

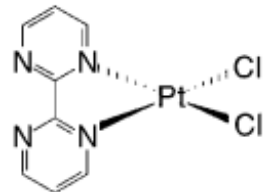
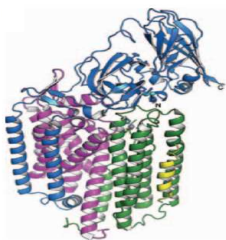
遺伝子工学の改良が可能な 短鎖炭化水素化合物酸化生体触媒

京都大学 大学院農学研究科 応用生命科学専攻
教授 阪井 康能

2019年5月16日

夢の反応: メタン → メタノール

(C-H結合 104kcal mol⁻¹)

	触媒性能	反応機構の解析	安定性と材質	設計と合成法
固体触媒 	低触媒活性 ($<0.0004\text{s}^{-1}$) 低収率($<9\%$)	困難	安定 不均一系	合理的な設計は 不可 材料の選択は経験に負う 材料を処理・混合し加熱
分子触媒 	低触媒活性 ($<0.01\text{ s}^{-1}$) 低ターンオーバー数 (多くが <1)	反応機構は明らか	均一系	反応機構が知られていないと設計できない 合理的な設計は 可
生体触媒 	高触媒活性 (室温で 4 s^{-1}) 高反応特異性	構造機能関連の解析が可	均一系 タンパク質 不安定	遺伝子合成と改変により合理的な設計は 可 活性発現できていない

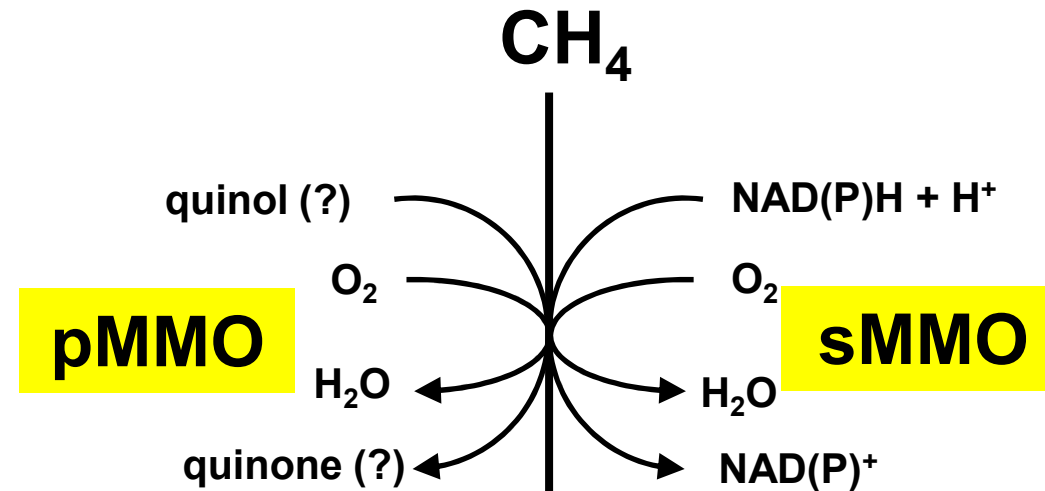
生体触媒は既存の分子触媒に比較して
数百～数千倍の触媒活性！
様々な化学合成法

メタンモノオキシゲナーゼ (MMO)

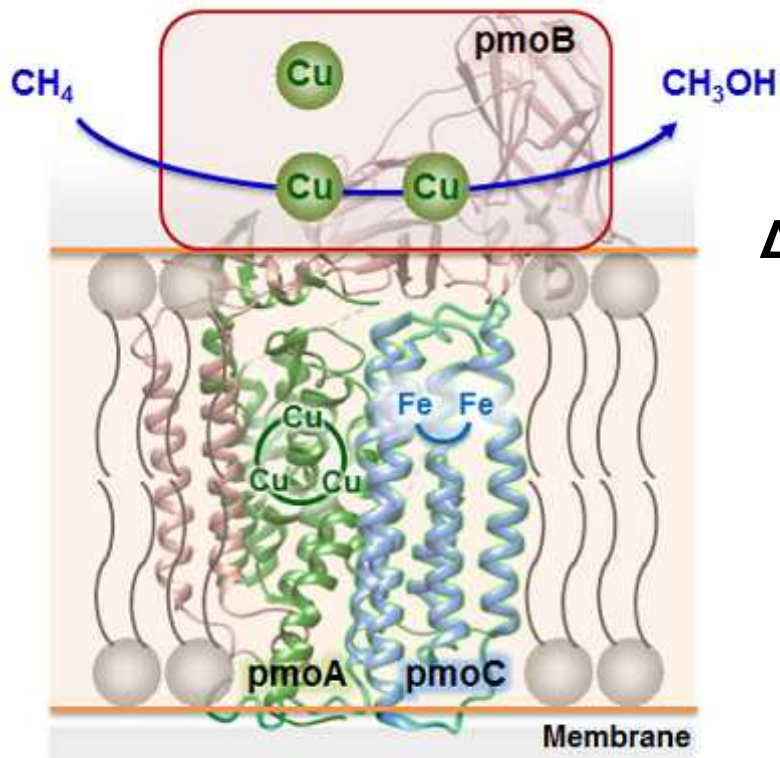
メタン酸化菌



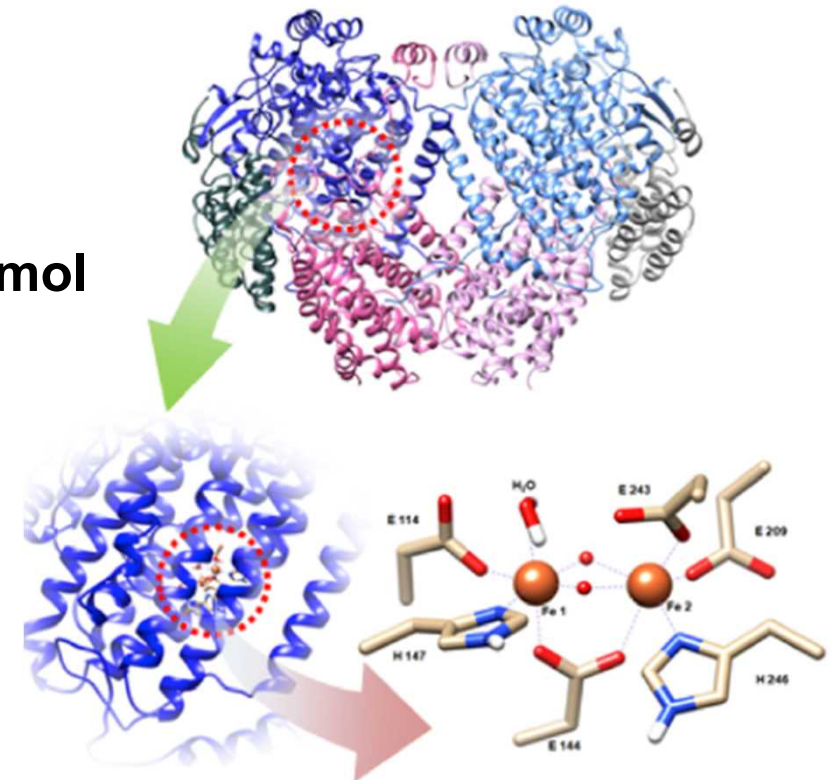
M. trichosporium OB3b



$$\Delta G^{\circ'} = -111 \text{ kJ/mol}$$



pMMOの構造と活性中心



sMMOの構造と活性中心

MMOの基質となる多様な炭化水素化合物

基 質	生 成 物	基 質	生 成 物
エタン	エタノール	エチレン	エチレンオキサイド
プロパン	1-プロパノール 2-プロパノール	プロピレン	プロピレンオキサイド
		1-ブテン	ブチレンオキサイド
ブタン	1-ブタノール 2-ブタノール		
		t-2-ブテン	t-2, 3-エポキシブタン t-2-ブテン-1-オール
i-ブタン	i-ブタノール t-ブタノール		
ペンタン	1-ペンタノール 2-ペンタノール 3-ペンタノール	ブタジエン	1, 2-エポキシブテン
		イソブレン	1,2-エポキシイソブレン
ヘキサン	1-ヘキサノール 2-ヘキサノール 3-ヘキサノール	アリルクロライド	エピクロルヒドリン
		クロトン酸メチル	エポキシクロトン酸メチル
		アリルベンジルエステル	グリシジルベンジルエステル
ヘプタン	1-ヘプタノール 2-ヘブ 3-ヘブ	ジアリルエステル	アリルグリシジルエステル
オクタン	1-オク 2-オク		
n-アルカン(C ₉ -C ₁₆)	n-1-アル		
メチルエチルケトン	1-ヒド		

表4 MMOの反応生成物の中で有望な化合物

化合物	特 徴
プロピレンオキサイド	低沸点で、ガスとして回収可能
ブチレンオキサイド	マーケットが日本では500tと小さい
エピクロルヒドリン	水への溶解度が高く、回収が難しい
クロロフェノール	マーケットが小さい
シアノフェノール	マーケットが小さい
ニトロフェノール	マーケットが小さい メタ、パラ体が生成、分離が必要
p-ヒドロキシアセトアニリド	マーケットが小さい

基 質	生 成 物	基 質	生 成 物
シクロプロパン	シクロプロパノール	安息香酸エチル	p-ヒドロキシ安息香酸エチル
メチルシクロプロパン	シクロプロパノール	p-クレゾール	5-メチル-1, 3-ベンゼンジオール
シクロヘキサン	シクロヘキサノール	ベンジルクロライド	p-ヒドロキシベンジルクロライド
ベンゼン	フェノール o-ヒドロキノン p-ヒドロキノン	1,4-ジクロロベンゼン	2-ヒドロキシ-1,4-ジクロロベンゼン
		m-クロロトルエン	ベンジルアルコール m-ヒドロキシベンジルアルコール p-ヒドロキシベンジルアルコール
トルエン	p-クレゾール ベンジルアルコール		
		フルオロベンゼン	p-ヒドロキシフルオロベンゼン
エチルベンゼン	o-ヒドロキシエチルベンゼン p-ヒドロキシエチルベンゼン ベンジルアルコール	ベンジルニトリル	p-ヒドロキシベンジルニトリル
		フェニルアセトニトリル	p-ヒドロキシフェニルアセトニトリル
スチレン	スチレンオキサイド p-ヒドロキシスチレン		
		ニトロベンゼン	3-ヒドロキシニトロベンゼン 4-ヒドロキシニトロベンゼン
p-メチルスチレン	p-ヒドロキシメチルスチレン	フェニルアセトアミド	p-ヒドロキシアセトアニリド
プロピルベンゼン	p-ヒドロキシプロピルベンゼン	ピリジン	ピリジン-N-オキサイド
フェニルヘプタン	4-ヒドロキシフェニルヘプタン 1-フェニルヘプタン-7-オール	ナフタレン	β-ナフトール 1,6-ナフタレンジオール
		ジフェニル	2-ヒドロキシジフェニル 4-ヒドロキシジフェニル

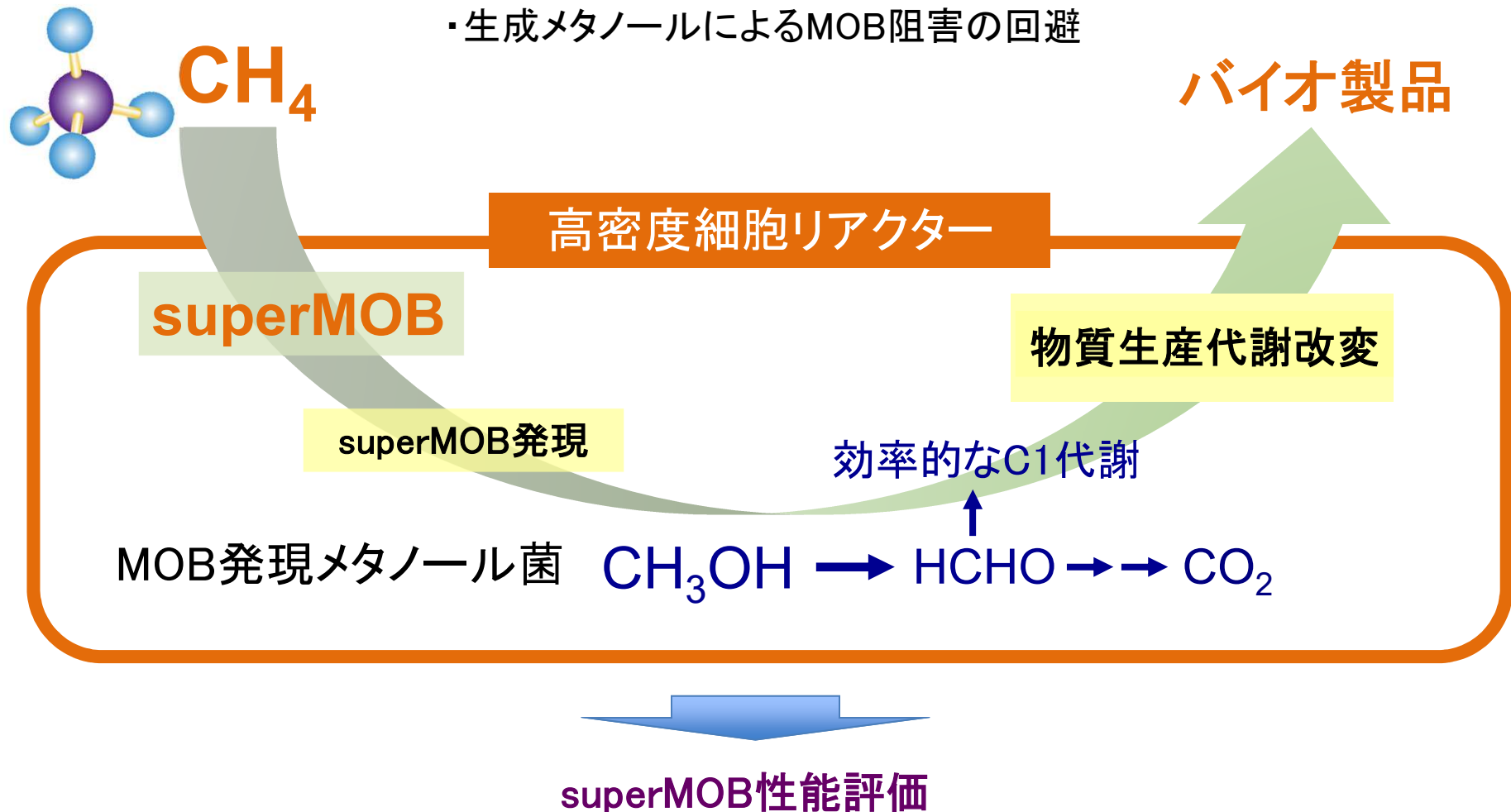
「バイオ コンバージョン」
谷、児玉、倉根 監修, JBA編集
医学出版センター(1993) より引用

superMOB メタノール資化性菌への導入による細胞触媒の創製

superMOB 細胞触媒

メタンを原料とする微生物生産

- ・多段階反応を細胞内に集積
- ・エネルギーと還元力の供給
- ・生成メタノールによるMOB阻害の回避



想定される用途

- 従来、困難であった炭化水素の常温常圧条件における酸化反応
- メタンを炭素資源とした微生物生産
- 環境浄化 (トリクロロエチレン など)

従来技術とその問題点

メタン酸化菌のもつメタン酸化酵素(MMO)については、**メタン以外にも様々な炭化水素化合物の酸化が可能**である。しかし基質特異性や生産性向上を目的として、**細胞内で活性型としてMMOを発現することができず、触媒活性の評価・育種・遺伝子工学的な改変ができなかった。**

その理由:

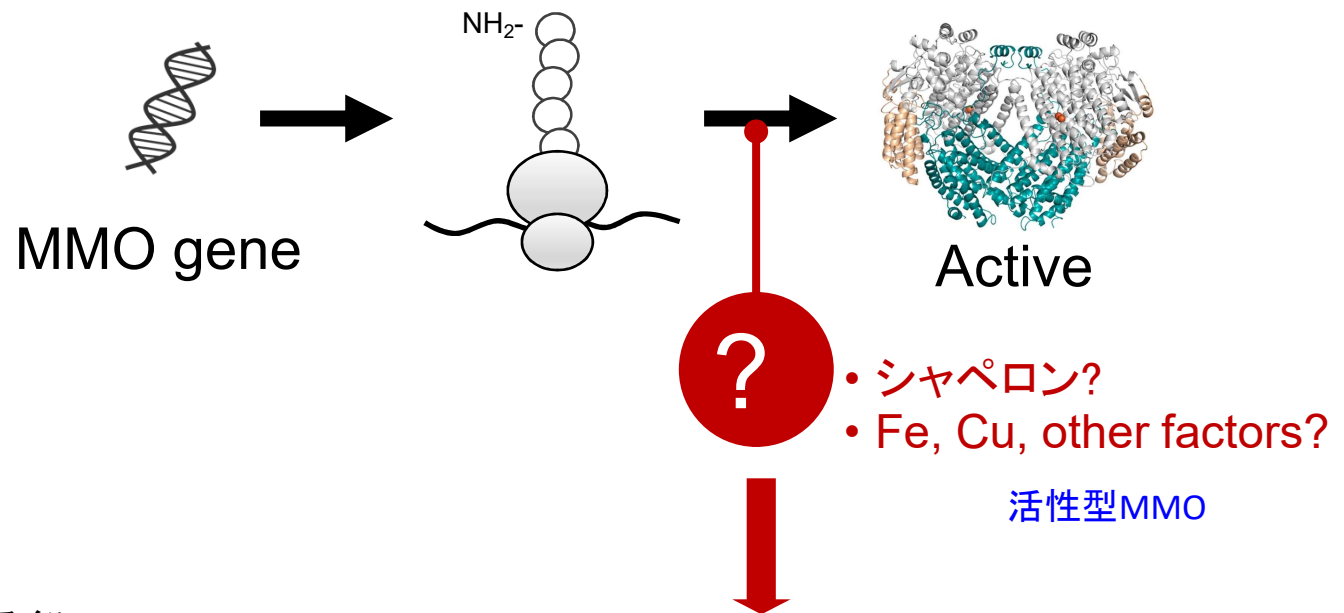
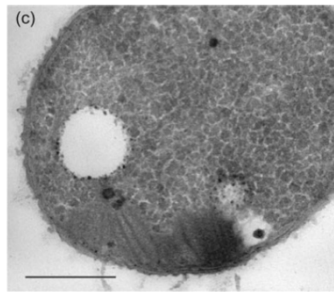
- 1) メタン酸化菌はメタンしか炭素源として生育することができず育種ができない。
- 2) 大腸菌・酵母などの異宿主でMMOの活性発現例の報告は無く困難で、大腸菌から得た**凝集体を *in vitro*でフォールディングする必要がある。**従って、**細胞レベルでMMO活性を指標とした検定・評価ができない。**
- 3) MMOの基質であるメタンは気体のため、**酵素活性の測定が煩雑かつ困難で、ハイスループットな活性スクリーニングがない。**

大腸菌を宿主とした不活性な凝集体としての発現と in vitro リフォールディング

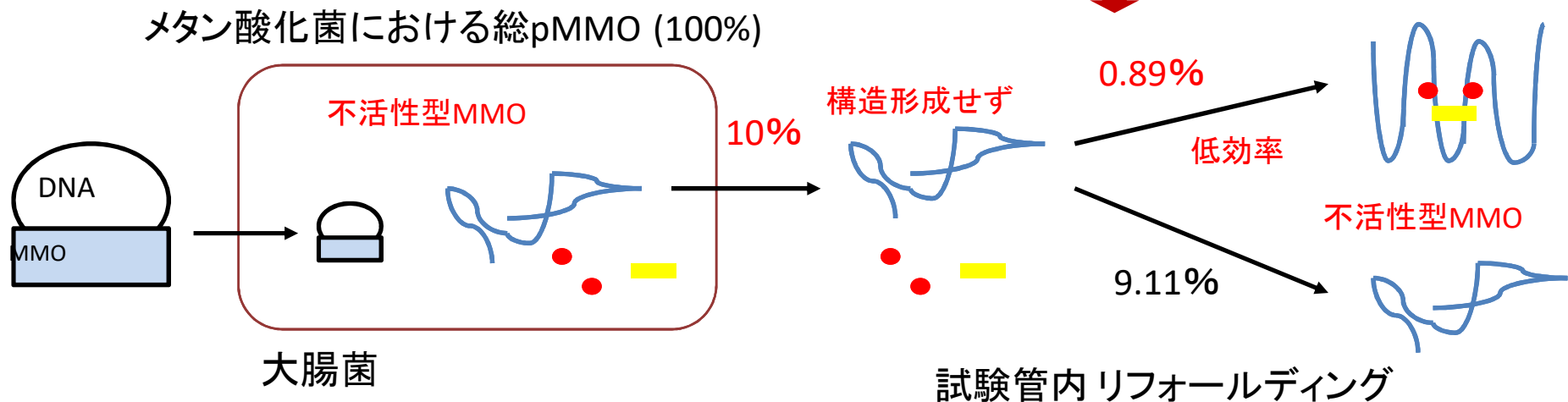
Nature 465, 115-119 (2010)

Crit. Review. Biochem. Mol. Biol. 47, 483-492 (2012)

メタン酸化菌 (メタンしか炭素源として利用できず、生育が遅い)



異宿主細胞



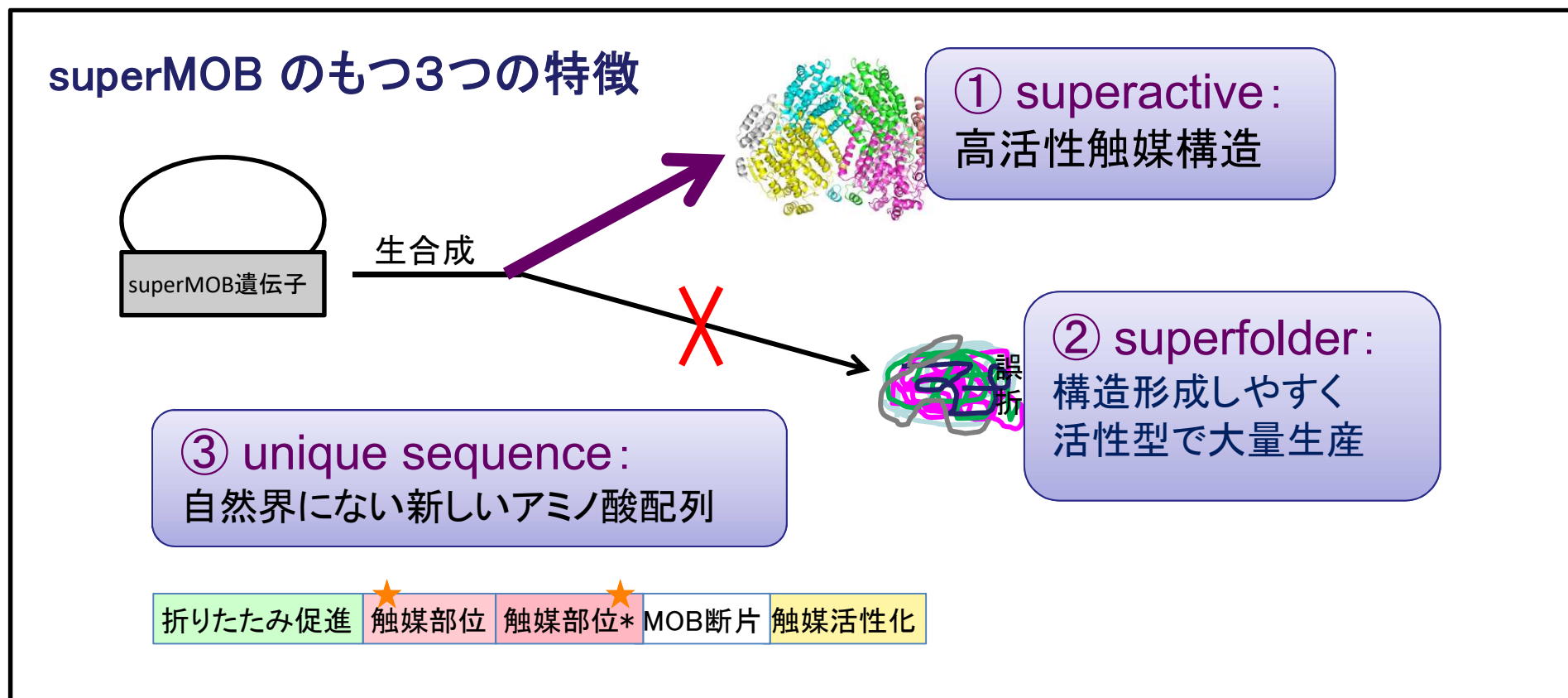
新技術の特徴・従来技術との比較

“高性能酸化生体触媒の新しいプラットフォーム”

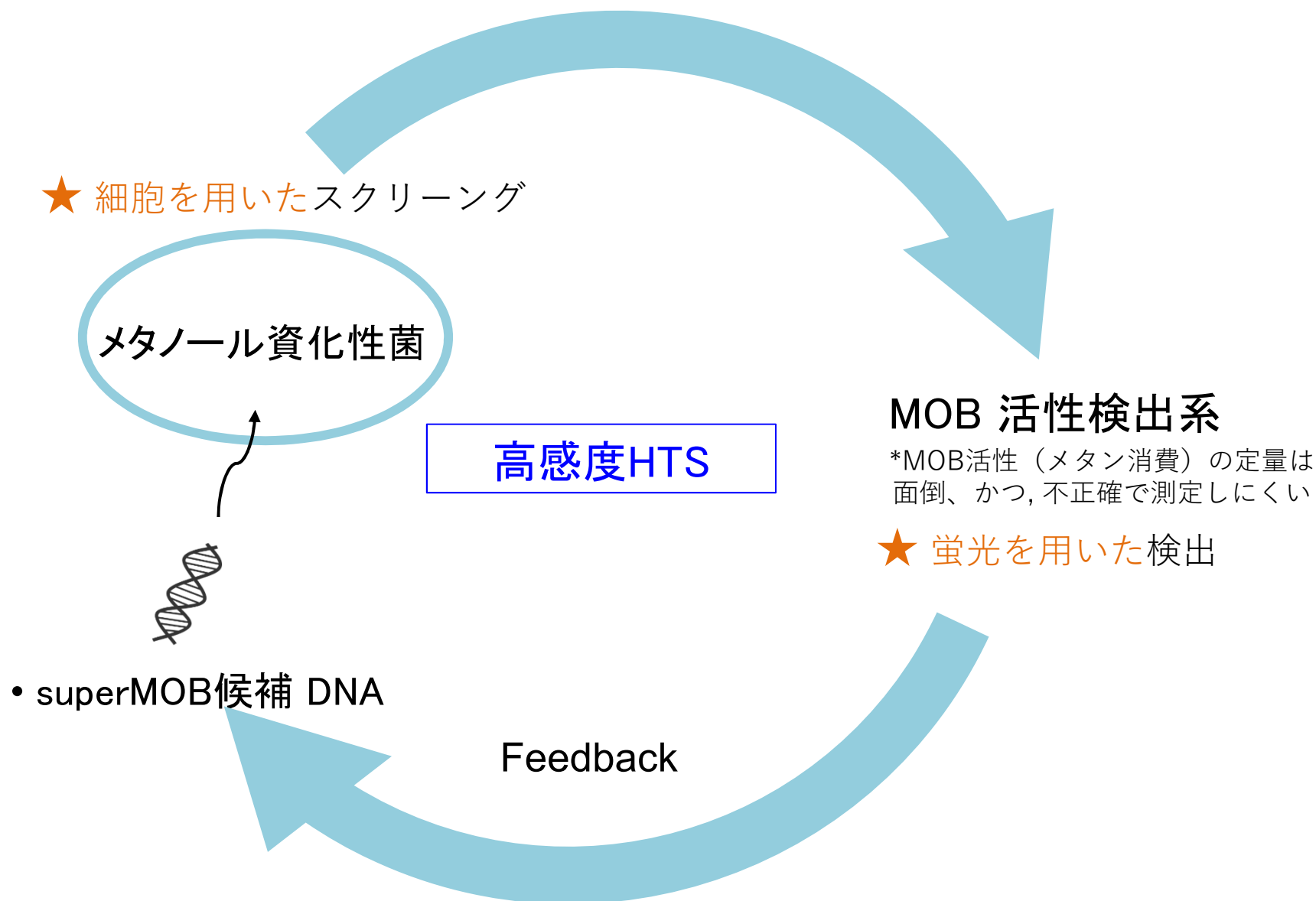
= 基本特許

- FACSを用いた一細胞解析による、メタノール生成活性を指標としたハイスループットスクリーニング系を構築
- 上記技術により、異宿主酵母細胞内でのMOB活性発現に成功
- 遺伝子工学的改変により、触媒活性ならびに折りたたみ効率の高いsuperMOBを開発

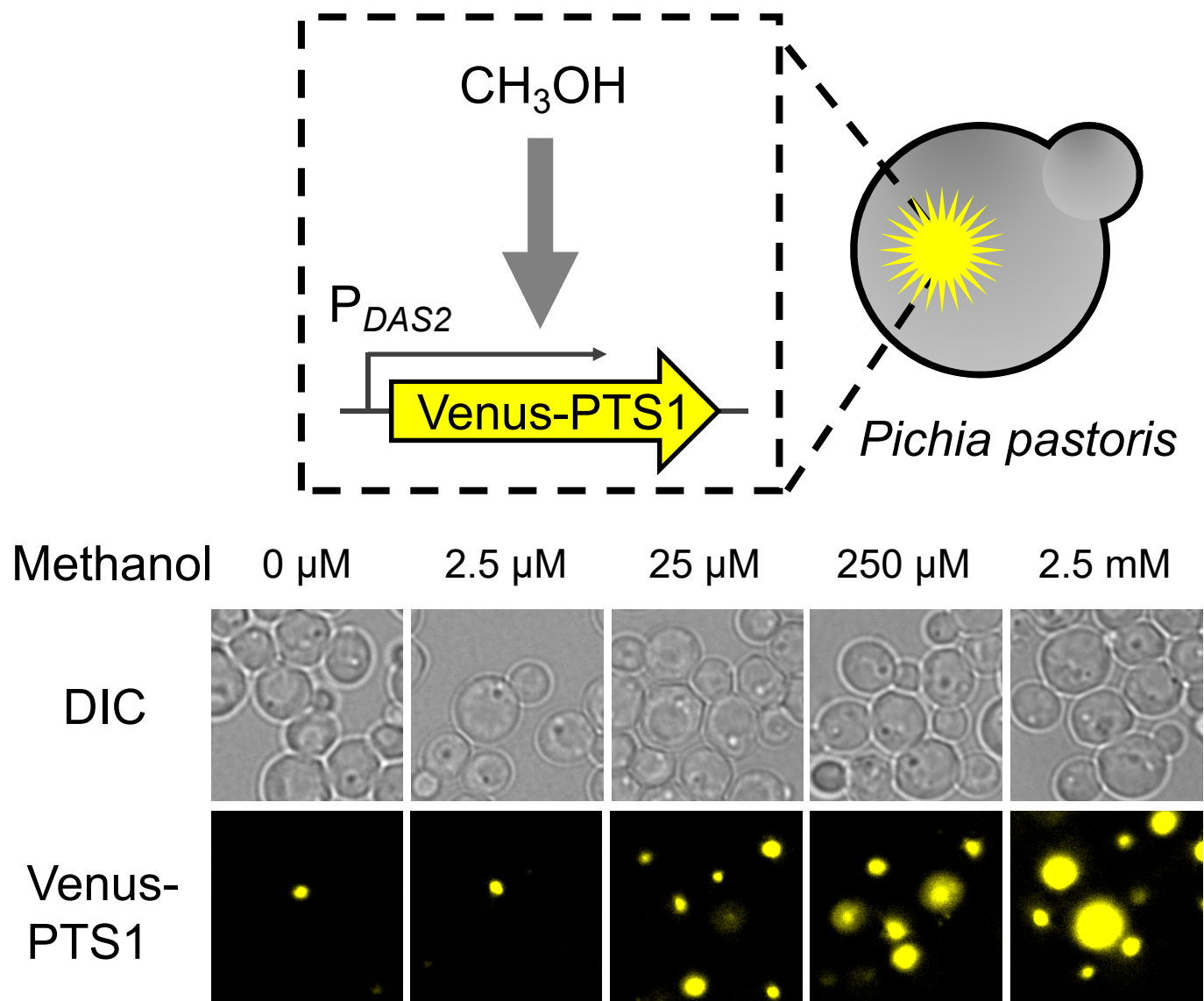
スーパーメタン酸化生体触媒： superMOB (Methane-oxidizing biocatalyst) のもつ3つの特徴



superMOB の開発戦略



C1 酵母 メタノールセンサー宿主細胞



(YPD (glucose medium) $\rightarrow$ methanol medium for 4 h)

一細胞レベルでの触媒活性評価とハイスループットスクリーニング

“細胞触媒”

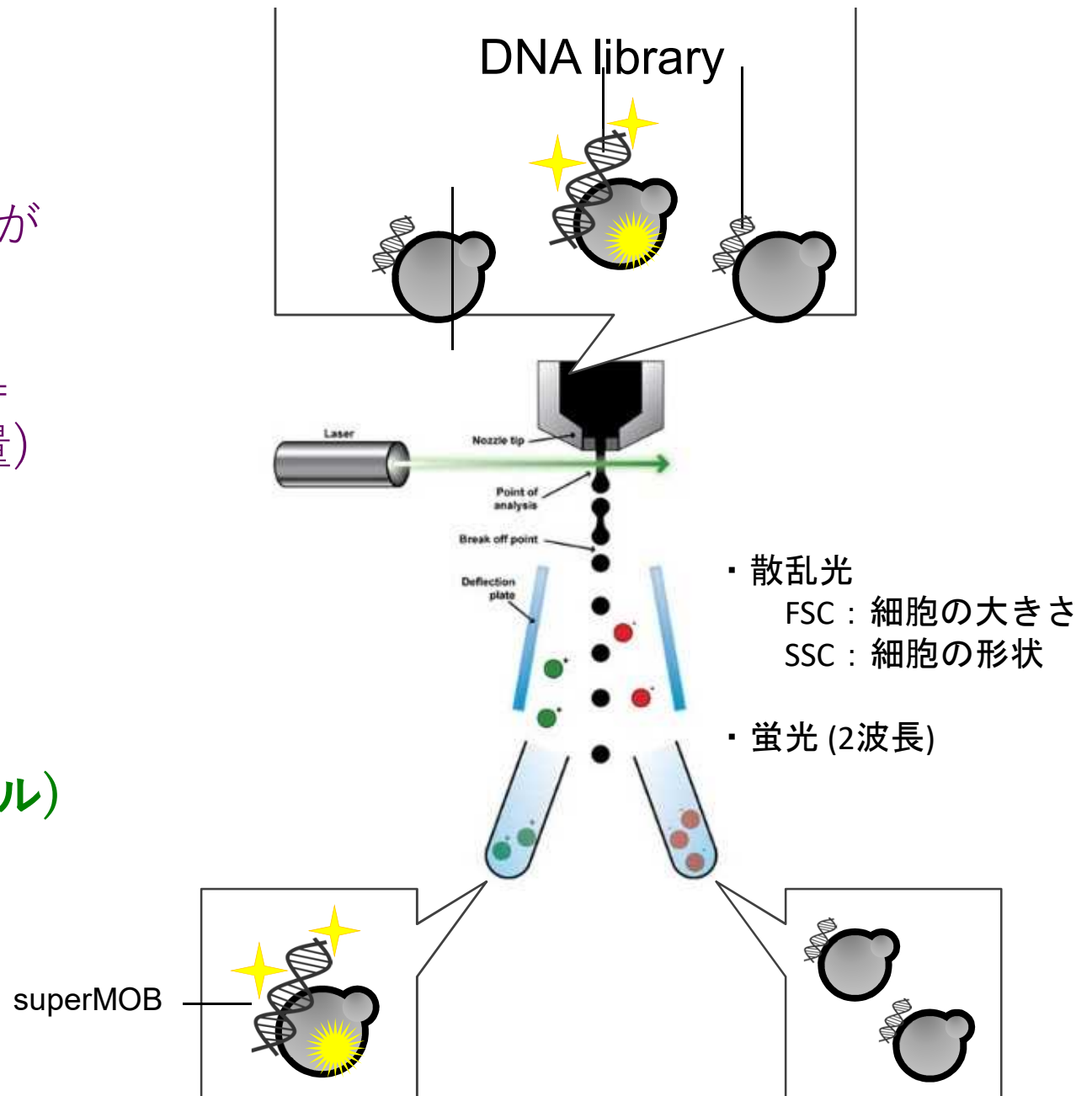
1種類のDNA配列をもつ1細胞が
1本の試験管

1細胞触媒活性 (蛍光強度) =
MOB (触媒活性) x (生産量)
(superactive) x (superfolder)

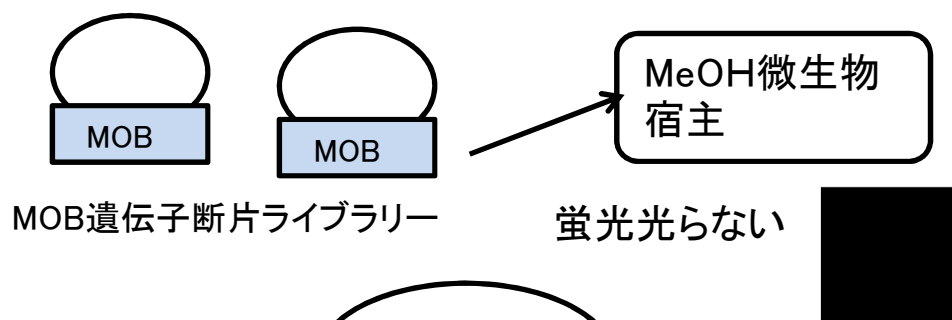
FACS導入により

- ・ハイスループット
- ・MeOH検出感度 (μ Mレベル)

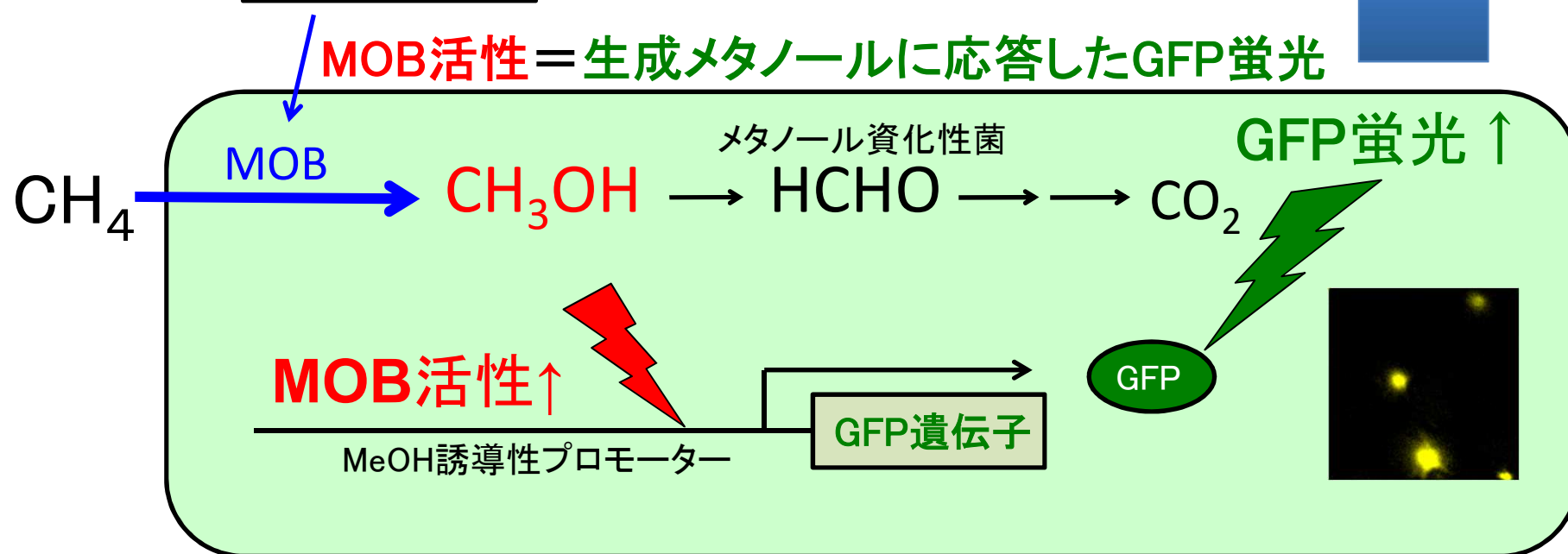
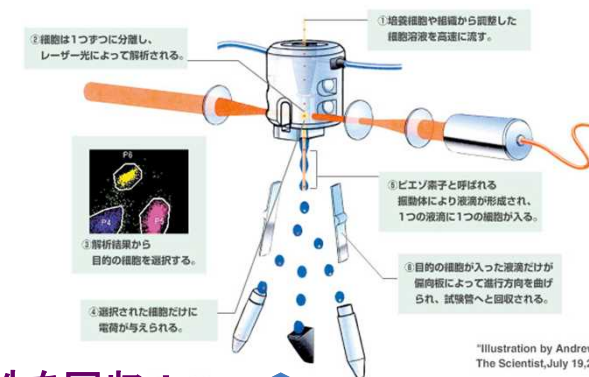
Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)



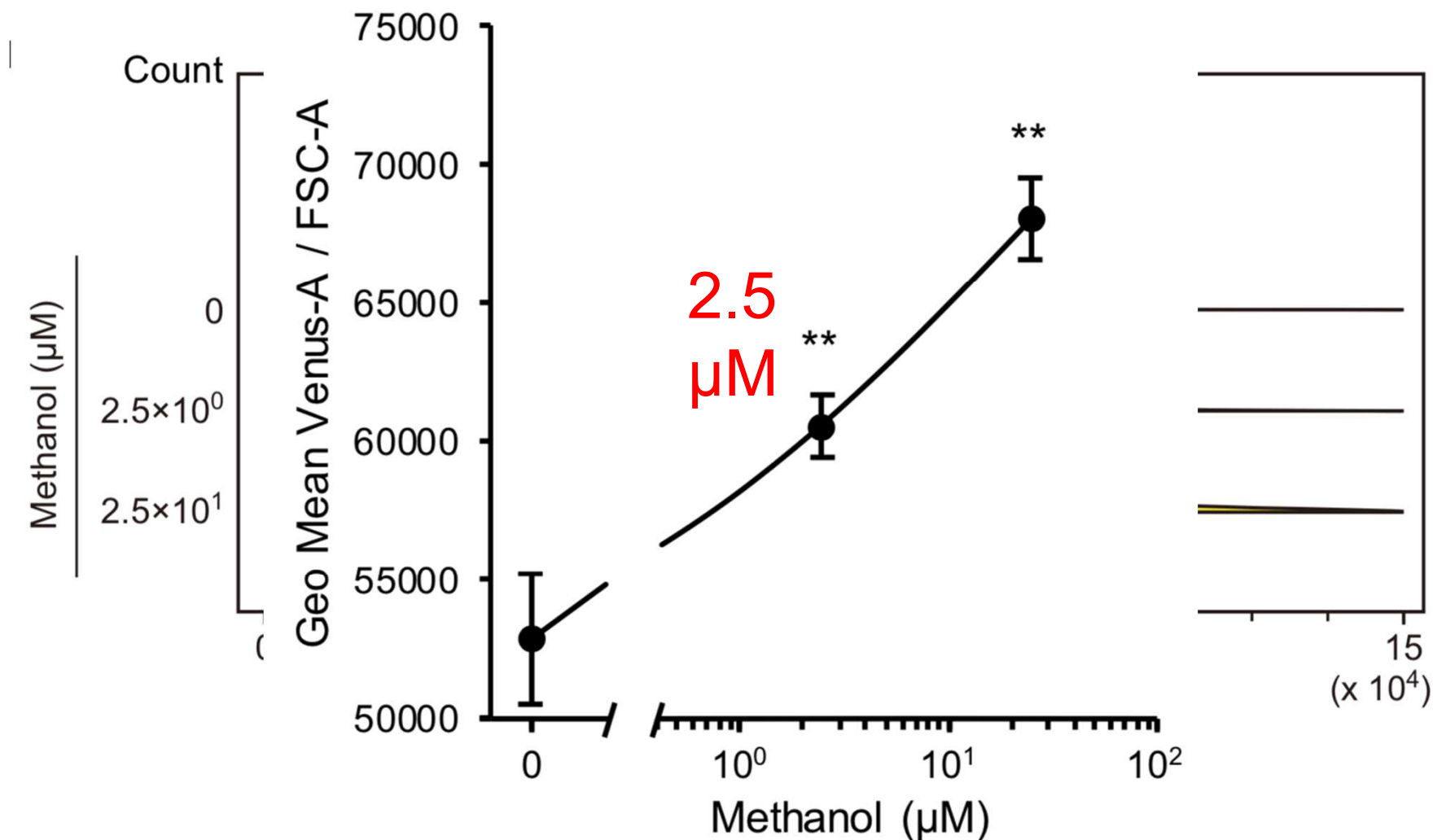
メタノール資化性菌蛍光細胞の一細胞FACS解析による MOB活性を指標としたハイスループットスクリーニング



セルソーターで
高活性MOB発現株を回収！



C1酵母メタノールセンサーの感度

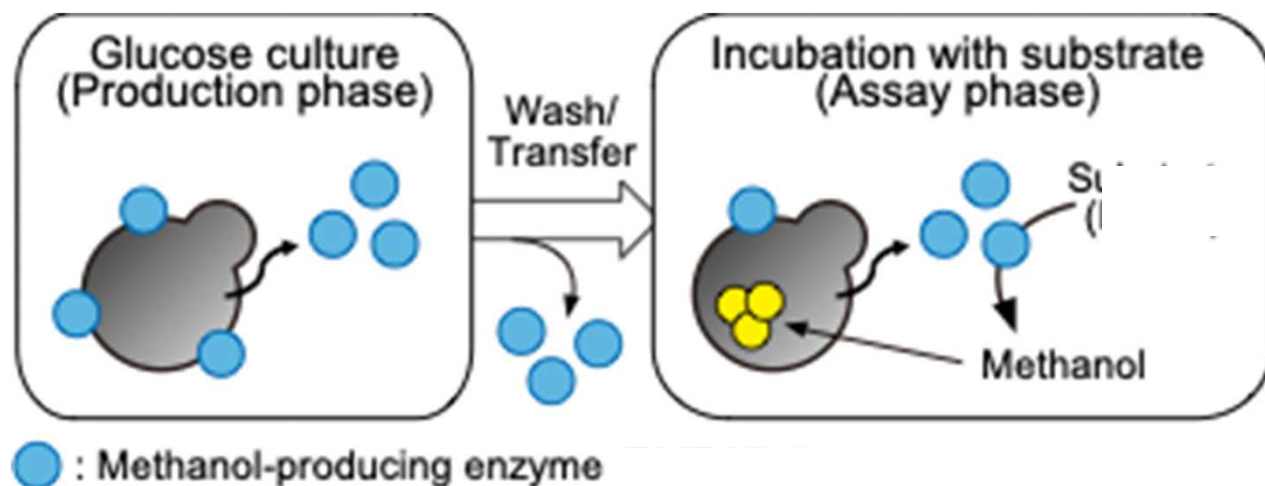


メタン酸化生体触媒組換え体の活性評価と 高活性細胞の選別

酵素生産

メタン添加による反応

生成MeOHによる
蛍光タンパクの誘導



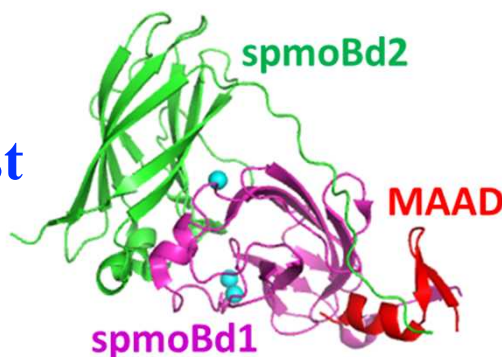
(4h)

FACS

高活性細胞の選抜

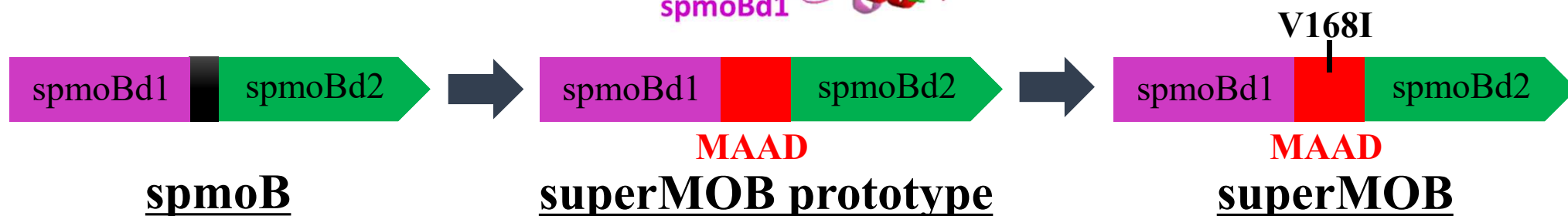
メタノールセンサー細胞を宿主として創製したsuperMOB

MOB:
Methane-oxidizing biocatalyst

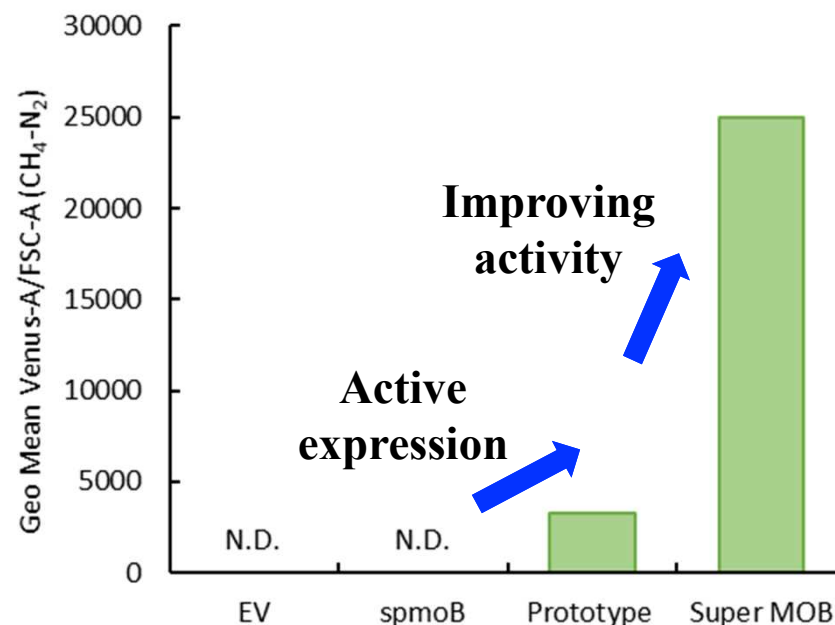


Methylovulum miyakonense HT12
(20-30°C)

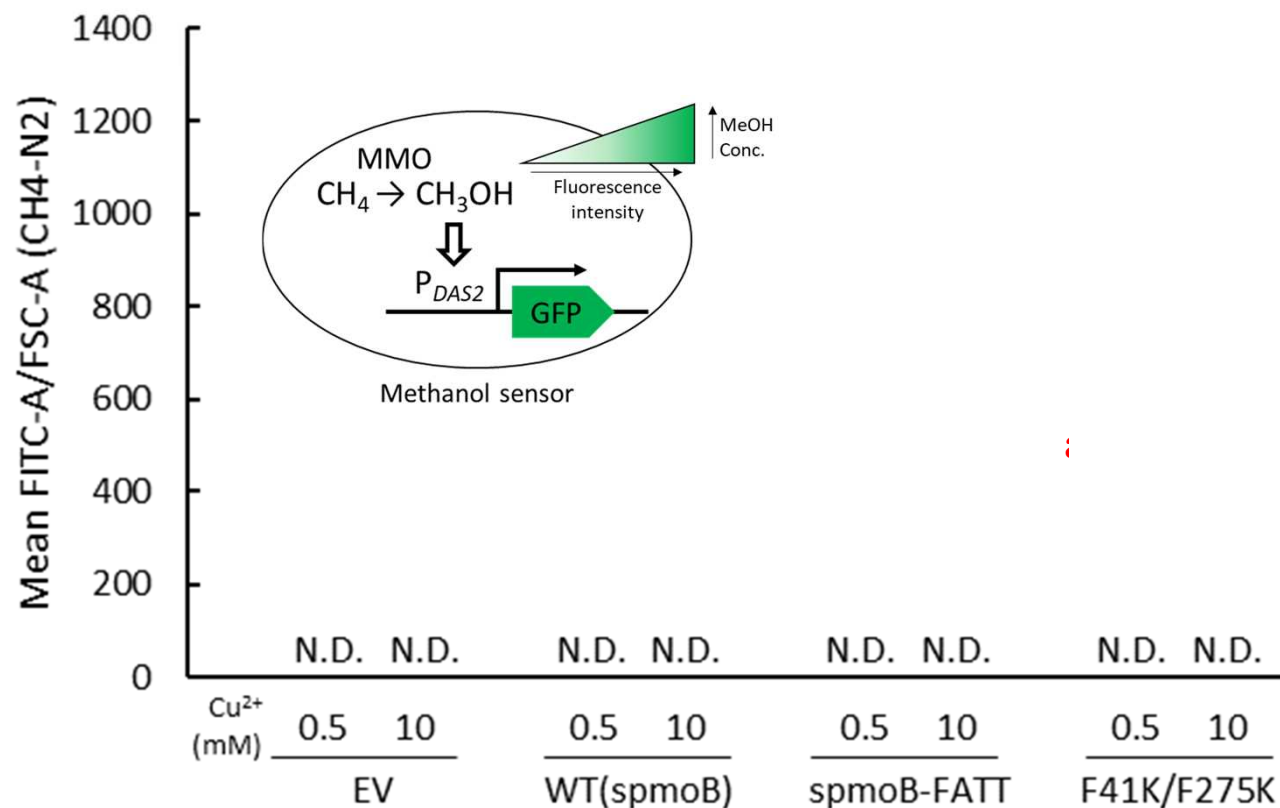
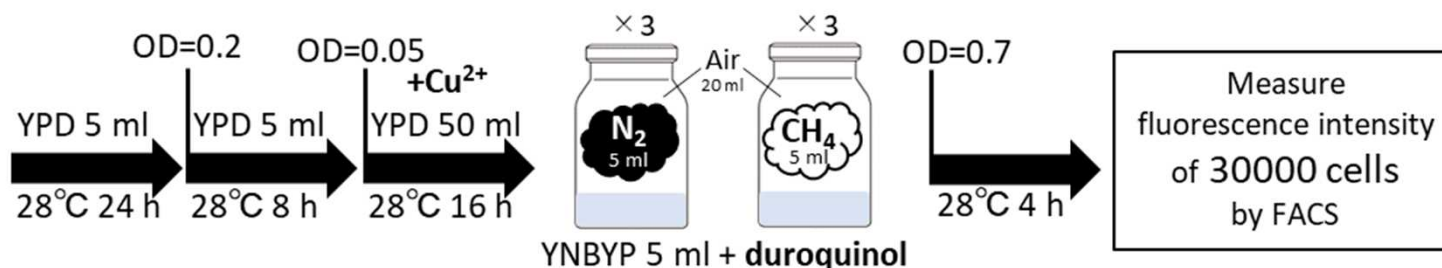
Methylococcus capsulatus Bath
(45-60°C)



MAAD:
MOB-activating pmoA domain

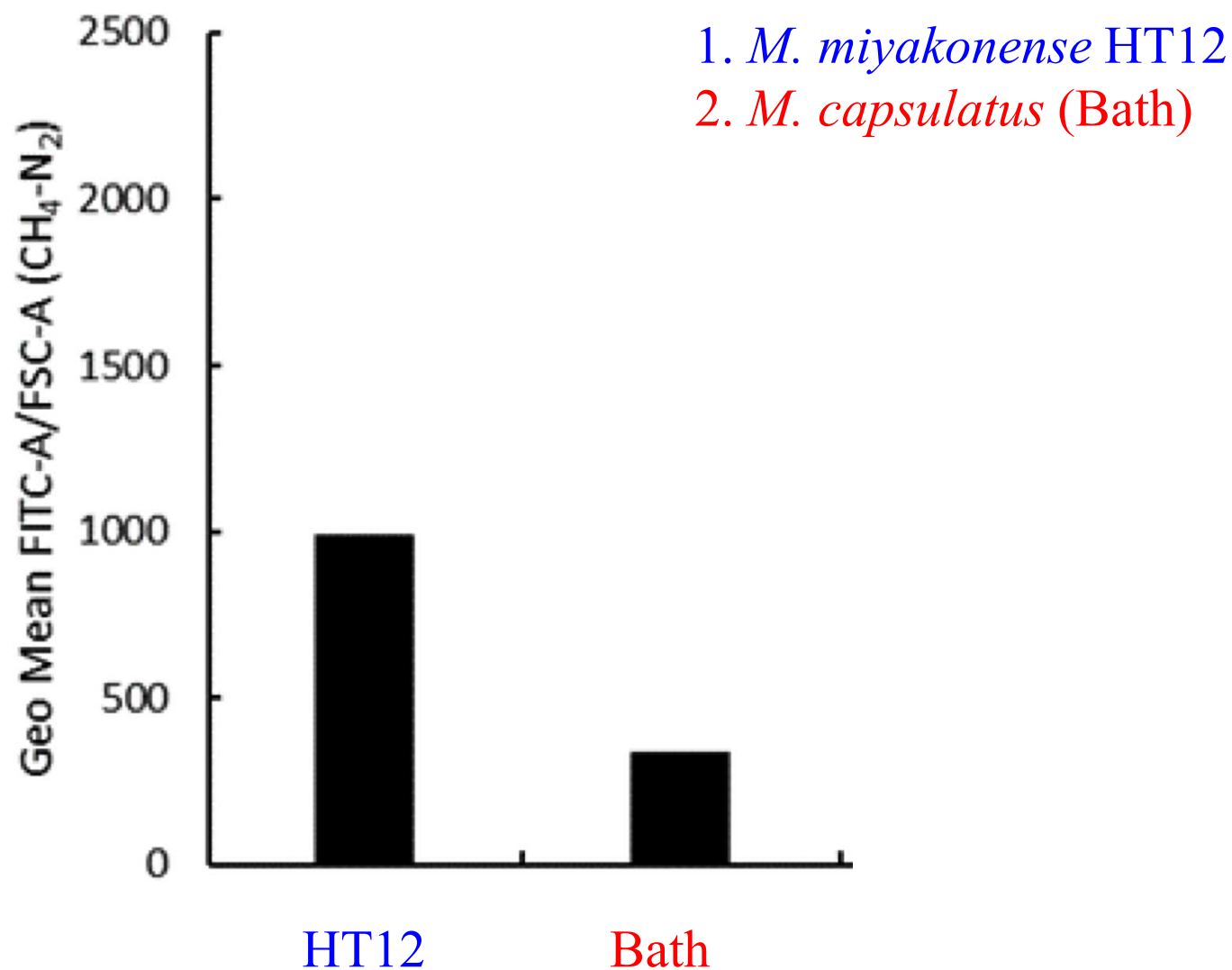


メタン酸化活性評価(FACS)

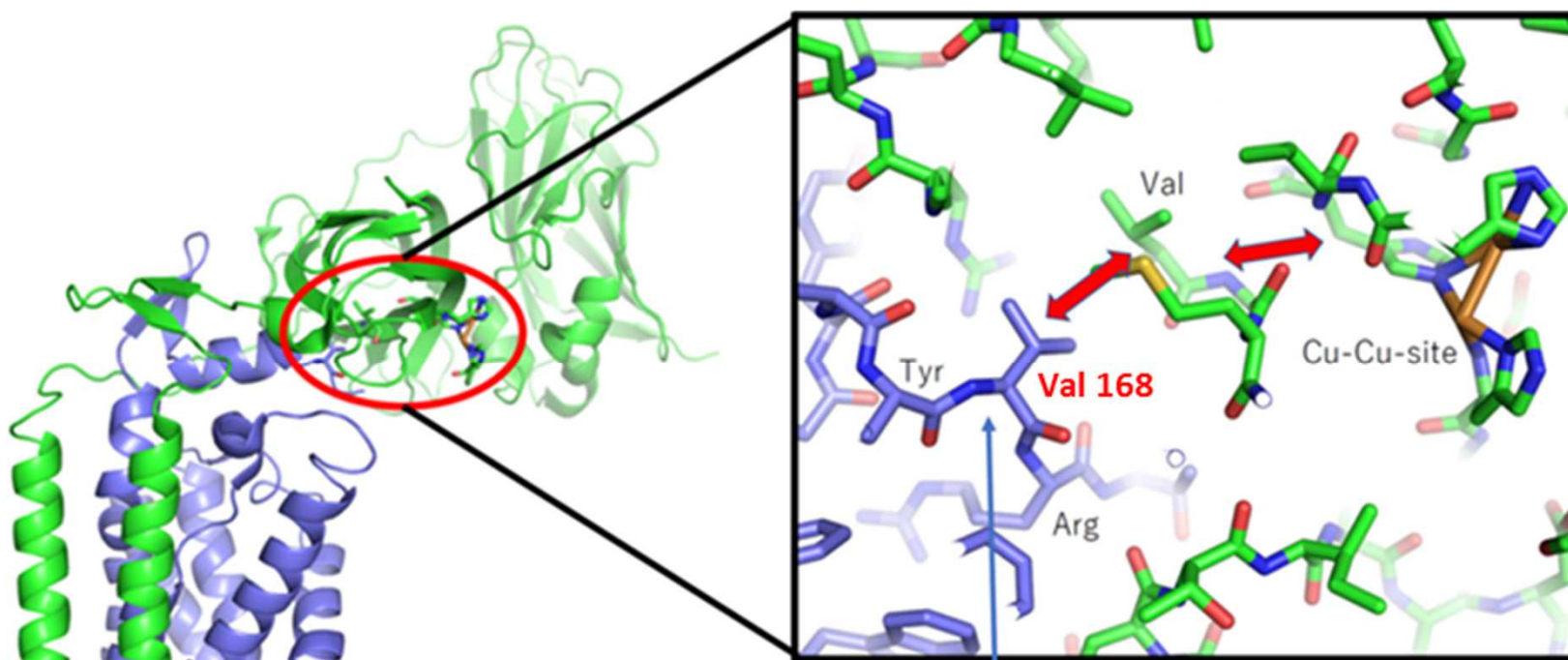


+ folder

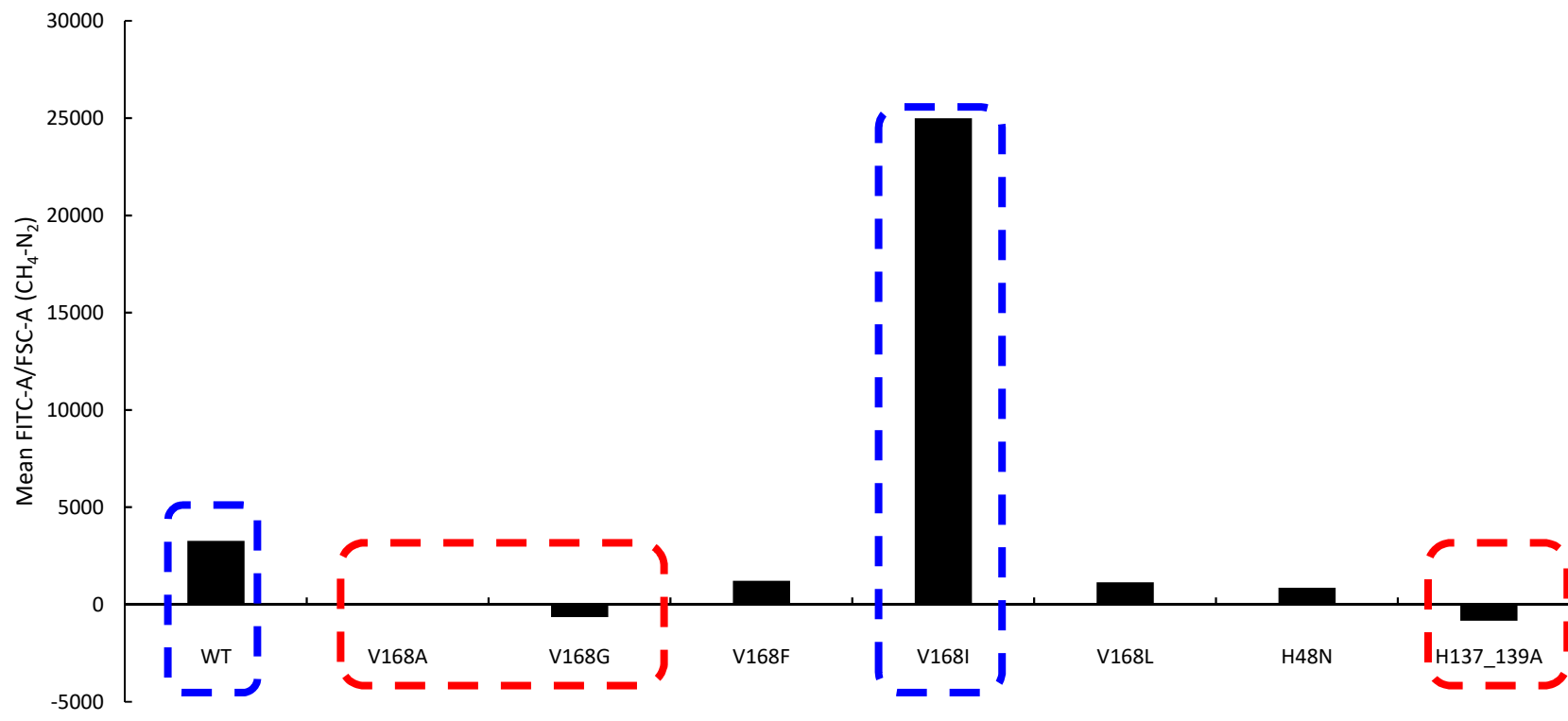
superMOB prototype メタン酸化活性評価(FACS)



MAAD 配列 触媒部位に近い Val168の変異

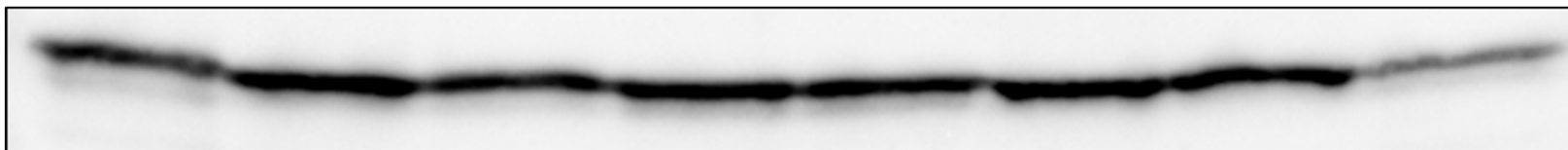


superMOBプロトタイプ変異体 メタン酸化活性評価(FACS)



superMOB prototype

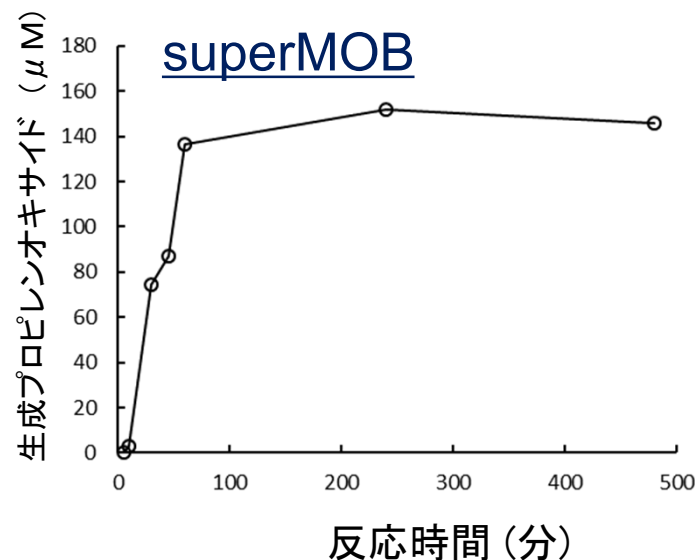
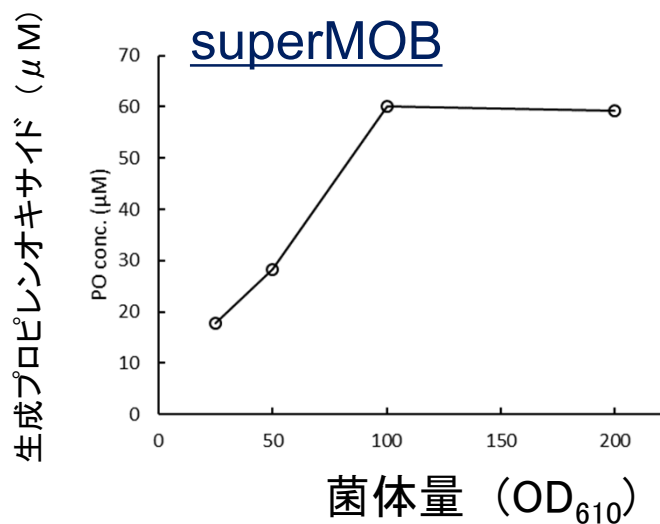
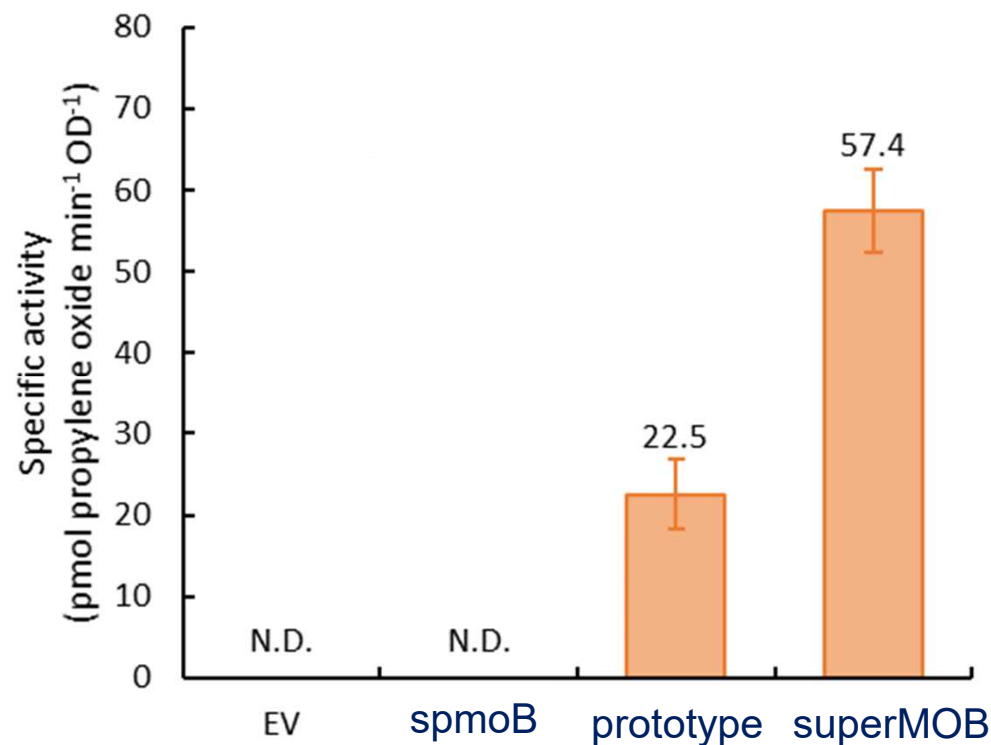
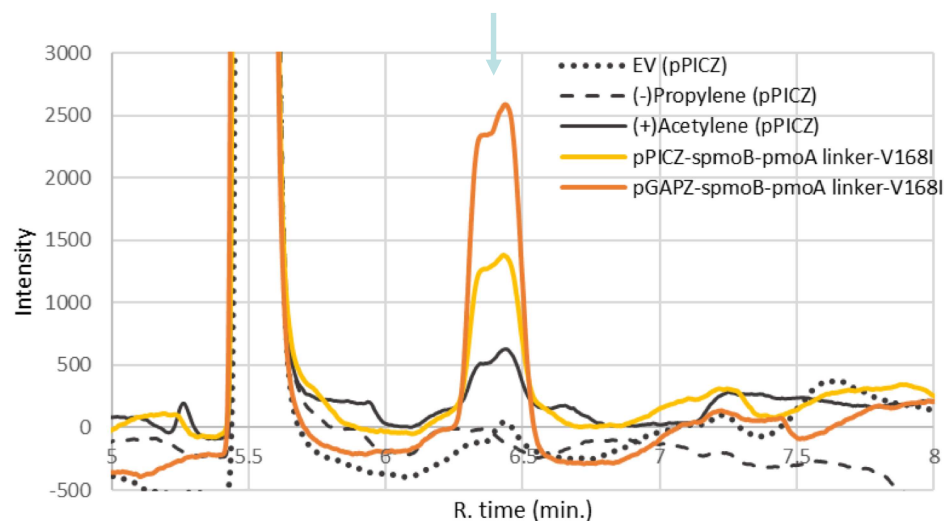
western
(Anti-His)



V168I変異によりメタン酸化活性が顕著に上昇

V168A, V168G, H137_139A 変異では、メタン酸化活性が消失

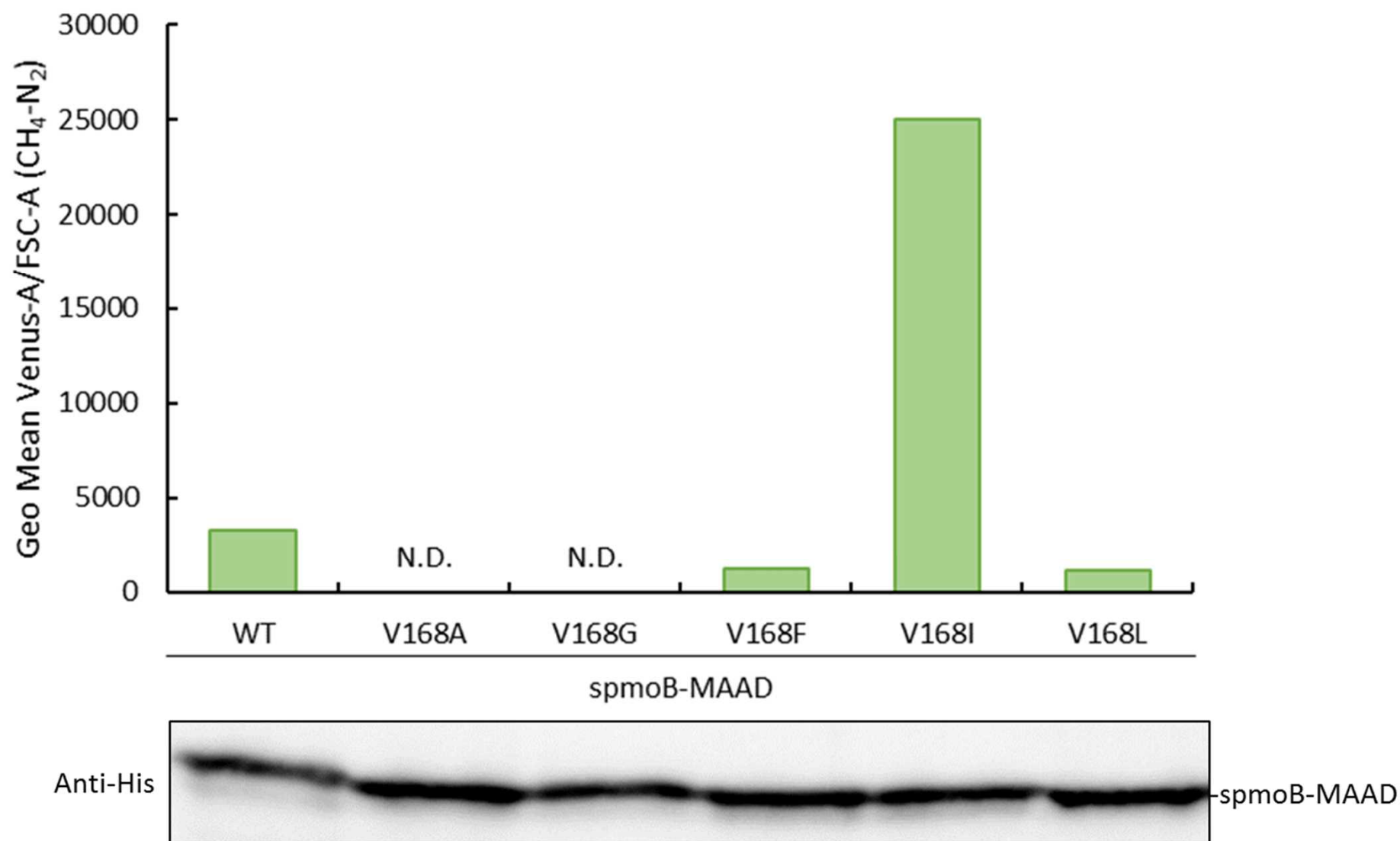
superMOB細胞触媒プロピレン酸化活性



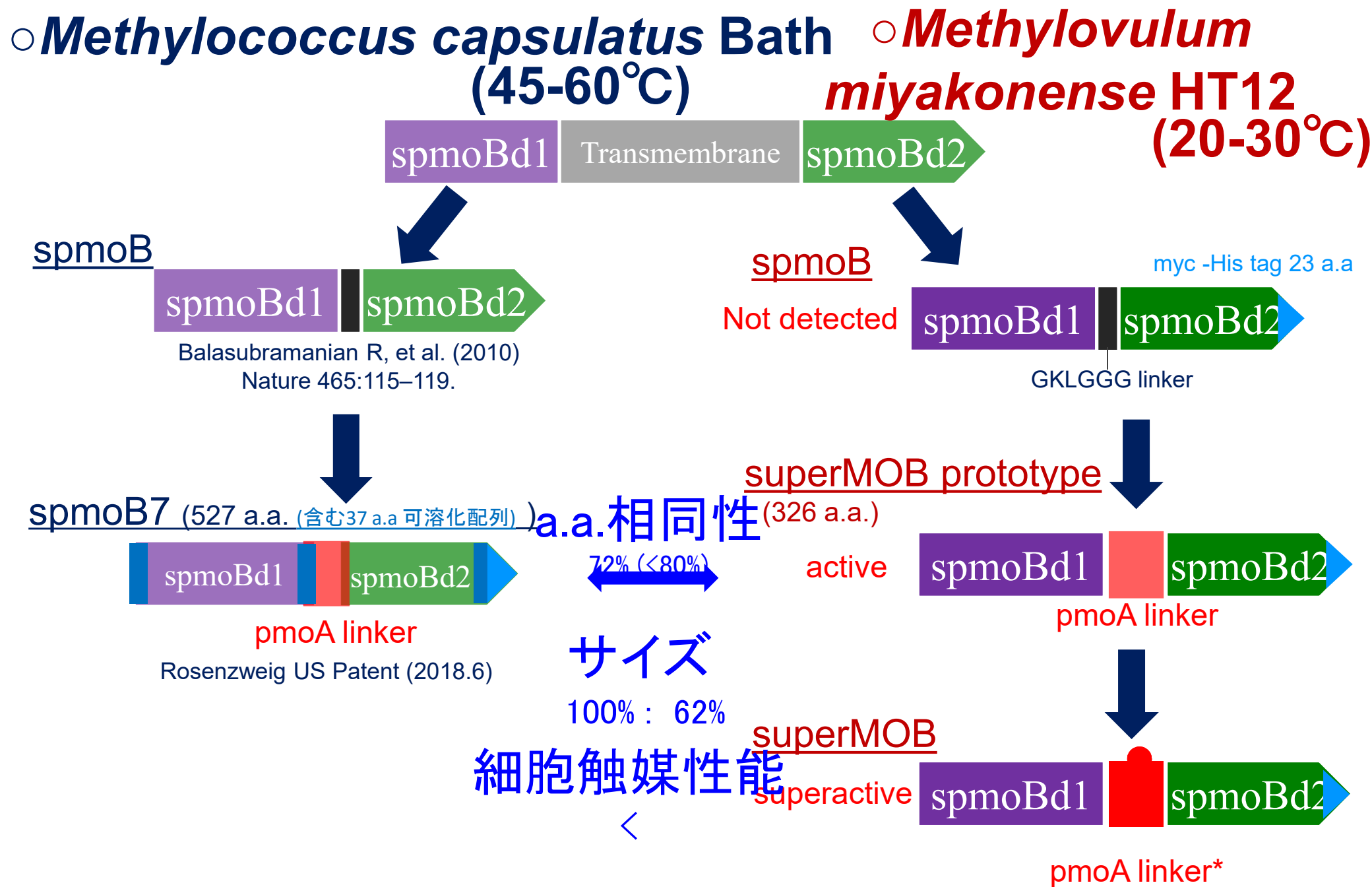
実用化に向けた課題

- C1酵母を用いてFACSによる一細胞解析を用いた高活性メタン酸化生体触媒のスクリーニング系を確立、直接活性発現が可能なsuperMOBを開発済み。これまで確立した一細胞解析とFACSを利用した、高活性・高生産性をもつsuperMOBの探索が可能となった
- 実用化に向けて、さらなる触媒活性の高活性化と発現量が向上するための菌体調製法および培養技術を確立する必要がある
- メタン・プロピレン以外の炭化水素化合物を対象にした有用な酸化反応についての実証が必要

メタノールセンサー細胞を宿主としたsuperMOBの開発



superMOBの創製 (1)



企業への期待

- 化学プロセスの中でも、特に炭化水素酸化反応について興味、技術を持つ、企業との共同研究を希望
- アルカン・芳香族など、炭化水素化合物 のアルコール、オキサイドへの精密な酸化反応について、検討が可能な企業への本技術の導入が有効と思われる
- 共同研究で各企業で興味ある基質を試します！

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 活性発現する炭化水素酸化生体触媒
- 出願番号 : 特願 2019-036229
- 出願人 : 京都大学、北海道大学
- 発明者 : 阪井康能、由里本博也、寶関 淳、
緒方英明

産学連携の経歴

CREST

- 2015.12月 ～ JST CREST 事業 に採択 (～2021.3.)
多様な天然炭素資源の活用に資する革新的触媒と創出技術
(革新的触媒]
研究総括: 上田 渉

“合成生物学によるメタン酸化生体触媒の創製”
研究代表者: 阪井康能

問い合わせ先

国立大学法人京都大学内
関西ティー・エル・オー株式会社
京大事業部門 技術移転チーム
井下 陽平(いのした ようへい)

TEL 075-753-9150

FAX 075-753-9169

e-mail inoshita@kansai-tlo.co.jp