

耐熱性酵素モジュールを用いたオンデマンド・バイオプロセスの開発

大阪大学大学院工学研究科 本田 孝祐



【略歴】

2003年3月 京都大学大学院農学研究科博士課程修了（農学博士）
2003年4月～2005年3月 京都大学大学院農学研究科 博士研究員
2005年4月～2009年5月 大阪大学大学院工学研究科 助教
2010年6月～現在 大阪大学大学院工学研究科 准教授

1. はじめに

細胞という微小コンパートメント内で、数千種類にもおよぶ酵素反応が同調的に進行し、多種多様な代謝産物を作り出す様は、さしずめミクロの化学コンビナートと比喻しても差支えなからう。このメタファーに則せば、近年、応用微生物学分野において強力な研究アプローチのひとつとなりつつある「代謝工学」は、微生物というミクロの化学コンビナートの生産ラインを合理的に改変し、われわれにとって都合のよい（発酵プロセスに適した）スーパー微生物工場を創出するものだと換言できる。

しかし残念ながら、代謝工学的手法に基づき設計・導入した改変が、期待どおりの生産性向上に結び付かない事例も少なくない。これは、われわれが特定の代謝産物の生産性増大を目論んで微生物ゲノムに人為的改変を加えようとも、その改変が彼らの生存・増殖にとって不利に働くものであった場合、何らかのセーフティーネットワークが発動し、改変の効果が打ち消されること（いわゆる「生命のロバスト性」）があるためである。

一方、筆者は、生きた細胞の代謝経路を改変するのではなく、モジュール化した代謝酵素を *in vitro* で自在に組み合わせ、物質生産に特化した人工経路をデザインする「合成代謝工学」なる技術を開発し、これを用いて既存の代謝工学が抱える諸問題を克服することを試みている。生命のロバスト性に起因する不確実さの問題の克服に加え、合成代謝工学が有するもう一つの利点は、本法が原理上、あらゆる代謝産物の生産に応用可能なオンデマンド性にある。本研究では、合成代謝工学が有するこれらの潜在的可能性を検証すべく、本法を用いた様々な有用化学品の選択的生産に取り組んだ。

2. 合成代謝工学とは？

単離酵素を組み合わせた *in vitro* での代謝経路の構築についてはすでに多くの報告がなされているが、ここで問題となるのは複数の代謝酵素を副反応を伴わないレベルにまで精製する操作の煩雑さにある。合成代謝工学ではこの煩雑さを回避するため、(超)好熱菌に由来する耐熱性酵素遺伝子を利用する。まず、耐熱性酵素遺伝子を大腸菌などの中温性宿主微生物内で過剰発現させる。得られた組換え菌を熱処理に供した後、触媒としてそのまま利用する。この結果、宿主由来酵素の大部分が熱変性により失活し、精製酵素と同レベルの高い選択性を有した生体触媒が容易に得られる。また安定性に優れた耐熱性酵素を触媒モジュールとすることにより、従来の *in vitro* 代謝システムの欠点のひとつであった酵素活性の低下による長時間反応への不適合性を回避できる。本法は、異種宿主内での機能的発現さえ可能であれば、あらゆる耐熱性酵素に対して適用可能である。従って代謝経路を構築する一連の耐熱性酵素をモジュール化し、これらを任意に組み合わせることによって化学品生産に特化した人工代謝経路を極めて簡便かつ自在に構築することが可能なる。

3. 合成代謝工学による ATP 非生産性キメラ型解糖経路の構築

端的に述べれば、代謝の生理的意義とは ATP や NAD(P)H などの補酵素を通貨としたエネルギーや還元力の獲得（異化代謝）と、ここで得られたエネルギーを利用した細胞構成物質の合成（同化代謝）に集約される。従って、天然の代謝経路の一部を無作為に「コピー&ペースト」しただけの合成経路では、補酵素の過不足による反応停止が避けられない。例えば解糖系の場合、真核・原核生物における

Embden-Meyerhof (EM) 経路を経れば、グルコース 1 分子あたり 2 分子の ATP が生産される（すなわち 2 分子の ADP が消費される）。これに対し、一部のアーキアが有する変形 EM 経路は、経路全体での化学量論式は原核生物型 EM 経路と一致するものの、ADP 依存型キナーゼなどの特異な補酵素要求性を有したユニークな酵素群からなることが知られている。筆者らは、変形 EM 経路中でリン酸非依存的に glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) を酸化する non-phosphorylating GAP dehydrogenase (GAPN) を原核生物型 EM 経路酵素群に組み込んだ ATP 非生産性キメラ型 EM 経路を *in vitro* で構築し、これを用いたグルコースからの乳酸生産に取り組んだ。この結果、6 mM のグルコースから理論収率どおりの乳酸（すなわち 12 mM）を生産させることに成功した。

4. キメラ型解糖経路を用いたリンゴ酸生産

次に筆者らは、上述のキメラ型解糖系に、ピルビン酸からリンゴ酸への NAD(P)H 依存的な炭酸付加反応を触媒する malic enzyme をカップリングさせ、グルコースからリンゴ酸への変換経路を作成した。必要最小限の酵素反応のみから代謝経路を再構築する合成代謝工学では、副反応や微生物の生育が生じず、一連の反応が単純な化学量論式で表現される。このため有機合成と同様、反応前後の自由エネルギー変化 ($\cdot G^0$) から熱力学的に収率を予測することが可能となる。Malic enzyme による炭酸付加反応は、 $\cdot G^0$ が正の値 (+7.3 kJ/mol) となる熱力学的に不利な反応である。一方、上述のキメラ型解糖経路によるグルコースからピルビン酸への変換反応では、本来 ATP の形で取り出される自由エネルギー変化がキャンセルされるため、通常の解糖系に比べてより大きな自由エネルギー変化 (-136 kJ/mol) を伴う。本経路と malic enzyme とのカップリングにより、下記の化学量論式に表されるとおり、経路全体のレッドクスバランスの合致と、炭酸固定方向への化学平衡シフトを両立させた経路をデザイン・構築した。



本経路を用いた生産実験の結果、4 時間の反応で、2.4 mM のグルコースより 3 mM のリンゴ酸を生産することが可能であった。

5. おわりに

ここに記した実施例の他にも、筆者らはすでに、第 3 世代バイオ燃料として注目されるブタノールやバイオプラスチック素材であるコハク酸生産のための *in vitro* 代謝経路構築に着手し、成果を得つつある。一方、各実施例で示された最終生産物濃度からもわかるとおり、現時点における合成代謝工学の力価は、まだまだ実生産に応用可能なレベルには達していない。しかしながら、これまでの研究を通じて、合成代謝工学のオンデマンド性が実証されつつあること、またその高度化に向けて今後取り組むべき課題が徐々に具体化されつつあることの手ごたえを感じている。

近年注目を集めるバイオリファイナリー分野に限定すれば、欧米諸国に比べ、やや遅れをとっているとの指摘も聞かれる日本の微生物・酵素利用技術ではあるが、技術要素とプロダクトの多様性にかけては、未だ他国の追随を許していない。これは、筆者のみならず同分野に携わるわが国の産学官の研究者の共通見解であろう。残された課題に真摯に取り組み、「Made in Japan」の新技术である合成代謝工学のさらなる高度化を達成することで、本技術をわが国の発酵製造業の強みである「多様性」のさらなる増強に資する新たなバイオプロセスプラットフォームへと成熟させたいと考えている。

謝辞

本研究は、大阪大学大学院工学研究科 生命先端工学専攻 生物化学工学領域で実施されたものである。研究の実施にあたり、ご指導・ご助言を頂戴した同領域の大竹久夫教授、岡野憲司助教をはじめ、共に研究に取り組んだ Ye Xiaoting 博士および学生諸氏に深く感謝いたします。