

フェルラ酸脱炭酸酵素の合理的な基質特異性改変による 1,3-ブタジエン生産

森 裕太郎^{1,2}, 白井 智量^{1,2}

1. はじめに

近年、持続可能な循環型社会の実現に向けた取り組みが全世界で行われている中で、これまで化石資源から作られてきた化学物質を、食糧問題と競合しない再生可能資源である非可食性バイオマスから生成するバイオリファインリーに大きな関心が寄せられている。将来的には化石資源由来の化合物をバイオベース化合物で代替するためには、「すでに微生物によって生産することが可能な既存の化合物の生産量と収率を向上させる」研究と、「いまだ微生物による生合成が達成されていない新規の有用化合物の生成を実現する」研究の双方が必要である^{1,2)}。化石資源から変換可能な化合物空間に対して、微生物が生合成可能な化合物はいまだごくわずかであることから、特に後者の研究が求められている³⁾。

近年の合成生物学や生物情報科学の発展に伴い、「実際に生体内の化学反応を触媒する役割を持つ酵素」に着目したタンパク質工学的観点から行った研究により、既存の酵素反応の活性向上や新規の非天然化合物の生成を達成した例が多数報告されている。そこで本稿においては、近年、新たな発見があったフェルラ酸脱炭酸酵素 (ferulic acid decarboxylase: FDC) の最新の知見について紹介しつつ、FDCの基質特異性を合理的に改変することによって、非天然化合物である1,3-ブタジエンを炭素源であるグルコースから直接的に生産可能な新規人工代謝経路の構築に成功した研究成果について報告する。

2. フェルラ酸脱炭酸酵素 (FDC)

FDCは、フェルラ酸や桂皮酸といった芳香族不飽和カルボン酸 $R-CH=CH-COOH$ の側鎖末端を脱炭酸して $R-CH=CH_2$ を生成する脱炭酸酵素であり、古くからバイオスチレンの生産発酵に用いられてきた。その脱炭酸反応は、活性中心Arg-Glu残基ペアが触媒するプロトン移動から続く基質化合物内での電子リレーが駆動力であると推定され、そのためFDCの基質は芳香環のような共役環式化合物だけであると考えられてきた。そんな折、2015年に *Saccharomyces cerevisiae* や *Aspergillus niger* 由来のFDCが⁴⁾、プレニル化されたフラビンモノヌクレオチド (prFMN) を補酵素として保有し、このprFMNが脱炭酸反応を触媒しているということが明らかとなった⁴⁾。prFMNは、プレニルトランスフェラーゼと新たに名づけられたubiXやpad1相同体によって、生体内化合物ジメチルアリルリン酸 (DMAP) の脱リン酸化反応を伴うFMNとの結合反応と、それに続く環化反応により形成される (図1a)⁵⁾。prFMNはFDCが属するUbiDファミリーの酵素群に取り込まれた状態で酸化成熟を受ける。この活性型のprFMN^{iminium} となって初めて、UbiD酵素群は不飽和カルボン酸の脱炭酸反応を触媒することが可能となる⁶⁾。prFMNを持つFDCによる桂皮酸の脱炭酸反応では、prFMN^{iminium} と基質間の1,3-双極子付加環化反応とピロリジン環状付加化合物の形成からスタートする反応機構が推定されている (図1b)。この他、基質によって駆動力とする反応機構は異なるものの、芳香環やヘテロ環に結合したカルボキシ基の脱炭酸反応を可能としており、UbiDファミリーは非常に幅広い化合物を基質としている (図1c)。特に、prFMNが触媒する特異的な反応によって、芳香環を持たない不飽和カルボン酸も脱炭酸反応により末端アルケンへと変換することが可能なが報告されている。またこの脱炭酸反応は可逆反応であり、多量の炭酸イオン存在下またはCO₂ 高圧条件下においては基質へのカルボキシル化を行うことが可能であることから、CO₂ の直接固定化という視点からも注目を集めている⁷⁾。その他にも、活性型prFMNは光照射により不可逆的な互変異性化を起こし不活性型となること⁸⁾、長時間の酸素の曝露によって一部のFDCは失活してしまうこと⁹⁾、多くのprFMNはMn²⁺をはじめ2価イオンを介して

¹ 特定国立研究開発法人理化学研究所環境資源科学研究センター (〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22)

² 理化学研究所バトンゾーン研究推進プログラム (〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22)

Direct bioproduction of 1,3-butadiene by the tailor-made ferulic acid decarboxylase mutant

Yutaro Mori^{1,2} and Tomokazu Shirai^{1,2} (¹Center for Sustainable Resource Science, RIKEN, Yokohama, Japan, 1-7-22 Suehirocho, Yokohama shi, Tsurumi ku, Kanagawa, 230-0045, Japan, ²Center for Sustainable Resource Science, RIKEN, Yokohama, Japan, 1-7-22 Suehirocho, Yokohama shi, Tsurumi ku, Kanagawa, 230-0045, Japan) 本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940605

© 2022 公益社団法人日本生化学会

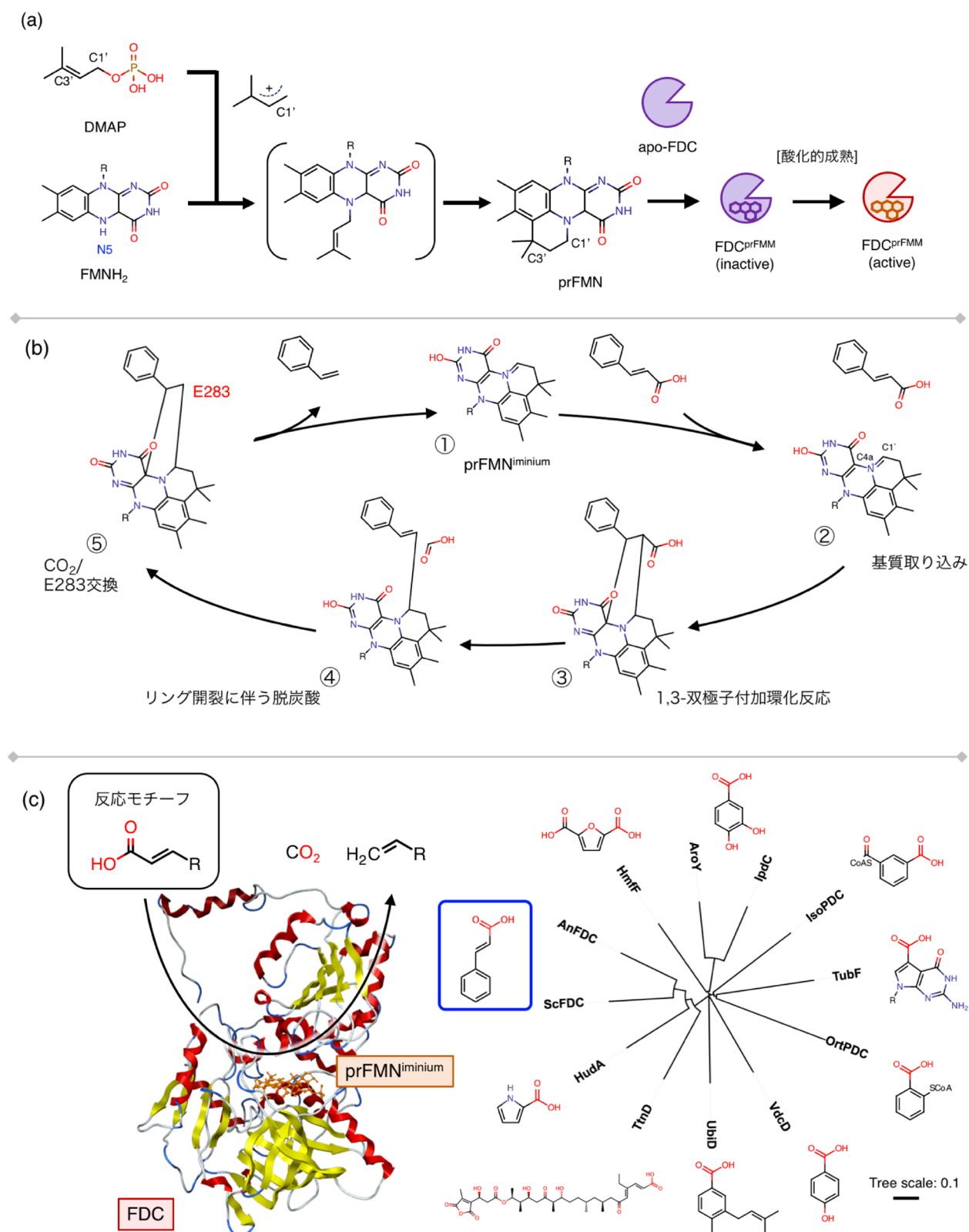


図1 UbiX/UbiD システム

(a) UbiX による prFMN の形成, (b) prFMN の触媒する推定脱炭酸反応機構, (c) UbiD ファミリーの系統樹と主要基質化合物.

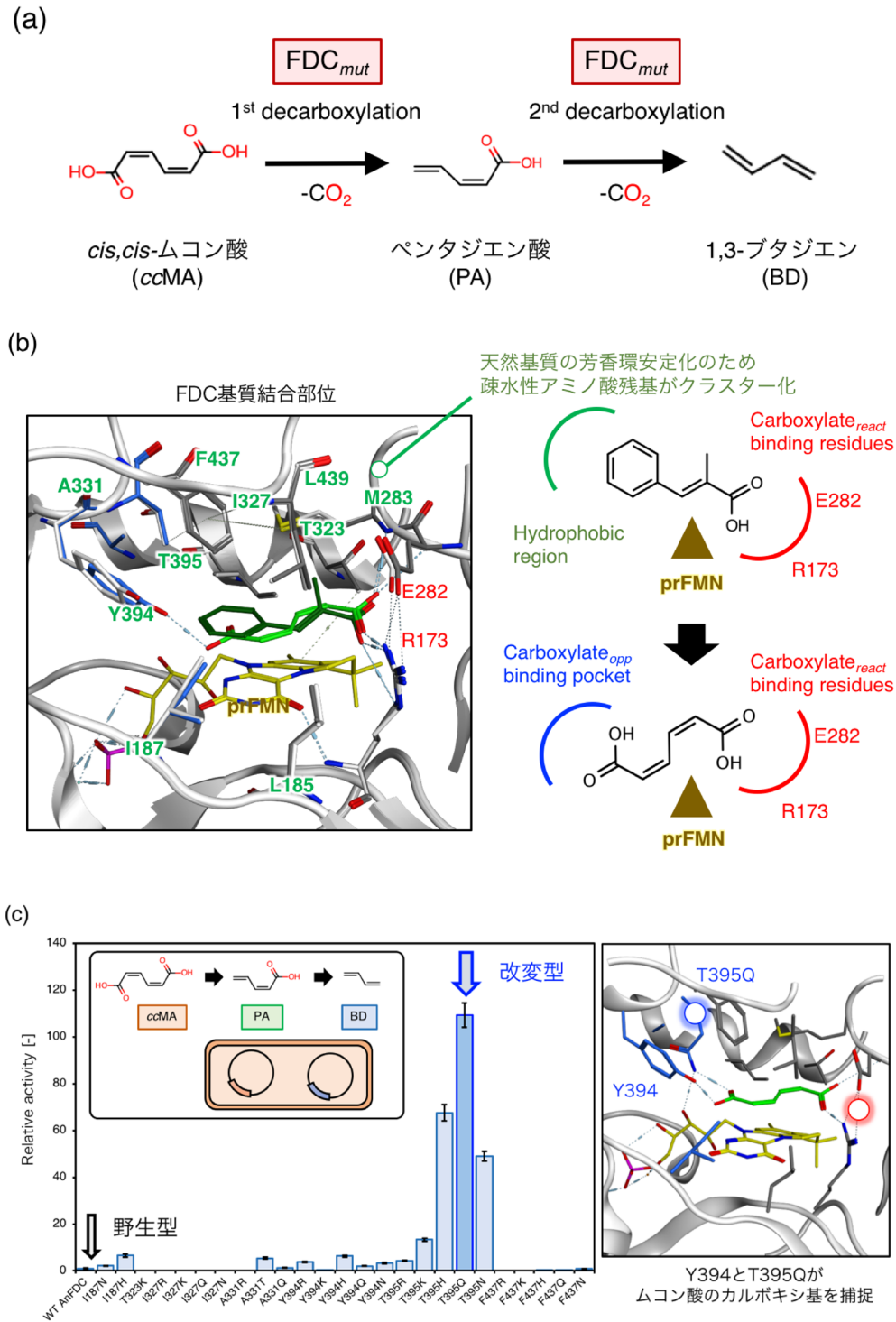


図2 AnFDC変異体の開発
(a) 1,3-ブタジエン生成反応, (b) AnFDC基質結合部位と変異体デザイン, (c) 変異体活性グラフ.

UbiD酵素群と相互作用していることなど¹⁰⁾, 現在進行系でFDC周りの基礎情報が解明されつつある.

3. バイオベース1,3-ブタジエン

1,3-ブタジエンは合成ゴムや樹脂などの原料となる重要な工業原料であるが, 生産量はほぼすべてを化石資源に依存していることから, 再生可能資源を原料とするバイオペー

スの1,3-ブタジエンへの転換が求められていた。しかしながら、自然界において1,3-ブタジエンの生合成経路はいまだ発見されていないため、これまでの合成生物学ではグルコースからの1,3-ブタジエンの直接生成は達成されていなかった。既存の人工代謝経路設計ツールによって、クロトニル-CoA、マロニル-CoAやエリスロ-4-リン酸を出発化合物とした人工代謝経路が提案されていたものの、実際にこれらの経路を利用した1,3-ブタジエン生産は成功していない。

ここで新規の1,3-ブタジエン人工生産経路の設計を試みたところ、上述のprFMNを持つFDCの反応モチーフR-C=C-COOHから逆合成的に考え、このモチーフが二つ連結した構造であるムコン酸が1,3-ブタジエンの反応前駆体候補にあがった。*cis,cis*-ムコン酸(ccMA)は、微生物による安息香酸等の芳香族化合物の分解経路に位置する化合物として古くから知られており、再生可能資源グルコースから変換可能な生体内化合物である^{11,12)}。よってFDCを鋳型酵素として基質特異性を改変し、ccMAを基質として2回の脱炭酸反応を行うことができれば、1,3-ブタジエンの生成が達成されたと考え、FDC変異体の合理的開発を行った(図2a)。

4. FDCの基質特異性の改変による1,3-ブタジエン生成酵素の開発

昨今、*in silico*でのシミュレーション結果を基に、基質特異性の改変、酵素触媒活性の向上、可溶性・熱安定性の向上などを行った研究が多数報告されている^{13,14)}。本稿においても、FDCの基質特異性を改変してccMAを基質として1,3-ブタジエンへと変換するため、FDCと基質であるccMAとの親和力を判断基準とした*in silico*デザインを試みた。FDCに変異を導入するにあたり、基質との共結晶構造が報告されている*A. niger*由来FDC(*AnFDC*)を選択した。*AnFDC*の基質結合部位においては、脱炭酸反応を触媒するprFMNの直上に基質である α -メチルケイ皮酸が位置しており、そのカルボキシ基はR173および主鎖骨格と水素結合を形成して相互作用をする一方で、芳香環は疎水性アミノ酸残基クラスター領域によって、安定化と基質認識を行っているようすが観察された。そこで、基質を1分子中にカルボキシ基を二つ持つccMAへと改変するためには、脱炭酸反応が行われる側のカルボキシ基と*AnFDC*との相互作用を維持したまま、反対のカルボキシ基と相互作用できる部位を新たに設ければよいという仮説を立てた(図2b)。そこでまず疎水性クラスター領域を形成しているアミノ酸残基について、一残基変異体モデルを*in silico*上で構築した。次にccMAとそれら変異体モデルとのドッキングシミュレーションの結果から、変異

導入による親和力の向上順に24変異体を選択した。大腸菌(*Escherichia coli*)をタンパク質発現用の宿主として選択し、prFMNを形成する*E. coli*由来UbiXと*AnFDC*を共発現させ、基質であるccMAを培地中に添加して培養を行うことで1,3-ブタジエンの生成を試みた。その結果、野生型*AnFDC*においても1,3-ブタジエンの生成が確認され、野生型*AnFDC*はccMAと反応中間体ペンタジエン酸(PA)の両方に対して脱炭酸反応を触媒できるということが明らかとなった。次に、作製した25変異体について同様に活性測定を行ったところ、T395Q変異体において野生型と比較して109倍の活性の向上が確認された(図2c)。*AnFDC* T395Q-ccMAドッキングモデルを確認したところ、Y394と導入したT395QがccMAのカルボキシ基と相互作用しているようすが確認された。そして、これらの結果をフィードバックし、独自の判定ルールを設けスコアリングを行うことで最大で四重変異体までの多重変異体の構築を試み、最終的に*AnFDC* Y394H:T395Q変異体において、野生型の1003倍の活性向上を達成した。次に野生型において*AnFDC*より1,3-ブタジエン変換活性の高かった*S. cerevisiae*由来FDC(*ScFDC*)に対して、今回開発した酵素デザインを適用することで、さらに活性の高い*ScFDC* F397H:I398Q変異体を獲得することに成功した。また今回用いた1,3-ブタジエンの反応前駆体であるムコン酸は、二重結合の周りの幾何によってccMAの他に*cis,trans*-ムコン酸(*ctMA*)、*trans,trans*-ムコン酸(*ttMA*)と呼ばれる2種類の異性体が存在する。*ScFDC* F397H:I398Q変異体について基質特異性を検討したところ、*ctMA*や*ttMA*も1,3-ブタジエンへと変換可能であった。その一方で、野生型*ScFDC*と比べたときの活性は、それぞれ440倍(ccMA)、46倍(*ctMA*)、12倍(*ttMA*)であり、ドッキング時に基質として用いたccMAに対する活性向上が最大であり、シミュレーション時の基質選択が、実際の実験結果に反映されていることが明らかとなった。

5. FDC変異体とムコン酸生産大腸菌によるグルコースからの1,3-ブタジエン生産

代謝改変により生産能力の強化を行ったムコン酸生産大腸菌に対して、開発した1,3-ブタジエン生成酵素*ScFDC* F397H:I395QおよびUbiXを導入することで、グルコースからの1,3-ブタジエンの直接生産を試みた。その結果、培養開始48時間において、41mg/Lの1,3-ブタジエンの生産を達成した。これはグルコースからの1,3-ブタジエンの直接生産を達成した世界で初めての成功例である。最後に、1,3-ブタジエンの生産量を向上させるために、1Lジャーファーメンターを用いた培養を行った(図3)。検討の結果、培養中の溶存酸素量(DO)と培地のpHが1,3-ブタジ

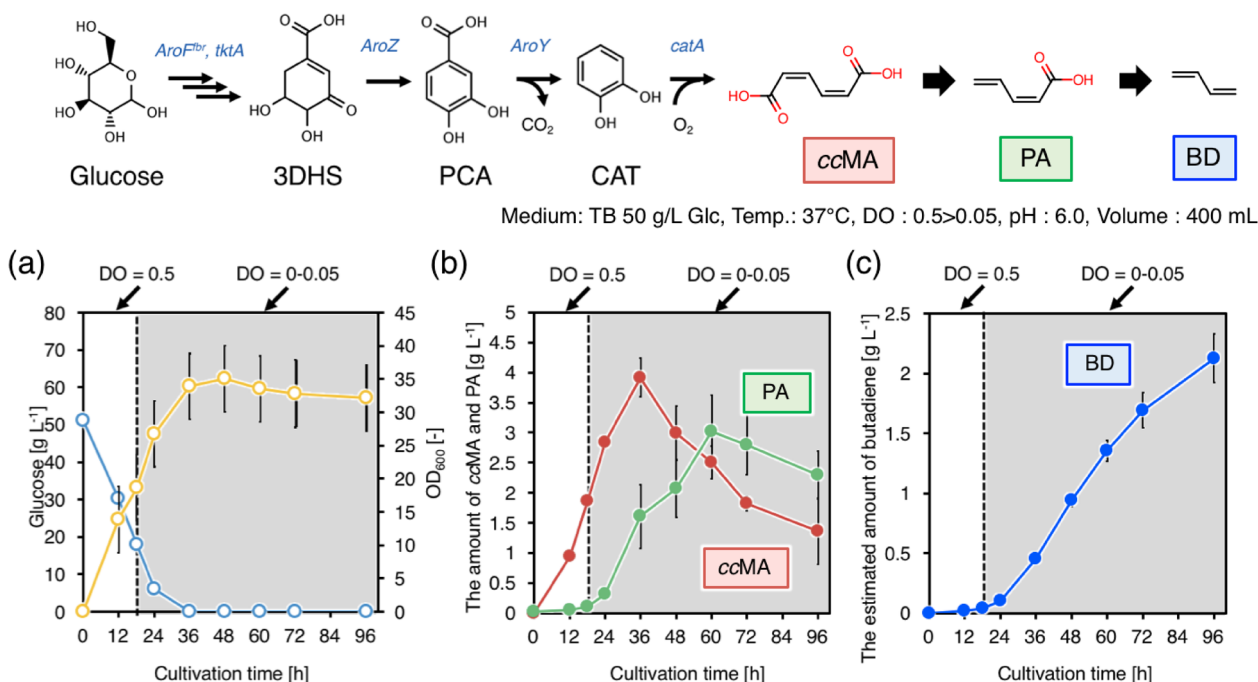


図3 1,3-ブタジエン生産大腸菌の培養プロファイル

導入遺伝子: *E. coli*由来3-デオキシ-7-ホスホヘブツロン酸合成酵素 (AroF), トランスケトラーゼ (tktA), *Bacillus thuringiensis*由来3-デヒドロキシミ酸 (3DHS) 脱水酵素 (AroZ), *Klebsiella pneumoniae*由来プロトカテク酸 (PCA) 脱炭酸酵素 (AroY), *Pseudomonas putida* DOT-T1E由来カテコール (CAT) 酸化開裂酵素 (catA) および 1,3-ScFDC F397H:I395Q, UbiX. (a) グルコース濃度 (青) と菌体量 (黄), (b) ccMA (赤) と PA (緑) の生産量, (c) 1,3-ブタジエンの生産量.

エンの生産量に大きく影響することが明らかとなった。今回設計した1,3-ブタジエン生産経路では、グルコースからムコン酸までの経路前半においてFDCの基質であるccMAを生産するために酸素が必要であり、好気条件下での培養が望ましい。次にムコン酸から1,3-ブタジエンまでの経路後半において、FDCは過剰の酸素に曝露されると失活してしまう一方で、prFMNは酸素による酸化的成熟により活性化するため、完全な嫌気状態ではccMAからの1,3-ブタジエンの生成を行うことができない。以上を踏まえて、培養開始後18時間において好気から微好気へと通気条件を切り替える2段階培養を行った。また、生成した基質であるccMAおよびPAは菌体外へと放出されてしまうため、培養時に低pHを維持することで、培地中からの基質の再取り込みが促進されることが明らかとなった。最終的にDO-statによる流加培養を行うことにより、ccMAやPAは培養液中に残存しているものの培養開始96時間後においてグルコースからの2.1 g/Lの1,3-ブタジエンの生産を達成した¹⁵⁾。

6. おわりに

本稿では、非天然化合物である1,3-ブタジエンの生産を

目的として人工代謝経路を設計し、シミュレーションに基づく合理的な基質特異性の改変により、ccMAの脱炭酸反応を触媒する酵素変異体の開発を行った。現在は、さらなる酵素改変により1,3-ブタジエンへの変換効率を高めた変異体の獲得を行うとともに、本稿で紹介した合理的改変設計アルゴリズムの情報蓄積および他の反応機構を持つ別の酵素への適用を進めているところである。今後、本研究のような非天然化合物生産に向けた酵素変異体開発のさらなる発展により、化石資源由来の化合物が一つずつ再生可能資源から生産できるようになることで、真の循環型バイオエコノミー社会の実現が近づくだろう。

文 献

- 1) Noda, S. & Kondo, A. (2017) Recent advances in microbial production of aromatic chemicals and derivatives. *Trends Biotechnol.*, **35**, 785-796.
- 2) Matsumoto, T., Tanaka, T., & Kondo, A. (2017) Engineering metabolic pathways in *Escherichia coli* for constructing a "microbial chassis" for biochemical production. *Bioresour. Technol.*, **245**(Pt B), 1362-1368.
- 3) Mori, Y. & Shirai, T. (2018) Designing artificial metabolic pathways, construction of target enzymes, and analysis of their function. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **54**, 41-44.
- 4) Payne, K.A., White, M.D., Fisher, K., Khara, B., Bailey, S.S.,

- Parker, D., Rattray, N.J., Trivedi, D.K., Goodacre, R., Beveridge, R., et al. (2015) New cofactor supports α,β -unsaturated acid decarboxylation via 1,3-dipolar cycloaddition. *Nature*, **522**, 497–501.
- 5) Wang, P.-H., Khusnutdinova, A.N., Luo, F., Xiao, J., Nemr, K., Flick, R., Brown, G., Mahadevan, R., Edwards, E.A., & Yakunin, A.F. (2018) Biosynthesis and activity of prenylated fmn cofactors. *Cell Chem. Biol.*, **25**, 560–570.e6.
- 6) Balaikaite, A., Chisanga, M., Fisher, K., Heyes, D.J., Spiess, R., & Leys, D. (2020) Ferulic acid decarboxylase controls oxidative maturation of the prenylated flavin mononucleotide cofactor. *ACS Chem. Biol.*, **15**, 2466–2475.
- 7) Aleku, G.A., Roberts, G.W., Titchiner, G.R., & Leys, D. (2021) Synthetic enzyme-catalyzed co 2 fixation reactions. *ChemSusChem*, **14**, 1781–1804.
- 8) Bailey, S.S., Payne, K.A.P., Fisher, K., Marshall, S.A., Cliff, M.J., Spiess, R., Parker, D.A., Rigby, S.E., & Leys, D. (2018) The role of conserved residues in Fdc decarboxylase in prenylated flavin mononucleotide oxidative maturation, cofactor isomerization, and catalysis. *J. Biol. Chem.*, **293**, 2272–2287.
- 9) Payer, S.E., Marshall, S.A., Bärlund, N., Sheng, X., Reiter, T., Dordic, A., Steinkellner, G., Wuensch, C., Kaltwasser, S., Fisher, K., et al. (2017) Regioselective para-carboxylation of catechols with a prenylated flavin dependent decarboxylase. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **56**, 13893–13897.
- 10) Payne, K.A.P., Marshall, S.A., Fisher, K., Rigby, S.E.J., Cliff, M.J., Spiess, R., Cannas, D.M., Larrosa, I., Hay, S., & Leys, D. (2021) Structure and mechanism of *pseudomonas aeruginosa* pa0254/huda, a prfmn-dependent pyrrole-2-carboxylic acid decarboxylase linked to virulence. *ACS Catal.*, **11**, 2865–2878.
- 11) Noda, S., Shirai, T., Oyama, S., & Kondo, A. (2016) Metabolic design of a platform *Escherichia coli* strain producing various chorismate derivatives. *Metab. Eng.*, **33**, 119–129.
- 12) Fujiwara, R., Noda, S., Tanaka, T., & Kondo, A. (2020) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for shikimate pathway derivative production from glucose-xylose Co-substrate. *Nat. Commun.*, **11**, 1037.
- 13) Yang, K.K., Wu, Z., & Arnold, F.H. (2019) Machine-learning-guided directed evolution for protein engineering. *Nat. Methods*, **16**, 687–694.
- 14) Li, R., Wijma, H.J., Song, L., Cui, Y., Otzen, M., Tian, Y., Du, J., Li, T., Niu, D., Chen, Y., et al. (2018) Computational redesign of enzymes for regio- and enantioselective hydroamination. *Nat. Chem. Biol.*, **14**, 664–670.
- 15) Mori, Y., Noda, S., Shirai, T., & Kondo, A. (2021) Direct 1,3-butadiene biosynthesis in *Escherichia coli* via a tailored ferulic acid decarboxylase mutant. *Nat. Commun.*, **12**, 2195–2195.

著者寸描

●森 裕太郎 (もり ゆうたろう)



特定国立研究開発法人理化学研究所環境資源科学研究センター研究員、兼科技ハブ産連本部バトンゾーン研究推進プログラムバイオモノマー生産研究チーム研究員、博士 (工学)。

■略歴 2015年1月九州大学大学院工学府化学システム工学専攻博士課程修了。15年2月～理化学研究所細胞生産研究チーム特別研究員。21年4月～現在同

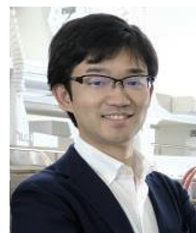
研究員。バトンゾーン推進プログラムバイオモノマー生産研究チーム研究員 (兼任)。

■研究テーマと抱負 研究テーマは、必要とする機能を満たすための酵素変異体の合理的設計技術の確立。特に非天然の酵素反応を触媒する酵素変異体の迅速な獲得を可能とすることで、持続可能な開発目標 (SDGs) 達成への貢献を目指す。

■ウェブサイト <https://researchmap.jp/yutaro-mori>

■趣味 コーヒー、料理、散歩。

●白井 智量 (しらい ともかず)



国立研究開発法人理化学研究所環境資源科学研究センター細胞生産研究チーム上級研究員、兼科技ハブ産連本部バトンゾーン研究推進プログラムバイオモノマー生産研究チーム副チームリーダー、博士 (工学)。

■略歴 2006年大阪大学大学院工学研究科応用生物工学専攻博士課程後期単位認定取得中退。07年学位取得。同年財団法人地球環境産業技術研究機構 (RITE) 研究員。08年三井化学株式会社。12年理化学研究所バイオマス工学研究プログラム細胞生産研究チーム上級研究員。同所環境資源科学研究センター細胞生産研究チーム副チームリーダー。21年同所上級研究員。20年同所科技ハブ産連本部バトンゾーン研究推進プログラムバイオモノマー生産研究チーム副チームリーダー (兼任)。

■研究テーマと抱負 人工代謝経路の設計および有用化合物の生産細胞の合理的設計技術の開発。産業界と緊密に連携し、化石原料の活用技術の確立を目指す。

■ウェブサイト https://researchmap.jp/tomokazu_shirai

■趣味 登山、ランニング、ゲーム。