

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05805

研究課題名(和文) 異種遺伝子を発現させたロドコッカス細胞を反応場とする物質変換系の開発

研究課題名(英文) Development of enzymatic conversion using Rhodococcus cells expressing heterologous genes

研究代表者

吉田 豊和 (YOSHIDA, Toyokazu)

岐阜大学・工学部・教授

研究者番号：90220657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ロドコッカス宿主は高GC含量の異種遺伝子を発現させることに適しており、宿主細胞内で酵素は安定に活性を維持していた。また、ロドコッカス細胞は有機溶媒耐性を示し、細胞内に発現させた酵素は、大腸菌を宿主とした場合よりも有機溶媒存在下の反応で高活性を維持していた。ロドコッカス宿主による物質変換では、長時間の反応においても酵素活性が安定に保持され、大腸菌宿主では得られなかった高濃度での基質変換が可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ロドコッカス宿主は高GC含量の異種遺伝子の発現に優位であるだけでなく、その細胞は堅牢かつ有機溶媒耐性を示した。従来は大腸菌細胞が汎用されてきたが、ロドコッカス宿主は酵素による物質変換における新たなツールとして位置づけられる。NADPHの再生系を内在していることから、酵素による物質生産という応用面でも利用価値が高いことが判明した。

研究成果の概要(英文)：Rhodococcus host was suitable for expression of heterologous genes with high GC content, and the enzyme maintained stable activity in the host cells. Rhodococcus cells were resistant to organic solvents, and the enzyme expressed in the cells maintained higher activity in reactions in the presence of organic solvents than in the case of the E. coli host. In the conversion of substances by the Rhodococcus host, the enzyme activity remained stable even in a long reaction time, and substrate transformation at high concentrations, which could not be obtained with the E. coli host, was possible.

研究分野：応用微生物学

キーワード：酵素変換 Rhodococcus 異種遺伝子発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物酵素を利用して有用化合物を合成する場合、細胞破碎して調製した酵素液や固定化酵素を用いる場合と、集菌した微生物細胞を「酵素の入った袋」とみなして基質に作用させる手法がある。後者では、微生物は生育しないが、酵素は細胞内で機能するため、微生物細胞は「休止菌体」と呼ばれる。強い酵素活性をもつ野生株の休止菌体を用いる物質変換が旧来から検討されていたが、近年、酵素遺伝子を大腸菌で高発現させ、組換え大腸菌の休止菌体で物質変換する研究が多く報告されている。しかし、大腸菌細胞は万能でなく、物質変換の反応時間が長い場合や有機溶媒を添加した反応系では細胞が溶解して酵素が失活し、酵素が触媒能を発揮できない事例も多い。

放線菌として知られる *Rhodococcus* 属細菌はグラム陽性菌で、種々の脂肪族・芳香族・複素環化合物を分解する能力に長け、その細胞は有機溶媒耐性を示す。このような細胞特性に基づき、*Rhodococcus* 宿主においてタンパク質を発現させるベクター系(田村ら, *J. Environment. Biotechnol.*, 7,3-10, 2007)が開発・市販され、その改良が施されている。しかし、開発された宿主ベクター系を用いた異種遺伝子の機能発現に関する報告が幾つかあるが、大腸菌で発現が困難であった遺伝子への利用に主眼がおかれていた。そこで本研究では、*Rhodococcus* 属細菌の細胞を「酵素の入った堅牢な袋」とみなした物質変換に活用することを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、*Rhodococcus* 属細菌において異種遺伝子を発現させ、「酵素の入った袋」として物質変換に活用することを目的とし、(1)宿主用に開発されているベクター系の評価、(2)*Rhodococcus* 属宿主における酵素遺伝子発現の検討、(3)*Rhodococcus* 細胞がもつ有機溶媒耐性の優位性の評価、を検討することとした。

また、(4)物質変換系に *Rhodococcus* 宿主を活用することを目的とし、*N*-アシル環状アミンの立体選択的加水分解を触媒する新奇酵素による光学活性環状アミンの合成、機能性を向上させたイミン還元酵素による光学活性環状アミンの効率的合成、について研究を進めた。

3. 研究の方法

以下の全ての項目において、*R. erythropolis* L88 を宿主として用いた。

(1) 3系統の宿主用ベクター系の評価

R. erythropolis L88 用ベクターとして、チオストレプトン誘導型プロモータをもつ pTip 系、構成型プロモータをもつ pNit 系(中程度発現)と pCpi 系(高発現)が開発されている。*Streptomyces* 属由来の3種のイミン還元酵素遺伝子は、GC含量が67-69%と高いため、大腸菌宿主での発現が良好でない。そこで、研究室保有の *Streptomyces* 属イミン還元酵素の中で、比活性が最も高い *R* 体選択的酵素 RIR87 を用いて3系統のベクターの評価を行った。

(2) *Rhodococcus* 属宿主における酵素遺伝子発現の検討

Arthrobacter 属細菌由来の Boc 基脱離酵素遺伝子を大腸菌において発現させると、酵素タンパク質は生成するが全て封入体となる。この酵素タンパク質のフォールディングが宿主に依存するかを検証するために、*Rhodococcus* 宿主での発現を検討した。ベクターには(1)において発現が良好であった pTipRT2 ベクターを用いた。

Rhodococcus sp. D32 がもつエステラーゼの一つは、2-エチル-2-メチルマロン酸ジエチルなどのマロン酸ジエステル類に作用し、立体選択的にモノエステルを生成する有用酵素である。しかし、野生株の活性は極めて低く、エステラーゼ遺伝子を導入した組換え大腸菌においても物質変換に適用できる活性は得られなかった。そこで、*Rhodococcus* 属宿主と pTipRT2 ベクターを用いて高発現株の作製を行った。

(3) *Rhodococcus* 細胞がもつ有機溶媒耐性の優位性の評価

宿主細胞の有機溶媒耐性については、(2)において作製した Boc 基脱保護酵素と立体選択的エステラーゼ遺伝子を発現させた *Rhodococcus* 宿主で実施した。遺伝子導入した *Rhodococcus* および大腸菌の組換え体を用いて種々の有機溶媒を添加して休止菌体反応で評価した。

(4) 物質変換系への *Rhodococcus* 宿主の活用

立体選択的加水分解を触媒する新奇ハイドロラーゼによる光学活性環状アミンの合成
Arthrobacter sp. K5 からハイドロラーゼを精製し、一次構造情報と全ゲノム配列から酵素遺伝子を同定し、*Rhodococcus* 宿主で異種発現させた。組換え体の休止菌体を用いて、環状アミンの速度論的光学分割を実施した。

イミン還元酵素による光学活性環状アミンの効率的合成

大腸菌では発現が良好でなかった高 GC 含量の *Streptomyces* 属由来イミン還元酵素遺伝子を取りあげ、*R* 体および *S* 体の 2-メチルピロリジンの高濃度酵素合成を検討した。3種のイミン還元

酵素遺伝子を *Rhodococcus* 宿主と大腸菌宿主において発現させ、それぞれの休止菌体による変換反応を比較した。イミンの還元反応には NADPH が必要であるが、*Rhodococcus* 宿主では内在するグルコース脱水素酵素 (GDH) によって NADP⁺ から NADPH が再生されるとされており、その要求性と遺伝子レベルでの再生系遺伝子の同定を進めた。また、S 体選択性のイミン還元酵素は酵素の比活性と安定性が低いため、熱安定性を指標とした指向進化を施し、得られた変異酵素を用いて生産性の向上を図った。

4. 研究成果

(1) 3 系統の宿主用ベクター系の評価

R 体選択性を示すイミン還元酵素 RIR87 の遺伝子を pTip 系、pNit 系、pCpi 系ベクターにそれぞれ組み込み、*R. erythropolis* L88 において発現させた。組換え体の酵素活性を評価した結果、pTip 系ベクターである pTipRT2 と pTipQC1 で良好な発現が認められた。他のイミン還元酵素 2 種についても pTipRT2 を用いて *Rhodococcus* 宿主で遺伝子発現させ、高活性が確認された。

(2) *Rhodococcus* 属宿主における酵素遺伝子発現の検討

Arthrobacter 属細菌の Boc 基脱保護酵素遺伝子を pTipRT2 ベクターに組み込み、*Rhodococcus* 宿主に形質転換した。チオストレプトンで発現誘導後の培養温度を検討した結果、24 °C で 24 時間の培養で最大の酵素活性が認められた。20 °C では誘導時間を延ばすと活性は高まるが、比活性は 24 °C よりも低下した。28 °C では 24 °C に比べて 4 分の 1 程度の活性であり、18 °C ではほとんど活性を示さなかった。培地 pH は、pH6.5 から 8.0 の範囲で比活性に変化は見られなかったが、pH5.5 では生育がほぼ見られず、最適 pH は 7.5 とした。Boc 基脱保護酵素遺伝子の発現を SDS-PAGE で確認した。大腸菌では全て封入体となっていたが、*Rhodococcus* 宿主においては完全に可溶化した状態で酵素タンパク質が確認された。酵素タンパク質のフォールディングに参与する因子が *Rhodococcus* 宿主内で機能していることが示唆される。

Rhodococcus sp.D32 の立体選択的エステラーゼについても pTipRT2 ベクターを用いて遺伝子発現を行った。発現誘導の温度条件の検討から、24 °C で 20-24 時間、あるいは 20 °C で 24 時間が最適であることが判明した。この結果は上述の Boc 基脱保護酵素の場合とほぼ同じである。プロトコールでは 28 °C で 16 時間と記載されているが、24 °C が適切であると考えられる。SDS-PAGE でエステラーゼの発現を大腸菌の場合と比較したところ (図 1)、活性は大腸菌の約 10 倍であり (野生株の約 100 倍) SDS-PAGE においても明瞭にタンパク質バンドが検出された。

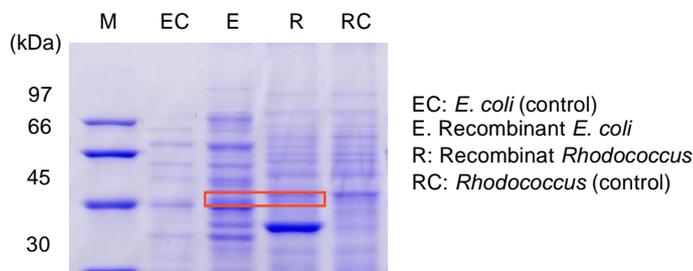


図 1 大腸菌と *Rhodococcus* での酵素発現の比較

今後検討すべき項目としては、低 GC 含量の異種遺伝子を *Rhodococcus* 宿主において高発現させることである。

(3) *Rhodococcus* 細胞がもつ有機溶媒耐性の優位性の評価

Arthrobacter 属細菌の Boc 基脱保護酵素遺伝子を発現させた *Rhodococcus* 菌体を用い、5% (v/v) の有機溶媒を添加した反応で Boc 基脱保護活性を測定した。メタノール、アセトニトリル (MeCN)、ジメチルホルムアミド (DMF) の添加では 100-111% の相対活性を示し、イソプロパノール、テトラヒドロフラン (THF)、ジメチルエーテル (DME) では活性が低下した (21-45%)。この実験結果は、宿主細胞の有機溶媒耐性によるのか、酵素分子の有機溶媒耐性に由来するかが判明しなかった。そこで、大腸菌においても酵素遺伝子が発現する *Rhodococcus* sp.D32 立体選択的エステラーゼを用いて有機溶媒耐性を検討した。

立体選択的エステラーゼ遺伝子を *Rhodococcus* 宿主および大腸菌で発現させ、各種の有機溶媒存在下 (5%, v/v) で休止菌体を用いて 24 時間反応させた結果、酵素活性に明瞭な差異が認められた (図 2)。大腸菌宿主では顕著な活性の低下あるいは消失が認められた有機溶媒存在下においても、*Rhodococcus* 細胞を宿主とした場合には 55% 以上の活

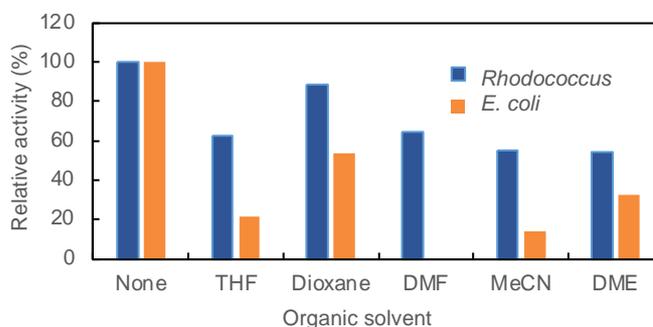


図 2 有機溶媒が酵素活性に及ぼす影響

性が保持されていた。酵素自体の有機溶媒耐性が低い場合でも、*Rhodococcus* 宿主において酵素遺伝子を発現させれば、難水溶性基質の変換に活用できる可能性を示唆している。

(4) 物質変換系への *Rhodococcus* 宿主の活用

立体選択的加水分解を触媒する新奇ハイドロラーゼによる光学活性環状アミンの合成

N-ピバロイル-2-メチルピペリジンの加水分解を触媒するハイドロラーゼを *Arthrobacter* sp. K5 から精製し、一次構造情報と全ゲノム配列から酵素遺伝子を同定した。酵素の一次構造解析では、既知のハイドロラーゼと 50-67%の相同性を示す程度で、新奇性の高い酵素であった。(2)の実験において *Arthrobacter* 属の Boc 基脱離酵素遺伝子が *Rhodococcus* 宿主において良好に発現したことを踏まえ、同様に pTipRT2 ベクターを用いて組換え体を作成した。

組換え体の休止菌体を触媒として用い、ラセミ体の *N*-ピバロイル-2-メチルピペリジンから 2-メチルピペリジン (2-MPI) へと変換する反応条件を最適化した。ラセミ体の基質 100 mM に休止菌体を作用させると、72 時間の時点で変換率 48%、光学純度 83.5% ee で *S* 体の 2-MPI が生成した (図 3)。野生株 *Arthrobacter* sp. K5 の休止菌体での酵素変換では、反応 24 時間以降に変換速度が低下し、115 時間後に 38%の変換率に留まった。

Rhodococcus 組換え体の細胞内では酵素が安定に保持されたため、高い変換率に達しと考えられる。

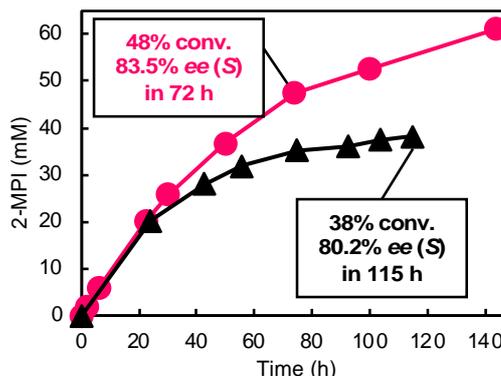


図 3 光学活性2MPIへの酵素変換
赤：Rhodococcus組換え体、黒：野生株

イミン還元酵素による光学活性環状アミンの効率的合成

*R*体選択性を示すイミン還元酵素 (RIR87 と RIR85) と *S*体選択性を示すイミン還元酵素 (SIR46) の遺伝子を *Rhodococcus* および大腸菌において発現させ、休止菌体反応で 2-メチル-1-ピロリンから 2-メチルピロリジン (2-MP) への不斉還元を行った (図 4)。不斉還元反応は補酵素として

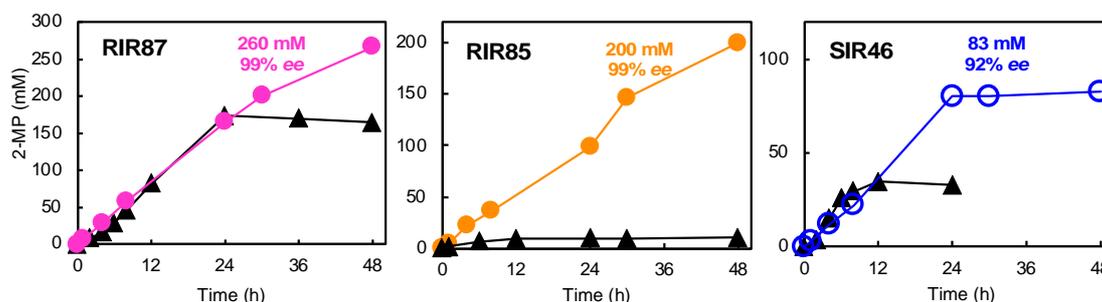


図 4 イミン還元酵素遺伝子組換え体による2-メチル-1-ピロリンからの2-メチルピロリジンへの不斉還元
色付き：Rhodococcus組換え体、黒：大腸菌組換え体

NAAPH を要求するため、大腸菌宿主では NADPH 再生系としてグルコース脱水素酵素 (GDH) を共発現させ、グルコースと 1 mM の NADPH を反応系に添加した。一方、*Rhodococcus* 宿主では内在の GDH が機能するとされているため、NADPH 再生系は導入しなかった。反応系にグルコース添加は必要であったが、NADPH の添加は不要であった。RIR87 については両宿主において変換初速度の差はなかったが、24 時間以降では *Rhodococcus* 宿主のみで反応が進行した。大腸菌宿主での実験で、生成物阻害が生じることが判明しており、*Rhodococcus* 宿主では生成物阻害が回避されたと推察される。RIR85 は大腸菌における遺伝子発現が不良であったが、*Rhodococcus* においては発現が良好で、200 mM の *R* 体 2-メチルピロリジンを蓄積した。SIR46 においても大腸菌宿主と比べて明瞭な差異が認められたが、生成物濃度は 83 mM に留まった。SIR46 の比活性が RIR87 と RIR85 より低く、安定性も劣ることに起因している。しかしながら、*Rhodococcus* 宿主では 24 時間まで 2-MP への変換が継続していた。

上述の *Rhodococcus* 細胞に内在する NADPH 再生系について、酵素活性レベルで検討した。無細胞抽出液を調製し、グルコースを基質として NADP⁺からの NADPH を生成する GDH 活性を測定したが、有意な活性は認められなかった。グルコース-6-リン酸を基質とした場合に明瞭な NADPH の生成が検出され、NADPH 再生系にグルコース-6-リン酸脱水素酵素が関与することが示唆された。*R. erythropolis* L88 のゲノム上には GDH と命名されている遺伝子が一つあり、今後、この遺伝子とグルコース-6-リン酸脱水素酵素の関連性について検討を加える。

次に、*S* 体への不斉還元を触媒する SIR46 の機能性の向上を図るために、SIR46 酵素分子への変異導入を行った。野生型 SIR46 は保存安定性が低く、4 月の保存で 1 ヶ月後の残存活性は 34%、35 日の保存で 1 日後には 4%しか活性を示さない。そこで、変異導入による安定性の向上を検討

した。SIR46 およびそのホモログの一次構造アライメント、SIR46 立体構造モデルにもとづき、変異点候補と置換アミノ酸を決定して変異酵素を作成した。40-60 で30分間熱処理を行い、熱安定性が向上した変異酵素を選抜した。最終的に、有効な変異の組合せによって、9アミノ酸を置換したM9変異体を得た。M9変異体は50 で30分の熱処理によって全く活性を失わず、また、酵素活性も約2倍となった。M9変異体は野生型酵素に比べて高濃度基質の存在下でも強い活性を示し、立体選択性は92%eeを保持したままであった。このM9変異体酵素遺伝子を *Rhodococcus* 宿主で発現させ、高濃度での2-メチル-1-ピロリンの不斉還元を菌体反応で実施した(図5)。

200-500 mMのいずれの基質濃度においても反応初速度は変わらず、高濃度での酵素変換を達成した。

以上のように、*Rhodococcus* 属宿主の細胞を「酵素の入った堅牢な袋」として、物質変換の反応場として活用することができた。今後は、難水溶性基質を有用化合物へと変換する酵素を用い、有機溶媒耐性を示す *Rhodococcus* 宿主細胞の特性を活かした物質変換系の検討を進める予定である。

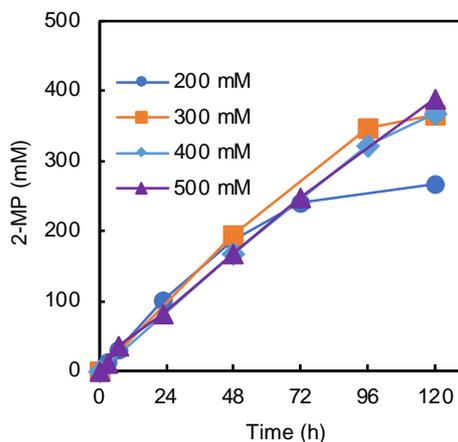


図5 SIR46変異体M9による2-メチル-1-ピロリンの不斉還元

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 1件）

1. 著者名 Yuta Fukawa, Yuta Mizuno, Keisuke Kawade, Koichi Mitsukura, Toyokazu Yoshida	4. 巻 11
2. 論文標題 Novel (S)-Selective Hydrolase from Arthrobacter sp. K5 for Kinetic Resolution of Cuclic Amines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Catalysts	6. 最初と最後の頁 809-817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/catal11070809	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fukawa Yuta, Yoshida Keita, Degura Sayaka, Mitsukura Koichi, Yoshida Toyokazu	4. 巻 58
2. 論文標題 Improvement of (S)-selective imine reductase GF3546 for the synthesis of chiral cyclic amines	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 13222 ~ 13225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2cc05116h	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yuta Fukawa, Yuta Mizuno, Keisuke Kawade, Koichi Mitsukura, Toyokazu Yoshida
2. 発表標題 Enantioselective synthesis of cyclic amines using a novel hydrolases
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 府川 裕太、吉田 佳太、満倉 浩一、吉田 豊和
2. 発表標題 イミン還元酵素の異種発現系を用いたキラルアミン合成
3. 学会等名 第22回生体触媒化学シンポジウム
4. 発表年 2020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
---------	---------