

好熱菌細胞で常温菌酵素を常温誘導的に高生産させる新規代謝工学

鈴木 宏和

鳥取大学大学院 工学研究科

研究の目的

微生物の代謝経路を合理的に改変し、有用代謝物を高度かつ特異的に生産させる技術（代謝工学）が広く研究されている。一般の代謝工学では、代謝経路に関連する遺伝子を高発現させたり、関連しない遺伝子を破壊したりすることで、特定の代謝経路を優勢化する。その達成には煩雑な遺伝子改変が概して求められ、時間と労力が必要になることも少なくない。細胞増殖性の悪化など予想しにくい影響が出ることもあり、一般的な代謝工学では高生産が達成できない代謝物もある。これを背景に我々は、好熱菌細胞で常温菌酵素を高生産させる新規な代謝工学を提案した。このアプローチでは、常温誘導プロモーターの下流に常温菌酵素の遺伝子を連結し、それを好熱菌に導入する。高温培養中の好熱菌では常温菌酵素は産生されないが、増殖した好熱菌を常温に移すと常温菌酵素が産生され、高活性な状態で細胞内に蓄積される。常温では好熱菌由来の夾雑酵素群が不活性になるため、結果として常温菌酵素から構成される代謝経路のみが優勢化されると期待した。本研究では、枯草菌のイノシトール変換酵素群¹⁾を好熱菌 (*Geobacillus kaustophilus* HTA426) 中で産生させ、その細胞によってイノシトールが特異的に変換されるかを検証した。

方法

Geobacillus kaustophilus で機能する常温高発現プロモーター (P_{cspX}) は、以前の研究で同定した pGKE119²⁾ のプロモーターを P_{cspX} に置換することで pGKE120 を構築し、枯草菌由来の *iolG-iolX* と *iolG-iolW* を P_{cspX} 下流に連結した。得られたプラスミドで *G. kaustophilus* を形質転換し、形質転換体を菌体濁度が 1 になるまで LB 培地中で培養 (60°C) した。さらに常温 (40°C) で 24 時間培養した後、細胞膜透過処理のための界面活性剤とリゾチーム、ならびに *scyllo*-inositol (SI) 生成反応のための *myo*-inositol (MI) と NAD^+ (終濃度、1 mM) を培養液に添加した。30°C で 6 時間保温した後、生成した SI を高速液体クロマトグラフィーで分析した。

結果

IolG は MI から *scyllo*-inosose への NAD^+ 依存的酸化を、IolX と IolW は各々 $NADH$ と $NADPH$ を電子供与体にしながら *scyllo*-inosose から SI への還元を触媒する (図 1A)。IolG と IolX を産生する細胞を膜透過処理し、MI (10 g/L) と共に 30°C で 6 時間保温したところ、30% の MI が SI に変換された。24 時間保温しても変換効率は変わらなかったが、これは MI と SI 間の化学平衡が理由と思われる。10°C で保温した場合

も、6時間で25%のMIがSIに変換された。反応液に多量のMI(60 g/L)を添加した場合は、30°Cの24時間保温で27%がSIに変換された。この変換率は、本システムが16 g/LのSIを生産できることを示唆する。反応には培養液を直接用いることができ、反応前に菌体を洗浄する必要はなかった。NAD⁺の添加濃度を終濃度0.1 mMにすると、変換率は半分程度になった。NAD⁺の添加濃度を2 mMにしても、変換率は変わらなかった。リゾチーム添加量を増やした場合、変換率は減少した。IolGとIolWを産生する細胞もMIをSIに変換したが、この場合はNAD⁺に加えてNADPHの添加も必要で、さらに変換効率も低かった。残念ながら、細胞膜透過処理なしでは、反応は全く進まなかった。MI取り込みに関わると考えられる*iolT*を同時発現させても、膜透過処理なしではSIは生成しなかった。MIの取り込みは、好熱菌の代謝が不活性な常温では起こりにくいのかもかもしれない。

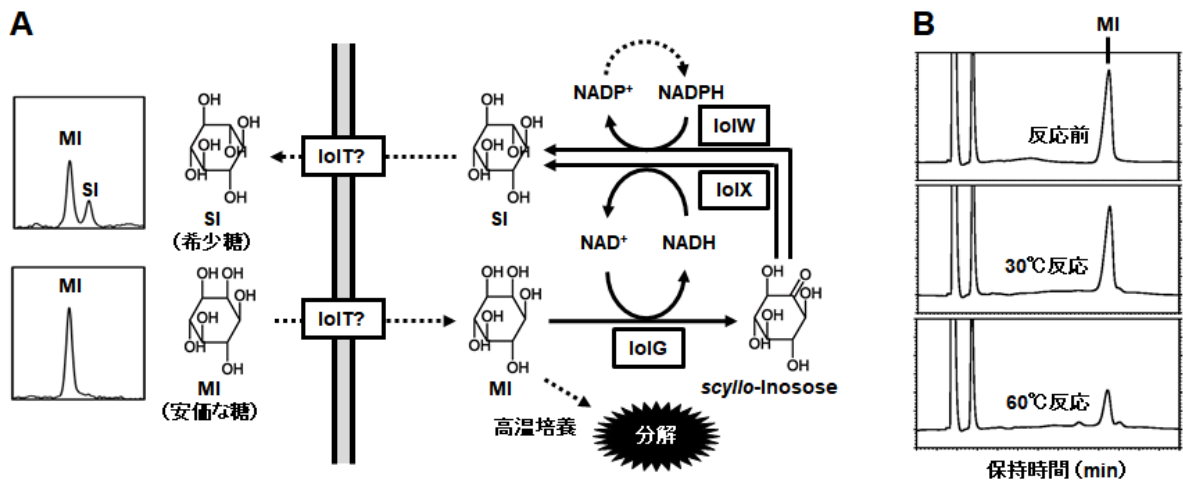


図1 好熱菌細胞で常温菌酵素を高生産させるシステムの検証。(A) 枯草菌Iol酵素群が触媒する反応。IolGとIolXもしくはIolWは、*myo*-inositol (MI)を*scyllo*-inositol (SI)に変換する。IolTは、MI取り込みに関与すると考えられている。好熱菌宿主(*Geobacillus kaustophilus*)は、もともとMI代謝系をもっている。(B) 好熱菌によるMI分解の温度依存性。膜透過処理をした好熱菌とMIを30°Cで保温してもMIは分解されないが、60°Cで保温すると分解された。

好熱菌酵素が常温で不本意なMI代謝を行わないことを確認するために、*G. kaustophilus*をpGKE120で形質転換し、上述の要領で培養した。得られた菌体を膜透過処理し、MIなどと共に60°Cで保温したところ、MIの顕著な減少が見られた(図1B)。しかし30°Cで保温した場合は、MIはほとんど変化せず、本アプローチの有効性が支持された。またP_{espX}が有効な宿主域を調べるため、黄色蛍光タンパク質(Venus)の遺伝子をpGKE120に連結し、様々な*Geobacillus*属細菌に導入した。得られた形質転換体を菌体濁度が1になるまで60°Cで振盪培養し、つづいて40°C

で 24 時間培養した。菌体中に産生された Venus 量を解析したところ、1 株 (*G. stearothermophilus* 10) については *G. kaustophilus* よりも多くの Venus を産生した。他 3 株 (*G. subterraneus* DSM 13552、*G. thermoglucosidasius* DSM 2542、および *G. thermoleovorans* DSM 5366) については、ほとんど産生しなかった。本結果は、*G. stearothermophilus* 10 が本システムの宿主として有用であること、ならびに P_{cspX} が機能する *Geobacillus* 属細菌は限定的であることを暗示する。

結論

本研究では、好熱菌細胞で常温菌酵素を高生産させる新規な代謝工学的アプローチを検証した。生細胞による MI 変換はできなかったが、好熱菌の膜透過処理は簡単で、処理細胞（粗酵素）による MI 変換は効率よく起こった。期待通り、好熱菌酵素による MI 分解は、常温下において抑制されており、当該アプローチの有効性も支持された。本法に類似するものとしては、常温菌中で耐熱性酵素を産生させ、その細胞抽出物を加熱処理することで耐熱性酵素のみが残存した酵素カクテルを作る方法がある。この方法は、高温反応中にビタミン類が破壊されるという短所があり、また常温菌酵素を利用できない。好冷菌中で常温菌酵素を産生させ、温和な熱処理によって常温菌酵素のみが残存したカクテルを作る方法もある。しかし、好冷菌は冷却しながら培養する必要があり、概して生育も遅い。それに対し本法は熱処理を必要とせず、常温で反応を進めることができる。細胞増殖は速く、酵素の生産性も高い。重要なことに、基質の取り込みが起こる場合には、生細胞を用いた物質生産にも利用できるだろう。本法は、新規な代謝工学として大いに発展する可能性を秘めたものである。

研究発表：国際会議（BACELL2020）発表要旨の公開（大会中止）

文献

- 1) Tanaka, K., Natsume, A., Ishikawa, S., Takenaka, S., and Yoshida, K. (2017) A new-generation of *Bacillus subtilis* cell factory for further elevated scyllo-inositol production. *Microb. Cell Fact.* **16**: 67.
- 2) Kurashiki, R., Mizuno, T., Murata, K., Ohshiro, T. and Suzuki, H. (2020) A plasmid vector that directs hyperproduction of recombinant proteins in the thermophiles *Geobacillus* species. *Extremophiles* **24**: 147–156.