

## 「変わり種酵素」とバイオリファイナリー

中澤 昌美

「ミドリムシは動物と植物の間に位置する生き物」と、誰もが昔聞いたことがあるのではないだろうか。ユーグレナ（ミドリムシの学名）は、その代謝系にも動植物両方の性質を併せ持っている。さらにミトコンドリアに独自の代謝系を多くもつ生物でもある。1960年代から1990年代にかけて多くの生理・生化学的解析がなされており、ユーグレナ独自の酵素活性も少なからず知られている。遺伝子工学の発展した現在において新規遺伝資源＝「変わり種酵素」の宝庫といえる。しかし、塩基配列情報が不充分であったため、バイオリファイナリーへの活用は進んでいなかった。

可能性の一端が示されたのが、多価不飽和脂肪酸（PUFA）合成への活用である。ユーグレナは、多くの生物で見いだされる $\Delta 6$ -不飽和化酵素活性を有さず、 $\Delta 8$ -不飽和化酵素活性を持つ。その特徴を生かして、1999年に世界初の $\Delta 8$ -不飽和化酵素cDNAクローニングがユーグレナで達成されたり、Qiらは2004年に、ユーグレナ $\Delta 8$ -不飽和化酵素と、他生物由来 $\Delta 5$ -不飽和化酵素、およびC18- $\Delta 9$ -PUFA特異的伸長酵素をシロイヌナズナに形質転換し、本来合成できない炭素長20のPUFAを細胞内脂肪酸中20%もの含量で蓄積させることに成功した<sup>2)</sup>。二重結合が4つのアラキドン酸および5つのエイコサペンタエン酸もそれぞれ数%蓄積していた。これは植物の生育に影響を及ぼさずにPUFAを高蓄積させた初めての研究例である。

また近年、1-ブタノールの微生物生産系においても、ユーグレナ酵素が間接的に重要な役割を果たしている。少し回り道になるが、ユーグレナ脂肪酸合成系についてまず言及し、1-ブタノール生産との関連を述べる。

ユーグレナは嫌気状態で発酵によりATPを獲得しながらワックスエステル（脂肪酸-脂肪アルコールエステル）を生産する。この際に鍵となるのが、ミトコンドリアでのATP非依存脂肪酸 $de novo$ 合成経路である。この経路は多くの生物が持つ $\beta$ 酸化の逆行経路である。 $\beta$ 酸化ではアシル-CoAデヒドロゲナーゼの触媒する反応が不可逆であるため、逆行経路においてはトランスエノイル-CoAレダクターゼ（TER）が反応を触媒する。高等動物TERはC4基質クロトニル-CoAの還元反応によるブチリル-CoA生成活性が非常に低い。そのため、これらの生物では本経路は中鎖アシル-CoAの鎖長伸長系として機能している。しかし、ユーグレナにはクロトニル-CoAに高い特異性を示すアイソフォームを含む3種のTERが存在するため、本逆行経路がアセチル-CoAからの脂肪酸 $de novo$ 合成経路として機能している。Inui

ら<sup>3)</sup>によって1984年に見いだされたこのTERは、2005年にHoffmeisterらによって完全精製とクローニングが達成された<sup>4)</sup>。ユーグレナTERは既知のTERとの相同性は低かったが、微生物ゲノム上に機能未知として同定されているオルソログとファミリーを形成していた。これらのオルソログは主に脂質代謝酵素とオペロンを形成しており、実際に微生物の脂質代謝系で機能していることが示唆された。

2007年にTucciらは*Treponema denticola*（歯周病原菌のひとつ）からの本TERオルソログのクローニングと大腸菌での発現に成功した<sup>5)</sup>。*T. denticola*由来TERはユーグレナTERと比べ、クロトニル-CoAとの親和性が非常に高い、クロトニル-CoAによる基質阻害が低い、という性質を有していた。またユーグレナTERと同様に、ブチリル-CoAを基質とした酸化反応は起こさなかった。この*T. denticola*由来TERは2011年にShenらによって1-ブタノールの大腸菌によるバイオリファイナリーに活用された<sup>6)</sup>。本系では、クロストリジウムの1-ブタノール生産系を大腸菌で再現する際に、二段階の戦略をとっている。まず、フェレドキシン依存型酵素であるブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ複合体の可逆反応を、NADH依存型酵素である*T. denticola*由来TERによる不可逆反応に置き換える。加えて、細胞内のアセチル-CoAおよびNADH消費系をデリーションして、反応の駆動力を得るというものである。これらの戦略により30 g/lという、クロストリジウム生産系と同等以上の1-ブタノール生産量を達成した。理論収率も70%超という高効率であった。生じる副産物量がクロストリジウム生産系よりも少ないという利点もあった。

ユーグレナTERの発見がなければ1-ブタノールの高効率生産は達成されていなかったかもしれない、というユーグレナの肩を持ち過ぎだろうか。ユーグレナ研究者のひとりとして、この生物のもつ「変わり種酵素」資源が今後、合成生物学やバイオリファイナリーへさらに活用されることを期待している。

- 1) Wallis, J. G. *et al.*: *Arch. Biochem. Biophys.*, **365**, 307 (1999).
- 2) Qi, B. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **22**, 739 (2004).
- 3) Inui, H. *et al.*: *Eur. J. Biochem.*, **142**, 121 (1984).
- 4) Hoffmeister, M. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **280**, 4329 (2005).
- 5) Tucci, S. *et al.*: *FEBS Lett.*, **581**, 1561 (2007).
- 6) Shen, C. R. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 2905 (2011).