

大腸菌内での YK ペプチドタグ融合による酵素集積化と 3-ヒドロキシ酪酸合成への影響

(東京工大院生命理工¹・東大院工²) ○小笹 文吾¹・中山 彩恵¹・橋本 匡浩¹・三木 卓幸^{1,2}・三原 久和¹

Enzyme integration by YK peptide tag fusion in *E. coli* and its effect on 3-hydroxybutyrate synthesis(¹*School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology*, ²*School of Engineering, The University of Tokyo*). ○Bungo Kozasa¹, Sae Nakayama¹, Masahiro Hashimoto¹, Takayuki Miki^{1,2}, Hisakazu Mihara¹

Cells are leveraged as factories for mass production by modifying the metabolic pathways to produce desired compounds. The integration of enzymes is essential in this process. Local concentration of enzymes accelerates the cascade reactions by transferring the intermediates from one enzyme to another.

We aimed to establish a more straightforward strategy for enzyme accumulation by using self-assembling peptide tags. Previously, we have developed YK peptides, composed of repeats of tyrosine and lysine, self-assembled intracellularly. In this study, we fused the YK11 peptide to β -ketothiolase (PhaA), (*S*)-3-hydroxybutyryl-CoA reductase (Hbd), and propionate CoA transferase (Hbd) for efficient production of (*S*)-3-hydroxybutyrate. We expressed these enzymes in *E. coli*, and the yield of 3-hydroxybutyrate was evaluated. Unexpectedly, the fusion of the peptide tag resulted in a 60% decrease in yield.

To confirm the cause of the yield decrease, we examined each enzyme's activity in the soluble and insoluble fractions of the lysate. The results showed that PhaA lost its activity dramatically, while the expression of Hbd was significantly reduced. Of note, despite the significant decrease in the activity of the respective enzymes in the cell lysate, the intracellular evaluation showed only a 60% yield decrease. This study indicates the necessity to construct and evaluate in living cells.

Keywords: *Enzyme engineering, Peptide engineering, Self-assembling peptides, Metabolon*

細胞は物質生産の場として活用されている。細胞内の代謝経路を改変し、望みの化合物を生産する。その上で、酵素集積化が重要視される。酵素が濃縮することで、酵素間での中間体の受け渡しが迅速化され、カスケード反応が促進される。

我々は、より簡便に酵素を集積化する戦略として、自己集合化ペプチドタグを用いることを考案した。これまで、我々はチロシンとリシンを繰り返した YK ペプチドは、細胞内で自己集合することを見出している。そこで本研究では YK11 ペプチドを β -ケトチオラーゼ(PhaA)、(*S*)-3-ヒドロキシブチリル-CoA 還元酵素(Hbd)、プロピオン酸 CoA トランスフェラーゼ(Hbd)に融合し、(*S*)-3-ヒドロキシ酪酸の効率的な生成を目指した。その結果、予想外なことに、大腸菌内で 3-ヒドロキシ酪酸の生成量評価を行なったところ、ペプチドタグの融合によって 60%の収率の低下が見られた。

収率低下の原因を確認すべく、破碎液の可溶性画分、不溶性画分それぞれを用いて各酵素の活性の変化を調べた。その結果、PhaA はペプチド融合によって劇的に活性が失われ、また Hbd はペプチド融合によって発現量が大幅に低下したことが要因であることがわかった。同時に、興味深い点として、細胞破碎液中でのそれぞれの酵素活性は大幅に低下しているにも関わらず、細胞内での評価は 60%の収率低下にとどまった。本研究から、細胞内での直接的な酵素集積化の構築と評価の必要性が明白となった。