

(別記様式-博7)

千葉大学審査学位論文 (要約) (Summary)

先進理化学 専攻

Division

共生応用化学 コース

Department

氏名 大谷 悠介

Name

テルペン骨格形成酵素のスクリーニング手法の開発と生合成工学への応用

植物、動物、微生物などが生産するトリテルペンには、ステロイドホルモン、高級香料、医薬など、産業価値の高い化合物が多く存在する。しかしトリテルペン骨格形成に関わる酵素活性のスクリーニング手法が不在であったため、これらの生合成工学はほとんど例がなかった。本研究は、スクアレン環化酵素活性のハイスループットな評価系を開発し、トリテルペン酵素の探索と改良を可能とすること、および、天然・非天然を問わず、様々な構造のトリテルペン類の生合成工学を目指した。

ブドウ球菌由来のカロテノイド不飽和化酵素CrtNがスクアレンをカロテノイド色素に転化できるという現象を利用して、スクアレンエポキシダーゼ (SQE) およびスクアレン-ホペン環化酵素 (SHC) の大腸菌活性を可視化する技術を開発した。この技術をスクリーニング原理とし、これまで機能発現が困難とされてきた高効率なオキシドスクアレン生合成経路を構築することに成功した。さらに、蓄積したオキシドスクアレンがCrtNによって色素化され、エポキシ基を持つ新奇なカロテノイドを生合成できることも発見した。また、上記スクリーニング系を利用して、SHCの大腸菌内での活性を飛躍的に向上させることに成功した。

内在するトリテルペン経路が不在のため、大腸菌に再構築したトリテルペン経路は、その経路由来のテルペンだけを選択的に蓄積・生産する。上で得た SHC 変異体と様々な酵素の共発現によって、天然型バクテリオホパンテトロールや非天然骨格を持つトリテルペン様化合物などの生合成に成功した。

第 2 章

スクアレン消費活性スクリーニング系の確立とオキシドスクアレン生合成工学

Squalene はトリテルペンという 20,000 を超える巨大な化合物群の共通の前駆体であり、ステロイドホルモンやサポニンなどの医薬品、高級香料の原料であるアンブレインなど、高価で有用な化合物が多く含まれる。しかしながらこれらの化合物を天然から得ることは難しく、供給の安定性にも欠けるため、近年微生物宿主を用いた異種生産の試みが多くなされている。トリテルペンの微生物生産、特に大腸菌におけるボトルネックは Squalene のエポキシ化または環化のステップである。これらの反応を担う酵素の活性評価には HPLC や GC といったクロマトグラフィーが必要であるが、そのスループットの低さから Squalene 転化酵素を本格的に探索または改良した例はない。

第 2 章では、所属研究室で以前発見されたカロテノイド不飽和化酵素による Squalene の色素化を利用した、Squalene 転化酵素の活性スクリーニング手法の開発を行った。この手法を用いることで、Squalene 転化酵素の Squalene “消費量” を大腸菌コロニーの“色”によって評価でき、活性をハイスループットにスクリーニングすることが可能となった。また、Squalene epoxidase が意外にも高い大腸菌内活性を持つことが明らかとなり、Oxidosqualene の効率的な大腸菌生合成経路を構築することが出来た。

第3章

スクアレン消費スクリーニングを用いたスクアレン・ホペンサイクラーゼの進化学

第3章では、第2章で開発した Squalene 消費スクリーニング系を用いて、Squalene 環化酵素の一種である Squalene-Hopene cyclase (SHC) の活性進化学を行った。ランダム変異を導入した SHC ライブラリの中から、Hopene 生産量が増加した変異体が多数得られ、中には 20 倍以上もの Hopene 生産量を示す変異体も存在した。取得した変異体の *in vitro* 解析を行ったところ、至適温度が低温側へシフトしていることが示された。このように、第2章で開発したスクリーニング系は、Squalene 転化酵素の活性をハイスループットに評価できる系として酵素の進化学にも適用可能であることが示された。さらには、Hopene の大腸菌生産が可能になったことを受けて、Hopene 修飾酵素の追加発現により Hopanoid の大腸菌生合成経路が開通した。

第4章

オキシドスクアレンドヒドロゲナーゼの発見と

オキシドスクアレン環化酵素スクリーニングへの応用

前章まででは Squalene の転化酵素の活性スクリーニング系の開発およびそれを用いた酵素工学について述べてきた。一方で、動植物がつくるトリテルペンの大部分は Oxidosqualene の環化物である。第4章では、Squalene 色素化に用いた不飽和化酵素 CrtN の基質特異性の低さを利用して、Oxidosqualene も色素化されることを発見した。この色素化経路の発見によって、Oxidosqualene 環化酵素に対しても第2章で示したスクリーニングと同様に、色素スクリーニング系が構築可能となった。大腸菌内での活性が異なる複数の Oxidosqualene 環化酵素を用い、環化酵素の活性が高いときはコロニーの色が白くなり、コロニーの色から環化酵素の活性を評価できることを示した。また、CrtN によって Oxidosqualene から生合成される色素は、末端にエポキシ基を持つ新奇カロテノイドであることも明らかにした。

第 5 章

テルペン酵素の Promiscuity を利用した非天然骨格生合成の拡張

当研究室ではこれまでに、Squalene/Phytoene 合成酵素のサイズ特異性を改変し、非天然サイズの Squalene/Carotenoid の生合成経路に成功してきた。第 5 章では、環化酵素やエポキシ化酵素の基質特異性の低さを利用し、この非天然テルペノイド経路の拡張を試みた。SHC の追加発現により、天然よりも大きな骨格サイズを持つ非天然 Squalene の環化物が得られた。また、Squapene エポキシ化酵素の追加発現により、C35 および C40-Squalene のエポキシ化産物も得られた。さらに、 ϵ 環化酵素の追加発現により、C50-lycopene の ϵ 環化が可能となり、また新規 C50- ϵ -carotene が得られた結果から、 ϵ 環化酵素の基質メカニズムについて新たな知見が得られた。