

## 酵素の高機能化によりバイオ燃料の生産性を向上

### 1. 発表者：

工藤 恒（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 学振特別研究員）  
林 勇樹（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 助教）  
新井 宗仁（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 教授）

### 2. 発表のポイント：

- ◆軽油相当の炭化水素生産に関わる酵素 AAR を構成しているアミノ酸の中から、酵素のはたらきを効率化する上で重要なアミノ酸を複数見出しました。
- ◆これらのアミノ酸を別のアミノ酸に置き換えたところ、酵素 AAR を用いた炭化水素生産を効率化させることに成功しました。
- ◆本成果によって得られた高機能化酵素は、効率的なバイオ燃料生産に応用可能と期待されます。

### 3. 発表概要：

光合成を行う微生物であるラン藻（注1）は、酵素（注2）を利用して軽油燃料の主成分となる炭化水素を生産できます。近年、ラン藻による炭化水素の生産に重要な酵素 AAR が同定されました。しかし、その酵素がはたらく効率は低いため、炭化水素の生産性を向上させるためには、酵素を改変して高機能化させることが必要となっていました。

東京大学大学院総合文化研究科の工藤恒学振特別研究員と新井宗仁教授らの研究グループは、酵素 AAR を構成するアミノ酸の一部を別のアミノ酸に置き換えたときに、酵素のはたらきがどのように変化するかを詳細に調べました。その結果、酵素のはたらきを効率化させるアミノ酸置換を複数見出しました。さらに、これらのアミノ酸置換を多重に組み合わせることで、酵素 AAR を用いた炭化水素生産を効率化させることに成功しました。本研究によって得られた高機能化酵素は今後、再生可能エネルギーであるバイオ燃料の効率的な生産に応用できると期待されます。

この研究成果は2019年12月17日付でオープンアクセス誌「バイオテクノロジー・フォー・バイオフィューエルズ」オンライン版に掲載されました。

### 4. 発表内容：

#### ①研究背景

現在のエネルギー消費の大半は、石油、石炭、天然ガスなどの化石燃料ですが、これらは限りある資源であり、将来的には枯渇する恐れがあります。これに対して、再生可能で枯渇しないエネルギーを再生可能エネルギーといい、化石燃料に代わるエネルギーとして注目されています。その中で、生物に由来する物質を燃料として用いる再生可能エネルギーのことを「バイオ燃料」といいます。ある種の微生物や植物は、軽油や重油に相当する炭化水素を生産でき、それらはバイオ燃料として利用可能です。特にラン藻という微生物は光合成を行い、大気中の二酸化炭素（CO<sub>2</sub>）を材料にして、軽油に相当する炭化水素（炭素数15と17）を生産できます。

ラン藻の炭化水素生産には、アシル（アシル輸送タンパク質(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つの酵素のはたらきが重要であること

が知られています(図 1)。酵素 AAR は、生物が脂肪酸を合成する途中でつくるアシル ACP を原料(基質)としてアルデヒドを生産します。次に酵素 ADO は、このアルデヒドを原料として、軽油相当の炭化水素を生産します。炭化水素を生産できない大腸菌(注 3)などの微生物にこれら 2 つの酵素を導入すると、微生物が炭化水素を生産できるようになることから、酵素 AAR と ADO は炭化水素生産の鍵となる酵素です。しかし、AAR と ADO ともに、はたらく効率(活性)が低いため、これらの酵素をバイオ燃料生産に応用するためには、両酵素を改変して高機能化させることが必要となっていました。

そこで発表者らは、2019 年 4 月に、酵素 ADO を構成する 232 個のアミノ酸の一部を別のアミノ酸に置き換えることにより、酵素 ADO のはたらきを効率化する上で重要なアミノ酸を複数見出しました。これらの知見は、酵素 ADO を高機能化する上で有用と期待されています。一方、酵素 AAR については、その酵素を構成する 341 個のアミノ酸のうち、どのアミノ酸が酵素活性を向上させる上で重要なのかは未解明であり、高機能化した酵素 AAR の変異体は得られていませんでした。

## ②研究内容

工藤恒学振特別研究員と新井宗仁教授らの研究グループは、酵素 AAR を構成するアミノ酸の一部を別のアミノ酸に置き換えたときに、酵素のはたらきがどのように変化するのかを詳細に調べました。グループは以前、さまざまなラン藻が持つ AAR の中で、活性が比較的高い AAR と低い AAR のアミノ酸配列(注 4)を明らかにしていました。そこで本研究では、まず、活性の低い AAR が持つアミノ酸の一部を、活性の高い AAR が持つアミノ酸に置換した変異体を 41 種類作製しました。アミノ酸置換した AAR 変異体と ADO の遺伝子を大腸菌に導入して炭化水素を生産させたとき、炭化水素の生産性が向上すれば、置換したアミノ酸は炭化水素生産を効率化する上で重要なアミノ酸であるといえます。41 種類の AAR 変異体それぞれを、大腸菌内に ADO とともに導入したところ、6 種類の変異体で炭化水素の生産性が大きく向上しました(図 2)。これにより、酵素 AAR を高機能化させるアミノ酸置換を 6 個見出しました。生産性の向上は、酵素のはたらきの効率化や、大腸菌内での酵素量の増大に起因していました。また、これら 6 つのアミノ酸置換を多重に組み合わせた AAR 多重変異体を作製し、同様にして大腸菌内で炭化水素を生産させたところ、アミノ酸を置換する前と比べて 60 倍以上も炭化水素の生産量が向上しました(図 3)。この結果は、これまでに知られている最も高活性な AAR を用いたときよりも高い生産性を示していました。さらに、この AAR 多重変異体は、短い炭素鎖をもつ炭化水素(炭素数 15)を多く生産できるようになっていました。

## ③研究の意義・今後の展望

本研究により、酵素 AAR のはたらきを効率化する上で重要なアミノ酸を複数見出しただけでなく、炭化水素の生産性を向上させる高機能化酵素(AAR 多重変異体)の創出に成功しました。一般に、炭化水素の長さを短くすると凝固点が下がり、凍りにくくなります。新たに創出した AAR 多重変異体は、従来の高活性な AAR に比べ、より短い炭化水素を多く生産できるために、凍りにくい寒冷地用の軽油燃料生産に適しているといえます。このように、本研究で開発された高機能化酵素(AAR 多重変異体)は今後、再生可能エネルギーであるバイオ燃料の効率的な生産に大きく貢献できると期待されます。

本成果は、日本学術振興会の科学研究費補助金と公益財団法人発酵研究所の支援を受けたものです。

## 5. 発表雑誌：

雑誌名：*Biotechnology for Biofuels* (2019年12月17日オンライン版)

論文タイトル：Improving hydrocarbon production by engineering cyanobacterial acyl-(acyl carrier protein) reductase

著者：Hisashi Kudo, Yuuki Hayashi, Munehito Arai\*

DOI 番号：10.1186/s13068-019-1623-4

アブストラクト URL：

<https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-019-1623-4>

## 6. 問い合わせ先：

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

教授 新井 宗仁 (あらい むねひと)

## 7. 用語解説：

注1) ラン藻

藻類の一種。シアノバクテリアともいう。光合成によって酸素を生み出す微生物であり、海水中や淡水中などに生息する。植物がもつ葉緑体の起源と考えられている。多くのラン藻は、軽油に相当する炭化水素を生産できる。

注2) 酵素

化学反応を触媒するタンパク質のこと。

注3) 大腸菌

環境中、特にヒトの大腸などに存在する微生物。生物学研究のモデル微生物として有名であり、遺伝学や分子生物学の研究によく利用されている。

注4) アミノ酸配列

タンパク質は基本的に 20 種類のアミノ酸から構成されており、これらが様々な順番で連結されることによって、多種多様なタンパク質がつくられる。このときにアミノ酸が連結される順番 (並び方) のことを、アミノ酸配列と呼ぶ。

8. 添付資料：

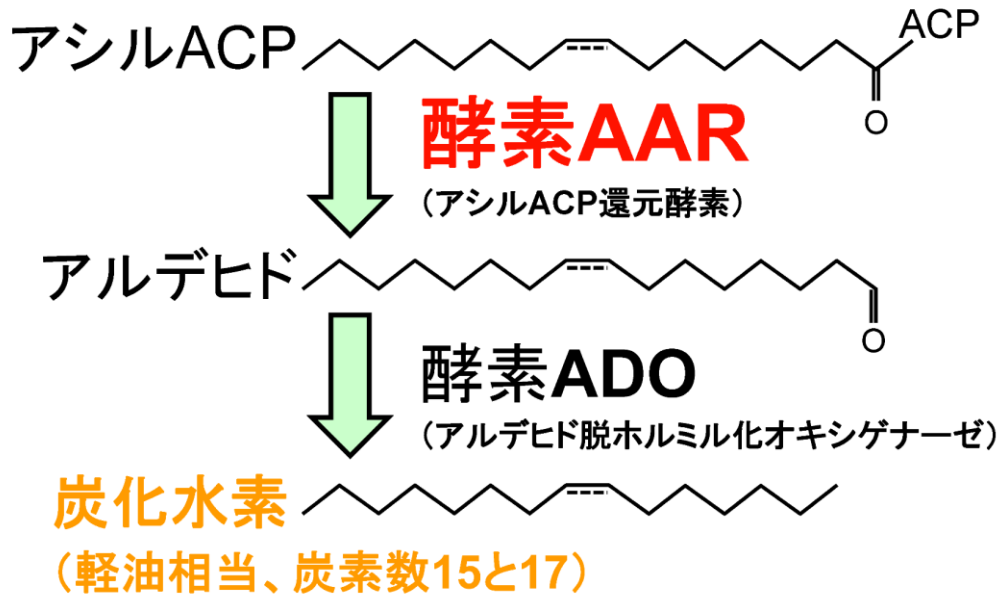


図1. ラン藻における炭化水素の生産プロセス。

酵素 AAR と酵素 ADO の 2 段階反応によって、アシル ACP から軽油相当の炭化水素（炭素数 15 と 17）が生産される。

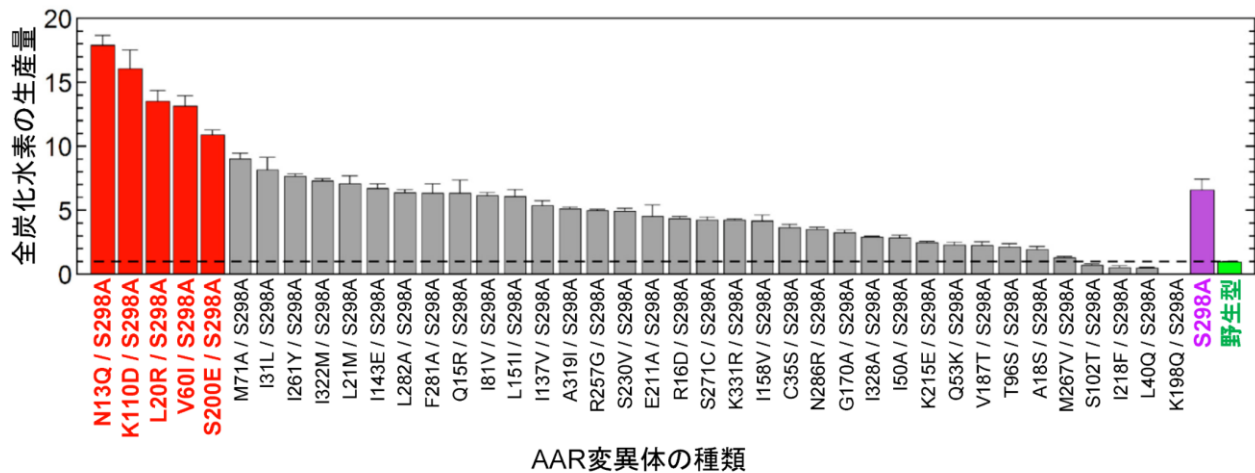


図2. 様々な AAR 変異体を用いたときの炭化水素の生産量。

活性の低い AAR (ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7336 由来の AAR; 7336AAR) が持つアミノ酸配列の 1, 2 箇所を、活性の高い AAR (ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 由来の AAR; 7942AAR) のアミノ酸に置換した変異体を 41 種類作製し、各変異体と ADO を大腸菌内に導入して、炭化水素 (炭素数 15 と 17) を生産させた。図中では、全炭化水素の生産量が多い順に変異体を並べてある。全炭化水素生産量の値はアミノ酸を置換する前の野生型での値 (右端) を 1 とした相対値で表す。7336AAR に S298A (298 番目のセリンをアラニンに置換) という変異を 1 つだけ導入したところ、炭化水素生産が大きく向上した (右から 2 番目)。そこで、この S298A 変異体に対して、さらにもう 1 つの変異を導入した二重変異体を 40 種類作製したところ (N13Q / S298A のように表記する)、5 つの変異体 (左端より 5 つ目まで、赤字で表示) で炭化水素生産がさらに大きく向上した。

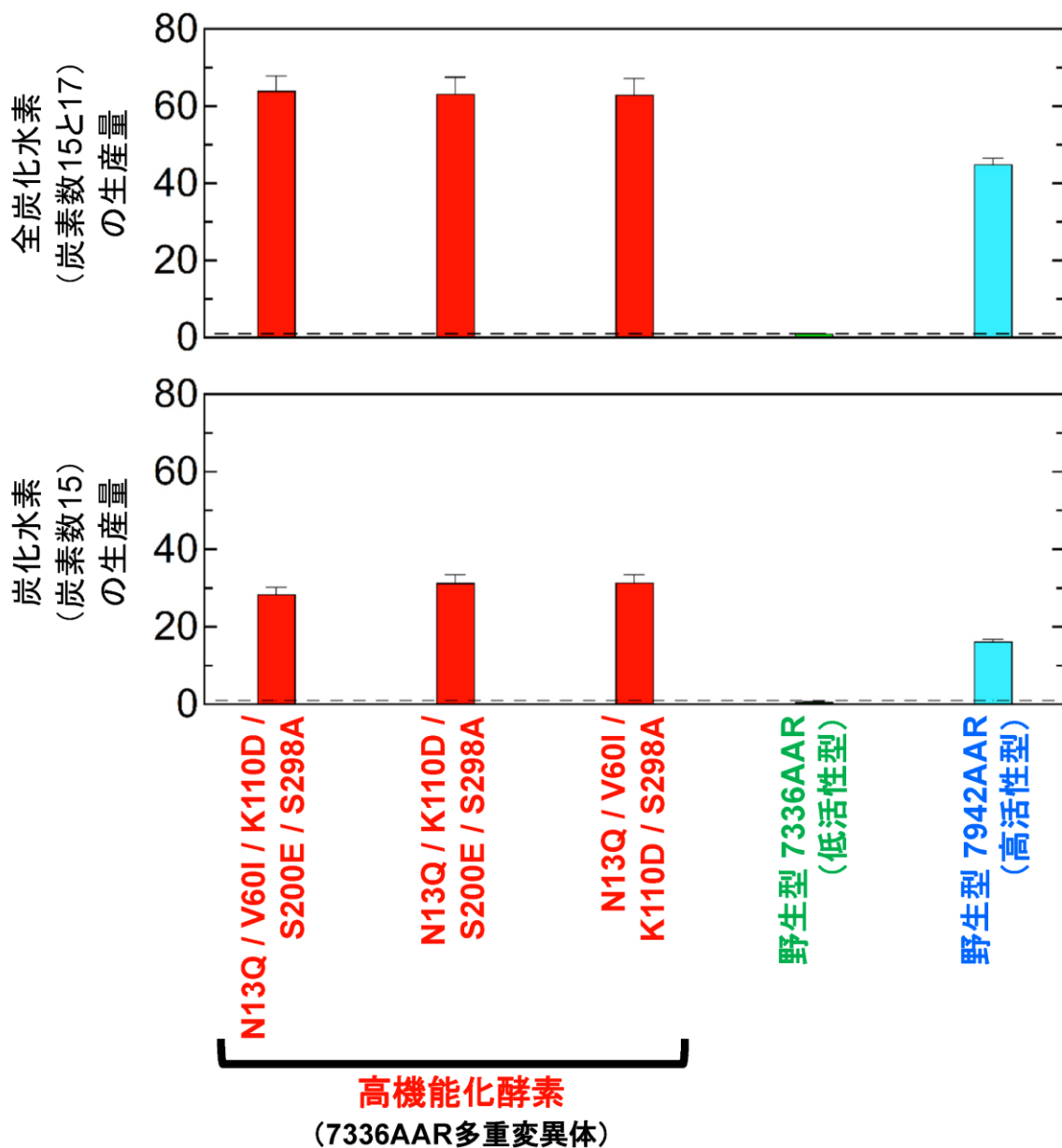


図3. 高機能化酵素 (AAR 多重変異体) を用いたときの炭化水素の生産量。

AAR (変異体もしくは野生型) と ADO を大腸菌内に導入して炭化水素 (炭素数 15 と 17) を生産させた。炭化水素の生産量 (縦軸) は、上側と下側の図ともに、野生型 7336AAR での全炭化水素 (炭素数 15 と 17) の生産量 (点線) を 1 とした相対値で表す。図 2 において赤字で示した 6 つのアミノ酸置換を、さまざまな組み合わせで 7336AAR に多重に導入した変異体のうち、最も高い炭化水素生産を示した 3 つの多重変異体 (高機能化酵素) の結果が左側の 3 つ (赤色) である。これら 3 つの多重変異体を用いると、全炭化水素の生産量は元の 7336AAR (低活性型、右から 2 つ目・緑色) の 60 倍以上に増大し、7942AAR (高活性型、右端・青色) よりも多く炭化水素を生産した (上側の図)。さらに、高機能化酵素では、短いほうの炭化水素 (炭素数 15) を 7942AAR の約 2 倍も生産していた (下側の図)。