

代謝アドオンシステムと物質生産

吉田 健一

コンピュータソフトウェアに部分的な機能を追加する小さなソフトウェアは一般に“アドオン”と呼ばれる。“アドオン”は主体的に機能するソフトウェアに取り込まれて初めて役立つものであり、それ自身単独に機能を果たすことはない。“代謝アドオンシステム”とは、これにヒントを得た筆者の造語である。

特定の生体変換能力を付与する人工的な代謝経路（あるいはそれを可能にするひとつまたは複数の酵素の遺伝子）を微生物に組み込んだ細胞触媒は、これまでも多種多様なタイプのものが開発され、その枚挙に暇がない。細胞触媒は細胞外から原料基質を取り込み、細胞内での特定の酵素反応経路を経て生体変換を施した生成産物を細胞外へと放出する。この目的のために細胞へ人工的に組み込まれる代謝経路は、多くの場合それ自身で自己完結するべきであるという設計思想に基づいている。すなわち、人工的な代謝経路を構成する複数の酵素反応は、環状サーキットを形成して試験管内でも自律的に機能することが理想であり、細胞に本来備わっている基幹代謝系には影響を与えず、逆に基幹代謝系からも影響を与えられないようにデザインされるのがよいとされてきた。したがって、微生物細胞自体は人工的な代謝経路を形成する酵素の遺伝子を発現させる”入れ物”に過ぎず、また基幹代謝系の寄与はあまり問題にされない傾向にある。

そこで“代謝アドオンシステム”であるが、この場合も人工的代謝経路を細胞に組み込むのは同じだが、従来の細胞触媒の設計思想に基づいて組み込まれるそれとは似て非なるものである。まず、“代謝アドオンシステム”で組み込まれる経路は環状サーキットではない。よって、不可欠な代謝資源の供給が限界を超えた時点で破綻せざるを得ず、自らは継続的に維持できない（これが独立性のない“アドオン”になぞらえた所以である）。そのため、“代謝アドオンシステム”が駆動すると必ず細胞内で特定資源の枯渇という“ひずみ”が生じるので、基幹代謝系はそれを解消しようとする。そして、その解消力こそが“代謝アドオンシステム”の駆動力となる。つまり、“代謝アドオンシステム”の機能は基幹代謝系からの駆動力供給を前提として成立する。したがって、基幹代謝系に何等かの変調が起って初めて“代謝アドオンシステム”は機能を果たし、また“代謝アドオンシステム”の駆動を可能にする基幹代謝系の変調を解明することは、基幹代謝系が資源枯渇の“ひずみ”に如何に対応するかという問題を解くことにもなる。このアプローチは、環状サー

キットではない半端な代謝経路を細胞に作りこみ、この“居候”に細胞がどう対応するか反応を見ることで、基幹代謝系が自ら見いだす合理的な問題解決策を浮き彫りにする“探り針”戦略と言うこともできる。応用面から見ると、ある“代謝アドオンシステム”が首尾よく機能するならば、それが新たなタイプの細胞触媒の設計思想を提案することにもなり得るだろう。

以下、筆者が研究対象としているイノシトール異性体変換の“代謝アドオンシステム”を枯草菌で組んだ場合を例に具体を検討することとしよう。

“代謝アドオンシステム”の実例

イノシトール（1,2,3,4,5,6-シクロヘキサンヘキサオール）には、6つの水酸基の立体配座の組み合わせによって9種の異性体が存在する。天然にもっとも多く存在する異性体は*myo*-イノシトールであり、米ぬかなどに含まれるフィチン（*myo*-イノシトールの6リン酸エステル塩）から安価に供給される。しかし、他の異性体は一般に希少かつ高価である。筆者らは枯草菌のイノシトール代謝経路¹⁻⁶⁾を応用して、*myo*-イノシトールを希少な他のイノシトール異性体へ変換する方法論の開発に取り組んでいる。その過程で、アルツハイマー病の治療薬候補として期待される異性体である*scyllo*-イノシトールへの生体変換を可能とする“代謝アドオンシステム”を考案した（図1）⁷⁾。

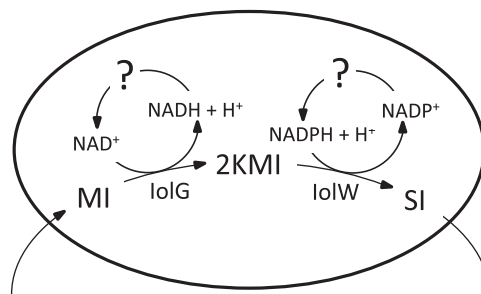


図1. イノシトール異性体変換“代謝アドオンシステム”の概要。枯草菌細胞内で起こるイノシトール異性体変換反応を模式的に示す。クエッションマークで示したNAD⁺およびNADPHの再生が細胞の基幹代謝系から供給される“代謝アドオンシステム”の駆動力となる。図中の略号:MI (*myo*-イノシトール), 2KMI (2-keto-*myo*-イノシトール), SI (*scyllo*-イノシトール), IolG (*myo*-イノシトール脱水素酵素), IolW (*scyllo*-イノシトール脱水素酵素)。

このイノシトール異性体変換“代謝アドオンシステム”は、細胞内へ取り込まれた *myo*-イノシトールを *IoIG* によって NAD^+ の還元を伴って 2-keto-*myo*-イノシトールへと酸化し、ついで *IoIW* によって NADPH の酸化を伴って *scyllo*-イノシトールへと還元する 2段階反応より構成される (図1)。第1段階反応では NAD^+ が消費されて NADH が生じ、また第2段階反応では NADPH が消費されて NADP^+ が生じる。この“代謝アドオンシステム”は、人工的な NAD^+ と NADPH の再生経路を内包していないので、これら補酵素が細胞内から枯渇するとともに破綻してしまうと予測される。しかし勿論、 NAD^+ と NADPH の枯渇は細胞自体にとっても死活問題なので、細胞の基幹代謝系はどうかしてこの“ひずみ”を解消しようとする。まず、一般に可能性が想定されるのは NADH から NADP^+ へ水素を転移するトランスヒドロゲナーゼの経路であるが、枯草菌にはその酵素自体が存在しないので、なにか未知の別経路が活性化されるはずである。ところで、好気的環境では呼吸によって NADH は容易に NAD^+ に酸化されるので、偏性好気性生物である枯草菌では、 NAD^+ の不足はほぼストレスなく解消されると考える方が妥当だろう。したがって、 NADP^+ から NADPH の再生こそがこの“代謝アドオンシステム”を起動するための原動力となると想定することができそうである。すなわち、この“代謝アドオンシステム”の駆動によって *myo*-イノシトールが *scyllo*-イノシトールへと生体変換される効率は、基幹代謝系において NADPH が再生される効率と読み替えることができ、また生体変換効率が高まる条件とその際の基幹代謝系の状態の詳細を明らかにすることで、枯草菌における誘導的な NADPH の再生経路が判明すると期待される。では、果たして事実はその通りだろうか？

“代謝アドオンシステム”の動作と解析

上記の生体変換の変換率を精密かつ定量的に評価する GC-TOFMS 測定系を立ち上げ、効率化に寄与する培地条件を検討した。その結果、特に窒素源濃度を適度に高めた場合に、細胞増殖に大きな変化を伴わず変換率のみが向上することが見いだされた (図2)⁷⁾。そして、その他の培地成分を含めて最適化された条件においては、培地中の *myo*-イノシトールの 50% が *scyllo*-イノシトールへと変換される高効率な生体変換が可能となることが判明した。この結果より、所定の培養条件において枯草菌の基幹代謝系は NADP^+ を NADPH へと還元する何らかの機構を活性化させる可能性が見込まれると筆者らは考えている。

トランスクリプトーム解析によって観察できる遺伝子発現の変化をもとに、上記の培養条件において活性化される代謝経路の抽出を試みたところ、少なくとも糖新生

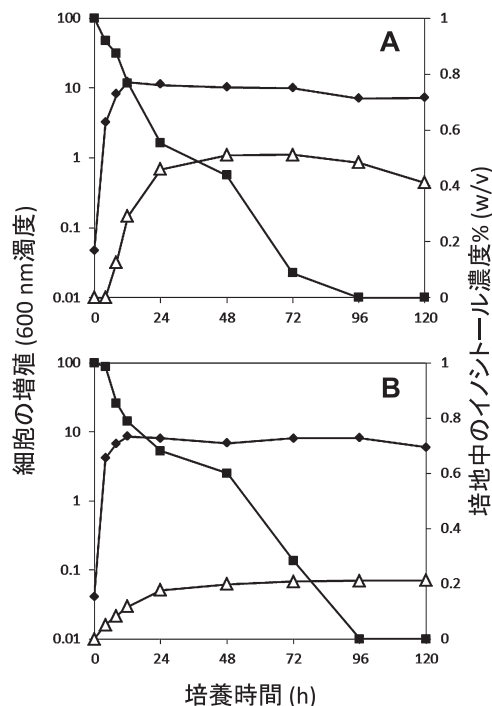


図2. “代謝アドオンシステム”によるイノシトール異性体変換. “代謝アドオンシステム”を組み込んだ枯草菌細胞を窒素源濃度2% (A) あるいは1% (B) にて培養し、細胞の増殖 (◆) と培地中の *myo*-イノシトール (■) と *scyllo*-イノシトール (△) の濃度を継時的に測定した。

とペントースリン酸経路が促進する可能性が示唆されている。ペントースリン酸経路は元来、一般に脂質合成に必要な NADPH の需要を賄うことが知られており、このことから考えても筆者らの得た示唆は合理的ではないかと推定される。以上より、この“代謝アドオンシステム”は、実際の有用物質生産にも利用可能であり、さらに加えて枯草菌に備えられた誘導的 NADPH 再生系の発見とその代謝工学ツールとしての活用の可能性を示唆している。しかし、依然として窒素源濃度を高めることが、いかにして誘導的 NADPH 再生系を活性化に繋がったのか説明がつかない。さらには、遺伝子発現の変動から推定した代謝経路の活性化が実際に生じているかの確認についてもさらなる解析を待たねばならず、現状ではいまだ原因究明の端緒についたに過ぎない。

文 献

- 1) Yoshida, K. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **179**, 4591 (1997).
- 2) Yoshida, K. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **184**, 983 (2002).
- 3) Yoshida, K. *et al.*: *Microbiology*, **150**, 571 (2004).
- 4) Yoshida, K. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 1310 (2006).
- 5) Yoshida, K. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **283**, 10415 (2008).
- 6) Morinaga, T. *et al.*: *Microbiology*, **156**, 1538 (2010).
- 7) Yamaoka, M. *et al.*: *Microb. Cell Fact.*, **10**, 69 (2011).