

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22292

研究課題名（和文）代謝経路全体を区画化する合成生物学ツールの開発

研究課題名（英文）Development of a synthetic biology tool for compartmentalizing whole biosynthetic pathway

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、補酵素再生系を含む代謝経路全体を細胞内の微小空間内に区画化することにより、中間体の蓄積や細胞内在酵素による副産物の生成を抑制する合成生物学ツールの開発を目標とした。細胞小器官が存在しない原核生物における代謝経路全体の人工的な区画化を目標として、細菌微小区画への任意の酵素の内包を試みた。大腸菌における、微小区画の殻タンパク質と、その内包シグナルを付加した緑色蛍光タンパク質（GFP）の共発現を行い、蛍光顕微鏡観察により、細胞内共局在を示唆する蛍光焦点の形成を確認した。今後、微小区画の精製を行い、GFPの微小区画への内包を生化学的に確認する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

合成生物学分野では、有用物質生産を目的として、人工的に設計した代謝経路を微生物に導入する研究が盛んに行われているが、様々な理由により十分な合成量が得られない場合が多々ある。本課題では、細胞小器官が存在しない大腸菌において、代謝経路を区画化することにより、中間体の蓄積や細胞内在酵素による副産物の生成を抑制し、更に、補酵素再生経路を内包することで、微小空間内での生合成反応を持続可能にする合成生物学ツールの開発を目標とした。本課題によって、大腸菌細胞内における細菌微小区画とGFPの共局在を示唆する結果を得たため、大腸菌細胞内における有用物質生産経路の区画化に向けた技術基盤が得られたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop a synthetic biology tool that prevents the accumulation of intermediates and the formation of byproducts by compartmentalizing whole metabolic pathway, which involves the regeneration pathway of coenzymes, into an intracellular microcompartment. To compartmentalize whole metabolic pathway in prokaryotic cells without organelles, I tried to encapsulate desired enzymes into a bacterial microcompartment (BMC). Formation of fluorescent foci was observed in Escherichia coli cells co-expressing the BMC shell proteins and green fluorescent protein (GFP) fused to the encapsulation signal sequence using a fluorescent microscopy, suggesting intracellular co-localization. I'm planning to confirm the encapsulation of GFP into the BMC shell by the biochemical analysis of BMC shell isolated from recombinant E. coli cells co-expressing the BMC shell and GFP fused to the encapsulation signal sequence.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：合成生物学 生合成経路 有用物質生産

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の合成生物学分野では、有用物質生産を目的として、人工的に設計した代謝合成経路を微生物に導入する研究が盛んに行われている。しかし、細胞内に予め存在する内在代謝経路への反応中間体の流出や、細胞へ新たに導入した外来代謝経路による補酵素類の一方的な消費、外来代謝経路の反応中間体や生成物の毒性や不安定性などの理由により、十分な合成量が得られない場合が多々ある。上記問題点の克服は、有用物質生産を目的とした合成生物学分野における重要課題である。

2. 研究の目的

本研究課題では、細胞小器官を持たない原核細胞である大腸菌において、上記問題点を克服するため、人工的に設計された代謝経路を微生物へ導入する際に、補酵素再生系を含む代謝経路全体を細胞内において区画化する新たな合成生物学ツールの開発を目指した。微生物細胞内における代謝経路の区画化は、代謝酵素の発現量が少ない際の反応効率の改善に効果を発揮すると共に、他の内在代謝経路への反応中間体の流出を防ぐため、副産物の生成を抑制する。また、反応中間体に毒性物質や不安定物質を含む場合、それらの細胞内への拡散を防ぐため、細胞の生育を改善し目的産物の生合成量の改善に寄与する。更には、補酵素再生系を内包することで、外来代謝経路による補酵素類の一方的な消費による酸化還元バランスの破綻を回避する。尚、本研究課題では、大腸菌細胞内における副産物生成が課題となっている汎用化成品原料の生合成経路を区画化することで、副産物生成の抑制と合成量改善を最終目標とした研究を行った。

3. 研究の方法

細胞小器官が存在しない原核細胞である大腸菌における代謝経路の人工的な区画化を目標として、細菌微小区画 (Bacterial microcompartment (BMC)) (図1) の利用を検討した。BMCは、タンパク質から構成される直径約 100~400 nm の多面体構造 (主に正 20 面体構造) の中に、様々な代謝酵素を内包した巨大なタンパク質複合体である。BMC の多面体構造は、6 量体又は 3 量体の殻 (shell) タンパク質 (BMC-H 又は BMC-T) と、5 量体の頂点 (vertex) タンパク質 (BMC-P) から形成される。BMC は、多様な細菌ゲノム (約 20%) に存在することが知られており、細胞内で特定の代謝反応を区画化することにより、代謝酵素と反応中間体の局所的濃度を高めると共に、毒性や揮発性の反応中間体が細胞内に拡散することを防いでいる。BMC の基質や生成物は、濃度勾配によって shell タンパク質の中央孔を通過すると考えられているが、中央孔のサイズや電荷は shell タンパク質によって異なるため、BMC shell を通過する分子は、ある程度選別されていると予想される。BMC は、カルボキシソームとメタボロソームの 2 つのグループに大別され、藍藻のカルボキシソームは、炭酸脱水酵素と RuBisCO を内包し、CO₂ 固定を担う。メタボロソームは、様々な代謝酵素を内包しており、1,2-プロパンジオール利用 BMC (Pdu BMC) とエタノールアミン利用 BMC (Eut BMC) (図1) が最もよく研究されている。本研究では、BMC への任意の代謝経路の内包を目的として、*Salmonella enterica* 由来 Eut BMC を対象に、大腸菌細胞内における Eut BMC shell への緑色蛍光タンパク質 (GFP) の内包を試みた。また、BMC への任意の代謝経路の内包を目的として、補酵素 (NAD⁺, Coenzyme A) 再生経路の汎用性を拡張した基盤微小区画の構築と、副産物生成が課題となっている汎用化成品原料生合成経路の区画化を目指した。

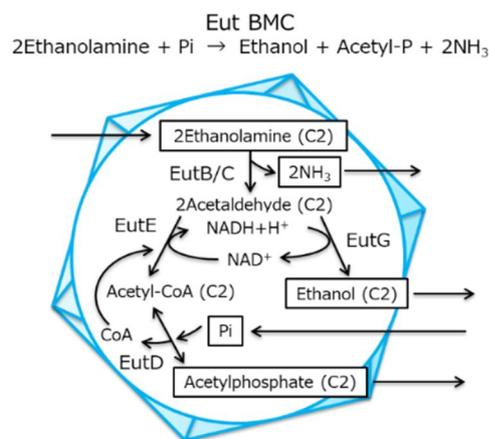


図1. エタノールアミン利用 BMC (Eut BMC)
四角の物質は BMC shell を透過する。

4. 研究成果

S. enterica 由来 Eut BMC shell タンパク質 5 種類 (EutS, EutM, EutN, EutL, EutK) の遺伝子オペロンを pQE ベクターにクローニングし、Eut BMC shell 発現プラスミドを構築した。また、Eut shell タンパク質 EutS (BMC-H) 内壁に結合する Eut BMC shell 内包配列 (エタノールアミンアンモニアリアーゼ EutC の N 末 19 残基) を融合した GFP (EutC¹⁻¹⁹GFP) 遺伝子を pMOD ベクターにクローニングし、EutC¹⁻¹⁹GFP 発現プラスミドを構築した。これらのプラスミドを大腸菌 EC100D *pir*⁺ 株へ導入し、Eut BMC shell と EutC¹⁻¹⁹GFP を共発現させた (図 2a)。また、使用した pMOD ベクターは、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) の組換え部位 *attB* を有しているため、予め TG1 インテグラーゼの組換え部位 *attP* を Tn5 トランスポゾンを用いてゲノム DNA に導入した大腸菌 EC100 *ysgA::Tn5attPKm^r* 株へのゲノム遺伝子導入を行い、pQE ベクターにクローニングした Eut BMC shell と共発現させた (図 2b)。

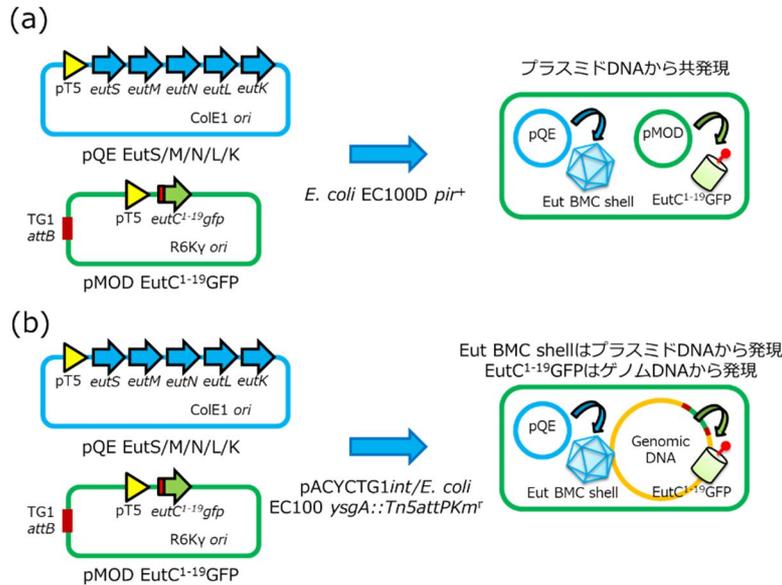


図 2. Eut BMC shell と Eut BMC 内包シグナル融合 GFP (EutC¹⁻¹⁹GFP) の共発現
 (a) プラスミド DNA から発現、(b) GFP をゲノム DNA から発現

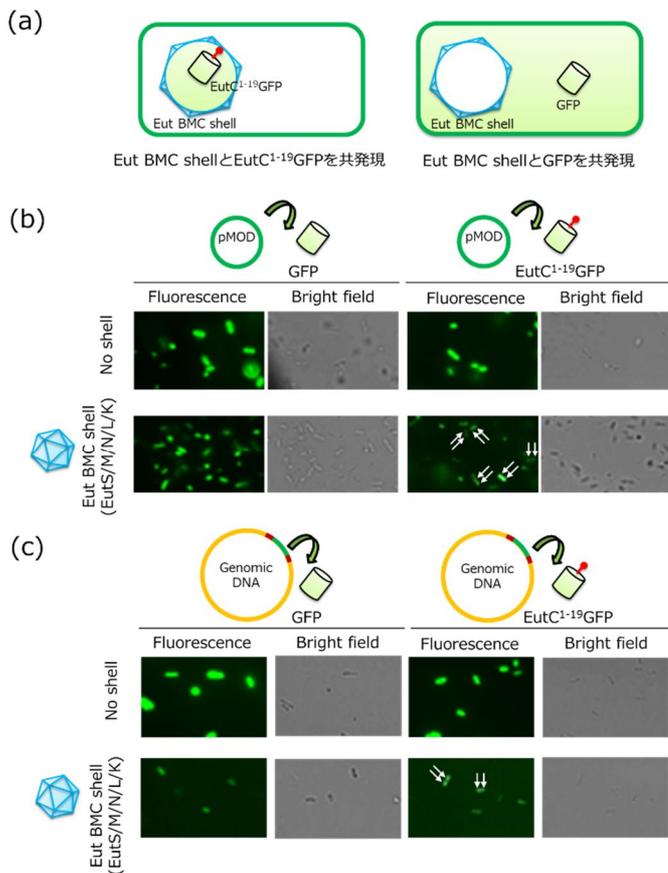


図 3. Eut BMC shell と Eut BMC 内包シグナル融合 GFP (EutC¹⁻¹⁹GFP) を共発現した大腸菌株の蛍光顕微鏡観察
 (a) 予想される結果、(b) プラスミド DNA から発現した場合、
 (c) GFP をゲノム DNA から発現した場合

蛍光顕微鏡で組換え大腸菌株を観察した場合、Eut BMC 内包シグナルを融合した GFP (EutC¹⁻¹⁹GFP) と Eut BMC shell を共発現した大腸菌株では、EutC¹⁻¹⁹GFP が Eut BMC shell に内包されるため、大腸菌細胞内に蛍光焦点が形成されると予想される (図 3a 左) 。一方、内包シグナルを持たない GFP と Eut BMC shell を共発現した場合、GFP は Eut BMC shell に内包されないため、蛍光焦点は形成されないと予想される (図 3a 右) 。

蛍光顕微鏡で組換え大腸菌株を観察した結果、Eut BMC shell 発現プラスミドと EutC¹⁻¹⁹GFP 発現プラスミドを導入した大腸菌株では、細胞内に蛍光焦点の形成 (白矢印: 1 細胞当たり 2 個) が確認された (図 3b 右下) 。一方、Eut BMC shell 発現プラスミドと GFP 発現プラスミドを導入した大腸菌株では、蛍光焦点の形成は確認されなかった (図 3b 左下) 。これらの結果は、Eut BMC shell と EutC¹⁻¹⁹GFP が、大腸菌細胞内で共同存在していることを示唆している。また、EutC¹⁻¹⁹GFP 発現プラスミドをゲノム遺伝子導入した場合でも、Eut BMC shell と共発現した場合、同様の蛍光焦点の形成 (白矢印: 1 細胞当たり 2 個) が確認された (図 3c 右下) 。ゲノム DNA はプラスミド

DNA よりも、長鎖の DNA を安定に保持可能なため、構成因子の多い長鎖 DNA から成る代謝経路遺伝子オペロンの導入に適していると考えられる。今後、組換え大腸菌株の細胞破砕液から遠心分画によって Eut BMC shell を精製し、GFP の内包を生化学的解析によって確認してゆく予定である。また現在、補酵素 (NAD⁺, Coenzyme A) 再生経路の汎用性を拡張した基盤微小区画を構成する酵素遺伝子 4 種類、及び、大腸菌細胞において副産物生成が課題となっている汎用化成品原料の生合成酵素 7 種類から成る遺伝子オペロンの構築を行っている。今後、補酵素再生経路の汎用性を拡張した基盤微小区画を構築し、汎用化成品原料生合成経路の区画化を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirano, K., Saito, T., Shinoda, S., Haruki, M., and Hirano, N.	4. 巻 366
2. 論文標題 In Vitro Assembly and Cellulolytic Activity of a Beta-Glucosidase-Integrated Cellulosome Complex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters.	6. 最初と最後の頁 fnz209
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/femsle/fnz209.	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Rui Sasaki, Yoshinobu Watarai, Sana Tamura, Kazuki Ishiyama, Tsutomu Kishi, Mitsuru Haruki, and Nobutaka Hirano
2. 発表標題 Encapsulation of GFP into a Bacterial Microcompartment in Escherichia coli Cells.
3. 学会等名 令和3年度化学系学協会東北大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤 翼, 篠田 優, 平野 勝紹, 春木 満, 平野 展孝
2. 発表標題 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の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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

	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
---------	---------