



微生物のメタボリック・エンジニアリング

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2020-06-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 太田, 一良 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10458/5518">http://hdl.handle.net/10458/5518</a>

# 微生物のメタボリック・エンジニアリング

太田 一良\*

## 1. はじめに

微生物の示す多種多様な代謝活性には、直接工業生産に応用できるものもあるが、多くの場合、アミノ酸発酵菌の育種に見られるように、代謝調節の解除に主眼をおいた種々の突然変異を積み重ねることにより生産性の向上が図られてきた。最近では、これに加えて遺伝子工学の急速な発展によって、「メタボリック・エンジニアリング」という新しい分野が開けようとしている<sup>1,2)</sup>。この手法は、従来の工業微生物の育種改良法とは異なり、組換えDNA技術により、新規な代謝機能をもつ組換え体を構築しようとするものである。すなわち、異種微生物由来の代謝経路を宿主菌に導入し、中間代謝の流れを宿主菌固有の代謝経路から転換することを目的とする。本稿では、微生物のメタボリック・エンジニアリングのモデル系として、筆者らが行ったエタノール発酵細菌 *Zymomonas mobilis* 由来のエタノール生成経路を大腸菌へ導入した研究例を中心に紹介する。

1970年代のいわゆる石油ショック以来、石油代替エネルギーとしてのエタノールの発酵生産が関心を集めている。発酵原料の農産物資源が豊かなアメリカやブラジルでは、すでに燃料用エタノールが発酵法で生産され、ガソリンに10~15%のエタノールを混入したガソール (gasohol) が自動

車燃料として実用化されている。このような再生可能な植物系バイオマス由来のエタノールは、環境的にクリーンなエネルギーであり、ガソリンに混入することで排ガス中の窒素酸化物や一酸化炭素など環境汚染物質の濃度を低減する効果がある。従来、エタノールは糖質原料(サトウキビ、糖蜜など)やデンプン質原料(穀類、芋類)から主として *Saccharomyces* 属酵母を用いて発酵生産されていたが、特に資源の乏しいわが国では、農林産廃棄物などの食料と競合しない未利用資源からのエタノール生産技術の開発のための大型プロジェクトが進められている。バガス、コーンストーバ、おが屑など豊富に存在するセルロース系バイオマス資源は、構成多糖としてセルロース、ヘミセルロース、それに少量のペクチンを含む。セルロースはグルコースのホモポリマーであるが、ヘミセルロースは主として5炭糖(キシロース、アラビノース)からなり、6炭糖(マンノース、グルコース、ガラクトース)も含む。これまでキシロースからのエタノール生産は、*Pachysolen* 属、*Candida* 属および *Pichia* 属などの5炭糖発酵性酵母を用いて研究されてきたが、これらの酵母はエタノール耐性が低く、また半好氣的条件下で行う必要があるため収率が低い。したがって、セルロース資源を高度に利用して燃料用エタノールを生産するためには、その構成糖である5炭糖と6炭糖を効率よくエタノールに変換する発酵菌の開発が必要である。

\* Kazuyoshi Ohta 宮崎大学農学部生物資源利用学科 助教授 農学博士

## 2. 大腸菌と *Z. mobilis* の糖代謝

現存する微生物がもっている種々の代謝系は、幹から枝へと多方向に分岐している。それは過去の進化の過程の蓄積によるものであることを示唆している。糖類は嫌氣的に代謝され、一旦共通の代謝中間体ピルビン酸に変化し、同時にATPとNADHが生成する。NADHはピルビン酸またはそれ以後の中間代謝物を還元するのに使われる。その結果、微生物の種類によって異なった最終生産物へと変化する。

大腸菌を含め多くの腸内細菌群は、嫌氣的条件下で上述したようなセルロース系バイオマスに由来する5炭糖と6炭糖をすべて発酵の基質として代謝することが可能であるが、乳酸、酢酸、ギ酸、コハク酸、エタノール、水素および二酸化炭素を生成する。この腸内細菌による混合酸型発酵では、Embden-Meyerhof-Parnas経路とペントースリン酸経路が利用される。ここで特徴的なことは、コハク酸だけはホスホエノールピルビン酸から出発する分岐経路でつくられるが、それ以外の最終生産物はすべてピルビン酸を経てつくられるということである。大腸菌においては、ピルビン酸に対して2種類の酵素、乳酸脱水素酵素(LDH)とピルビン酸・ギ酸リアーゼ(PFL)が作用する(図1)。LDHは、ピルビン酸から乳酸への還元を触媒し、NADHを酸化してNAD<sup>+</sup>を再生産する。ピルビン酸は、一方PFLによりギ酸とアセチル-CoAへ開裂される。ギ酸は、さらにギ酸・水素リアーゼによって水素と二酸化炭素を生成する。アセチル-CoAは、代謝されて酢酸とエタノールの混合物を生じる。

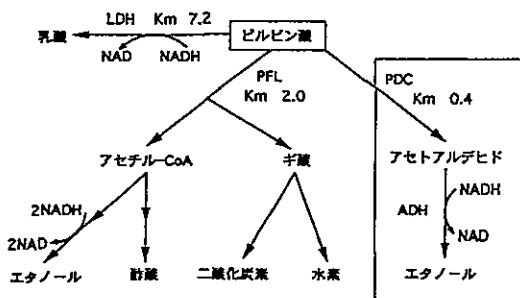


図1 大腸菌と *Z. mobilis* のピルビン酸からの代謝経路<sup>10)</sup>。  
四角で囲んだ部分は *Z. mobilis* のエタノール生成経路

*Z. mobilis* は、1924年Lindnerによってメキシコの竜舌蘭の汁液を発酵させたブルケという酒から分離されたグラム陰性、通性嫌氣的の桿菌である。*Z. mobilis* は、Entner-Doudoroff (ED) 経路により1モルのグルコースから約2モルのエタノールを生成する。この反応で、グルコース1モル当たり1モルのATPを産生する。ED経路で生成したピルビン酸は、ピルビン酸脱炭酸酵素(PDC, E.C. 4.1.1.1)の作用でアセトアルデヒドと二酸化炭素に分解され、アセトアルデヒドはNADHの存在下にアルコール脱水素酵素(ADH, E.C. 1.1.1.1)によって還元されてエタノールになり、同時にNAD<sup>+</sup>が再生される(図1)。この細菌は発酵速度が速く、100g/l以上のエタノールを生成する<sup>3)</sup>。ただ、利用できる糖の種類が少なく、6炭糖であるグルコース、フルクトースおよびスクロースに限定される。

### 3. エタノール生産のためのメタボリック・エンジニアリング

メタボリック・エンジニアリングでは、代謝における生化学反応を個々にではなく、複数の生化学反応過程からなる代謝経路の単位でとらえる必要がある。*Z. mobilis* のエタノール生成経路の反応は上述したように2種の酵素、PDC(分子量60,000)とADH(分子量40,100)によって触媒される。いずれも同種のサブユニットからなる四量体として細胞質内に存在する可溶性酵素である。*Z. mobilis* の染色体上に1コピーずつ存在するピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子 *pdC* (1.7kbp) とアルコール脱水素酵素II遺伝子 *adhB* (1.1kbp) は、大腸菌でそれぞれクローニングされ、そして発現されている。また、その塩基配列とともにプロモーター領域も明らかにされている<sup>4,5)</sup>。特にPDCは、細菌での存在が比較的珍しく、このED経路では重要な酵素である。

#### 3.1 原理と方法論

代謝経路“網(ネットワーク)”では、代謝の流れは分岐点で2つまたはそれ以上の代謝経路へと分かれていく。分岐点においては共通の代謝中間体に対して複数の酵素が競合することになり、各代謝経路の最終産物の量比は共通の基質に対する

酵素の相対的な親和性や酵素量などに支配される。したがって、中間代謝の流れを宿主菌本来の主要な経路から新しく導入する代謝経路へ大きく転換させるためには、あらかじめ対象とする代謝経路網の分岐点を明らかにし、その分岐点における一連の生化学反応の特性を十分に把握しておく必要がある。たとえば、酵素のミカエリス定数 $K_m$ 、代謝の流れを変えるのに必要な遺伝子の発現量、酸化還元電位、代謝産物の宿主に対する毒性、栄養要求性、フィードバック阻害の存否などである。

大腸菌は組換えDNA実験に当初から用いられ、遺伝子発現についての多くの知見が集積されている。また、その代謝、生理、遺伝に関する情報は最も豊富である。さらに、*Z. mobilis*の遺伝子*pdc*と*adhB*に見られるコドン選択性は大腸菌で高発現される遺伝子のそれに類似している。このような理由から、*Z. mobilis*のエタノール生成経路を導入し、発現させる宿主菌として、まず大腸菌が選択された。

ピルビン酸は、大腸菌の混合酸型発酵経路と*Z. mobilis*のエタノール生成経路の共通の代謝中間体である。*Z. mobilis*のピルビン酸脱炭酸酵素のピルビン酸に対する $K_m$ 値は0.4mMと低く、大腸菌の乳酸脱水素酵素( $K_m$  7.2mM)やピルビン酸・ギ酸リアーゼ( $K_m$  2.0mM)のそれよりもピルビン酸に対して高い親和性を持っている(図1)。したがって、これらの代謝系が競合した場合、*Z. mobilis*のエタノール生成経路が大腸菌本来の混合酸型発酵経路よりも優先されることが期待される。

腸内細菌にPDCとADHからなるエタノール生成経路を構築するために2種のアプローチがなされた。

(1)大腸菌を含め腸内細菌群(*Escherichia*, *Klebsiella*, *Erwinia*)はアセチル-CoAからアセトアルデヒドを経て固有のADHにより少量のエタノールを生成する。したがって、初期の研究では*Z. mobilis*のPDCをコードする遺伝子のみをADH活性を有する大腸菌<sup>6)</sup>、*Klebsiella planticola*<sup>8)</sup>および*Erwinia chrysanthemi*<sup>7)</sup>で発現させ、いずれもエタノール生成量はその宿主菌よりも増大することを示した。しかし、宿主菌の内存性ADHの活性が低いために、生産されるエタノール濃度

は低い値を示した。

(2)Ingramら<sup>9,10)</sup>は、プラスミド・ベクターpUC18上の*lac*プロモーターの下流に*Z. mobilis*のエタノール生成経路をコードするピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子*pdc*とアルコール脱水素酵素II遺伝子*adhB*を繋いでエタノール生産のための人工的なオペロンである*pet* (production of ethanol) オペロンを構築した(図2)。*Z. mobilis*の*pdc*と*adhB*に固有のプロモーターは大腸菌では機能しないので除去され、*pet* オペロンでは大腸菌*lac*プロモーターに置き換えられている。また、オペロンを構築するため、*pdc*の転写のターミネーターは除去し、その下流に位置する*adhB*のターミネーターの配列が機能するように残されている。この組換えプラスミドpLOI295には、*pet* オペロンの他に*colE1*レプリコンおよび選択符号としてのアンピシリン耐性遺伝子が含まれている。大腸菌をプラスミドpLOI295で形質転換したところ、*lac*プロモーターの制御下に、*pdc*、*adhB*両遺伝子はともに高いレベルで発現された。その結果、ピルビン酸からの代謝の流れが大腸菌本来の混合酸型発酵からエタノール発酵へ転換した。

### 3. 2 組換え大腸菌によるエタノール生産

組換え大腸菌のエタノール生産性向上のために、*pet* オペロンの受容菌として、American Type Culture Collection (ATCC)由来の大腸菌8株の中から低いpH領域、塩化ナトリウム、エタノール

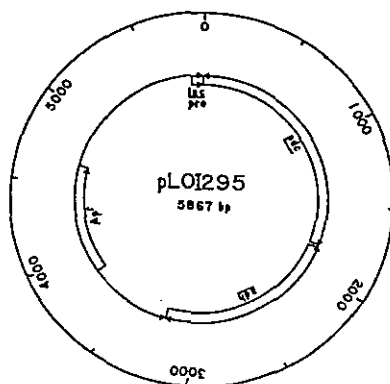


図2 *pet* オペロンの構築<sup>9)</sup>  
*pdc*: ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子  
*adh*: アルコール脱水素酵素遺伝子  
*Ap<sup>r</sup>*: アンピシリン耐性遺伝子

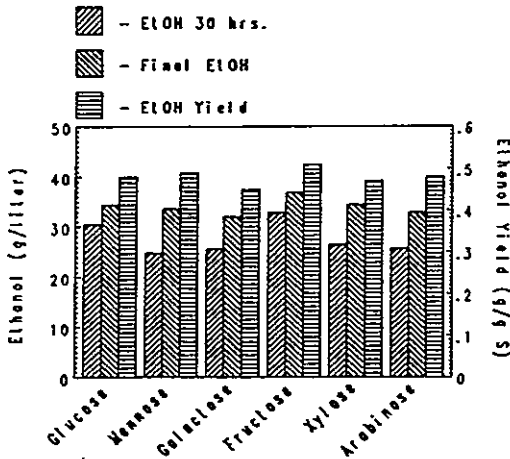


図3 *pet* プラスミドを保有する組換え大腸菌によるエタノール生産<sup>12)</sup>  
基質濃度: 8%

ルに対して高い耐性を示す *Escherichia coli* B (ATCC 11303) 株が選抜された<sup>11)</sup>。また、上記プラスミド pLOI295 にさらに選択符号としてテトラサイクリン耐性遺伝子を付加した多コピーの組換えプラスミド pLOI297 を構築し、*E. coli* B 株に導入した。組換え大腸菌 *E. coli* B (pLOI297) のエタノール生産性を評価するために、エタノール発酵試験を各種の糖を含む Luria broth (350ml) を用いて 30°C で行った<sup>12)</sup>。また、組換え大腸菌の液体培養では、副生する有機酸のため pH が低下し、発酵が遅滞する。したがって、エタノール発酵を能率よく行うためには、培養期間中は培養液の pH を 0.2N 水酸化カリウムにより 6.0~7.0 に制御する必要がある。セルロース系バイオマスの主要 5 炭糖であるキシロース (8%) から 34.4 g/l (理論収率の 93%) のエタノールを 48 時間で生成し、その生成速度の最大値は 0.9 g/l/h であった。また、この *E. coli* B (pLOI297) 株は、バイオマスの構成糖であるグルコース、マンノース、アラビノース、ガラクトースも効率良くエタノールに変換した (図 3)。発酵産物として中性のエタノールを生産する *Saccharomyces cerevisiae* と *Z. mobilis* は、大腸菌のような混合酸型発酵菌よりも高い菌体密度まで増殖することが知られている。エタノール発酵性組換え大腸菌の場合も、*E. coli* B 野生株よりも約 3 倍高い培養菌体密度を示した。

### 3.3 *Z. mobilis* の *pdc* と *adhB* の大腸菌染色体への組込み<sup>13)</sup>

エタノール発酵性組換え大腸菌においては、先に述べたように、ピルビン酸・ギ酸リアーゼはピルビン酸をギ酸とアセチル-CoA に分解し、エタノール生成経路と競合する分岐点に位置する。ピルビン酸・ギ酸リアーゼ遺伝子 *pfl* は大腸菌からクローニングされ、またその塩基配列も明らかにされている。この遺伝子は嫌氣的な増殖において少なくとも 6 個のプロモーターから高いレベルで発現される。以上の理由から、*Z. mobilis* の遺伝子 *pdc* と *adhB* を *E. coli* B 株の染色体上の *pfl* 遺伝子領域に組込むことにより、エタノール生成経路を導入し、併せて酢酸生成経路を不活性化することを企図した。まず、プロモーターを含まない *pdc* と *adhB* からなる断片 (3.2 kbp) の下流に選択符号としてのクロラムフェニコール耐性遺伝子 *cat* を付加した。この *pdc*, *adhB* および *cat* からなる断片 (4.6 kbp) をプラスミド pHB4 上の *pfl* 内部の *Bam*HI 部位に挿入し、プラスミド pLOI510 を構築した (図 4)。この pLOI510 から複製開始点 *ori* を除去し、その断片を環状化した。大腸菌で複製できない環状の断片で、*E. coli* B 株を形質転換することにより、染色体上の *pfl* 領域との相対的組換えにより *pdc* と *adhB* を染色体に組込んだ組換え体 KO3 を得た。多コピープラスミド上に *pdc* と *adhB* を持つ *E. coli* B (pLOI297) 株に比べ、KO3 では染色体に組込まれた *pdc* と *adhB* の安定性が增大した。ただ、コピー数が少ないため、*pdc* と *adhB* の発現量が低く、エタノール生成量が微弱であった。ところが、KO3 から高濃度のク

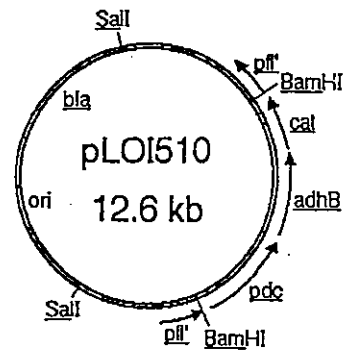


図4 *Z. mobilis* の *pdc* と *adhB* を大腸菌染色体上の *pfl* 領域へ組込むためのベクター<sup>13)</sup>

ロラムフェニコール (600  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) に耐性を示す自然突然変異体として取得したKO4では、同時に *pdC* と *adhB* の発現量が *E. coli* B (pLOI297) 株に匹敵するレベルにまで増大した。染色体組込み型の組換え大腸菌KO4による発酵試験 (30°C, pH 6.0) の結果, 10% グルコースと 8% キシロースからそれぞれ 54.4 g/l と 41.6 g/l のエタノールを生成した (図5)。

KO4は酢酸と乳酸の生成量は減少したが, その高いエタノール生成量にもかかわらず, 著量のコハク酸を副産物として産生した (表1)。これはコハク酸生成へ導く酵素ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼがエタノール生成経路のPD Cと直接には競合関係に無いためと考えられる。そこで, KO4のコハク酸生成経路を不活性化させるためフマル酸レダクターゼ遺伝子 *frd* 変異を導入し, KO4のコハク酸生成量の約90%を除

去した。この有機酸生成量が低下したKO11は培養菌体密度が *E. coli* B 野生株に比べて高く, 異種タンパク質生産の宿主菌として好都合である。そこで *Bacillus stearothermophilus* の  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子と *Thermoanaerobium brockii* のプルナーゼ遺伝子を持つプラスミド pLOI140 (17.8 kbp) を構築し, KO11に導入したところ, エタノール発酵の副産物としてデンプン糖化のための耐熱性酵素を生産した<sup>14)</sup>。また, 相同的組換えによる遺伝的不安定性をなくすためKO11にさらに *recA* 変異を導入したKO12を構築した。

### 3. 4 *Klebsiella* 属細菌への応用<sup>15)</sup>

大腸菌に近縁の腸内細菌 *Klebsiella* 属は, 混合酸型発酵経路以外に, ピルビン酸から分岐した 2, 3-ブタンジオール生成経路を有する。 *Z. mobilis* の *pdC*, *adhB* および *cat* からなる *Pst* I 断片 (4.6 kbp) を *E. coli* B 株の内蔵性プラスミドに挿入した組換えプラスミド pLOI555 (8.4 kbp) を構築した。プラスミド pLOI555 を *K. oxytoca* M5A1 株に導入したところ, 選択圧としてのクロラムフェニコール非存在下で 68 世代増殖後でも 98% 宿主菌に保持された。 *K. oxytoca* M5A1 (pLOI555) 株による発酵試験 (30°C, pH 6.0) の結果, 10% キシロースおよびグルコースから 48 時間でそれぞれ 46 g/l (理論収率の 94%) と 48 g/l (理論収率の 98%) のエタノールを生成した。特にキシロールからのエタノールの生成速度の最大値は上述の組換え大腸菌に比べ約 2 倍の 2.0 g/l/h に上昇した。これは, 中性の 2, 3-ブタンジオールを産生する *Klebsiella* 属細菌では, 大腸菌に比べ有機酸生成量が少ないことに起因するものと思われる。 *K. oxytoca* M5A1 (pLOI555) 株では酢酸, 乳酸およびブタンジオールの生成量が減少した。しかし, エタノール発酵性組換え大腸菌の場合と同様に, コハク酸生成量の減少は認められなかった。

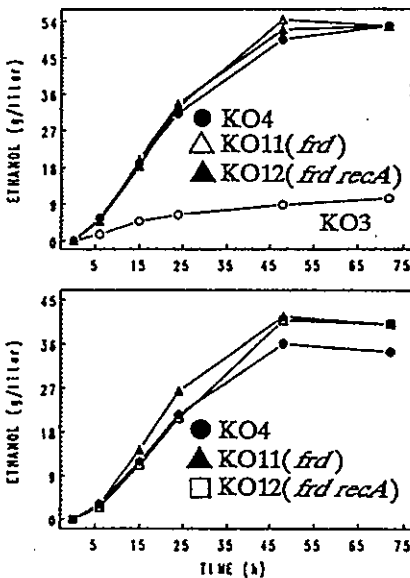


図5 染色体組込み型の組換え大腸菌によるエタノール生産<sup>13)</sup>  
上: 10% グルコース, 下: 8% キシロース

表1 組換え体によって産生される有機酸量

組換え体	有機酸量 (mM)		
	酢酸	乳酸	コハク酸
<i>E. coli</i> B	66	641	58
<i>E. coli</i> B (pLOI297)	21	32	49
KO3	69	525	66
KO4	22	29	70
KO11 ( <i>frd</i> )	4	32	2

10% グルコースを 72 時間発酵後の有機酸量

## 4. おわりに

本稿では, エタノール生産のための腸内細菌のメタボリック・エンジニアリングについて概説した。図6に示すように, 腸内細菌に *Z. mobilis* 由来の *pet* オペロンを導入した組換え体の発酵系により, 乳糖やセルロース系バイオマス資源由来の

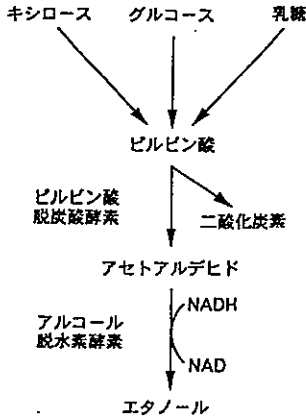


図6 *pet* オペロンを組込んだ腸内細菌の糖代謝

5炭糖と6炭糖がエタノールへ効率よく変換された。しかし、エタノールの工業生産のためには、さらに多くの遺伝的改良が必要である。たとえば多糖類分解酵素の発現、競合する発酵経路の不活性化、凝集性や原料中に存在する発酵阻害物質に対する耐性の付与などである。この *pet* オペロンは、移動可能なエタノール生成経路として適当なプロモーターとベクターが存在すれば、腸内細菌以外の細菌で発現されることができであろう。本稿で紹介した例以外にも、たとえば生分解性ポリマーとして注目されているポリ-β-ヒドロキシ酪酸 (PHB) では、*Alcaligenes eutrophus* の PHB 生合成経路をコードするオペロンが大腸菌で発現された<sup>17)</sup>。また、*Erwinia uredovora* のカロチノイド生合成経路が大腸菌の代謝経路に組み込まれ発現された<sup>18)</sup>。アミノ酸生産性のコリネ菌においても、トリプトファン生産菌の代謝の流れを変えることにより、チロシンやフェニルアラニン生産菌へと転換された<sup>19)</sup>。現在、この分野は細菌の系で精力的に研究が進められているが、今後、真核細胞への応用など、さらなる展開が期待されるところである。

最後に本研究の遂行にあたり、終始ご指導賜りました米国フロリダ大学微生物学科の L.O. Ingram 教授に心から御礼申し上げます。

#### 引用文献

- 1) J.E. Bailey : *Science*, 252, 1668 (1991)
- 2) G. Stephanopoulos, J.J. Vallino : *Science*, 252, 1675 (1991)
- 3) K. Ohta, K. Supanwong, S. Hayashida : *J. Ferment. Technol.*, 59, 435 (1981)
- 4) T. Conway, Y.A. Osman, J.I. Konnan, E.M. Hoffmann, L.O. Ingram : *J. Bacteriol.*, 169, 949 (1987)
- 5) T. Conway, G.W. Sewell, Y.A. Osman, L.O. Ingram : *J. Bacteriol.*, 169, 2591 (1987)
- 6) B. Brau, H. Sahm : *Arch. Microbiol.*, 144, 296 (1986)
- 7) J.S. Tolan, R.K. Finn : *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2033 (1987)
- 8) J.S. Tolan, R.K. Finn : *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2039 (1987)
- 9) L.O. Ingram, T. Conway, D.P. Clark, G.W. Sewell, J.F. Preston : *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2420 (1987)
- 10) L.O. Ingram, F. Alterthum, K. Ohta, D.S. Beall : *Dev. Ind. Microbiol.*, 31, 21 (1990)
- 11) F. Alterthum, L.O. Ingram : *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1943 (1989)
- 12) D.S. Beall, K. Ohta, L.O. Ingram : *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 296 (1991)
- 13) K. Ohta, D.S. Beall, J.P. Mejia, K.T. Shanmugam, L.O. Ingram : *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 893 (1991)
- 14) W.V. Guimaraes, K. Ohta, G. Burchhardt, L.O. Ingram : *Biotechnol. Lett.*, 14, 415 (1992)
- 15) K. Ohta, D.S. Beall, J.P. Mejia, K.T. Shanmugam, L.O. Ingram : *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2810 (1991)
- 16) N. Misawa, M. Nakagawa, K. Kobayashi, S. Yamano, Y. Izawa, K. Nakamura, K. Hara-shima : *J. Bacteriol.*, 172, 6704 (1990)
- 17) S. Slater, W.H. Voige, D.E. Dennis : *J. Bacteriol.*, 170, 4431 (1988)
- 18) M. Ikeda, R. Katsumata : *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 781 (1992)

☆

☆

☆