

ミュータンス菌の特異な解糖系酵素を用いる アミノ酸生産菌レドックス代謝の再設計

信州大学 農学部 池田 正人



1. 研究の目的

多くの有用物質がその生合成の過程で還元力として NADPH を必要とする。このため、アミノ酸発酵においても、NADPH の供給強化は菌株改良の重要な視点になっている。既に、コリネ型アミノ酸生産菌では、NADPH の主な供給源であるペントースリン酸経路への代謝フローを高める育種が一般的な戦略になっており、種々の具体策が報告されている。しかし、その戦略では、発酵原料の 1 つであるフラクトースの炭素をペントースリン酸経路に向けることが難しく、加えて同経路では脱炭酸による炭素ロスが発生するといった欠点を伴う。特に後者は同経路への代謝フローを高めるほど炭素ロスが大きくなるというジレンマになっている。

近年、ゲノム情報により、*in silico* で全代謝マップを構築することが可能になった。既に多くの微生物で、その生命活動を支えている多様な代謝経路が構築されている。我々はその中にペントースリン酸経路が不完全な細菌がいることに目を留めた。このような細菌はグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (Gap) の段階で NADPH を産生する特異な解糖系を有していることが報告されている。もしそれを模した解糖系をコリネ菌で構築できれば、上記の問題をクリアして、より効率的な物質生産系が構築できるはずである。

その仮説を検証するため、一部の細菌がもつ特異な GapN 酵素を用いてコリネ菌のレドックス代謝の再設計を試みた。具体的には、う蝕菌 *Streptococcus mutans* (ミュータンス菌) の GapN 酵素を用いてコリネ菌の解糖系を再構築し、ペントースリン酸経路ではなく解糖系で NADPH を産生するミュータンス菌型のレドックス代謝系をもつアミノ酸生産菌の開発を目指す。

2. 研究計画と進捗

GapN 酵素は *Streptococcus* 属、*Clostridium* 属、*Bacillus* 属、および *Lactobacillus* 属の一部細菌が有する特殊な酵素で、解糖系全 10 段の反応のうち、6 段目の Gap 反応とそれに続くホスホグリセリン酸キナーゼ反応を一気にかつ不可逆に触媒する NADP 型酵素である (下図 B)。我々はミュータンス菌の GapN 酵素を題材に選び、ミュータンス菌型の解糖系を有するアミノ酸生産菌の開発を以下の手順で進めた。

1) コリネ菌の Gap 反応に預かる酵素を特定し、その生理的役割を解析する

我々はコリネ菌ゲノムに *gapA* のホモログを見出し *gapB* と命名している。この *gapB* は *gapA* と異なり、NADP 型のモチーフを有することから、その生理的意義を遺伝学的なアプローチにより解析した。その結果、NAD 型の GapA 酵素は解糖および糖新生の両方向に働くのに対し、NADPH 型の GapB 酵素は糖新生に働き、解糖方向の反応を行わないことがわかった (下図 A)。

2) 自前の GapB 酵素の改変の可能性を探る

狙いとする解糖系の構築を目指す前に、まず、自前の GapB 酵素で対応できないかを検討した。もし GapB 酵素の反応を解糖方向に改変できれば目的に沿う。*gapA* を破壊した *gapB* のみの菌株はグルコースで生育できないことを利用し、同株からグルコースで生育する変異株を誘導する方法で目的酵素の取得を試みた。そのような変異株は得られるものの、糖消費能は発酵生産に耐えうるレベルにはなく、実用的な *gapB* の改変は困難と判断した。

3) 自前の Gap 酵素をミュータンス菌の GapN に置換したコリネ菌を造成する

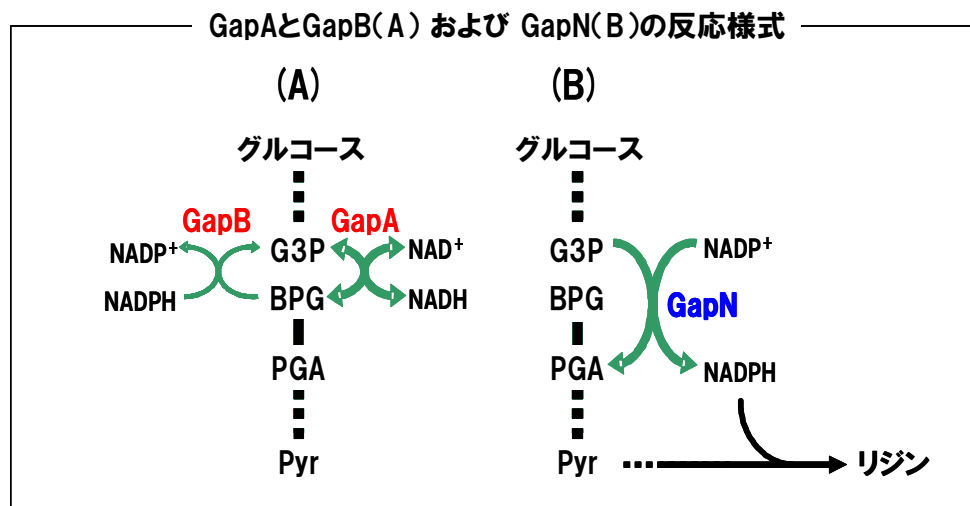
自前の酵素で対応することを断念し、モデルとする特異な代謝系を有するミュータンス菌の *gapN* 遺伝子を用いてコリネ菌の解糖系の再構築を試みた。コリネ菌の $\Delta gapB$ 株ベースに、その *gapA* をミュータンス菌の *gapN* で ORF 置換し、自前の *gapAB* に代えて *gapN* をゲノム上で発現する菌株を造成した。本株は残念ながらグルコースで十分に生育できなかったが、同株から生育良好なサプレッサー株が自然突然変異で出現することを見出した。その代表株 (RE2 株と命名) は NADPH 産生型の GapN 活性を保持していたことから、サプレッサー変異は不明なものの、我々の目的に沿う性質を維持していることが確認された。

4) GapN を発現する RE2 株のアミノ酸生産宿主としての性能を評価する

上記で得た RE2 株、ならびに元株である GapA 株の両者にリジン生産用プラスミドを導入して、各々からリジン生産菌を造成した。発酵試験で、RE2 株を宿主とした場合は GapA 株を宿主とした場合に比べて有意に高いリジン生産能が示された。RE2 株のゲノム上の *gapN* 遺伝子を *gapA* に戻すと、リジン生産能も元のレベルに低下することから、リジン生産能の向上は RE2 株に導入された未知のサプレッサー変異に因るのではなく、GapN に起因することが確認された。このリジン生産菌では、1 分子のリジン合成に必要な 4 分子の NADPH は、理論上、GapN を発現する解糖系ですべて賄われるため、脱炭酸を伴うペントースリン酸経路に依存しない代謝系になってリジン発酵収率が向上したと考えられる (下図 B)。

5) RE2 株のもつサプレッサー変異を特定する

RE2 株で認められた高いリジン生産能は、NADPH 産生型の解糖系に因ることは確かなものの、その効果を発揮するうえでサプレッサー変異の存在を見過ごすことはできない。そこで、RE2 株の全ゲノム解析により、その特定を試みた。その結果、サプレッサー変異は転写終結因子である *rho* 遺伝子の変異であることを突き止めた。



3. 今後の課題

現在までの研究で GapN を組み入れたコリネ菌は、期待通りの高いリジン発酵性能を有することが示された。しかし、アミノ酸生産宿主としてはなお生育速度に課題を有している。今後は、特定した *rho* 遺伝子変異が代謝系にどのような影響を及ぼしているのかを解析し、その知見を生育速度の一層の改良に役立てていく予定である。