

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780078

研究課題名(和文) モジュール型生体触媒によるキメラ代謝経路構築と化学品生産への応用

研究課題名(英文) Construction of in vitro artificial metabolic pathway using thermo-tolerant enzymes

研究代表者

本田 孝祐 (Honda, Kohsuke)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90403162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、好熱菌(55℃以上の高温環境下でも生育可能な微生物)などが生産する耐熱性酵素を試験管内で自在に組み合わせ、有用物質生産に利用可能な人工代謝経路を構築する技術の確立を目指し実施されたものである。特に本課題では、解糖系の最終産物であるピルビン酸から、多くの代謝経路のハブとなる重要な中間体であるアセチルCoAへの酸化的脱炭酸反応に着目し、本反応を試験管内で再現するとともに、これを用いた有用物質の生産に取り組んだ。この結果、4種類の耐熱性酵素を用い、ピルビン酸と α -ケトグルタル酸を原料に55% (mol/mol)の高い収率でN-アセチルグルタミン酸を生産することに成功した。

研究成果の概要(英文)：An artificial pyruvate decarboxylation pathway, through which pyruvate can be converted to acetyl-CoA, was constructed by using a coupled enzyme system consisting of thermo-tolerant pyruvate decarboxylase and CoA-acylating aldehyde dehydrogenase. To demonstrate the applicability of the artificial pathway for chemical production, a cofactor-balanced and CoA-recycling synthetic pathway for N-acetylglutamate production was designed by coupling the acetyl-CoA-forming pathway with the glutamate dehydrogenase and N-acetylglutamate synthetase. N-Acetylglutamate could be produced from an equimolar mixture of pyruvate and α -ketoglutarate with a molar yield of 55% through the synthetic pathway consisting of the four thermo-tolerant enzymes. The overall recycling number of CoA was calculated to be 27.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学

キーワード：酵素反応 発酵 生体機能利用 代謝工学

1. 研究開始当初の背景

化学品生産における微生物(由来酵素)の利用は、位置・立体異性体の選択的生産が可能なこと、各種生体分子の複雑な混合物であるバイオマスを原料として利用できることなど、有機合成的手法とは異なるアドバンテージを有する。遺伝子工学技術を利用し、目的物質の生産に必要な(不要)な酵素遺伝子を増強(削除)することで、微生物の代謝経路を任意に改変する「代謝工学」は、微生物機能を利用した化学品生産プロセスの応用範囲を高めうる技術として近年大きな注目を集めている。一方、代謝工学的手法により微生物に外来の代謝経路を導入した結果、当該微生物が元来有する天然経路との間に代謝中間体や補酵素をめぐる競合が生じ、期待どおりの生産収率が得られないという事例も少なくない。これに対し、目的とする代謝経路を構成する酵素群のみを抽出し、これらを *in vitro* で再構成すれば、理論上、上記の問題をクリアした効率的な物質変換システムを樹立することができると考えられる。しかしながら、生体内には、数千種にもおよぶ酵素が共存しており、これらのうち所望のものだけを抽出し利用することは、経済的観点からも困難である。研究代表者らは、この問題を解決する方策として、70~90°C 程度の高温で生育可能な好熱性微生物に着目した新たな物質生産システムの開発に取り組んできた。本法では、まず遺伝子組換え技術を用いて、好熱性微生物が有する耐熱性の代謝酵素を常温(25~40°C 程度)でしか生育できない中温性の宿主微生物(大腸菌など)の中で生産させる。これらの組換え微生物を 70~90°C 程度で加熱することで、宿主由来の代謝酵素群は熱で不活化され、好熱性微生物に由来する耐熱性酵素のみが活性を保った状態が得られる。こうして作成した「熱処理組換え微生物」をモジュールとして組み合わせれば、有用化学品生産に特化した人工代謝経路を簡便に構築することが可能となると考えられる。

2. 研究の目的

研究代表者のグループでは、先行研究にて本法を用いた ATP 非生産型キメラ解糖経路の構築に成功していた。本キメラ経路に、さらに複数段階の酵素反応をカップリングさせることにより、さまざまな有用化学品の合成が可能になると考えられる。

アセチル CoA は、生体内において多くの代謝産物の前駆体となる重要な中間体である。本研究では、上述のキメラ解糖経路の最終産物であるピルビン酸からアセチル CoA への変換が可能な人工代謝経路の構築とその利用を主たる目的とした。

なお、これら人工代謝経路構築に関わる一連の研究は、全て大腸菌を宿主として用いて実施された。一方、研究代表者らが開発した *in vitro* での代謝経路合成技術では、高温で生理

活性を失うものであれば、遺伝子発現の宿主は、大腸菌に限定されない。従って大腸菌には見られない特性を持った微生物を宿主として利用することにより、その特性を活かしたユニークな物質生産システムを構築できる可能性も考えられる。この点を検証するため、最終年度にはスピニングアウト課題として研究代表者らが従前より研究対象としてきた疎水性細菌 *Rhodococcus opacus* を宿主とした有機溶媒中での物質生産システムの構築にも取り組んだ。

3. 研究の方法

大腸菌内での耐熱性酵素遺伝子の発現には、宿主として Rosetta2 (DE3)、遺伝子発現ベクターとして pET ベクターを利用した。*Rhodococcus opacus* は、先行研究において研究代表者らのグループにより取得された微生物であり、NBRC (Biological Resource Center, NITE) に寄託済みである。本菌を宿主とした遺伝子発現には中島、田村のグループにより開発されたプラスミドベクター (Nakashima N and Tamura T 2004 Appl Environ Microbiol 70, 5557-5568) を利用した。

好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来遺伝子は、本菌の一遺伝子発現プラスミドライブラリーより取得した。その他の微生物由来の酵素遺伝子は、当該微生物のゲノム DNA より適当なプライマーによる PCR にて取得し、上述の発現プラスミドへ連結して用いた。

4. 研究成果

ピルビン酸からアセチル CoA への変換は、多くの生物においてピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体 (PDH) と呼ばれる酵素タンパク質複合体によって触媒される。しかし、PDH はそれぞれ 10~20 個ものサブユニットからなる 3 つの酵素で構成される巨大な酵素複合体であり、その複雑な高次構造ゆえに異種宿主内での機能的発現は困難とされる。そこで研究代表者らは、耐熱性 PDH の異種発現を試みるのではなく、ピルビン酸デカルボキシラーゼ (PDC) によるピルビン酸からアセトアルデヒドへの脱炭酸反応と CoA 付加型アルデヒドデヒドロゲナーゼ (CoA-acylating ADDH) によるアセトアルデヒドからアセチル CoA への酸化反応を組み合わせた 2 ステップの酵素反応により PDH が触媒するものと同様の交換反応を行わせた。CoA-acylating ADDH としては好熱菌 *T. thermophilus* 由来のものが目的の変換活性を有することを見出し、これを利用した。一方、PDC に関しては、各種好熱菌ゲノム情報に基づいた探索を行ったが、目的に適った酵素遺伝子は見いだされなかった。そこで、関連文献を精査した結果、中温菌である *Acetobacter* 属細菌(最適生育温度 30°C) が産生する PDC が、60°C での半減期が 2 時間強という中温菌由来酵素としては例外的に高い耐熱性を示すものであることを見出し、これを利用した。両酵素遺伝

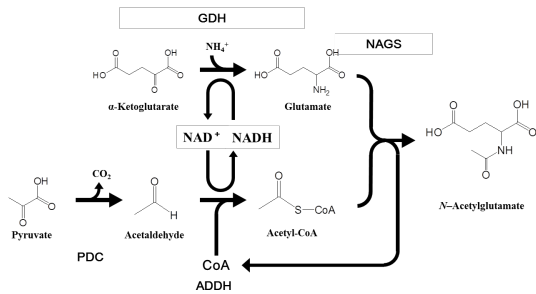


図1 ピルビン酸および α -ケトグルタル酸からのNAG生産のための人工経路

子を大腸菌内で発現させ、これを熱処理(70°C、30分間)に供したのち、ピルビン酸とインキュベートすることでアセチル CoA が生産されることを確認した。さらにこれらの反応に *T. thermophilus* 由来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH)、*Thermotoga maritima* 由来 *N*-アセチルグルタミン酸 (NAG) シンターゼ (NAGS) の2種類の酵素反応をカップリングさせることでピルビン酸および α -ケトグルタル酸からの NAG 生産のための人工経路を構築した(図1)。この結果、10 mM のピルビン酸および α -ケトグルタル酸から 5.5 mM の NAG の生産が認められ、構築した経路が期待どおりに機能することが確認された。

以上とは別に、*R. opacus* を宿主とした有機溶媒中での物質生産システムの構築にも取り組んだ。*R. opacus* は、湿潤状態でも有機溶媒に分散可能なユニークな特性を有する疎水性細菌として特徴づけられる(図2)。この特性を活かし、ここでは脂溶性の難水溶性化学品生産に有用な耐熱性酵素遺伝子を *R. opacus* を発現させ、得られた組換え菌体を基質を含む有機溶媒中に直接投入することで変換反応を実施した。モデル反応として用いたのは *Geobacillus* sp. 30 由来エンレダクターゼが触媒するケトイソフォロンの立体選択的飽和化による(6*R*)-レボジオンの生産である(図3)。また、本反応は還元反応の補酵素として NADH もしくは NADPH を必要とするため、生じた NAD(P)⁺ を再還元する補酵素再

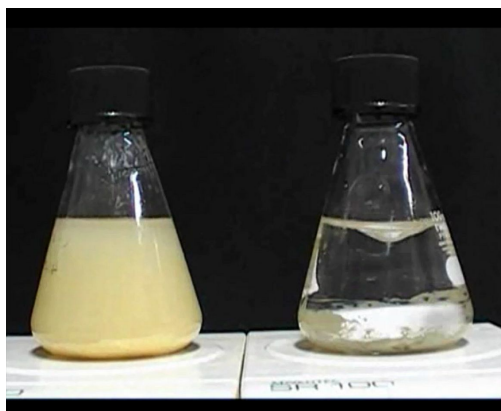


図2 有機溶媒(シクロヘキサノール)中における *R. opacus* (左) と大腸菌(右) 湿潤菌体の分散性の比較

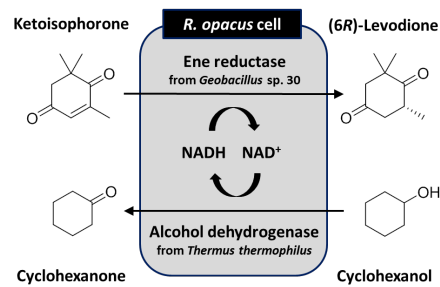


図3 耐熱性エンレダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼを共発現させた *R. opacus* によるケトイソフォロンから(6*R*)-レボジオンへの変換反応の模式図

生反応との共役が必要である。そこで、研究代表者らは脂溶性・低揮発性・安価という3つの条件を満たしうる基質としてシクロヘキサノールを選択し、NAD(P)⁺の還元を伴いつつ本基質の酸化反応を触媒出来る耐熱性酵素を探索した。この結果、*T. thermophilus* より目的の触媒活性を持った酵素 (TtADH) を見出し、上述の ene reductase とともに *R. opacus* 内でこれを共発現させた。得られた組換え菌体を1 Mのケトイソフォロンを溶解させたシクロヘキサノール中に直接投入し、50°Cにて反応を実施した結果、60 mol%を超える収率で目的産物である(6*R*)-レボジオンを得ることができた。

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5件)

- Restiawaty E, Iwasa Y, Maya S, Honda K, Omasa T, Hirota R, Kuroda A, Ohtake H (2011) Feasibility of thermophilic adenosine triphosphate-regeneration system using *Thermus thermophilus* polyphosphate kinase. *Process Biochem*, 46: 1747-1752
- 本田孝祐, 岡野憲司, 大竹久夫 (2012) 「合成代謝工学」による化学品生産. *化学と生物*, 50: 567-569
- 本田孝祐, 岡野憲司, 大竹久夫 (2012) 「合成代謝工学」による有用化学品生産への挑戦. *生物工学会誌*, 90: 629-630
- Krutsakorn B, Imagawa T, Honda K, Okano K, Ohtake H (2013) Construction of an *in vitro* bypassed pyruvate decarboxylation pathway using thermostable enzyme modules and its application to *N*-acetylglutamate production. *Microbial Cell Fact*, 12: 91
- Tsuji N, Honda K, Wada M, Okano K, Ohtake H (2014) Isolation and characterization of a thermotolerant ene reductase from *Geobacillus* sp. 30 and its heterologous expression in *Rhodococcus opacus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* in press

〔学会発表〕(計7件)

1. 本田孝祐「Synthetic metabolic engineering –the proof of concept-」IUMS 2011 Sapporo 平成23年9月8日 札幌
2. 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 平成24年10月25日 神戸
3. 本田孝祐「耐熱性酵素モジュールを用いた合成代謝工学への挑戦」極限環境生物学会第13回シンポジウム 平成24年6月23日 神戸
4. 本田孝祐「合成代謝工学による化学品生産」酵素工学研究会第67回講演 平成24年4月27日 京都
5. 本田孝祐「耐熱性酵素モジュールを用いた *in vitro* バイオリファインリーへの挑戦」日本生物工学会平成25年度大会 2013年9月19日 広島
6. 本田孝祐「耐熱性酵素モジュールを用いた *in vitro* 代謝工学への挑戦」化学工学会第45回秋季大会 2013年9月16日 岡山
7. 本田孝祐「耐熱性酵素をモジュールとしたミニマムエンザイムファクトリーの創出」「細胞を創る」研究会 6.0 2013年11月14日 鶴岡
8. 本田孝祐「耐熱性酵素を用いたミニマムエンザイムファクトリーの創出」2013年度日本生物工学会技術セミナー「生物機能エンジニアリングの最前線」2014年1月15日 神戸

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田孝祐(大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻)

研究者番号：90403162

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：