

「合成代謝工学」による有用化学品生産への挑戦

本田 孝祐*・岡野 憲司・大竹 久夫

「代謝工学 (metabolic engineering)」がひとつの学術・技術分野として体系化されたのは1998年のStephanopoulosらの著作¹⁾にさかのぼるとされる。以後、現在に至るまでのさまざまな技術改良を経て、代謝工学は微生物による有用化学品生産を目指す上で欠かすことのできない研究・開発戦略のひとつへと成熟しつつある。しかし一方で、本法に基づく代謝改変が、設計どおりの生産性向上に結び付かないという事例も少なくない。これは、われわれが特定の代謝産物の生産性増大を目論んで微生物ゲノムに改変を加えようとも、その改変が彼らの生存や増殖にとって不都合なものであった場合、何らかのセーフティーネットワークが発動し、改変の効果が打ち消されるためであるとされる。発展著しい各種の-omics技術を駆使し、いわゆる「生命のロバスト性」と呼ばれるこれら一連のネットワークをより深く理解し制御しようという試みが、近年の代謝工学分野における潮流のひとつとなっている。

一方、筆者らは、これらとは一線を画するアプローチで既存の代謝工学が有する問題を克服することを試みている。すなわち、生きた微生物の代謝経路を改変するのではなく、複数の代謝酵素をあらかじめモジュール化し、これらを任意に組み合わせることで、物質生産に特化した合成経路を人工的に構築しようというものである。こうして構築された合成経路は、微生物の生命活動に依存しないため、反応条件のフレキシビリティが格段に向上する。上述の「生命のロバスト性」に起因する問題も含め、従来の発酵生産に付きまといってきた「生き物を取り扱う」がゆえの問題を回避することが可能となる。

*In vitro*での代謝経路の再構築と物質生産の例はこれまでも多くの報告がなされており、古くは1985年にWelchとScopesによって報じられた酵母由来の解糖系酵素群およびATPaseを用いたグルコースからのエタノール生産が挙げられる²⁾。本報告によれば、1 Mのグルコースから8時間の反応で、理論収率である2 Mに迫るエタノールが生産されている。しかし、ここで問題となるのは複数の代謝酵素を、副反応を伴わないレベルにまで精製する作業の煩雑さである。筆者らはこの煩雑さを回避するため、(超)好熱菌に由来する耐熱性酵素に着目した。まず、耐熱性酵素遺伝子を大腸菌などの中温

性宿主微生物内で過剰発現させる。得られた組換え菌を70°C程度の熱処理に供した後、触媒としてそのまま利用する。この結果、宿主由来酵素の大部分が熱変性により不可逆的に失活し、精製酵素と同レベルの高い選択性を有した生体触媒が容易に得られる。本法は異種宿主内での機能的発現さえ可能であれば、あらゆる耐熱性酵素に対して適用可能である。したがって一連の酵素をモジュール化し、これらを任意に組み合わせることによって、化学品生産のための代謝経路をオンデマンドで構築できる「合成代謝工学」なるアプローチが実現可能となる。本稿ではこれまで筆者らが取り組んできた研究例のひとつを紹介し、合成代謝工学による化学品生産のフィージビリティについて議論したい。

合成代謝工学によるATP非生産型解糖系の構築

端的に述べれば、代謝の生理的意義とはATPやNAD(P)Hなどの補酵素を通貨としたエネルギーや還元力の獲得(異化代謝)と、ここで得られたエネルギーを利用した細胞構成物質の合成(同化代謝)に集約される。したがって、天然の代謝経路の一部を無作為に「コピー&ペースト」しただけの合成経路では、補酵素の過不足による反応停止が避けられない。これらの補酵素はいずれも高価な化合物であり、産業応用を視野に入れた場合、合成に必要なモル数の補酵素を投入するという選択肢はまずありえない。

合成代謝経路中での補酵素収支の問題を解決するには、適当な補酵素再生反応の導入がひとつの方策として挙げられよう。一方、微生物由来酵素の多様性を活用すれば、こういった方法に頼らない解決策を得ることも可能である。たとえば解糖系の場合、真核・原核生物におけるEmbden-Meyerhof (EM) 経路を経ればグルコース1分子あたり2分子のATPが生産される(すなわちADP 2分子が消費される)。これに対し、一部のアーキアはADP依存型キナーゼなどのユニークな補酵素要求性を有した酵素からなる変形EM経路を有することが知られている³⁾。原核・真核生物型EM経路においてグリセロアルデヒド3-リン酸 (GAP) から3-ホスホグリセリン酸 (3-PG) への変換は、GAPデヒドロゲナーゼ (GAPDH) によるリン酸依存型の脱水素反応とホスホ

*著者紹介 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻(准教授) E-mail: honda@bio.eng.osaka-u.ac.jp

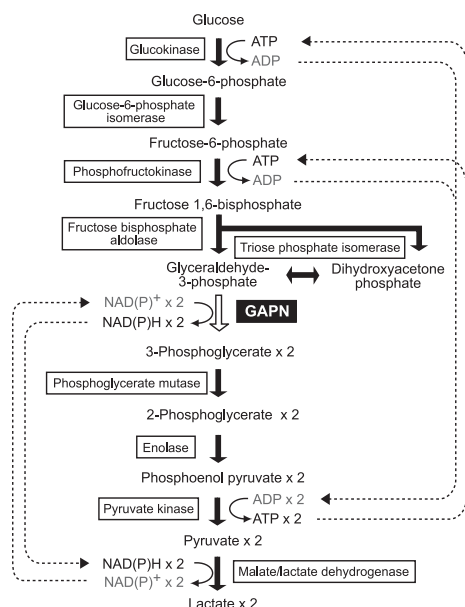


図1. キメラ型EM経路の構築. アーキア型変形EM経路に由来する酵素反応を白抜き矢印で示した.

グリセリン酸キナーゼ (PGK) による脱リン酸化反応の2段階から成り立っており、この一連の反応でGAP 1分子あたり1分子のATPが産生される。一方、変形EM経路中では、リン酸非依存的にGAPを脱水素するGAPフェレドキシン酸化還元酵素 (GAPOR) やnon-phosphorylating GAPDH (GAPN) により、GAPは1段階の反応で直接3-PGへと変換される。これらの酵素が触媒する反応はATP産産を伴わないため、原核・真核生物型EM経路中のGAPDHおよびPGKをアーキア由来のGAPORもしくはGAPNに置換することでATP/ADP収支の合致した(ATPを生産しない)キメラ型EM経路を構築することが可能となる(図1)。ここで重要となるのは、このようなキメラ型経路は合成代謝工学的手法を用いなければ構築できない点にある。言うまでもなく、EM経路は、もっともよく研究された、そして生物にとってもっとも重要な代謝経路のひとつであり、基質(グルコース)が有する自由生成エネルギーをATPの形で取り出すことを生理的役割としている。すなわち、ATPを生産しないEM経路は、もはやその生理的役割を失っており、このようなキメラ型経路を生きた微生物内で再構築するということは、取りも直さず当該微生物のEM経路の機能を無効化することに他ならないからである。

筆者らは、*Thermococcus kodakarensis*由来のGAPN⁴⁾ならびに*Thermus thermophilus*由来の原核生物型EM経路酵素群を組み合わせたキメラ型EM経路を構築し、これを用いたグルコースからの乳酸生産に取り組んだ。本

経路の最終ステップとなるピルビン酸から乳酸へのNADH依存的還元反応は通常、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)によって触媒されるが、*Thermus thermophilus*由来LDHは、数十~数百 μ Mオーダーの NAD^+ 存在下で顕著に阻害を受け、同経路内ではほとんど機能しないことが明らかとなった。そこでわれわれは、同細菌よりLDHと同様の反応を触媒可能な別の酵素を探索し、リンゴ酸/乳酸デヒドロゲナーゼ(MLDH)を選抜した。生きた細胞を用いない合成代謝工学では、転写・翻訳レベルでの調節作用に束縛されない物質生産が可能であることは言うまでもないが、このように異なる代謝経路(あるいは異なる微生物)に由来する酵素をアッセンブルすることにより、タンパク質レベルで作用するアロステリック調節をも回避できる点には着目すべきだろう。こうして構築されたキメラ型EM経路を用い、6 mMのグルコースから理論収率どおりの乳酸(すなわち12 mM)を生産させることに成功しており、この際のATPターンオーバー数は31と見積もられる。

おわりに

上記の最終生産物濃度からもおわかりいただけるとおり、現時点で筆者らが得ている成果と産業応用可能な生産レベルとの間にはまだまだ大きな隔たりがあり、今後取り組まなければならない課題は山積している。しかし、ATPを生産しないキメラ型EM経路が従来の代謝工学では構築できないものであったように、合成代謝工学は、これまでの方法論では乗り越えられなかったバイオプロセスの諸問題に新たな解決策を提供しうるものであると筆者らは考えている。

既存の地図(代謝経路)の上に新たな道を書き足したり、あるいは不要な横道を消し去ったりすることで出発地(基質)から目的地(生産物)への経路を最短化する手法が従来の代謝工学だとするならば、合成代謝工学は白紙のキャンバス上にフリーハンドで新たな地図をデザインしようというものである。そこにどのような地図を描き、どこへ向かうのかはわれわれ研究者のアイデアと努力に委ねられている。

文 献

- 1) Stephanopoulos, G. N. *et al.*: *Metabolic engineering: principles and methodologies*, Academic Press, San Diego (1998).
- 2) Welch, P. and Scopes, R. K.: *J. Biotechnol.*, **2**, 257 (1985).
- 3) 大島敏久, 櫻庭春彦: 蛋白質 核酸 酵素, **54**, 134 (2009)
- 4) Matsubara, K. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **81**, 1300 (2011).