

氏名	林 勇樹
所属機関	東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻   生命環境科学系 助教
研究題目	バイオエネルギー生産を指向した高活性アルカン合成酵素への人工進化

## 1. 研究の目的

**本研究では、微生物によるバイオエネルギー生産の高効率化を目指し、進化分子工学的手法を用いて、アルカン合成酵素の高活性化を実現する。**

東日本大震災を機に、原油へのエネルギー依存度が高まる一方で、その枯渇は重大問題である。そのため、原油に代替する再生可能なエネルギー資源の開発が盛んに研究されている。一部の微生物が生成するアルカンは、再生可能なバイオエネルギーとして注目されている。近年、アルカン合成に関わる2つの酵素、脂肪酸アシル-ACP還元酵素(AAR)とアルデヒド脱炭酸酵素(AD)、が同定され、遺伝子組み換え微生物によるアルカン合成が可能となった。しかし、その酵素の活性は非常に低く、微生物を使った実用的なアルカン生産を行うには、その活性を飛躍的に向上させる必要がある。そこで、本研究では、アルカン合成酵素の変異体ライブラリを作成し、その中から高活性変異体を“一目で”検出、選択することができる超高速人工進化系を構築し、アルカン合成酵素の高活性変異体を創出する。得られた高活性アルカン合成酵素を使った微生物によるカーボンニュートラル、かつ再生可能なバイオエネルギーの生産を実現し、日本のバイオエネルギー資源立国と地球温暖化の防止に大きく貢献したい。

## 2. 研究の内容(手法、経過、評価など)

酵素活性を向上させる方法として、進化分子工学が挙げられる。活性を上げたい酵素の変異体集団を作成する。その変異体集団の各変異体の活性を調べ、高活性な変異体を選択し、その変異体を基に、さらに変異体を作成する。この変異と選択からなる進化的プロセスを人工的に繰り返すことで、酵素の活性を飛躍的に向上させる方法である。本研究で、アルカン合成酵素の1つであるAARに着目し、画期的な活性検出法を開発し、 $10^4$ 種以上もの変異体AAR集団の中から、高活性AAR変異体を“一目で”選択できる人工進化プロセスを構築し、高活性AARを創出することを目指した。

### 1.1 バクテリアルシフエラーゼ (BL) を用いた画期的な AAR 活性検出法の構築

大腸菌内で発現したAARは、脂肪酸合成代謝物である脂肪酸アシルACPを基質として、脂肪酸アルデヒドを生成する(図1)。しかし、菌体内の酵素により、アルデヒドは、アルコール、もしくは脂肪酸へと変換されるため、アルデヒドを定量することでAARの活性を評価することは難しい。ADにより、アルデヒドから安定なアルカンへと変換し、アルカン量からAARの活性を調べることも可能であるが、多段階のプロセスと時間を要する。そこで、本研究では、AARの生成したアルデヒドの精製をリアルタイムにかつ、非破壊的にその活性を検出できる画期的な活性検出法の構築を目指した。

## 2. 研究の内容(続き)(書ききれない場合には、同一形態のページを追加しても結構です)

大腸菌内において、AAR と共に、バクテリアルシフェラーゼ(BL)を共発現する。BLは、脂肪酸アルデヒドを基質として、強い発光を伴って脂肪酸を生成する(図1)。大腸菌は、AAR が生成したアルデヒドの量に応じて発光するため、変異体 AAR 集団の中から強く発光する大腸菌を選択することで、活性の高い AAR を選択することができる。まず大腸菌内でイソプロピルガラクトシド (IPTG) を使って、AAR と BL の共発現が行える 2 種類のベクター、pRL と pLR を構築した。

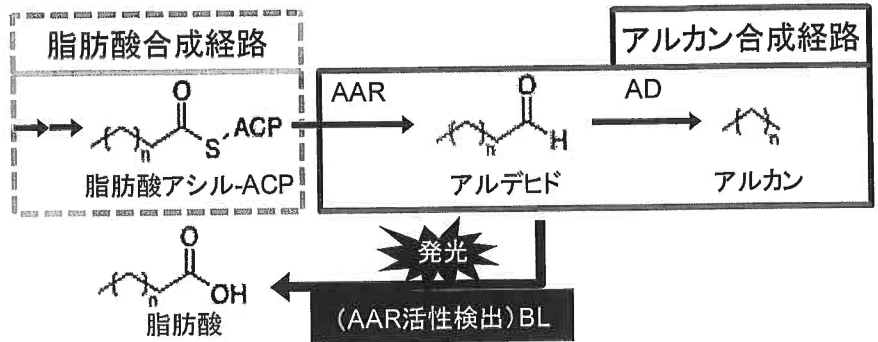


図1 AARとADの共発現によるアルカン合成経路と発光によるAAR活性検出

### 1.2 AAR と BL の共発現による発光検出

pRL、もしくは、pLR で形質転換した大腸菌 (BL21(DE3)pLysS 株) の前培養、本培養を行い、対数増殖期において、IPTG を含む寒天培地に植菌し、寒天培地上で AAR と BL の共発現を誘導した。同時に、寒天培地に X 線フィルムを貼付し、暗室にて、37°Cで一晩培養した結果、pRL と pLR において、IPTG の発現誘導に依存した発光を検出した。pRL、pLR 内の AAR 内部に Stop コドンを導入し、全長の AAR が発現しないようにした結果、発光は確認できなかつたので、AAR の発現依存的に発光していることが確認された。この結果、AAR が生成するアルデヒド依存的に大腸菌コロニーが発光することを確認した。

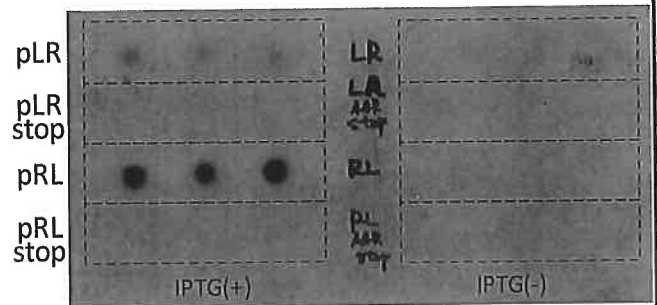


図2 X線フィルムによる大腸菌コロニーの発光検出 AARの発現依存的な発光(黒色部)を示している。

本検出法は、大腸菌内にあるアルデヒドをリアルタイムで発光として検出できる方法である。そこで、pRL、pLR で形質転換した大腸菌を前培養、本培養し、対数増殖期に IPTG により、AAR と BL の発現誘導を行った。発現誘導後、1 時間毎に液体培地をサンプリングし、カメラで撮影を行った(露光時間 1 分)(図3)。その結果、IPTG で発現誘導を行った液体培地から発光をリアルタイムに確認できた。一方で AAR 内部に Stop コドンを導入した pRLStop、pLRStop では発光を確認できなかった。その結果、液体培地に発光は、AAR と BL の共発現依存的であることを確認した。

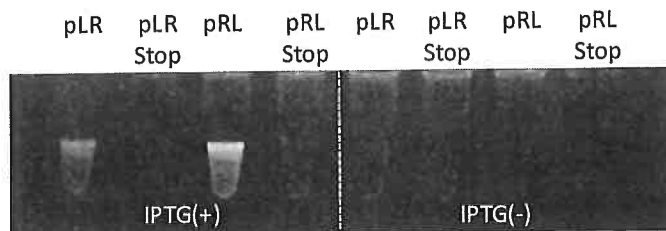


図3 AARとBLの共発現による発光の様子。発現誘導4時間後。露光時間1分間。

### 1.3 新規 AAR、BL の共発現系の構築

AAR の活性に応じて大腸菌の発光強度が変化することを確認するために、AAR 遺伝子のプロモーターを、培養液中に添加したアラビノースの濃度に応じて発現量を調節できる BAD プロモーターに置換した新たな共発現ベクター pLaraR、pLaraepR 構築した。今後は、AAR の発現量の変化と得られる発光強度の相関を調べる予定である。

### 1.4 AAR 変異体ライブラリの調製条件の最適化

野生型 AAR 遺伝子を鋳型として、error-pronePCR 法を用いて変異体 AAR ライブラリを調製する。変異導入率が高い場合、得られる変異体集団の各々の活性は大きく低下する。一方で、変異導入率が低い場合は、変異が入らない遺伝子が多く存在するため、変異体集団の種類は小さくなる。AAR 遺伝子において平均 2～3 個のアミノ酸となるように error-pronePCR の条件 (4 種類の基質濃度、マンガニオン濃度、鋳型 DNA 量、サイクル数) の最適化を行った。

### 1.5 AD に含まれるシステイン残基の重要性

システインは、蛋白質の構造安定性や触媒活性に対し重要な役割を担っているが、一方でシステイン残基同士の不適切なジスルフィド結合による蛋白質の変性や凝集を引き起こす危険性を有している。その危険性を抑えるため、通常、蛋白質溶液を扱う際には、ジチオスレイトール (DTT) などの還元剤を添加する必要がある。システインを持たない (システインフリー) 蛋白質の場合は、還元剤を添加する必要もなく経済的であり、また不適切なジスルフィド結合に由来する蛋白質の変性や凝集の危険性もない。そのため、産業利用の点からシステインフリーの蛋白質は望まれている。もう一つのアルカン合成酵素である AD には 3 つのシステイン (C71、C107、C117) が含まれている。AD の構造安定性や機能に対するこれら 3 つのシステインの役割を調べるために、システインをアラニン、もしくはセリンに置換した様々な変異体を作製し、その活性と構造安定性について野生型と比較した。その結果、C71 をアラニン (C71A)、もしくはセリン (C71S) に置換した変異体ではアルカン合成能が大きく低下した。一方で、C107、C117 の置換体は活性の低下は見られなかった。これらの変異体の多量体形成能を調べて結果、野生型、C107A、C117A は主に単量体であるのに対し、C71A は、その大部分が二量体を形成した。これらの付けから、C71 は AD の構造安定性と活性に非常に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。興味深いことに、システイン二置換体 (C107A/C117A) においても、活性が低下しなかったことから、AD の産業利用の点において、AD の活性や構造安定性を低下させることなく、不適切なジスルフィド結合の形成を抑えられる変異体として期待できる。これらの結果と、各置換体の熱安定性について解析した結果とまとめて、発表論文として現在投稿中である。

### 3. 研究の結論、今後の課題

#### 3.1 本研究の結論

本研究では、アルカン合成酵素の1つである AAR と BL を大腸菌内で共発現し、AAR によるアルデヒドの生成を、BL による発光として検出できる系の構築に成功した。また、全長の AAR の発現に依存した発光であることも確認した。さらに本手法は、大腸菌内で AAR の生成するアルデヒドを発光としてリアルタイムに検出できることも明らかにした。次に、進化実験を行う上で非常に重要な変異体ライブラリの構築条件の最適化も完了した。進化分子工学を用いた蛋白質の機能進化において、変異体ライブラリ集団の質は非常に重要である。その質を決定する要因として変異導入率があげられる。変異導入率が高い場合、各変異体 AAR の活性は大きく低下することから、機能進化は期待できない。一方で変異導入率が低い場合は、変異体ライブラリはほとんどが、変異を持たない野生型 AAR となってしまうため、同様に機能進化は期待できない。最適と思われる変異導入率（アミノ酸置換数 2-3 個/AAR 遺伝子）となるよう、鋳型 DNA 量、マンガンイオン濃度、4 種の塩基の濃度、PCR のサイクル数の決定を行い、変異体ライブラリの調製条件は決定した。

これと並行して、もう一つのアルカン合成酵素である AD において、蛋白質の構造安定性と活性に対する。3 つあるシステイン残基（C71、C107、C117）の重要性について、様々なシステイン置換体を用いて調べた。その結果、C71 は AD の構造安定性と活性に対し、非常に重要な役割を果たしていることを明らかにした。一方で、C107 と C117 の置換体は構造安定性や機能に大きな影響を与えないことから、産業利用の点から、C107A と C117A の二置換体は望ましいと結論づけた。

#### 3.2 今後の課題

この検出方法を用いて、進化分子工学による AAR の高活性化を実現するためには、AAR の活性（アルデヒド生成量）に応じた BL の発光が得られる条件の検討が必要である。そのために、AAR と BL を異なる誘導剤で発現可能な新たな共発現用ベクター（pLaraR、pLaraepR）の構築は完了している。これらのベクターでは、培地に添加するアラビノースの濃度に応じて AAR の発現量をコントロールできる。そのため、この共発現系を用いて、AAR の発現量を変化させ、その変化に応じて BL による発光が得られる条件を検討、決定し、進化分子工学による AAR の高活性化の選択条件とし、速やかに進化分子工学を開始する予定である。

#### 4. 成果の価値(とくに判りやすく書いて下さい)

##### 4. 1. 社会的価値

大腸菌を用いて実用的なアルカン生産を行うためには、大腸菌の代謝工学だけでなく、この2つの酵素(AARとAD)の高活性化は不可欠である。通常のAARの活性測定法では、一日当たり、数10種の変異体しか活性測定ができない。本手法が確立されれば、一日当たり $10^4$ 種以上の変異体の活性を評価することができることから、進化分子工学によるAARの高活性化研究が、単純計算で1000倍加速されることになる。AARの高活性化のために、AARによるアルデヒド生成量に応じたBLの発光量の相関が見られる条件の検討が必須となる。新たに構築した共発現ベクターにより、その条件を決定できれば、ただちに、AARの進化実験を行えるところまで来ている。AARの高活性化の実現することができれば、大腸菌によるアルカン生産を行う上での大きな問題点の1つが解決され、石油に変わる代替エネルギー生産として、微生物によるアルカン生産の実現可能性が飛躍的に向上すると思われる。

##### 4. 2. 学術的価値

本検出手法は、アルカン合成の最終基質であるアルデヒドの量を発光によりモニターすることが可能なシステムであり、大腸菌だけでなく、その他の微生物への応用も可能である。さらには、微生物の代謝経路を改変し、最終産物(アルデヒド)が多くできる条件を非破壊的に検討するといった微生物の代謝工学への応用も可能である。そのため、微生物によるアルカン生産に関する研究を大きく加速させる技術である。アルカン合成酵素であるAARは、発見されてまもなく、また非常に溶けにくい性質であるため、その機能や構造についてはほとんどわかっていない。進化実験により得られる変異体の中にはより溶けやすい性質をもったものが得られる可能性も十分に高い。その結果、蛋白質の結晶化が可能となり、AARの結晶構造を明らかにすることが可能となる。得られた結晶構造から新たに酵素の機能や活性の改変も可能となることから、さらなる酵素の機能進化を加速させることが期待できる。

##### 4. 3. 成果論文(本研究で得られた論文等を年代順に書いて下さい。未発表のものは公表予定を書いて下さい)

###### 学会発表

林勇樹、八杉文隆、新井宗仁 アルデヒドデカルボニラーゼによるバイオアルカン生産に向けたシステイン置換体の開発 第51回日本生物物理学会年会 2013年 京都国際会議場 京都

林勇樹、新井宗仁 脂肪酸アシル-ACP還元酵素の迅速活性評価法の開発 第52回日本生物物理学会年会 2014年 札幌コンベンションセンター 北海道

###### 発表論文

Role of cysteine residues in the structure, stability, and alkane producing activity of cyanobacterial aldehyde deformylating oxygenase

Yuuki Hayashi, Fumitaka Yasugi, Munehito Arai (2014) 現在投稿中。