

## 分子ディスプレイ法による革新的有機溶媒内酵素反応の開拓

植田 充美

**Development of Revolutionary Enzymatic Reactions in Organic Solvents with Molecular Display**

Mitsuyoshi UEDA

*Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kitashirakawa-oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan*

(Received July 17, 2010)

We have seen increasing use of the term “White biotechnology”. White biotechnology involves the use of microbial cells and enzymes in the production of bulk and fine chemicals such as amino acids and polymers. This generally results in cleaner processes with minimum waste generation and energy use. Most of the organic syntheses using enzymes are carried out in nearly anhydrous organic solvents or solvent-free media. Ionic liquids have more recently emerged as another nonaqueous media, which, in view of their low vapor pressure, are viewed as “green solvents”. Organic solvents may alter the structure and activity of enzymes that usually function in an aqueous environment. One alternative is to immobilize the enzymes on solid supports to increase their function and stability in response to organic solvents or increased temperatures. Enzymes may be stabilized by chemical and physical processes. With chemical methods, enzymes are immobilized by strong covalent bonding, but changes in protein structure often result. In physical stabilization processes, the interactions between enzymes and solids usually are weaker, resulting in fewer changes in the enzyme’s structure. Yeast cell surface engineering is an alternative approach that immobilizes enzymes on the yeast cell surface. Proteins are immobilized by using an outer shell cell-wall protein, the C-terminal half of alpha-agglutinin. Display of enzymes on the yeast cell surface has at least two advantages relative to other physical immobilization methods. First, the displayed enzymes can be readily produced in a standard fermentation. No further work is required to either purify or immobilize the enzymes. Second, enzyme displayed on the yeast cell surface can be modified directly by conventional genetic engineering, which enables error-prone PCR, DNA shuffling, and combinatorial mutagenesis to be used quickly and efficiently to create strains (whole-cell biocatalysts) with enhanced enzyme activity.

**Key words**—molecular display; cell surface engineering; white biotechnology; whole-cell biocatalysts; genetic immobilization; organic solvent

**1. はじめに**

酵素反応は温和な条件で、主に水溶液中で行われ、その反応選択性と特異性が魅力である。しかし、化学工業に使われる触媒と比較して、有機溶媒中では酵素タンパク質の失活により、せっかくの機能が発揮できない。この弱点を克服するために、酵素の各種固定化や遺伝子組換えなどの操作が加えられ、いくつかの酵素が有機溶媒内で使われるようになってきた。しかし、どれも万能とは言えず、ホワ

イトバイオテクノロジーの発展が必須の現在において、革新的な発想と技術が求められている。われわれは、こういう状況下で、これまで開拓してきた細胞表層工学 (Cell Surface Engineering) を発展させ、細胞と酵素が一体化した生体触媒 (Whole-cell biocatalysts) を開発した。これは、酵素に従来の固定化に匹敵する安定化とタンパク質の弱点である増殖性と保存性という物性を賦与する結果となった。さらに、反応ライブラリーを生み出す酵素変異体ライブラリーの調製を簡便に高速に実現した。このような分子ディスプレイを活用した有機溶媒内酵素反応の開拓は、薬学の精緻な合成反応を、酵素の本来的に持つ高機能性を基盤とするホワイトバイオテクノロジーに変換していく上で、環境負荷を低減し、地

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 (〒606-8502 京都市左京区北白川追分町)

e-mail: miueda@kais.kyoto-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第130年会シンポジウム S55 で発表したものを中心に記述したものである。

球環境に優しい化学反応の普及に大いに貢献していくものと考えており、化学産業に使われている合成反応への展開を企図した生体触媒を取り上げ紹介する。

## 2. 分子ディスプレイによる新しい生体触媒の作製

目的の遺伝子をタンパク質に変換していくタンパク質調製系として、従来の細胞内発現系や分泌系に対して、分子ディスプレイ系では、タンパク質が細胞の表層や細胞膜などの上に安定な形で提示（分子ディスプレイ）され、細胞を1つの支持体として、分子ディスプレイされたタンパク質をいつも生きたまま、必要ならいつでも増幅できるなど、その生体触媒としての活性や機能解析が容易となる。さらに、タンパク質のアミノ酸配列分析をしなくても、PCR（遺伝子増幅）法などの併用により、導入されたDNAの配列から分子ディスプレイされたタンパク質のアミノ酸配列が決定できるという他の方法論の追随を許さない、次世代シーケンシング時代に適応した変異体も高速に創出される。こういったゲノム情報分子をタンパク質機能分子に変換する新しく、簡易で、迅速で、しかも、多くの組み合わせの（コンビナトリアル）分子ライブラリーから適合するものをシステムティックに選択することのできる手法として展開してきたのが、ニューバイオテクノロジーとしての「コンビナトリアル・バイオエンジニアリング」手法である。<sup>1,2)</sup>

われわれは、酵母の細胞表層への分子ディスプレイ法—酵母の細胞表層工学—という新しいバイオテクノロジー分野を開拓してきた（Fig. 1）。<sup>1-6)</sup> 1999年ノーベル医学生理学賞を受賞した Blobel 教授の「タンパク質におけるシグナル説」で周知のごとく、細胞内のすべてのタンパク質は、個々に固有の「アドレス」を指定する情報を持ち、その情報に基づいて輸送され局在化し、そこで機能を発揮している。酵母を用いた分子ディスプレイでは、細胞表層で機能を発揮しているタンパク質の「アドレス」を指定する遺伝子情報を用いた機能タンパク質の新しい発現手法として、【細胞表層工学（Cell Surface Engineering）】を考案した。最も単純でヒトの生活に既に密接に係わっている真核細胞であるパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた場合、この細胞表層最外殻に位置する  $\alpha$ -アグルチニンの分子情報

を活用することによって種々の酵素やタンパク質を細胞表層にディスプレイすることが可能となってきた。 $\alpha$ -アグルチニンの分子構造は、分泌シグナル・機能ドメイン・細胞壁ドメイン（セリンとスレオニンに富むC末320アミノ酸残基）からなっており、このC末320アミノ酸残基のC末端にグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカー付着シグナルが存在する。したがって、この分泌シグナルと機能ドメインを操作することによって、これまでに、異種由来の酵素や各種因子や受容体など分子サイズの大きいタンパク質を、単独で、あるいは、協奏的に細胞表層に発現提示させることに成功し、酵母がこれまで持たなかった機能を持った新機能酵母を創製してきた。このような細胞は、アメリカの Chemical & Engineering News [Vol. 75, p. 32 (1997)] でもいち早く取り上げられ、「アーミング酵母（Arming Yeast）」と命名されており、こういった技術は「アーミング技術」として、タンパク質と細胞を一体化できる Whole-cell biocatalyst を創製できる革新的基盤技術となってきている。

## 3. 有機溶媒内での Whole-cell biocatalyst の反応

加水分解反応を触媒する酵素を有機溶媒下で用いることにより、その反応の可逆性を利用した、いわゆる逆反応により物質合成を行う例が多い。ここでは、リパーゼ、エステラーゼやプロテアーゼなどの分子ディスプレイによる Whole-cell biocatalyst を用いて、エステル合成<sup>7,8)</sup>やペプチド合成<sup>9)</sup>などについての最近の注目されている事例を紹介する。

バイオマスの利用の1つとして、植物由来プラスチックである生分解性プラスチックのポリ乳酸は注目を集めている。現在の汎用性プラスチックは石油を原料にして化学合成によって作られており、微生物による分解を受けないため、使用後は焼却や埋め立て処分される。そのため、焼却処理では二酸化炭素が放出され、また、埋め立て処分では環境中に蓄



植田充美

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻生体高分子化学分野教授。1979年京都大学工学部工業化学科卒業（福井三郎教授）。学振奨励研究員（京大医学部 沼正作教授）。京都大学工学部助手、助教授。バイオエナジー顧問。三菱化学生命科学研客員。2003年より現職。2010年バイオインダストリー協会賞受賞。

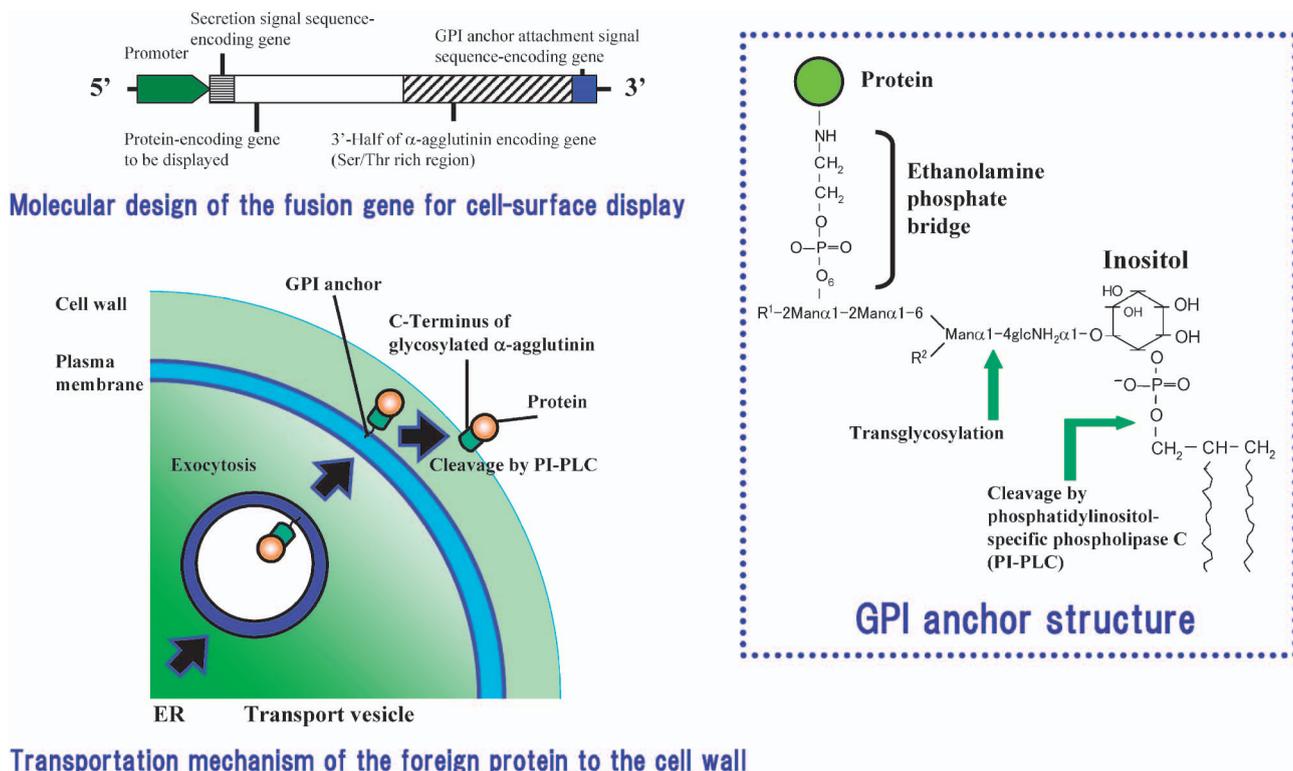


Fig. 1. Mechanism of Cell Surface Engineering (Molecular Display)

積していく。したがって、このような環境負荷の大きい素材をバイオマスから製造し、使用後は微生物によって分解されて最終的には再び植物に戻るというカーボンニュートラルが実現可能な素材に置換していくことは急務である。しかし、生分解性プラスチックは汎用性プラスチックと比較して、物性の面で劣るといふことや高価格であるといふことが障害となり、普及が遅れているのが現状である。物性の問題は近年盛んに研究がなされており、価格化についても、ポリ乳酸のポリマー化の多段階からなるステップを減らす研究が行われている。しかし、直接のポリマー化を行う際には乳酸が十分に精製されていないと成形したプラスチックに色がついてしまうという問題がある。現在のポリ乳酸の工業的な製造工程では、乳酸の精製は水酸化カルシウムと酸を用いて行われているため、最終的に副産物として大量の塩が生成することが問題視されている。そこで、Whole-cell biocatalyst を用いて、乳酸の精製を、安価に、そして環境負荷の少ない形で行うことができる手法が開拓された。

その手法とは、先に述べたように、乳酸の精製過程で問題となっている副産物の問題を解決するため

に、乳酸をエステル化することにより乳酸の分離を容易にし、それに続く加水分解反応を行うことによって純度の高い乳酸を得るという方法で、乳酸をエステル化する過程である。乳酸をエステル化するために、乳酸とアルコールの脱水反応を用いることにし、その脱水反応を触媒する酵素としてリパーゼを選択した。リパーゼの本来の反応はエステル結合の加水分解反応であるが、その逆反応であるエステル合成反応やエステル交換反応にも作用することが知られている。そこで、実際に使用する酵素として、担子菌類酵母 *Candida antarctica* が生産するリパーゼ B (CALB) を選択し、酵母分子ディスプレイシステムを用いて CALB を細胞表層にディスプレイすることによる CALB 提示酵母の構築を試みた。このシステムを用いて酵素を酵母の細胞表層にディスプレイすると、酵母 1 細胞あたりおよそ  $10^4$ - $10^5$  分子の酵素が最密充填的にディスプレイされた Whole-cell biocatalyst が創製できる (Fig. 2)。さらに、酵素が酵母細胞の細胞壁に固定化されることにより、酵素の熱安定性が増す。このことは、物質合成に酵素を用いる上で重要である。また、CALB は水溶性及び有機溶媒系の両方において高い活性や

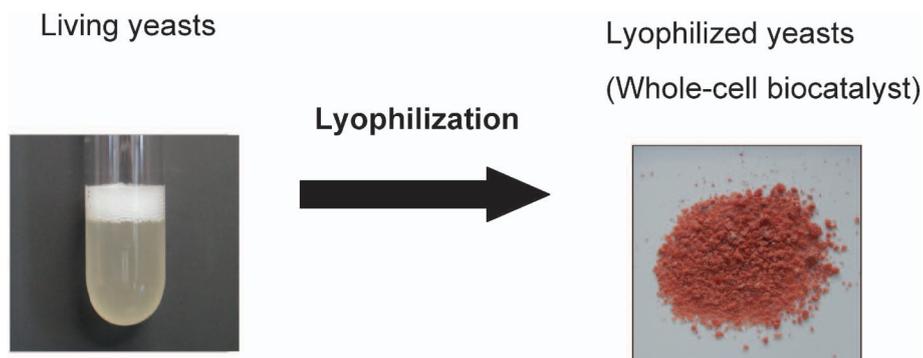


Fig. 2. Preparation of Whole-cell Biocatalysts with Displayed Enzymes

安定性を保つため、物質合成への応用が期待されている。CALBの触媒反応に関する現在までの報告では、その大半がNovozym 435 (Novo-Nordisk)などの固定化リパーゼを使用している。固定化酵素は安定性が非常に高いため利用価値が大きいという特徴を有する反面、特別な化学修飾により製造されているためにコストが高いという問題がある。そこで、ここに示したような酵母分子ディスプレイシステムを用いてCALB提示酵母を構築すれば、酵母を培養するだけで固定化された状態のCALBを得ることができ、コストの問題を解消できると考えられる。

実際にCALBをディスプレイするために、前述に従って、遺伝子を融合させ、表層最外殻に固定化した。目的とするエステル反応はCALB本来の反応である加水分解反応の逆反応なので、反応系にはできるだけ水分が少ないほうがよいと推測できる。CALB提示酵母を有機溶媒中での乳酸エステル合成に用いるため、CALB提示酵母菌体を培養・洗浄後、凍結乾燥することにより水分を除き、粉状の乾燥菌体を調製した。凍結乾燥することによって細胞表層にディスプレイしたCALBの活性が失われていることは、凍結乾燥前後でのCALB提示酵母の*p*-Nitrophenyl butyrateに対する加水分解活性を測定することにより確認した。活性を保持していることが確認された乾燥菌体50 mgを用いて、50 ml スクリューキャップ付試験管の中に溶媒として5 mlの水飽和ヘプタン、基質として500 mMのエタノールと10 mMの乳酸を添加し、30°Cで振とうすることによって乳酸エチルの合成反応を行った。その反応液をHPLCで分析した結果、乳酸エチルの生成を確認することに成功した。反応系に Molecu-

lar sievesを加えて脱水した無水ヘプタン、反応系に10%の水を加えた水を含むヘプタン、水飽和ヘプタンの3種類の溶媒を用いて合成反応を行ったところ、溶媒として水飽和ヘプタンを用いた反応系で最も効率よく乳酸エチルが生成することが確認された。つまり、酵素が活性を示し、かつ加水分解の逆反応を触媒するには、水飽和のようなごく少量の水分が必要であるということになる。

乳酸エチルの合成における酵素反応の様子を調べるために反応のタイムコースをとると、200時間以降は反応が停止していると思われた。反応はエタノール過剰の条件下で行っていたので、反応系にもう一方の基質である乳酸をさらに加えてみたところ、合成の再開がみられた。また、合成反応再開時の酵素反応の初速度は反応初期と比較して遜色はなかった。このことから、反応停止の原因は酵素の失活ではなく、加水分解反応と合成反応とが平衡に達したからではないかと考えられる。また、合成反応の再開がみられたことから、有機溶媒にCALB提示酵母をさらしても酵素活性は失われないということが分かる。さらに、効率よく乳酸エチル合成を行う条件を検討するために、温度を上げて反応を行った。その結果、温度の上昇とともに酵素反応の初速度が増加し、反応時間111時間での合成効率は50°Cで74%にまで上昇させることに成功した。

また、CALBはD-乳酸も基質として認識できるかを120時間の合成反応で調べたところ、L-乳酸よりやや高い合成効率を得られることが分かった。CALBを用いて乳酸の光学分割をすることはできないが、乳酸発酵を行う際にL体のみ、又は、D体のみを生産する微生物を使用すれば、どちらの乳酸の精製にもCALBを提示した酵母を使用するこ

とが可能である。<sup>8)</sup>

次に、生理活性ペプチドの合成の例として、 $\beta$ -アラニンとL-ヒスチジンがペプチド結合したカルノシンの例を簡単に紹介する。カルノシンは、脳内に存在する生理活性ペプチドとして最近、注目を集めてきており、抗疲労や抗酸化効果により、サプリメントとしても広がりつつある。このペプチドは、非天然の $\beta$ -アラニンを含むため、ノンリボソーム合成が必要であり、われわれは、カルノシン合成酵素の存在が未知であるため、分解酵素カルノシナーゼの遺伝子をクローニングし、前述の方法により、酵母細胞表面に提示して、有機溶媒下で、分解反応の逆反応で、この生理活性ペプチドの合成を試みた。その結果、有機溶媒でも疎水的な有機溶媒下で合成が進むことを見出し (Fig. 3)、試験管内合成に初めて成功した。さらに、イオン液体の適用を試みたところ、疎水的性質を持つイオン液体内で同様の反応が実現できた。<sup>9)</sup>

以上のように、細胞表面工学により創製された Whole-cell biocatalyst は非常に簡便で安価な新しい生体触媒の創製手法となり、水系はもちろん、有機溶媒やイオン液体系での合成反応にもその適用範囲を広げていっている。

#### 4. 生体触媒の有機溶媒耐性—新しい合成生物学による触媒開発<sup>10,11)</sup>

細胞表面工学では、酵素の担体となる酵母の有機溶媒耐性も重要であるが、真核微生物についての有機溶媒耐性の研究はほとんどない。われわれは、有機溶媒存在下でのドライイーストの連続培養中に、イソオクタンに耐性を示す酵母 *S. cerevisiae* KK-211 株を世界で初めて単離した。KK-211 株は野生株では生育できないイソオクタン ( $\log\text{Pow}=4.8$ ) 含有培地においても生育可能であり、そのほかにもノナンやオクタン、ジフェニルエーテルといった有機溶媒にも耐性を示す。KK-211 株の細胞膜脂質中の飽和脂肪酸含量を調べたところ、その割合の増加が確認されたが、さらに野生株と KK-211 株ではイソオクタンドロップに対する親和性が大きく異なり、KK-211 株ではほとんど吸着しないことから、細胞表面の組成の変化がうかがえる。そこで、KK-211 株の有機溶媒耐性機構を明らかにするとともに、有機溶媒耐性株の分子育種を試みた。

KK-211 株の有機溶媒耐性機構を明らかにするため、DNA マイクロアレイ解析により KK-211 株と野生株とで網羅的に転写レベルを比較し、有機溶媒に係わっていると考えられる遺伝子を絞り込んだ。その結果、KK-211 株では多くの遺伝子の転写レベ

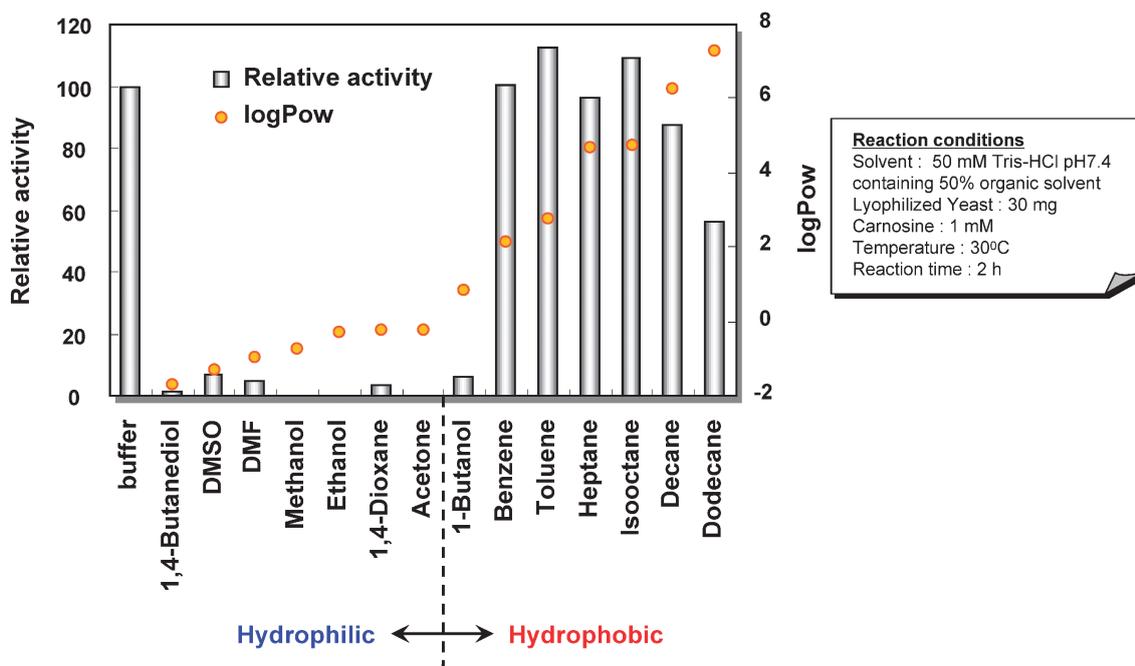


Fig. 3. Effect of Organic Solvents on Displayed Carnosinase as the Whole-cell Biocatalyst

ルの上昇が確認された。これらの遺伝子群の中には、ABC トランスポーターなど細胞表層タンパク質をコードするものが多く含まれていた。さらに、これらの遺伝子の発現制御機構を調べると、共通してプロモーター領域中に PDRE (Pleiotropic Drug Response Element) が存在していたことから、PDRE を持つ遺伝子の発現制御を行っている転写因子 Pdr1p に着目した。そこで、KK-211 株の遺伝子転写プロファイル进行分析したところ、興味深いことに pdr1 変異株の遺伝子転写プロファイルと高い類似性を示した。したがって、有機溶媒耐性をもたらす要因として PDR1 遺伝子の介在が考えられたため、KK-211 株の PDR1 遺伝子配列を調べてみると、野生株と比べて 4 ヶ所のアミノ酸変異の存在を発見した。

実際に、有機溶媒耐性がこの変異に起因するかを確かめるため、野生株ゲノム中の PDR1 遺伝子に変異導入を試みた。KK-211 株の pdr1 の 4 ヶ所の変異のうち、821 番目のアミノ酸がアルギニンからセリンに置換している変異 (R821S) に着目した。この変異 (PDR1-R821S) を相同組換えによって実験室株 MT8-1 のゲノム DNA に導入し、有機溶媒耐性の有無を調べたところ、PDR1-R821S 変異を導入した MT8-1 変異株ではイソオクタンやノナン

などの有機溶媒含有培地においても良好な生育を示した。この結果から、KK-211 株の有機溶媒耐性が PDR1-R821S 変異に起因していることが明らかになり、この変異をゲノム中に導入することによって、野生株の有機溶媒耐性を再現することもできた。さらに、PDR1-R821S 変異の導入により有機溶媒耐性化した MT8-1 株を用いて、水/有機溶媒二相系にて 3-オキソブタン酸ブチルの還元反応を試みたところ、PDR1-R821S 変異を導入した株は反応開始 30 時間後にほぼすべての基質を還元しており、有機溶媒耐性を持つだけでなく実際の物質変換等に必要触媒活性も保持していることが明らかとなった (Fig. 4)。

### 5. 今後の展望

本稿では、酵母分子ディスプレイシステムにより、これまでにない新しい革新的な Whole-cell biocatalyst を創製し、より環境への負荷が少ない反応系の構築の展開について紹介した。また、有機溶媒耐性酵母の解析により、耐性をもたらす因子を同定するとともに、転写因子 PDR1 を改変することによって、本来有機溶媒耐性を持たない酵母などの真核微生物の生体触媒への応用展開に関して、容易に有機溶媒耐性の付与が、合成生物学的に、可能であることを明らかにした。有機溶媒耐性という複雑

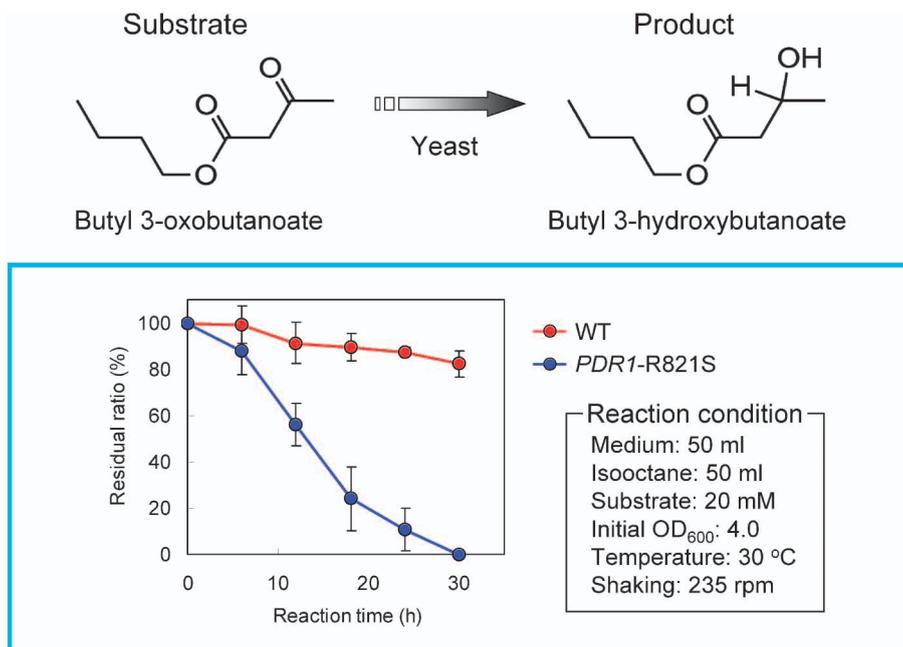


Fig. 4. Microbial Reduction with the Reconstructed Organic-solvent-tolerant Yeast

な要因のからむ表現型を、関連する転写制御因子の変異により再現し、有機溶媒内で機能する新しい生体触媒の開発を可能にした。得られた技術は、今後、環境負荷の大きい疎水性化合物の合成など有機溶媒を用いる生体触媒反応において大きく貢献できるであろうと考えられる。

#### REFERENCES

- 1) Ueda M., Kondo A., "Kagaku Frontier," Vol. 9, Kagaku-Dojin Publishing Company, INC, Kyoto, 2003.
- 2) Ueda M., "Frontier of Combinatorial Bioengineering," CMC Publishing Co., Ltd., Tokyo, 2004.
- 3) Ueda M., *Bioscience and Industry*, **55**, 275–278 (1997).
- 4) Ueda M., *Kagaku to Seibutsu*, **35**, 525–532 (1997).
- 5) Ueda M., *Bionics*, **27**, 31–35 (2007).
- 6) Ueda M., *Yakugaku Zasshi*, **129**, 1277–1284 (2009).
- 7) Shiraga S., Kawakami M., Ishiguro M., Ueda M., *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 4335–4338 (2005).
- 8) Inaba C., Maekawa K., Morisaka H., Kuroda K., Ueda M., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **83**, 859–864 (2009).
- 9) Inaba C., Higuchi S., Morisaka H., Kuroda K., Ueda M., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **86**, 1895–1902 (2010).
- 10) Matsui K., Hirayama T., Kuroda K., Shirahige K., Ashikari T., Ueda M., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **71**, 75–79 (2006).
- 11) Matsui K., Teranishi S., Kamon S., Kuroda K., Ueda M., *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 4222–4225 (2008).