

# 酸素を出さない光合成細菌の遺伝子工学的な有用物質生産

小林 淳平

## はじめに

読者の多くは光合成と聞いて何を思い浮かべるだろうか。小学校の理科で教わった、植物が水と二酸化炭素からデンプンを合成し、酸素を発生させるあの光合成を思い浮かべるのではないだろうか。この光合成は主に光化学系IIや光化学系Iから成り、光化学系IIによって水が分解され酸素が発生することから、酸素発生型光合成と呼ばれる。植物の他にもシアノバクテリアのような細菌も光合成を行い、大気中の酸素を生成するなど、太古から現在に至るまで、地球環境および生物の進化へ多大な影響を与え続けている。一方、酸素発生型光合成という呼称が存在することからも、“非”酸素発生型光合成も存在する。この非酸素発生型光合成は紅色硫黄細菌や緑色硫黄細菌などの光合成細菌が行い、これらの細菌は光化学系Iのみを持ち、酸素を生成しない。また、光化学系IIを持たないことから、酸素発生型光合成よりも原始的と考えられている。要するに酸素が存在しない嫌気的な条件で、酸素を発生させずに、二酸化炭素や有機物を光合成的に同化することができる。酸素発生型光合成と異なり、水を電子供与体として利用できず、硫化物や有機酸などを電子供与体として利用することは、一見して不利にも感じられるが、有機廃液を光合成的に処理できる利点がある。

この非酸素発生型の光合成を行う細菌は主に、紅色硫黄細菌、紅色非硫黄細菌、緑色硫黄細菌、緑色非硫黄細菌に大別され、なかでも紅色非硫黄細菌は物質生産の宿主として優れた特徴を持つ。まず、多くの緑色硫黄細菌および緑色非硫黄細菌は好熱性で、50°C台で生育するのに対して、多くの紅色硫黄細菌や紅色非硫黄細菌は中温菌であり、至適生育温度が30°C台である。また、多くの緑色硫黄細菌、緑色非硫黄細菌、紅色硫黄細菌は絶対嫌気性であるのに対して、紅色非硫黄細菌は通性嫌気性である。そのため暗所であれば好気的な増殖も可能で、光合成時にも厳密な嫌気条件を必要としない。さらに緑色硫黄細菌や紅色硫黄細菌と異なり、紅色非硫黄細菌は電子供与体として硫化物を必要とせず、有機物を炭素源かつ電子供与体として利用できる。このような性質から、

前培養や組換え用の菌体を得る場合は、LB培地のような一般的な培地で好氣的に培養できる。光合成的に培養する場合も厳密な嫌気条件が要求されず、たとえば培養ビンを培地で満たして封をするといった方法で十分培養でき、初心者でも取り扱いは容易である。

このように、紅色非硫黄細菌は取り扱いが容易で、有機物を光合成的にさまざまな有用物質に変換する特徴を持つことから、古くから物質生産の宿主として利用されてきている。本稿ではこの紅色非硫黄細菌と遺伝子工学的的手法を用いた有用物質の生産に関していくつか紹介したい。

紅色非硫黄細菌の研究史は古く、確認できる範囲で少なくとも1930年代にまで遡れる<sup>1)</sup>。古い文献の多くは電子化されておらず、文献の調査も困難であり、さらに古い報告もあるかもしれない。最初期の研究は光合成やそれに伴う電子伝達系の機構に関するものが多く、現在でもそのような基礎的な研究は報告され続けている。本稿で解説する紅色非硫黄細菌による有用物質生産は、1970年代に当時の京都大学の小林らや、東京都立大学の北村らによる廃水処理に関するテーマで、同細菌の応用研究に注目したことに端を発する<sup>2)</sup>。この生物的な廃水処理は、次第に活性汚泥を用いる手法が主流になっていったが、紅色非硫黄細菌は、水素、生分解性プラスチック（ポリヒドロキシ酪酸など）、5-アミノレブリン酸、カロテノイド類、ポルフィリン、ユビキノン（コエンザイムQ10など）、ビタミンB<sub>12</sub>といったさまざまな有用物質を生産することが明らかになり、次第にこのような物質生産に関する研究が増えていった。それにともない、遺伝子発現用のベクター構築<sup>3)</sup>、形質転換法の検討<sup>4)</sup>、相同組換えを利用した遺伝子破壊株の構築<sup>5)</sup>など、遺伝子工学の基礎的な研究も行われ、これらの知識やツールは今日でも活用されている。以降は紅色非硫黄細菌により生産できる有用物質別にまとめたい。

## 水 素

水素の生産ではまずヒドロゲナーゼを連想する読者もいるだろう。ヒドロゲナーゼはATP非依存型の酵素で、可逆的に水を分解して水素を発生させる。緑藻やシアノ

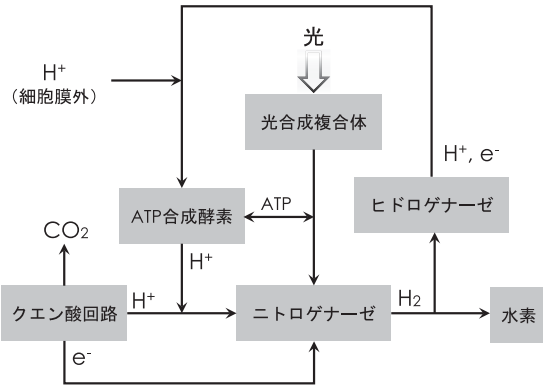
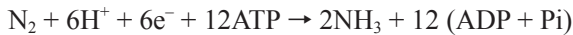
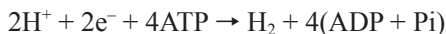


図1. 紅色非硫黄細菌の水素代謝概要図

バクテリアなどは主にこのヒドロゲナーゼによる水素生産を行う。一方、紅色非硫黄細菌が行う水素生産は、主にニトロゲナーゼが細胞内のH<sup>+</sup>（プロトン）を還元することによって行われる（図1）。ニトロゲナーゼはその名が示す通り、以下のように窒素からアンモニアを合成する、いわゆる窒素固定を触媒する酵素である。



しかし、ニトロゲナーゼは基質特異性が低く、細胞内が還元的かつ窒素源欠乏状態になると、細胞内の余剰な還元力を処理するために、以下のようにプロトンの水素へと還元して細胞外に排出する。



ヒドロゲナーゼによる水素生産は可逆的であるのに対して、ニトロゲナーゼによる水素生産は、光合成で供給されるATPを利用するため、不可逆的かつ高効率という特徴を持つ。

紅色非硫黄細菌による物質生産で、おそらく現在もっとも多く研究されているのはこの水素と思われる。これには環境やエネルギー問題への関心が高まっていることと無関係ではない。これまでの研究は培地組成、pH、培養温度、照度などといった培養条件の検討や、リアクターに関する研究報告が多く、本稿の趣旨である遺伝子工学的手法を用いた研究は意外と少ない。実はこれには理由がある。たとえばグルコースを炭素源としてエタノールを生産するのであれば、解糖系を経てグルコースから生成されたピルビン酸は、ピルビン酸脱炭酸酵素によってアセトアルデヒドに変換され、続いてアルコール脱水素酵素によってアセトアルデヒドはエタノールへと

変換される。つまり、エタノールという生成物へ収束する明確な代謝経路が存在するのである。一方水素生産では、細胞内のさまざまな代謝（主にクエン酸回路と考えられている）によって生成したプロトンが、前述のようにニトロゲナーゼによってATPを利用した還元を受けることで水素になると一般的に説明される。そのため、1か所の明確なプロトン発生源が存在せず、どの遺伝子を発現または破壊するべきかといった戦略を立てることが困難なのである。

そんな中でも遺伝子工学的な手法で水素生産に取り組んだ例もある。後述するポリヒドロキシ酪酸（PHB）はアセチルCoAのアセチル基が重合することで合成される。そのためPHBが合成されると、クエン酸回路へ回る分の炭素源が減少し、結果的にプロトンの生成も減少する。そこでクエン酸回路の起点であるアセチルCoAがPHB合成に流れなくするために、PHB合成酵素遺伝子を破壊することで、結果的に水素収率が向上したのである<sup>6)</sup>。他にも、図1に示されるように、ニトロゲナーゼによる不可逆的な水素生産では、可逆的な反応を触媒するヒドロゲナーゼは、むしろ排出された水素の取り込みを触媒する。そのため、紅色非硫黄細菌のヒドロゲナーゼ遺伝子を破壊することで、水素収率を向上させることができる<sup>5)</sup>。

筆者は博士後期課程の学生時に、紅色非硫黄細菌に酢酸を炭素源として水素生産をさせると、細胞内に多量のアセトアルデヒドが蓄積されることに気が付いた。そこでこの紅色非硫黄細菌にアルデヒド脱水素酵素遺伝子を発現させることで、酢酸からの水素生産を向上させることに成功した<sup>7)</sup>。当時の遺伝子工学的手法による紅色非硫黄細菌の水素生産研究では、前述のPHB合成酵素遺伝子の破壊や、取り込み型ヒドロゲナーゼ遺伝子の破壊、ニトロゲナーゼ遺伝子オペロンの転写活性化因子の発現といった報告しかなかった。そのため、図1に示されるニトロゲナーゼによる水素代謝やクエン酸回路とは一見して関連がなさそうな、このアルデヒド脱水素酵素遺伝子の発現によるアプローチは非常に画期的だった。また以前の研究で、紅色非硫黄細菌の色素減少変異株が親株よりも高い水素生産能力を獲得した例も報告されていることから<sup>8)</sup>、クロロフィルやカロテノイド類の合成経路遺伝子などを対象とした試みも期待できるかもしれない。近年では、ATP合成酵素を発現させることで水素生産を向上させるといった研究も報告されており<sup>9)</sup>、今後もさまざまなアプローチが展開されることを期待したい。

## ユビキノ

ユビキノンは紅色非硫黄細菌の細胞膜に存在し、光合成反応中心で電子伝達を行う重要な化合物である。商業的には補酵素QやコエンザイムQ10 (CoQ10) といった名前でも知られ、聞き覚えのある読者も多いのではないだろうか。経口摂取による抗疲労作用や抗老化作用など、さまざまな効能が報告されており、実際にサプリメントとして販売されている。そのため、大腸菌によるCoQ10生産が以前から研究されてきたが、収率が低い点や、さまざまな前駆体が蓄積するといった問題があった。前述のように光合成反応中心に存在することから、紅色非硫黄細菌はもともと高いユビキノ合成能力を持ち、ユビキノ発酵生産法の宿主として研究されている。前述の水素と異なり、明確な代謝経路が存在することから、ユビキノ合成に関与する遺伝子を高発現させることで、その収率を向上させることができる。

図2に示されるCoQ10代謝酵素の中で、UbiGが律速になっていることが以前から知られていたが<sup>10)</sup>、近年これら合成酵素遺伝子を網羅的に発現させることによって、UbiG以外にもUbiHとUbiFも律速になっていることが明らかにされた<sup>11)</sup>。また、非メバロン酸経路の各酵素遺伝子の発現量を最適化することで、デカプレニル二リン酸の供給を増やし、結果的にCoQ10の収率を向上させるといった試みもなされている<sup>12)</sup>。さらに興味深いアプローチとして、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水

素酵素遺伝子を発現させることで、細胞内を還元的な状態にしたり、ヘモグロビン遺伝子を発現させることで、細胞内を酸化的にしたりするなど、CoQ10が細胞内の電子伝達に関与することで、酸化還元バランスと密接に関わっていることを利用した報告もある<sup>13)</sup>。前述のように、水素生産においても、余剰な還元力の排出先としてプロトンが利用されていることなどを考えると、このような酸化還元バランスを意図的に変動させる戦略は、その他の物質生産にも十分応用可能と考えられる。

## PHB

前述の通り、PHBはヒドロキシ酪酸が重合した高分子であり、生物による分解が可能で、いわゆる生分解性プラスチックである。単純なプラスチックとしての用途だけでなく、生体内で加水分解する特性から縫合糸などにも利用されている。紅色非硫黄細菌内でのPHB合成は、図3で示されるように、PhbAによるアセチルCoAのアセチル基にアセチル基が転移する反応から始まり、PhbB、PhbCと3段階の反応を経て合成される。したがって、これらの遺伝子を高発現させることでPHB収率を向上させることができる<sup>14)</sup>。また、紅色非硫黄細菌によるPHB生産では酢酸を炭素源として利用した場合に収率が大きく向上することが知られていることから<sup>15)</sup>、たとえば、アセチルCoA合成酵素遺伝子を発現させるといったことでも収率の向上が見込める可能性がある。その他の研究例として、PHB合成制御タンパク質PhbRが

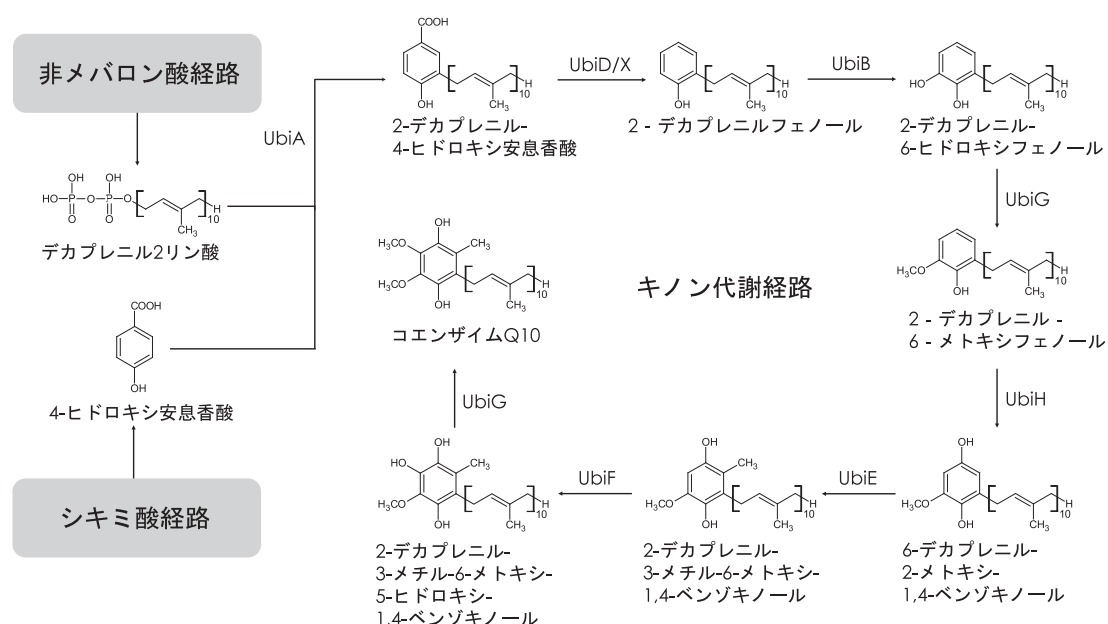


図2. 紅色非硫黄細菌のCoQ10代謝概要図

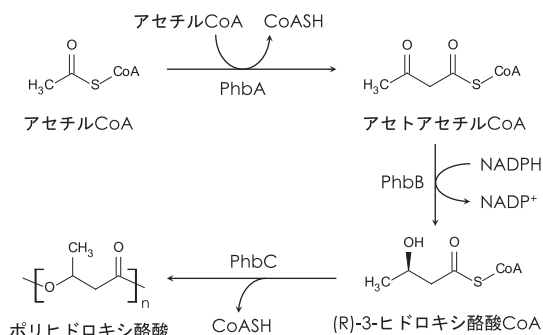


図3. 紅色非硫黄細菌のPHB代謝概要図

PHB合成遺伝子の転写抑制因子であることを同定するとともに、同遺伝子を破壊することで、PHB合成が向上した例もある<sup>16)</sup>。

### おわりに

本稿では水素の他にCoQ10やPHBにも焦点を当てたが、前述の通り、筆者はもともと紅色非硫黄細菌による水素生産を研究していた。しかし、紅色非硫黄細菌が水素以外のさまざまな物質を生産するという知識は持っていたものの、具体的な研究事例までは把握しておらず、本稿を執筆するにあたってさまざまな文献を調査すると、多くの研究が培養条件の最適化であり、遺伝子工学的な手法に限定すると、まだまだ報告が少なく、多くの可能性が残されていると感じた。光合成細菌を利用した物質生産を紹介する文献もいくつか見られたが、遺伝子工学的な手法の適用はこれからの課題である。

紅色非硫黄細菌の、光合成によって嫌氣的に多量のATPを供給できる性質を利用することで、本稿で紹介

した物質や、もともと生産することが知られている物質以外にもさまざまな物質生産に応用できる可能性は十分にあるといえるだろう。筆者自身も紅色非硫黄細菌の応用研究を今後の研究課題の一つとしていくつもりで、現在いくつかの研究を展開しているところではあるが、読者の中で紅色非硫黄細菌の応用研究に興味を持ち、さらには研究のテーマや足掛かりにしてくれる人がいてくれたら幸いである。

### 文 献

- 1) Roelofsen, P. A.: *Proc. Royal. Acad. Sci. Amsterdam*, **37**, 660 (1934).
- 2) 佐々木健ら: *生物工学*, **94**, 146 (2016).
- 3) Vasilyeva, L. *et al.*: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **77**, 337 (1999).
- 4) Fornari, C. S. and Kaplan, S.: *J. Bacteriol.*, **152**, 89 (1982).
- 5) Liu, T. *et al.*: *Int. J. Hydrogen Energy*, **35**, 9603 (2010).
- 6) Kim, M. *et al.*: *Int. J. Hydrogen Energy*, **31**, 121 (2006).
- 7) Kobayashi, J. *et al.*: *Int. J. Hydrogen Energy*, **37**, 9602 (2012).
- 8) Kondo, T. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **93**, 145 (2002).
- 9) Zhang, Y. *et al.*: *Int. J. Hydrogen Energy*, **42**, 9641 (2017).
- 10) Lu, W. *et al.*: *Biochem. Eng. J.*, **72**, 42 (2013).
- 11) Lu, W. *et al.*: *Metab. Eng.*, **29**, 208 (2015).
- 12) Lu, W. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **111**, 761 (2014).
- 13) Zhu, Y. *et al.*: *Enzyme Microb. Technol.*, **101**, 36 (2015).
- 14) Kranz, R. G. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3003 (1997).
- 15) Khatipov, E. *et al.*: *FEMS Microbiol. Lett.*, **162**, 39 (1998).
- 16) Chou, M. E. *et al.*: *Mol. Genet. Genomics*, **282**, 97 (2009).