

環境とバイオテクノロジー
2020 年度採択研究者

2020 年度 年次報告書

二井手 哲平

大阪大学 大学院情報科学研究科
助教

構造情報に基づいた in silico 酵素改変が先導するスマート代謝経路設計

§ 1. 研究成果の概要

本研究では、医薬品の原料となる種々の低分子化合物を環境低負荷な微生物発酵により生産するため、微生物の代謝経路を設計・最適化することを目的としている。特に、代謝フラックスに基づく代謝反応予測とタンパク質構造モデリングによる合理的な酵素機能設計を組み合わせ、汎用的かつ統一的な代謝経路設計プロセスの提案に取り組んでいる。

そこで本年度はまず、BLAST・KEGG・BRENDA をはじめとしたデータベースを活用して代謝酵素を探索し、酵素が微生物内で可溶性タンパク質として発現するかの調査、および物質生産に用いる微生物のゲノム DNA に対し特定の遺伝子を欠損させることで基質化合物の要求性株を作製した。関連酵素の調査と発現評価に関しては、5 経路 19 酵素をデータベースより取得し、独自の発現ベクターにクローニングした。これを物質生産に用いる微生物へ導入、タンパク質を発現させ、SDS-PAGE と western blot により発現評価を実施した。その結果、19 種類中 16 種類の酵素で可溶性画分への発現・精製することに成功した。次年度は精製した酵素の触媒活性を評価する計画である。また、基質化合物の要求性株の作製に関しては、物質生産に用いる微生物における特定の遺伝子を相同組換え技術により欠失させることで、基質化合物の存在が無いと生存できない代謝状態を構築した要求性株を調製した。実際に、基質化合物が存在しない時は要求性株の増殖が見られず、基質化合物濃度に依存して要求性株の増殖が向上する結果が得られ、要求性株の作製に成功したと考える。次年度は、進化実験により基質化合物の取り込み経路の強化することを計画している。