

C1微生物代謝経路の省エネ型炭素固定系としての利用とその問題点

由里本博也・阪井 康能*

光合成によるCO₂固定反応に代表されるように、一般に炭素固定はエネルギーを必要とする反応である。資源循環型・低炭素社会の構築のためには、炭素循環の律速段階である「炭素固定」反応を高効率で活用するための技術開発が必要であり、温室効果ガス排出削減技術やバイオマス増産・利用技術においては、化学、工学、生物学に基づく多様なアプローチからの技術開発が進められている。人類が直接利用できる炭素資源には、石油・石炭を中心とする化石資源、光合成によってCO₂から得られるバイオマス、そして埋蔵量の豊富な天然ガスがあるが、これらの炭素資源を有効利用し、かつ、少ないエネルギー投入量で炭素資源として固定するための一つの有効な手段として、筆者らは、CO₂排出を最小限に抑え、エネルギー効率の高い生物生産系として、C1微生物とその代謝経路を利用する「省エネ型生物的炭素固定」を提唱している(図1)。

天然ガスやバイオマスに由来するメタン、メタノールなどの還元型C1化合物は、石油・石炭に替わる未来型天然資源として注目されている。自然界には、C1化合物を炭素源として利用する微生物(C1微生物;メチロトローフ)が広く棲息しており、二大温室効果ガスであるメタンとCO₂間の炭素循環(メタンサイクル)において、きわめて重要な役割を果たしている。このC1微生物の代謝経路では、CO₂よりもエネルギー準位の高いホルムアルデヒドを固定して細胞構成成分を合成しており、CO₂固定よりも少ない消費エネルギーで炭素固定が

可能である(図1)。本稿では、筆者らが行ってきた、C1微生物代謝経路を省エネ型生物的炭素固定系に活用する技術開発例を紹介する。

C1微生物代謝における炭素固定反応

C1微生物はその炭素源の利用性から、メタンを利用するメタン資化性菌と、メタノールを利用するメタノール資化性菌に分類することができる。メタン資化性菌は細菌であり、その多くが偏性メタン資化性細菌、すなわちメタン(あるいはメタノール)などのC1化合物のみを炭素源として利用できる。一方、メタノール資化性菌には細菌と酵母が存在し、C1化合物以外の化合物も炭素源として利用する通性C1微生物がほとんどである。C1微生物によるC1化合物代謝は、関与する酵素に多少の違いはあるものの、基本的な代謝経路は共通している。メタン資化性細菌はメタンからメタノールの酸化を担う酵素として、メタンモノオキシゲナーゼ(MMO)を持っている。続くメタノール代謝は、メタノールからホルムアルデヒドへの酸化であり、ホルムアルデヒドはエネルギーを得るための酸化経路(ギ酸を経てCO₂まで酸化される)と細胞構成成分を得るための資化経路の分岐点に位置する重要な代謝中間体である。このように、C1微生物は完全酸化されたCO₂よりもエネルギー準位の高いホルムアルデヒドを固定することができる(図1)。

C1微生物のホルムアルデヒド固定系路には、細菌のリブローズモノリン酸(RuMP)経路とセリン経路、酵母のキシロースモノリン酸(XuMP)経路の三つの経路がある(図2)。このうち、RuMP経路では、3-ヘキスロース-6-リン酸シンターゼ(HPS)および6-ホスホ-3-ヘキスロイソメラーゼ(PHI)の二つの鍵酵素によって、ホルムアルデヒドがリブローズ5-リン酸(Ru5P)にアルドール縮合によって固定され、生じたヘキシユロース6-リン酸(Hu6P)はフルクトース6-リン酸(F6P)へと異性化される(図3)。この一連の反応は、補酵素類やその他の低分子化合物を必要とせず、遊離のホルムアルデヒドを直接基質とする。HPSによるホルムアルデヒド固定反応の標準自由エネルギー変化(ΔG^0)は、 -25 kJ/mol と発エルゴンのであり、エネルギーを消費しない炭素固

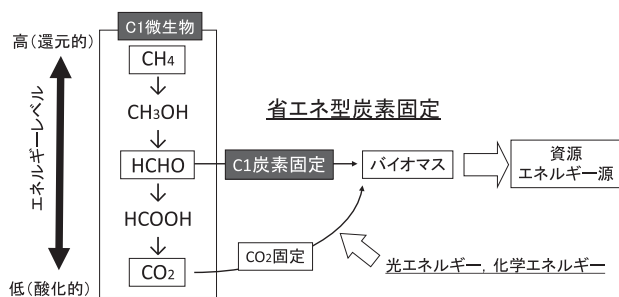


図1. C1微生物代謝経路を利用した省エネ型炭素固定

* 著者紹介 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻(教授) E-mail: ysakai@kais.kyoto-u.ac.jp

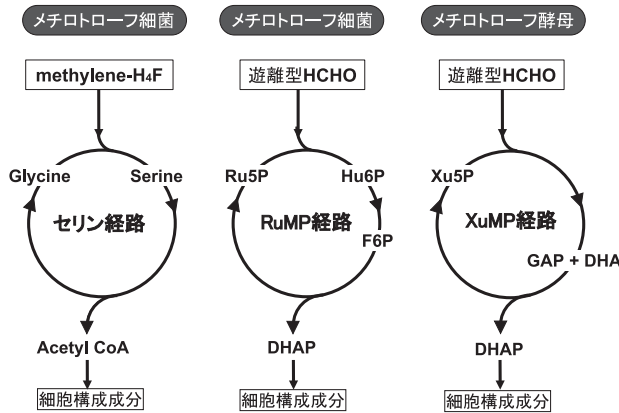


図2. C1微生物の炭素固定経路。物質名の略号：H₄F, tetrahydrofolate; Ru5P, ribulose 5-phosphate; Hu6P, hexulose 6-phosphate; F6P, fructose 6-phosphate; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; Xu5P, xylulose 5-phosphate; GAP, glyceraldehyde 3-phosphate; DHA, dihydroxyacetone.

定反応である。また、反応の基質であるRu5Pおよび生成物であるF6Pは、ペントースリン酸経路やカルビン回路の代謝中間体としてあらゆる生物に普遍的に存在するので、RuMP経路を持たない生物にも、HPSとPHIを導入するだけで、RuMP経路を構築することが可能である。これにより、異種生物内で新たな炭素固定反応を導入することが可能になり、ホルムアルデヒド資化能あるいは耐性を異種生物に付与することができる(図3)。

HPS-PHI人工融合酵素の創成と大腸菌での発現

HPSとPHIの遺伝子はメチロトロフ細菌に特有のものと考えられていたが、さまざまな微生物のゲノム解析の結果、メチロトロフ細菌だけでなく、非メチロトロフ細菌やアーキアにも広く存在することが明らかになった¹⁾。細菌ではほとんどの場合、*hps*, *phi* 遺伝子はオペロンとして存在するが、一部のメタン資化性細菌やアーキアでは、*hps*, *phi* 遺伝子が融合遺伝子として存在し、超好熱性アーキアのHPS-PHIが二機能性酵素として働くことを見いだした²⁾。*hps*, *phi* の異種発現のためには、1度の形質転換で遺伝子導入が可能な*hps-phi*融合型遺伝子の利用が効率的であるが、超好熱性アーキアのHPS-PHIは至適温度が高温のため、常温では活性を示さない。そこで、メタン資化性細菌*Mycobacterium gastris* MB19株由来の*hps*, *phi* を人工的に融合させた遺伝子を作製した³⁾。この*hps-phi* 遺伝子をpETシステムを用いて大腸菌内で発現させたところ、HPS-PHI人工融合酵素では、触媒効率が向上しており、大腸菌発現株のホルムアルデヒド耐性が向上した(図4A)。さらに、

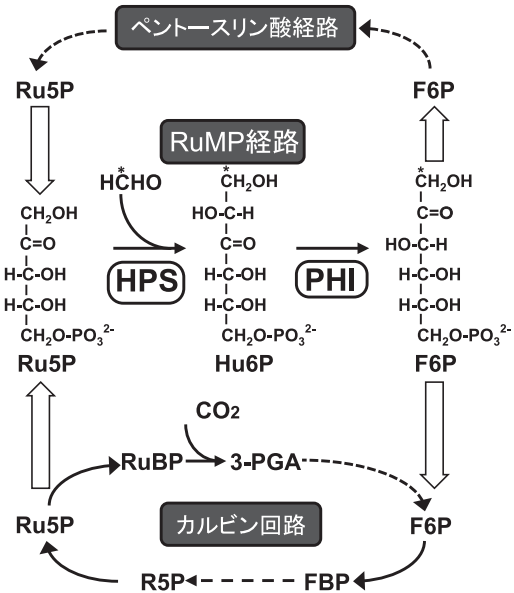


図3. RuMP経路とペントースリン酸経路およびカルビン回路の代謝融合。物質名の略号：R5P, ribose 5-phosphate; RuBP, ribulose 1,5-bisphosphate; 3-PGA, 3-phosphoglycerate; FBP, fructose 1,6-bisphosphate.

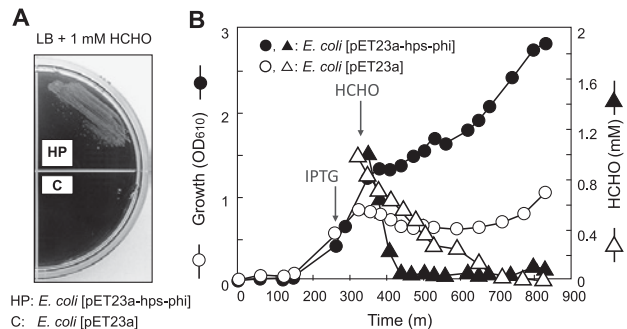


図4. RuMP経路の大腸菌への導入。(A) *hps-phi*発現株はHCHO耐性を示す。(B) *hps-phi*発現株ではIPTG添加後に1 mM HCHOを添加すると、HCHOの減少とともに増殖が観察されるが、コントロール株では、HCHO消費速度が遅く、増殖も見られない。

大腸菌発現株においては、LB培地にホルムアルデヒドを添加することで、ホルムアルデヒドが速やかに消費され、かつ菌体収量が増加したことから、異種生物へのホルムアルデヒド固定反応の導入が可能であることが明らかとなった(図4B)。

RuMP経路の植物への導入

RuMP経路とカルビン回路とは多くの代謝中間体を共有することから、植物へ*hps*, *phi* 遺伝子を遺伝子工学により導入して、葉緑体内でRuMP経路を構築し、カル

ビン回路をバイパスしてホルムアルデヒドが固定できると考えられた(図3)。まずはじめに、*M. gastris* MB19由来の *hps*, *phi* 遺伝子に葉緑体移行シグナルを付加した遺伝子を、シロイヌナズナとタバコに導入したところ、形質転換体植物ではホルムアルデヒド耐性および吸収能が増強された⁴⁾。さらに、形質転換作業の簡略化と触媒機能向上が認められた *hps-phi* 融合遺伝子を、観葉植物であるゼラニウムで発現させたところ、同様の効果が認められた⁵⁾。このようにホルムアルデヒドを吸収固定する形質転換植物の創成は、シックハウスの原因となるホルムアルデヒドの室内環境中からの除去に有効な技術としても期待される。

植物のカルビン回路では、光エネルギーのインプットにより CO₂ 固定方向に代謝が起こるが、HPS-PHIを導入することにより、効率よく、ホルムアルデヒド固定反応が作動して、光合成と共役したホルムアルデヒドからの効率的炭素固定が可能となった。

一部のアーキアでは RuMP 経路が逆方向に機能する

HPS-PHIが触媒する反応は可逆反応であり、細胞内のエネルギー・代謝状態(基質の濃度バランス)によっては、炭素固定方向ではなく、その逆方向へも起こりうる(図5)。筆者らがアーキア由来のHPS-PHIとして初めて酵素学的諸性質を明らかにした超好熱性アーキア *Pyrococcus horikoshii* では、HPS-PHIが触媒する正・逆両反応の活性比は約7:1であり、逆反応の菌体内比活性が生理的に意義のあるレベルであることがわかった²⁾。そこで、HPS-PHI融合酵素を持つもののペントースリン酸経路が不完全な *Thermococcus kodakaraensis* KOD1株を用い、当該遺伝子を破壊して生育特性を調べた。遺伝子破壊株は最少培地に生育できず、培地中にヌクレオシドを添加した場合のみ生育可能であったことから、HPS-PHIがヌクレオチドの前駆体となるリボース5-リン酸(R5P)の生合成に必須であることを実証した⁶⁾。

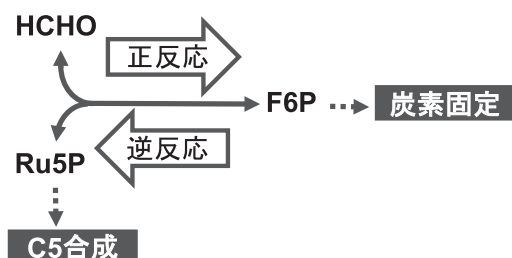


図5. RuMP 経路による炭素固定(正反応)とC5合成(逆反応)

このように、ペントースリン酸経路の不完全な一部のアーキアでは、RuMP 経路における炭素固定の逆反応が、R5P 供給のためのペントースリン酸経路を代替する核酸生合成経路として機能していることを明らかにした。

RuMP 経路の *Methylobacterium* への導入

上述のように RuMP 経路は、HPS-PHI の正反応が機能する炭素固定方向だけでなく、逆方向にも働くことができ、特にアーキアでは、五炭糖(C5)合成に導く逆反応に生理的意義があることがわかった(図5)。次に、同じ宿主内でも HPS-PHI を発現させた場合に、正逆両方向に代謝が進む例を紹介する。

メタノール資化性細菌である *Methylobacterium extorquens* は、セリン経路により C1 炭素固定を行い、メタノール培養時に生分解性プラスチックとして有用なポリヒドロキシアルカン酸(PHA)を著量蓄積できる。本菌で HPS-PHI を発現することにより、セリン経路と RuMP 経路を共存させ、炭素固定能の増強を試みた(図6)。

M. extorquens AM1 株のセリン経路酵素ヒドロキシピルビン酸レダクターゼ遺伝子(*hpr*)の欠損株は、メタノールに生育できない。この株に *hps-phi* 遺伝子を導入すると、メタノールでの生育が部分的に回復したことから、セリン経路欠損株では、RuMP 経路が炭素固定方向に機能し、RuMP 経路がセリン経路を代替できることがわかった⁷⁾。

次に、AM1 株の野生株に *hps-phi* 遺伝子を導入して、セリン経路と RuMP 経路を共存させた。*hps-phi* の発現には、セリン経路酵素セリン-グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼをコードする *sgaA* 遺伝子のプロモーターと、メタノールデヒドロゲナーゼの大サブユニット

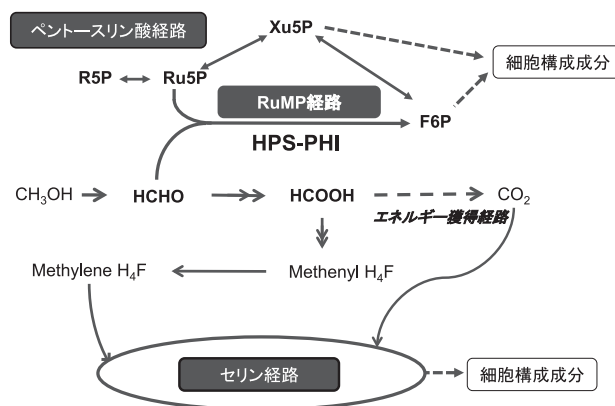


図6. メタノール資化性細菌における RuMP 経路とセリン経路の共存による炭素固定能の増強

をコードし、*sgaA*の20倍以上の発現量である*mxoF*遺伝子のプロモーターの、発現レベルの異なる二つのプロモーターを用いた。メタノールを単一炭素源とする培養では、*sgaA*プロモーター支配下で*hps-phi*を発現する株では、野生株と比較して菌体収量が向上したことから、RuMP経路とセリン経路の共存により、炭素固定能が増強されたと考えられる。一方、さらなる炭素固定能増強効果を期待した*mxoF*プロモーター支配下で*hps-phi*を発現する株では、野生株に比べて菌体収量が低下した。これは、HPS-PHIの高発現により、宿主内の代謝物およびエネルギーバランスに変化が生じ、炭素固定方向に代謝が進まなくなったためではないかと考えられた。そこで、この生育低下を補うことを目的として、HPS-PHI高発現により供給が不足することが予想されるR5Pおよびエネルギー源であるギ酸を培養液中に添加したところ、菌体収量が回復した⁸⁾。この結果は、細胞内のエネルギーレベル・代謝状態によって、炭素固定方向でなく、その逆方向(C5合成方向)に代謝が進んでいることを示唆する結果であり、*hps-phi*遺伝子の発現量や培養条件の検討などを、炭素固定方向に代謝を進めるために最適化する必要がある。

おわりに

以上のように、HPS、PHIが駆動するRuMP経路は、本来RuMP経路を持たない宿主に導入することが可能であり、その宿主内の代謝・エネルギー状態に応じて、炭素固定方向にもその逆方向にも機能することがわかった。多様な宿主にHPS-PHIを導入し、発現レベルや培養条件を最適化することにより、RuMP経路の進行方向を制御することができれば、直接的なC1炭素固定だけでなく、有用物質生産やバイオレメディエーションにも有効な新技術の開発が期待できる。

文 献

- 1) Yurimoto, H. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **84**, 407 (2009).
- 2) Orita, I. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **187**, 3636 (2005).
- 3) Orita, I. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **76**, 439 (2007).
- 4) Chen, L. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 627 (2010).
- 5) Song, Z. *et al.*: *Biotechnol. Lett.*, **32**, 1541 (2010).
- 6) Orita, I. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **188**, 4698 (2006).
- 7) 西山大介ら：日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 41 (2007).
- 8) 梶原大輔ら：日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 4C21a11 (2012).