

代表的なメトキシ芳香族 3 種類（シリンガ酸、バニリン酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸）およびメタノールを基質として小スケールの嫌気培養により資化性試験を行った。また、 H_2 の添加効果についても同様に試験を行った。

2. 代謝設計と遺伝子破壊株構築の試み

メトキシ基の酸化経路を H_2 代謝により代替する微生物の構築に向けて、代謝設計を行い遺伝子組換え株の構築を試みた。メトキシ基の酸化経路が欠損した場合の代謝について酸化還元バランスを考慮した代謝の設計を考案し、コンストラクト導入試験を行った。

3. トランスクリプトーム解析による解析

合理的な代謝設計の基盤的知見を得るため、メトキシ化合物、 H_2 、糖を代謝する場合のそれぞれにおける遺伝子発現をトランスクリプトーム解析により調べた。十分な細胞量を取得するため、メトキシ基代謝の実験では基質としてメタノールを用いた。 H_2 を代謝する場合には炭素源として無機物である CO_2 を投与した。糖はフルクトースを用いた。それぞれ対数増殖期の細胞より RNA を抽出し解析を行い、遺伝子発現の変化について比較検討した。

結果

各種メトキシ芳香族を基質とした培養試験の結果、*N. thermoacetica* はシリング酸、バニリン酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸のいずれも資化し、特にシリング酸に対して高い資化性を示した (図 2 (A))。シリング酸は 1 分子当たりメトキシ基を 2 つ有することから、等モルの基質からより高い酢酸生成と生育を示したと考えられる。なお、溶解性が高いメタノールを高濃度で与えるとより高い酢酸生成および生育を示しメトキシ基の量との相関が示された。さらに、シリング酸に加えて H_2 、 CO_2 を同時に投与する試験を行うと、メトキシ基と H_2 を同時に代謝する際に互いに阻害しないことが示唆された (図 2 (B))。これまで、酸化還元バランスが崩れ H_2 を生成する代謝が関与すると阻害が生じることがわかっている³⁾。得られた知見をもとに、本研究の目的であるメトキシ基酸化を H_2 代謝に代替した合成経路の構築を、代謝酸化還元バランスに留意した設計により進めた。

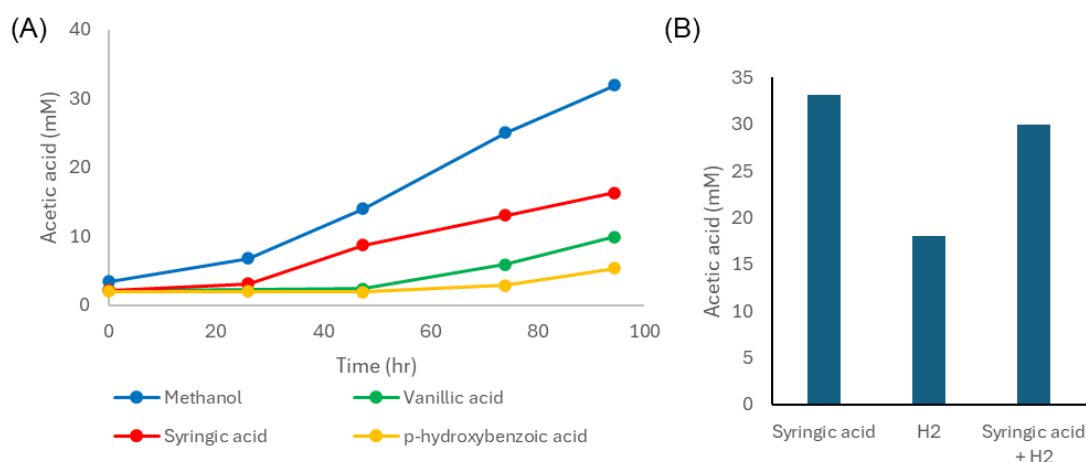


図 2 各種メトキシ化合物の資化試験および H_2 の添加効果試験

メトキシ基の酸化経路を根本から破壊するため、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素遺伝子を標的とする遺伝子破壊を設計した。遺伝子破壊を行う際の基本培養条件である糖を基質とする際、代謝量論計算を行うと NADH が余剰に発生することが予想されたため、遺伝子破壊と同時に NADH を消費する乳酸合成経路を導入する設計とした。コンストラクトを構築し遺伝子導入試験を行ったが、取得クローンはすべて偽陽性であった。予想と異なる代謝インバランスに対応するため、電子供与体、受容体を追加で添加する検討も行ったが、目的の株の取得には至らなかった。

原因を探るため、また、将来的により効率的な合成代謝構築のデザインに向け、各基質条件下における遺伝子発現の比較をトランスクリプトーム解析により行った。遺伝子破壊標的としたメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素は糖の代謝時にはメトキシ化合物、 H_2 時よりも発現量は低く、遺伝子破壊の困難さとの関連は不明であった。一方、メトキシ化合物利用の鍵となるメチル基転移酵素やメトキシ化合物利用において重要な補因子を構成するコバラミン系の遺伝子は、メトキシ化合物の代謝時には発現上昇が著しかった。 H_2 代謝の鍵となるヒドロゲナーゼ発現は基質条件間で大きな違いは見られなかった。

結論

リグニン由来メトキシ芳香族と H_2 の同時資化による低炭素型のものづくり宿主として選択した *N. thermoacetica* は代表的なメトキシ化合物を資化するとともに、 H_2 を同時に投与しても代謝に干渉は見られず、好適な微生物であった。メトキシ化合物の資化を H_2 からの還元力利用により行う低 CO_2 排出型の合成代謝構築の試みは難航し、刷新した設計戦略が必要である。また、合成代謝の効率化にはメチル基利用経路の調節が重要であることが示唆された。本研究を通じ、再生可能資源を効率的に利用する合成代謝系の構築に向けた基盤が得られたと考えている。

文献

- 1) Drake, H.L. and Daniel, S.L. (2004) Physiology of the thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*. *Res. Microbiol.* **155**:869-883.
- 2) Kato, J.*, Matsuo, T.* *et al.* (2024) Isopropanol production via the thermophilic bioconversion of sugars and syngas using metabolically engineered *Moorella thermoacetica*. *Biotechnol. Biofuels. Bioprod.* **17**:13.
- 3) Kobayashi, S.*, Kato, J.* *et al.* (2022) Reversible hydrogenase activity confers flexibility to balance intracellular redox in *Moorella thermoacetica*. *Front. Microbiol.* **13**:897066.