

革新的なものづくり実現のための「合成生物工学」

石井 純¹・蓮沼 誠久¹・松田 史生²・近藤 昭彦^{3*}

再生可能な資源であるバイオマスから微生物発酵や酵素変換などのバイオテクノロジーを利用して化学品原料や高付加価値品を生み出すバイオリファイナリー・プロセスは、石油に依存した現代の社会構造を転換し、持続可能な社会を構築するための施策としてその実現が強く期待されている。しかし、現代社会の豊かなくらしを維持しながらバイオリファイナリー社会を実現していくためには、汎用化学品やファインケミカルの原料となる多種多様な化合物をバイオマスから大量に生産できる必要がある。とりわけ、我々の生活を支えるエチレンやベンゼンなどのバルクケミカルについては、石油由来製品と張り合えるだけのコスト競争力が求められており、バイオプロセスを実用化する上において最大の障壁となっている。

もともと自然界に存在する微生物が生産している化合物は多様かつ複雑な構造を有するものが多く、ごく一部の化合物を除いてその生産性は決して高いとは言えない。また、エンジニアリングプラスチックや機能性ポリマーなど高性能な製品が続々と開発されている現代社会においては、多様な構造のモノマー化合物が原料として必要とされており、自然界に存在する天然化合物だけはどうてい、すべてを賄うことはできない。これらのことから、遺伝子レベルの改変を施すことで高度に機能化された微生物をつくり出し、バイオマス原料から多様な化合物を大量に生産しようとする試みが盛んに行われている。たとえば、目的の化合物を生産する微生物において代謝の流れを変えてやることで生産性を大幅に向上させたり、植物や微生物が保有する特殊な代謝経路を移植することで本来生産しない化合物の生産や従来資化できないバイオマス原料の利用を可能にしたり、さらには、自然界には存在しない人工的な代謝反応を生み出すことで新たな化合物の生産を可能にする、といったさまざまな取組みが報告されている。

このように、標的とする化合物を大量に生産するよう改変され、あたかも工場かのごとく振る舞う微生物細胞は“microbial cell factories”とよばれ、その利用が期待されているが、現実には実用化されている例は少なく、産業化におけるハードルの高さが見え隠れしている。このことから、現代の多様なニーズに対応できるさまざまな化合物の生産を可能にするとともに、単位時間あたり

の生産性が高く、バイオマス原料（おもに糖成分）から理論収率に近いレベルで目的物を生産し、しかも化学触媒のように何度も繰り返し利用できる究極の微生物触媒を開発すること、つまり、コスト競争力の高い革新的なものづくりを実現することが産業化における第一の閑門であり、バイオリファイナリー・プロセスを社会に浸透させるための最重要かつ最難関の課題であるといえる。

こうした背景から、微生物代謝の機能を革新し、最適化するための技術が求められており、“合成生物工学”に注目が集まっている¹⁾。合成生物工学とは、細胞の機能を合理的にデザインするための学問であり、細胞内の代謝や転写を正しく理解するための分析技術やそれらを最適化するための予測ツールに加え、遺伝子の発現やタンパク質の局在/構造/修飾を制御できるツールなどを含んでいる。これらの技術開発を進めることで、これまでの微生物改変スキームは一新され、合理的なデザインに基づいて高度に機能を制御できる革新的な微生物の作出が可能となる。本稿では出芽酵母を題材に、合成生物工学に必要とされるツールの開発現状について解説する。酵母はエタノール発酵における実績があり、発酵時のさまざまなストレスに強く、研究開発のための基盤が整備されているなど、バイオプロダクションのための有望な宿主の一つである。そのため、エタノール以外のプロダクトを大量生産するために、合成生物工学的な代謝改変法の進展がもっとも望まれている宿主でもある。

代謝工学的アプローチ

キシロース代謝経路 キシロースはリグノセルロースバイオマスに含まれる糖の中でグルコースにつぐ主要構成成分であり、その利用はバイオリファイナリー・プロセスにおいて重要な課題となっている。しかし、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はもともとキシロースを資化することができず、キシロースを資化するためには *Scheffersomyces stipitis* 由来のキシロースレダクターゼ (XR) およびキシリトールデヒドロゲナーゼ (XDH) の導入や、*S. cerevisiae* 由来キシリロキナーゼ (XK) の過剰発現が必要となる²⁾。これらの導入によりキシロースを糖原料としたエタノール生産が可能となるが、XR と XDH の補酵素特異性はそれぞれ NADPH および

*著者紹介 ¹神戸大学自然科学系先端融合研究環重点研究部, ²大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻
³神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻 (教授) E-mail: akondo@kobe-u.ac.jp

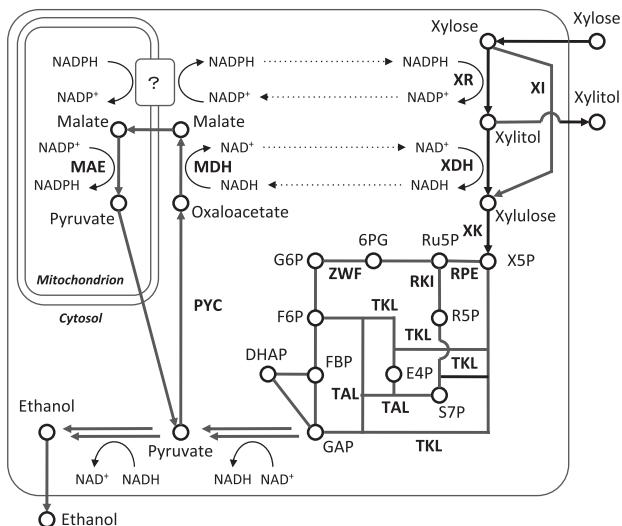


図1. *S. cerevisiae*におけるキシロース代謝経路の導入およびトランシスヒドロゲナーゼ様シャントの活性化

NAD⁺であり、酸化還元のアンバランスが原因となってキシリトールを副産物として大量に生産してしまうことが広く知られている(図1)。この問題を解決するための別の経路として、バクテリアや嫌気性細菌由来のキシロースイソメラーゼ(XI)を経由する経路が知られている²⁾(図1)。XIはキシロースをキシリロースへと1段階で変換する酵素であり、補酵素のアンバランスを回避することができるため、理論値に近いエタノール収率を達成することができる。しかし一方で、酵母内でのXIの活性が低く、XR/XDH経路に比べキシロースの消費速度が遅いという問題がある。

トランスヒドロゲナーゼ様シャント *S. cerevisiae* に導入したXR/XDH経路における酸化還元のアンバランスを解消するための手段として、トランスヒドロゲナーゼ様シャントの活性化が有効である³⁾。トランスヒドロゲナーゼ様シャントとは、リンゴ酸酵素 (MAE)、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MDH) およびピルビン酸カルボキシラーゼ (PYC) から成るシャントであり、ピルビン酸→オキサロ酢酸→リンゴ酸→ピルビン酸の変換反応を1周することで、トランスヒドロゲナーゼのようにNADH および NADP^+ を消費して NAD^+ および NADPH を生成することができる (図1)。*S. cerevisiae* は直接 $\text{NADH} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{NADPH}$ 反応を引き起こすトランスヒドロゲナーゼを持っておらず、バクテリア由来のトランスヒドロゲナーゼ遺伝子を発現させた場合にはエタノールではなくグリセロール量が増加することが報告されている⁴⁾。

そこで、*S. cerevisiae*由来の *MAE1*, *MDH2*, *PYC2* を

表1. トランスピドロゲナーゼ様シャント活性化株のキシロース消費速度およびエタノール生産速度

発現遺伝子	キシロース消費速度 (g l ⁻¹ h ⁻¹)	エタノール生産速度 (g l ⁻¹ h ⁻¹)
<i>Control-1</i>	2.03 ± 0.06	0.53 ± 0.01
<i>MAE1</i>	2.60 ± 0.05	0.82 ± 0.05
<i>Control-2</i>	2.28 ± 0.14	0.73 ± 0.02
<i>MAE1/MDH2</i>	3.22 ± 0.07	1.03 ± 0.01
<i>Control-3</i>	2.41 ± 0.05	0.68 ± 0.03
<i>MAE1/MDH2/PYC2</i>	4.37 ± 0.03	1.16 ± 0.02

*宿主：XR/XDH/XK導入 *S. cerevisiae* YPH499株

表2. トランスヒドロゲナーゼ様シャント活性化株の消費キシリトースあたりの生産物の収率

発現遺伝子	消費キシロースあたりの収率 (g g ⁻¹)		
	エタノール	グリセロール	キシリトール
<i>Control-1</i>	0.31 ± 0.01	0.01 ± 0.002	0.28 ± 0.02
<i>MAE1</i>	0.38 ± 0.01	0.02 ± 0.004	0.19 ± 0.01
<i>Control-2</i>	0.33 ± 0.01	0.01 ± 0.002	0.30 ± 0.004
<i>MAE1/MDH2</i>	0.39 ± 0.003	0.03 ± 0.003	0.20 ± 0.003
<i>Control-3</i>	0.31 ± 0.02	0.01 ± 0.002	0.27 ± 0.01
<i>MAE1/MDH2/PYC2</i>	0.27 ± 0.003	0.06 ± 0.004	0.42 ± 0.01

*宿主：XR/XDH/XK導入 *S. cerevisiae* YPH499 株

それぞれ過剰発現して内因のトランシヒドロゲナーゼ様シャントを活性化させることを試みたところ、すべての株においてキシロース消費速度とエタノール生産速度が向上した(表1)。また、*MAE1*過剰発現株および*MAE1/MDH2*過剰発現株においては、キシリトール収率の大幅な減少とエタノール収率の増加が確認されたため、*XR/XDH*経路における酸化還元のアンバランスが緩和されたことが示唆された(表2)。一方、*MAE1/MDH2/PYC2*過剰発現株においては、キシロース消費速度とエタノール生産速度は劇的に向上していたものの、消費糖あたりのキシリトール収率の増加とエタノール収率の減少が見られた(表1,2)。これは、*PYC*の過剰発現により、シャント経路のサイクルが余剰に活性化されすぎたことが原因と考えられる。*S. cerevisiae*由来の*Mae1*はミトコンドリアに局在していると報告されており、再生されたNADPHは何かしらのシャトルを介してミトコンドリアから細胞質へと運び出されているものと推察される(図1)。このNADPHの運搬に関わる酸化還元シャトルは現時点では未同定ではあるものの、トランシヒドロゲナーゼ様シャントの活性化が*XR/XDH*以外の酸化還元アンバランスにも効果があることはすでに確認している(未発表)。これらのことから、トランシヒドロゲナーゼ様シャントの活性化は、補酵素バランスを調整するため

の非常に強力な合成生物学用ツールといえる。

イソブタノール生合成経路 2008年にLiaoらのグループから、大腸菌にエールリッヒ（Ehrlich）経路を導入することで、各種のアミノ酸生合成経路からさまざまなアルコール類を生産できることが報告された⁵⁾。そのうちの一つであるイソブタノールは、ガソリン代替のバイオ燃料として実用化が進められているエタノールに比べて、吸湿性が低いため既存のタンクや流通インフラに対応しやすく、エネルギー密度も高いというメリットがある。さらに、イソブタノールは脱水してイソブチレンにすることで、メタクリル酸メチルやイソプレンなどの樹脂や合成ゴムなどのポリマー原料になるだけでなく、バイオディーゼル燃料やバイオジェット燃料の構成要素としての利用も期待されている。

イソブタノールは、エールリッヒ経路を構成する2-ケト酸デカルボキシラーゼ（KDC）とアルコールデヒドロゲナーゼ（ADH）の触媒反応によって、バリン生合成経路の中間体である2-ケトイソ吉草酸から生産することができる（図2）。もともと*S. cerevisiae*においては、フーゼルアルコールとして少量ではあるもののイソブタノールを生産することが古くから知られており、工業化に有利な酵母においてイソブタノール生産量を劇的に上げることができれば、次世代のバイオアルコール生産プロセスとして非常に有力な候補となる。そのため、我々は酵母*S. cerevisiae*を宿主として、遺伝子組換えを利用した代謝工学的アプローチによるイソブタノール高生産株の構築に取り組んでいる。

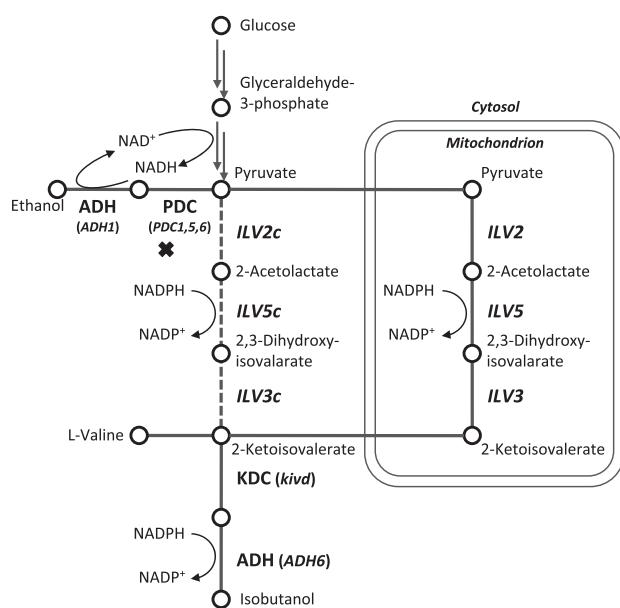


図2. *S. cerevisiae*におけるイソブタノール生合成経路

図2の経路に示すように、KDCとADH遺伝子を過剰発現してエールリッヒ経路を強化したり、ピルビン酸デカルボキシラーゼ（PDC）の一部のアイソザイムを破壊してエタノールへの炭素フラックスをバリン生合成経路へと引き抜くことでグルコースからのイソブタノール生産量は野生株よりも増加した⁶⁾。また、酵母の場合ミトコンドリアを経由するバリン生合成経路の酵素群（Ilv2, Ilv5, Ilv3）について、ミトコンドリア局在シグナルを削除した改変酵素（Ilv2c, Ilv5c, Ilv3c）を作製することで、細胞質を経由して機能するバリン生合成のための人工合成経路の構築にも成功した⁷⁾。*S. cerevisiae*において基本的に必須であるエタノール生産経路の存在により、現時点ではイソブタノール生産量はまだエタノール量を上回っていないが、酸化還元バランスの調節など合成生物学によるデザインを洗練していくことで、エタノールをまったく作らないイソブタノール高生産株の開発を目指している。

分析・予測ツール

細胞内の代謝や転写などの挙動を理解するための分析技術であるメタボロームやトランスクリプトームは、代謝状態の実測に基づいて微生物発酵における問題点や律速点を見つけることができる^{8,9)}。また、細胞内の代謝フラックスを予測し、最適化するための計算手法も近年活発に開発されており¹⁰⁾、これらの技術は細胞や代謝の改変戦略を合理的にデザインする上で重要なツールとなる。本稿では紙面の都合上詳細は割愛するが、これらの利用により微生物触媒の開発にかかる時間を大幅に削減し、成功率を上げることができるとして大きく期待されている。

遺伝子発現・制御ツール

遺伝子破壊ツール *S. cerevisiae*は相同組換え効率が高く、標的遺伝子を選択マーカー配列と置換することで、比較的簡単にゲノム上の遺伝子を破壊することができる。また、Cre-loxP組換えシステムなどによりマーカー配列をポップアウトすることで、繰返し遺伝子破壊を行うことも可能である¹¹⁾。しかし、このシステムはポップアウト後にloxP配列が残るため、同一染色体上で距離の近い遺伝子を複数破壊する場合には予期せぬゲノム領域の脱落が起こる場合がある。一方、Akadaらが開発したシームレス遺伝子破壊法（マーカーリサイクル法）は、酵母のゲノム配列自体をポップアウト用の相同配列として利用するため、余計な配列は一切残らず遺伝子を破壊することができる¹²⁾（図3）。5-フルオロオロチニ酸（5-

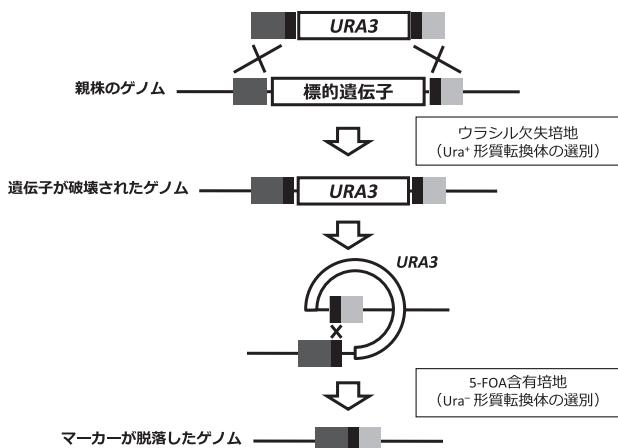


図3. シームレス遺伝子破壊法（マーカーリサイクル法）

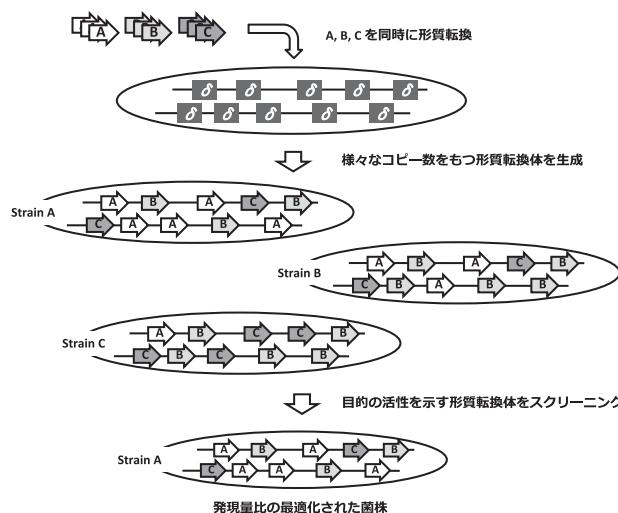


図4. カクテルδインテグレーション法

FOA) 含有培地によるカウンターセレクションが可能な *URA3* 選択マーカーを利用することで、標的遺伝子の配置によらず繰り返し遺伝子破壊が可能な手法である。

マルチ遺伝子発現ツール 既述のとおり、酵母の代謝機能を改変するためには、複数の遺伝子発現が必要なケースが多々存在する。真核生物である *S. cerevisiae* は、ポリリストロニックな発現が可能な原核生物と異なり、基本的に一つのプロモーターで一つの遺伝子しか発現することができない。そのため、何種類かのアミノ酸選択マーカーや薬剤選択マーカーを持つ各種の発現ベクターセットを準備することは、デザインした代謝改変戦略を実行する上で必要不可欠なツールである。我々は *PGK1* プロモーターをもつ *S. cerevisiae* 用の発現ベクターセットとして¹³⁾、ゲノム組込み型の pGK40x、シングルコピー型の pGK41x、マルチコピー型の pGK42x (x=1~6、各種アミノ酸マーカー) をナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP, <http://yeast.lab.nig.ac.jp/nig/index.html>) の酵母部門に寄託しているので、是非ご利用いただけると幸甚である (NBRP_ID : BYP7357~BYP7373)。その他、一つのベクターで2種類の遺伝子を発現できる誘導発現型の *GAL1/GAL10* プロモーターをもつ市販の pESC ベクター (Stratagene/Agilent Technologies, Inc.) や、バイリストロニックな mRNA 発現を可能にする IRES (internal ribosome entry site) などの配列も利用できる。

上記以外の複数遺伝子の発現方法として、カクテルδインテグレーション法を紹介する¹⁴⁾。まず、δインテグレーション法とは、*S. cerevisiae* の染色体上に存在する *Ty* レトロトランスポゾンのδ配列を標的として、複数コ

ピーの遺伝子発現カセットを導入する手法である。この改変手法であるカクテルδインテグレーション法は、異なる酵素をコードしている複数種類の遺伝子発現カセットを準備し、δ配列を標的として酵母を同時に形質転換することで、各遺伝子についてコピー数の異なるさまざまな形質転換体を1ステップで取得できる手法である (図4)。本手法では、得られた形質転換体から目的活性の高い株をスクリーニングすることで、複数の遺伝子について発現比率が最適化された株を簡単に取得することができる (図4)。各酵素遺伝子の発現量や導入されたコピー数を調べることで、合理的な遺伝子導入のデザインとしても活用できるため、より目的化合物の生産性の高い株をベースとした安定株の樹立にも利用できる。

発現制御ツール 微生物代謝における合理的なデザインを具現化するためには、転写の発現時期や発現量を厳密に制御する必要がある。既出の *GAL1/GAL10* プロモーターをもつ pESC ベクターは、ガラクトースによる誘導発現が可能な発現制御ツールとして有用である。グルコース存在下 (ガラクトース非存在下) において抑制因子である Gal80 は、転写因子である Gal4 に結合することで *GAL1/GAL10* プロモーターの発現活性を負に抑制している。一方、ガラクトースが誘導因子である Gal3 に結合し活性型へと構造が変化すると (Gal3*)、抑制因子である Gal80 が Gal4 から引き離され、フリーになった Gal4 が転写因子として働き、*GAL1/GAL10* プロモーターの発現を活性化するため、*GAL1* プロモーターの下流に目的遺伝子を挿入しておくことで、ガラクトース添加によるタンパク質発現誘導の制御が可能である (図5A)。

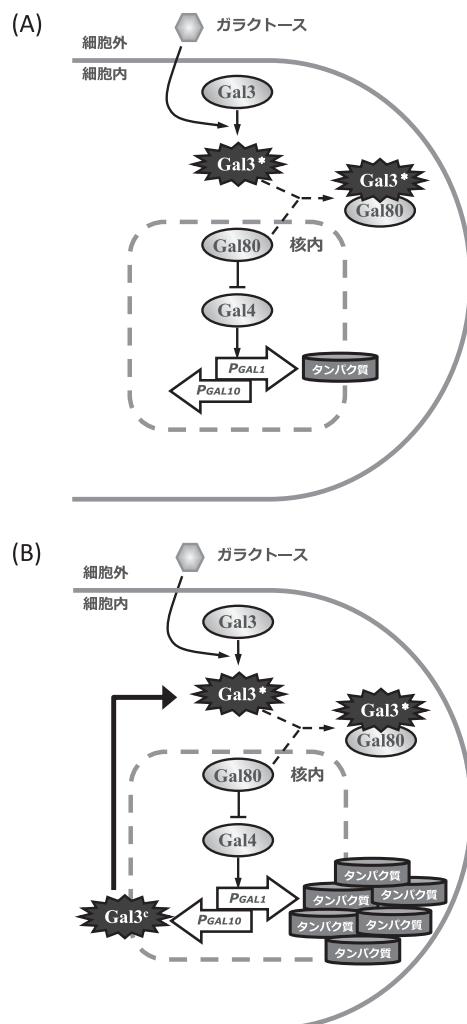


図5. ポジティブフィードバック発現制御系

このガラクトース誘導のメカニズムを利用し、ポジティブフィードバックによる新たな発現制御システムを開発した（投稿準備中）。*GAL10*プロモーターの下流にGal3の恒常活性型変異体であるGal3^cをコードする遺伝子を挿入しておくことで、ガラクトース添加に応答して*GAL1*プロモーター下流のタンパク質とともにGal3^cが発現する（図5B）。発現したGal3^cはGal80に作用してGal4をフリーにするため、さらに目的タンパク質とGal3^cの発現が誘導され、同様のループが繰り返される（図5B）。このループは正のフィードバックとして、一度誘導がかかると増幅が繰り返される遺伝子サーキット

として機能する。そのため、目的タンパク質の発現量増加を見込むことができ、また、少量のガラクトースでも十分な誘導が可能となるため、コスト競争力の高いものづくりに有効である。

おわりに

本稿で紹介した例を含め、各種の発現・活性の制御ツールを蓄積していくことで代謝モデルをより厳密に再現することが可能となり、代謝シミュレーションやフラックス解析により設計された合理的な代謝デザインを具現化し、革新的なものづくりを実現するための“合成生物工学”が完成する。たとえば、これらの技術を組み合わせていくことで、セルロースの糖化やキシロースの資化、さらにはプロダクトの生産や酸化還元バランスの補正を合理的に最適化するための数十以上の遺伝子を組込んだり破壊した酵母株の創製も、近い将来のうちに可能となるだろう。

合成生物工学は現在まだ発展途上であるが、逆にアイデア次第でバイオリファイナリー社会を実現する革新的な微生物を生み出すさまざまなチャンスが秘められた非常に魅力的な分野である。皆様の斬新なアイデアやチャレンジによって合成生物工学が完成へと導かれる期待している。

文 献

- 1) Kondo, A. et al.: *J. Biotechnol.*, **163**, 204 (2013).
- 2) Hasunuma, T. et al.: *Biotechnol. Adv.*, **30**, 1207 (2012).
- 3) Suga, H. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 1669 (2013).
- 4) Nissen, T. L. et al.: *Yeast*, **18**, 19 (2001).
- 5) Atsumi, S. et al.: *Nature*, **451**, 86 (2008).
- 6) Kondo, T. et al.: *J. Biotechnol.*, **159**, 32 (2012).
- 7) Matsuda, F. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 2139 (2012).
- 8) Hasunuma, T. et al.: *Microb. Cell Fact.*, **10**, 2 (2011).
- 9) Hasunuma, T. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **90**, 997 (2011).
- 10) Matsuda, F. et al.: *Microb. Cell Fact.*, **10**, 70 (2011).
- 11) Gueldener, U. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **30**, e23 (2002).
- 12) Akada, R. et al.: *Yeast*, **23**, 399 (2006).
- 13) Ishii, J. et al.: *J. Biochem.*, **145**, 701 (2009).
- 14) Yamada, R. et al.: *Microb. Cell Fact.*, **9**, 32 (2010).