

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06927

研究課題名（和文）多段階反応の効率化を指向した低温菌シンプル酵素触媒の構築

研究課題名（英文）Construction of Psychrophile-based simple biocatalysts for the efficient bioconversion with multi-step reactions

研究代表者

田島 誉久（Takahisa, Tajima）

広島大学・統合生命科学研究科（先）・助教

研究者番号：80571116

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、効率的な反応を行うためのシンプル酵素触媒を構築するために触媒の宿主である低温菌の代謝酵素の熱処理による抑制と変換反応を行う酵素の融合を行い、評価した。その結果、多くの低温菌代謝酵素は中温の熱処理で失活することが示され、本触媒における熱処理の有効性が示された。また、変換酵素の融合により反応の部分的効率化と酵素サイズの高分子化により固定化触媒からの酵素漏出を抑制できることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は環境負荷の少ない生物学的な物質変換法としてシンプル酵素触媒の効率化に着目して行った。本触媒は簡便な操作で変換反応に不要な副産物生成経路を削除できることから有用化学品の収率向上に大きく貢献すること、融合酵素による反応及び固定化触媒での酵素漏出に寄与することが示された。以上の成果はバイオ触媒の効率性の向上と今後のさらなる触媒改変に重要な知見であると考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we constructed the psychrophile-based simple biocatalysts for the efficient bioconversion with heat treatment. Most of the metabolic enzymes in host psychrophilic bacterium were inactivated with heat treatment at normal temperature. We also constructed the fusion proteins of two conversion enzymes. Some of them showed the tendency of increased efficiency. They also had the advantage in the leak of conversion enzymes from the immobilized biocatalyst.

研究分野：生物学

キーワード：酵素触媒 低温菌 イタコン酸 融合酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、変換酵素を効率的に機能させる触媒としてシンプル酵素触媒を構築してきた。本触媒は多様な中温菌や植物の酵素を利用して変換反応代謝経路を設計でき、熱処理により宿主由来の代謝酵素を失活させることで目的の変換酵素のみを機能させることが可能なものである。既に低温菌を宿主に用いた本技術によりグリセロールを 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドに収率 99% で変換することに成功している。また、競合する低温菌の代謝酵素を熱失活させたことで副産物を生成することなくフマル酸からアスパラギン酸への高収率変換も実現した。常温常圧下で反応できるバイオ触媒による物質変換が優れる点は、ワンポットで多段階の反応を触媒して持続的に変換できることである。しかし、上述の変換系は単一酵素による反応であり、本触媒をさらに広範な化学品の変換に適用するには複数の酵素による多段階反応系を構築することが不可欠である。複数酵素による効率的な物質変換系を本触媒においても構築できれば、既存の代謝経路に依存せずに異種の酵素を組み合わせることで自由に代謝経路を設計することも有利な点になりうる。そこで本研究では、低温菌内に中温菌由来の酵素を高発現させた細胞を用い、多段階反応で化学品を生成するシンプル生体触媒創製のための基盤技術確立を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究ではシンプル酵素触媒の基盤技術確立のために、研究項目を次の 2 つに分けた。宿主代謝酵素の動態解析、多段階反応を行う触媒の構築である。これらを遂行することでシンプル酵素触媒の基盤技術の確立を目指した。

熱処理による宿主由来代謝酵素の動態解析：本触媒の根幹である低温菌の中温熱処理による代謝酵素の失活を明らかにする必要があるが、一般に数千種に及ぶといわれる低温菌の代謝酵素の一部は熱失活せずに機能しているかもしれない。そこで本研究では、代謝酵素の熱安定性を解析し、熱処理条件ごとの代謝酵素の動態をモニタリングすることで低温菌の代謝酵素を失活できる熱処理条件と適用可能な反応系を明確化する。

多段階反応を効率的に行うシンプル酵素触媒の構築：複数酵素による多段階反応を持続的に行うには、各反応系が滞ることなく連携することが求められる。そのためには隣り合う反応系の酵素を近接化することで基質を迅速に供給するのが良いと想像される。本反応系では競合反応系が存在するピルビン酸周辺の中央代謝系において物質変換系を設計し、効率的に変換が行われるシンプル酵素触媒構築の基盤技術を確立する。

3. 研究の方法

本研究では多段階反応の効率化を行うために宿主である低温菌代謝酵素と競合する経路の選択、反応経路の設計および変換酵素を融合させた酵素の構築と変換反応への寄与について検証した。

熱処理による宿主由来代謝酵素の動態解析では、中央代謝系であるクエン酸回路の酵素をターゲットとし、各種温度で熱処理した低温菌細胞におけるこれらの酵素活性を測定することで熱処理が低温菌代謝酵素におよぼす影響を明らかにするとともに、大腸菌などの中温菌との比較も行った。

クエン酸回路の代謝酵素と競合する変換酵素反応系としてイタコン酸生産を選択し、その 2 段階反応系の効率化を目的として、2 種類の酵素をリンカーペプチドにて融合させた酵素を構築し、変換反応への影響を調べるとともに、本触媒を包括的に固定化した際の効果についても持続的利用の観点から検証を行った。

4. 研究成果

宿主代謝酵素の動態解析

酵素触媒の宿主として用いる低温性 *Shewanella* 属細菌において細胞を超音波破砕にて調製した粗酵素液を用い、クエン酸回路の酵素であるリンゴ酸酵素、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、フマラーゼ、コハク酸デヒドロゲナーゼの酵素活性を各温度で熱処理した後に酵素活性を測定した。一部を除くほとんど酵素において 50 °C の中温で熱処理した粗酵素液において活性が低下した。その一方でリンゴ酸デヒドロゲナーゼは中温の熱処理でも活性が低下しないことから低温菌を利用したシンプル酵素触媒は中温の熱処理で有効であることが示唆された。今後、その他の中央代謝系の酵素においても解析を進めることでシンプル酵素触媒が適用できる変換反応を明らかにできると考えている。

イタコン酸生産系における融合酵素による変換反応および固定化触媒における解析

多段階反応の効率化検討のため、クエン酸を基質としたイタコン酸生産系を選択した。

イタコン酸の生成経路はクエン酸をアコニターゼにより *cis*-アコニット酸にし、これを *cis*-アコニット酸デカルボキシラーゼによりイタコン酸に変換する。アコニターゼは大腸菌由来の *AcnB* を、*cis*-アコニット酸デカルボキシラーゼ (CAD) は糸状菌 *Aspergillus terreus* 由来の *CadA* を用いた。各酵素遺伝子を広宿主域プラスミドベクター *pHA12* により低温菌に導入し、酵素を発現した。構築した発現株を用いて変換反応を行ったところ、収率 96.5% で 385 mM のイタコン酸を生成した。本研究では、この酵素反応を効率化するアプローチの一つとしてリンカー配列を介して *cadA* と *acnB* を連結した融合酵素による変換を試みた。リンカー配列には Flexible (F;

[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n) と Rigid (G; [Glu-Ala-Ala-Ala-Lys]_n) の 2 種類を用い、繰り返し数 n をそれぞれ 1~3 にして、長さや硬さの異なる合計 6 種類の融合タンパク質 (F1, F2, F3, R1, R2, R3) を構築した。まず、ゲル濾過クロマトグラフィーによる融合の確認と分子量を推定した。CAD (分子量: 58.1 kDa) とアコニターゼ (分子量: 101.8 kDa) を融合させた F1 については 412 kDa のピークが確認された。これは CAD およびアコニターゼ単独発現した酵素分子量ピークよりも大きく、融合していることが明らかであった。また、融合酵素単量体分子量は 157 kDa であることから、二量体もしくは三量体を形成していることが示唆された。次に融合酵素 F1 を精製してクエン酸を基質とした反応を行い、Lineweaver-Burk plot から生化学的パラメーターである基質親和性 K_m 、反応最大速度 V_{max} 、比活性、触媒回転数 k_{cat} 、触媒効率 k_{cat}/K_m を求めた。CAD とアコニターゼを 1:1 のモル比で混合した非融合酵素による反応を control として、融合タンパク質 F1 と比較を行った。その結果、 $K_m = 28$ mM (control: 56 mM), $V_{max} = 4.7 \times 10^{-4}$ mM/s (3.3×10^{-4} mM/s), 比活性 0.1 U/mg protein (0.1 U/mg protein), $k_{cat} = 0.47$ s⁻¹ (0.34 s⁻¹), $k_{cat}/K_m = 1.0 \times 10^{-2}$ s⁻¹·mM⁻¹ (1.3×10^{-2} s⁻¹·mM⁻¹) であり、 K_m が酵素融合により低下する傾向が見られたため、基質濃度が低い場合には反応速度が高い可能性が示唆された。また、精製酵素を用いたイタコン酸生成では control と有意な差は見られず、融合タンパク質は control と同等のイタコン酸生成能を有することが示された。

また、低温菌に 6 種類をそれぞれ発現させたシンプル酵素触媒 (F1, F2, F3, R1, R2, R3) を構築し、変換反応を行い生産性について評価した。CAD とアコニターゼの単独発現株を control として全種類の融合タンパク質とのイタコン酸生産能を比較した。その結果、いずれの融合酵素でもイタコン酸を精製した。融合タンパク質は、control と比較して、Flexible リンカーで融合した酵素による反応において反応速度が高い傾向にある一方で、Rigid リンカーで融合した酵素による反応が遅い傾向にあった。しかし、24 時間後のイタコン酸生成量は control と大きく変わらなかった。

融合酵素のもう一つのメリットとして高分子化がある。本反応系では CAD の分子量が小さいためにこれを包括的固定化した場合、CAD が担体から漏出し、持続的反応に用いられないことが問題であった。そこで、変換酵素同士を融合させることで低分子酵素の漏出を防ぐことができるのではないかと考えた。そこで融合酵素を発現させたシンプル酵素触媒を低融点アガロースにて固定化した触媒による繰り返し利用について評価した。6 種の融合タンパク質 (F3, F2, F1, R3, R2, R1) を発現させた低温筋細胞を固定化し、繰り返し反応に適した融合タンパク質を選定した。その結果、Flexible、Rigid どちらも 2 回繰り返しリンカーで連結したものにおいて最も生産性が高いことが示された。

そこで、F2 と R2 においてさらに繰り返しして反応に用いた場合のイタコン酸生成量を検証した。control では反応回数とともに大きく生産量が減少したのに対し、融合酵素では減少は見られるものの、その低下は抑制されていることが示された。したがって、融合により高分子化した変換酵素が固定化単体内に保持されやすくなったといえる。格子サイズにより小さな単体との組み合わせにより、酵素の漏出を完全なものとするのが期待される。

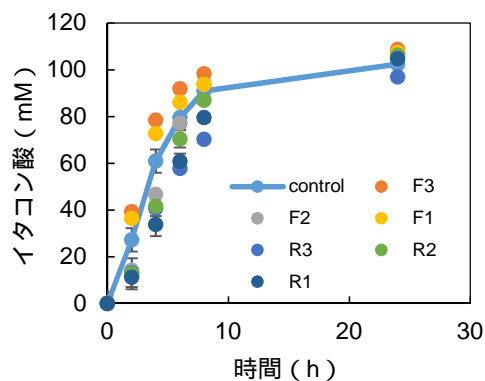


図 1 融合酵素発現株によるイタコン酸生産

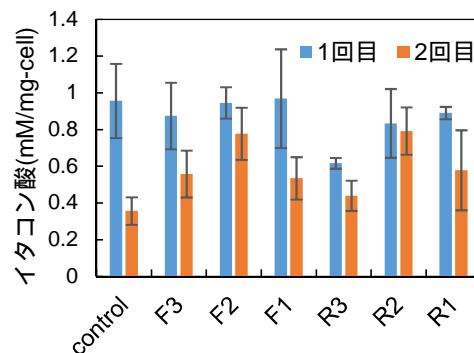


図 2 融合酵素発現株を用いた固定化触媒による 2 回繰り返し反応

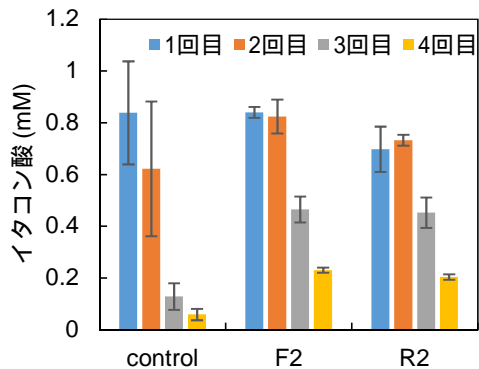


図 3 融合酵素 F2 および R2 発現株を用いた固定化触媒による 4 回繰り返し反応

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 G. Luo, M. Fujino, S. Nakano, A. Hida, T. Tajima, J. Kato	4. 巻 312
2. 論文標題 Accelerating itaconic acid production by increasing membrane permeability of whole-cell biocatalyst based on a psychrophilic bacterium <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biotechnology	6. 最初と最後の頁 56-62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiotec.2020.03.003	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25件（うち招待講演 2件/うち国際学会 10件）

1. 発表者名 田島誉久
2. 発表標題 シンプル酵素触媒によるイタコン酸の生産
3. 学会等名 第74回広島大学バイオマスイブニングセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田島誉久, 羅宮臨風, 中野翔, 緋田安希子, 加藤純一
2. 発表標題 低温菌シンプル酵素触媒によるイタコン酸の効率的生産
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahisa Tajima, Luo Gonglinfeng, Sho Nakano, Akiko Hida, Junichi Kato
2. 発表標題 Psychrophile-based Simple Biocatalyst for Efficient Conversion
3. 学会等名 The 14th Asian Congress on Biotechnology (ACB2019)（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Gonglinfeng Luo, Syo Nakano, Takahisa Tajima, Junichi Kato
2. 発表標題 Carboxylic acid production by psychrophilie-based simple catalyst
3. 学会等名 The 3rd International Symposium on Fuels and Energy (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤野美穂、羅宮臨風、中野翔、田島誉久、緋田安希子、加藤純一
2. 発表標題 シンプル酵素触媒における酵素の高機能化に関する研究
3. 学会等名 生物工学会若手研究者の集い夏のセミナー2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 羅 宮臨風, 田島誉久
2. 発表標題 低温菌Shewanella livingstonensis Ac10における熱透過全細胞触媒の開発
3. 学会等名 第77回広島大学バイオマスイブニングセミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahisa Tajima, Luo Gonglinfeng, Junichi Kato
2. 発表標題 Itaconic acid production by a marine psychrophilic bacterium
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Gonglinfeng Luo, Takahisa Tajima, Junichi Kato
2. 発表標題 Efficient production of itaconic acid using a psychrophile-based simple biocatalyst
3. 学会等名 第71回日本生物工学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野翔, 羅宮臨風, 田島誉久, 緋田安希子, 加藤純一
2. 発表標題 低温菌シンプル酵素触媒を活用したイタコン酸の効率的な生産
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度西日本・中四国支部合同沖縄大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤野美穂, 羅宮臨風, 中野翔, 田島誉久, 緋田安希子, 加藤純一
2. 発表標題 イタコン酸変換酵素の高機能化に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度西日本・中四国支部合同沖縄大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田島誉久
2. 発表標題 低温菌を活用したシンプル酵素触媒による効率的な物質変換
3. 学会等名 広島大学若手研究者による研究シーズ発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahisa Tajima, Gonglinfeng Luo, Syo Nakano, Miho Fujino and Junichi Kato
2. 発表標題 Efficient bioproduction by psychrophile-based simple biocatalyst
3. 学会等名 25th Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鴨木 明子, 田島 誉久, 小西 正朗, 八久保 晶弘, 坂上 寛敏, 南 尚嗣, 山下 聡, 中島田 豊, 加藤 純一
2. 発表標題 低温菌を活用したシンプル酵素触媒構築のための基盤技術の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第51回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mohammad MOJARRAD, Takahisa Tajima, Junichi Kato
2. 発表標題 Simultaneous production of 3-Hydroxypropionic acid and 1,3-Propanediol by psychrophile-based simple biocatalysts in <i>Shewanella</i> sp.
3. 学会等名 The 2nd International Symposium on Fuels and Energy (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Luo GONGLINFENG, Takahisa Tajima, Junichi Kato
2. 発表標題 Carboxylic acid production by psychrophile-based simple catalyst
3. 学会等名 The 2nd International Symposium on Fuels and Energy (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鴨木明子, 田島誉久, 小西正朗, 八久保晶弘, 坂上寛敏, 南尚嗣, 山下聡, 中島田豊, 加藤純一
2. 発表標題 低温菌シンプル酵素触媒の宿主とその培養に関する基盤的解析
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野翔, 羅宮臨風, 田島誉久, 加藤純一
2. 発表標題 低温菌を活用したシンプル酵素触媒によるジカルボン酸の効率的生産
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mohammad Mojarrad, Takahisa Tajima, Akiko Hida, Junichi Kato
2. 発表標題 Simultaneous production of 3-Hydroxypropionic acid and 1,3-Propanediol by psychrophile-based simple biocatalysts in <i>Shewanella</i> sp.
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Luo Gonglinfeng, Takahisa Tajima, Yutaka Nakashimada, Junichi Kato
2. 発表標題 Carboxylic acid production by psychrophile-based simple catalyst
3. 学会等名 The 1st International Symposium on Fuels and Energy (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takahisa Tajima, Mai Hamada, Koji Fuki, Yutaka Nakashimada, Junichi Kato
2. 発表標題 Bioproduction by psychrophile-based simple biocatalysts
3. 学会等名 The 1st International Symposium on Fuels and Energy (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kazumasa Mori, Ami Tsuzuki, Takahisa Tajima, Yutaka Nakashimada, Junichi Kato
2. 発表標題 Efficient conversion system with NADH regeneration by the psychrophile-based simple biocatalyst
3. 学会等名 The 1st International Symposium on Fuels and Energy (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森一将、津々木亜美、田島誉久、廣田隆一、黒田章夫、中島田豊、加藤純一
2. 発表標題 低温菌シンプル酵素触媒における補酵素再生系に関する研究
3. 学会等名 生物工学若手研究者の集い2017夏のセミナー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森一将、津々木亜美、田島誉久、廣田隆一、黒田章夫、中島田豊、加藤純一
2. 発表標題 低温菌シンプル酵素触媒における補酵素再生系に関する研究
3. 学会等名 第69回日本生物工学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takahisa Tajima, Mai Hamada, Koji Fuki, Yutaka Nakashimada, Junichi Kato
2. 発表標題 Efficient conversion by psychrophile-based simple biocatalysts
3. 学会等名 The 23rd Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community (YABEC 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田島 誉久, 鴨木 明子, 小西 正朗, 八久保 晶弘, 坂上 寛敏, 南 尚嗣, 山下 聡, 中島田 豊, 加藤 純一
2. 発表標題 北海道東沖海底堆積物より取得した低温性微生物の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 低温菌を用いたイタコン酸の製造方法	発明者 田島誉久、加藤純一、羅宮臨風	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-124796	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

低温菌を用いたシンプル酵素触媒の開発 https://home.hiroshima-u.ac.jp/~mbiotech/kato_lab/psychrophile.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
---------	---------------------------	-----------------------	----