

植物ホルモン・アブシジン酸の発酵生産へ向けた基盤研究

南 篤志

北海道大学大学院 理学研究院

研究の目的

植物ホルモン・アブシジン酸 (ABA、**1**) は、砂漠地域の緑化や塩害地域での農業生産量の向上などといったグリーンイノベーションに資する鍵物質であることから、発酵技術を利用した大量生産が強く期待されている。申請者らが解明した糸状菌 (*Botrytis cinerea*) における ABA 生合成経路はわずか4工程であり^{1,2} (図1)、植物におけるカロテノイド経路と比較して短工程であることなどから、発酵生産を指向する上で格好の研究材料である。既に構築した形質転換体の異種生産の際の化合物プロファイルを調べると、ABA 生合成におけるボトルネックは、ABA の基本炭素骨格の構築を担う新しいタイプの環化酵素 (BcABA3) の酵素活性そのものにあることが予想された。以上のような仮説の下、本研究課題では、①仮説の前提となった化合物プロファイルの再確認、②BcABA3 の酵素学的諸性質の検討を行った。

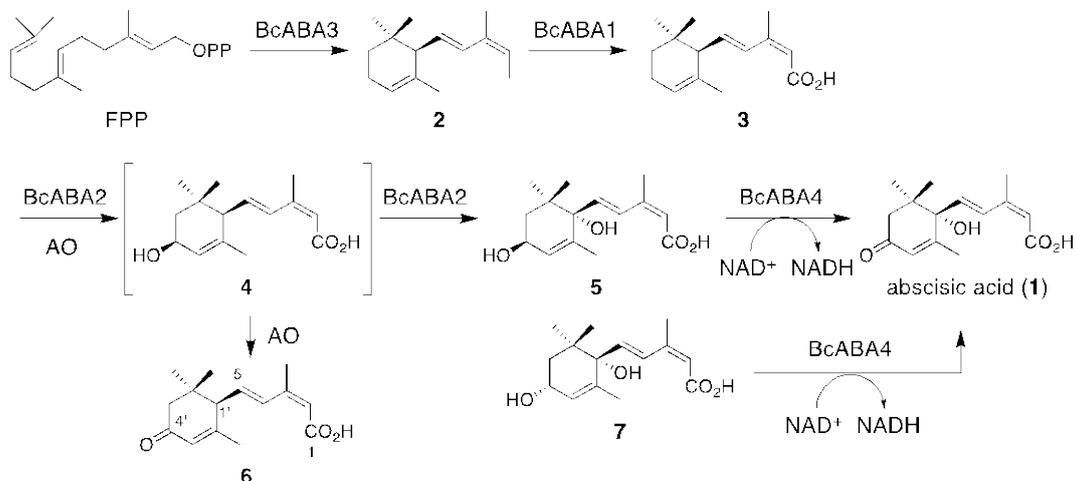


図1 糸状菌における ABA 生合成経路の概略図

方法

① 仮説の前提となった化合物プロファイルの再確認

麹菌は非相同末端修復系を介して染色体上の複数箇所に外来遺伝子を取り込むことが知られており、この不規則性と符合するかのよう、代謝産物の生産量や代謝プロファイルは形質転換体ごとに大きく異なる。この問題を解決するため、申請者らは高発現領域への遺伝子導入法「Hot spot-Knock in 法」を確立した。本手法は、導入した遺伝子が必ず転写・翻訳される高発現領域へと標的遺伝子導入する手法であ

る。本研究では、仮説の前提となった化合物プロファイルをより詳細に精査するため、「Hot spot-Knock in 法」を用いて BcABA 生合成遺伝子 (*bcABA1-4*) を高発現領域 (HS801、HS201) へと導入した。具体的には、①遺伝子導入用プラスミドの構築、②*ligD* 破壊株 (麹菌 NSPID1 株) を用いた形質転換、③得られた形質転換体の代謝プロファイルの確認を行った。

② BcABA3 の酵素学的諸性質

BcABA3 は、直鎖状化合物であるファルネシル 2 リン酸 (FPP) を原料とした環化反応を触媒して環化体(2*Z,4E*)- α -ionylideneethane (**2**) を与える。上述した実験により、BcABA3 が触媒する環化反応が ABA 生合成のボトルネックになっていることがわかったため、その酵素学的諸性質を調べることにした。

一般に、セスキテルペン環化酵素の酵素学的性質の解明では、①FPP からのピロリン酸部の脱離、②環化体の生成のいずれかのプロセスに着目した解析が行われる。BcABA3 が触媒する環化反応では 2 つの中性分子 (β -farnesene、allofarnesene) を経て環化体が生成することを考慮し (図 2)、環化体の生成に着目した GC-MS 分析を行うことで、至適 pH、至適温度、金属イオン要求性を調べた上で速度論解析の予備検討を行った。

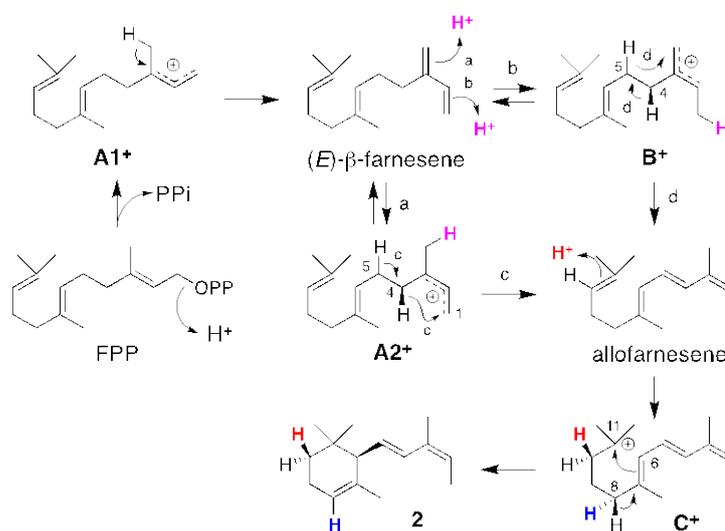


図 2 BcABA3 が触媒する推定環化機構

結果

① 仮説の前提となった化合物プロファイルの再確認

「Hot pot-Knock in 法」を用いて ABA 生合成に関わる 4 種の遺伝子 (*bcABA1-4*) を麹菌へと導入し、4 遺伝子導入株 (AO-*bcABA1/2/3/4*) を得た。その形質転換効率 (ABA 生産株の数/プレート上に生育した形質転換体の数) は 70%であった。得られた形質転換体の代謝産物を UPLC-MS で分析したところ、取得した全ての形質転換体において最終産物である ABA のみが観測された。その収量は 228 mg/kg of rice であり、以前に構築した形質転換体の生産量 (68 mg/kg of rice) を大幅に上回る結果であった。この生産量の増加は、高発現領域に標的遺伝子を導入したためであると考えられる。環化体及び生合成中間体が観測されなかったことから、当初の仮説通り、環化体の生成が ABA 生合成におけるボトルネックであることを再確認できた。

② BcABA3 の酵素学的諸性質

組み換え酵素を用いた *in vitro* 反応により生成した環化体を定量することで、1) 至適 pH 8.0、2) 至適温度 30 度、3) マグネシウムイオン要求性であることを確認した。またマグネシウムイオンの濃度が 10 mM の時に酵素活性が最大となった。この至適条件下での K_m 、 k_{cat} はそれぞれ 3.2 mM、 $6.7 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ であった。

結論

本研究課題ではグリーンイノベーションに資する鍵物質であるアブシジン酸 (ABA) の発酵生産を志向し、①「Hot spot-Knock in 法」を用いた *bcABA* 生合成遺伝子導入株の再構築とその化合物プロファイルの確認、②BcABA3 の酵素学的諸性質の解析を行った。項目 2 の結果を基盤とした酵素機能のファインチューニングを行えば、異種発現による ABA 生産量の向上が期待できる。また、上述した実験に加えて、阻害剤として利用できるアナログ体の特定、結晶構造解析、類縁酵素の機能解析などについても予備検討も行った。

最後になりますが、本研究を支援して頂いた公益財団法人野田産業科学研究所に深謝致します。

文献

- 1) Takino, J., Kozaki, T., Sato, Y., Liu, C., Ozaki, T., Minami, A., and Oikawa, H. (2018) Unveiling biosynthesis of the phytohormone abscisic acid in fungi: Unprecedented mechanism of core scaffold formation catalyzed by an unusual sesquiterpene synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **140**: 12392-12395.
- 2) Takino, J., Kozaki, T., Ozaki, T., Liu, C., Minami, A., and Oikawa, H. (2019) Elucidation of biosynthetic pathway of a plant hormone abscisic acid in phytopathogenic fungi. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **83**: 1642-1649.