

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25820402

研究課題名(和文)耐熱性酵素モジュールを用いた高効率物質生産プロセスの開発

研究課題名(英文)Development of an efficient bio-production system using thermostable enzyme modules

## 研究代表者

岡野 憲司 (Okano, Kenji)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40623335

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)：好熱菌に由来する耐熱性酵素を遺伝子組換え的に生産する大腸菌は、70℃の熱処理に供するのみで、耐熱性酵素のみが活性を有した極めて選択性の高い生体触媒へと変貌する。こうして得られた耐熱性酵素モジュールを任意に組み合わせることで、所望の化学品生産に特化したin vitro代謝経路の構築が可能となる。本研究では本手法を用いて一部の超好熱菌が有するEntner-Doudoroff解糖経路のin vitro構築を行った。その結果、8種の耐熱性酵素を組み合わせることで、グルコースより100%の収率で乳酸を生産することに成功した。またこれら8種の耐熱性酵素を単一の大腸菌内で生産させる技術の開発にも成功した。

研究成果の概要(英文)：Novel and efficient bio-production system using thermostable enzyme modules was developed. In this system, recombinant Escherichia coli strains having a heterologous thermophilic enzyme were directly used as catalysts at high temperatures. The denaturation of indigenous enzymes at high temperatures resulted in a one-step preparation of highly selective thermotolerant biocatalytic modules. The combination of these modules enabled to construct in vitro synthetic pathways specialized for chemical manufacture.

By using this technique, in this study, the non-phosphorylated Entner-Doudoroff glycolysis pathway, which was found in some hyperthermophile, was constructed. By coupling this pathway with lactate dehydrogenase, lactate was produced from glucose with 100% molar yield. Moreover, an artificial operon including the genes encoding eight thermophilic enzymes was successfully constructed and co-expression of eight enzymes in a single recombinant E. coli strains was achieved.

研究分野：生物化学工学

キーワード：In vitro代謝工学 耐熱性酵素 非リン酸化型Entner-Doudoroff経路 乳酸 人工オペロン

### 1. 研究開始当初の背景

微生物を用いた物質生産は、ワンポットでの多段階反応や立体選択的な反応を得意とし、化学プロセスによる物質生産にとって不得手な変換反応を相補する物質生産の手法として期待を集めてきた。また温和な条件下で反応が進行し、エネルギー消費量が低いことも魅力である。従来の発酵生産における菌株育種では、所望の変換反応についてある程度の力価を有した微生物を探索し、必要(不要)な酵素遺伝子を増強(削除)するといった手法が汎用され、代謝工学という一つの研究分野として広く認知されてきた。一方、微生物が生育・生存のために「生産しなければならない」代謝物と、我々が商業目的で「生産してほしい」代謝物は、必ずしも合致するわけではなく、量産が可能な代謝物には自ずと限りが生じる。そこで本研究では、生きた細胞の代謝経路を改変するのではなく、予めモジュール化した代謝酵素(耐熱性酵素遺伝子を発現後、加熱処理した大腸菌等の中温性微生物)を任意に組み合わせ、所望の物質生産に特化した経路を *in vitro* で再構築するという全く逆の手法を用いた物質生産技術の開発を行うこととした。

### 2. 研究の目的

上記の *in vitro* 代謝工学の手法の実行可能性を示すべく、様々な物質生産において重要となる解糖系の構築を行うこととした。一部の超好熱菌が有する非リン酸化型 Entner-Doudoroff 解糖経路(np-ED 経路)は通常の Embden-Meyerhoff 経路(EM 経路)と異なり、わずか7つの酵素によりピルビン酸の生産が可能であり(EM 経路では10の酵素が必要)、熱に不安定な中間体を經由しないことや、経路内でATPが再生されるなど、*in vitro* 代謝経路の構築において好ましい特徴を有するため、本経路の構築を行うこととした。また本研究では本手法を産業レベルでの物質生産の新たな手法へと発展させるべく、単一の耐熱性酵素モジュール内に複数の耐熱性酵素を保有させる技術を開発し、簡便に所望の物質生産に必要な全ての酵素を保持した耐熱性酵素モジュールを調製する方法の開発も行った。

### 3. 研究の方法

耐熱性酵素モジュールの調製、および酵素活性の測定

図1に示す np-ED 経路を構成する耐熱性酵素の遺伝子を(超)好熱菌より取得した。Glucose dehydrogenase (GDH) は *Sulfolobus solfataricus* より、Gluconate dehydratase (GAD) は *Thermoproteus tenax* より、KDG aldolase (KDGA) は *Picrophilus torridus* より、Glyceraldehyde dehydrogenase (GADH) 及び Glycerate kinase (GK) は *Thermoplasma*

*acidophilum* より、Pyruvate kinase (PK) は *Thermotoga maritima* より、Enolase (ENO)及び NADH 再生のために用いた Lactate dehydrogenase (LDH)は *Thermus thermophilus* より取得した。なお、GADH については NAD<sup>+</sup> 依存の酵素について報告がなく、NAD<sup>+</sup> を補酵素として利用可能な F34M, Y399M, S405N 変異体を作成し、これを利用した。これらの遺伝子を温度誘導性の発現ベクターである pRCI にクローニングし、*Escherichia coli* Rosetta2 株に導入した。得られた形質転換体を 30℃ にて培養後、指数増殖期に培養温度を 42℃ へとシフトさせ、遺伝子の発現誘導を行った。その後、菌体を遠心分離により回収し、超音波破碎により、粗酵素抽出液を得た。得られた抽出液を 70℃、30 分の熱処理に供することで、大腸菌宿主由来のタンパク質を変性させ、遠心分離により除去することで、簡便に酵素液を得ることが可能となる。その後、NADH が 340 nm に吸収極大を持つことを利用し、NADH を生成あるいは、消費する反応とのカップリング反応を行うことで、各種酵素の活性測定を行った。

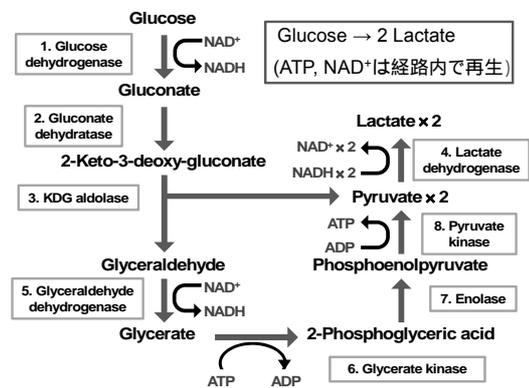


図1 np-ED 経路による乳酸生産経路

### 乳酸の生産実験

調製した耐熱性酵素の酵素液および基質、補基質を混合し、60℃ で反応させることでグルコースからの乳酸生産実験を行った。なお、反応液の組成は以下の通りである(10 mM glucose、1 mM gluconate、100 mM MES-NaOH (pH 7.0)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、0.6 mM ATP、0.2 mM ADP、0.5 mM NAD<sup>+</sup>、GDH・GAD 0.03 U/mL、KDGA・GK・GADH・ENO・PK 0.15U/mL、LDH 0.30 U/mL)。60℃ で反応を行い、継時的にサンプルを採取し、グルコース濃度を和光純薬 Wako CII test wako により、有機酸濃度を HPLC (島津電気伝導度システム) により測定した。グリセルアルデヒドは GADH によるグリセルアルデヒドの変換反応を、メディエーター分子を介した MTT の還元反応とカップリングさせ、生じた MTT formazan を定量することで測定した。

8種の酵素遺伝子の遺伝子集積  
np-ED 経路を用いた乳酸生産経路を構成す

る8種の酵素遺伝子を単一プロモーターの下流に配置した人工オペロンをOGAB法(Ordered Gene Assembly in *Bacillus subtilis*)により行った【Nishizaki et al. (2007) Appl. Environ. Microbiol. 73:1355-1361】。本手法は各遺伝子の5'-または3'-末端へ任意の3塩基突出を付加し、これらの断片を相補配列間で連結することで、所望の順序で遺伝子を配置したオペロンを構築する技術である。各遺伝子の発現量はプロモーターからの距離に比例して減少するため、活性の低い酵素から順にプロモーターの下流に配置した。なおGADに関しては極端に活性が低いため、人工オペロンを有するプラスミドpGETS-ED8に加え、GADを過剰発現するためのプラスミドpRCI-GADを*E. coli* Rosetta2株に導入した。本形質転換体を用いて前述の方法で酵素液を調製することにより、np-ED経路を用いた乳酸生産に必要な8種の酵素を含む耐熱性酵素カクテルの生産が可能となる。

#### 4. 研究成果

##### 酵素活性測定

np-ED経路を用いた乳酸生産経路を構成する8種の耐熱性酵素遺伝子を個別に導入した大腸菌より酵素液の調製を行い、酵素活性の測定を行った(Table 1)。いずれの酵素についても活性を確認できたが、その比活性は0.0041-13 U/mg-total proteinと幅広い値を示した。最も活性の低いGADについては*T. tenax*以外にも*S. solfataricus*についても遺伝子が同定されているが、大腸菌での異種発現が困難であり、現状では*T. tenax*由来酵素のみ活性を有する形で発現することに成功した。GADに次いでGADHが0.12 U/mg-total proteinと活性が低かったが、GADHについてはNAD<sup>+</sup>依存性の酵素の報告が無く、本研究で用いた変異酵素のみがNAD<sup>+</sup>の利用が可能であるため、本酵素を用いることとした。KDGAについては*S. solfataricus*由来の酵素も同定されているが、活性が低く、*P. torridus*由来のものを使用することとした。またGDHについてはKmの低い酵素が*S. solfataricus*由来のものに限定されているため、本酵素を用いることとした。その他の酵素については十分に高い活性が得られているため、他の微生物由来の酵素との比較は行わなかった。

酵素	基質	比活性 ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ total protein)	
		単独発現株	共発現株
GDH	Glucose	0.94	0.058
GAD	Glucanate	0.0041	0.0021
KDGA	KDG	0.38	0.112
GADH	Glyceraldehyde	0.12	0.0091
GK	Glycerate	13	0.19
ENO	2-PG	4.6	5.1
PK	PEP	2.2	1.1
LDH	Pyruvate	2.4	0.143

##### 乳酸の生産実験

上記の8種の耐熱性酵素を用いたグルコースからの乳酸発酵実験を行った。GADの活性

が極端に低いため、本酵素が十分に働くよう、基質である10 mM glucoseに加え、1 mMのgluconateを添加することとした。GAD以降の酵素反応が律速段階とならないように、KDGA、GADH、GK、ENO、PKについては5倍量の0.15 U/mLの酵素を添加することとした。また1分子のglucoseより2分子のpyruvateが生産されるためLDHについては更に倍量の0.30 U/mLの酵素を添加することとした。図2に示す通り、反応時間の経過に伴い、glucoseの消費が確認され、4時間で完全に消費された。それに伴い、lactateの生産が確認され、6時間で16.2 mMのlactateが生産された。しかしながらlactateの収率は63%と低い値となった。そこで何かしらの中間体が蓄積していると考え、glyceraldehyde、glycerate、pyruvateについて分析を行ったところ、3時間で3.3 mMのglyceraldehydeの蓄積が確認された。Glyceraldehydeは本経路内で唯一60において不安定な化合物であり、熱分解により収率を低下させる要因となる。

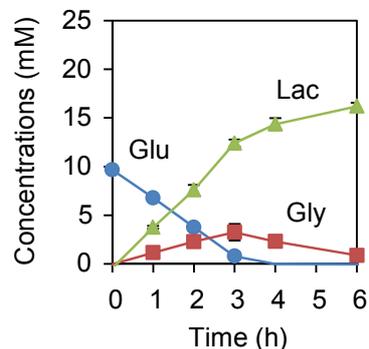


図2 耐熱性酵素を用いた乳酸生産結果

そこでglyceraldehydeの蓄積を防ぐために、GADHの添加量を倍量の0.30 U/mLとし、反応を行った(図3)。その結果、glucoseの消費速度に殆ど違いが見られないものの、lactateの生産速度が向上し、最終的なlactate濃度は21 mMと理論収率に達した。21 mMのlactateが生産されるのは10 mMのglucoseより20 mMのlactateが、1 mMのgluconateより、lactate及びpyruvateが1 mMずつ生産されるためである。反応中、glyceraldehydeの蓄積は殆ど生じず、GADHによる反応が律速段階であったことが明らかとなった。

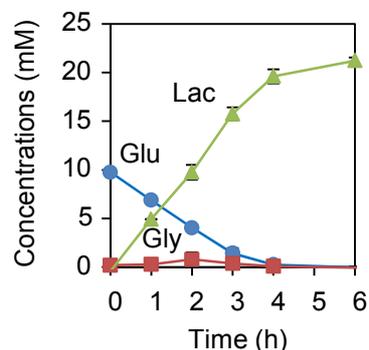


図3 耐熱性酵素を用いた乳酸生産結果

## 耐熱性酵素カクテルを用いた乳酸の生産実験

次に np-ED 経路を用いた乳酸生産経路を構成する 8 種の耐熱性酵素を共発現する大腸菌株の作成を行った。本株を培養し、発現誘導を行った後、細胞破碎、熱処理を行うことで、簡便に 8 種の酵素が活性を有した耐熱性酵素カクテルを調製することが可能となる。得られた酵素カクテルを用いて、各酵素の活性測定を行った結果 (Table 1)、単独発現株より得られた酵素液よりも活性が劣るものの、全ての酵素について活性が確認でき、耐熱性酵素の調製の簡便化に成功した。

続いて耐熱性酵素カクテルを用いた乳酸の生産実験を行った。最も活性の低い GAD を基準に GAD が 0.03 U/mL となるように耐熱性酵素カクテルを添加し、60 にて lactate の生産を行った (図 4)。

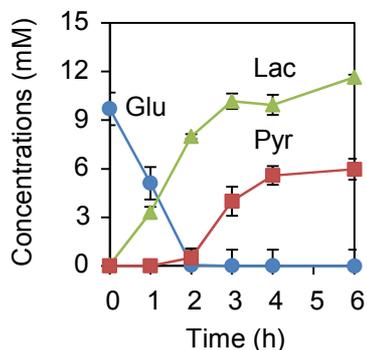


図 4 耐熱性酵素を用いた乳酸生産結果

その結果、glucose の速やかな消費と lactate の生産が確認できたが、lactate の濃度は 11.6 mM と理論到達濃度の 21 mM を大きく下回った。一方で 6.0 mM の pyruvate の副生が確認された。本実験では 0.5 mM の  $\text{NAD}^+$  を添加しており、理論上 pyruvate が 0.5 mM 以上蓄積することは無い。Pyruvate が 0.5 mM 以上蓄積するためには LDH 以外の反応で  $\text{NADH}$  と  $\text{NAD}^+$  へと再生する必要がある。そこで耐熱性酵素カクテル中に  $\text{NADH}$  の酸化活性があるかどうかを確認したところ、活性が確認された。従って、熱処理によって失活しなかった宿主由来の何らかの酵素が  $\text{NADH}$  の酸化反応を触媒し、そのため lactate の代わりに pyruvate が生成していると考えられる。

## 総括

以上のように、本研究では耐熱性酵素モジュールを用いて、所望の物質の生産に特化した代謝経路を *in vitro* で構築する、*in vitro* 代謝工学のコンセプトの実証に成功した。上述の通り、耐熱性酵素モジュールを組み合わせることで glucose から理論収率で lactate を生産することに成功し、副反応を伴わない物質生産が可能であることを示した。また人工オペロン導入による耐熱性酵素カクテルの簡

便な調製方法にも成功した。しかしながら、個別酵素を混合する物質生産と比較し、各々の酵素活性が低くなり、そのため多量の触媒を必要とした。これにより未失活の宿主由来の酵素の影響が無視できなくなり、生産収率が低下したものと考えられる。今後は熱処理方法の工夫や、あるいは活性の低い酵素を進化工学的に改変し、酵素の使用量を削減する方法で、これらの問題の解決が可能となると考えられる。

## 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 8 件)

岡野憲司、本田孝祐、耐熱性酵素を用いたニコチンアミド補酵素の安定化技術の開発、ケミカルエンジニアリング (査読なし), 61, (2016) 44-50.

岡野憲司、本田孝祐、*In vitro* 代謝工学による 1-ブタノール生産、バイオサイエンスとインダストリー (査読なし), 73, (2015) 481-482.

P. H. Ninh, K. Honda, T. Sakai, K. Okano, T. Omasa, H. Ohtake, Assembly and multiple gene expression of thermophilic enzymes in *Escherichia coli* for *in vitro* metabolic engineering. *Biotechnol. Bioeng.*, (査読あり) 112, (2015) 189-196. 10.1002/bit.25338/abstract

B. Krutsakorn, T. Imagawa, K. Honda, K. Okano, H. Ohtake, Construction of an *in vitro* bypassed pyruvate decarboxylation pathway using thermostable enzyme modules and its application to N-acetylglutamate production. *Microb. Cell Fact.*, (査読あり) 12, (2013) 91. 10.1186/1475-2859-12-91

B. Krutsakorn, K. Honda, X. Ye, T. Imagawa, X. Bei, K. Okano, H. Ohtake, *In vitro* production of n-butanol from glucose. *Metabolic Eng.*, (査読あり) 20, (2013) 84-91. 10.1016/j.ymben.2013.09.006

Y. Morimoto, K. Honda, X. Ye, K. Okano, H. Ohtake, Directed evolution of thermotolerant malic enzyme for improved malate production. *J. Biosci. Bioeng.*, (査読あり) 117, (2013) 147-152. 10.1016/j.jbiosc.2013.07.005

P. H. Ninh, K. Honda, Y. Yokohigashi, K. Okano, T. Omasa, H. Ohtake, Development of continuous bioconversion system using thermophilic whole-cell biocatalyst. *Appl. Environ. Microbiol.*, (査読あり) 79, (2013) 1996-2001. 10.1128/AEM.03752-12

X. Ye, K. Honda, Y. Morimoto, K. Okano, H. Ohtake, Direct conversion of glucose to malate by synthetic metabolic engineering. *J. Biotechnol.*, (査読あり) 164, (2013) 34-40. 10.1016/j.jbiotec.2012.11.011

[学会発表](計 6 件)

岡野憲司、本田孝祐、大竹久夫、Assembly

and multiple gene expression of thermophilic enzymes in *Escherichia coli* for *in vitro* metabolic engineering, Young Asian Biochemical Engineers' Community Symposium (YABEC2015)(招待講演) 2015.10.17, Elysian Changchon Resort (Korea)

岡野憲司、本田孝祐、大竹久夫、Assembly and multiple gene expression of thermophilic enzymes in *Escherichia coli* for *in vitro* metabolic engineering、Japanese-German Graduate Externship Program, Biotechnology and Chemistry for Green Growth (招待講演) 2015.3.10、大阪大学銀杏会館(大阪府・吹田)

岡野憲司、本田孝祐、大竹久夫、*In vitro* metabolic engineering employing thermophilic enzymes –a novel, simple technology for designing a chimeric metabolic pathway-、0<sup>th</sup> cccc、2014.11.7、National Chung Cheng University (Taiwan)

岡野憲司、朱倩心、本田孝祐、大竹久夫、*In vitro* 代謝工学による非リン酸化型 Entner-Doudoroff 経路の構築および乳酸生産への応用、第 66 回日本生物工学会大会、2014.9.9、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)

岡野憲司、本田孝祐、大竹久夫、*In vitro* 代謝工学-バイオプロダクションのための新たなパラダイム構築-、2014 年度生物工学若手研究者の集い 夏のセミナー、2014.7.12、神戸セミナーハウス(兵庫県・神戸)

岡野憲司、朱倩心、本田孝祐、大竹久夫、合成代謝工学による非リン酸化 Entner-Doudoroff 経路の構築および乳酸生産への応用、化学工学会第 79 年会、2014.3.20、岐阜大学(岐阜県・岐阜)

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡野 憲司 (OKANO KENJI)

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号：40623335

### (2) 研究分担者

無し