

## 菌に優しいものづくり

中川 明

菌を用いたものづくり、いわゆる微生物発酵法は、基本的に酵素反応を利用するため、光学特異性、官能基特異性に優れ、環境に優しく、古くより研究されてきたテクノロジーである。化学合成法では難しい化合物は、微生物発酵法で生産されることが多々あり、これまでに、主として、一次代謝産物であるアルコール、有機酸、アミノ酸が微生物発酵法で生産されてきた。近年では、強い生理活性を持ち、実際に医薬、創薬研究に役立つ多くの二次代謝産物についても、生合成経路が続々と判明してきており、管理、培養が容易な微生物を用いた発酵生産が可能になってきた。

プラスミドベクターを用いた遺伝子導入は、強力な遺伝子工学的ツールであり、さまざまな微生物発酵法に用いられている。一方で、プラスミドの存在が菌体に負荷をかけるという点で問題も多い。たとえば、物質生産に広く用いられている Duet ベクターを大腸菌 BL21(DE3) 株に導入し、発現誘導させるための化合物である IPTG による発現誘導を行うだけで、何の遺伝子もクローニングしていないにも関わらず、菌の細胞膜に形態異常が生じ、菌は死んでしまう<sup>1)</sup>。こうしたネクロシスが、物質生産の効率に多大な影響を及ぼすことは容易に想像できるであろう。そのため、遺伝子発現の菌に対する負荷を軽減することが、生産量向上に役立つと考えられている。この点は、導入する遺伝子の数の多い二次代謝産物の生産においては特に考慮すべき点である。抗菌作用を持つ青色色素ピオラセインは、5つの酵素遺伝子を導入することによりトリプトファンから生産される。このピオラセイン合成系においては、弱いプロモーターの組合せにより、強いプロモーターのみを組み合わせた場合に比べ、およそ240倍もの生産量改善が見られた<sup>2)</sup>。つまり、酵素遺伝子をとにかく多量に発現させるのではなく、発現量と菌に対する負荷のバランスを考慮することが、生産量向上に役立つことが示唆された。プロモーターを弱くする以外にも、プラスミドのコピー数を減らしたり、リボソーム結合配列を変えてその結合を弱めたりする方法も有効であることが示されている。

プラスミド由来の発現を調整する以外にも、プラスミドによる菌体への負荷を低減させる試みがなされている。今のところ機序は明らかになっていないが、一般にプラスミドを持つ菌は、酸素呼吸が弱まることによりエ

ネルギー産生が低減してしまうと考えられている。そこで、酸素運搬タンパク質であるヘモグロビンを導入すれば、菌体内酸素量が増え、生産能が向上すると考えられた。グラム陰性であるビトレシオラ属細菌の一種はバクテリアとしては珍しく、ヘモグロビンを有している。このヘモグロビンを微生物に導入すると、予想通り、呼吸活性が上がり、生育が改善した。実際に、タンパク質生産、エタノール生産、抗生物質生産などにおいて、高生産の実現が報告されている<sup>3)</sup>。酸素吸収能を向上させるというアプローチは、今後、菌を用いたものづくりにおいて広く用いられると考えられる。

上述のプラスミド由来の菌に対する負荷に加えて、考えなければならないのが、中間代謝産物の毒性である。毒性のある中間代謝産物の蓄積は、菌に負担をかけ、結果、生産量の低下を引き起こす。バイオディーゼル燃料生産は、エタノールとアシルCoAを融合する反応を介して行われるが、中間代謝産物のエタノールは、当然、菌にとっては有害である。しかし、エタノール生成はアシルCoAの生成より効率がよく、エタノールが過剰に蓄積してしまう。そこで、Keaslingらは、アシルCoAが十分量蓄積するまで、エタノールの生産を止め、ある程度アシルCoAが蓄積してからエタノール生産をONにするというバイオセンサーを開発した<sup>4)</sup>。具体的にはアシルCoA応答リプレッサーFadRとそれに鋭敏に応答する人工プロモーターを用いて、エタノール生産遺伝子を制御したのである。このバイオセンサーの利用により、4倍以上のバイオディーゼル燃料生産に成功している。

古くより研究されてきた単純な化合物の生合成工学では問題にならなかったことが、今後、さまざまな化合物に用いられるであろう多段反応系構築では、非常にクリティカルな問題になることが示されている。現在のところ、複数の反応ステップを必要とする化合物の生産は、少量でもまずは作ればよいという研究が多いが、今後、実用化を目指した場合、さまざまな菌に優しい手法が重要になってくると考えられる。

- 1) Dvorak, P. et al.: *Microb. Cell Fact.*, **14**, 201 (2015).
- 2) Jones, J. A. et al.: *Sci. Rep.*, **5**, 11301 (2015).
- 3) Stark, B. C. et al.: *Biotechnol. Lett.*, **33**, 1705 (2011).
- 4) Zhang, F. et al.: *Nat. Biotechnol.*, **30**, 354 (2012).