

研究報告書

「バイオマス高度利活用を志向した人工代謝システムの創出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年4月～平成26年3月

研究者: 本田 孝祐

1. 研究のねらい

本研究では、好熱性微生物が有する耐熱性酵素群をモジュール化し、これらを任意に組み合わせることで、有用物質生産に特化した人工代謝経路を試験管内で再構成する新たな手法の開発に取り組んだ。

代謝とは、すべての生物が有する能力であり、外部から取り込んだ物質を、タンパク質や脂質など自分自身の体を構成する様々な分子に変換する(同化代謝)、あるいは体を動かすためのエネルギー性物質へと変換する(異化代謝)ための能力と定義づけることができる。細胞の中には、これらの変換反応を触媒する酵素タンパク質が数千種類も含まれ、複雑な代謝反応の担い手となっている。特に生物的多様性に富む微生物は、ユニークな代謝酵素の宝庫であり、人類は古来これらを発酵食品生産などに利用してきた。近年では、この発酵技術をさらに発展させ、バイオ燃料などの有用物質生産に利用しようという試みも活発となっている。一方、発酵技術による物質生産では、われわれが目的とする物質以外にも、微生物が生育に必要とする様々な物質が副産物として生産される。目的物質の生産に必要な代謝酵素だけを微生物から取り出して、試験管内で「人工代謝経路」を再構成することができれば、原理上、副産物を伴わない効率的な発酵生産が可能となるが、数千種類にもおよぶ生体内の酵素の中から必要な酵素だけを選択的に取り出すには、多大な手間とコストがかかることがネックとなってきた。

本研究では、この問題を解決する方策として、温泉などに生息する好熱性微生物(50～90℃程度の高温で生育可能な微生物)に着目した。まず、遺伝子組換え技術を用いて、これらが有する耐熱性の代謝酵素を、常温でしか生育できない中温性微生物の中で生産させる。これらの組換え微生物を50～90℃程度に加熱することで、中温性微生物由来の代謝酵素群は熱で不活化し、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となる。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単に構築することが可能となる。本研究では、次世代バイオ燃料として注目されるブタノールの生産を具体的ターゲットとし、人工代謝経路の構築とそのパフォーマンスを検証することを目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、異なる好熱性微生物に由来する合計16種類の耐熱性酵素を組み合わせた人工代謝経路を構築し、グルコース(ブドウ糖)を原料に次世代バイオ燃料として注目を集める1-ブタノールを試験管内で生産させることに成功した。構築した代謝経路は、古くからアセトン・ブタノール発酵菌として知られる *Clostridium acetobutyricum* の1-ブタノール生産経路を模

做してデザインされたものである。しかし、天然型経路を構成する酵素反応には、細胞外環境では動作困難なものも複数含まれることから、必要に応じてこれらの反応をバイパスさせるなど人為的なデザイン変更を施した。各種好熱性微生物のゲノム情報等を参考に、人工経路のモジュールとなりうる耐熱性酵素群を選択し、これらを個別に大腸菌内で過剰発現させた。得られた組換え大腸菌の細胞に 60~70°C程度の熱処理を施すことで、宿主である大腸菌に由来する中温性酵素群を不活化させた。こうして耐熱性酵素だけが活性を保持した触媒モジュールを調製するとともに、これらを組み合わせることで人工代謝経路を構築した。また、今回の研究では、人工経路内での代謝の流れ(流束)を、吸光度測定をベースにリアルタイムで測定する手法を開発することで、所望の代謝流束(すなわち目的物質の生産速度)を達成するのに必要な酵素濃度を実験的に最適化することを可能とした。この結果、生産速度 8.2 $\mu\text{mol/l/min}$ 、対グルコース収率 82% (mol/mol)という生産効率で1-ブタノールの試験管内生産に成功した。この生産効率は、発酵プロセスを用いたこれまでの世界最高水準に比肩しうる値であった。

また、同様の方法論に基づき、酵素モジュールの組み合わせを任意に変えることによって、1-ブタノールのほか、乳酸、リンゴ酸等の化学品を選択的に生産することにも成功している。これは、本法がバイオ燃料に限定されない様々な化学品にオンデマンドに適用可能であることを示すものである。

(2) 詳細

(2-1) ATP 非生産性キメラ型解糖系の構築とその利用

試験管内での酵素反応では、各反応に必要なエネルギーや酸化・還元力の供給源となる補酵素(ATP や NADH 等)を外部から添加する必要がある。一般にこれら補酵素群は高価な化合物であるため、物質生産を目的とした酵素反応の利用を考える場合、これらの消費と再生をバランスさせ、その利用効率を高めることが非常に重要となる。本研究では、一般的な解糖系(Embden-Meyerhof 経路、EM 経路)の一部の酵素反応を超好熱性アーキアに見られる変形EM経路のそれらと入れ替えることによりATP/ADPの消費と再生がバランスした(すなわちATPを生産しない)キメラ型EM経路を構築することに成功した(図1)。さらに構築したキメラ経路にリンゴ酸/乳酸デヒドロゲナーゼなどの酵素をカップリングさせることでグルコースからの乳酸およびリンゴ酸を選択的に生産させることに成功した(研究成果 1、2)。

(2-2) 人工代謝経路を用いたグルコースからの1-ブタノール生産

上記のキメラ経路をさらに伸長し、16種類の耐熱性酵素を用いて次世代バイオ燃料として注目を集める1-ブタノールの生産に取り組んだ。天然の1-ブタノール生産経路を構成する酵素反応の一部については、好熱菌に由来する耐熱性酵素が見出されていなかったり、大腸菌等の異種宿主内での組換え発現が困難であるものも含まれる。そこで、本研究では、天然の1-ブタノール生産経路には含まれない酵素反応を適宜組み込んだ人工経路をデザインすることで、これらの問題を回避した(図2)。

例えば、解糖系の最終産物であるピルビン酸からアセチル CoA への変換は、通常、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体とよばれる酵素複合体によって触媒されるが、本酵素複合体は極

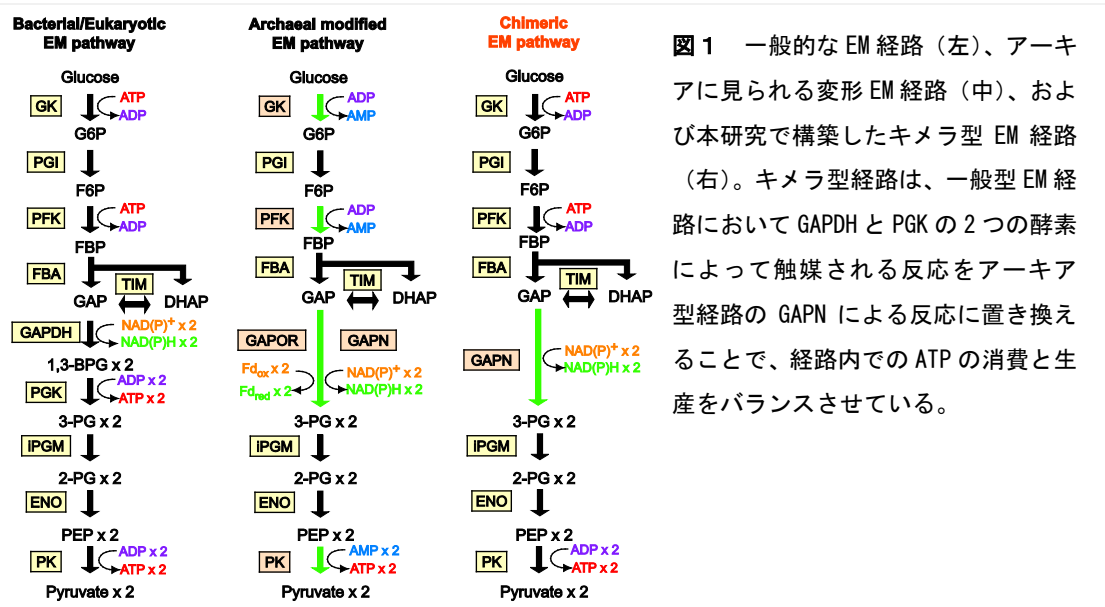


図1 一般的なEM経路(左)、アーキアに見られる変形EM経路(中)、および本研究で構築したキメラ型EM経路(右)。キメラ型経路は、一般型EM経路においてGAPDHとPGKの2つの酵素によって触媒される反応をアーキア型経路のGAPNによる反応に置き換えることで、経路内でのATPの消費と生産をバランスさせている。

めて複雑な高次構造を有し、異種宿主内での機能的発現の報告例は見られない。そこで、ピルビン酸デカルボキシラーゼ(PDC)、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ(ADDH)と呼ばれる二種類の酵素反応により、これをバイパスすることによって、天然型経路と同等の変換反応を試験管内でも動作させることに成功した(研究成果4)。また *Clostridium acetobutyricum* の1-ブタノール生産経路における中間体のひとつであるクロトニル CoA は、ブチリル CoA レダクターゼ(BCD)と呼ばれる酵素により二重結合の飽和化を受け、ブチリル CoA に変換され、次いでアルデヒドデヒドロゲナーゼによる還元反応でブタノール前駆体であるブチルアルデヒドへと変換される。しかし、このうち BCD は極めて酸素感受性の強い酵素であり、試験管内の反応でこれを利用するには困難が伴う。そこで、まずアルデヒドデヒドロゲナーゼによるクロトニル

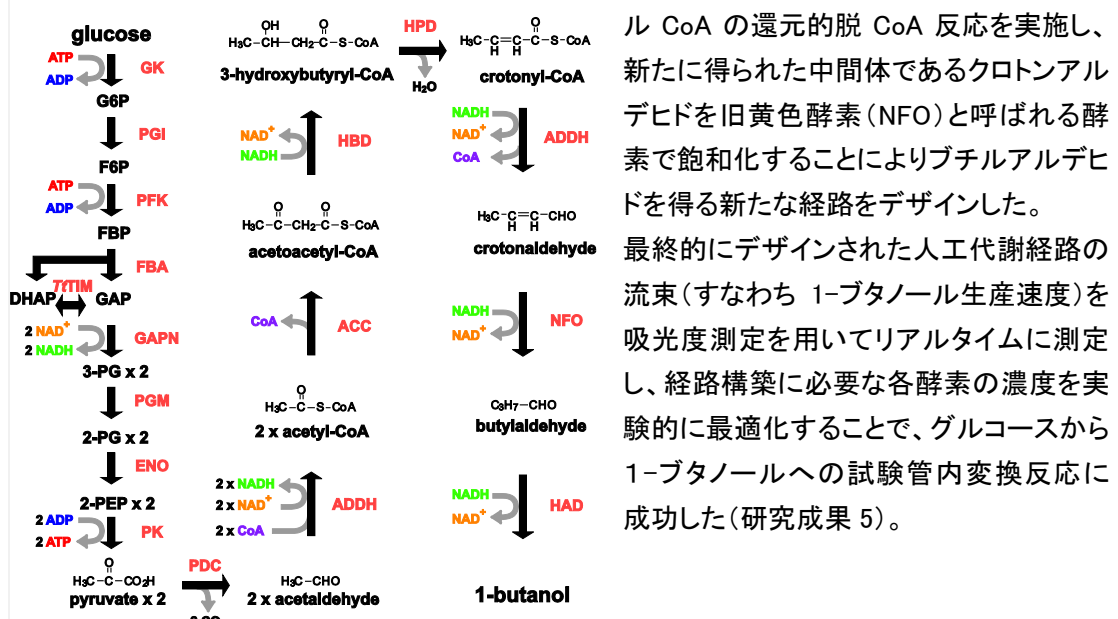


図2 本研究で構築した1-ブタノール生産のための人工代謝経路

ル CoA の還元的脱 CoA 反応を実施し、新たに得られた中間体であるクロトニアルデヒドを旧黄色酵素(NFO)と呼ばれる酵素で飽和化することによりブチルアルデヒドを得る新たな経路をデザインした。最終的にデザインされた人工代謝経路の流束(すなわち1-ブタノール生産速度)を吸光度測定を用いてリアルタイムに測定し、経路構築に必要な各酵素の濃度を実験的に最適化することで、グルコースから1-ブタノールへの試験管内変換反応に成功した(研究成果5)。

3. 今後の展開

本研究では、耐熱性酵素をモジュールとした試験管内での人工代謝経路構築技術を確立するとともに、本法を用いて 1-ブタノールをはじめとする各種の代謝産物を選択的に作りわけること成功している。本法の魅力のひとつは、モジュールである耐熱性酵素を自在に組み合わせることで、様々な有用化学品をオンデマンドで作りに出せる点にある。一方、本研究で示された物質生産システムの魅力は、生産速度と収率の点では既存の発酵プロセスを凌駕するものであった反面、一部の補酵素(NADH、NADPH など)の高温条件下での不安定性などが原因で長時間にわたる物質生産には適さず、結果的に得られた生産物濃度は、実用化には不十分な値にとどまっている。この問題は同時に、「高温環境下で生育する好熱菌たちはいかにして、これら補酵素群の持続的利用を可能にしているのか？」という基礎的疑問を投げかけるものでもある。今後、好熱菌における補酵素安定化メカニズムの解明など、本研究の遂行により新たに顕在化した課題をクリアすることで、人工代謝経路による物質生産プロセスのフィージビリティを向上させていくことが必要となろう。

4. 評価

(1) 自己評価

一連の研究を通じて、耐熱性酵素をモジュールとした試験管内での人工代謝経路構築という新たな方法論を確立することができた。本技術の魅力のひとつはモジュールである耐熱性酵素を自在に組み合わせることで、様々な有用化学品をオンデマンドで作りに出せるポテンシャルを有する点にある。今後、高付加価値な化学品にターゲットを定めることによって比較的近い将来の産業利用も可能であると考えている。

一方、バイオ燃料などのバルクケミカルへの応用を考えた場合、現時点で得られている生産物濃度などの値は、産業利用可能なレベルに比べ、未だ大きな隔たりのあるものと言わざるを得ない。しかし、補酵素群の熱安定性の問題など、今後、本技術のフィージビリティを向上させるために取り組むべき要素技術が本プロジェクトの遂行により具体化された点は非常に重要であると認識している。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

微生物の発酵機能を担う代謝酵素群を自由自在に組み合わせ、さまざまな化学品を生産できる人工代謝システムを開発することを目指し、この手法を用いて、第3世代バイオ燃料としての実用化が期待されるブタノールの生産に取り組んでいる。独創的な研究で発展性が期待される提案内容であったが、研究期間を通じて、順調に成果を獲得し、論文業績などは満足する結果を得られ、研究領域に十分な貢献を果たしたと評価する。今後は、CREST との連携研究などを通じて、NADH 等の補酵素群の熱安定性の問題などの解決による更なる可能性の追求や、バイオエネルギー関連物質のみならず、ファインケミカル生産などを含め、産業利用可能なレベルへの進展を期待する。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Ye Xiaoting, Kohsuke Honda, Takaaki Sakai, Kenji Okano, Takeshi Omasa, Ryuichi Hirota, Akio Kuroda, Hisao Ohtake Synthetic metabolic engineering—a novel, simple technology for designing a chimeric metabolic pathway. *Microbial Cell Fact.* 2012, 11, 120.
2. Ye Xiaoting, Kohsuke Honda, Yumi Morimoto, Kenji Okano, Hisao Ohtake Direct conversion of glucose to malate by synthetic metabolic engineering. *J. Biotechnol.* 2013, 164, 34–40.
3. Pham Huynh Ninh, Kohsuke Honda, Yukako Yokohigashi, Kenji Okano, Takeshi Omasa, Hisao Ohtake Development of continuous bioconversion system using thermophilic whole-cell catalyst. 2013, 79, 1996–2001.
4. Borimas Krutsakorn, Takashi Imagawa, Kohsuke Honda, Kenji Okano, Hisao Ohtake Construction of an *in vitro* bypassed pyruvate decarboxylation pathway using thermostable enzyme modules and its application to *N*-acetylglutamate production. *Microbial Cell Fact.* 2013 12, 91
5. Borimas Krutsakorn, Kohsuke Honda, Xiaoting Ye, Takashi Imagawa, Xiaoyu Bei, Kenji Okano, Hisao Ohtake *In vitro* production of *n*-butanol from glucose. *Metab. Eng.* 2013, 20, 84–91

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

・学会発表

1. Kohsuke Honda, Xiaoting Ye, Kenji Okano, Hisao Ohtake Construction of a chimeric glycolysis pathway by synthetic metabolic engineering. 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS). Sep 18, 2012, Daegu, Korea
2. Kohsuke Honda, Xiaoting Ye, Kenji Okano, Hisao Ohtake Synthetic metabolic engineering –A novel, simple technology for designing a chimeric metabolic pathway. Society of Biotechnology Japan, International Symposium on Green Growth. Oct 26, 2012, Kobe, Japan
3. Kohsuke Honda Butanol production through *in vitro* synthetic metabolic pathway. Sep 26, 2013 Enzyme Engineering XXII, Toyama, Japan.

・受賞

4. 本田孝祐 「耐熱性酵素モジュールを用いたオンデマンド・バイオプロセスの開発」 第 14 回酵素応用シンポジウム研究奨励賞(主催:天野エンザイム株式会社)2013 年 6 月 14 日

・報道/プレスリリース

5. 「試験管内でバイオ燃料合成」2013 年 10 月 3 日 朝日新聞 朝刊 21 面