

# 酢酸菌の細胞表層を反応場とする高効率酸化的物質生産への 遺伝子工学研究

山口大学大学院創成科学研究科 薬師 寿治

## 【略歴】

1993年3月 山口大学農学部 卒業  
1995年3月 山口大学大学院農学研究科修士課程 修了  
1998年3月 東京大学大学院農学生命科学研究科博士課程後期 修了  
1998年4月 東京大学分子細胞生物学研究所 博士研究員  
1999年4月 バイエル薬品(株) 研究員  
2000年4月 名古屋大学大学院理学研究科 助手  
2005年10月 信州大学農学部 助教授  
2008年4月 山口大学大学院医学系研究科 准教授  
2016年4月 山口大学大学院創成科学研究科 准教授 現在に至る

## 細胞表層を反応場とする酸化的物質生産

酢酸菌は、特徴的な酸化的物質変換能を持ち、古くから酢酸発酵やビタミンC生産におけるソルボース発酵などに用いられてきた。これは、細胞質膜の外側で代謝を営むという特徴と、生産した代謝産物の資化能がない、もしくは非常に弱いという二つの特徴によって成り立つ。ここでは、酢酸菌が持つ前者の特徴：細胞質膜の外側での代謝について考えたい。これは、細胞質膜の外側に存在する、ピロロキノリンキノン(PQQ)を補欠分子族とするキノプロテイン脱水素酵素などによる酸化反応である。この酸化的物質変換系は細胞表層を反応場とするため、反応物質を細胞質へ取り込んだり、逆に反応産物を細胞質から排出する必要がない。すなわち、細胞内代謝による物質生産と比較すると、生産速度が速い、あるいは膜輸送に伴うエネルギー消費を抑えることなどがメリットとしてあげられる。細胞内では毒性を示すような物質や細胞内では速やかに代謝・分解される物質の生産にも今後応用できると期待している。

しかしながら、細胞表層を反応場とする物質生産は、酢酸菌などの一部の菌種に限定され、反応としては酸化反応がほとんどである。なお、デンプンやセルロース、タンパク質など高分子化合物の加水分解も細胞表層を反応場と言えらるかも知れないが、ここで想定している物質生産は低分子化合物の代謝に関わるものである。本研究の目的は、この細胞表層を反応場とする物質生産を展開・拡張させることである。一つは、細胞質酵素の細胞内局在を遺伝子工学的に細胞表層へと変化させ、人工的に細胞表層を反応場とさせる。二つ目として、細胞表層を反応場とする新たな脱水素酵素と新たな脱水素反応を探索し利用する。

## デヒドロキナ酸脱水素酵素の細胞内局在

ここでは、従来から知られている酢酸菌の酸化的物質生産に、脱水反応を付け加えることを試みる。この脱水反応はエネルギーを必要としないため、基質と酵素で反応が進行する。私たちは以前、キナ酸からの有用物質生産を検討する過程で、キノプロテイン・キナ酸脱水素酵素(QDH)とデヒドロキナ酸脱水素(DHQase)を用いた発酵系を構築し、キナ酸からのデヒドロキシミ酸生産を可能にした(1)。酢酸菌のDHQaseは、QDHと同様に細胞膜表面で機能すると報告されていたが、発酵過程の考察からそこに疑問があった。そこでDHQaseの細胞内局在を検討することとし、そのシ

グナル配列と想定される配列を除去した変異型 DHQase を構築した。この変異型 DHQase は解析した範囲において、活性、細胞内局在、発酵特性、いずれの点においても野生型と同様であったので、想定されたシグナル配列は DHQase に必要ないと結論できた。つまり、DHQase は細胞質酵素であると考察できる。今後、この酵素の細胞内局在を人工的に改変させ、その発酵特性を解析する。

### 新たな脱水素酵素と新たな脱水素反応の探索

二つ目の試みとして、機能未知の膜結合型脱水素酵素や既知酵素を用いた新しい物質の酸化反応系を構築する。本菌の酸化反応は呼吸鎖に直接つながっているため、NAD<sup>+</sup>などを必要とせず、酸素の還元でバランスをとる。それゆえ、この酸化的物質変換は、精製酵素ではなく休止菌体、あるいは膜画分を用いることを考えており、物質変換反応後のプロセスにも有利となる。基質未知のオーファン膜結合型脱水素酵素の機能解析が本研究の主軸となるが、その前に、既知のキノプロテイン・グリセロール脱水素酵素 (GLDH) の基質特異性の解析を行った。GLDH はグリセロールなどのポリオール<sup>2</sup>の2級アルコールを幅広い基質特異性で酸化し、対応するケトンを生じる。ここでは、アルドペントースの酸化を検討した。野生株と GLDH 破壊株の膜画分を用いて酸化活性を測定し、二つのサンプル間の差分を GLDH 活性と見なした。この実験系で GLDH が L-リボースを基質とすること、反応産物の構造解析から L-リボン酸を生じることが明らかとなった。GLDH がこのような反応を触媒することは知られておらず、既知の酵素が新たな反応を触媒することを明らかにした好例といえる。本研究では、このような試みにも積極的に取り組む。

オーファン膜結合型脱水素酵素は魅力的な材料であるが、発現レベルが低いことが予測される。私たちはいくつかの膜結合型脱水素酵素の過剰発現を行ってきているので、このシステムを利用する (2-4)。また、遺伝子破壊技術も確立しているので、これを組み合わせる。最終的に、オーファン膜結合型脱水素酵素や既知酵素を一種類だけ、かつ大量に持つ菌株を遺伝子工学的に構築する。この菌株の休止菌体や膜画分を用いて、糖、ポリオール、アルコール、アルデヒドなど様々な化合物を用いた酸化活性を解析するとともに、その反応産物の構造決定を行い、新しい酸化的物質変換系を構築していきたい。

### 謝辞

本研究は、山口大学農学部応用微生物学研究室で行われたものであり、ご指導いただいた先生方、共同研究を下さった先生方、本研究に関わった学部学生、大学院生の皆様に感謝いたします。

### 参考文献

1. S. Nishikura-Imamura et al., 2014. Overexpression of a type II 3-dehydroquinatase enhances the biotransformation of quinate to 3-dehydroshikimate in *Gluconobacter oxydans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:2955-2963.
2. N. Kataoka et al., 2015. Efficient production of 2,5-diketo-D-gluconate via heterologous expression of 2-ketogluconate dehydrogenase in *Gluconobacter japonicus*. *Appl Environ Microbiol* 81:3552-3560.
3. P. Charoenyingcharoen et al., 2015. A functionally critical single nucleotide polymorphism in the gene encoding the membrane-bound alcohol dehydrogenase found in ethanol oxidation-deficient *Gluconobacter thailandicus*. *Gene* 567:201-207.
4. S. Kawai et al., 2013. Heterologous overexpression and characterization of a flavoprotein-cytochrome c complex fructose dehydrogenase of *Gluconobacter japonicus* NBRC3260. *Appl Environ Microbiol* 79:1654-1660.