカロテン型の新規色素が蓄積された (図 4 右)。また, CrtY のかわりに CrtP (ケト化酵素) を加えると, 特徴的な紫色を呈する新規色素の蓄積がみられた (図 4 中央)。このことは, 経路下流に位置する酵素群の基質寛容性を示すものである。ひとたび新しい骨格をつくれれば, それをもとにした多くの化合物が, いわゆるコンビナトリアル合成の方法によって簡単にアクセスできることが分かる。

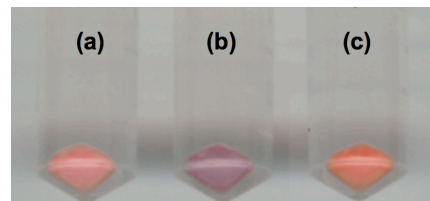


図 4. 非天然骨格を有するカロテノイドの機能化. C45/ C50 カロテノイドの合成経路を与えるプラスミドを導入した大腸菌に, 更に (a) CrtI, (b) CrtI, CrtP, (c) CrtI, CrtY, を追加発現させた細胞の遠心集菌物。

(3) 「非選択」機能のふるい落としによる特異性の進化

新規な化合物への生合成経路は, 生まれた当初は, その他多くの「非新規な」化合物との混合物として得られることが殆どである。代謝経路の進化における最大の山場は, じつは, その先にこそある。項目 (1) で得た CrtM₃₈ は, C30・40 のいずれの経路においても高い活性を示す「generalists」酵素であった。この CrtM₃₈ を C40 酵素として高速進化させ, C40 特異的な酵素にすることを試みた。

代謝経路の進化においては, 旧来の機能に対する負の選択がかかり, 反応性シフトが加速されるケースと, 旧来の機能への選択が消失し, 次第に退化してゆくケースとがある。本研究では, 二次代謝経路に多いであろう, 後者のシナリオに沿った選択性進化の手法開発を行った。

具体的には、CrtM38を親とした変異ライブラリを作製し、その中から、項目1の要領で、C40活性のあるコロニーを~50個ほど無作為に拾いプールし第1世代とした。これを親として更なる変異ライブラリを作製し、同様にC40合成機能に対する機能スクリーニングを行った(第2世代)。このように、C40機能は保持させつつ、C30機能に対しては何の選択も行わず、変異→選択を多世代にわたって繰り返し、その遺伝子型を発散させる実験を行った。

上の要領で高速に遺伝型を発散させながら、各世代ごとにCrtN(C30不飽和化酵素)を発現する大腸菌に導入した。ここで、C30合成能を有するCrtM変異体は、宿主細胞のコロニー色を黄色とするため、もとのC30機能が保持されているかどうかを観ることが出来る。興味深いことに、数世代のうちに、明らかにC40機能に特化した(C30機能を失った)変異体が複数得られた(図5: CrtM_{m1-m3})。本実験から、(1)選択圧下がないだけで、C30カロテノイドの合成機能は、遺伝的浮動の中で簡単に消失しうること、(2)このような現象を高速にプロデュースすることによっても、人工的に構築した代謝経路の特異化が実現し得ることが明らかとなった。

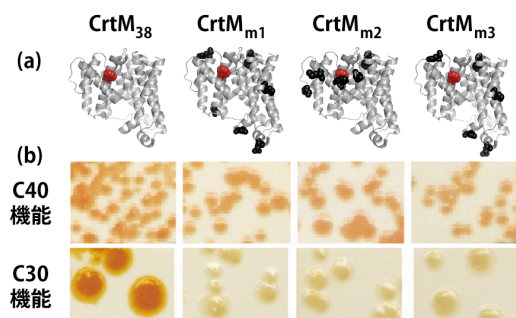


図5. CrtMをC40経路における多世代進化の過程で現れた、特異性変異体。(a) 赤色部は、C30/C40の両機能を両立させるW38A変異、黒いsphere表示の部分は、それぞれに見いだされた付加的な変異点を示す。(b) それぞれのCrtM変異体のC40およびC30機能。

(4) スクアレン合成酵素のサイズ特異性の実験室内進化

スクアレン合成酵素(SQS)はコレステロール経路の前駆体を合成する酵素であるが、カロテノイド合成酵素とは、ごく近縁の酵素である。SQSはC15PPに特異性が高く、C30骨格を持つスクアレン(SQ)のみを選択的に合成する。これが、天然のステロイド分子群の骨格構造を一義的に規定している。様々なサイズのSQを合成できれば、それらを元にした非天然ステロイドのシリーズ合成が可能となる。

ヒト由来のSQSが大腸菌内においてCrtMとして機能(DSQ合成)することを利用し、より大きな骨格サイズのSQを合成するSQS変異体を探索した。まず、SQSを変異PCRによってライブラリ化し、CrtEとCrtNを発現する大腸菌に導入した。この条件では、C35合成能を有するSQS変異体をもつ宿主のみが赤いコロニーを形成する(Umenoら, *J Bac.* 2003)。

このスクリーニング法を用いてC35骨格をもつSQを合成できる変異体を得た。これらの中には、C15+C20を選択的におこなうもの、基質特異性が大きく緩みC35、C40およびC45骨格をもつSQを合成できるSQS変異体とが存在した(図6)。

コレステロール経路においても、下流酵素の特異性の低さはよく知られる。本研究で得たSQS変異体を、種々の環化酵素/水酸化酵素などと共発現させることによって、膨大なコレステロール様の新規化合物を生物生産できると期待される。

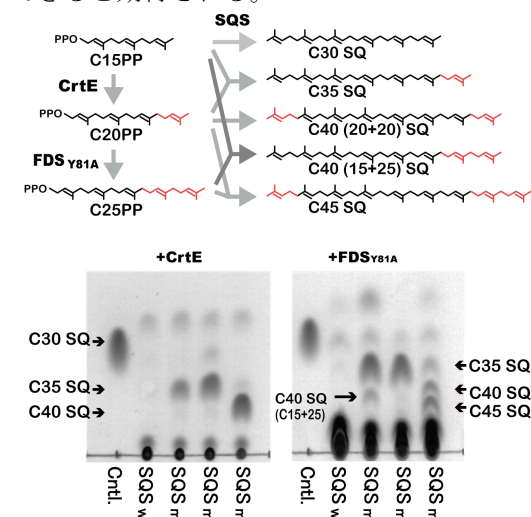


図6. スクアレン合成酵素のサイズ変異体

(5) スクアレン合成酵素の反応特異性の実験室内進化

前項で得られたSQS_{mut3}を親とした第2世代のライブラリを作製し、大骨格サイズのSQ合成活性が更に高い変異体(C40合成能を有する)を探索した。その結果、天然の酵素に匹敵するほど高いC40カロテノイド活性をもつSQS変異体を多数得ることができた。

これらの遺伝型や反応特異性を調べたところ、いずれも、サイズ特異性ではなく、SQ/DSQの反応特異性がシフトした変異体であることが明らかになった。これらの変異体の配列解析から、SQSの反応特異性に関わるアミノ酸部位(図5の青い部位)が多数特定された。これらは前項で特定した部位(図5の赤い部位)とは大きく離れており、SQ合成に必要なNADPH結合ドメインと予想されてき

た部位 (Lee ら, *J. Bacteriol.*, 2008) の周辺に集中していた。これらにみられる変異は、NADPH への結合能、あるいは NADPH の基質への受け渡しに何らかの支障を与えるものである。SQ 合成の完遂を困難としたため、第2段階が非還元的に進行し、DSQ 合成への「redirection」を導いた。

スクアレン合成酵素は、高脂血症の予防薬開発の最大の標的の一つとなっている。現在検討されている阻害剤は、他のイソプレノイド酵素にも作用するため、副作用が多い。本研究で見いだされた部位を標的とした創薬デザインは、SQ/DSQ の創り分けを後者に導くという、新しいメカニズムによる SQS 阻害剤の開発に道を拓くものと期待される。

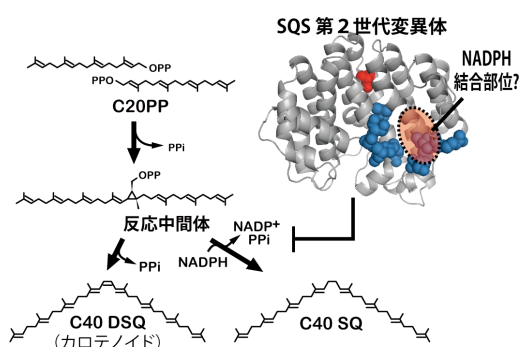


図 7. 反応特異性の進化.

(6) スクアレン合成酵素の阻害剤の新規なスクリーニング法の開発

高脂血症の予防薬としての SQS 阻害剤が盛んであるが、SQS 阻害剤の開発においてはその機能評価が最大のネックとなる。

我々は、前2項の研究で用いた手法が、SQS 阻害剤のハイスループットなスクリーニング法を与えることに気づいた；前項では、SQS が大腸菌内でカロテノイド (DSQ) を合成すること、その DSQ は CrtN の共発現によって、黄色い細胞色として読み出せることを利用してきた。SQS の活性を可視化できるなら、その阻害活性のスクリーニングは可能である。

これまで開発されてきた阻害剤の多くは、ピロリンサン部位のミミックを含むため、*in vitro* 試験でよいスコアを示すが、細胞通過性が低く実使用には課題があった。細胞内活性そのものの変化を見る本手法は、細胞膜透過性も加算したスコアを与えるため、選択的に SQS を阻害でき、かつ細胞への浸透性がよい薬剤の探索に適している。

(7) テルペン酵素の網羅的な探索法

自然界には7万を超えるテルペンが存在すると言われており、医薬品、香料、化粧品など様々な産業的価値が見出されている。テルペンには化学合成の難しいものが多く、生物生産系の確立への挑戦が続いている。しかし、テルペンの殆どが無色透明であり、その反応活性は、カロテノイド酵素のように色スクリーニングすることができない。このことが、テルペン酵素の発見も、そしてその酵素工学を、大きく制限してきた。

この状況を打破するために、我々は、テルペン酵素を組織的に探索する新たな手法を確立した。着目する点は、どの構造を与えるにせよ、テルペン酵素は全て同じ、そしてカロテノイドと共通する前駆体を消費する点である：ひとつの細胞内に、カロテノイド合成経路とともに、テルペン酵素遺伝子（あるいはその候補となるもの）を共発現させるとき、テルペン酵素が活性をもち、カロテノイド合成経路から前駆体を奪うため、その細胞あたりの色素量が減少する。これは大腸菌コロニーの色が減退することで判別可能である (図 8)。

いままでに、ゲラニオール合成酵素 (GES)、スクアレン合成酵素 (SQS)、ファルネシルリン酸合成酵素の変異体 (FDS_{Y81A})、これら既知のテルペン酵素を用いて色素蓄積量の顕著な減少、そしてそれに伴う細胞色の減退を確認済みである。本手法は、生成物ではなく前駆体の消費を見るため、未知 / 既知を問わずあらゆるテルペン酵素を分け隔てなく探索可能であることが分かった。更に、それぞれのテルペン酵素の細胞活性が強いほど、その色変化は大きい。これを利用したテルペン酵素の細胞活性の進化工学も可能となる。大腸菌や酵母などを用いたテルペンの生物生産は、まだまだ端緒についたばかりの困難な課題であるが、本研究の成果は、その克服に向けた重要な一歩を与えるものである。

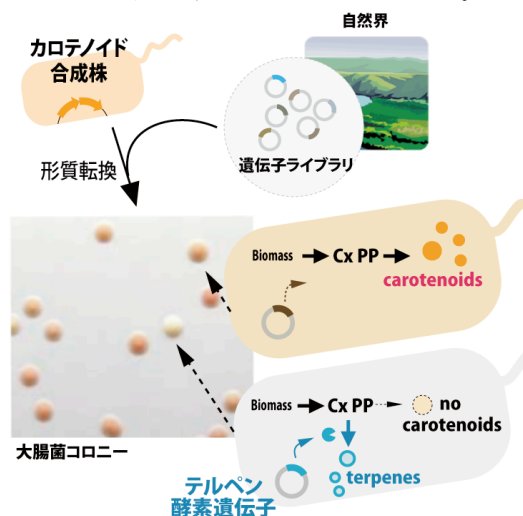


図 8. テルペン合成酵素の高速探索法.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 20 件)

1. 梅野太輔, 生合成経路の「進化能」を探る, 生命化学研究レター (2009) 査読無し
2. Umeno, D., Tashiro, Y., Furubayashi, M., Device Genetics for Programmed Cell Death., *J. Japan Soc Extremophiles*, **7**, (2008) 31-35. 査読無し
3. Suzuki, T., Suzuki, K., Tashiro, Y., Saito, K., Umeno, D., Probing the mutation spectrum in *E. coli*., *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **51**, 289-290 (2008) 査読無し
4. 梅野太輔, 細胞ロボットをつくる, 高分子, **56**, 840 (2008) 査読無し
5. 梅野太輔, 細胞ロボットの製作に挑む -合成生物学のフロントライン-, 現代化学, **433**, 56-63 (2007) 査読無し
6. Iwanade, A., Umeno, D., Saito, K., Sugo, T., Protein binding characteristics of amphoteric polymer brushed grafted onto porous hollow-fiber membrane, *J. Ion Exchange*, **18**, 492-497 (2007). 査読有り
7. Tashiro, Y., Furubayashi, M., Morijiri, T., Suzuki, K., Yasuno, K., Matsuno, S., Katabami, A., Saito, K., Umeno, D., *Escherichia coli* robots that freeze, smell, swell, and time-keep. *Synthetic Biology, IET.*, **1**, 41-43 (2007) 査読有り

など.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. ○方波見彰仁, 高市真一, 古林真衣子, 斎藤恭一, 梅野太輔. ヒトスクアレン合成酵素の実験室内進化と非天然スクアレン合成, 日本農芸化学会 2009 年度大会 (東京大学駒場キャンパス), 2009 年 3 月 29 日
2. ○古林真衣子, 斎藤恭一, 梅野太輔. カロテノイド合成酵素の遺伝型発散と特異性進化, 日本農芸化学会 2009 年度大会 (東京大学駒場キャンパス), 2009 年 3 月 28 日
3. ○生悦住菜友, 古林真衣子, 方波見彰仁, 斎藤恭一, 梅野太輔, Screening for Terpenoid Synthase Activity Based on Substrate Consumption, 第 32 回日本分子生物学会 (パシフィコ横浜), 2009 年 12 月 9 日

4. ○古林真衣子, 方波見彰仁, 中谷洋介, 生悦住菜友, 斎藤恭一, 梅野太輔, カロテノイド合成酵素のサイズ選択性進化, BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会), (神戸ポートアイランド) 2008 年 12 月 12 日
5. ○Katabami, A., Nakatani, Y., Furubayashi, M., Ikezumi, M., Saito, K., Umeno, D., Carotenoid Production of Squalene Synthases, The 15th International Symposium on Carotenoids, (ホテルムーンビーチ・沖縄) 2008 年 6 月 26 日
6. ○方波見彰仁, 中谷洋介, 金澤弘貴, 斎藤恭一, 梅野太輔, スクアレン合成酵素による非天然カロテノイド生産, 日本化学会 第 88 春季年会 (立教大学池袋キャンパス) 2008 年 3 月 28 日
7. (招待講演) ○Umeno, D., Probing Evolvability of Biosynthetic Pathways, Synthetic Biology Meeting (Chalmer Center, Sweden) 2007 年 8 月 27 日

など.

〔図書〕(計 1 件)

1. 梅野太輔, 古林真衣子, 三沢典彦, カロテノイドの生合成, 『カロテノイドの科学と最新応用技術』, シーエムシー出版 (2009) pp.27-37

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: テルペン合成酵素遺伝子のスクリーニング方法
発明者: 梅野太輔, 生悦住菜友, 古林真衣子, 方波見彰仁, 斎藤恭一
権利者: 千葉大学
種類: 特許
番号: 特願 2009-264294
出願年月日: 平成 21 年 11 月 19 日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ:

<http://chem.tf.chiba-u.jp/acb03/umeno/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅野太輔 (UMENO DAISUKE)

千葉大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 00400812

(2) 研究協力者

高市真一 (TAKAICHI SHINICHI)

日本医科大学・准教授