

# 人工遺伝子回路の物質生産への応用

相馬 悠希・花井 泰三\*

生物は外部環境および細胞内の環境変化を感知し、これに応答して遺伝子発現を制御している。自然界には、このように複雑な遺伝子発現制御を担うシステムが数多く存在するが、その構成要素である生体分子パーツのいくつかはすでに同定されており、それらを部分的に抽出してモデル微生物において人為的に再構成することができる。「合成生物学」の分野では、このような既知の生体分子パーツを組み合わせて設計・再構成された遺伝子発現制御システムを「人工遺伝子回路」と呼び、概日リズムや細胞間コミュニケーションなどの生物特有の現象を担う遺伝子発現制御システムの特性や設計原理の解明を目的に用いられてきた。一方で、人工遺伝子回路は、設計次第で標的遺伝子に望みの動的挙動を与えることができることから、代謝制御やバイオセンサーの構築などのさまざまな生物工学分野への応用が期待されている。本稿では、人工遺伝子回路の物質生産への応用について、筆者らが構築した自律的な代謝流束制御を行う遺伝子トグルスイッチを例にあげて解説する。

## 合成代謝経路と菌体増殖のトレードオフ

再生可能資源であるバイオマスから、さまざまな有用化合物をバイオプロセスを用いて生産するバイオファインリーは、持続可能な社会づくりのために、その実現が望まれている。現在、化石資源由来で供給されている多用な化合物を、自然界に存在する微生物のみで生産することは非常に困難であり、新たな生産菌の構築が望まれる。

微生物により生産可能な化合物の拡大に向けては、すでに多くの「合成代謝経路」の構築が進められている。合成代謝経路とは、異種生物由来の遺伝子を組み合わせで構築される人工的な代謝経路であり、これを大腸菌や酵母などのホストに導入することで、これまでに多様な化合物の生産が可能となっている<sup>1)</sup>。一方で、工業生産レベルでこのような化合物を生産するためには、まだまだ生産性の向上が必要である。

これまでに報告されている合成代謝経路の多くは、解糖系末端の代謝物であるホスホエノールピルビン酸、ピルビン酸、アセチルCoAなどを起点として構築されている。これらの代謝物は、TCA回路やアミノ酸合成、

脂質合成に利用される中間代謝物であり、菌体増殖に欠かせない代謝物である。つまり、多くの合成代謝経路は菌体増殖と直接的競合関係にある。一般的に代謝工学の分野では、物質生産と競合する経路に関する遺伝子をゲノム上から欠損させることで、目的物質の生産性の向上を図る。しかし、従来の遺伝子ノックアウトによる代謝工学では、上記のようにその欠損が著しい菌体増殖の低下を招く遺伝子は改変対象から排除せざるを得ず、物質生産と菌体増殖のトレードオフ関係を解消することできない<sup>2)</sup>。我々は、人工遺伝子回路を用いた遺伝子発現制御を行い、「菌体増殖に適した代謝状態」と「物質生産に適した代謝状態」を人為的に切り替えることでこの問題を解決することを試みた。

## 遺伝子トグルスイッチによる遺伝子発現の抑制

対立する2つの異なる代謝状態を培養過程の任意のタイミングで切り替えるために、我々は「遺伝子トグルスイッチ」<sup>3)</sup>とよばれる人工遺伝子回路に着目した。遺伝子トグルスイッチとは、λファージの溶原化と溶菌の切り替えを行う遺伝子発現制御システムを模倣して人為的に再構築された人工遺伝子回路である。この回路は、二つのグループの遺伝子発現について、一方のグループの遺伝子が発現した際は、もう一方のグループの遺伝子発現は抑制されるように制御される。

TCA回路は、アセチルCoAを利用し、エネルギーやアミノ酸生産を行う重要な代謝経路であり、最小培地では細胞増殖に必須である。このような「TCA回路依存的な菌体増殖」と「アセチルCoAを利用する物質生産」は、どちらもアセチルCoAを利用するため、対立する2つの異なる代謝状態として考えられる。そこで、我々は、十分な菌体密度を得た後にTCA回路への代謝流束を遮断することで、物質生産に利用可能な細胞内アセチルCoA濃度を向上させるための遺伝子トグルスイッチを設計した<sup>4)</sup>。

TCA回路の初発反応を行うクエン酸合成酵素 (citrate synthase: CS) の発現量を制御するため、その酵素遺伝子 *gltA* の発現制御のための遺伝子トグルスイッチを構築した(図1A)。この回路は、恒常的に発現するリプレッサー LacI によって発現抑制された  $P_{LlacO_1}$  プロモーター

\*著者紹介 九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門(准教授) E-mail: taizo@brs.kyushu-u.ac.jp

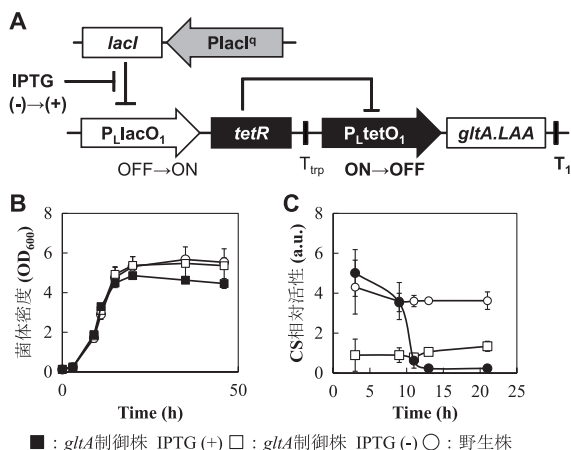


図1. 遺伝子トグルスイッチによる *gltA* 制御. ■: *gltA* 制御株 IPTG(+), □: *gltA* 制御株 IPTG(-), ○: 野生株

の下流に、P<sub>L</sub>tetO<sub>1</sub> プロモーターのリプレッサーである *tetR* を挿入し、P<sub>L</sub>tetO<sub>1</sub> プロモーターの下流に *gltA* を挿入してある。このため、IPTG 添加前は P<sub>L</sub>tetO<sub>1</sub> 下流の *gltA* が発現し、IPTG 添加によって P<sub>L</sub>lacO<sub>1</sub> 下流の *tetR* が発現すると、P<sub>L</sub>tetO<sub>1</sub> 下流の *gltA* の発現が抑制される。さらに、IPTG 添加後、速やかな TCA 回路の遮断を実現するために、LAA タグと呼ばれる分解促進配列を付加した。この回路を *gltA* 欠損株に導入し、*gltA* 制御株とした。*gltA* 制御株は IPTG 非存在下では野生株と同等の生育を示した。また、対数増殖期中期（培養開始後 9 h；図 1B）に IPTG を添加したところ、速やかに CS 活性が低下し、最終的に野生株と比較して 93% 以上の CS 活性の低下が認められた（図 1C）。この際、TCA 回路前半の代謝物であるクエン酸および  $\alpha$ -ケトグルタル酸濃度は野生株と比較して 96% 以上低下し、細胞内のアセチル CoA 濃度は 3.2 倍に向上した。このように、遺伝子トグルスイッチを用いることで菌体増殖に重要な代謝経路を培養の任意のタイミングで遮断し、物質生産の起点となる目的の中間代謝物濃度を向上させることができた。

## 代謝トグルスイッチによるイソプロパノール生産

TCA回路の遮断により増加した細胞内アセチルCoAを実際の物資生産に利用するため、モデルケースとしてイソプロパノール (IPA) 生産合成代謝経路<sup>5)</sup>を*gltA*制御株に導入した。IPAはバイオプラスチックの原料として利用可能なアルコールであり、アセチルCoAを利用する合成代謝経路によって生産される。IPA生産合成代謝経路遺伝子をP<sub>1</sub>lacO<sub>1</sub>プロモーターの支配下に置くことで、IPTG添加前は、*gltA*制御株同様に*gltA*遺伝子が発現し、IPTGを添加すると*gltA*の発現抑制と同時にIPA生産合成代謝経路の遺伝子が発現する設計とした。

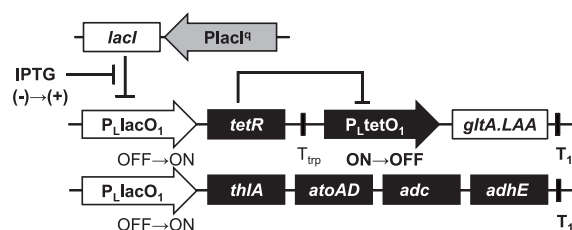


図2. 代謝流束制御のための遺伝子トグルスイッチ

表1. 代謝流束制御時の菌体密度とIPA生産性の関係

| 誘導時間<br>(h) | 誘導時菌体密度<br>(OD <sub>600</sub> ) | IPA生産量<br>(mM) | 比増殖速度<br>(h <sup>-1</sup> ) |
|-------------|---------------------------------|----------------|-----------------------------|
| 0           | 0.1                             | 45.7           | 0.07                        |
| 6           | 0.5                             | 48.3           | 0.21                        |
| 9           | 1.6                             | 50.9           | 0.20                        |
| 12          | 3.6                             | 38.1           | 0.22                        |
| 15          | 5.3                             | 20.5           | 0.23                        |
| コントロール株     | 0.5                             | 13.7           | 0.21                        |

(図2)。この回路では、グルコースからアセチルCoAを経てTCAサイクルに流れる代謝流束を、IPTG添加により、IPA生産合成代謝経路への代謝流束に転換することが可能となる。この株を代謝トグルスイッチ株とした培養過程でのTCA回路の遮断は、菌体あたりのIPA生産性を高めるが、それ以降の菌体増殖の低下を招くため、IPTG添加のタイミングが早すぎると十分な菌体量が得られず、結果としてIPA生産量の増加は期待できない。逆にIPTG添加のタイミングが遅すぎると代謝流束制御を行わない従来のIPA生産株（コントロール株）と同等の菌体増殖が期待されるが、IPA生産量では十分な差が観測されないと予想された。そこで、代謝トグルスイッチ株に対してさまざまなタイミングでIPTGを添加し、IPA生産量を比較した(表1)。培養開始直後にIPTGを添加した場合では、著しい菌体増殖の低下が見られたものの、最終的なIPA生産量はコントロール株の3.3倍まで向上した。最適なタイミング( $OD_{600} \sim 1.6$ )でTCA回路を遮断した場合では、IPA生産量はコントロール株の3.7倍、対グルコース収率は3.1倍まで向上した(表1)。このように、代謝トグルスイッチによる代謝流束制御は、十分な菌体密度を担保しながら中央代謝経路の余剰な代謝流束を物質生産に転用するために非常に有用な合成生物工学的ツールと言える。

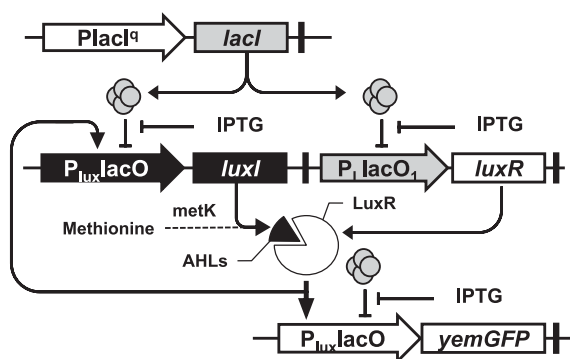


図3. Lux システムを改良した菌体密度センサー回路

### 菌体濃度センサーによる自律的代謝流束制御

代謝トグルスイッチを用いた代謝流束制御では、その効果を最大限に引き出すために、代謝流束制御のタイミングが非常に重要となる。そのために、前出のIPA生産実験では、菌体密度を指標として代謝流束制御のためのIPTG添加のタイミングを最適化した。しかし、実際の生産過程においてこの方法を行うためには、菌体密度を断続的にモニタリングし、誘導剤を添加しなければならない。このような人為的な誘導操作をなくし、大腸菌による自律的な代謝流束制御を実現するために、筆者らは大腸菌においてクオラムセンシング機構 (quorum sensing: QS) の再構築と改良に取り組んだ<sup>6)</sup>。

QS機構は微生物が互いの菌体密度を感知して相互に遺伝子発現を制御し合うシステムであり、筆者らはもっとも研究されたQSの1つである *Vibrio fischeri* 由来のLuxシステム<sup>7)</sup>を大腸菌内で再構成した(図3)。Luxシステムでは、LuxIによって合成される自己誘導剤アシルモホセリンラクトン (AHL) が細胞間を拡散し、転写調節因子LuxRと結合する。このAHL-LuxR複合体が $P_{lux}$ プロモーターを活性化することで、下流の遺伝子発現が誘導される。培養液中のAHL濃度は菌体増殖に伴って増大し、その濃度が閾値に達すると上記の遺伝子発現誘導が引き起こされる。AHL合成遺伝子である *luxI* は $P_{lux}$ プロモーター制御下にあり、ポジティブフィードバックでその発現が促進される。ただし、Luxシステムを大腸菌内に構築しただけでは、非常に低い菌体密度で動作する回路となることが知られている<sup>8)</sup>。そこで、QS依存的な遺伝子発現が誘導される菌体密度 (閾値菌体密度) を代謝流束制御の最適条件に調整するため、筆者らは $P_{lux}$ プロモーターの両端に *lacO* 配列を導入した $P_{lux}lacO$ プロモーターを構築し、AHL-LuxR複合体によるプロモーターへの結合をLacIリプレッサーによる立体障害により制限した。この合成Luxシステムでは、培養開始

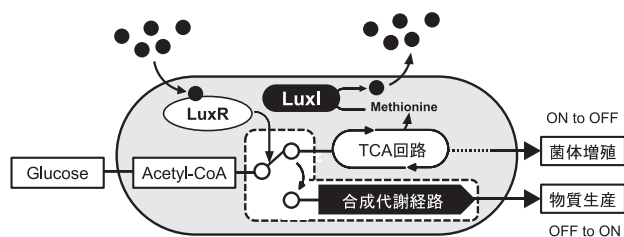


図4. 菌体密度センサーと代謝トグルスイッチによる自律的な代謝流束制御

時に異なる濃度のIPTGを添加することで、 $P_{lux}lacO$ プロモーター活性およびその制御下にあるAHL合成の速度が変化するため、QS依存的な遺伝子発現が誘導される閾値菌体密度を自由に調整可能な菌体密度センサーとして利用できる。このシステムを遺伝子トグルスイッチの $P_{lacO}$ 制御系と置換することで、任意の菌体密度で自律的に代謝流束制御を行うIPA生産大腸菌の構築に成功した<sup>6)</sup>(図4)。このように、在来環境感知システムを新規な人工遺伝子回路として再構築・改良することで、その機能を改変し、人為的な誘導操作に依存しない環境応答型の遺伝子発現制御・代謝流束制御システムを構築することができる。

### おわりに

本稿で紹介した遺伝子トグルスイッチは、もっとも単純なON/OFF回路の一つであり、さらに複雑な回路を利用することで、微生物による物質生産におけるさまざまな問題に対して、今までとはまったく異なる解決法を提案することが可能になると考えている。このような回路をデザインするには、実際の物質生産に関わる研究者が直面する課題と経験に基づいたアイデアが不可欠である。一方で、望みの回路を構築するためには、生体分子パーツを改変するためのタンパク質工学や回路の特性を予測するための数理モデル構築・システム解析の技術など、多分野にわたる専門的知見が必要となる。今後、合成生物学が複合的な研究テーマ発展の受け皿となりながら、持続可能な社会の形成に寄与していくものと期待される。

### 文 献

- 1) Jang, Y. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **109**, 2437 (2012).
- 2) Holtz, W. J. et al.: *Cell*, **140**, 19 (2012).
- 3) Gardner, T. et al.: *Nature*, **403**, 339 (2000).
- 4) Soma, Y. et al.: *Metab. Eng.*, **23**, 175 (2014).
- 5) Hanai, T. et al.: *AEM*, **73**, 7814 (2007).
- 6) Soma, Y. et al.: *Metab. Eng.*, **30**, 7 (2015).
- 7) Fuqua, C. et al.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 685 (2002).
- 8) Haseltine, E. L. et al.: *AEM*, **74**, 437 (2008).