様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 月 ２０ 日現在

機関番号：１２５０１
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2015～2017
課題番号：１５Ｈ０４１８９

研究課題名（和文）スクアレンを出発材料とする生合成経路の再構築とその実験室内進化

研究課題名（英文）Directed evolution of squalene-converting biosynthetic pathways

研究代表者
梅野　太輔（Umeno, Daisuke）

千葉大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：００４００８１２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　13,700,000円

研究成果の概要（和文）：30,000を超えると云われるトリテルペン類の全てが，スクアレンを原料として生合成される．これらの骨格形成に関わる未知の遺伝子探索と機能改良のため，不可視であった細胞内のスクアレンの消費活性を色スクリーニングする手法を開発した．この手法を用いて得たスクアレン環化酵素の活性変異体を用いた人工経路を構成し，自然界には見つかっていない種々の非天然トリテルペン合成経路を確立することに成功した．

研究成果の概要（英文）：All of the > 30,000 trierpenoinds are synthesized via squalene. To start accessing those structurally and functionally diverse compounds, we have developed a novel screening system to visualize squalene consumption. By using this as a screening principle, we have identified activity mutants of squalene cyclizing enzymes, enabling efficient microbial synthesis of cyclic triterpenoids. By combining these mutant enzymes with pathways for squalene-like molecules, we succeeded in establishing pathways toward numbers of novel compounds that have not been previously reported.

研究分野：進化合成生物学

キーワード：合成生物学　進化分子工学　スクリーニング　トリテルペン　オキシドスクアレン　環化酵素

１．研究開始当初の背景

(1) トリテルペンの価値
スクアレンは C_{30} の直鎖状炭化水素である．自身，化粧品原料や食油，燃料として注目されるが，そのスクアレンを前駆体として生合成される「トリテルペン」類の中には，産業価値の高い化合物が数多く存在する．しかし，これらの生合成経路の解明は今なお，非常に限定的である．幾つかの単純なトリテルペン経路については，生合成経路がほぼ分かっているものもある．しかし，それらを効率よく異種発現することは今なお困難であり，トリテルペン類の生合成経路の再構成研究，その代謝工学やコンビナトリアル生合成の試みは，今日もなお殆ど例がない．

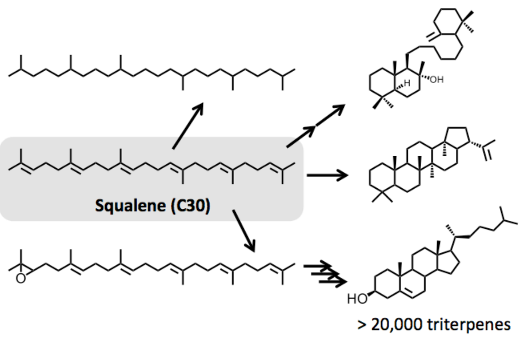

Fig.1　全てのトリテルペンへの道は，スクアレンに通ず．

その一つの理由として，適当なスクリーニング手法の欠如が挙げられる．もし，トリテルペン合成経路のそれぞれの生合成活性をスループット良くスクリーニングできれば，未知の遺伝子の探索も，そしてそれらの酵素の機能改良も，可能となるであろう．トリテルペン類は無色かつ構造が複雑である．30,000 あるとされるトリテルペン化合物ひとつひとつに対するプロダクトベースのスクリーニング系を開発するのは困難である．しかし，もしこれらの共通基質であるスクアレンの消費活性を見ることができれば，生産物の種類にかかわらず，トリテルペンの骨格形成を司る様々な酵素活性のハイスループットなスクリーニングが可能となる．

(2) 大腸菌というトリテルペン生産宿主
動植物を中心にトリテルペン経路の解明の再構築が強く望まれている．現在は，関連する生合成遺伝子の機能発現の宿主として酵母が使われている．しかし，酵母に内在するトリテルペン（エルゴステロール）経路のタイターが強く，導入したトリテルペン経路と競合やクロストークを起こすため，導入した酵素や経路の生産物解析と生合成デザインには困難がつきまとう．内在経路の発現レベルの下方修正（Kirby et al., ***FEBS J.***, <u>275</u>, 1852 (2008)）が試されてきたが，酵母の増殖に必須なエルゴステロール経路を完全に除去することは不可能である．一方，内在経路を持たない大腸菌はトリテルペン研究の「白いキャンバス」としてより望ましいプラットフォームたり得るが．オキシドスクアレンの機能発現が実現しておらず，ステロイド経路は未開通である．

(3) 端緒はやはりスクリーニング
最近我々は，スクアレン合成酵素の活性スクリーニングを目的とし，スクアレンを色素に転化できる酵素を探索していた．その途上，偶然にも，黄色ブドウ球菌のカロテノイド不飽和化酵素 CrtN がスクアレンを４段階脱水素化しニューロスポレン（黄色色素）を与えることを発見した（Furubayashi *et al.*,***FEBS Lett.***, <u>588</u>, 436 (2014)）．我々は，もし，スクアレンの生成が可視化できるならば，その減少（消費）も同じく見ることができると考えた．本研究は，この系を巧みに利用して，スクアレンを原料とする酵素の普遍的な活性スクリーニング系を開発し，それを用いて，いままで探索できなかった様々な酵素活性の探索・改良を可能とすることにある．

２．研究の目的

スクアレンを起点とする種々の生合成経路を大腸菌内に再構築し，関連酵素の機能解析と改変研究の基幹プラットフォームを完成させる．(1) ステロイドを始めとする医薬・有価物質の安定で効率的な生産経路の確立，(2) コンビナトリアル生合成への端緒を拓くのが目標である．研究を始めるに際して，我々は４つの具体的な目標を設定した．

(1) 細胞内スクアレン消費能の可視化：上で述べたように，CrtN のスクアレン色素化活性を利用して，スクアレンを基質とする酵素活性の汎用的なスクリーニング手法を確立する．
(2) スクアレン転化酵素の探索と活性改良：スクアレンを原料とするものとして，環化活性，エポキシ化活性の２つを目標に設定した．これらの大腸菌活性を，(1)の手法によって改良する．
(3) 非天然サイズのスクアレン経路の構築：二次代謝酵素は一般に，活性が低く，そして，特異性が低い．十分に細胞活性を高めた変異体であれば，その非天然化合物の合成活性も高くなると期待される．(2)で作出した変異体に別途開発したさまざまな「スクアレン様の化合物」を基質としてフィードし，さまざまな新規化合物への生合成ルートを組織的に確立する．
(4) 非天然スクアレンの消費活性（非天然活性）を直接選抜する系を構築する。

３．研究の方法

(1) 大腸菌株：遺伝子クローニング，ライブラリ生成，そしてスクリーニングやバイオプロダクション実験に至るまで，すべての実験において，大腸菌株 XL1Blue を使った．

(2) プラスミド：スクリーニング系の開発は，基本的には pACYC/pUC の２プラスミド系を用いた．それぞれのプラスミドの保持には，クロラムフェニコールとカルベニシリンを用いた．

(3) 化合物分析：細胞の産する各種化合物の分析には，カロテノイドやトリテルペンなどの抽出・分析手法として標準的なプロトコールに従った．カロテノイドの色素はもっぱら ODS1 カラム（Shimadzu-Shimpack）を用いた逆相 HPLC-PDA-MS によって行った．
スクアレン，オキシドスクアレン，およびその環化物の分析・定量は，ガスクロマトグラフ（GC-FID）によって行った．

４．研究成果

(1) スクアレン消費能の可視化技術の開発

まず，ヒト由来のスクアレン合成酵素（hSQS）と CrtN を共発現するオペロンを構成し，pACYC 系のベクターに導入した．このとき，実験手順を単純化するために，これらの遺伝子の発現は定常プロモータによって行うこととした．

このプラスミドで形質転換された大腸菌株は，大腸菌内在のファルネシル二リン酸を原料としてスクアレンを生合成し，さらにそれを４～５回不飽和化してジアポニューロスポレンあるいはジアポリコペンというカロテノイド色素を蓄積する．その結果，鮮やかな黄色のコロニーを呈する．この細胞内に，高いスクアレン消費活性を有する酵素を発現すると，色素経路から原料（スクアレン）を奪い，細胞色が低下する仕組みである．

スクアレン消費酵素の発現を pUC 系ベクターで行うこととした．実際に本系で *Alicyclobacillus acidocaldarius* 由来由来のスクアレン・ホペンサイクラーゼ（SHC）を発現させると，白いコロニーが得られた．活性中心に変異を導入して不活性化した SHC 変異体を発現させた場合は，強い黄色のコロニーが形成された．こうして，スクアレン転化酵素の活性スクリーニング系を確立することができた．観察される系を構築することができた（not shown）.

本系の唯一の泣き所として，細胞の呈する色が黄色～橙色である点が挙げられる．大腸菌や培地が若干黄肌色を持つため，視認できる黄色色素の蓄積量のダイナミックレンジは，元来高くとれない．そこで我々は，SqS+CrtN に加え，新たにもう一つの酵素（ *Staphylococcus aureus (strain NCTC 8325)* 由来の $CrtN_b$）を発現させた．この酵素は，カロテノイドの直鎖状飽和末端にカルボニルを導入することができる（Tao *et al.*, ***AEM***, 71, 3294 (2005)）．その結果，蓄積するカロテノイドの色素団の共役系は２つばかり伸びることによって（Fig. 2A），赤色のコロニーが生じることとなった．こうして，スクアレン消費活性の有・無の識別が圧倒的に容易となった（Fig.2B）.

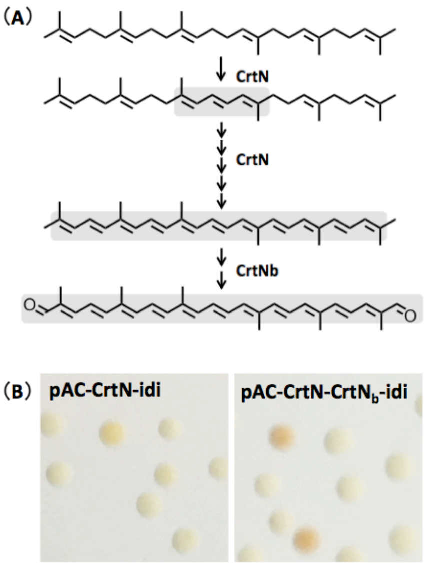

Fig.2 スクアレン消費スクリーニングの視認性向上へ（a）ジアポリコペン末端のアルデヒド化，（b）実際のコロニーの様子 左；probe として pAC-SqS-CrtN を用いた場合．右：pAC-SqS-CrtN-CrtNb を用いた場合．

(2) ホペンサイクラーゼの活性改良：

微生物の中には，スクアレンを直接環化できるものが数多く知られる．中でも，*Alicyclobacillus acidocaldarius* 由来のスクアレン/ホペンサイクラーゼ（SHC）は基質特異性が低いことで知られ，さまざまな非天然の化合物を酵素合成できることが知られる．しかし高熱性細菌由来であるため，この SHC は，大腸菌の培養温度での活性は僅かである．野生型 SHC の活性は低い：この酵素を過剰発現したところ，イソプレノイド強化株（Katabami, et al., ***JBB*** 119, 165 (2015)）の蓄積するスクアレン（300-400mg/L）のごく一部（～5%ほど）を環化するに留まった．

そこで本研究では，この酵素の大腸菌活性の向上を目指すことにした．まず我々は，SHC の遺伝子全体に変異 PCR によってランダム変異を導入し，～20,000 の変異体ライブラリを調製した．これらの中から，前節で開発したスクリーニング手法によって，スクアレンの消費活性の高いと思われる SHC 変異体（つまり親よりも有意に色の薄いコロニーを形成させるクローン）を複数単離できた（Fig.3A)．これらの殆どが，実際に大腸菌内で野生型の５～８倍のホペン生産能力を示した（Fig.3B).

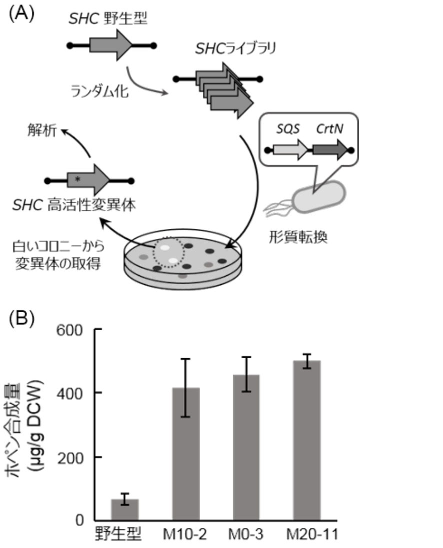

Fig.3 スクアレン・ホペンサイクラーゼの細胞活性進化（a）進化工学のスキーム（b）得られた変異体の大腸菌活性

(3) <u>非天然トリテルペンの生合成へ</u>

上述の SHC は，様々な基質に作用できる．天然基質はスクアレンであるが，オキシドスクアレンにも作用できるという報告されている（Hoshino *et al*, ***Org.Biomol.Chem*** <u>2</u>, 1456 (2004)）．大腸菌に構築されたオキシドスクアレン生合成経路に上項で活性改良された SHC 変異体を追加発現したところ，たしかに，先行研究が報告する通り，オキシドスクアレンの環化物が得られた（Fig.4）．この環化物は 3 位にヒドロキシ基が付いており，糖などの両親媒性官能基の付加が可能である．細胞膜に対して垂直配向し，膜流動性調節能の高い様々な化合物の生合成に道が拓くものと期待される．

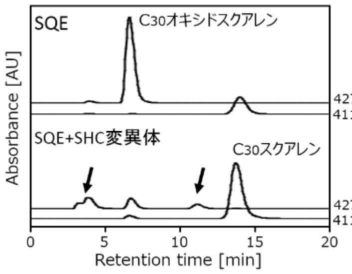

Fig.4 ホペンサイクラーゼによるオキシドスクアレンの大腸菌内での環化反応

スクアレン環化酵素などの「隠れた機能」は，殆ど記述がないながら明らかである．例えば，精製された *Alicyclobacillus* 由来のスクアレン／ホペンサイクラーゼ（SHC）に有機合成された人工基質を与えると，全く非天然の C_{35} テルペン骨格が得られる（Abe, et al., ***JACS***, <u>124</u>, 14514 (2002): Hoshino, ***Chem Eur. J.*** <u>15</u>, 2091(2009)）．データベース上にはこのような新規機能の候補が無数に存在するが，それらの組織的な探索，あるいはそれらの特異性の改変は，スクリーニング系の不在により極めて困難であった．

我々は，スクアレン合成酵素とファルネシル二リン酸合成酵素のサイズ変異体をシリーズで調製し，これらの組織的な掛け合わせによって，C_{35}，C_{40}，C_{50} などのサイズをもつスクアレン様分子の選択的な生合成経路を確立した．上節で得た SHC の活性変異体をこれらの経路と共発現したところ，各種非天然 SQS 経路との組み合わせを組織的に実施し，C_{35}，C_{40} 骨格をもつ合計 12 個もの環状トリテルペン様物質の生合成経路が構築できた．

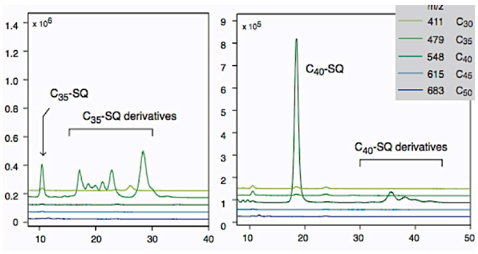

Fig.5 C35・C40 骨格をもつスクアレンを SHC 変異体で環化する

C35 スクアレンの環化物は試験管内で実現した例があるが（上述），これらの細胞生産は世界で初めてである．また，C40 スクアレンの環化はこれまでに報告がない．また，C50 スクアレンを SHC 変異体に基質として供したところ，極性の高い新規ピークが出現した．現在は，この謎の新規化合物の構造決定に取り組んでいる．

真核生物が合成するステロイド類は，スクアレンがスクアレンエポキシダーゼ（SQE）によって酸化された後に環化酵素の作用を受けて合成される．自然界には C30 以外の骨格をもつオキシドスクアレンは見つかっておらず，SQE は高い基質特異性を持つと信じられてきた．

ところが，上述の非天然スクアレン経路にシロイヌナズナ由来の SQE を追加発現したところ，C_{35}，C_{40} 骨格を持つオキシドスクアレンが得られた（図 6）．これは，SQE の意外な寛容性が明らかにした初めての例である．これにサイクラーゼを足すことによって，いままで作ることができなかった様々な環状トリテルペン様化合物が得られると期待される．例えば私達は，この経路に本研究で開発した活性型 SHC 変異体を追加発現させることによって，C_{35}/ C_{40} 骨格を持つ様々な非天然イソプレノイド生合成経路の確立に取り組みはじめたところである．

残念ながら 野生型のスクアレンオキシゲナーゼは，C50 スクアレンを全く受け入れることができなかった．これらの改造は，非天然サイズのスクアレン消費能に対する活性スクリーニングが有れば可能かもしれない．

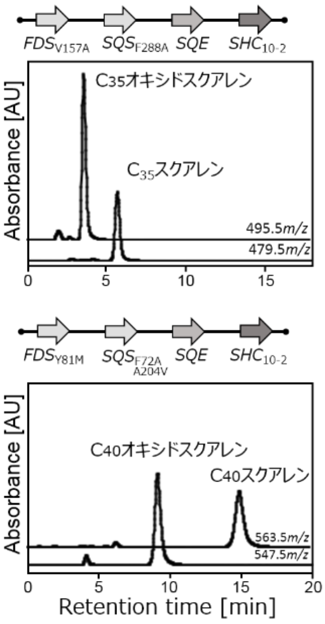

Fig. 6　C35・C40 骨格をもつオキシドスクアレンの大腸菌合成

(4) 非天然経路の直接スクリーニング？

当初我々は，我々の確立した C_{35}，C_{40}，C_{50} などの非天然スクアレンの生合成経路に CrtN（あるいはその変異体）を追加発現すれば，簡単に非天然カロテノイド色素の生合成経路が開通すると考えていた．もしこれが実現すれば，非天然スクアレンの消費機能(環化，酸化など)がスクリーニングできるようになるはずであった．

しかし，結果は期待はずれであった．我々の期待に反して，我々の有するブドウ球菌由来の CrtN は殆ど C35 以上の骨格をもつスクアレンを受け入れることができず，細胞の呈色はみられなかった．我々は様々な方法で CrtN に変異を導入し，なんとか>C35 スクアレンを基質とした色素合成経路を確立しようとしたが，あらゆる努力は報われなかった．CrtN は C30 骨格を持つジアポフィトエンという化合物を不飽和化する酵素であるが，この酵素は，スクアレンを不飽和化してジアポフィトエンにする副活性を持つ．さらには C35～C40 フィトエンの不飽和化活性も有している（Umeno and Arnold, ***AEM***, 69, 3573 (2003)）基質寛容性の高い酵素である．しかし，「>C35 かつスクアレン型」の基質は，頑として色素へ転化してくれないのである．

困った我々は，データベースの中から，他の由来の CrtN を探索することにした．その結果，メチロモナス種に由来する CrtN が，C35～40 骨格スクアレンの色素化ができるらしいことが分かった（Fig. 7）．これを用いれば，トリテルペン経路における天然活性の探索の枠を超え，非天然スクアレンの転化活性を直接スクリーニング探索できることを意味している．

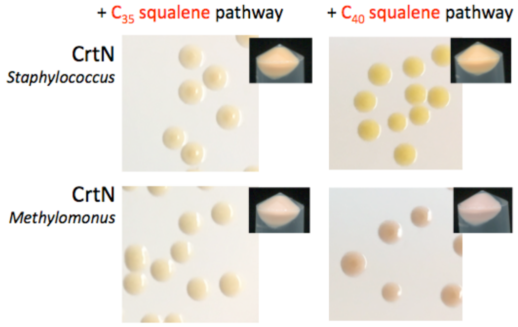

Fig. 7 C35・C40 スクアレン共存下で色素蓄積する CrtN ホモログを発見した．

以上，まだ道半ばながら，開始時に想定していた４つの目標のほぼ全ては順調に実現しつつあると判断できる．トリテルペンはスクアレンというただ一つの化合物から発し，20,000 種以上の化合物が作られる．我々が本研究で見いだしたように，環化酵素も酸化酵素も，十分な基質寛容性を持っているとすれば，これらの追加発現によって，膨大な数の新規な化合物が微生物生産できるようになる．これらの化合物は，核レセプターなどへの親和性を通して，多くの生理活性を含むと期待される．

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計６件）

1. Tashiro, M., Ono, K., Kimura, O., Kawai-Noma, S., Saito, K., Umeno, D.: Tweezing the cofactor preference of gymnosperm pinene synthase.: *Biosci. Biochem. Bioeng.*, 82, 1058-1061 (2018). (査読あり)
2. Tashiro, M., Fujii, A., Kawai-Noma, S., Saito, K., Umeno, D.: Directed evolution and expression tuning of geraniol synthase for efficient geraniol production in *Escherichia coli.* : *J. Gen. Appl. Microbiol.* doi:10.2323/jgam.2017.01.006 (2017). (査読あり)
3. 田代美希，梅野太輔：テルペノイド合成酵素の機能進化デザイン，化学と生物，54(8)，562-567 (2016).（査読なし）
4. Tashiro, M., Kiyota H., Kawai-Noma S., Saito K., Ikeuchi M., Iijima Y., Umeno,

D. Bacterial production of pinene by laboratory-evolved pinene synthase. *ACS Synth. Biol.* 5, 1011-1020 (2016). (査読あり)

5. Katabami, A., Lin L., Iwasaki, M., Saito, K., Umeno D.: Production of squalene by squalene synthase and its truncated mutants in *Escherichia coli.*: *J. Biosci. Bioeng.*, 119, 16-171 (2016). (査読あり)
6. 古林真衣子, 梅野太輔, 香料の合成生物学, 267, 21-29 (2016). (査読なし)

〔学会発表〕(計 15 件)

1. D. Umeno: "Re-Designing carotenoid biosynthetic pathways." Gordon Research Conference 2018 on Carotenoids, Sunday River, ME, アメリカ合衆国, 2018/06/17.
2. 梅野太輔:「非天然トリテルペノイド生合成の進化合成生物学」:農芸化学会 2018 大会, 名城大学, 愛知 2018/03/18.
3. 梅野太輔:「情報処理機能の実験室内「創発」」:生命の起源および進化学会シンポジウム, 埼玉大学, 埼玉, 2018/03/16
4. D. Umeno: "Laboratory evolution of triterpenoid biosynthetic pathways." : 1st China-Japan Symposium on Natural Product Biosynthesis, Hotel Nikko, Shanghai, "201710/03.
5. 梅野太輔:「テルペノイド生合成経路の兵站体系を再検討する」:日本生物工学会, 早稲田大学, 東京, 2017/09/13.
6. 梅野太輔:「カロテノイド生合成経路の「進化能」の探索」日本植物学会第 81 回大会, 北海道大, 東京, 2017/09/08.
7. D. Umeno: "Directed evolution of carotenoid/ terpenoid biosynthetic pathways." 9th US-Japan Symposium on the Biosynthesis of Natural Products, Arrowhead, CA, 2017/06/01.
8. 梅野太輔:「トリテルペン生合成経路を実験室内で進化させる」JBA 発酵と代謝研究会セミナー, 東京, 2017/03/27.
9. D. Umeno: "Directed Evolution of carotenoid/terpenoid biosynthesis." :Fusion Conference on Synthetic Biology, Cancun, Mexico, 2017/03/05.
10. D. Umeno: "Rapid Diversification and Compression of the Genetic Networks via Directed Evolution." Biosystems Design 3.0, Singapore, 2017/02/16.
11. 梅野太輔:「生体高分子の協働様式の進化分子工学」:酵素工学研究会第７６講演会, 東京大学, 東京, 2016/10/07.
12. 梅野太輔:「人口生合成経路の進化デザイン」新学術領域生合成リデザイン, キックオフシンポジウム, 東京大学, 東京, 2016/09/10.
13. 梅野太輔:「分子スイッチ機能 進化から創発へ」生命の起源および進化学会 & 日本アストロバイオロジーネットワーク夏の学校, 葉山, 2016/08/29.
14. 梅野太輔:「生体分子の協働機能形式を進化デザインする」生物工学会夏のセミナー2016, 府中. 2016/07/16.

〔図書〕(計３件)

1. 梅野太輔:「生物を作る～新薬を生み出すスーパー酵母を創る」, バイオベンチャーの冒険者たち, pp65-103, 千葉大 VBL 編, 幻冬舎, ISBN978-4-344-91602-9 (2018 年 3 月 15 日).
2. Sakurai T, Tsujikawa T, Umeno D., "Propagation and aggregation of motile cells of *Escherichia coli* pattern", pp227-237, ***Complexity and Synergetics***, *SC Muller Edn.*, Springer International (2018).
3. 斎藤恭一, 梅野太輔 (共著):アブストラクトで学ぶ理系英語, 朝倉書店, ISBN978-4-254-10276-5 (2017 年 6 月 25 日).

〔産業財産権〕

○出願状況(計３件)

名称:スクアレン消費酵素のスクリーニング法およびスクアレン―ホペン環化酵素
発明者:梅野太輔, 大谷悠介, 河合繁子
権利者:千葉大学
番号:特願 2018-066299
出願年月日:2018 年 3 月 30 日
国内外の別:国内のみ

名称:化合物およびトラクション油の製造法
発明者:浅野真菜, 久野 斉, 梅野太輔, 李伶, 眞岡孝至
権利者:千葉大学/デンソー
番号:特願 2018-045352
出願年月日:2017 年 5 月 29 日
国内外の別:国内のみ

名称:ボトリオコッセン生合成経路の活性向上手法および細胞活性変異体
発明者:梅野太輔, 浅野真菜, 久野 斉, 李 伶
権利者:千葉大学/デンソー
番号:特願 2017-105533
出願年月日:2017 年 5 月 29 日
国内外の別:国内のみ

○取得状況(計０件)
なし

〔その他〕
ホームページ等
http://chem.tf.chiba-u.jp/gacb02/index.html

６．研究組織

(1)研究代表者
梅野 太輔 (Daisuke Umeno)
千葉大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号:00400812

(2)研究分担者
河合 繁子 (Shigeko Kawai)
千葉大学・大学院工学研究院・助教
研究者番号:40638920