

古細菌型メバロン酸経路を利用したイソプレノイドの微生物生産

邊見 久

名古屋大学大学院 生命農学研究科

研究の目的

イソプレノイドはイソペンテニル二リン酸 (IPP) およびジメチルアリル二リン酸 (DMAPP) を生合成前駆体とし、炭素数 5 個のイソプレノイド単位を構造中に含む天然化合物の総称である。これまでに報告されたイソプレノイド化合物数は数万種に上り、最大の天然化合物群を形成している。その中にはステロイドや、脂溶性ビタミン (ビタミン A、D、E、K)、ユビキノン (コエンザイム Q) といった、ヒトの健康に欠かせないホルモンや栄養素が含まれる。また、抗マラリア薬であり、発見者である屠呦呦博士が 2015 年にノーベル医学・生理学賞を受賞したアルテミシニンや、がんの化学療法に用いられるパクリタキセル (タキソール) に代表されるように、イソプレノイドには重要な天然医薬品や、合成医薬品の元となったリード化合物が数多く存在する。その他にも、多くのイソプレノイドが香料や工業原料として使われている。

IPP と DMAPP の生合成経路として、これまでに 2 種類の経路が見出されている。1 つはメバロン酸 (MVA) 経路であり、真核生物や古細菌、一部の真正細菌に存在し、アセチル CoA を出発物質として MVA を経由した後、まず IPP を、そしてその異性化により DMAPP を合成する。もう 1 つがメチルエリスリトールリン酸 (MEP) 経路であり、大半の真正細菌と植物の葉緑体に存在し、ピルビン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸を出発物質として MEP を経由し、最終段階の反応で IPP もしくは DMAPP を与える。我々は古細菌における MVA 経路について研究を続けてきたが、最近、超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* から、ホスホ-*trans*-アンヒドロメバロン酸 (tAHMP) という新規化合物を経由する変形 MVA 経路を発見した¹⁾。同経路は古細菌の大半に存在するため、「古細菌型 MVA 経路」と命名された。同経路の特徴は、1 分子の IPP を合成するのに、通常 MVA 経路であれば 3 分子の ATP を必要とするところ、2 分子しか ATP を消費しないことである。これは、通常 MVA 経路において ATP 依存性脱炭酸酵素が単独で触媒する脱水/脱炭酸過程を、ホスホメバロン酸脱水酵素 (PMDh) と tAHMP 脱炭酸酵素 (AMPD) という 2 つの新奇酵素が ATP 非依存的に触媒するためであるが、この特徴から、古細菌型 MVA 経路はエネルギー消費の少ない代謝経路として、イソプレノイドの生物生産に有用だと期待されている。

そこで本研究では、同経路を用いたイソプレノイド生産システムを、大腸菌を宿主として構築することで、その有用性を示すこと²⁾、および、そのシステムを用いてイソプレノイド生産により適した古細菌型 MVA 経路中の酵素を探索することを

目的とした。

方法

古細菌型 MVA 経路において、MVA から IPP および DMAPP に至る生合成反応を触媒する、MVA リン酸化酵素 (MVK)、PMDh、AMPD、イソペンテニルリン酸リン酸化酵素 (IPK)、IPP 異性化酵素 (IDI)、および AMPD の補酵素の合成反応を触媒するプレニル化 FMN 合成酵素の遺伝子を大腸菌用プラスミド pBAD18 に挿入し、pBAD-mMP7 と pBAD-aMP7 を構築した。MVK と IPK の遺伝子は常温性のメタン生成古細菌 *Methanosarcina mazei* 由来のものを、IDI の遺伝子は大腸菌由来のものをを用いた。それ以外の遺伝子は、pBAD-mMP7 を構築する際には *M. mazei* 由来のものをを用い、pBAD-aMP7 を構築する際には *A. pernix* 由来のものをを用いた。これらのプラスミドを、カロテノイド生合成遺伝子を含んだプラスミド、pACYC-IBE を有する大腸菌に導入し、5.0 mg/mL のメバロノラクトン (MVL) を含んだ LB 培地 5 mL 中で培養した (図 1A)。通常の好気条件での振とう培養に加えて、パラフィンを重ねた準嫌気条件でも培養を行った。集菌後、菌体からカロテノイド色素であるリコペンをアセトン抽出し、吸光度をもとに定量した。

結果

好気条件で培養を行なった場合には、pBAD-mMP7 と pBAD-aMP7、どちらのプラスミドを持つ株も、ネガティブコントロールである pBAD18 を有する株に比べてリコペン生産量が低下し、古細菌型 MVA 経路導入によるポジティブな効果は見られなかった。一方、準嫌気条件で培養を行なった場合には、pBAD-mMP7 導入株において大幅なリコペン生産の増進が、pBAD-aMP7 導入株でもわずかな増加が観察された (図 1B)。培地から MVL を除くことで各株のリコペン生産はネガティブコントロールレベルにまで低下した。大腸菌は元来 MEP 経路を有し、MVA 経路を持たないため、この増加分のリコペンは導入された古細菌型 MVA 経路で合成された IPP/DMAPP に由来すると判断された。培養条件による違いの理由は、ATP 生産が少ない準嫌気条件において消費 ATP の少ない古細菌型 MVA 経路が有利に働いたためか、もしくは、好気条件において同経路中の酸素感受性酵素が十分に活性を発揮できなかったためだと予想された。

なお、pBAD-mMP7 から PMDh、もしくは AMPD 遺伝子を除いた欠失プラスミドを用いた場合、リコペン生産の増進は観察されなかった。また、それぞれのプラスミドに欠失させた遺伝子を再挿入することでリコペン生産は回復した。つまり、これらの欠失プラスミドは PMDh と AMPD の活性検出に応用可能である。この系を用いて、これまでに複数の生物の PMDh と AMPD を同定しており、現在、酸素耐性などの優れた形質を持つ酵素の探索を進めている。また、脂溶性が高く、生産量の上限が低いカロテノイドに代え、揮発性の高いテルペンを指標としたイソプレ

ノイド生産性評価システムの構築を進めている。

結論

古細菌型 MVA 経路は、条件次第ではあるが、イソプレノイドの生物生産に応用可能であり、特に低酸素条件において高い可能性を秘めている。

文献

- 1) Hayakawa, H. *et al.* (2018) Modified mevalonate pathway of the archaeon *Aeropyrum pernix* proceeds via *trans*-anhydromevalonate 5-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **115**: 10034-10039.
- 2) Yoshida, R., Yoshimura, T., and Hemmi, H. (2020) Reconstruction of the “archaeal” mevalonate pathway from the methanogenic archaeon *Methanosarcina mazei* in *Escherichia coli* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **86**: e02889-19.

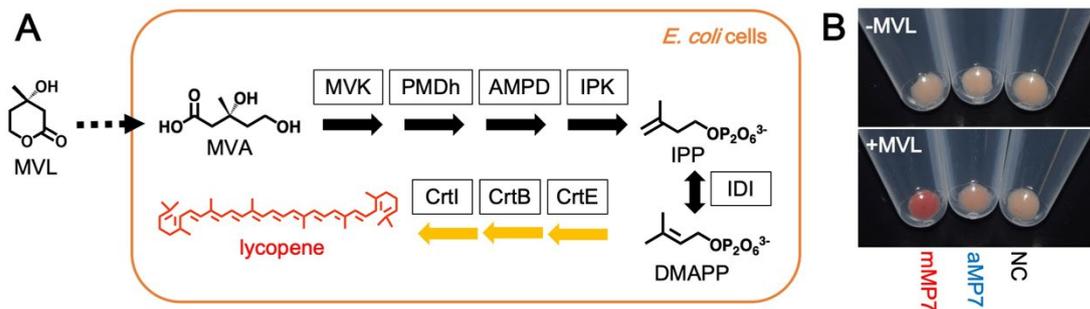


図1 古細菌型 MVA 経路を含むリコペン生産システム

(A) システムの模式図。CrtI、CrtB、CrtE は pACYC-IBE にコードされたカロテノイド生合成酵素。(B) リコペンを生産した大腸菌菌体。mMP7 : pBAD-mMP7 を有する株。aMP7 : pBAD-aMP7 を有する株。NC : pBAD18 を有する株。 Copyright @ American Society for Microbiology, *Appl. Environ. Microbiol.* **86**: e02889-19 doi: 10.1128/AEM.02889-19, 2020.