

# シアノバクテリア由来の光応答スイッチの 大腸菌代謝工学への利用

戸谷 吉博

## はじめに

大腸菌などの宿主微生物の代謝経路を利用したさまざまな有用物質生産が行われている。代謝工学の研究では、原料から目的物質への変換効率を高めるため、代謝システムを合理的に改変することが行われてきた。近年、遺伝子発現の制御手段として、オプトジェネティクスが注目されている。オプトジェネティクスとは、可逆的に光変換するタンパク質を利用して、細胞内の生理現象をコントロールする技術である。シアノバクテリアはフィトクロムやフィトクロム様光受容タンパク質を持ち、外界の光を感知してこれらのタンパク質を光変換することで、二成分制御系を介してさまざまな生理反応を調節する仕組みを備えている<sup>1)</sup>。本稿では、シアノバクテリア由来の二成分制御系に着目し、この仕組みを利用した大腸菌細胞内における光応答代謝スイッチについて紹介する。

## 代謝工学とオプトジェネティクス

代謝工学では、目的物質の生産性に適した状態になるように、代謝経路における化合物の流れ（フラックス分布）を最適化することを目指す。従来、標的遺伝子の欠失や過剰発現が行われてきたが、理想的なフラックス分布を実現するためには、標的遺伝子の発現量の微調節が必要である。イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (IPTG) などの薬剤による発現システムを利用したフラックス分布の調節も行われているが<sup>2)</sup>、培地に一度加えた薬剤を除くことができないため、可逆的な遺伝子発現制御が望ましい。IPTGのような薬剤と異なり、光は培養槽の外部から照射するため、何度でもオン・オフを繰り返すことが可能である。また、光の強度、波長、照射タイミングを自由に変えることができる。このような長所から、オプトジェネティクス技術を代謝工学のツールとして活用することが期待されている<sup>3)</sup>。大腸菌には光を感知する仕組みがないので、内在のシステムとクロストークする危険がないことも利点の1つである。Zhaoらは、酵母のイソブタノール生産において、EL222という青色光を当てると遺伝子発現が促進、暗所で抑制されるシステムを利用し、増殖に必要な遺伝子（青色光で

誘導）とイソブタノール生産経路の遺伝子（暗所で誘導）の発現をスイッチする技術を開発し、イソブタノールの高い生産性を実現した<sup>4)</sup>。興味深いのは、増殖を抑制してイソブタノール合成を誘導した定常期において、パルス的に青色光を照射することで、まるで細胞に「喝」を入れるがごとく、長期間の生産期を実現している。このようにオプトジェネティクスは、微生物の発酵生産を高度化するうえで、新しい有用なツールとなることが期待されており、さまざまなオプトジェネティクスのシステムが報告されている<sup>5)</sup>。

## 大腸菌で働くオプトジェネティクスのシステム

大腸菌で利用可能な二成分制御系によるオプトジェネティクスのさまざまなシステムについて、表1にまとめた。

**Cph8/OmpR** シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis*) のCph1はフィコシアノビルリン (PCB) を色素として結合する光受容タンパク質であり、赤色光を感知するセンサーとして働く。大腸菌でのオプトジェネティクスに用いるため、*Synechocystis* のCph1と大腸菌のヒスチジンキナーゼ EnvZ のN末端ド

表1. オプトジェネティクスのシステムとその性能

システム	性能および特徴	
Cph8/OmpR <sup>6)</sup>	波長：活性/不活性 703 nm (dark) /650 nm	発現比率 72倍
	制御プロモータ <i>ompC</i>	補因子 PCB
	由来 Cph8は <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803と大腸菌のキメラタンパク質、OmpRは大腸菌由来	
CcaS/CcaR <sup>7)</sup>	波長：活性/不活性 535 nm/670 nm	発現比率 600倍
	制御プロモータ <i>cpcG2</i>	補因子 PCB
	由来 <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	
UriS/UriR <sup>8)</sup>	波長：活性/不活性 405 nm/534 nm	発現比率 6.2倍
	制御プロモータ <i>csiR</i>	補因子 PVB
	由来 <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	

著者紹介 大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻(准教授) E-mail: ytoya@ist.osaka-u.ac.jp

メインのキメラタンパク質Cph8が構築されている<sup>6)</sup>。Cph8は遠赤色光を吸収するとキナーゼ活性を持ち、EnvZのレスポンスレギュレータのOmpRをリン酸化する。リン酸化されたOmpRは、ompCのプロモータに結合して転写を促進する。赤色光を吸収するとCph8はキナーゼ活性を失い、発現は抑制される。ただし、大腸菌はPCBを自己合成することができないため、Synechocystis由来のpycAとholを導入することでヘムから合成させる必要がある。大腸菌での利用に最適化されたCph8/OmpRシステムでは、赤色光に対して遠赤色光を照射した際の発現量が72倍に変化することが報告されている<sup>6)</sup>。

**CcaS/CcaR** SynechocystisのCcaS/CcaRは、集光アンテナのリンカータンパク質CpcG2の発現制御に関する二成分制御系として知られている<sup>9)</sup>。CcaSはセンサー部位とヒスチジンキナーゼ部位を持つ<sup>6)</sup>。緑色光を受けるとキナーゼ活性を持ち、レスポンスレギュレータのCcaRをリン酸化する。リン酸化されたCcaRは、cpcG2のプロモータの領域に結合して転写を促進する。一方、赤色光を吸収するとCcaSはキナーゼ活性を失い、転写は抑制される<sup>7)</sup>。大腸菌での利用に最適化されたシステムでは、構成要素の発現量の最適化に加え、CcaSにおける機能未知の2つのPASドメインを削除することで<sup>10)</sup>、赤色光に対して緑色光を照射した際の発現量が700倍に変化することが報告されている<sup>7)</sup>。Cph8と同様にCcaSも補因子としてPCBを必要とするため、大腸菌での使用においてはPCB合成経路の導入が必要である。

**UriS/UriR** SynechocystisのUriS/UriRは、低CO<sub>2</sub>に対するストレス応答に関する非翻訳RNAのcsiR1の発現制御に関する二成分制御系とされている<sup>8)</sup>。UriS/UriRは、紫外光で活性化し、緑色光で抑制されるシステムである。UriSは、PCBから変換されるフィコビオロピリン (PVB) を色素に用いる。紫外光を吸収して活性化したUriSは、レスポンスレギュレータのUriRをリン酸化し、csiR1プロモータ下の転写をする。大腸菌に導入したUriS/UriRのシステムは、緑色光に対する紫外光照射時の発現量が6.2倍に変化することが報告されている<sup>8)</sup>。

### 解糖系とメチルグリオキサル経路の制御

筆者らは、CcaS/CcaRのシステムを大腸菌に導入し、解糖系のトリオースリン酸イソメラーゼ (TPI) の発現制御に応用した (図1a)<sup>11)</sup>。TPIは、ジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) からグリセルアルデヒド3リン酸 (GAP) への反応を触媒する酵素である。DHAPは3-ヒドロキシプロピオン酸 (3-HP) や1, 3-プロパンジオール

(1, 3-PDO) などの有用化合物の前駆体であり、DHAPからこれらの目的化合物の生合成経路に代謝フローを変えるにはTPIをコードするtpiAの遺伝子破壊が有効な手段であった<sup>12,13)</sup>。しかし、tpiA破壊は細胞増殖を著しく抑制するため、条件に応じたtpiA発現の制御が必要と考えた。

CcaS/CcaRにおけるTPI発現制御株を構築するため、大腸菌BW25113株のゲノム上のtpiA遺伝子を欠失した株に、ccaSとccaR遺伝子、およびPCB合成に必要なholとpycAを導入し、cpcG2プロモータ下で大腸菌のtpiAを導入した。代謝スイッチを構築するには、制御する遺伝子 (この場合はtpiA) の発現をフラックスの制御に適切な範囲に設定するのが肝要であり、本研究では、低コピーのプラスミドを利用することで実現した (図1b)<sup>11)</sup>。

この株では、グルコースを炭素源として培養すると、解糖系によってDHAPとGAPに変換される。緑色光下ではTPIが発現するため、DHAPはGAPに変換され、解糖系下流を経由して代謝される。一方、赤色光下ではTPIの発現が抑制されるため、DHAPはメチルグリオキサル (MGO) 経路を迂回して代謝されることが期待される (図1a)。MGO経路はエネルギー生産を伴わず、中間体のMGOは細胞毒性があるため、赤色光下においては増殖速度の低下が予測された。

構築した株を赤色光および緑色光のLED照射下でそれぞれ培養したところ、緑色光下における増殖速度は赤色

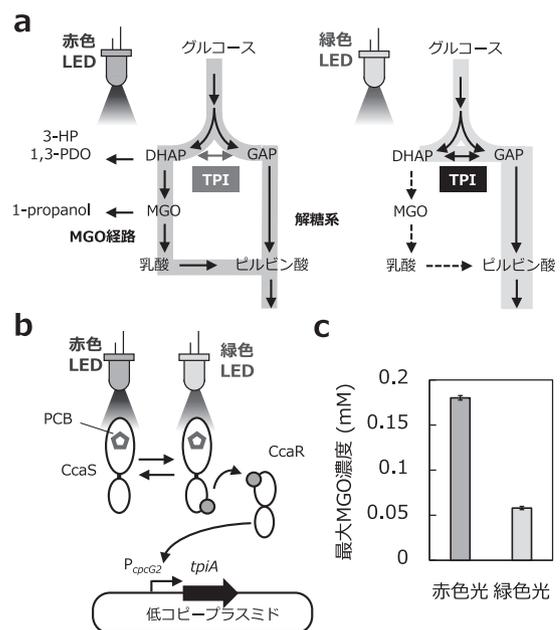


図1. CcaS/CcaRシステムによるTPI発現スイッチ. a) TPI発現制御による解糖系とMGO経路のフラックスの調節, b) CcaS/CcaRによるtpiAの発現量の概要, c) 細胞外のメチルグリオキサル濃度の最大値.

光下よりも1.5倍高かった。 *tpiA* 遺伝子破壊株では、MGOが細胞外に漏れることが知られている。そこで、MGO経路と解糖系のフラックス比を測定できない代わりに、細胞外のMGO濃度をフラックスの指標として評価したところ、赤色光下における最大MGO濃度は緑色光下よりも4倍高かった(図1c)。これらの結果は、TPIにおける代謝スイッチが光照射によって設計通りに働いたことを示唆している。

### 解糖系と酸化的ペントースリン酸経路の制御

次に、筆者らはCcaS/CcaRのシステムを解糖系のグルコース6リン酸イソメラーゼ(PGI)の発現制御に応用し、解糖系とペントースリン酸(PP)経路のフラックス比の制御を試みた(図2)<sup>14)</sup>。解糖系とPP経路は、グルコース6リン酸(G6P)からの分岐経路であり、PP経路では炭素原子を1つCO<sub>2</sub>として損失するが、還元力として重要な2分子のNADPHを獲得する。一方、解糖系では、CO<sub>2</sub>の損失はないがNADPHを生産できない。そのため、生合成にNADPHを必要とする化合物の生産においては、解糖系とPP経路のフラックス比が収率に影響を及ぼす<sup>2)</sup>。たとえば、解糖系の最終産物のアセチルCoAとNADPHから合成されるメバロン酸の生産においては、解糖系とPP経路のフラックス比が40:60において最大の収率になることが、アセチルCoAとNADPHの物質収支から予測される。薬剤誘導によって解糖系とPP経路のフラックス比を調節した結果、このフラックス比においてメバロン酸の収率をもっとも高くなることを実験的に確認した<sup>2)</sup>。

前述のTPI発現制御株と同様に、ゲノム上の *pgi* を欠失した株に *ccaS* と *ccaR*, *hol1*, *pycA* を導入し、低コピープラスミドを用いて、*cpcG2* プロモータ下に大腸菌の *pgi* を導入した<sup>14)</sup>。この株は、緑色光下ではPGIが発現するため、細胞に取り込まれたグルコースは主に解糖系を經由して代謝される。一方、赤色光下ではPGIの発現が抑制されるため、G6Pは主にPP経路を經由して代謝される。野生株に比べて *pgi* 破壊株では、増殖速度が低下することが報告されており、赤色光下における増殖速度の低下が期待された。

構築した株を各色光下でそれぞれ培養したところ、予想とは異なり、赤色光下において増殖速度の低下が見られなかった。制御した *pgi* の mRNA 量は狙い通り赤色光下において低下していたことから、さらにPGIの酵素量を減らすためPGIタンパク質に分解タグを付加した。最終的に構築した株は、期待通り緑色光下における増殖

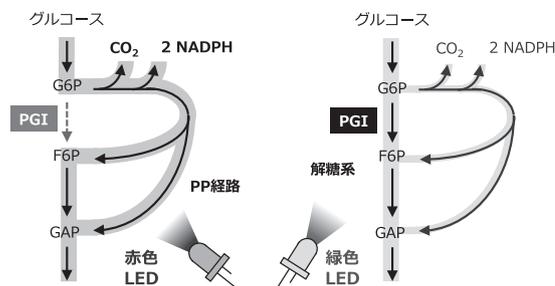


図2. CcaS/CcaR システムによる PGI 発現スイッチ

速度は赤色光下の約3倍であり、<sup>13</sup>C-代謝フラックス解析の結果、解糖系とPP経路のフラックス比は、緑色光下では49:50、赤色光下では1:99であり、PGIにおける代謝スイッチが正しく働いたことが確認できた<sup>14)</sup>。

### おわりに

本稿では、大腸菌で機能するシアノバクテリア由来のオプトジェネティクスのツールを示し、その1つのCcaS/CcaRを中枢代謝経路における代謝スイッチに応用した研究を紹介した。表1に示したように、さまざまな波長の光で独立に制御可能なシステムが開発されており、これらを組み合わせることで、より精緻に代謝経路全体にわたるフラックス分布を調節することが期待される。また、蛍光タンパク質と組み合わせることで、フィードバック制御を行い、遺伝子発現を外部から制御できる応用例も報告されている<sup>15)</sup>。このようにオプトジェネティクスは、代謝工学の新しい技術の可能性を有している。

### 文 献

- 1) 広瀬 侑, 池内昌彦: 化学と生物, **54**, 403 (2016).
- 2) Kamata, K. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **11**, 1080 (2019).
- 3) 戸谷吉博, 清水 浩: バイオサイエンスとインダストリー, **78**, 30 (2020).
- 4) Zhao, E. M. et al.: *Nature*, **555**, 683 (2018).
- 5) Liu, Z. et al.: *Front. Microbiol.*, **9**, 2692 (2018).
- 6) Schmidl, S. R. et al.: *ACS Synth. Biol.*, **3**, 820 (2014).
- 7) Ong, N. T. and Tabor, J. J.: *Chembiochem.*, **19**, 1255 (2018).
- 8) Ramakrishnan, P. and Tabor, J. J.: *ACS Synth. Biol.*, **5**, 733 (2016).
- 9) 広瀬 侑: 光合成研究, **18**, 46 (2008).
- 10) Nakajima, M., et al.: *Sci. Rep.*, **6**, 37595 (2016).
- 11) Senoo, S. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **116**, 3292 (2019).
- 12) Ohno, S. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **115**, 221 (2012).
- 13) Jung, J. Y. et al.: *J. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 1797 (2008).
- 14) Tandar, S. T. et al.: *Metab. Eng.*, **55**, 68 (2019).
- 15) Miliadis-Argeitis, A. et al.: *Nat. Commun.*, **7**, 12546 (2016).