

基質競争条件下におけるイソペンテニルリン酸化酵素 (IPK) の進化分子工学

(千葉大工¹・早稲田大院理工²・千葉大院工³) ○石原 大地¹・小野里 由美³・河合 (野間) 繁子³・梅野 太輔^{2,3}

Directed evolution of isopentenyl phosphate kinase in the presence of two competing substrates. (¹*Faculty of Engineering, Chiba University*, ²*Graduate School of Science and Engineering, Waseda University*, ³*Graduate School of Engineering, Chiba University*) ○Daichi Ishihara¹, Yumi Onozato³, Shigeko Kawai (Noma), Daisuke Umeno^{2,3}

Isoprenoids are a group of valuable compounds used in flavors, fragrances, and pharmaceuticals. They are all synthesized from the common dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP) and isopentenyl pyrophosphate (IPP). Recently, salvage pathways for DMAPP and IPP from corresponding alcohols were established by the pair of kinases [1][2]. In this study, we aim to supply both DMAPP and IPP using a single variant enzyme of isopentenyl phosphate kinase, IPK. However, we found that phosphorylation of DMAOH is severely inhibited by IOH. Using carotenoid-based activity screening in the presence of excess amount of IOH, we searched for the IPK variants that can efficiently convert DMAOH to DMAPP. In this presentation, we report the nature, specification, and application of the IPK variants obtained herein.

Keywords : Synthetic biology; Directed Evolution; Isoprenoid; Substrate Competition; precursor

イソプレノイドは香料や医薬品などに利用される有価な化合物群であり、ジメチルアリルニリン酸 (DMAPP)、イソペンテニルニリン酸 (IPP) を基質に合成される。近年、ジメチルアリルアルコール (DMAOH) とイソペンテニルアルコール (IOH) から DMAPP と IPP を独立に供給する経路が注目されている[1][2]。本研究では、DMAPP と IPP の両方を、一つの酵素 IPK の特異性変異体によって供給することを目指している。しかし、DMAOH と IOH の両方を一酵素で供給しようとする、DMAOH と IOH どちらかが互いのリン酸化活性を阻害するという問題が生じる。そこで、IPK 変異体ライブラリの中から、IOH を過剰量添加した条件で、DMAOH のリン酸化活性の高い IPK 変異体をスクリーニング探索した。本講演では、この選択条件で高い活性を示した IPK 変異体の遺伝型と DMAPP 供給活性を報告するとともに、これらの発現がもたらす大腸菌のテルペン生産量への影響について報告する。

[1] A. O. Chatzivasilieiou, V. Ward, S. M. B. Edgar, and G. Stephanopoulos, Two-step pathway for isoprenoid synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **116**, 506–511 (2019).

[2] J. M. Clomburg, S. Qian, Z. Tan, S. Cheong, and R. Gonzalez, The isoprenoid alcohol pathway, a synthetic route for isoprenoid biosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **116**, 12810–12815 (2019).