

1S-Bp01 代謝トグルスイッチによる物質生産向上の試み

○花井 泰三
(九大院・農)
taizo@brs.kyushu-u.ac.jp

生体分子ネットワークを「眺めて解析する生物学」から、「創って解析する・利用する生物学」を目指し、2000年頃から米国で合成生物学 (synthetic biology) という研究が行われている。サイエンスの面では、同定済みの相互作用する生体分子を組み合わせた人工遺伝子回路 (Genetic circuit) を設計して、発振回路などの特定の生体内現象を再現させようとする試みがなされている。また、エンジニアリングの面では、別の生物由来の酵素遺伝子を複数組み合わせた合成代謝経路 (Synthetic pathway) を設計し、その生物が本来生産できない物質を大量生産させる試みが行われている。ここでは、我々のグループの研究結果を例に、人工遺伝子回路および合成代謝経路の研究を紹介したい。

まず、人工遺伝子回路についての研究であるが、我々は遺伝子トグルスイッチの開発を行っている。遺伝子トグルスイッチとは二つの遺伝子 (例えば遺伝子①と②) のうち、初期状態では①の発現がONで②の発現がOFF、誘導添加などでスイッチを切り替えるように、逆に①がOFFで②がONというように二つの遺伝子の発現を同時に制御できるものを指している。PLtetO-1およびPLlacO-1プロモーター、TetRおよびlacIリプレッサーを利用したトグルスイッチを作成したが、望み通りの遺伝子発現を行わせるためには、lacIリプレッサーの供給量とその他の要素のバランスが重要であることが明らかとなった。次に、合成代謝経路についての研究であるが、我々はイソプロパノール、イソブタノール、ブタノールを生産する合成代謝経路の開発を行っている。ここでは、イソプロパノール生産大腸菌について紹介したい。グルコースからイソプロパノールを生産するために必要な4種類の酵素の遺伝子を、アルコールデヒドロゲナーゼは *C. beijerinckii* NRRL B593 から、それ以外は *E. coli* K-12 MG1655 と *C. acetobutylicum* ATCC824 から、大腸菌に導入した。上記の遺伝子のいくつかの組み合わせで、81.6mMのイソプロパノールが生産された。最後に、開発した遺伝子トグルスイッチとイソプロパノール合成代謝経路を組み合わせて、代謝トグルスイッチを開発した。イソプロパノール合成代謝経路は大腸菌の AcetylCoA を利用するが、菌体増殖に必要なアミノ酸、エネルギーなどの供給を担う TCA サイクルも AcetylCoA を利用するため、菌体増殖と物質生産で AcetylCoA を奪い合うこととなる。このため、TCA サイクルに AcetylCoA を導入する酵素遺伝子 *gltA* の遺伝子発現を、菌体増殖時にはON、菌体増殖終了後にはOFFとし、一方、イソプロパノール合成代謝経路遺伝子群の遺伝子発現を、菌体増殖時にOFF、菌体増殖終了後にはONとするような遺伝子組換え菌を作成した。この菌を利用したところ、代謝トグルスイッチを利用しない株と比べ、約3.6倍生産量が向上した。

Improvement of productivity by metabolic toggle switch

○Taizo Hanai
(Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words Synthetic Biology, Synthetic Pathway, Synthetic Genetic Circuits, Metabolic Toggle Switch

1S-Bp02 大腸菌によるものつくりをめざした中枢代謝と電子伝達系のエンジニアリング

○横田 篤, 和田 大
(北大院・農・微生物生理)
yokota@chem.agr.hokudai.ac.jp

中枢代謝経路と電子伝達系からなる異化経路は糖代謝の根幹をなすため、そのエンジニアリングによる代謝制御に関する知見は、様々な発酵生産菌株の育種研究の基盤となる。本シンポジウムでは、異化代謝の活性化により、多くの有用物質合成の出発原料となるアセチル CoA ならびに還元力 NADH の供給強化につながる汎用性の高い有効変異の開発を目指した取り組みについて紹介する。

1. *pdhR*欠損変異: PdhR は、ビルビン酸脱水素酵素複合体 (PDHc) をコードする *pdh* オペロンの負の転写調節因子である。近年、PdhR は *pdh* オペロンだけでなく、呼吸鎖酵素である NADH 脱水素酵素 (NDH-II) および末端酸化酵素 (Cyt) の一つであるシトクロム *bo3* オキシダーゼの遺伝子群の転写抑制因子としても働くことが明らかとなった。このため *pdhR* 欠損変異株 ($\Delta pdhR$ 株) ではビルビン酸の酸化的脱炭酸反応の亢進によるアセチル CoA と NADH 生成の増大のみならず、呼吸鎖活性の増大による NADH の再酸化反応の促進が共役し、生育の促進等、中枢代謝の活性化が期待される。そこで、 λ Red リコンビナーゼ系を用いて大腸菌野生株 W1485 株から $\Delta pdhR$ 株を構築した。 $\Delta pdhR$ 株の培養特性を検討するために、ジャーファーマンターを用いて $\Delta pdhR$ 株を様々な条件で培養し、その特性を野生株と比較した。その結果、 $\Delta pdhR$ 株は野生株に比べて低酸素条件で高い生育量、呼吸活性および持続的な糖消費を示した。代謝産物では野生株で見られたビルビン酸や酢酸の副生が抑制される一方、2-オキソグルタル酸の生成が増大しており、より多くの炭素がアセチル CoA を経て TCA サイクルに流れ込んでいると考えられた。 $\Delta pdhR$ 株では PDHc、NDH-II 活性が上昇していたが、3種類ある Cyt は全活性、各酵素の発現レベルにおいて、ともに両株間で差が見られなかった。従って、PDHc 反応や NDH-II 反応のバランスの取れた活性上昇が、低酸素条件で異化代謝活性を維持するために有効であると考えられた。一方、酸化還元バランスの指標として低酸素条件で測定した $\Delta pdhR$ 株の $NAD^+/NADH$ 比は、野生株よりも低い値となった。これは PDHc 反応の活性化による NADH の供給の増大に呼吸活性が追いついていないことを示している。見方を変えると、*pdhR* 欠損変異は還元力供給の強化にもつながる可能性がある。従って、本変異により、アセチル CoA ならびに還元力 NADH の供給を同時に強化できる可能性が浮上し、現在、本変異を有用物質生産に応用するための検討を進めている。

2. 呼吸鎖 (電子伝達系) 変異株: 呼吸鎖は NADH の再酸化に伴う電子伝達によりプロトン駆動力を形成し、それに共役する ATP 合成 (酸化的リン酸化) などを通じて、異化代謝に大きな影響を与えている。大腸菌の呼吸鎖は NDH と Cyt から構成され、NDH にはプロトン駆動力形成能を持つ I 型と持たない II 型、Cyt にはプロトン駆動力形成能の高い *Cytbo3* と低い *Cytd* が存在する。我々はこれらの成分を単独またはコンビナトリアルに欠損させた変異株を作成して前項と同様に培養特性を検討した。その結果、いずれの変異株においても野生株に比べて生育速度と生育量は低下したが、糖代謝活性や呼吸活性は株ごとに特徴的であった。特にプロトン駆動力形成能が最低になると予想される NDH-I と *Cytbo3* 二重欠損株では糖代謝活性および呼吸活性が上昇した。一方、逆にプロトン駆動力形成能が最高になると考えられる NDH-II と *Cytd* 二重欠損株では生育速度と生育量、呼吸活性の著しい低下が観察された。これらの変異株では酸化還元バランスが大きく変動している可能性が高く、ものづくりにおける還元力供給強化の点で興味が持たれる。

Engineering central metabolism and electron-transport chain to enhance metabolite production in *Escherichia coli*

○Atsushi Yokota, Masaru Wada
(Lab. Microb. Physiol., Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ.)

Key words *Escherichia coli*, *pdhR*, respiratory chain