

CO₂を原料とするバイオポリマー合成および新規分解代謝の解明

亀谷 将史

東京大学大学院 農学生命科学研究科

研究の目的

CO₂を炭素源、水素をエネルギー源として増殖する水素酸化細菌[1]は、CO₂からの物質生産手段として近年注目されている。水素細菌が poly-hydroxybutyrate (PHB) などのバイオポリマーを合成することは代表的な水素細菌 *Ralstonia eutropha* などで知られており、水素細菌による PHB や類縁菌のバイオプラスチック生産として実用化されている。PHB は菌にとってのエネルギー貯蔵物質であり、栄養状態に応じて合成 (CO₂ から PHB へ)・分解 (PHB から CO₂ とエネルギーへ) が切り替えられるが、その機構は *R. eutropha* においても詳細には明らかになっていない。

本研究で実験材料とした菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1 は、独立栄養条件で倍加時間 1 時間という極めて高い増殖能を示す好熱性水素酸化細菌であり、CO₂を原料とした高効率な物質生産への利用が期待されている。本菌は特定の培養条件で高い PHB 蓄積能を示すことが知られているが、既知の PHB 分解遺伝子群を有しておらず、新規経路で PHB を分解・利用していると予想された (図 1)。CO₂を原料とした有用バイオポリマーの合成およびその効率的利用の実現に向けて、本菌における PHB の合成・分解メカニズムについて研究を行った。

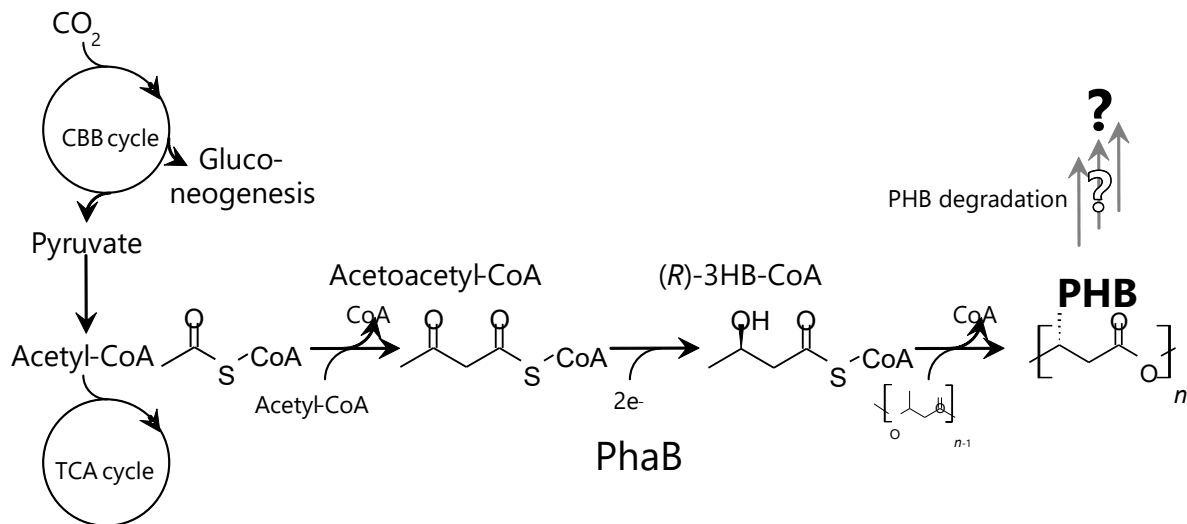


図 1. *H. thermoluteolus* TH-1 における PHB 合成・分解経路。

方法

転写活性解析

本菌は窒素飢餓条件で PHB 合成が誘導され、さらにその後に炭素源飢餓条件に置くことで PHB 分解が誘導される。そこで、これら条件の菌体から RNA を抽出し転写活性解析を行うことで、各条件特異的に誘導される遺伝子を特定し、PHB 合成・分解の切り替え時にどのような発現変化が起きるかを明らかにした。

酵素学的解析

PHB 合成および分解に関わることが予想された酵素について、活性測定を行った。活性測定の方法には、TH-1 の無細胞抽出液の他に、大腸菌での異種発現系を構築して調製した各精製酵素を使用した。

細胞内酸化還元バランス評価

各種培養条件で TH-1 を培養し、無細胞抽出液を調製した。市販の NADP/NADPH 測定キットおよび NAD/NADH 測定キットを使用し、細胞内 NADP(H)および NAD(H)濃度を定量した。

ランダム変異による PHB 非生産株・非分解株の取得

変異誘導化合物である 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine での処理により、TH-1 のランダム変異ライブラリを調製した。これを各種条件で培養し、Nile red による PHB 染色後にセルソーターにかけ、PHB 生産能を失った株および生産した PHB の分解能を失った株を選別した。

結果

転写活性解析により、PHB 合成・分解の切り替え時にどのような発現変化が起きるかを調べた。代表的な PHB 生産性水素細菌である *R. eutropha* では PHB 蓄積時に TCA 回路遺伝子の発現が低下し、それにより PHB 合成へのフラックス流入が引き起こされることが報告されている。一方 TH-1 においてはそのような発現低下は見られず、既知の PHB 蓄積メカニズムとは異なる機構が本菌で働いていることが示唆された。PHB 合成に関わることが予想される遺伝子のうち、*phaB* ホモログの一つで PHB 蓄積時の転写誘導が見られ、本酵素が PHB 蓄積に寄与している可能性が示唆された。PHB 分解条件においては、PHB 分解とは直接の関係がないと考えられていた代謝系遺伝子の発現上昇が見られ、この代謝系と本菌の新規 PHB 分解系との関連を現在検証している。

既知の類似酵素のほとんどが NADPH を電子供与体として用いるのに対し、本菌で PHB 蓄積への寄与が示唆された PhaB ホモログは NADH を電子供与体とする。本菌の細胞内酸化還元バランスを測定したところ、PHB 蓄積時に NADH/NAD⁺比

の上昇が見られた。上述の結果と総合すると、本菌が NADH 依存的な PhaB を有すること、その転写が誘導されること、さらに細胞内 NADH 量が増加することの相乗効果により PHB 蓄積が引き起こされるという、これまで他菌では知られていなかったメカニズムが本菌で働いていることが示唆された (図 2)。

TH-1 にランダム変異を施し PHB 生産能を失った株および生産した PHB の分解能を失った株の取得も行った。得られた株の性状解析および PHB 生産・分解に寄与する遺伝子の同定を現在進めている。

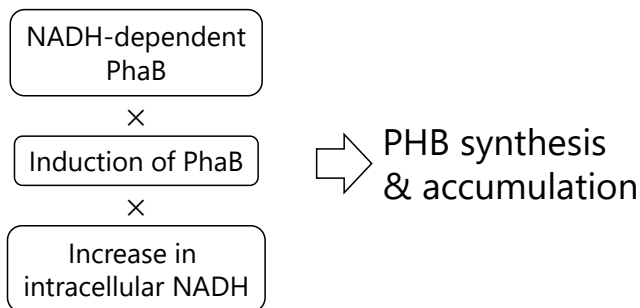


図 2. *H. thermoluteolus* TH-1 において推定される PHB 蓄積メカニズム

結論

本研究により、PHB 合成系については新規メカニズムが示唆され、また PHB 分解系についても候補遺伝子のリストアップおよび今後の実験材料となる変異株取得に成功した。今後の研究によりそれぞれの系の詳細を明らかにし、CO₂ を原料とした物質生産や効率的なバイオポリマー分解など持続可能な社会構築に資する知見・技術の獲得を目指す。

文献

- 1) 亀谷将史, 新井博之, 石井正治. 水素細菌の代謝特性と低炭素社会実現に向けての展開. 極限環境生物学会誌. 2020;18:30-38.