

代謝デザインに資する酵素創製と探索

森 裕太郎*・折下 涼子・白井 智量

はじめに

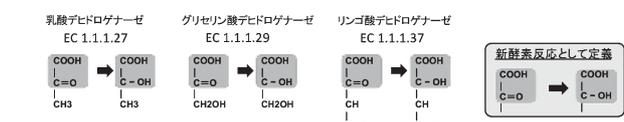
近年の合成生物学・代謝工学技術の進展に伴い、「微生物が生産しているもの」を「大量に・効率よく」作ることから、「これまで実現不可能であった有用化合物を微生物で作る」ことが可能になりつつある^{1,2)}。そのためには、バイオ生産性向上を目的とした新規代謝経路の創生が必須であるが³⁾、まだまだ試行錯誤プロセスを経るものが多く、合理的でシステマティックな手法の開発が望まれる。近年、KEGG・BRENDAなどの各種データベースには、代謝経路に関する豊富な知識が蓄積されてきており、代謝工学において生物・化学情報解析による知識抽出が重要な役割を果たしてきている。本稿では、筆者らが開発している非天然の代謝経路を設計するツール：BioProVをもとに、有用酵素の創製および探索によるイソプレンの新規バイオ合成経路の創生について述べる。

BioProV：人工代謝経路の設計ツール

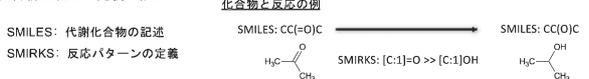
当該ツールでは、目的の(非天然の)有用化合物をインプットデータとしてシミュレーションを開始すると、生体内の既知の化合物から目的の化合物までをつなぐ人工代謝経路の候補を探索し、表示することが可能である。概要は以下の通りである(図1)。

1. KEGGやBRENDAといった代謝反応・酵素反応が

(a) 約3,000の既知の酵素反応 (i.e., EC number) を反応パターンに注目して400種類の反応に再分類化



(b) 化合物と反応の定義・記述



(c) 設計シミュレーションアルゴリズム

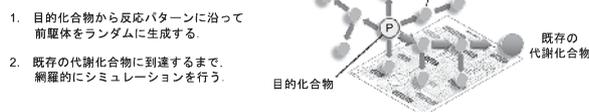


図1. 人工代謝経路設計ツール (BioProV) の実装内容

格納されているデータベースから、個々の酵素という概念を外し、化学反応パターンだけを記述した。そして、同様の化学反応パターンを一つの化学反応として再分類化し、コンピュータに学習させた(図1a)。

2. 学習の方法としては、各反応において、前駆体と生成物をSMILESという表記方法で記述し、その反応メカニズムをSMIRKSという方法ですべて記述した(図1b)。

3. 実際のシミュレーションにおいては、目的化合物をSMILESで記述し、インプットデータとする。そして、それをもとにランダムに、かつ網羅的に前駆体を逆合成していく。その逆合成された前駆体の中に、生体内での存在が既知の化合物が出てくるとシミュレーションが成功となる。つまり、その既知の生体化合物を出発物質として、設計された人工代謝反応を実現することができれば、目的の化合物が生成できる(図1c)。

このようにして開発した上記ツールをバイオイソプレンの生産に利用した。イソブレンは自動車タイヤなどの原料として使われる合成ゴム(ポリイソブレンゴム)の原料として使用される。イソブレンはポリイソブレンのモノマーとして、また、二次代謝産物の構造単位として幅広い生物の細胞内に存在しうる物質であるが、多段階の酵素反応となるため、その合成経路を最適化するのは難しい。さらに1分子のイソブレンを生成するためには、エネルギー物質であるATPが3分子必要であるので、エネルギー的に大きな不利となる(図2a)。そこで、ATP

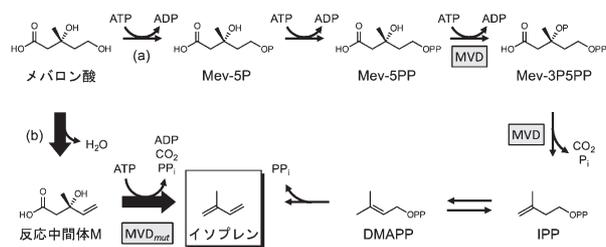


図2. (a) 既知のイソブレン合成経路と(b) BioProVにより探索された人工代謝経路

* 著者紹介 国立研究開発法人理化学研究所環境資源科学研究センター (特別研究員) E-mail: yutaro.mori@riken.jp

反応中間体M)であり、反応中間体Mは天然の基質の $1/10^5$ 以下の結合しか持たないことが明らかとなった。これより疎水性残基の導入や高高いアミノ酸残基による基質結合ポケットの縮小により、MVDと反応中間体Mとの親和力の向上を狙った(指針2)。またMVDとMevPPについて両者の構造を固定せず、induced-fitを考慮し、それぞれ立体配座を変化させながらドッキングシミュレーションを行うと、上述の酸性/極性クラスター部位がまずMevPPの-COOH基と相互作用した後に、-OH基、-OPP基と次々に相互作用部位を変えて、MVD内部にある活性中心に向けて奥へ奥へと送り込んでいく様子が見受けられた。MevPPについてはこのような相互作用の受け渡しを駆動力として効率的な基質取り込みが行われていると予測されたため、反応中間体Mの取り込みを期待し、基質結合部位入り口の空間を大きく、また基質の通り道に変異を導入することとした(指針3)。

これら指針に基づき作製したMVD変異体が大腸菌にて発現・精製し、反応中間体Mを基質として*in vitro*での酵素反応を行い、生成したイソプレンを測定することで各酵素を評価した。その結果、野生型のMVDでも少量ながらイソプレンが検出できた一方で、上述の設計指針に従い作製したMVDの一残基変異体により、野生型の100倍以上のイソプレン生成を達成した(図4、変異体M2)。また、この他にも各指針に基づき高活性なMVD変異体を多数取得することができたため、これらを組み合わせることで、最終的に 10^5 倍以上の非常に高活性なイソプレン生成MVD変異体の獲得に成功した(図4、変異体M10)⁷⁾。構築した変異体モデルと反応中間体MおよびATPとのaffinityを計算したところ野生型MVDからさほど変化が見られなかったことから、主に基質取り込みの促進により酵素活性が向上したのではな

いかと推察している。

鑄型酵素の基質特異性を変化させて目的化合物を生産する場合、新規化合物への親和力と反応性を高めるとともに、天然の基質に対しては逆に親和力を下げることが考慮する必要がある。生体内化合物として天然の基質が存在している場合は競合反応となってしまう、目的の化合物の生成が阻害されるためである。合理的設計に基づく変異体構築を行い、前駆体化合物に対する新たな触媒活性の発現と、天然化合物への親和力低減を達成した新規人工代謝経路の創生も、近年では報告されている⁸⁾。実際に、今回取得したMVD変異体についても、元の基質であるMevPPに対する酵素活性の低下を確認している。さらに、大腸菌内でMVD変異体を発現させ、培地中に反応中間体Mを添加して一晩培養したところ、イソプレンを生成していることが明らかとなった。大腸菌は非メバロン酸経路を有しているため細胞内にMevPPは存在しないとは言え、今回*in vivo*における非天然の化合物を用いた人工代謝反応の実現に成功したと言える。現在は上記と同様の指針により、新規バイオイソプレン合成経路の前半反応である、生体内化合物であるメバロン酸から末端OH基の脱水反応により、反応中間体Mを生成する脱水酵素の変異体獲得に向けた研究を進めている。

新規代謝経路の構築に有用な酵素の探索

天然には存在しない新規の代謝経路の構築において、反応を触媒する酵素の合理的な変異体設計と合わせて、使用する酵素自体のスクリーニングも並行して行うことで、人工経路の実現化および生産性の向上が期待できる。近年では、特定の化合物と結合して特定遺伝子の翻訳が開始されるアロステリック制御された転写因子を用いたものや、目的化合物の結合によるスプリット蛍光タンパク質の蛍光回復を利用したものなど、多岐にわたるスクリーニング系が構築されている⁹⁾。メバロン酸経路に関連して、(R)-5-ホスホメバロン酸(MVA5P)を効率的に脱炭酸する酵素の活性と大腸菌の成長速度をリンクさせることで選別を行い、野生型の2.4倍の活性を持つ変異体の獲得に成功した例も報告されている¹⁰⁾。筆者らの研究においては培養液に基質である反応中間体Mを添加し、測定用バイアルに密閉して培養を行い、そのまま培養ガス中のイソプレンを測定すればよいいため、酵素の単離精製および生成物の分離などを行う必要がなく、高効率なスクリーニングを行うことができる。実際に異種由来のMVDについて複数検討したところ、使用してきた*S. cerevisiae*由来MVDの野生型と比較して反応中間

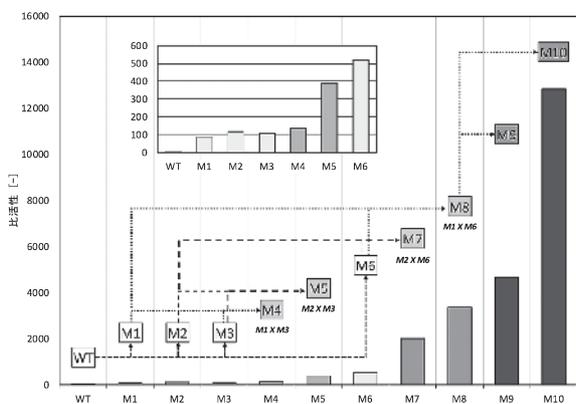


図4. 野生型MVD (WT)が、反応中間体Mから生成したイソプレン量を1とした場合のMVD変異体 (M1~M10)の比活性および各変異体の系統図。

体Mからイソプレンへの変換能力が20倍以上高い異種由来MVDを見いだすことに成功している。

一般的に酵素の人工代謝経路の構築においては、基質の構造類似性から鋳型となる酵素にある程度あたりを付けたうえで、由来の異なる酵素群から高活性体を探す手法が主流である。一方で、基質の構造が大きく異なる酵素や、EC番号の分類上では本来反応を触媒しないはずの酵素においても、目的とする反応が進行することがある。バイオイソプレンの生成について見てみると、本来はC11～C18の長鎖脂肪酸を基質とするような長鎖脂肪酸デカルボキシラーゼおよびオレイン酸ヒドラーゼの二つの酵素を用いることで、メバロン酸からイソプレノールを経た2段階でのイソプレン生成が報告されている¹¹⁾。また、筆者らのチームでは検討を進める中で、本来はATPを消費してメバロン酸の3位のOH基をリン酸化する酵素である *Thermoplasma acidophilum* 由来のメバロン酸キナーゼ (M3K) が、反応中間体Mをリン酸化するのみならず脱炭酸反応まで触媒することでイソプレンを効率的に生成することを見いだしている。MVDとM3Kについては、構造の比較からMVDにおけるリン酸化に関わるアミノ酸残基の特定と、その後に配座変化に伴う脱リン酸化を経て脱炭酸反応が進行する機構が明らかとなってきた¹²⁾。また、M3K本来の基質であるメバロン酸と比較して小さい基質について、M3Kであっても脱炭酸反応するという報告がある¹³⁾。よって、基質ポケット内部で立体配座が固定されるメバロン酸とは異なり、affinityが弱く小さい反応中間体Mについては同様に、リン酸化後に脱炭酸反応が進行しているのではないかと推察している。このようにすでに知られている基質特異性や酵素の分類から少し離れて、鋳型として使用する酵素のスクリーニング範囲を拡張することも時に有用である。本来は脱炭酸能力を持たないはずである酵素であるにもかかわらず、上述の鋳型酵素で

ある *S. cerevisiae* 由来MVDの10³倍以上のイソプレン生成能力を示しているのは非常に興味深い。今後は酵素のスクリーニングで見いだした異種由来MVDとのアミノ酸配列の違いをMVDにフィードバックし、またこれらに合理的設計に基づくアミノ酸変異を適応することで、さらなる反応性の向上を目指す。

おわりに

今回、有用物質生産を志向した新規人工代謝経路の創生に向けて、筆者らが開発したBioProVによるバイオイソプレン生産経路デザインと、合理的設計による有用酵素の創製および探索を行った。非天然化合物を介する反応経路であっても、鋳型酵素の選択と変異体の設計により構築しうることは、代謝デザインの自由度を増すことにつながる一つの大きな指針であり、今後は代謝デザインと酵素デザインの両方面からの更なる取組みを進めたい。

文 献

- 1) Noda, S. *et al.*: *Metab. Eng.*, **33**, 119 (2016).
- 2) Noda, S. *et al.*: *Nat. commun.*, **8**, 1153 (2017).
- 3) Mori, Y. *et al.*: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **54**, 41 (2018).
- 4) Araki, M. *et al.*: *Bioinformatics*, **31**, 905 (2015).
- 5) Freund, G. S. *et al.*: *ACS Chem. Biol.*, **12**, 2465 (2017).
- 6) Molecular Operating Environment (MOE), version 2018.01; Chemical Computing Group Inc, Montreal (2018).
- 7) 折下涼子ら：特願2017-016864 (2017).
- 8) Walther, T *et al.*: *Nat. Commun.*, **8**, 15828 (2017).
- 9) Rogers, J. K. *et al.*: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **42**, 84 (2016).
- 10) Kang, A. *et al.*: *Metab. Eng.*, **41**, 125 (2017).
- 11) Yang, J. *et al.*: *BMC Biotechnol.*, **16**, 5 (2016).
- 12) Motoyama, K. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **292**, 2457 (2017).
- 13) Rossoni, L. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 2625 (2015).