

研究成果報告書

所属機関
 東京大学 大学院総合文化研究科
 広域科学専攻 生命環境科学系

職名
 教授
 氏名
 新井 宗仁

研究テーマ

軽油相当のバイオ燃料を生産できる酵素の高活性化

研究報告

1. 研究の背景と目的

石油に代わる再生可能エネルギーを効率的に生産できる基盤技術の開発は、人類の持続的繁栄のために必須の課題である。シアノバクテリア(ラン藻)は、空気中の二酸化炭素を吸収し、光合成によって軽油相当のアルカンを生産できるため、カーボンニュートラルな燃料生産を実現できる(図1)。それゆえ、シアノバクテリアがつくるバイオ燃料は、地球温暖化の防止に有効な再生可能バイオエネルギーとして期待されている(図1)。

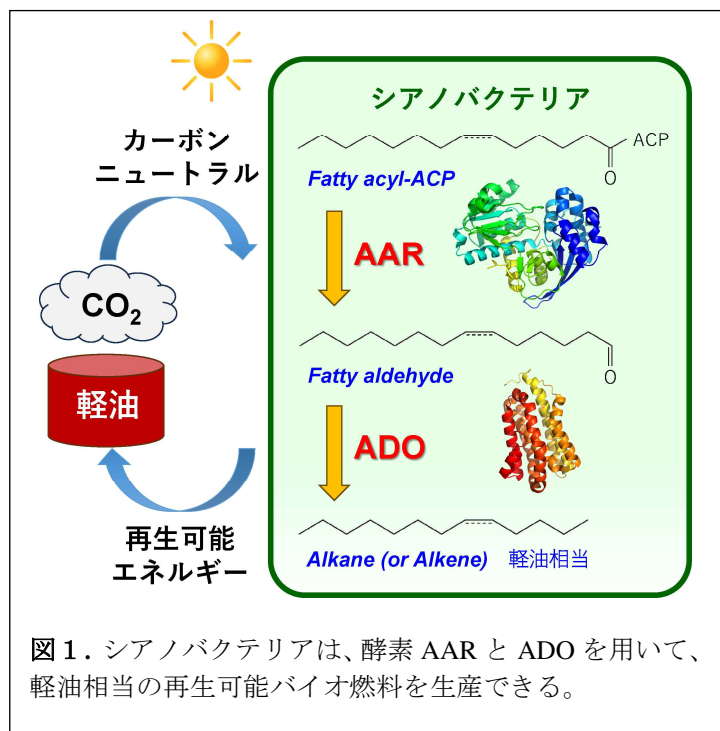
最近、シアノバクテリアによるアルカン合成には、アシルACP還元酵素(AAR)とアルデヒド脱ホルミル化オキシゲナーゼ(ADO)という2つの酵素が関わることが明らかになった [Schirmer *et al.* (2010) *Science*, 329, 559]。AARは、脂肪酸合成の中間体(脂肪酸アシルACP)を基質として、アルデヒドを合成する。次にAARはADOと結合し、アルデヒドをADOに受け渡す。最後にADOが、アルデヒドを軽油相当のアルカン(もしくはアルケン)に変換する。これら2つの酵素を大腸菌内で共発現させると、大腸菌でさえもアルカンを合成して分泌できるようになる。それゆえ、AARとADOはバイオ燃料生産の鍵となる酵素として世界的に注目されている。特にADOは、軽油相当のアルカンを合成できる唯一の小型球状タンパク質であるため、アルカンを生産させる目的で頻りに利用されている [Arai *et al.* (2018) *Adv. Exp. Med. Biol.* 1080, 119]。

しかし、ADOの酵素活性は極めて低いため、ADOの酵素反応が生物によるアルカン合成の律速段階となっている。したがって、軽油相当のバイオ燃料の大量生産を可能とするためには、ADOの高活性化が急務である。そこで本研究では、ADOの酵素活性を向上させ、生産されるアルカンの合成量を増加させることを目的として、実験と理論の両方を活用した複数のアプローチで研究を行った。具体的な方法と成果は次の通りである。

2. 研究成果および考察

(1) 網羅的変異実験に基づくADOの高活性化

我々は以前、ADO(約230アミノ酸残基)の各残基を一つずつ網羅的にアラニンに置換していくアラニンスキャン変異解析を行った。各変異体をAARとともに大腸菌で発現させ、大腸菌内で生産されたアルカンの合成量を定量した結果、1か所のアミノ酸をアラニンに置換しただけで活性が約1.4倍向上したADO変異体などが得られた(論文執筆中)。そこで、野生型よりも高活性化したアミノ酸置換変異を2つ組み合わせた変異体を作製し、大腸菌内でのアルカン合成量を測定したところ、活性の向上はみられなかった。これは、可溶性タンパク質として存在するADOの量が減少したためと考えられた。そ



ここで、ADOの高活性化変異体に、可溶性ADO量を向上させるアミノ酸置換を組み合わせ導入した結果、アミノ酸を2か所置換するだけで活性を野生型の1.8倍にまで増大させる変異体を得ることができた。さらに、アラニンスキャン変異解析で最も高活性化した変異体の変異部位において飽和変異解析を行ったところ、野生型よりも1.85倍高活性化した変異体を得ることができた。以上の成果をまとめた論文を現在執筆中である。

(2) AARとADOの結合を強化させるADO変異体の合理的設計

ADOがAARからアルデヒドを受け取る際、両者は図2のように結合することが知られている。しかしこれらの結合は弱いため、結合を強化することによって基質をADOに効率的に受け渡すことが可能になると期待される。そこで、タンパク質設計用ソフトウェアRosettaを用いて、AARとの結合を強化するようなADO変異体を理論的に設計し、実験で検証した。その結果、野生型のAAR/ADOの場合に比べて、大腸菌内でのアルカン合成量を数倍向上させることができた。

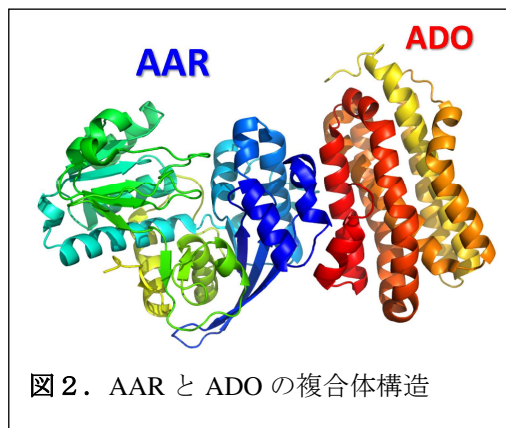


図2. AARとADOの複合体構造

(3) ADOを高活性化させる変異体の合理的設計

一般に化学反応は、反応の始状態から遷移状態バリアを超えて終状態へと到達する。その遷移状態バリアの高さを低くすることができれば、化学反応は高速化する。酵素反応においては多くの場合、生成物解離のステップが律速段階となる。また、酵素反応の遷移状態の構造は終状態の構造と類似していることが報告されている。そこで、生成物結合構造（始状態）を不安定化させ、基質結合構造（終状態）を安定化させることによって生成物解離反応を高速化することを試みている。まず、タンパク質設計用ソフトウェアRosettaを用いて、両者の構造を安定化／不安定化しうるアミノ酸置換変異を網羅的に探索した。現在、これらの計算結果の解析と実験を進めているところである。

(4) 分子動力学シミュレーションによるADOの構造ダイナミクス解析

ADOの高活性化を実現するためには、ADOの機能発現機構を解明する必要がある。また、ADOの機能発現機構を解明するためには、基質や生成物の存在下でADOがどのような構造変化をするのかを明らかにする必要がある。そこで、これらの課題を解決するために、分子動力学シミュレーションによってADOの基質結合状態と生成物結合状態における構造ダイナミクスを解析した。その結果、生成物結合状態においては、生成物であるアルカンはADOの内部で柔軟に運動し、解離しやすい方向に移動する様子が観測された。この知見は今後、上記(3)のストラテジーのように、酵素の生成物解離を高速化させることで酵素反応の効率化を目指すうえで有用である。

3. 将来展望

以上のように本研究では、ADOの高活性化によるアルカン合成量の増大を目指して、実験と理論の両方のアプローチから多角的に研究を進めた。その結果、アルカン合成量を増大させうるADO変異体が得られつつある。また、AARとADOに関する我々のこれまでの研究成果を中心にまとめた総説を執筆した（研究発表1）。

今後はまず、上記(3)の研究を完了させた後、高活性化したADO変異体をシアノバクテリアに導入し、光合成によるアルカン合成が効率化したことを確認する。これにより、バイオ燃料の大量生産の実現を目指す。また、上記の成果を複数報の論文として発表していく予定である。

4. 研究発表

1. Hayashi, Y., Arai, M. (2022) Recent advances in the improvement of cyanobacterial enzymes for bioalkane production. *Microbial Cell Factories* 21, 256.