

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450088

研究課題名(和文)好熱菌における酸化還元補酵素安定化戦略の解明とインビトロ代謝工学への応用

研究課題名(英文)Studies on molecular mechanisms involved in the nicotinamide-cofactor homeostasis in thermophiles and their application to in vitro metabolic engineering

研究代表者

本田 孝祐 (Honda, Kohsuke)

大阪大学・工学研究科 准教授

研究者番号：90403162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ニコチンアミド補酵素はあらゆる生物で普遍的に用いられる酸化還元補酵素である。一方、ニコチンアミド補酵素は熱安定性に乏しく、高温で容易に分解を受ける。本研究では、好熱性細菌 *Thermus thermophilus* を主たる対象に、高温環境下でのニコチンアミド補酵素の恒常性維持に重要な役割を果たすと考えられるサルベージ合成酵素群の特性解析を行った。この結果、ニコチンアミド補酵素のサルベージ合成能が同菌の高温での生育に極めて重要な役割を果たすことを明らかにした。またニコチンアミド補酵素サルベージ合成経路を *in vitro* で再構成し、これにより高温域でのニコチンアミド補酵素の見かけ上の安定化を達成した。

研究成果の概要(英文)：Nicotinamide cofactors are involved in a wide variety of enzymatic redox reactions and ubiquitously present in all organisms. Although thermophiles also use these cofactors, nicotinamide cofactors are readily degraded at high temperatures where thermophiles preferably grow. To address this discrepancy, we have characterized enzymes composing the salvage synthesis of NAD⁺ in a thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*, and evaluated their importance in the bacterial growth at high temperatures. As a result, we newly identified the gene encoding nicotinamidase, which is engaged in the first step of the salvage synthesis of NAD⁺, of *T. thermophilus*. Disruption of this gene resulted in a marked decrease in the bacterial growth at 80 °C. In addition, we reconstituted the NAD⁺ salvage pathway *in vitro* using thermophilic enzymes. In the presence of reconstituted pathway, NAD⁺ concentration could be kept almost constant at 60 °C for 15 h.

研究分野：酵素工学

キーワード：ニコチンアミド補酵素 NAD(H) 好熱菌 *Thermus thermophilus* サルベージ合成

1. 研究開始当初の背景

NAD⁺/NADH およびそのリン酸化誘導体である NADP⁺/NADPH (ニコチンアミド補酵素と総称する) はあらゆる生物で普遍的に用いられる酸化還元補酵素である。70 を超える高温域で生育する高度好熱菌や超好熱菌もその例外ではないが、ニコチンアミド補酵素はこれらの微生物の生育温度下では容易に分解を受ける熱安定性の低い物質である。

研究代表者は従来より、各種好熱菌に由来する酵素を細胞外で組み合わせ、任意にデザインされた人工代謝経路を *in vitro* で構築する独自技術、*in vitro* 代謝工学の開発を進めるとともに同技術を用いた有用化学品生産に取り組んできた。しかし、触媒素子として好熱性酵素を用いる動作原理上、本法では、50~70 程度の高温域で変換反応を実施する必要があり、同温度域におけるニコチンアミド補酵素の不安定性のため、十分な濃度の生産物を得るには至っていなかった。

本課題では、「好熱菌は高温域においてニコチンアミド補酵素を安定化するための何らかの分子メカニズム有する」との仮説を立て、同メカニズムの解明とこれ利用した *in vitro* でのニコチンアミド補酵素の安定化を試みた。

2. 研究の目的

本研究ではまず、「好熱菌は高温域でのニコチンアミド補酵素の恒常性を維持するため、その熱分解産物よりニコチンアミド補酵素を速やかに再合成するための優れたサルベージ合成経路を備えている」との仮説を立て、本仮説に基づき当該経路の全容を解明することを本研究の第1の目的とした。

またニコチンアミド補酵素サルベージ合成能が高温域における好熱菌の生育に及ぼす影響を検証するため、当該経路を構成する酵素遺伝子の一部をノックアウトし、好熱菌の表現型に及ぼす影響を検証した。

さらに一連の取り組みで見出された好熱性サルベージ合成酵素群を、研究代表者の有する独自技術である *in vitro* 代謝工学のスキームに則って利用することにより、高温条件下におけるニコチンアミド補酵素の持続的利用に適用可能な *in vitro* サルベージ合成経路の構築に取り組んだ。

3. 研究の方法

本研究では、NAD⁺/NADH および NADP⁺/NADPH のうち、NAD⁺に焦点を当てた。これは一般に知られる生合成経路において NAD⁺は他のニコチンアミド補酵素の共通の前駆体となる物質であるためである。NAD⁺を熱分解に供し、その分解産物を HPLC 分析によって分離、同定した。同定は、NAD⁺のビルディングブロックとなりえる各種物質の標

準品と保持時間を比較することによって行った。サルベージ合成酵素群の探索は高度好熱菌 *Thermus thermophilus* を主な対象として行った。同菌は、ゲノム配列が解読されているほか、1 遺伝子発現プラスミドライブラリーが完備されており、酵素遺伝子群の大腸菌内での発現と解析が容易に行える。同定された分解物より NAD⁺のサルベージ合成を触媒すると予想される酵素遺伝子を上記ライブラリーもしくは *T. thermophilus* のゲノムより取得し解析に供した。

4. 研究成果

(1) NAD⁺熱分解物の同定

NAD⁺を 60 でインキュベートした後、その分解産物を HPLC 分析に供し、それぞれの保持時間を予想される分解産物と比較した。この結果、中性~弱アルカリ性条件下において NAD⁺は、ニコチンアミドと ADP-リボースに分解されることが明らかとなった(図1)。また同様のアッセイを還元型補酵素である NADH に対しても実施した。この結果、NADH の約 70% は NAD⁺を経て、ニコチンアミドと ADP-リボースにまで分解されることが確認された。また、この過程で生じる NAD⁺には、通常生体内で酸化還元補酵素として用いられる β-NAD⁺だけでなく、その立体異性体である α-NAD⁺を含むことが明らかとなった。

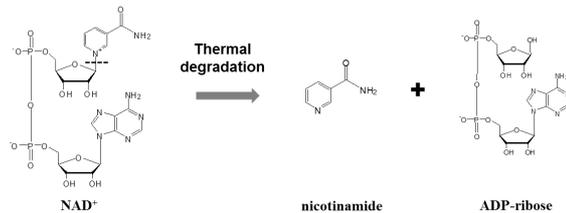


図1. NAD⁺の熱分解様式。

(2) NAD⁺サルベージ合成酵素群の取得と当該経路の *in vitro* 再構成試験

上記の結果に基づき、ニコチンアミドと ADP-リボースより NAD⁺を再合成可能な酵素群を *T. thermophilus* より探索した。本菌のゲノムアノテーション情報より、候補となる遺伝子を取得、これらが大腸菌内で発現させ、活性を評価した。この結果、ADP-リボースは、まず ADP-リボースピロフォスファターゼ (ADPRP) によりリボース-5-リン酸 (R5P) と AMP へと分解され、ここで生じた R5P がホスホリボシルキナーゼ (PRK) によりホスホリボシルピロリン酸 (PRPP) へとリン酸化されることで、NAD⁺サルベージ合成に利用可能な分子への変換が生じることが確認された。

一方、ニコチンアミドのサルベージ酵素としては、アノテーション情報をもとに、ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ (NAPRT)、ニコチン酸モノヌクレオチドアドニルトランスフェラーゼ (NaMNAT)

NAD⁺シンターゼ (NADS) を同定することができた (図2)。このうち NaMNAT は、NAD⁺サルベージ合成の中間体となりうる物質のうち、ニコチン酸モノヌクレオチド (NaMN) / ニコチンアミドモノヌクレオチド (NMN) の両者を基質として利用できた。一方、NAPRT はニコチン酸を基質とはできないものの、そのアナログ反応であるニコチンアミドのホスホリボシル化 (図2 白抜き矢印の反応) を触媒することはできなかった。結果として、既知の *T. thermophilus* ゲノムアノテーション情報からは、ニコチンアミドのサルベージを担う初発反応を触媒する酵素を見出すことができなかった。

後述するように、再度ホモロジー解析を行うことにより、*T. thermophilus* のゲノム中より NAD⁺のサルベージ合成経路の初発反応を担う酵素 (ニコチンアミダーゼ、NADase) 遺伝子を同定することに成功したが、ここでは NAD⁺サルベージ合成経路の in vitro 再構成試験を優先すべく、*T. thermophilus* 以外の好熱菌からの目的酵素遺伝子の探索を進めた。

この結果、複数の超好熱性アーキアより NADase を取得、このうち *Thermoplasma acidophilus* 由来酵素を in vitro 再構成試験に供した。また *T. thermophilus* 由来酵素のうち、活性が微弱であった NADS についても再スクリーニングを行い、比較的高活性なものとして *Bacillus stearothermophilus* 由来酵素を取得、これを再構成試験に用いた。

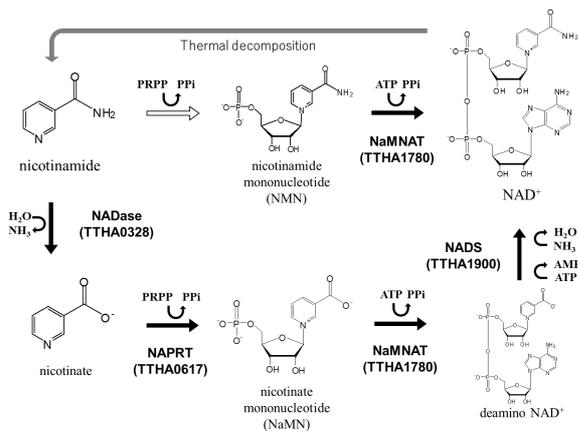


図2. *T. thermophilus* におけるニコチンアミドから NAD⁺へのサルベージ合成経路。括弧内は各遺伝子の locus tag 番号を示す。本研究で同定されなかった酵素反応を白抜き矢印で示す。NADase (TTHA0328) はデータベース上のゲノムアノテーション情報からは同定されなかったが、他微生物に由来する既知酵素の配列をクエリとしたホモロジー検索を再度行うことで存在が確認された。

再構成試験では、以上のとおり選抜されたニコチンアミドサルベージ酵素群および上述の ADP-リボースサルベージ酵素群のほか、合成反応で消費される ATP の再生のため、ポリリン酸をリン酸基供与体とした ATP 再生酵素反応を組み合わせた。ATP 再生酵素とし

ては、*T. thermophilus* 由来アデニル酸キナーゼ (ADK) とポリリン酸キナーゼ (PPK) を使用した。

再構成経路の動作確認は、上記のサルベージ合成酵素群を含む反応液中、pH8.0、60 で 4 mM の NAD⁺をインキュベーションすることで行った。この結果、サルベージ合成酵素群を含む反応液中ではインキュベーション開始から 15 時間にわたって NAD⁺濃度がほぼ一定に保たれた。一方、酵素を含まないコントロール実験では、同条件下で残存 NAD⁺が 1 mM 程度にまで低下しており (図3)、in vitro サルベージ合成経路を用いることにより、NAD⁺の「見かけ上の」安定化が可能であることが示された。

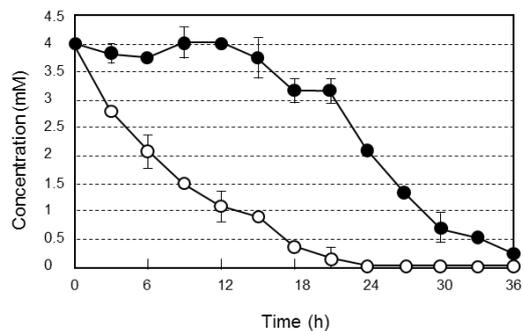


図3. 好熱性酵素を用いた in vitro サルベージ合成経路による NAD⁺の見かけ上の安定化。NAD⁺ (4 mM) をサルベージ合成酵素群の存在下 (○) および非存在下 (●)、pH8.0、60 でインキュベートした後の残存濃度を示す。

(3) *T. thermophilus* 由来ニコチンアミダーゼ (NADase) の同定と解析

上記(2)の取り組みでは、ニコチンアミド再利用のための初発反応を触媒しうる酵素 (NADase もしくはニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ) を *T. thermophilus* のゲノム中より見出すことができなかった。そこで中温性菌などで報告されている当該酵素のアミノ酸配列をクエリとしたホモロジー検索により *T. thermophilus* ゲノム上の遺伝子の再調査を行った。この結果、イソコリスマターゼとアノテーションされた遺伝子 (TTHA0328) が酵母等の NADase と高い相同性を示すことを見出した。本遺伝子を大腸菌内で発現させ、その産物をニコチンアミドと作用させたとこ、ニコチンアミドの脱アミノ化反応の進行を確認することができた。また本反応の速度論的パラメーターを測定した結果、 K_m 、 k_{cat} はそれぞれ 19 μ M、51 s^{-1} と求められ、本酵素がニコチンアミドに対し、高い親和性と活性を有することが示された。*T. thermophilus* のゲノム上の同遺伝子を破壊したところ、野生型 *T. thermophilus* の無細胞抽出液中では確認できたニコチンアミド脱アミノ化活性が破壊株では検出されなくなった。このことから TTHA0328 の産物は、少なくとも今回の研究で用いた培養条件下において *T. thermophilus* 内でニコチンアミダー

ぜとして機能する唯一の酵素であると考えられた。

次に NAD⁺ サルベージ合成能が *T. thermophilus* の生育に及ぼす影響を検証するため、野生株、TTHA0328 破壊株を 70 および 80 で培養し、その生育をモニターした。この結果、最適生育温度に近い 70 では両者の生育に違いは見られなかった一方、80 では破壊株の生育に顕著な遅れが見られた (図 4)。さらに 80 で生育させた菌体抽出物中の NAD⁺ 濃度を測定したところ、破壊株ではほとんどこれを検出することができなかった (図 5)。TTHA0328 破壊株で見られた 80 での生育遅延と細胞内 NAD⁺ の枯渇は NADase 反応の生産物であるニコチン酸を培地に供給することにより回復した。以上の結果より、TTHA0328 の産物は *T. thermophilus* の NAD⁺ サルベージ合成に関わる NADase として機能すること、またの NAD⁺ のサルベージ合成能は、本菌の高温環境下での生育に極めて重要な役割を果たすことが示された。

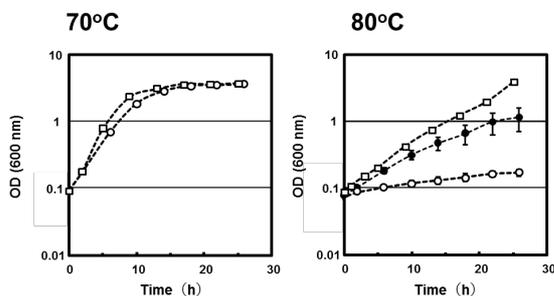


図 4. *T. thermophilus* の 70□ (左) および 80□ (右) における生育曲線。野生株 (□) および TTHA0328 破壊株 (○) を最小培地中で培養した結果を示す。TTHA0328 破壊株の培養は 100 μM のニコチン酸を添加した培地中 (○) でも行った。

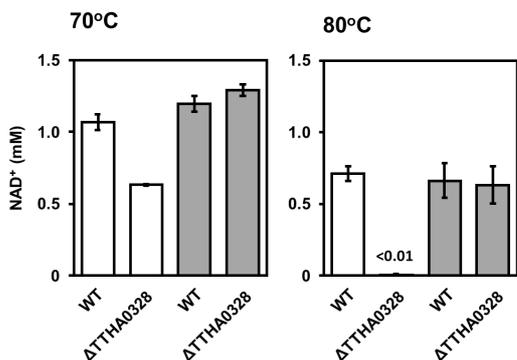


図 5. 70□ (左) および 80□ (右) で培養した *T. thermophilus* の細胞内 NAD⁺ 濃度。最小培地で培養した菌体中の NAD⁺ 濃度を白、100 μM のニコチン酸を添加した最小培地で培養したものを灰色で示す。

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 6 件)

本田孝祐 (2014) 耐熱性酵素を用いた in vitro バイオリファインリーへの挑戦. 環境バイオテクノロジー学会誌 14 (1), 31-36 査読なし

Jaturapaktrarak, C., Napathorn, S.C., Cheng, M., Okano, K., Ohtake, H., Honda K. (2014) In vitro conversion of glycerol to lactate with thermophilic enzymes. Bioresour. Bioprocessing 1 (1), 18, 査読あり, doi: 10.1186/s40643-014-0018-4

Ninh, P.H., Honda, K., Sakai, T., Okano, K., Ohtake, H. (2015) Assembly and multiple gene expression of thermophilic enzymes in *Escherichia coli* for in vitro metabolic engineering. Biotechnol. Bioeng. 112 (1), 189-196, 査読あり, doi: 10.1002/bit.25338

Cheng, M., Yoshiyasu, H., Okano, K., Ohtake, H., Honda, K. (2016) Redirection of the reaction specificity of a thermophilic acetolactate synthase toward acetaldehyde formation. PloS One 11 (1), e0146146, 査読あり, doi: 10.1371/journal.pone.0146416

Honda, K., Hara, N., Cheng, M., Nakamura, A., Mandai, K., Okano, K., Ohtake, H. (2016) In vitro metabolic engineering for the salvage synthesis of NAD⁺. Metab. Eng. 35: 114-120, 査読あり, doi: 10.1016/j.ymben.2016.02.005

Honda, K., Kimura, K., Ninh, P.H., Taniguchi, H., Okano, K., Ohtake, H. (2016) In vitro bioconversion of chitin to pyruvate with thermophilic enzymes. J. Biosci. Bioeng. In press, 査読あり, doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.04.013

〔学会発表〕(計 10 件)

Kohsuke Honda “Construction of an in vitro synthetic pathway with thermophilic enzymes” International Conference of Tailor-Made Fuels from Biomass, 2014 年 6 月 17 日、アーヘン・ドイツ

Kohsuke Honda “Construction of in vitro artificial metabolic pathway with thermophilic enzymes” The 13th China Japan Korea Enzyme Engineering Conference, 2014 年 11 月 17 日、済州・韓国

原 直矢、中村安奈、万袋木麻子、本田孝祐、岡野憲司、大竹久夫「In vitro 代謝工学を用いた NAD⁺サルベージ経路の構築」日本農芸化学会、2015 年 3 月 27 日、岡山

Kohsuke Honda “In vitro salvage synthesis of nicotinamide cofactor by thermophilic enzymes” Enzyme Engineering XXIII, 2015 年 9 月 8 日、セントピーターズバーグ・米国

Kohsuke Honda “Construction of in vitro metabolic pathways using thermophilic enzymes” The 27th Annual Meeting of the Thai Society for

Biotechnology and International Conference, 2015年11月18日、バンコク・タイ

Kohsuke Honda “In vitro metabolic pathway for the salvage synthesis of nicotinamide cofactor” Metabolic Engineering 11, 2016年6月26~28日、淡路島

本田孝祐「耐熱性酵素を用いた in vitro 人工代謝経路の構築」日本進化学会、2016年8月25日、東京

Kohsuke Honda “In vitro salvage synthesis of NAD⁺ with thermophilic enzymes” Extremophiles 2016, 2016年9月12日、京都

Kohsuke Honda, Hayato Yoshiyasu, Maria Cheng “Development of a thermostable pyruvate decarboxylase by directed evolution of the acetolactate synthase from *Thermus thermophilus*” The 14th China Japan Korea Enzyme Engineering Conference, 2016年11月18日、南寧・中国

谷口博範、サングウワンレックサティダポーン、チョチュワンパチャリン、岡野憲司、本田孝祐「*Thermus thermophilus* HB8 由来ニコチンアミダーゼの同定と機能解析」日本農芸化学会、2017年3月18日、京都

〔図書〕(計1件)

Kohsuke Honda (2016) Chapter 16, Industrial applications of multistep enzyme reactions. In G. Brahmachari, A. Demain, J.L. Adrio edn. Biotechnology of Microbial Enzymes, 433-450. Elsevier

〔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 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 (HONDA, Kohsuke)

大阪大学・大学院工学研究科・生命先端工学専攻・准教授

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：

(4) 研究協力者

()