



Directed evolution of thermotolerant malic enzyme for improved malate production

リンゴ酸生産能の増強を目的とした耐熱性マリックエンザイムの改変

(JBB, Vol. 117, No. 2, 147–152, 2014)

森本 有美¹・本田 孝祐^{1*}・Xiaoting Ye¹・岡野 憲司¹・大竹 久夫^{1,a}

浅学の身で冒頭から教訓めいたことを述べるのも些か僥越ではあるが、筆者（本田）なりに考える探索研究の「心得」を、以下に二つあげたい。

- ① 獲得を目指すモノの特性を具体的にイメージして探索にあたること。
- ② 予期せぬ「例外」に注視すること。

筆者にとって本研究は、この2点の重要性を改めて認識させてくれたものであり、今回その成果が論文賞の対象となったことに格別の感慨を感じている。

本研究は、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* KOD1由来のマリックエンザイム (*TkME*) を対象に、ランダム変異の導入により、その補酵素要求性を改変させることを目的として実施されたものである。マリックエンザイムは $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ 依存的にリンゴ酸の脱炭酸反応を触媒し、ピルビン酸を与える酵素である。反応は可逆的であり、炭酸（正確には重炭酸イオン）濃度の高い環境下では、ピルビン酸のカルボキシル化によるリンゴ酸生産を触媒することもできる。野生型 *TkME* は、 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ を補酵素として利用するが、より熱安定性の高い NAD^+/NADH を利用可能な変異型酵素を取得することが、本研究のねらいであった。

はっきり言ってしまえば、筆者らはこの試みに「失敗した」と感じている。2000を超える変異酵素ライブラリーからの探索を通じて獲得された変異酵素は、確かに野生型酵素に比べ、 NAD^+ を補酵素とした場合の触媒活性に優れるものであった (k_{cat}/K_m で野生型酵素の約6倍)。しかし、この活性増大は主として k_{cat} の向上に起因するものであり、 NAD^+ に対する変異型酵素の K_m は 1.5 mM と野生型酵素のそれ (2.1 mM) と比べて、大きく改善されたものではなかった。論文タイトルにもあるとおり、本研究は、リンゴ酸生産に適したマリックエンザイムの取得を目指して立案されたものである。 NAD(P)^+ や NAD(P)H は高価な物質であることから、これらの補酵

素を要求する酵素を用いた化学品生産では、適当な補酵素再生反応の共存下で、少量の補酵素を持続的に利用する必要がある。したがって、補酵素濃度が低い環境下でも十分な触媒活性を示すよう、使用される酵素は、補酵素に対し、できるだけ低い K_m を有するものであることが望ましい。本研究で、 K_m の低い酵素を取得できなかった理由は単純で、変異酵素ライブラリーからの探索試験で、比較的高い濃度 (1 mM) の NAD^+ を使用してしまったことにある。つまり、冒頭に述べた心得の①に反し、獲得すべき酵素の具体的なイメージを持たないまま、探索試験を行ってしまったがゆえの失敗である。

とはいえ、苦心の末に得た変異酵素である。このまま捨て置くのも口惜しいとの思いで、同変異型酵素を用いたリンゴ酸生産実験に取り組んだ。上記のとおり、*TkME* は重炭酸イオンを基質としたピルビン酸の還元的カルボキシル化によりリンゴ酸を生産する。一方、重炭酸イオン濃度が低い場合、*TkME* は、カルボキシル化を伴わないピルビン酸の還元を触媒し、乳酸を副生する。驚いたことに、変異型 *TkME* は、カルボキシル化反応に対する特異性が向上しており、野生型酵素を用いた場合に比べ、リンゴ酸生産で副生する乳酸の割合を大きく低下させることが明らかとなった。これは、偶然にも筆者らの用いた分析法 (HPLC法) では、リンゴ酸、乳酸の同時定量が可能であったためであるが、もしこの時、HPLCチャート上でリンゴ酸のピーク面積ばかりを凝視していたら、このようなセレンディピティーに巡り合うこともなかっただろう。このような予期せぬ「例外」に出会うことが、探索研究の醍醐味の一つともいえる。

とはいえ、探索研究において、このような「例外」に巡り合うためには、やはり、

③ 多数の検体を辛抱強く調べ上げる継続性
 がもっとも重要であることは言うまでもない。凡庸な結論かもしれないが、今後も筆者なりの心得に基づき、継続的に探索研究に取り組んでいきたいと考えている。

* 著者紹介 ¹大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 (准教授) E-mail: honda@bio.eng.osaka-u.ac.jp

^a 現 早稲田大学リンアトラス研究所