

## ペリプラズムにおける代謝工学

片岡 尚也

グラム陰性細菌は、電子伝達系酵素や輸送タンパク質が埋め込まれた脂質二重層により構成される細胞膜の外側に、ポリンを含む細胞外膜を持っている。ペリプラズムは、この細胞膜と細胞外膜の二つにより囲まれた空間を指し、加水分解酵素や結合タンパク質などが存在している。これらのタンパク質は主に、SecまたはTat (Twin-Arginine Translocation) 膜透過装置によりペリプラズムへと分泌されており、特徴としてN末端領域にシグナル配列を有している<sup>1)</sup>。

ペリプラズムでの物質代謝が発達した細菌として我々となじみ深いものは、古くから食酢醸造に利用されてきた酢酸菌であろう。酢酸菌は、細胞膜のペリプラズム側に多種多様な膜結合型脱水素酵素を保有しており、その働きによりさまざまな糖やアルコールを不完全に酸化する酸化発酵と呼ばれる代謝を営む。酸化発酵における最終電子受容体は酸素であり、電子伝達系のユビキノール酸化酵素により水へと還元される<sup>2)</sup>。近年、酢酸菌のペリプラズムでの代謝工学に関する興味深い報告がなされたので、本稿で紹介する。酢酸菌をその発酵特性から分類すると、エタノールの酢酸への酸化に長けた*Acetobacter*属および*Komagataeibacter*属、糖類や多価アルコールの酸化に長けた*Gluconobacter*属の二つに分類される。ここからの主役は、後者の*Gluconobacter*属である。

まず、トレハロースを炭素源として生育する*Gluconobacter oxydans*の造成である。トレハロースは、二分子の $\alpha$ -グルコースが1,1-グリコシド結合してできる二糖であり、*G. oxydans*はこの二糖を炭素源として生育することはできない。そこでKosciowらは、トレハララーゼをペリプラズムで機能的に発現させることを考えた。*G. oxydans*で恒常的に発現可能なプロモーターの支配下に、高性能シグナル配列に自身のシグナル配列を置換した大腸菌由来トレハララーゼをコードする遺伝子を組み込んだプラスミドを構築し、*G. oxydans*に形質転換した。その結果、この組換え*G. oxydans*は、トレハロースを炭素源とする培地での生育能を獲得し、グルコースの酸化発酵産物である5-ケトグルコン酸と細胞内代謝産物である酢酸を生成していた<sup>3)</sup>。こういった基盤技術を開発できると応用微生物学者は、如何にしてこの技術を産業的に利用できるかを考えるものである。上記研究グループは、開発した技術を拡張することで甘味料として有用な5-ケト

フルクトースを安価な原料から生産できることをさらに報告している。具体的には、インペルターゼおよび膜結合型フルクトース脱水素酵素複合体を*Gluconobacter*属で共発現させることによる、スクロースからの5-ケトフルクトース生産である。この実現のためHoffmannらはまず、さまざまな*Gluconobacter*属を対象に高活性なインペルターゼのスクリーニングを行った。他属を含まなかった理由として、膜透過装置の適合性が低くなるからだと予想される。餅は餅屋、ということだろう。その後、膜上でのグルコース酸化能を失った*G. oxydans*を宿主に、膜結合型フルクトース脱水素酵素複合体をコードする遺伝子群をゲノム上で、高活性インペルターゼをコードする遺伝子をプラスミドを用いて、恒常的に発現させた。構築した組換え*G. oxydans*は、80%を超える変換率で5-ケトフルクトースを生産した<sup>4)</sup>。

ペリプラズムでの物質代謝は、その特性から、(i) 取込み・排出にかかるエネルギー・時間を節約できる、(ii) 細胞膜外での反応であるため毒性物質を対象にできる、などの利点を有する一方で、反応が加水分解や脱水、水和、電子伝達系と協働する酸化反応などに限定される点をデメリットに持つ。ペリプラズムでの代謝工学の発展には今後、たとえば、NAD(P)<sup>+</sup>やNAD(P)Hを補酵素とする酸化還元反応を可能にさせる技術の確立などが望まれ、また同時に、遺伝子工学的ツールや有用酵素に関する遺伝学・生化学情報の充実も必要となってくる。簡単でないのは直感的に感じるができるが、挑戦していきたいと思わせる研究課題である。

最後に酢酸菌を研究していて出逢った不思議な現象を紹介して終わりたい。酢酸菌の発酵液を高速液体クロマトグラフで分析した時にだけ廃液中に昆虫の死骸が浮いているのである。大腸菌やアミノ酸生産コリネ型細菌の発酵液ではお目にかかれない現象である。研究から離れた場で無意識に耳を澄ましてみると「ゴーストの囁き」が聞こえた気がした<sup>5)</sup>。

- 1) 菊池慶実：化学と生物，**47**, 397 (2009).
- 2) 薬師寿治ら：バイオサイエンスとインダストリー，**67**, 308 (2009).
- 3) Kosciow, K. et al.: *J. Biotechnol.*, **189**, 27 (2014).
- 4) Hoffmann, J. J. et al.: *J. Biotechnol.*, **307**, 164 (2020).
- 5) 加藤純一：生物工学，**97**, 593 (2019).