

進化分子工学によるデザイナー炭化水素生合成経路の開発

早稲田大学先進理工学部応用化学科

梅野 太輔

Squalene and squalane are compounds in demand in many industries, from ointments, health foods, special lubricants, nutrients and pharmaceuticals to biofuels, as well as in many cosmetics as a skincare ingredient due to its excellent emulsifier performance and outstanding stability. Highly efficient and stable microbial production is required as a highly efficient and sustainable supply method for these compounds. However, squalenes maintain a large C₃₀ skeleton, and the cells had to be disrupted to extract the squalene from the cells, resulting in the contamination of countless impurities in the extract. In this study, we developed a system to synthesise mini-squalenes was created, for enabling the hyperproduction of squalene-like compounds via continuous extraction and the creation of novel squalene alternatives possibly with the better quality as cosmetic ingredients.

1. 緒言

スクアレンは、我々の表皮脂質の5~15%を占める炭化水素成分であり、単にコレステロールなどの生理活性テルペンの生合成原料となるのみならず、それ自身に積極的な役割があることがわかっている。我々の皮脂腺からは、一日およそ100~500mgものスクアレンが分泌され、汗腺からのその他の分泌物と乳化して皮膚表面を保湿し、肌のなめらかさの保持に役立っている。これらは化粧品素材として保湿クリームなどに使われるだけでなく、各種健康食品素材としての需要がある¹⁾。さらには、インフルエンザウイルスのアジュバンド(免疫賦活剤)として、1shotあたり1mgのスクアレンが使用されている²⁾。また、スクワレンを水素還元して得られるスクワランはさらに需要が高い。そもそもスクアランは、第二次世界大戦中に日本軍が寒冷地での戦車・戦闘機の潤滑油として用いたのが工業規模での利用のさきがけであるという¹⁾。戦後は、時計やカメラのシャッター用潤滑油として民需使用されるようになったが、その皮膚への親和性・良好な展伸性と低温特性、さらには保湿性に優れることから、化粧品への応用展開が一気に進むことになった。今では、バスオイル、ヘアケア製品、メイクアップ剤、リップスティック、日焼け剤、ボディパウダー、ネイルケア製品など、コスメ・スキンケアに関連する無数の製品に0.1~50%程度の含有量で含まれるに至っている。さらにスクアレン・スクアランは、完全なる炭化水素であるため、その燃料特性にも優れており、SAF

(Sustainable Aviation Fuel)として大量生産する挑戦も始まっている。化粧品産業はもちろん、医療・健康食品・潤滑油など、産業需要の高いスクアレン・スクアランの年間需要はすでに数千トン(マーケットサイズは200億円)を超える³⁾。燃料用途のスクアレンの実用生産に目処がつけば、その需要規模は青天井に成長するに違いない。

このように需要の高いスクアレン・スクアランであるが、その持続可能な供給は脅かされている。主な供給源の一つは深海ザメの肝油であるが、毎年、おびただしい数(~1億匹といわれる)のサメがスクアレンのために乱獲されており、動物愛護の立場から、多くの企業が肝油由来スクアレンの使用中止を宣言し始めている。さらに海洋汚染のため、最近では、肝油に種々の有害物質が検出されるケースが増えはじめている。また、植物スクアレンの多くはオリーブなどの可食植物に由来するうえ、その含有量が気候によって大きく変動するため、安定な供給源にはなり得ない。また植物スクアレンはパラフィンなど他成分とともに抽出されるため、高純度のスクアレン・スクアラン源とも言い難い。このような背景のもと、スクアレンの持続可能で夾雑物の少ない新たなリソースとして微生物生産への期待が高まっている。Amyris社をはじめとする合生成物学ベンチャーは、スクアレン合成経路を導入した大腸菌や酵母などを徹底的に育種し、産業要請の一部(2013年実績でおよそ需要の20%)に応えつつあるが、その高い分子量(炭素骨格30、分子量411/423)とロウのような油性(沸点285/417℃)によって、高い膜蓄積性を示し、細胞を破碎せずに取り出すことが困難である。その結果、膜蓄積容量を超える生産はできないという重大な問題によって、その直接の微生物生産は困難である⁴⁾。ファルネセン(C₁₅骨格)程度の炭化水素の場合は、微生物の培養液に、有機溶媒(ドデカンなど)を上層するだけで、連続的に抽出しながら生物生産が可能となるため、~100g/Lを超える生産が可能となる⁵⁾。前出のAmyris社は、半分の分子量を持つ直鎖状テルペン(フ



Directed evolution of pathways for non-natural squalenes

Daisuke Umeno

Dept. Applied Chemistry, Waseda University

アルネセン)を微生物生産し、これらを化学触媒プロセスで縮合してスクアレンを供給している。

私たちは長年大腸菌でのスクアレンの高効率生産に挑んできたが⁶⁾、株の生産力の向上とともに、その蓄積毒性は顕著となり、ある程度以上の生産は宿主致死に至ることが明らかになった。その原因はひとえに、大きすぎる分子骨格(C₃₀)にある。そもそも、その優れた油質・保水効果と低刺激性によって長年愛用されてきたスクアレン・スクアランであるが、油というよりは「ろう」に近い物性を持つ。これが本当に化粧品素材としての理想型なのであろうか？その分子量をもう少しだけ小さくすることができれば、流動性がより高く、かつスクアレンと同等の油質・保水効果を示す、全く新しい化粧品素材が開発できるのではないかな？

最近我々は、スクアレン合成酵素の近縁酵素であるフィトエン合成酵素(カロテノイド色素の原料骨格合成酵素)を特異性変換し、イソプレナムユニット1つぶんだけ小さい骨格を持つC₂₅カロテノイドを大腸菌に生合成させることに成功した。すると驚くことに、その化合物は、C₃₀やC₄₀骨格を持つ天然カロテノイドと異なり、大腸菌を破碎することなく、培養液に上層したドデカン層に連続的に抽出されてくることになった⁷⁾(Fig. 1)。フィトエンと構造が酷似しているスクアレンも、その骨格サイズを小さく変更することによって、肌上での展性や保湿効果をそのままに、その流動性や加工性、さらには微生物生産を可能とする新規化粧品ベース素材となるのではないかな。この着想にもとづき本助成研究では、進化分子工学を駆使して「ミニスクアレン」合成酵素を実際に創出し、実際に大腸菌で生産させることに成功した。

2. 方法

2.1. ミニスクアレン合成酵素の創出

バイオ燃料の分野でもスクアレンは注目されているが、実際に燃料として使うためには、クラッキングによって

低分子化されることになる。エネルギー負荷の高いこのクラッキングプロセスを避けるため、多くの研究者が「小さいな(<C₂₅スクアレン)」の生合成に挑戦したが、これまで誰も成功していない。理論的には、スクアレン合成酵素(Squalene synthase, SQS)の反応ポケットの形状を再デザインし、より小さな基質に最適化すれば、C₂₅スクアレンを合成できるSQS変異体の創出は可能であろう。しかし色素前駆体であるフィトエンの場合^{8,9)}と異なり、スクアレンは分子量にかかわらず無色透明であり、それを前駆体とするホパノイドやステロイド類も無色であるため、スクリーニングの手立てがなかった。立体構造情報が豊富なヒト由来のSQS(hSQS)と中度好熱性シアノバクテリア(Thermocynechococcus)由来のSQS(tSQS)の2つを出発点とし、Fig. 2に示す3工程によって実験室内で「進化」させてC₂₅構造を持つスクアレン合成酵素を創出することを試みた。

具体的な工程を概説すると、以前の我々の発見¹⁰⁾に基づき、tSQS/hSQSのNADHからの電子供与能を奪うアミノ酸置換を導入し、カロテノイド前駆体デヒドロスクアレン(DSQ)型の生産物を与える酵素変異体に変換する(工程①)。こうして得たC₃₀-DSQSの反応ポケットにランダムなアミノ酸置換を遺伝子レベルで導入し、そのサイズ特異性の多様化を図る。我々は最近、C₂₅骨格を持つフィトエンを前駆体としたときのみ、蛍光性の色素を与える不飽和化経路を開発した⁷⁾。この系を使い、C₃₀ではなくC₂₅カロテノイドを合成する変異体を探索する(工程②)。最後に、こうして得られたC₂₅-DSQS変異体から工程①で導入した変異部位を野生型に戻し、還元能を復活させてC₂₅-SQSを得る(工程③)という作戦である。

2.2. ミニスクアレンの大腸菌生産と抽出特性の調査

得られた変異体は大腸菌にプラスミド発現させ、培地の体積の20~50%のドデカンを上層したかたちで30~37℃で24~48時間振盪培養した。その後、細胞外に抽出し得

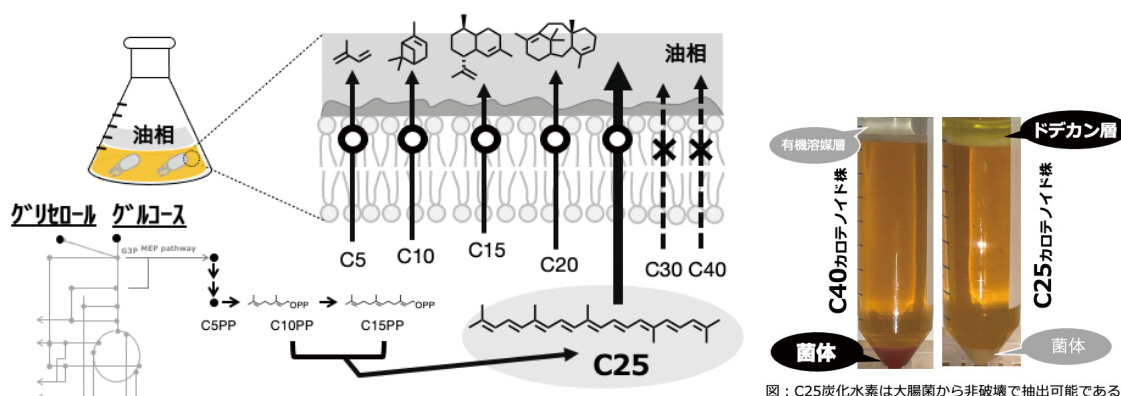


Fig. 1 大腸菌は C₂₅ カロテノイドを放出する～ C₂₅ スクアレンも同様と期待される

たスクアレン類は、培地を遠心し上澄として現れるドデカン画分から、細胞残留したスクアレン類は、遠心時に得られる細胞ペレットを回収し、アセトン抽出→ヘキサン/水二相分配させたヘキサン画分から回収した。

3. 結果

3.1. ミニスクアレン合成酵素の創出

我々は、中度好熱シアノバクテリア *Thermocynechococcus* 由来の tSQS の活性を落とさずその還元能だけを奪う変異⁷⁾を見出している。そのような変異のひとつ V314A (314 番目の残基をバリンからアラニンに変換する変異) を導入した tSQS 変異体を作出したところ、首尾よく C₃₀-DSQ 合成酵素として振る舞うことが確認された。この変異体を発現する大腸菌にカロテノイド不飽和化酵素 CrtI を追加発現すると黄色いコロニーを与えた。この酵素は、C₃₀-DSQ を 3~4 ステップ不飽和化し、大腸菌に蓄積する¹¹⁾。Fig. 2 の工程①が首尾よく成功したことになる。

この tSQS 変異体を親として、遺伝子全域にランダムな変異を様々な方法で導入して遺伝型を多様化した。得られた tSQS ライブラリを、CrtI を共発現する大腸菌に導入したところ、ほとんどの変異体は親と代わり映えない黄色コロニーを与えたが、数割のコロニーは白いコロニーを与えた。これらはランダム変異によって tSQS の機能あるいはフォールディング能が損なわれた「dead mutants」である。そしてこれら有象無象の中に、わずかに蛍光性を示すコロニーが見られた。我々はこの蛍光性変異体を単離し、次の世代の親と定め、さらなるランダム変異導入(遺伝型の多様化)に供した。このサイクルを 3 世代にわたって右

繰り返す、CrtI 共発現によって高い蛍光性を示す tSQS 変異体を得ることができた(工程②: C₂₅-DSQ: Fig. 3a左)。この変異体は全く C₂₅-SQ を合成しなかったが、工程①で導入した 314A 変異を元のアミノ酸(V)に戻したところ(工程③)，得られた変異体は、細胞内で C₂₅-SQ を主生成物として与えることがわかった(Fig. 3a右)。自然界の SQS は種を問わず厳密に C₃₀ 骨格のスクアレンを合成し、ホパノイドやステロールなど、50,000 超ものトリテルペンはすべて、この C₃₀-SQ から生合成される。本研究は、3 段階の進化工程を経て、世界で初めて「ミニスクアレン」の生合成に成功した。

我々は、ヒト由来の hSQS においても、ミニスクアレン合成酵素化を試みた。hSQS は高血圧創薬標的であったこともあり、多くの X 線結晶構造が取得されている。しかし tSQS と異なり、hSQS には、NADPH の結合がなければ縮合が完結しない独特な「仕掛け」が埋め込まれているため、単に C₃₀-DSQS 化する変異を導入するだけでは、全体活性が大きく下がってしまう¹⁰⁾。そこでこの酵素については、構造情報を参考にした部位だけを特異的なランダム化を集中的に導入し、工程②(C₂₅ 骨格合成能の蛍光選抜)によって、C₂₅-DSQ 型の変異体を得た(Fig. 3a左)。得られた変異体から、工程①で導入した NADPH 結合性を奪う変異のキャンセル(工程③)を行ったところ、hSQSwt の 40 倍もの C₂₅-SQ 合成ができる変異体の獲得に成功した(Fig. 3b右)。

3.2. ミニスクアレン合成酵素の連続抽出培養

こうして獲得した C₂₅ SQS を大腸菌に導入し、ドデカン

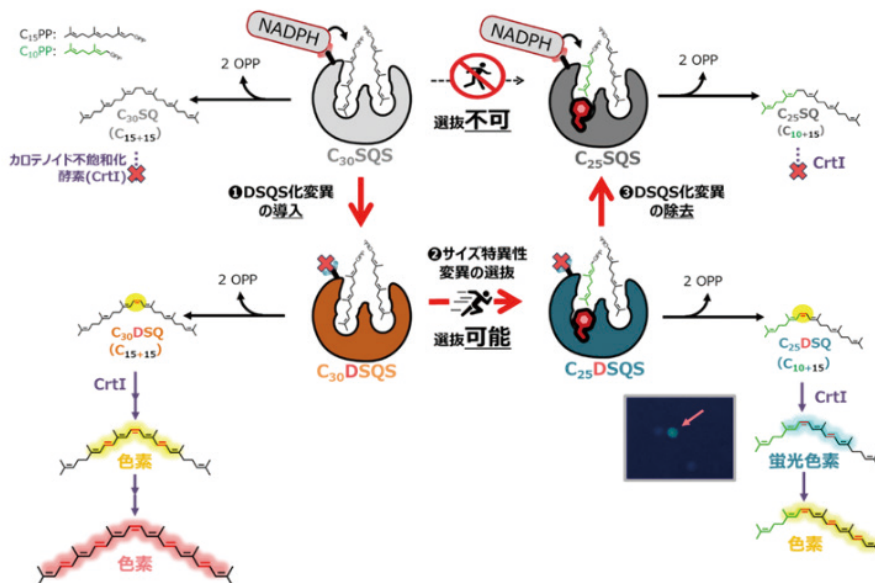


Fig. 2 急がばまわれ? ミニスクアレン合成酵素を創出する「進化工程」

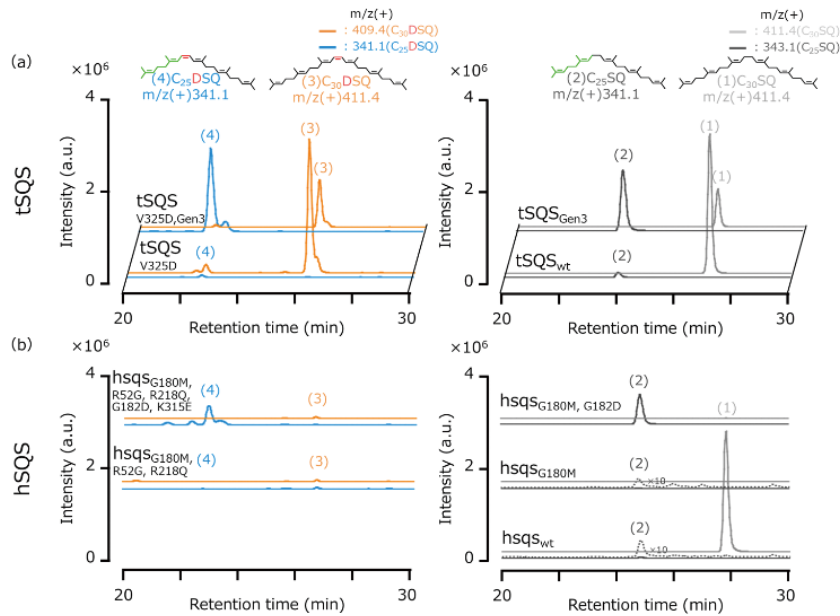


Fig. 3. tSQS および hSQS のサイズ変異体

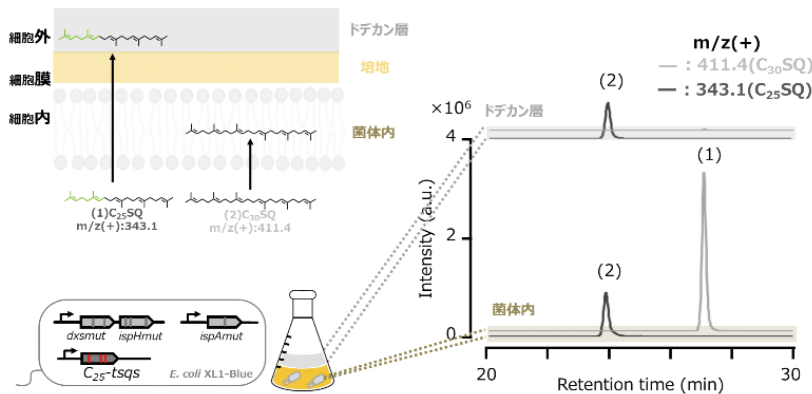


Fig. 4 C₂₅SQ の膜透過性検証

を上層したまま培養を行った。C₃₀SQは膜蓄積するため細胞ペレット画分のみ見られたが、C₂₅SQは上層したドデカン層にみられた (Fig. 4)。期待どおり、直鎖状C₂₅-SQは細胞外に抽出することが可能であることが本系でも追認された。

3. 3. もうひとつの反応特異性・分岐型スクアレンの合成

炭化水素の油質を決める主要素として、分子サイズと不飽和度が知られるが、これに加えて、分岐の有無という構造要素も重要である。SQSは2分子のC₁₅PPを還元的に縮合して直鎖状のC₃₀SQを合成する酵素であるが、我々はhSQSのさらなるサイズ変異体の変更を画策しているうちに、試作したhSQS変異体のひとつが、SQ型でもDSQ型

でもない、新規生成物を合成していることを偶然発見した。この化合物は、C₄₀骨格を持ち、不飽和度はC₄₀-DSQ (カロテノイド原料であるフィトエンと同じ)でありながら、フィトエンの持つ287 nm (3つの二重結合の共役)を持たない。SQSの触媒する反応メカニズムを考慮すると、この新規化合物はC₄₀デヒドロボトリオコッセン (DBo)だと予測した (Fig. 5)。興味深いことに、この変異体は、C₂₀原料 (C₂₀PP)の二分子縮合産物はこの分岐型分子を与えるが、C₁₅原料 (C₁₅PP)の二分子縮合時には、天然型 (直鎖型)のC₃₀SQを与えることが明らかになった。すなわちこの酵素は、同じ酵素の同じ反応ポケットの中で、基質サイズによって2つの異なる縮合形式での炭化水素構造の形成を触媒する極めて珍しい特色を持つ。我々の知る限り、このような「自動仕分け機能」を持つ酵素の報告はない。

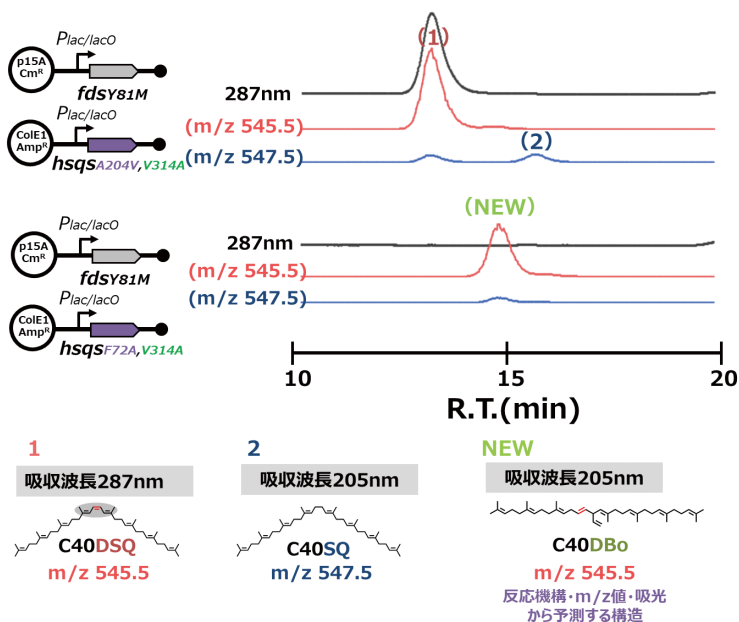


Fig. 5 新規 C₄₀ 炭化水素を合成する SQS 変異体

4. 総括

スクアレンの微生物生産における最大の問題は、細胞からそれを取り出せないことにある。米国ベンチャー Amyris 社は、C₁₅ 骨格を持つファルネセンを連続微生物生産し、これを化学触媒で縮合してスクアレンに変換する、半生物・半有機合成のスクアレン製造方法を実用化し、世界スクアレン需要の 2 割を担うことに成功している。しかしこのスクアレンは完全なる微生物合成ではないため、真の「バイオスクアレン」とは言い難い。本研究では、炭素骨格をあと 5 つぶんだけ間引いた C₂₅ スクアレンは、勝手に大腸菌の外に出てくることを発見した。化学触媒過程を一切排したかたちで、廃糖や廃油などから一段でスクアレン・スクアランを大量合成することができるとしたら、この化合物こそが、唯一にして絶対のフォーマットであると我々は確信している。大量微生物生産に適した改質型・連続抽出可能な「ミニスクアレン」の生合成経路は、イソプレノイド原料供給路を強化した微生物などの併用によって、拡大し続けるエマルジョン型保湿剤需要に応えられる、真に全生物生産な新規化粧品素材となる可能性が高い。また、一過的かつ不規則なパンデミック対応に不可欠なアジュバンドの大量供給体制の整備にも、一役買う可能性がある。さらに、本研究を進展させれば、C₅+C₂₀ や C₅+C₁₅ 型の非天然スクアレンシリーズやその分岐型炭化水素などの生合成が可能となる。軟膏成分やスキンケア素材として、実験室でも自然界でもアクセス不能だった、数多くの新規な物性を持つバイオ化粧品素材のシリーズ開発ができるものと期待される。

謝辞

本研究の遂行にあたって多大なる御支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に厚く御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) 海谷 篤, 天然スクアレン, スクアランの用途と最近の原料事情. 油化学, **1990**, 39 (8), 525-529.
- 2) K.J. Fisher; R. Kinsey; R. Mohamath, *et al.* Semi-synthetic terpenoids with differential adjuvant properties as sustainable replacements for shark squalene in vaccine emulsions. **2023**, *npj Vaccines*, 8, 14.
- 3) <https://www.greenpeace.org/static/planet4-eastasia-stateless/2019/11/eca7ede5-eca7ede5-etc-squalene-synbio-casestudy2014.pdf>
- 4) Y. Meng; X. Shao; Y. Wang; Y. Li; X. Zheng; G. Wei; S-W. Kim; C. Wang, Extension of cell membrane boosting squalene production in the engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.*, **2020**, 117 (11), 3499-3507.
- 5) A. Meadows; K. Hawkins; Y. Tsegaye, *et al.* Rewriting yeast central carbon metabolism for industrial isoprenoid production. *Nature*, **2016**, 537, 694-697.
- 6) A. Katabami; L. Li; M. Iwasaki, M. Furubayashi; K. Saito; D. Umeno, **2015**, 119 (2), 165-171.
- 7) 梅野太輔, 尾島 匠, 非対称骨格を有するカロテノイド及び蛍光性非対称骨格を有するカロテノイド, 特願

2023-112676.

- 8) M. Furubayashi; M. Ikezumi; S. Takaichi, et al. A highly selective biosynthetic pathway to non-natural C₅₀ carotenoids assembled from moderately selective enzymes. *Nat Commun.* **2015**, 6, 7534.
- 9) M. Furubayashi; D. Umeno, Use of directed enzyme evolution to create novel biosynthetic pathways for production of rare or non-natural carotenoids. *Methods Enzymol.*, **2022**, 671, 351-382.
- 10) M. Furubayashi; L. Li; A. Katabami; K. Saito; D. Umeno: Directed evolution of squalene synthase for dehydrosqualene biosynthesis, *FEBS Lett.*, **2014**, 588, 3375-3381.
- 11) D. Umeno; A.V. Tobias; F.H. Arnold; Evolution of the C₃₀ Carotenoid Synthase CrtM for Function in a C₄₀ Pathway. *J. Bacteriol.*, **2002**, 184 (23), 6690-6699.