

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22360349

研究課題名(和文)メタゲノムスクリーニングと進化分子工学的手法の融合による有用生体触媒の創製

研究課題名(英文) Screening of ADH gene-specific amplicons from metagenome for enzyme molecular evolution and biocatalysis

研究代表者

伊藤 伸哉 (Itoh, Nobuya)

富山県立大学・工学部・教授

研究者番号：90213066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円、(間接経費) 4,410,000円

研究成果の概要(和文)：メタゲノムからADHの類縁酵素遺伝子(par/ladh)をPCR法にて増幅し、これらを発現ベクターにN-/C-末端近傍で融合する方法でライブラリー化する優れた手法を確立した。得られた遺伝子の解析結果から、PARでは30個、LSADHでは40個ほどの重複を除く酵素遺伝子が取得できた。PARについては、すべてホモログ(相同性が98%以上)であったが、その配列情報は進化分子工学による酵素の改変に活用できた。LSADHについては、ホモログのみならず、さまざまな新規酵素遺伝子を多数取得することができた。これらの酵素化学的な諸性質を解析し、当該ライブラリーが産業上、有用であることを証明した。

研究成果の概要(英文)：We have developed an efficient PCR-based amplification of diverse alcohol dehydrogenase (adh) genes from soil and compost metagenomes to aid in the synthesis of optically pure alcohols. Forty ladh-related genes (Hladh) and 30 par-homologous genes (Hpar), were obtained by screening of gene-specific amplicons from metagenome (S-GAM) from the metagenomic library. The amino acids sequences coded by the Hladh genes obtained by this approach were varied (8-99%). The recombinant enzymes obtained were characterized in detail. The results indicated that the enzymes are superior to the known ones to produce chiral alcohols. Thus S-GAM technique offers great biotechnological potential for biocatalysis and enzyme engineering.

研究分野：プロセス・化学工学

科研費の分科・細目：生物機能・バイオプロセス

キーワード：生体触媒 メタゲノム スクリーニング 光学活性アルコール アルコール脱水素酵素 進化分子工学

1. 研究開始当初の背景

化学品や機能性食品製造におけるバイオプロセス化技術は、ゲノム科学の応用により、新規で有用な酵素触媒やそれを保持する生物を効率的に開発できるようになり、従来のスクリーニングを中心にした手法に比べ費用、効率に優れた産業用バイオプロセスを開発できるようになっている。また新しいバイオプロセスを使うことで、従来の化学プロセスと比べて競争力、環境適合性においてより優れたプロセスの開発を期待することもできる。

我々は、これまで生体触媒を用いるケトン類の不斉還元反応に取り組み、優れたバイオ不斉還元触媒の開発に成功している。具体的には、異なる立体選択性を有するフェニルアセトアルデヒド還元酵素 (PAR) とその極性有機溶媒耐性変異酵素 (Sar268 や HAR1) ならびにアルコール脱水素酵素 (LSADH: *Leifosonia* sp. 由来 ADH) をそれぞれ高発現させた *E. coli* 菌体と安価な 2-プロパノール (IPA) を水素供与体として使用することにより、目的のケトンから 100% に近い収率で高濃度に R、S の両光学異性体アルコール (100-350g/L 以上、98-100% e.e.) を生産するバイオプロセスを開発し現在、企業の協力も得て、工業プロセスとしての実証研究を行っている。

よく知られているように、名古屋大学の野依教授 (現 理研) らにより BINAP を始めとする金属化学触媒 (不斉ルテニウム/ロジウム錯体触媒) を用いたテルペノイドやケトン類の不斉還元法が開発され、2001 年度のノーベル化学賞の受賞対象となった。しかし、最近では BINAP 触媒においても水素源として、より取り扱いが容易なギ酸や IPA を水素の代替とする方向で研究が行われており、IPA は現在考えられる最も簡便で安価な水素源といってもよい。本プロセス

は、こうした利点を有するとともに、1) 多くの場合、BINAP 系不斉金属触媒以上の光学純度を示す、2) 触媒の調製が容易で、ハンドリングにも優れている、3) ルテニウムやロジウムなどの貴金属を使用せず再生可能な触媒を利用している、4) 常温・常圧の反応であり省エネルギーかつ安全性が高い等、グリーンケミストリーの観点からは明らかに BINAP 系金属触媒よりも優れた特性を有している。こうした点から、開発したバイオ不斉還元法は、現在世界で最も優れたケトン類の不斉還元反応であると言える。

しかし、PAR/LSADH は、それぞれ 40 種類以上のケトンに作用する汎用性の高い酵素触媒であるが、これらが反応しない、もしくは活性が非常に低い化合物も存在する。同プロセスの実用性を一層高め、世界に冠たるプロセスにするためには、触媒酵素のライブラリー化や進化分子工学的な更なる改良が必要である。

そこで、メタゲノムから PAR/LSADH の類縁酵素遺伝子を取得し、その情報を新しい進化分子工学のアルゴリズムに適用し、汎用性の高い生体触媒の創製に役立たせようとするものである。

2. 研究の目的

本研究では、酵素遺伝子のメタゲノムからのライブラリー構築のための基盤技術の確立、進化分子工学のための新規アルゴリズムの開発、ライブラリーからの工業用還元酵素のスクリーニングの 3 点について研究を進め、有用な不斉還元生体触媒を創製しようとするものである。特に、メタゲノムから得られた有用酵素遺伝子の情報 (アミノ酸配列と酵素の基質特異性、立体選択性、安定性などの相関性) を進化分子工学のための情報源としてとらえ、手間と時間のかかる進化分子工学的手法を新規アルゴリズムを用いて効率化する点に重点を置き、生体触媒の研究開発

の手法として確立する。

3. 研究の方法

本研究では、上記目的のため、次の3点について研究する。

・**酵素遺伝子のライブラリー化のための基盤技術の確立**：土壤環境 DNA (メタゲノム) から PAR と LSADH の遺伝子を標的とした類似遺伝子群を単離しその解析を行う。幸いにして、これまでに両者の酵素遺伝子ライブラリーが出来ており、現在、鋭意その解析を行っているが、その数を増やし、また分離・発現の効率を向上させる。特に、効率的なターゲット遺伝子の取得と発現のハイスループット法を同時に開発する。既に、In-Fusion PCR クローニング法 (Marsischky and LaBaer, Genome Res., 14, 2020, 2004) が効率的発現に有効であることを見出している。

・**進化分子工学のための新規アルゴリズムの開発**：進化分子工学の手法は、目的とする酵素触媒の開発に非常に有効である。例えば、PAR については、水/2-プロパノール (IPA) 溶液中での活性の向上 (極性有機溶媒に対する耐性の向上) が生産性向上に著しく貢献した。しかし、進化分子工学では、ランダムな変異とスクリーニングという極めて手間のかかる作業を必要とする。そこで、今回の研究では、メタゲノム由来の還元酵素のライブラリー (各々のアミノ酸配列と活性や基質特異性との相関関係) を、米国 Fox らが開発した進化分子工学のアルゴリズム (Pro-SAR: Fox et al., Protein Engineering, 16, 589, 2003, Nature Biotechnol., 25, 338, 2007) を民間企業の協力を得て改良して適応することにより、非常に効率的な進化分子工学のプログラムを開発する。

・**ライブラリーからの工業用還元酵素の創製**：得られたライブラリーと進化分子工学のプログラムを PAR/LSADH を用いたバイオ不斉還元プロセスに応用し、各種工業用不斉還元酵素をスクリーニングし、より汎用性の高い不斉還元プロセスを開発する。

4. 研究成果

・酵素遺伝子のライブラリー化のための基盤技術の確立

土壤環境 DNA (メタゲノム) から PAR と LSADH の遺伝子を標的とした類似遺伝子群を直接的に PCR 法にて増幅し、これらを *par* または *lsadh* を発現するプラスミドベクターに、In-Fusion PCR クローニング法により N-および C-末端近傍で融合する方法で単離し、ライブラリー化するための基盤技術を確立した。当該法を、screening of gene-specific amplicons from metagenome (S-GAM) 法と呼ぶことにした。得られた遺伝子の解析結果から、PAR では 30 個、LSADH では 40 個以上の重複を除く関連酵素遺伝子が取得できた。また、LSADH については、メタゲノムを一般土壤から発酵中の堆肥に変更することにより、ホモログ (相同性が 98% 以上) のみならず、さまざまな新規酵素遺伝子 (相同性が 73-75%, 50-63%, 36-44%, 17% 以下) を多数取得することができた (*Hladh* と命名)。従って、S-GAM 法はホモログ遺伝子のみならず、上手くプライマーやメタゲノムの種類を選択することにより、簡単に多様な新規酵素遺伝子を単離できる手法であることが判明した。その後、今回の基盤研究の範囲から外れるが、他の酵素遺伝子でもほぼ同様の結果が得られることが判明している。これにより、効率的なターゲット遺伝子の取得と発現の手法が開発できたと言える (図 1)。

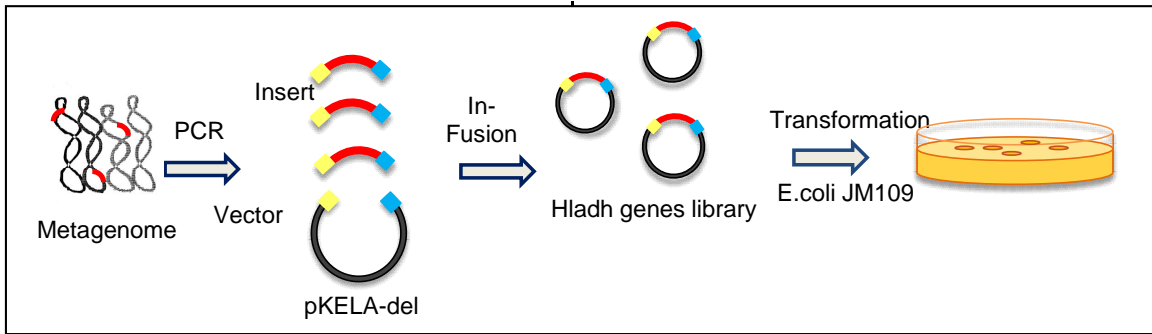


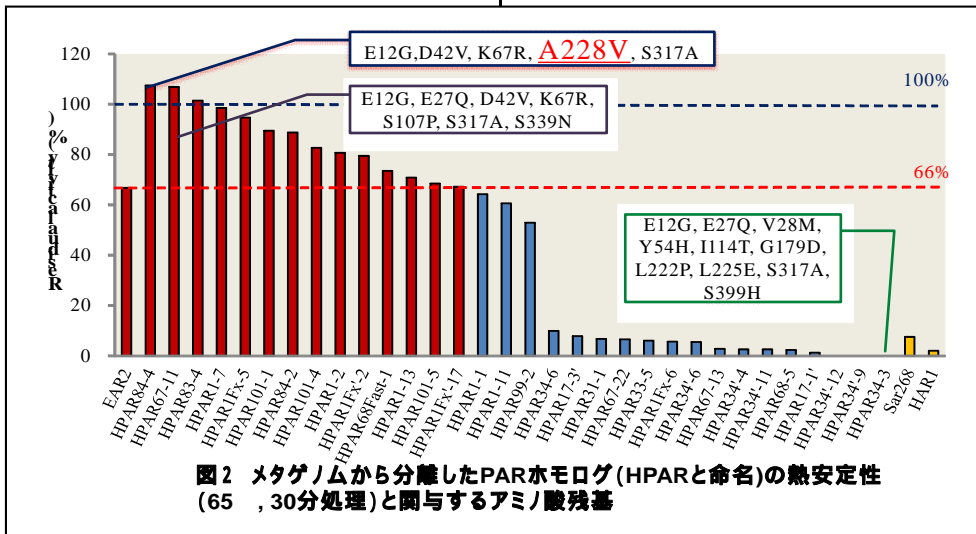
図 1 S-GAM 法の概略

また、別途 *Pseudomonas* 細菌由来の ADH ホモログ酵素もメタゲノムより取得し、約 30 種の酵素(HPADH/HBADH と命名)の評価を行い、不斉還元用の酵素ライブラリーに付け加えた。PAR においても同様の実験を行い、約 30 種の PAR のホモログ遺伝子(*hpar* と命名)の単離・解析に成功した。その配列情報を利用した進化分子工学の手法については事項で報告する。

・進化分子工学のための新規アルゴリズムの開発

PAR 酵素については、LSADH のように新規酵素遺伝子は得ることができなかったが、取得した約 30 種のホモログ(HAPR)のアミノ酸配列情報と各酵素の性質について、詳細に検討を加えた結果、興味深いデータが得られた。例えば、図 2 に示した酵素の一連の熱安定性データから、酵素タンパク質の熱安定性に関

与するアミノ酸部位をほぼ特定することが出来た。また、こうした部位を他の酵素に導入することにより、明らかに熱安定性が向上した。また、PAR では、ある種のアルデヒドの不斉還元では、十分な立体選択性が得られないが、これらのホモログ酵素のスクリーニングにより優れた立体選択性を有する酵素を確認できた。従って、活性を有するホモログ酵素のセットは、通常のスクリーニングにも使用できること、更にそのアミノ酸配列情報が進化分子工学の情報として有用であることが判明した。しかしながら、異なるアミノ酸配列を有するホモログ数が必ずしも十分でないことから、当初予定したアミノ酸配列と活性や基質特異性との相関関係を、進化分子工学のアルゴリズムにまで拡張・発展するまでには至らなかった。



・ライブラリーからの工業用還元酵素の創製

LSADH 配列を基にメタゲノムから分離した HLADH 酵素、PAR 配列を基に分離した HPAR 酵素、*Pseudomonas* 細菌の ADH 配列を基にした分離した HPADH/HBADH に約 100 酵素について、酵素化学的な性質の解析を行った。この中で、HLADH 酵素と HPADH/HBADH 酵素 70 種は、anti-Prelog 型の立体選択性を示し、HPAR 酵素は、Prelog 型の立体選択性を示した。比較的珍しい anti-Prelog 型の立体選択性を示す ADH のライブラリーをメタゲノムから多数取得できた。酵素化学的な検討の結果、この中には顕著な有機溶媒耐性を示す酵素、基質特異性が明らかに LSADH と異なり優位に anti-Prelog 型のキラルアルコールを合成できる HLADH 酵素、また前述したように、HPAR 酵素では、ある種のアルデヒドの立体選択的還元反応において、優れた選択性を示す酵素が取得できた。こうした、事実は当該ライブラリーがキラルアルコール生産用酵素触媒の探索に極めて有用であることを示している。

本研究では、産業上有用な各種 ADH を標的酵素遺伝子として、PCR によりメタゲノムから効率的に ADH ライブラリーを作成する手法、またライブラリー遺伝子の発現と簡便なスクリーニング手法を開発した。また、これら遺伝子群の有する機能とアミノ酸配列の相関データが進化分子工学の配列情報として十分に活用できることを証明した。

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10件)

1. H. Asako, M. Shimizu, Y. Makino, N. Itoh, Biocatalytic reduction system for the production of chiral methyl (R)/(S)-4-bromo-3-hydroxybutyrate. *Tetrahedron Lett.* 51:2664-2666 (2010).
2. J. Kurokawa, M. Asano, S. Nomoto, Y. Makino, N. Itoh, Gene cloning and characterization of dihydrolipoamide

dehydrogenase from *Microbacterium luteolum*: A useful enzymatic regeneration system of NAD⁺ from NADH. *J. Biosci. Bioeng.*, 109:218-223 (2010).

3. N. Itoh, K. Isotani, M. Nakamura, K. Inoue, Y. Isogai, Y. Makino, Efficient synthesis of optically pure alcohols by asymmetric hydrogen-transfer biocatalysis: application of engineered enzymes in a 2-propanol-water medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93:1075-1085 (2012).

4. 伊藤 伸哉, メタゲノムスクリーニングと進化分子工学的手法の融合による有用生体触媒の創製, *日本応用酵素協会誌* 46:31-40 (2012).

5. K. Isotani, J. Kurokawa, N. Itoh, Production of (R)-3-quinuclidinol by *E. coli* biocatalysts possessing NADH-dependent 3-quinuclidinone reductase (QNR or bacC) from *Microbacterium luteolum* and *Leifsonia* alcohol dehydrogenase (LSADH). *Int. J. Mol. Sci.*, 13:13542-13553 (2012).

6. H. Toda, R. Imae, N. Itoh, Efficient biocatalysis for the production of enantiopure (S)-epoxides using styrene monooxygenase(SMO) and *Leifsonia* alcohol dehydrogenase (LSADH) system. *Tetrahedron: Asymmetry*, 23:1542-1549 (2012).

7. K. Isotani, J. Kurokawa, S. Nomoto, T. Negishi, M. Matsuda, N. Itoh, Gene cloning and characterization of two NADH-dependent 3-quinuclidinone reductases from *Microbacterium luteolum* JCM 9174, *Appl. Environ. Microbiol.*, 79:1387-1384 (2013).

8. N. Itoh, Use of anti-Prelog stereospecific alcohol dehydrogenase from *Leifsonia* and *Pseudomonas* for producing chiral alcohols. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:3889-3904 (2014).

9. N. Itoh, K. Isotani, Y. Makino, M. Kato, K. Kitayama, T. Ishimota. PCR-based amplification and heterologous expression of *Pseudomonas* alcohol dehydrogenase genes from the soil metagenome for biocatalysis. *Enzyme Microb. Technol.*, 55:140-150 (2014).

10. Y. Makino, N. Itoh. Development of an improved phenylacetaldehyde reductase mutant by an efficient selection procedure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 4437-4443 (2014).

[学会発表](計16件)

1. N. Itoh, Y. Makino, Development of an efficient method for producing optically pure alcohols using an asymmetric hydrogen-transfer biocatalysis.

Pacificchem2010, 2010.12 (Hawaii, USA).

2. N. Itoh, Development of novel biocatalysts for producing chiral compounds. Seminar on Green Sustainable Chemistry in Tottori, 2012.12 (Tottori, Japan)
3. 磯谷健太郎, 黒川純司, 竹内奈美, 牧野祥嗣, 伊藤伸哉, フェニルアセトアルデヒド還元酵素 (PAR) 相同遺伝子のメタゲノムスクリーニングとその解析, 第16回生体触媒化学シンポジウム, 2012.11 (富山).
4. 狩谷理美, 黒川純司, 伊藤伸哉, Lesifonia sp. S749由来アルコール脱水素酵素 (LSADH) のメタゲノムスクリーニングと解析, 2013年度日本農芸化学会大会, 2013.3 (仙台)
5. 磯谷健太郎, 石母田剛, 加藤真輝, 黒川純司, 牧野祥嗣, 伊藤伸哉, メタゲノムを用いた酸化還元酵素遺伝子の探索とその応用, 2013年度日本農芸化学会大会, 2013.3 (仙台)
6. N. Itoh, Efficient synthesis of optically pure (S)-epoxides using Rhodococcus styrene monooxygenase (SMO) and Leifsonina alcohol dehydrogenase (LSDH) system. Enzyme Engineering XXII, 2013.9 (Toyama, Japan).
7. 伊藤伸哉, メタゲノムスクリーニングと進化分子工学による有用生体触媒の創製, 応用酵素協会成果発表会, 2013.11 (大阪)
8. 磯谷健太郎・黒川純司・竹内奈美・牧野祥嗣, 伊藤伸哉, メタゲノム由来フェニルアセトアルデヒド還元酵素 (PAR) 相同遺伝子の配列情報と酵素の改変, 第 65 回日本生物工学会大会, 2013.9 (広島)
9. 狩谷理美, 黒川純司, 伊藤伸哉, メタゲノムスクリーニングによる新規短鎖アルコール脱水素酵素遺伝子の取得とその解析, 第 17 回生体触媒化学シンポジウム, 2013.12 (岡山)
10. 風間美輝, 磯谷健太郎, 黒川純司, 竹内奈美, 牧野祥嗣, 伊藤伸哉, メタゲノム由来フェニルアセトアルデヒド還元酵素 (PAR) 相同遺伝子の配列情報と酵素機能の改変, 第 17 回生体触媒化学シンポジウム, 2013.12 (岡山)
11. 黒川純司, 狩谷理美, 磯谷健太郎, 伊藤伸哉, PCR 法により取得したメタゲノム由来新規単鎖アルコール脱水素酵素遺伝子とその翻訳産物の諸性質, 2014 年度日本農芸化学会大会, 2014.3 (東京)

その他省略

〔図書〕(計4件)

1. 伊藤伸哉, エコバイオリファイナリー, 酸化還元反応を利用する有用物質生産, シーエムシー出版, 193-202 (2010).
2. N. Itoh, Y. Makino, Protein engineering: development of novel enzymes for the improved reduction of C=O double

bonds. In: E. Brenna (ed) Synthetic methods for biologically active molecules. Wiley-VCH, pp 139-185 (2013).

3. 伊藤伸哉, 進化分子工学的手法による極性有機溶媒耐性 PAR の創製と生産性の向上 伏見讓 監修 進化分子工学、NTS 出版、pp.307-317. (2013).

4. 戸田弘, 伊藤伸哉, 進化分子工学を利用した光学活性エポキシ化合物生産プロセスの開発 伏見讓 監修 進化分子工学、NTS 出版、pp.297-305 (2013).

〔産業財産権〕
出願状況 (計 2 件)

名称: 変異型還元酵素及びその利用
発明者: 伊藤伸哉, 朝子弘之
権利者: 富山県, 住友化学
種類: 特願
番号: 2012-039796
出願年月日: 2012年2月
国内外の別: 国内

名称: 還元酵素遺伝子増幅用プライマーセット、および還元酵素遺伝子取得方法
発明者: 伊藤伸哉, 黒川純司, 朝子弘之
権利者: 富山県, 住友化学
種類: 特願
番号: 2013-040378
出願年月日: 2013年3月
国内外の別: 国内

取得状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.pu-toyama.ac.jp/BR/itoh/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
伊藤伸哉 (富山県立大学 工学部 教授)
研究者番号: 90213066

(2) 研究分担者
牧野祥嗣 (富山県立大学 工学部 講師)
研究者番号: 20347355

(3) 連携研究者
() 研究者番号: