

酢酸菌ペリプラズム酸化系の利用を鍵とする アルデヒドを標的とした新規合成生物学的物質生産システムの確立

片岡 尚也

山口大学 大学研究推進機構

研究の目的

微生物による物質生産は、近年の合成生物学の進展によって飛躍的な発展を遂げている。しかしながら、生物毒性を有する化合物、特にアルデヒド類の生産に関する報告は極めて少ない。バイオプロダクションの実用可能性を高めるためには、この課題を克服する新規な技術の開発が不可欠である。本研究では、この解決策として酢酸菌の有するペリプラズム酸化系 (図 1A) に着目した。本酸化系は細胞質外で反応が進行するため、細胞質内で毒性を示す化合物を標的とする場合に有利である。また、基質特異性の広い脱水素酵素群で構成されており¹⁾、天然には存在しない経路を介して生成される非天然化合物の生成にも適すると考えられる。そこで本研究では、ブチルアルデヒドおよび非天然化合物である 3-ヒドロキシブチルアルデヒドを生成する酢酸菌由来の膜結合型脱水素酵素を同定するとともに、その知見を活用し、酢酸菌と大腸菌の共培養系による各アルデヒドの発酵生産の実証を目的とした (図 1B)。

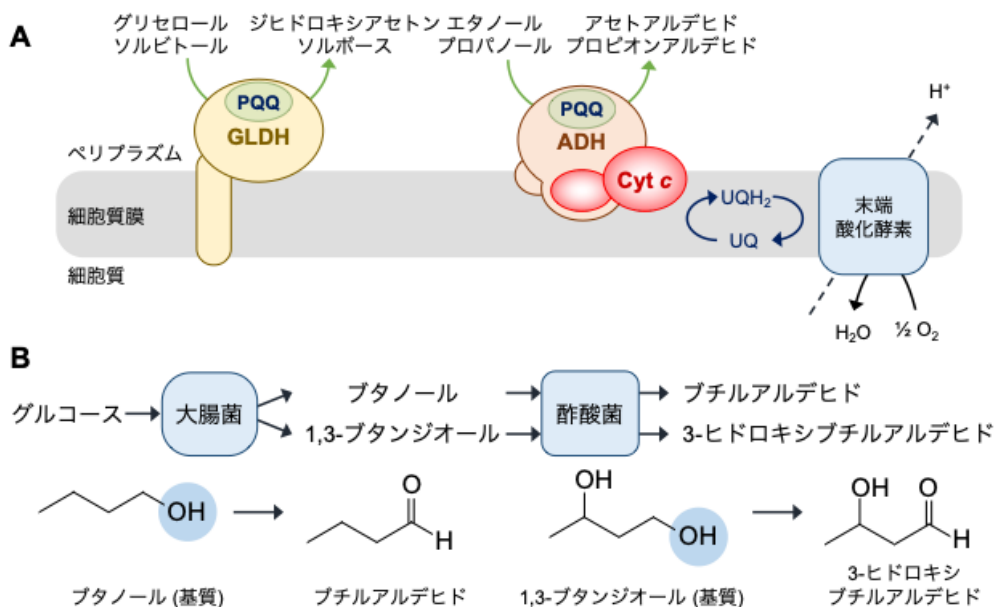


図 1. 酢酸菌ペリプラズム酸化系 (A), 構築を目指す酢酸菌-大腸菌共培養系 (B).
グリセロール脱水素酵素 (GLDH), アルコール脱水素酵素 (ADH): 代表的な脱水素酵素.
構造式中の丸で囲っている部分が酢酸菌により酸化される官能基.

方法

まず、目的酵素を探索するため、*Gluconobacter japonicus* を宿主とした脱水素酵素欠損ライブラリを利用した。このライブラリは主要な 6 種の膜結合型脱水素酵素を段階的に欠損させたものであり、本研究室で構築した独自のリソースである。ライブラリから膜画分を調製し、ブタノールおよび 1,3-ブタンジオールを基質とした人工電子受容体依存的な脱水素酵素活性を測定することで、標的酵素を特定した。

次に、同定された酵素の反応生成物を明らかにするため、*G. japonicus* に加え、ゲノム情報から当該酵素の存在が確認されている他の酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* および *Gluconacetobacter diazotrophicus* を対象とした。各菌株の膜画分を用いた変換試験を行い、基質および生成物を高速液体クロマトグラフィ (HPLC) により定量した。

さらに、目的の反応を触媒可能な脱水素酵素を有する酢酸菌を選抜し、ブタノールを生産する大腸菌と組み合わせて共培養系を構築した。1,3-ブタンジオール生産株との系も計画していたが、時間的制約により本研究では実施できなかった。培養はジャーファメンターを用いた回分培養により行い、酢酸菌と大腸菌の接種比を調整しつつ、発酵生産の可能性を検討した。培養条件は両菌が増殖可能な温度・pH・酸素濃度に設定し、基質および生成物を HPLC で定量した。

結果

ライブラリの膜画分を用いた活性測定の結果、ブタノールおよび 1,3-ブタンジオールに対する活性はいずれもアルコール脱水素酵素 (ADH) の欠損により低下した。また、1,3-ブタンジオール酸化については、ADH に加えてグリセロール脱水素酵素 (GLDH) の欠損によっても活性が減少した。これにより、両基質の酸化には ADH が主要に関与し、1,3-ブタンジオールでは GLDH も作用することが明らかとなった。

次に、ブタノールを基質として ADH を作用させた際の生成物を解析したところ、*G. japonicus* では目的化合物であるブチルアルデヒドは蓄積せず、その酸化物である酪酸が定量的に生成することが判明した (Fig. 2A)。これは、*G. japonicus* の ADH がブチルアルデヒドを経由して酪酸まで酸化を行うことを示唆していた。そこで、他の酢酸菌由来の ADH について同様の解析を行った。その結果、*Ga. diazotrophicus* 由来 ADH ではブチルアルデヒドの生成・蓄積が確認された (Fig. 2B)。一方で、*A. pasteurianus* 由来 ADH ではブチルアルデヒドが一時的に生成された後、酪酸へと酸化されることが示された (Fig. 2C)。このことから、酢酸菌に普遍的に存在する ADH であっても、その反応特性は菌種ごとに異なり、特に *Ga. diazotrophicus* 由来 ADH がブチルアルデヒドの生成に適していることが示唆された。

さらに、1,3-ブタンジオールを基質とした場合について調査した結果、ADH は 3-ヒドロキシブチルアルデヒドおよび 3-ヒドロキシ酪酸を生成し、GLDH は 4-ヒドロキシ-2-ブタノンを生成することが明らかとなった (Fig. 2D, 一部データ未記載)。特に、*G. japonicus* 由来の ADH では 3-ヒドロキシブチルアルデヒドが顕著に蓄積すること

が確認され、この酵素が非天然化合物である 3-ヒドロキシブチルアルデヒドの生成に利用可能であることが示唆された。

最後に、ブチルアルデヒドの生産を目的に、ブタノール生産大腸菌²⁾と、*Ga. diazotrophicus* 由来 ADH を発現させた *G. japonicus* を用い、接種比を調整して培養を行った。その結果、大腸菌、酢酸菌ともに初期 OD₆₀₀ を 0.1 とした条件において、45 時間後に約 0.7 mM のブチルアルデヒドが生成することを確認した。

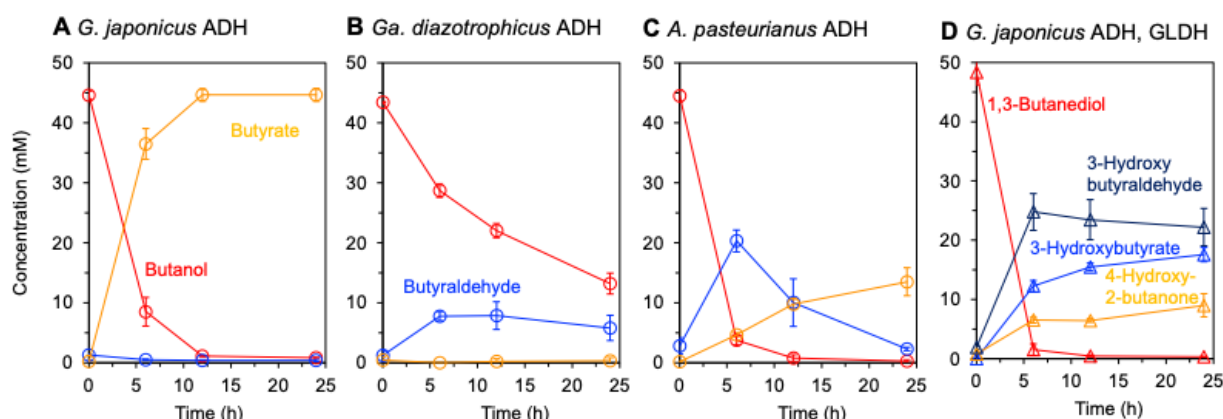


図 2. 膜画分でのブタノール変換試験 (A-C), 1,3-ブタンジオール変換試験 (D).

*G. japonicus*由来ADHでの変換試験 (A), *Ga. diazotrophicus*由来ADHでの変換試験 (B), *A. pasteurianus*由来ADHでの変換試験 (C), *G. japonicus*由来ADH・GLDHでの変換試験 (D).

結論

本研究では、酢酸菌のペリプラズム酸化系の特長を活用し、毒性化合物であるアルデヒドの生産技術の確立を目指した。酵素同定の結果、ブチルアルデヒドおよび3-ヒドロキシブチルアルデヒド生成に関与する脱水素酵素が明らかとなった。特に *Ga. diazotrophicus* 由来 ADH はブチルアルデヒド生産に有効であり、*G. japonicus* 由来 ADH は3-ヒドロキシブチルアルデヒドの生成に適していることが示唆された。また、大腸菌との共培養により、少量ながらブチルアルデヒドの発酵生産を実証できた。今後は、共培養系における各株の増殖動態や酢酸菌酵素の活性変化を解析するとともに、培養条件の最適化を進めることで、生産量の向上を図っていく。また、3-ヒドロキシブチルアルデヒドの発酵生産を進めることで、最終的な目的である酢酸菌ペリプラズム酸化系を利用した新規な合成生物学的物質生産システムの確立を目指す。

文献

- 1) Björn, P., Mientus, M., Kostner, D., Junker, A., Liebl, W., and Ehrenreich, A. (2013) Characterization of membrane-bound dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* 621H via whole-cell activity assays using multideletion strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 6397-6412.
- 2) Kataoka, N. *et al.* (2015) Construction of CoA-dependent 1-butanol synthetic pathway functions under aerobic conditions in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **204**: 25-32.