

微生物代謝の電気制御技術の開発と発酵生産への応用

高妻 篤史

東京薬科大学 生命科学部

研究の目的

現在、様々な化合物が発酵法により生産されているが、従来法では生産効率が低く、実用化に至っていないプロセスが多い。発酵プロセスの効率を下げる要因の一つは、原料の糖が菌の増殖や維持にも利用されてしまう点にある。また、原料よりも還元的で高エネルギーな物質を作る場合には、原料の一部から還元力や ATP を生産する必要があるため、さらに炭素収率が低下してしまう。微生物に原料以外からもエネルギーを供給すれば、理論上、原料内の炭素を全て生産物に変換することが可能になる。しかしその場合、プロセスの経済性を保つには、原料よりも安価にエネルギーを供給する必要がある。

一方、近年環境微生物学の分野において、電気化学的活性を持つ細菌 (electrochemically active bacteria, EAB) が注目を集めている。EAB は細胞外電子伝達系を介して、電極との間で電子の授受を行うことができる¹。高電位の電極が存在する場合、これらの細菌は有機物の酸化分解によって発生する電子を電極に放出することで増殖する。一方、電極の電位が低い場合には、EAB は電極から電子を取り込み、細胞内の還元的代謝に利用することができる。電気はグルコースよりも安価であるため、電気の利用は発酵プロセスの低コスト化につながると期待される。

そこで本研究では、広く発酵プロセスの高効率化や多様化に利用可能な技術として、“電気制御発酵法”の基盤構築を目指した。具体的には、電極から EAB (遺伝子改変 *Shewanella*) に電気エネルギーを供給し、これにより発酵産物 (1,4-ブタンジオール; 1,4-BDO) の生産収率を向上させるプロセスを開発することを目的に研究を行った。

方法

Shewanella oneidensis MR-1 株およびその派生株は LB 培地または乳酸もしくはグルコースを唯一の炭素源・エネルギー源として含む最少培地²を用いて 30°C で培養した。嫌気培養ではブチルゴム栓で密封したバイアル瓶に培地を添加し、高純度窒素ガスにて培地をバブリングすることによって培地中の酸素を除去した。嫌気呼吸 (フマル酸呼吸) 条件での培養においては、電子受容体として 20 mM のフマル酸を添加した。MR-1 株の形質転換および遺伝子破壊は、それぞれフィルター接合法、ダブルクロスオーバー法により行った²。DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析においては、MR-1(pBBR-*glk-galP*)株をグルコース最少培地にてフマル酸呼吸条件で前培養した後、菌体を回収して 2 つに分け、片方を発酵条件、もう片

方をフマル酸呼吸条件において3時間培養した後、total RNAを抽出した。DNAマイクロアレイ解析は以前に報告した方法³に従って行った。

結果

1. 遺伝子改変 *Shewanella* のグルコース発酵能力の検証

Shewanella oneidensis MR-1株は電極から電子を取り込み、細胞内の物質変換反応に利用する能力を持つため、電気制御発酵法のホスト菌株に適していると考えられる¹。MR-1株は糖（グルコース）を代謝する能力を持たないが、本株にグルコースの取り込みとリン酸化に必要な遺伝子（*galP* および *glk*）を導入すると、グルコースを代謝して増殖できるようになることが示されている²。そこで本研究ではこれらの遺伝子を導入したMR-1株（MR-1(pBBR-*glk-galP*)株）をベースに、電気制御発酵において1,4-BDOを生産可能な遺伝子改変株を構築することとした。

先行研究²では、MR-1(pBBR-*glk-galP*)株は酸素やフマル酸などの電子受容体存在下（呼吸条件）でグルコースを資化できることが示されていた。一方、本株を電気制御発酵に利用しようとする場合、電子受容体の存在しない発酵条件下でグルコースを代謝させる必要がある。そこで、まず本株をグルコースを唯一の基質として含む最少培地に植菌し、発酵条件下で増殖できるかを検証した。その結果、本株はフマル酸を電子受容体とした呼吸条件ではグルコースを消費して増殖したが、発酵条件ではグルコースをほとんど消費せず、増殖を示さなかった。この理由として、MR-1株は還元環境下ではTCAサイクルの活性が低下することが知られているため、発酵条件では呼吸条件よりもTCAサイクルの活性が低下し、これにより増殖に必要なアミノ酸が合成できなくなっていることが予想された。この仮説はDNAマイクロアレイ解析によって発酵条件と呼吸条件におけるMR-1株のトランスクリプトームを比較解析した結果からも支持された。そこでアミノ酸源として0.1%のトリプトンを加えて同様に培養を行ったところ、発酵条件においてもグルコースの消費に伴って細胞の増殖が見られた。この結果から、少量のアミノ酸源を供給すれば、MR-1(pBBR-*glk-galP*)株をグルコースを基質とした電気制御発酵法のホストとして利用できると考えられた。

2. 1,4-BDO 合成経路の導入と副生成物合成経路の破壊

MR-1(pBBR-*glk-galP*)株に1,4-BDO合成能を付与するため、1,4-BDO合成に必要な酵素遺伝子(図1)⁴の導入と副生成物（乳酸・酢酸）の生成経路（D/L-乳酸脱水素酵素およびPta-AckA経路）の破壊を行った。また、グルコースから1,4-BDO前駆体（コハク酸）への変換を促すため、MR-1(pBBR-*glk-galP*)株に枯草菌由来のピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子（*pyc*）を導入し、これによりグルコースからのコハク酸生成が促進されることを確認した。現在、図1に示した酵素遺伝子の発現と各酵素の活性について確認を行っている。



adhE2: *Clostridium acetobutylicum* 由来のアルデヒド・アルコールデヒドロゲナーゼ

cat2: *Porphyromonas gingivalis* 由来の4-hydroxybutyryl-CoA transferase

sucCD: *Escherichia coli* K-12由来のsuccinyl-CoA synthetase

sucD: *P. gingivalis*由来のセミアルデヒド デヒドロゲナーゼ

4HBd: *P.gingivalis*由来の4-hydroxybutyrate dehydrogenase

図 1. 1,4-BDO 合成のための遺伝子カセット

結論

本研究において、グルコースの取り込みとリン酸化に必要な遺伝子 (*galP* および *glk*) を導入した MR-1 株 (MR-1(pBBR-*glk-galP*)株) がグルコースを発酵的に代謝可能であり、電気制御発酵のホストとして適していることが示された。また、MR-1(pBBR-*glk-galP*)株に 1,4-BDO を合成させるための遺伝子カセットを設計し、本株に導入した。今後は 1,4-BDO 合成経路の導入と副生成物合成経路の破壊を行った MR-1(pBBR-*glk-galP*)株を低電位電極 (-0.6 V vs. Ag/AgCl) 存在下にて電気培養し、1,4-BDO の合成が促進されることを検証する予定である。

文献

- 1 Kouzuma, A. (2021) Molecular mechanisms regulating the catabolic and electrochemical activities of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **85**: 1572-1581.
- 2 Nakagawa, G. *et al.* (2015) Metabolic Characteristics of a glucose-utilizing *Shewanella oneidensis* strain grown under electrode-respiring conditions. *PLoS One* **10**: e0138813.
- 3 Hirose, A. *et al.* (2018) Electrochemically active bacteria sense electrode potentials for regulating catabolic pathways. *Nat Commun* **9**: 1083.
- 4 Yim, H. *et al.* (2011) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol. *Nat. Chem. Biol.* **7**: 445-452.