

# 発酵法／酵素法を融合したハイブリッド型バイオ変換システムの開発

本田 孝祐

大阪大学 生物学国際交流センター

## 研究の目的

生体触媒反応を用いた化学品製造法は、主として発酵法と酵素法の2つに大別される。前者は生きた細胞の代謝反応を利用し、グルコースなどの安価な原料(基質)からアルコールやアミノ酸等の基幹代謝物を量産する場合に強みを持つ。しかし原料となる物質の一部は、細胞の増殖やエネルギー生産にも用いられるため、生産物の対基質収率には制限が生じる。これに対し酵素法は、非天然の物質を含む多様な化学品の製造に適用でき、副反応がなく高収率な変換が行える点で強みを有するが、細胞からの目的酵素の単離・精製に時間とコストを要する。

本研究は、発酵法・酵素法の長所を兼備した新たな生体触媒利用技術を樹立すべく企図されたものである。具体的には、反応温度のシフトにより、発酵法から酵素法への切り替えを行うことができるハイブリッド型バイオ変換システムの開発に取り組む。本システムでは、代謝改変などによって特定の代謝物の生産性を向上させた中温性微生物に、当該代謝物をより付加価値の高い誘導体へと転換可能な耐熱性酵素を発現させた微生物株を用いる。はじめに中温域(30°C程度)で発酵生産を実施した後、耐熱性酵素が優れた活性を示す高温域(50~70°C程度)へと反応温度をシフトさせることで、発酵法フェーズから酵素法フェーズへの切り替えが生じる(図1)。高温域への温度シフトに伴い、中温性微生物由来の酵素の多くが失活し、副反応が抑えられることによって、耐熱性酵素による高収率な変換反応が達成される。本研究では、その概念実証のため、L-リジン発酵能を有した *Corynebacterium glutamicum* に、耐熱性の lysine 6-dehydrogenase (Lys6DH)、pyrroline-5-carboxylate reductase (ProC) を発現させた微生物株を用い、医薬品合成前駆体などとして知られる L-ピペコリン酸(L-PA)を生産することに取り組んだ(図2)。

## 方法

好熱菌由来の Lys6DH、ProC として報告されている *Geobacillus stearothermophilus*、*Sulfolobus solfataricus* 由来酵素(1,2)のアミノ酸配列をクエリとして、研究室に保存

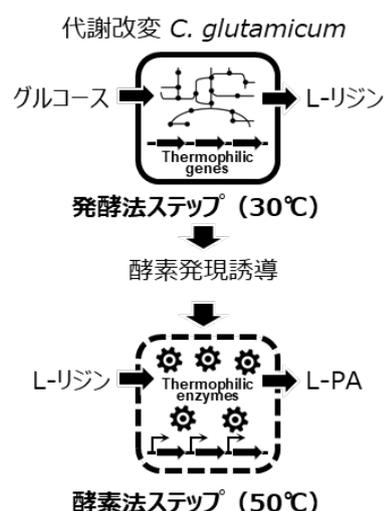


図1 本研究で開発に取り組んだハイブリッド型バイオ変換システムの概略。

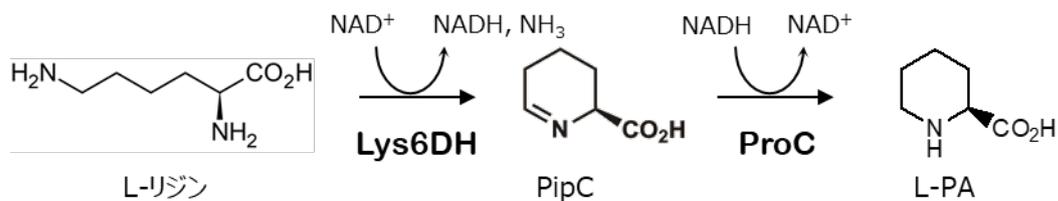


図2 L-リジンからの L-PA 生産. PipC は  $\Delta^1$ -Piperideine-2-carboxylic acid の略.

されている好熱菌ゲノムに対する相同性検索を行った。相同性を示した遺伝子を大腸菌で発現させ、熱処理による簡易精製の後、組換え酵素の活性を測定した。最も高い比活性を示した酵素について、*C. glutamicum* 内での発現用にコドン最適化した合成遺伝子を調製し、発現ベクターに連結した後、L-リジン生産株である *C. glutamicum* GRLys1 (3) へ導入した。得られた形質転換体を 4%グルコースを含む CGXII 培地 (50 mL) 上で 30°Cにて培養し、L-リジンの発酵生産および耐熱性タンパクの発現誘導を行なった。炭素源の枯渇を確認した後、培養槽の温度を 50°Cにシフトし、L-リジンから L-PA の変換を実施した。培地中のアミノ酸はフェニルイソチオシアネート (PITC) による誘導体化後、HPLC にて分析した。

## 結果

Lys6DH、ProC とも多くの好熱菌より相同遺伝子を見出すことができた。それぞれの酵素遺伝子について 5 種類ずつを選定し、大腸菌を宿主とした組換え酵素の調製と活性測定を行った。この結果、最も高い比活性を示した酵素として *Geobacillus* sp. 30 由来の Lys6DH、および *Desulfurobacterium thermolithotrophum* 由来の ProC を選抜した。両酵素遺伝子をタンデムに連結した発現カセットを有するプラスミドベクターを構築し、これを L-リジン発酵生産能を有した *C. glutamicum* へと導入した。なお本株は、ドイツ・ビーレフェルト大学のグループによって育種されたものであり、フィードバック阻害非感受性の変異を有した生合成酵素の導入などにより L-リジン発酵生産能が付与されている (3)。CGXII 培地上、30°Cでの培養で、培養開始から 48 時間後に 39 mM の L-リジンが生産された。また、この時に得られた菌体の一部を回収し、その粗抽出液を酵素アッセイに供したところ、Lys6DH および ProC が共に機能的に発現していることが確認された。一方、これらの酵素が発現しているにもかかわらず、30°Cでの培養 (すなわち発酵ステップ) では、L-PA の蓄積は見られなかった。これは、両酵素もしくはこれらのうちの一方が、中温域においては活性を示さず、L-リジンから L-PA への変換が行われなかったためと考えられる。培養液の温度を 50°Cにシフトするとともに終濃度 1 mM の  $\text{NAD}^+$  を添加することで、発酵生産された L-リジンの L-PA への酵素変換ステップを実施したところ、温度シフトから 48 時間後には 13 mM の L-PA の蓄積が認められた。

## 結論

代謝改変 *C. glutamicum* による中温域 (30°C) での L-リジン発酵生産と、高温域 (50°C) における L-リジンから L-PA への酵素変換からなるワンポット反応が実証され、本研究にて提案するハイブリッド型バイオ変換システムの動作確認を行うことができた。一方で、発酵生産された L-リジンの一部は L-PA にまで変換されないまま反応液中に残存しており、高収率での変換が可能という酵素法の強みのひとつが十分に活かされていないという課題も見つかった。今後は、耐熱性酵素遺伝子の発現強化や組換え *C. glutamicum* の高密度培養により、反応に供される酵素濃度を高めるなどの工夫が必要となろう。

## 文献

- 1) Heydari, M., Ohshima, T., Nunoura-Kominato, N., and Sakuraba, H. (2004) Highly stable L-lysine dehydrogenase from the thermophile *Geobacillus stearothermophilus* isolated from a Japanese hot spring: Characterization, gene cloning and sequencing, and expression. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 937-942
- 2) Meng, Z. *et al.* (2009) Purification, characterization and crystallization of pyrroline-5-carboxylate reductase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Protein Expr. Purif.* **64**: 125-130
- 3) Pérez-García, F., Peters-Wendisch, P., and Wendisch, V. F. (2016) Engineering *Corynebacterium glutamicum* for fast production of L-lysine and L-pipecolic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**: 8075-8090

## 謝辞

代謝改変 *C. glutamicum* の提供、ならびに多くの助言をいただいたドイツ・ビーレフェルト大学の Volker Wendisch 教授、Anastasia Kerbs 氏に御礼申し上げます。