



産業微生物における細胞内およびペリプラズムでの物質代謝に関わる生化学・生物工学研究

山口大学大学研究推進機構 片岡尚也

はじめに

微生物による物質生産は、発酵に代表されるように人類が古くから利用してきた技術の一つである。近年では、石油化学工業に取って代わるバイオリファイナリー技術としての側面も見出され、多種多様な化合物の微生物での生産が可能になってきている。微生物による物質生産を考えると、その対象は主に物質代謝になる。筆者らは、産業微生物である大腸菌、酢酸菌、コリネ型細菌を材料に、各微生物に特徴的な物質代謝の生化学的解析および物質生産への応用に焦点を当て研究に取り組んできた。本講演では、これまでの研究成果の中でも、大腸菌および酢酸菌に関連するものを中心にその概要を紹介する。

1. 大腸菌を宿主とした合成代謝経路の構築による非天然化合物の物質生産研究

大腸菌は、最も遺伝子工学ツールや代謝に関する情報が充実している微生物の一つであり、これまでも本菌を宿主とした物質生産に関する報告が数多くなされている。しかし、非天然化合物の生産に焦点を当てると、その報告例は、代謝経路の不在により極めて限定的である。微生物による物質生産の実用可能性の向上には、非天然化合物を生産しうる新たな技術の開発が重要になってくる。このような背景から、筆者らはまず、非天然化合物である1,3-ブタンジオールを生産の標的化合物として選抜した。1,3-ブタンジオールは、β-ラクタム系抗生物質の合成中間体等、医薬・農薬の分野で広く利用されている光学活性ジオールである。1,3-ブタンジオール合成代謝経路を水素細菌 *Ralstonia eutropha* の持つポリヒドロキシ酪酸合成経路由来 PhaAB とブタノール発酵細菌 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* の持つブタノール合成経路由来 Bld を組み合わせることで設計 (図1)、大腸菌内で機能的に発現させることで、グ

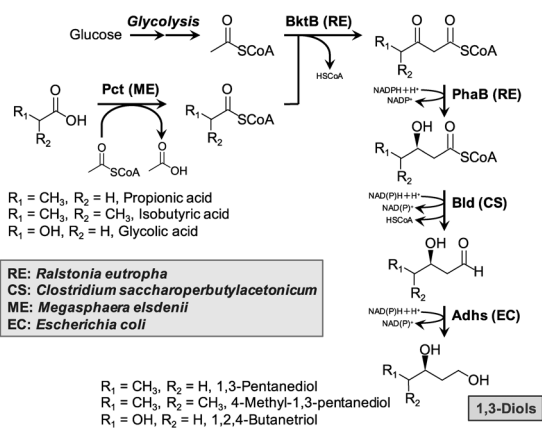


図1. 1,3-ジオール類生産のための合成代謝経路
 有機酸を添加せず、BktB (RE) を PhaA (RE) に変換した場合に上記合成代謝経路で生成される化合物が、1,3-ブタンジオールである。

ルコースから1,3-ブタンジオールを生産しうる組換え大腸菌の構築に成功した¹⁾。また、酸素移動容量係数 ($k_L a$) や pH といった培養条件の最適化を検討した結果、高い1,3-ブタンジオール生産収量を実現しうるバイオリアクターを開発した²⁾。さらに、1,3-ブタンジオール合成代謝経路を基盤に、ルーメン細菌 *Megasphaera elsdenii* 由来の有機酸の CoA 体への活性化を触媒する酵素プロピオン酸-CoA 転移酵素 Pct を鍵とした、原料に用いる有機酸依存的に様々な炭素骨格を有する1,3-ジオール類を合成可能な新規合成代謝経路 (図1) を構築することで、非天然化合物を含む1,3-ペンタンジオール、4-メチル-1,3-ペンタンジオール、1,2,4-ブタントリオールの生産を報告した³⁾。

2. 酢酸菌の糖質代謝に関わる酵素の生化学・遺伝子工学研究

酢酸菌は、細胞膜のペリプラズム側に多種多様な膜結合型脱水素酵素を保有しており、その働きにより、様々な糖質やアルコール類を不完全に酸化する酸化発酵と呼ばれる物質代謝を営む。本発酵系は、ビタミンC生産におけるソルボース発酵や、食酢醸造における酢酸発酵など、古くから産業の場で利用されてきた。筆者らは、酢酸菌の中でも特に糖質の酸化に特化する *Gluconobacter* 属を材料に、ケトグルコン酸発酵 (図2)、ジヒドロキシアセトン発酵を対象に研究を行ってきた。

2-1. ケトグルコン酸発酵系に関する研究

ケトグルコン酸発酵 (図2) は、*Gluconobacter* 属に保存された発酵系であるが、未だ同定されていない酵素遺伝子が存在していた。遺伝子の同定は、遺伝子工学による各ケトグルコン酸生産技術の開発や改良に重要な役割を持つ。そこでまず、未同定であった2-ケトグルコン酸脱水素酵素遺伝子をその活性を有する菌株のゲノム情報を活用することで同定した。次いで、同定遺伝子を遺伝子工学的に2-ケトグルコン酸を高生産するよう改変された *Gluconobacter* 属で高発現させることで、定量的に

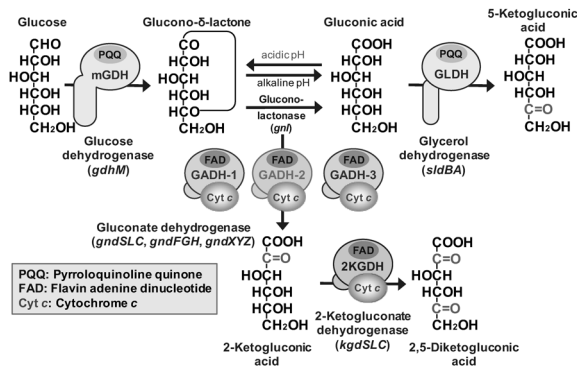


図2. *Gluconobacter* 属のケトグルコン酸発酵経路
 ケトグルコン酸発酵は、グルコースを基質として複数の膜結合型脱水素酵素が連続的に機能して進行する。GLDHは、L-リボースのL-リボン酸への変換も行うことが明らかにされた。

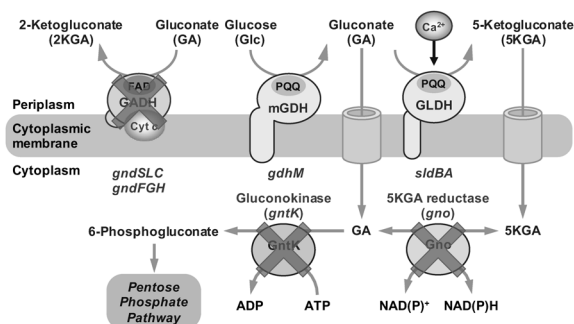


図3. 5-ケトグルコン酸高生産に向けた戦略

①ペリプラズムでのグルコン酸の2-ケトグルコン酸への変換, ②細胞内でのグルコン酸および5-ケトグルコン酸の代謝, ③カルシウムイオンの添加によるGLDH活性の維持, の3つの戦略により, グルコースは定量的に5-ケトグルコン酸に変換された。

2,5-ジケトグルコン酸を生成しうる組換え体の構築を報告した⁴⁾。また, 本研究で同定したタンパク質輸送シグナルに関する情報を活用することで, 細胞内酵素であるII型デヒドロキナ酸脱水酵素のペリプラズムへの局在による *Gluconobacter* 属でのキナ酸の3-デヒドロキシ酸への高速変換に代表されるタンパク質の局在改変を鍵としたペリプラズミック代謝工学といった, 新たな研究領域を開拓した⁵⁾。

ケトグルコン酸発酵による生成物で酒石酸生産の前駆体としての用途を持つ5-ケトグルコン酸は, 微生物の中でも *Gluconobacter* 属が特に生成能力が優れていることが知られている。しかし, その生産に関しては, 検討が不十分であった。そこで, これまでに明らかにされているペリプラズムでの物質代謝を5-ケトグルコン酸生成に向かうべく改変するとともに, 5-ケトグルコン酸およびグルコン酸の資化を制御する遺伝子工学を施した。加えて, 鍵酵素の活性維持に有効である培養液中のカルシウムイオン濃度を検討した。その結果, 定量的に5-ケトグルコン酸生産を生成可能な技術の開発に成功した(図3)⁶⁾。

2-2. ジヒドロキシアセトン発酵系に関する研究

日焼け剤としての用途を持つジヒドロキシアセトンもグリセロールを基質に *Gluconobacter* 属による酸化発酵にて生成される化合物として知られている。*Gluconobacter* 属はその資化能も有しており, 結果として, ジヒドロキシアセトンの生産性に問題を抱えていた。そこでまず, ジヒドロキシアセトン代謝の初発酵素と予想されるリン酸化酵素を精製し, 遺伝子を同定した。次いで, ゲノム情報を活用することで精製酵素のアイソザイムと推定される遺伝子をリストアップし, 各遺伝子産物に対し生化学的解析を行うことで, 全ての遺伝子産物が目的反応を触媒することを明らかにした。その後, それら遺伝子全てを欠損した組換え株を作製, 培養条件を最適化することで効率的にジヒドロキシアセトンを生成可能なシステムを構築した⁷⁾。

2-3. グリセロール脱水素酵素が触媒する新規酸化系の発見

グリセロールのジヒドロキシアセトンへの変換を担う酵素であるグリセロール脱水素酵素(図2, 3; GLDH)は, *Gluconobacter* 属の保有する膜結合型脱水素酵素の中でも特に基質特異性が広いことが知られており, その反応は, Bertrand-Hudson 則と呼ばれるルールに限定され, 2位と3位の水酸基がD-エリスロ(2S, 3R)配置を持つポリオール(2位をケトンに酸化する。筆者らは, 逆遺伝学的な解析により, 本酵素がL-リボース

を基質にすることを見出すとともに, 生成物がL-リボン酸であることを明らかにした⁸⁾。これは, 前述の Bertrand-Hudson 則に従わず, グリセロール脱水素酵素が1位の水酸基をも酸化することを提案していた点で興味深い。

おわりに

本研究では, 産業微生物の物質代謝に焦点を当て研究を行い, 大腸菌においては, 微生物により生成される化合物種の拡充を, 酢酸菌においては, 膜結合型酵素の新規機能の発見や遺伝子の同定およびその生物工学的活用を, 実験的に実証してきた。今後は, これまでの物質代謝に関する研究に, 細胞内酸化還元状態の制御やATP充足度の改変, 膜結合型脱水素酵素と呼吸鎖電子伝達系の共役(キノン・キノールを介してこれら二つはリンクしている)に関する研究に代表されるエネルギー代謝の視点も加えて研究を行うことで, 微生物機能の産業利用の可能性向上に向けてさらなる発展を図っていきたい。

(引用文献)

- 1) Kataoka N, Vangnai AS, Tajima T, *et al.* Improvement of (R)-1,3-butanediol production by engineered *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.*, 115, 475–480, (2013).
- 2) Kataoka N, Vangnai AS, Ueda H, *et al.* Enhancement of (R)-1,3-butanediol production by engineered *Escherichia coli* using a bioreactor system with strict regulation of overall oxygen transfer coefficient and pH. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 78, 695–700, (2014).
- 3) Kataoka N, Vangnai AS, Pongtharangkul T, *et al.* Production of 1,3-diols in *Escherichia coli*. *Bioresour. Technol.*, 245 (PtB), 1538–1541, (2017).
- 4) Kataoka N, Matsutani M, Yakushi T, Matsushita K. Efficient production of 2,5-diketo-D-gluconate via heterologous expression of 2-ketogluconate dehydrogenase in *Gluconobacter japonicus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81, 3552–3560, (2015).
- 5) Nakamura K, Nagaki K, Matsutani M, *et al.* Relocation of dehydratase to the periplasmic space improves dehydroshikimate production with *Gluconobacter oxydans* strain NBRC3244. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 105, 5883–5894, (2021).
- 6) Kataoka N, Naoki K, Ano Y, *et al.* Development of efficient 5-ketogluconate production system by *Gluconobacter japonicus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 106, 7751–5561, (2022).
- 7) Kataoka N, Hirata K, Matsutani M, *et al.* Three ATP-dependent phosphorylating enzymes in the first committed step of dihydroxyacetone metabolism in *Gluconobacter thailandicus* NBRC3255. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 105, 1227–1236, (2021).
- 8) Yakushi T, Terada Y, Ozaki S, *et al.* Aldopentoses as new substrates for the membrane-bound, pyrroloquinoline quinone-dependent glycerol (polyol) dehydrogenase of *Gluconobacter* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 102, 3159–3171, (2018).

謝辞 本研究は, 広島大学大学院先端物質科学研究科(現統合生命科学研究科)ならびに山口大学大学院創成科学研究科にて行われたものです。本研究に携わる機会をいただくとともに本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会中四国支部長・広島大学・加藤純一先生に心より感謝申し上げます。また, 酢酸菌研究に関して, 一からご指導ご鞭撻を賜りました山口大学・薬師寿治先生ならびに山口大学・松下一信先生に厚く御礼申し上げます。なお, 本研究は他にも多くの方々のご協力のもとで行われました。本研究に携わった全ての方々に感謝いたします。最後になりましたが, ご支援賜りました中四国支部の先生方に厚く御礼申し上げます。