

ポリケタイド生合成酵素の蛋白質工学とゲノム工学

平野 展孝
日大工・生命

【背景・目的】

植物由来ポリケタイドには、ウコンのクルクミンや、ブドウのレスベラトロールなど、抗腫瘍作用や抗酸化作用など様々な生理活性を持つものが存在する。近年、バイオテクノロジー分野では、これらの生理活性物質の誘導体を、遺伝子工学が容易な大腸菌で生産する手法が注目されている。しかし、従来から用いられる大腸菌プラスミド DNA への遺伝子導入法では、導入鎖長に限界があるため、多種類の生合成遺伝子が関与する生合成系への適応が困難である。そこで本研究では、長鎖 DNA が導入可能な大腸菌ゲノム DNA へ生合成経路を遺伝子導入することで、効率的なポリケタイド生産を可能にする手法の開発を行った。

【方法】

大腸菌ゲノムへの遺伝子導入には、放線菌ファージ TG1 由来部位特異的組換え酵素 (TG1 ファージ・インテグラーゼ) を用いた^{1,2)}。ファージ・インテグラーゼは、ファージ感染時に、ファージゲノムの宿主細菌ゲノムへの組み込みを触媒する酵素である³⁾。しかし、遺伝子導入した生合成経路のゲノム発現時では、プラスミド発現時と比較して、遺伝子発現量が大きく低下し、生合成量も大きく低下する場合が多い。本研究では、放線菌のフラビオリン (赤色色素) とウコンのクルクミン (抗腫瘍作用) の生合成系 (図 1) を対象に、生合成酵素を人工的に複合体化することで、生合成反応を効率良く進行させ、生合成量を向上させる手法の開発を試みた。

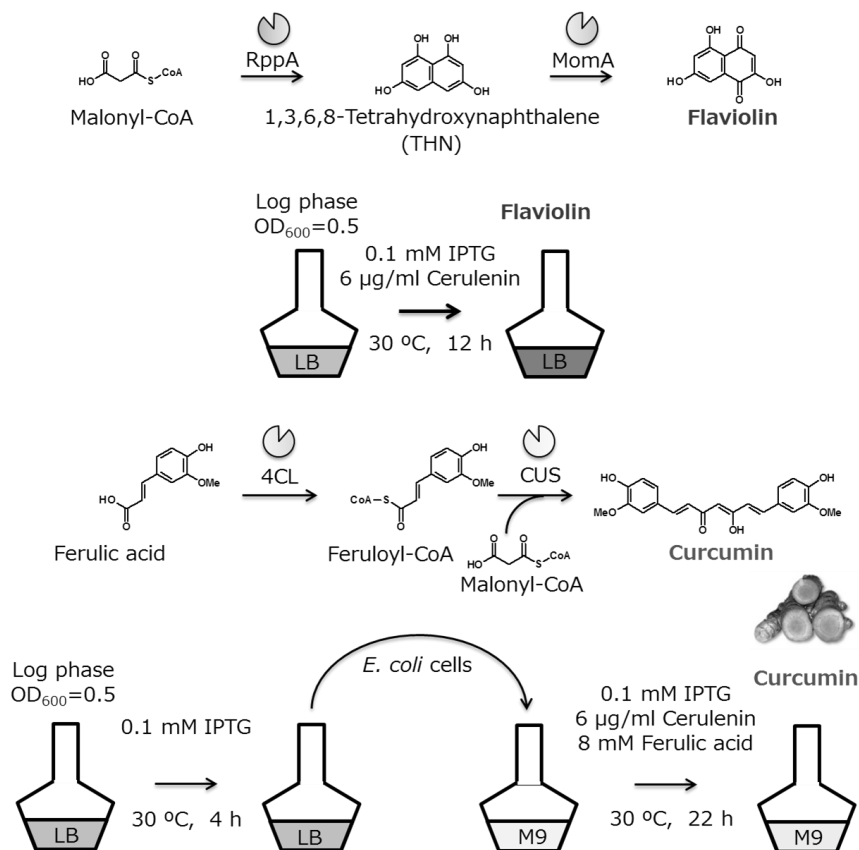


図 1. 大腸菌でのポリケタイド生合成 (フラビオリン生合成系・クルクミン生合成系)

【結果】

生合成酵素の人工的な複合体化には、植物バイオマス分解酵素複合体（セルロソーム複合体）の形成機構を用いた⁴⁷⁾。フラビオリン生合成系で比較した場合、ゲノム発現時では、プラスミド発現時と比較して、酵素発現量は1/5、生合成量は1/2に低下した。次に、生合成酵素を複合体化した場合、酵素発現量は1/5のままであるが、生合成量はプラスミド発現時と同等まで回復した（図2）。また、クルクミン生合成系のゲノム発現時においても、生合成酵素の複合体化によって生合成量は改善したが、フラビオリン生合成系と比べて改善効果が弱いため、同じポリケタイド生合成系であっても、複合体化した際の改善効果に違いが生じることが示唆された。酵素複合体化による生合成量の改善効果は、フラビオリン生合成系では顕著な効果が見られたが、クルクミン生合成系では顕著な効果は確認されなかった。

今後、ブドウのレスベラトロール（抗酸化作用）の生合成系を対象に、本手法の汎用性を検討する予定である。また今後は、ポリケタイド生合成系に限らず、更に多様な有用物質の生合成経路に対して、本手法の汎用性を検討してゆく予定である。

【引用文献】

1. Hirano, N. *et al. Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2011) 89, 1877-1884.
2. Muroi, T. *et al. Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2013) 97, 4039-4048.
3. Hirano, N. *et al. Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2011) 92, 227-239.
4. Hirano, N. *et al. FEMS Microbiol. Lett.* (2013) 344, 25-30.
5. Hirano, K. *et al. Appl. Environ. Microbiol.* (2015) 81, 4756-4766.
6. Hirano, K. *et al. Sci. Rep.* (2016) 6, 35709.
7. Shinoda, S. *et al. Appl. Biochem. Biotechnol.* (2018) DOI: 10.1007/s12010-018-2864-6.

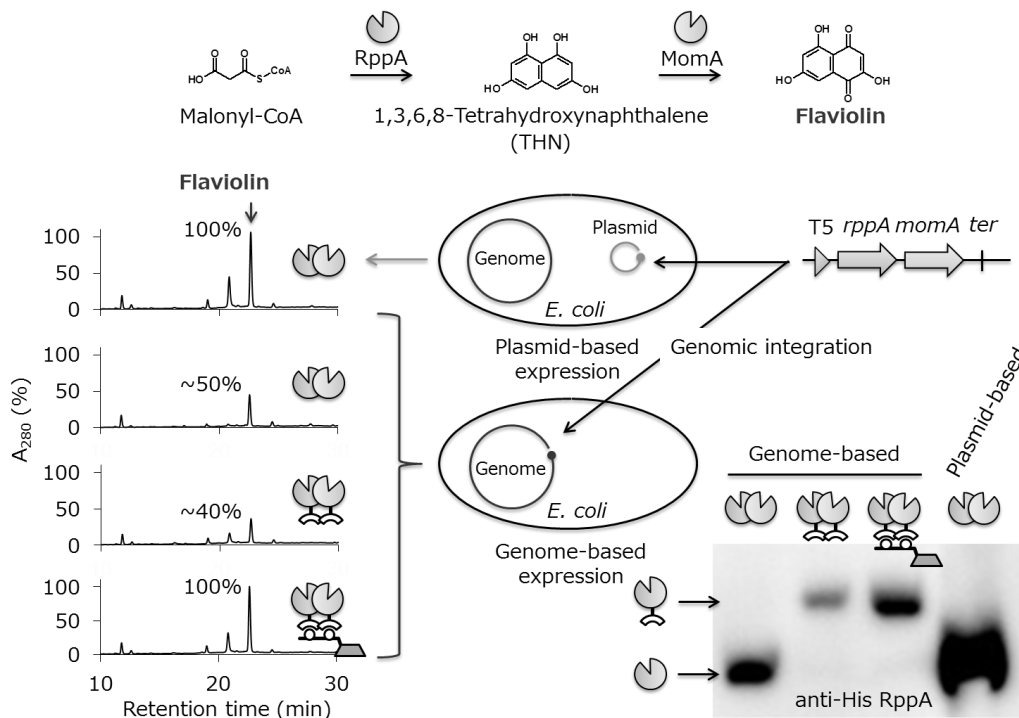


図2. 生合成酵素の複合体化による生合成量改善効果（フラビオリン生合成系）

※大量発現プロモーター（T5）で構築した生合成経路を大腸菌ゲノムへ導入した場合、プラスミド発現時に比べて酵素発現量は~1/5、生合成量は<1/2に減少する。一方、短鎖のセルロソーム骨格（酵素2個結合）で複合体化した場合、酵素発現量は~1/5のままであるが、生合成量はプラスミド発現時と同等まで回復する。結果として、生合成酵素を人工的に複合体化することで、ゲノム発現時であっても生合成量は維持される。