

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23663

研究課題名（和文）非対称オノセロイド生合成における特異性の進化デザイン

研究課題名（英文）Evolutionary design of specificity in asymmetric onoceroid biosynthesis

研究代表者

上田 大次郎（UEDA, DAIJIRO）

新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号：60843919

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：スクアレン消費型ハイスループット選抜系を最適化（ライゲーションにおけるベクターとインサートの比についての検討、形質転換において用いる大腸菌JM109株のコンピテントセルの作製方法の修正、形質転換におけるプラスミド量、SOC培地量、インキュベート時間）し、BmeTC変異体Y167A/D373Cにおいて適用できるようにした。スクリーニングを行った結果有用な天然物であるアンブレインを4～6倍生合成する変異体を3つ得られることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スクアレン消費型ハイスループット選抜系はBmeTC変異体において適用すると高い致死性を示してしまい、ライブラリーの構築が困難であった。様々な条件検討を行いBmeTC変異体における最適な条件を見出した。結果、希少天然物であるアンブレインの生産性が高い変異体が3つ得られた。本研究が成功すれば、将来、全ての有用物質の大量生産が化学合成から生物合成へ置き換わる日が近いものと考えられる。未来を創造する先駆的な研究に位置づけられることが期待される。

研究成果の概要（英文）：A squalene consuming high-throughput selection system was optimized and applied to the BmeTC mutant Y167A/D373C. After screening, we succeeded in obtaining three mutants that biosynthesize ambrein, a useful natural product, four to six times.

研究分野：生物有機化学

キーワード：生合成 テルペン オノセロイド

1. 研究開始当初の背景

生合成研究の飛躍的発展により、酵素を利用した効率的な物質生産が行われるようになってきている。一方で生物起源種が希少なため生合成研究が行えない課題もある。応募者は細菌由来の二機能性テルペン環化酵素 (BmeTC) を用い、希少天然物のアンブレイン (マッコウクジラの約 1% 個体しか生産しない腸管結石の主成分: 幻の香料である龍涎香) の酵素合成に成功した。一方、副生成物も生産される課題も残った (図 1A)。

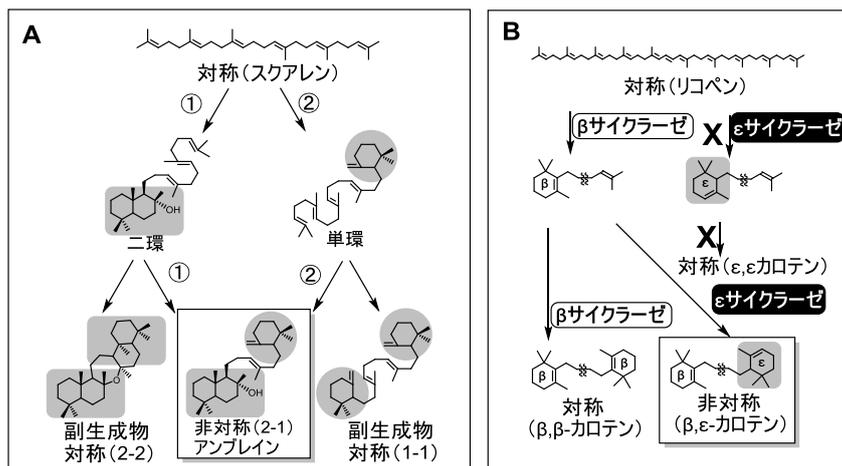


図 1 非対称性生合成例 (A: 応募者が開発した非天然型 B: 天然型)

対称構造を持つ基質に非対称性を与える生合成経路は、自然界にはしばしばみられる。たとえば植物のカロテノイド合成経路では、前駆体であるリコペン (二回対称構造) から、両端の環構造の異なる非対称化合物 (β/ε-カロテン) を生合成する (図 1B)。植物の多くは、ε, ε-カロテンを全く蓄積しない。この特異性は、一端が環化されたリコペンを基質として認識できないという ε サイクラゼの性質に依る (図 1B: *Plant Cell Physiol.* 2014, 55, 194)。一方、もう一端の環化を担う β サイクラゼは、両末端に作用できるため、対称な β,β-カロテンも合成してしまう (図 1B)。植物の場合は、β,ε-カロテンと β,β-カロテンの両方を必要とするため、上の機構で全く問題ないが、アンブレイン合成など、非対称型の生産物「のみ」を選択的に合成したい場合はどうであろうか。とくに、対称型基質 (この場合はスクアレン) にひとつの 2 役酵素が作用する場合において、両末端に異なる 2 つの環構造をもつ反応物だけを選択的に合成させるためには、どのような仕組みを酵素に作り込まねばならないだろうか。

2. 研究の目的

究極の目標は、単環・二環をコンテキストに応じて適切に賦与できるサイクラゼの創出である。スクアレン消費活性を可視化するスクリーニング技術を用いて、酵素としての構造・機能を保持する変異体を濃縮する。スクリーニング法 (図 2) の仕組みは以下のとおりである。

3. 研究の方法

カロテン合成株に PCR によりランダム変異を入れた進化型 BmeTC ライブラリーを形質転換し、白色のコロニーをピックアップし、何度も繰り返すことによりすべてのスクアレンを素早く消費するよう

な進化=酵素の安定性が高まった BmeTC の進化を行う。進化型 BmeTC ライブラリーを作成し、培養後抽出を行い、GC-MS による解析を行う。

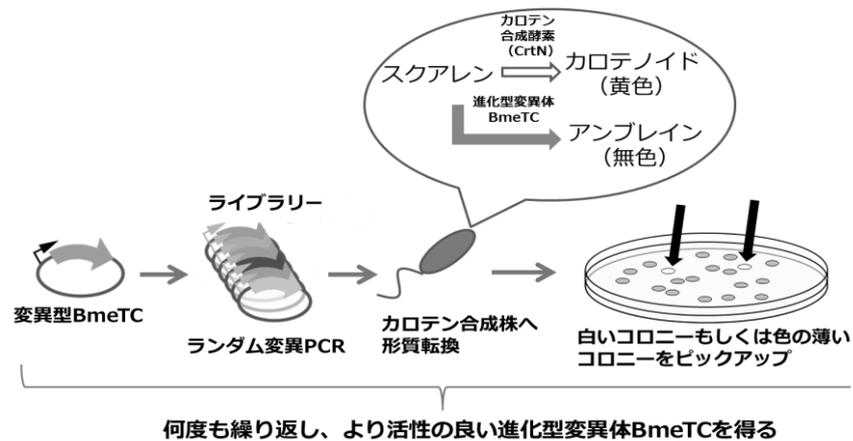


図2 進化型変異体 BmeTC のスクリーニング法

「単環型」(図1

①)「二環型」(図1②)「デュアル型」(図1①②) 変異体に分類し、その遺伝型などから、作り分けルールの抽出を試みる。並行して、スクアレンの消化能力の向上、つまり BmeTC の酵素の安定性も評価する。安定性の向上により、酵素の変異耐性を高められることは Tawfik らによって実証されている (JMB, 2013, 425, 2609)。安定性変異を適宜導入することによって、よりチャレンジングな変異を多数 BmeTC に導入できると期待される。また、本来活性の弱い BmeTC の活性向上により、酵素的に生産できるアンブレインの絶対量が増えるという効果も期待している。ここで得た変異体各種を親として、「アンブレインのみ」を生産する酵素変異体の創出に挑む。基質導入口付近に多数のランダム変異を導入し、このライブラリーの中から、活性を保持した変異体の濃縮・取得を実施する。得られたものを精製し、基質複合体を X 線結晶構造解析に供する。この知見を活かし、活性部位に変異をかけ、アンブレインに限らず多数のオノセロイド様物質を生合成できるようになると期待される。

4. 研究成果

初めに、BmeTC^{Y167A/D373C} にランダム変異を導入したライブラリーの作製に取り掛かった。理想とされるサイズ (10,000) に達するにはクローニング、形質転換の段階で致死性等の課題があり実験方法が未確立であった。

実験方法の最適化として、ライゲーションにおけるベクターとインサートの比についての検討、形質転換において用いる大腸菌 JM109 株のコンピテントセルの作製方法の修正、形質転換におけるプラスミド量、SOC 培地量、インキュベーション時間に関する最適条件の検討を行った。最適化した条件により、pJ211-BmeTC^{Y167A/D373C} のライブラリーを完成させることができた。

続いて、ライブラリーより選抜した変異体の中から活性比較の解析方法について検討した。変異体数が多いため、抽出の際に簡便な方法が求められる。最も簡便かつ *in vivo* で生成物の確認ができる方法を探索した。アセトン抽出は、集菌した菌体ペレットにアセトンを加えボルテックスをするという非常に簡便な方法であるが、BmeTC^{wild type} では二環化合物の僅かなピークが見られたが、BmeTC^{Y167A/D373C} 変異体において環化合物の検出は見られなかった。

BmeTC^{Y167A/D373C} において環化合物が見られなかった原因として、スクアレン取り込み活性が低いことが考えられた。そこで、プラスミドのタンパク質発現量を上げ反応をより引き起こす環境に仕立て上げることにした。そこで、非常に強度が高いプロモーターである T7 プロモーターを持つプラスミドである pET22b(+)ベクターを用いることとした。このベクターは IPTG 添加によって大腸菌 BL21(DE3)株が T7 RNA ポリメラーゼを発現させることで誘導が起こる。従って発現量は IPTG 濃度に依存するため、いくつかの濃度条件を設定し環化合物の検出を試みた。結果、IPTG 0.01 mM において環化合物のピークが検出された。

次にランダム変異を導入したライブラリーの中から活性の高い変異体を選抜するスクリーニング系の構築が必要とされた。ライブラリーのスクリーニングに先立ち、色素化の条件として、温度、IPTG 濃度を最適化した。結果、37 °C、IPTG 0.001 mM で最適な色素化が見られた。続いて、pET-BmeTC^{Y167A/D373C} ライブラリーを作製し、色の薄いコロニーが全体の 0.1~0.3 % で見られ選抜を行った。

変異体 1-3 は親とした Y167A/D373C に比べ、アンブレインの生成における活性の向上が見られた (変異体 1, 2 はおよそ 4 倍、変異体 3 はおよそ 6 倍)。また、基質であるスクアレンの消費、単環、2 環性プロダクトの生成の向上も見られた。変異体 2 は特にスクアレンの消費が大きくメインの生成物として単環が見られている。従って変異体 2 はスクアレン取り込みの活性

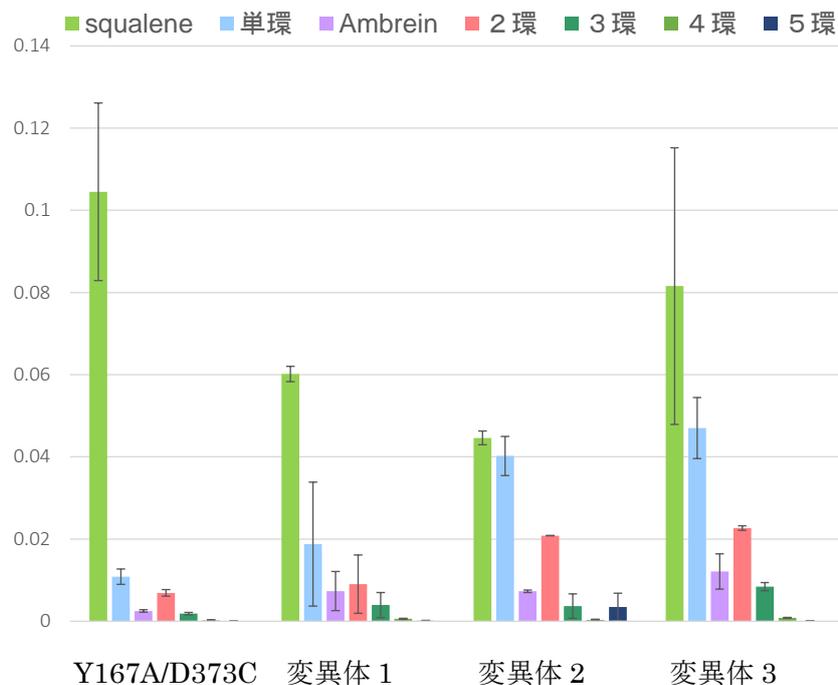


図3 Y167A/D373C を親とし選抜された変異体の生成物比較

は高く、2段階目の反応活性が低いことが示唆される。一方その他変異体は単環、2環の残存量が少なくなっており、これらの取り込みの活性が高いことが示唆される（図3）。

現在、これら変異体のシーケンス解析を行っており、変異箇所の解析を行っている。今後、さらにこの系を用いて酵素の安定性に優れた株の菌体抽出物と、スクアレン基質として酵素反応を行っていく。酵素反応生成物を GC-MS 解析することで非対称生合成酵素のスクリーニングを行う。さらに基質が酵素に結合した複合体の X 線結晶構造解析を行い、どのように基質を認識しているのかを明らかにし、「非対称生合成機構」を解明する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Daijiro Ueda, Kotone Okuno, Yota Yamabe, Mai Kawabe, Kanako Chikaoka, Yuka Sagae, Asuka Fujii and Tsutomu Sato
2. 発表標題 Enzymatic synthesis of major constituent of ambergris, ambrein
3. 学会等名 International Symposium-Workshop 2019 Scientific Studies of Marine Mammals in Asia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------