

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22360343

研究課題名（和文）

化学品製造のために生体触媒利用技術を飛躍的にシンプル化するための基盤技術開発

研究課題名（英文）

Development of basic technology to simplify biocatalytic processes for the production of chemicals

研究代表者

大竹 久夫 (OHTAKE HISAO)

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：10127483

研究成果の概要（和文）：化学品製造のための新規の簡便な生体触媒プロセスを開発した。本プロセスでは、耐熱性酵素が利用できる限りどんな化合物でも生産でき、その酵素も単離精製する必要がない。合成にはWhole cellを用いるが、耐熱性をもたない酵素は加熱で失活するので、副産物の生成が抑制される。また、生細胞を使用しないので、反応には複雑な組成の培養液や制御系を必要としない。本技術を用いてモデル化合物を高い変換効率で生産できた。

研究成果の概要（英文）：We have developed a simple, new bioproduction platform which is potentially applicable to the synthesis of specialty chemicals. The newly developed process has many potential advantages: (i) whatever target metabolites can be specifically produced; (ii) enzyme purification is not required; (iii) no by-product is formed; (iv) bioconversions can be performed using a simple reactor without elaborate process control; and (v) reaction can be prevented from microbial contamination.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2011年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2012年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：生物化学工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：耐熱性酵素、生体触媒、バイオプロセス、加熱処理

## 1. 研究開始当初の背景

バイオリファイナリー技術に続く次世代の技術開発課題は、多様な化成品を自在に製造できる生体触媒利用技術の開発である。化成品製造分野にバイオプロダクション技術を導入するためには、生体触媒利用技術を化

学触媒利用技術並みに飛躍的に簡略化し、バイオプロセスを化学プロセス並みにシンプル化することである。これまで、化学触媒利用技術に較べると、生体触媒利用技術は複雑で手間とコストが掛かるために、生体触媒利用技術の化成品製造分野への進出が阻まれ

ていた。生体触媒利用技術を化学触媒利用技術並みに簡素化するためには多くの課題を克服する必要があるが、国内・国外いずれにおいても、生体触媒利用技術を化学触媒利用技術並みに簡略化することに焦点を当てた戦略的研究は行われていなかった。

## 2. 研究の目的

多様な化成品を自在に製造できる生体触媒利用技術の開発は、バイオリファイナリー技術に続く次世代バイオプロダクション技術として、大きな期待を集めつつある。化成品製造のためのバイオプロダクション技術を開発するためには、生体触媒利用技術を化学触媒利用技術並みに徹底的に簡素化する必要がある。本研究の目的は、①生体触媒を精製する必要がなく、②副産物を生成せず、③多様な化学原料を変換でき、④雑菌汚染の心配もなく、⑤複雑な培養制御もいらぬ、夢のバイオプロダクション新技術を開発することである。

## 3. 研究の方法

超好熱菌より耐熱性酵素遺伝子をクローニングする(工程①)。耐熱性酵素遺伝子を大腸菌や親油性放線菌などの中温菌で高発現させる(工程②)。形質転換株を30-37°Cで大量培養する(工程③)。培養した菌体を70-100°Cの高温で処理する(工程④)。加熱処理により、耐熱性酵素以外の酵素が総て失活し、変成した蛋白質や核酸により耐熱性酵素が細胞内に固定されるとともに、細胞表層に無数の小孔が形成されて物質の透過性が高まる。耐熱性酵素のみが機能し細胞の物質透過性が高まった死滅細胞を固定化耐熱生体触媒として回収し、合成反応に用いる(工程⑥)。

## 4. 研究成果

フラクトースからフラクトース 1,6-ビスリン酸の合成を行うため、好熱菌の *Thermus thermophilus* よりフラクトキナーゼ、ホスホフラクトキナーゼおよびポリリン酸キナーゼをコードする遺伝子を取得し、大腸菌の Rosetta2 (DE3) pLysS 株で発現させた。3つの遺伝子を同時に発現させた形質転換体を用いて、温度70°Cで反応を試みたところ、10 mMのフラクトースからほぼ100%の収率でフラクトース 1,6-ビスリン酸が生産された。この結果は、酵素を精製しなくとも、代謝されやすいフラクトースを副産物の生成なしに、目的物質であるフラクトース 1,6-ビスリン酸に高い収率で変換できることを示している。また、*T. thermophilus* 由来の耐熱性ポリリン酸キナーゼがATPの再生系として機能するとともに、ATPによるフラクトキナーゼの高濃度阻害の防止にも効果的であるこ

とを示していた。

次に、フラクトースからの2-デオキシリボース 5-リン酸(DR5P)の合成を試みた。DR5PはDNA合成の中間体であるが、ここでは生体内でマイナーな合成経路であるデオキシリボアルドラーゼ反応を経由するショートカット経路に着目した。フラクトースを原料物質とし6種類の耐熱性酵素からなる人工代謝経路を大腸菌の Rosetta2 (DE3) pLysS 株に構築したところ、10 mMのフラクトースから副産物の生成なしに約5.5 mMのDR5Pを生産できた。この結果は、本技術が代謝経路をショートカットしたり、生細胞ではマイナーな代謝経路でもものづくりに活用することが可能であることを示していた。

グリセロールからのグリセロール 3-リン酸の合成も試みた。好熱菌 *T. thermophilus* 由来の耐熱性グリセロールキナーゼおよびポリリン酸キナーゼをコードする遺伝子は大腸菌 Rosetta2 (DE3) pLysS 株で発現させ、副産物を生成することなく、100 mMのグリセロールから約80 mMのグリセロール 3-リン酸を合成した。面白いことに、外膜結合型のポリリン酸キナーゼは、反応中も細胞内に保持されていたが、細胞質酵素であるグリセロールキナーゼは細胞から漏出することが見出された。そこで、グリセロールキナーゼと細胞膜結合タンパク質の融合タンパク質を作成することにより、酵素の細胞からの漏出が低減できることを見出した。

疎水性細菌 *Rhodococcus opacus* B-4 株の細胞は、水を殆ど含まない有機溶媒耐中に非常によく分散するという面白い性質をもつ。そこで、疎水性細菌 *R. opacus* B-4 株を中温菌宿主に選び、難水溶性の2,2,2-トリフルオロアセトフェノンから(R)--(トリフルオロメチル)ベンジルアルコールの合成を試みた。好熱菌 *T. thermophilus* 由来の2種類のアルコール脱水素酵素遺伝子を疎水性細菌 *R. opacus* B-4 株で発現させ、この還元反応を触媒させるとともに、シクロヘキサノールを基質として補酵素 NADH を再生させた。70°Cで加熱処理した *R. opacus* B-4 株の形質転換株は、水を殆ど含まない反応系において、ほぼ100%の変換収率で(R)--(トリフルオロメチル)ベンジルアルコールを生産した。

一般に、グルコースからエタノールを生産する場合、Embden-Meyerhof (EM) 経路を経ればグルコース1分子あたり2分子のATPが生産される。一部のアーキアにはADP依存型キナーゼなどのユニークな補酵素要求性を有した酵素からなる変形EM経路の存在が知られている。原核・真核生物型のEM経路において、グリセロアルデヒド-3-リン酸(GAP)から3-ホスホグリセリン酸(3-PG)への変換は、GAPデヒドロゲナーゼ(GAPDH)によるリン酸依存型の脱水素反応とホスホグリセリン酸

キナーゼ(PGK)による脱リン酸化反応の2段階から成り立っており、この一連の反応でGAP 1分子あたり1分子のATPが産生される。一方、変形 EM 経路中ではリン酸非依存的にGAPを脱水素するGAPフェレドキシン酸化還元酵素や non-phosphorylating GAPDH(GAPN)により、GAPは1段階の反応で直接3-PGへと変換される。GAPNが触媒する反応ではATP産生は伴わないため、原核・真核生物型EM経路中のGAPDHおよびPGKをアーキア由来のGAPNに置換することでATP収支の合致したキメラ型EM経路を構築することが可能となる。

*Thermococcus kodakarensis* 由来のGAPNならびに *Thermus thermophilus* 由来の原核生物型EM経路酵素群を組み合わせたキメラ型EM経路を構築し、これを用いたグルコースからの乳酸生産に取り組んだ。なお、本経路の最終ステップとなるピルビン酸から乳酸へのNADH依存的還元反応は通常、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)によって触媒されるが、*Thermus thermophilus* 由来LDHは、比較的低濃度(0.5 mM以上)のNAD<sup>+</sup>存在下で阻害を受け、同経路内ではほとんど機能しない。そこで、同細菌よりLDHと同様の反応を触媒可能な別の酵素を探索し、リンゴ酸/乳酸デヒドロゲナーゼ(MLDH)を選抜した。生きた細胞を用いない本手法では、転写・翻訳レベルでの調節作用に束縛されない物質生産が可能であることは言うまでもないが、このように異なる代謝経路に由来する酵素を組み合わせることによりタンパク質レベルで作用するアロステリック調節をも回避できる点には着目すべきと思われる。構築されたキメラ型EM経路を用い、6 mMのグルコースから理論収率どおりの12 mMの乳酸を生産させることに成功した。

また、代謝反応の中核を担うpyruvateからacetyl-CoAへの反応であるpyruvate decarboxylation経路を取り上げ、本技術による人工的な再構築とその応用可能性を実証した。具体的にはまず、pyruvateからacetyl-CoAへの反応であるpyruvate decarboxylation経路を利用するacetyl-CoA再生系において、合成代謝工学に基づきApPDCとTtALDHの二つの耐熱性酵素モジュールの組み合わせによる人工pyruvate decarboxylation経路を再構築した。ApPDCなどの中温性微生物由来の酵素など、好熱性微生物由来の酵素ほどの耐熱性がない酵素であっても、60°Cにおける熱処理により耐熱性酵素モジュールを作製できたことから、60°C程度の温度においてある一定の耐熱性を保有しており、かつ大腸菌などの中温性微生物内で酵素の発現が可能であれば中温性微生物由来の酵素であっても合成代謝工学へ応用できる事が実証された。

人工pyruvate decarboxylation経路は高

価な補酵素であるNAD<sup>+</sup>消費型の酸化反応であり、反応を継続的に実施するためにはNAD<sup>+</sup>を反応に必要な等量用いることが必要であるが、NAD<sup>+</sup>再生系としてTtGluDHを導入することでNAD<sup>+</sup>再生系が機能し、反応に必要なNAD<sup>+</sup>を等量用いる必要がないことが実証された。N-Acetyl-L-glutamateの生産においてCoA系化合物の総濃度が0.4 mMの反応ではCoA系化合物のTTNが約12、0.04 mMの反応ではTTNが約73であり、今回構築された人工pyruvate decarboxylation経路は新たなacetyl-CoA再生系として利用可能であることが示唆された。

最終生産物濃度という点からは、まだ十分に満足できる値には到達していないものの、本手法の魅力のひとつは反応条件に制約が少ない点にあり、酵素濃度を高めることで生産速度ならびに生産物濃度を向上させることは十分に可能であると考えられる。あるいは、固定化处理などにより一連の代謝酵素を空間的に近接させることも、今後の化学品生産の向上を目指すうえでの魅力的な技術的課題となると思われる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計10件)

- ① N. Wangthamrongwit, K. Klinsakul, A. S. Vangnai, J. Wongkongkatap, P. Inprakhon, K. Honda, H. Ohtake, J. Kato and T. Pongtharangkul, Bioproduction of Vanillin using an Organic Solvent-tolerant *Brevibacillus agri* 13. Appl. Microbiol. Biotechnol., (査読あり) 93, (2012) 555-563.
- ② E. Restiawaty, K. Honda, K. Okano, R. Hirota, T. Omasa, A. Kuroda, H. Ohtake, Construction of membrane-anchoring fusion protein of *Thermococcus kodakaraensis* KOD1glycerol kinase and its application to repetitive batchwise reactions. J. Biosci. Bioeng., (査読有り) 113, (2012) 521-525.
- ③ Ye, X., Honda, K., Sakai, T., Okano, K., Omasa, T., Hirota, R., Kuroda, A., and Ohtake, H., Synthetic metabolic engineering-A novel, simple technology for designing a chimeric metabolic pathway-, Microb. Cell Fact., (査読有り) 11, (2012) 212.
- ④ Cappelletti, M., Fedi, S., Frascari, D., Ohtake, H., Turner, R. J., and Zannoni, D., Analyses of both the alkB gene transcriptional start site and alkB promoter inducing properties in *Rhodococcus* sp. BCP1 as grown on n-alkanes. Appl. Environ. Microbiol., (査読有り), 77, (2011) 1619-1627.

〔学会発表〕（計 12 件）

- ① 本田孝祐、今川貴志、Ye Xiaoting、岡野憲司、大竹久夫、合成代謝工学による人工ピルビン酸酸化経路の構築、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013. 3. 26、仙台。
- ② 本田孝祐、Ye Xiaoting、岡野憲司、大竹久夫、Construction of a chimeric glycolysis pathway by synthetic metabolic engineering、IBS2012、2012. 9. 18、大邱、韓国
- ③ 本田孝祐、Ye Xiaoting、岡野憲司、大竹久夫、Synthetic metabolic engineering -A novel, simple technology for designing a chimeric metabolic pathway-、Society of Biotechnology, Japan, International Symposium on Green Growth、2012. 10. 26、神戸市
- ④ 本田孝祐、廣田隆一、黒田章夫、大竹久夫、Synthetic Metabolic Engineering -the proof of concept-、International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS 2011)、2011. 9. 20、Sapporo.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大竹 久夫 (OHTAKE HISAO)  
大阪大学・工学研究科・教授  
研究者番号：10127483

### (2) 研究分担者

本田 孝祐 (HONDA KHOSUKE)  
大阪大学・工学研究科・准教授  
研究者番号：90403162