

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14501  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2015～2016  
課題番号：15K18276  
研究課題名(和文) 酵素ステーブラーを用いた代謝チャネリング技術

研究課題名(英文) Metabolic channeling with enzyme stapler

## 研究代表者

松本 拓也 (Matsumoto, Takuya)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・特命助教

研究者番号：40727161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：バイオマスを有効利用する手段として、代謝改変微生物を用いた有用物質生産は重要な研究分野である。本研究では、新規な代謝改変ツールとして代謝酵素の連結に基づく代謝チャネリング技術の開発を目指した。代謝酵素を連結する手段として、sortase Aを「酵素ステーブラー」として用いることで、任意の代謝経路を代謝チャネリングによって強化する手法の開発を目指した。実際に、大腸菌体内でアセチルCoAを分岐点として、その前後の酵素をsortase Aによって繋げることで酢酸生産能が強化されることを見出した。

研究成果の概要(英文)：We demonstrate metabolic enzyme ligation using a sortase A in the microbial cytoplasm for the redirection of metabolic flux through metabolic channeling. Here, sortase A expression was controlled by the lac promoter to trigger metabolic channeling by the addition of isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG). We tested covalent linking of pyruvate-formate lyase and phosphate acetyltransferase by sortase A-mediated ligation and evaluated the production of acetate. The time point of addition of IPTG was not critical for facilitating metabolic enzyme ligation, and acetate production increased upon expression of sortase A. These results show that sortase A-mediated enzyme ligation enhances an acetate-producing flux in *E. coli*. We have validated that sortase A-mediated enzyme ligation offers a metabolic channeling approach to redirect a central flux to a desired flux.

研究分野：生物化学工学

キーワード：大腸菌 代謝工学 酢酸 代謝チャネリング 酵素

1. 研究開始当初の背景

持続可能な低炭素社会を実現するためには、再生可能資源であるバイオマスを有効に利用する必要がある。バイオリファイナリーは、バイオマスを原料に化成品や燃料などの有用化合物を産生する重要な研究分野であり、特に、微生物代謝を利用した有用物質生産はバイオマスを原料に様々な化合物を生産することが可能な重要な技術である。しかしながら、微生物を用いたバイオプロセスでは反応速度が遅いなど克服すべき課題が多数あり、これらを解決するためには、目的の化合物を効率的に生産する微生物を新たに設計・創成することが必要になる。

代謝改変微生物を用いた有用物質生産は上記課題を克服する上で重要な要素技術である。微生物はバイオマスに含まれる糖等を体内に存在する酵素の働きで代謝することで様々な化合物を生産するが、目的化合物を効率的に生産するためには、微生物が本来持つ代謝経路を任意の形に改変する必要がある。微生物の代謝を改変するためには、代謝経路を担う遺伝子を予め破壊することで、競合する代謝経路を遮断し、代謝フラックスを目的物質の生産に最適化する手法がよく用いられる(図1)。しかしながら、微生物細胞の代謝経路上には細胞の維持や生育に関わる遺伝子も存在し、それらを予め破壊することはできない。そこで、本研究ではこれらの課題を克服するための新たな代謝改変技術の開発を目指した。

遺伝子破壊株を用いた代謝フラックスの強化

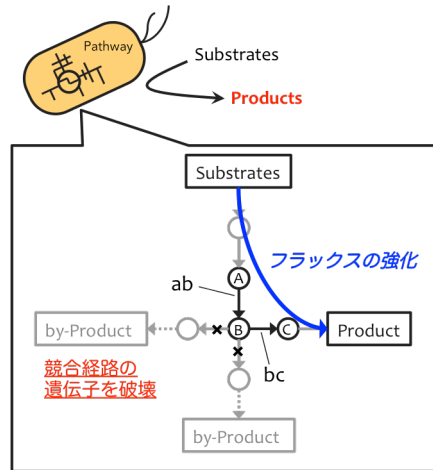


図1. 競合経路の破壊による微生物の代謝改変

2. 研究の目的

本研究においては、代謝経路上の酵素を近接させることで、代謝中間体の局所濃度を上げることが出来る「代謝チャネリング」に着目した。代謝チャネリングでは、連続する二つの代謝反応において代謝酵素どうしが近くに存在することで細胞内での中間体の拡散を抑制し、連続反応の効率を向上させるこ

とが可能になる。そのため、任意の代謝分岐点に対して前後の代謝反応をチャネリングすることで、任意の方向へ代謝フラックスを強化することが可能になると期待できる(図2)。本研究では、代謝酵素を近接する手段として、Sortase A と呼ばれるペプチド転移酵素を用いた。大腸菌細胞内において、Sortase A を、代謝酵素を繋ぎ合わせるための「酵素ステーブラー」として用いることで、代謝チャネリングを引き起こすことが可能かどうか検討した。

代謝チャネリングを用いた代謝フラックス強化

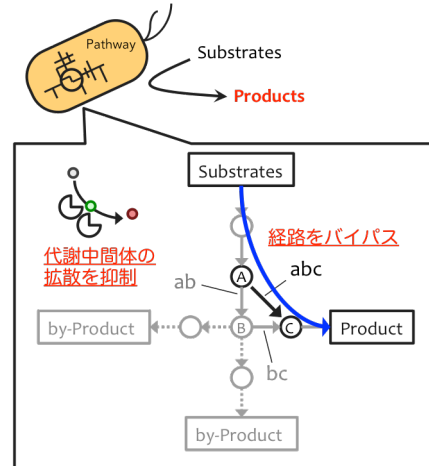


図2. 代謝チャネリング技術を用いた微生物の代謝改変

3. 研究の方法

代謝酵素を酵素ステーブラーによって連結することで、代謝チャネリングを引き起こすことが可能かどうか大腸菌をモデル微生物として用いることで検討を行なった。Sortase A は図3に示すように、特定のアミノ酸配列(LPXTG および G<sub>n</sub>配列)認識し、ペプチド転移反応を介して繋ぎ合わせる働きを触媒する。よって、任意の代謝中間体に対して、その前後の反応を担う代謝酵素にこれらの配列を遺伝子工学的に付与することで、Sortase A を用いて両者を連結し、代謝フラックスを変化させることが可能かどうか調査した。

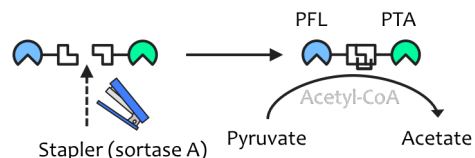


図3. 酵素ステーブラーを用いた代謝酵素の連結

具体的には、アセチル CoA を代謝分岐点と捉え、その代謝の前後の酵素(ピルビン酸ギ酸リアーゼ:PFL およびリン酸アセチルトランスフェラーゼ:PTA)に Sortase A の認識配列を付与することでそれらを連結させ、酢酸生産に与える影響を調査した(図4)。PFL と PTA が連結することで、ピルビン酸からアセ

チル CoA、アセチルリン酸を経由し、酢酸が生産される経路が強化されると予想される。

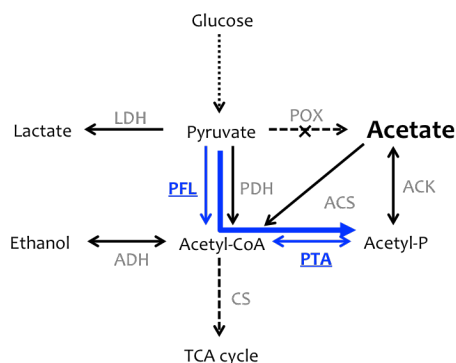


図4. 代謝チャネリング技術を用いた酢酸生産経路の強化

実際に、これらの株を、5%グルコースを含むLB培地で培養し、生産された代謝物を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。

#### 4. 研究成果

Sortase A の認識配列である LPETGG 配列を C 末端側に付与した PFL をコードする遺伝子 pf1B-lp および GGGGS 配列を N 末端側に付与した PTA をコードする遺伝子 g-pta を恒常発現型で発現させた (pf1B-lp\_g-pta/pHLA)。また、Sortase A に関しては Lac プロモータ制御下で発現を行った (SrtA/pZA23)。これらのプラスミドを酢酸非生産株 (BW25113 Δ pf1B; Δ pta; Δ poxB 株) に形質転換し、誘 Sortase A の発現の有無によって酢酸生産が変化するか調べた。図 5 にみられるように、pf1B のみを補完した株 (KT190; 酢酸非生産株) あるいは pf1B, pta を補完した株 (KT193; 酢酸生産株、Sortase A 発現なし) では酢酸はほとんど生産されなかったが、Sortase A によって pf1B および pta が連結された株 (KT195; 酢酸生産株、Sortase A 発現あり)

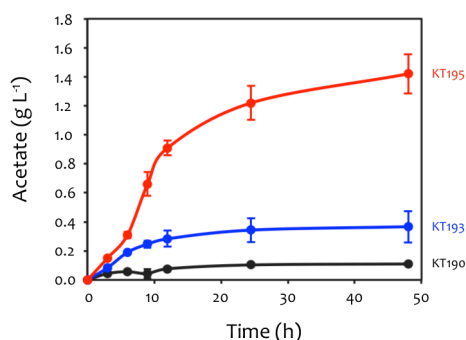


図5. 酢酸生産量の比較

では酢酸生産量が増大した。

菌体破砕液をウエスタンブロッティングによって解析したところ、pf1B および pta が連結されていたことから、Sortase A による大腸菌体内での代謝酵素の連結によって、代謝フラックスが酢酸生産に傾いたということが示唆された。以上の結果から、大腸菌体

内で Sortase A を用いて代謝酵素を連結することで、代謝改変が可能であるということを示すことができた。

今後、他の代謝経路においても同様に本技術を適用することで、Sortase A を用いた代謝チャネリング技術の汎用性を拡張することが必要であるが、以上より、本研究結果によって、代謝経路の遮断や弱化といった従来の手法とは異なるアプローチで代謝を改変することが可能であるということを示すことができた。

#### 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 3 件)

(1) Matsumoto T, Isogawa Y, Minamihata K, Tanaka T, Kondo A., Twigged streptavidin polymer as a scaffold for protein assembly. J Biotechnol. 2016 May 10;225:61-6. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.03.030.

(2) Matsumoto T, Furuta K, Tanaka T, Kondo A., Sortase A-Mediated Metabolic Enzyme Ligation in Escherichia coli. ACS Synth Biol. 2016 Nov 18;5(11):1284-1289. doi: 10.1021/acssynbio.6b00194.

(3) Matsumoto T, Tanaka T, Kondo A., Engineering metabolic pathways in Escherichia coli for constructing a "microbial chassis" for biochemical production. Bioresour Technol. 2017 May 4. pii: S0960-8524(17)30647-8. doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.008.

[学会発表] (計 9 件)

(1) 松本拓也、田中勉、近藤昭彦、酵素ステープラーを用いた大腸菌体内での代謝酵素の連結、化学工学会 第 47 回秋季大会、ポスター、北海道、2015.9.

(2) 松本拓也、田中勉、近藤昭彦、C-terminal-oriented immobilization of enzymes using sortase A-mediated technique, The 21th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers Community, ポスター、Chuncheon (Korea), 2015.10.

(3) 松本拓也、五十川由季、田中勉、近藤昭彦、Streptavidin Hydrogel as a Scaffold for Protein Assembly, PEGS EUROPE、ポスター、Lisbon (Portugal), 2015.11.

(4) 松本拓也、古田公、田中勉、近藤昭彦、Metabolic enzyme ligation by sortagging, 18th European Congress on Biotechnology, ポスター、Krakow (Poland), 2016.7.

(5) 松本拓也、田中勉、近藤昭彦、Sortase A を用いた大腸菌体内での代謝酵素の連結とその影響、化学工学会 第 48 回秋季大会、ポスター、徳島、2016. 9.

(6) 松本拓也、田中勉、近藤昭彦、Sortase A を用いた大腸菌体内での代謝酵素の連結とその影響、第 68 回日本生物工学会大会、ポスター、富山、2016. 9.

(7) 松本拓也、田中勉、近藤昭彦、Sortase A を用いた大腸菌内での代謝酵素の連結とその影響、酵素工学研究会 第 76 回講演会、ポスター、東京、2016. 10.

(8) 松本拓也、田中勉、近藤昭彦、Sortase A-mediated metabolic enzyme ligation, the 17th International Biotechnology Symposium and Exhibition, ポスター、Melbourne (Australia), 2016. 10.

(9) 松本拓也、Sortase A-mediated metabolic enzyme ligation in Escherichia coli, 2nd Korea-Japan smart biodesign workshop: ALCA, 口頭、仙台、2017. 2.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.kobe-u.ac.jp/~akondo/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 拓也 (MATSUMOTO Takuya)

神戸大学大学院・科学技術イノベーション

研究科・特命助教

研究者番号：40727161

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし