

応用から基礎へ 代謝工学研究から見出された好熱菌の温度適応メカニズム

大阪大学生物工学国際交流センター
分子微生物学研究室 教授

本田 孝祐

1. はじめに

“There are no such things as applied science, only application of science (応用科学などという言葉はない。あるのは科学とその応用だ。)”

これは筆者が専門とする微生物学の礎を築いたLouis Pasteurの言葉である。この言葉より、Pasteurが基礎研究とそれを応用するための研究を明確に区別して考えていたことがわかる。一方でPasteurは、この言葉に続けて次のようにも語っており、基礎研究と応用研究が切っても切れない不可分な関係にあることを強調している。

“They are related to one another as the fruit is related to the tree that has borne it (それらは樹木とそこに実る果実のような関係にある)”

基礎研究と応用研究は、私たちの社会の発展を支える両輪である。工学部/工学研究科での研究経験を有する者にとって、このことはPasteurの言葉を引用するまでもなく、容易に理解できるものであろう。純粋な知的好奇心から得られた基礎的な発見が、時を経て、思いもよらない形で産業応用に至った事例は枚挙にいとまがない。一方で研究とは、必ずしも基礎から応用へと一方通行的に進むわけではない。応用研究の過程で顕在化した疑問が基礎科学的な新たな発見につながったという経験を有する読者も少なくはないのだろうか。本稿では、そうした事例のひとつとして、筆者自身の最近の研究成果のひとつをご紹介します。

2. 好熱菌に由来する耐熱性酵素を用いた人工代謝経路の構築

「発酵」と聞けば、多くのお酒や醤油などの発酵食品を思い浮かべるだろう。発酵食品は、原料となる食品中に含まれる化学物質が、微生物の代謝により別の物質へと変換された結果、呈味性や保存性が増したものと定義することができる（例えば、ブドウ搾汁中の糖がエタノールへと代謝されたものがワインである）。こうした微生物の代謝機能は発酵食品に限らず、さまざまな有用物質の製造にも応用可能であり、うまみ調味料などとしてのアミノ酸類や抗生物質などの医薬品類、より近年では生分解性ポリマー類など、発酵生産により製造される生産物は多岐に渡る。また多くの場合、発酵生産は糖や

デンプンなど植物由来の物質を原料として利用することから、原料を化石資源に由来しない持続可能な製造技術としても注目を集めている。一方で、発酵生産を担う微生物にとって最も重要な「任務」は、我々が望むような商業的価値を持った物質の製造ではなく、与えられた生育環境下で自身の増殖や生存を維持することである。このため、発酵生産に用いられる原料物質の少なくない部分は、我々が目的とする生産物へと変換されることなく、微生物の増殖やエネルギー獲得のために費やされる。また微生物に毒性を示すような物質は、そもそも発酵生産の対象とはなりえない。

筆者らは、発酵生産におけるこうした制限を取り払うべく、原料から目的生産物に至る代謝経路を構成する酵素のみを微生物の細胞から分離・精製し、これらを組み合わせることで当該代謝経路を模したカスケード反応を細胞外で構築することを着想した。こうすることにより理論上、収率100%での変換反応が実現し、また細胞毒性を示すような物質を生産対象とすることも可能になると期待できる。ただし、この際に課題となるのは、細胞内に共存する多種多様な代謝酵素のうち、必要十分な種類の酵素だけを調製する手間とコストである（大腸菌のような単純な細菌でさえ、1000種を超える代謝酵素を利用するとされる）。この課題を解決すべく、筆者らは好熱菌に由来する耐熱性酵素に着目した。好熱菌とは高温環境で良好に生育できる微生物の総称であり、一般に55℃以上の温度でも生育可能なものと定義される。環太平洋造山帯に位置するわが国は、温泉や海底の熱水噴出孔など好熱菌にとって好適な生育環境に恵まれており、これらの微生物に関する研究で世界をリードする立場にある。好熱菌の細胞を構成する種々の生体分子は進化の過程で高温環境への適応を果たしており、酵素の実体であるタンパク質に関してもその例外ではない。常温環境から分離された微生物（中温菌）に由来するタンパク質が熱変性するような高温においても好熱菌由来のタンパク質はその構造と機能を維持することができる。従って、遺伝子組換え技術を用いて、大腸菌のような汎用的な中温性細菌内で、好熱菌由来の耐熱性酵素を過剰生産させたのち、得られた中温菌の細胞破砕液を高温でインキュベートすることで、宿主である中温菌由来のタンパク質を熱



図1 耐熱性酵素を用いた人工代謝経路構築スキーム。

失活させ、目的の耐熱性酵素のみを簡易精製することが可能となる。こうして得られた組換え耐熱性酵素を組み合わせることで、人工代謝経路の細胞外構築が可能となるのである(図1)。本アプローチを用いて筆者らは、これまでに有機酸やアルコール、アミノ酸類などさまざまな物質の高収率生産に取り組んできた^{1,2)}。

3. NAD⁺サルベージ合成経路の構築

筆者らは、こうした概念実証試験のほか、細胞外人工代謝経路を用いた物質生産の実用可能性を高めるための周辺技術の開発にも取り組んできた。そのうちのひとつとしてここではNAD⁺サルベージ合成経路の構築に関する成果について紹介する。NAD⁺ならびにその還元体であるNADHは、これらがリン酸化された物質であるNADP⁺/NADPHとともに、代謝反応における酸化還元補酵素(電子メデイエーター)として利用される。これらは、あらゆる生物で共通して用いられる分子であり、代謝反応データベースであるKEGG(https://www.genome.jp/kegg/kegg_ja.html)によれば、同データベースに登録された10000種を超える代謝反応のうち、およそ1/4がNAD⁺/NADHもしくはNADP⁺/NADPH(以下、ニコチンアミド補酵素と総称する)を利用するとされる。必然的に、筆者らが構築する人工代謝経路にも、これらの補酵素を利用する酵素反応が含まれる場合が多くなる。ニコチンアミド補酵素は高価な物質であることから、人工代謝経路の構築にあたっては経路全体での酸化還元バランスを合わせ、少量の補酵素をリサイクルさせながら継続的に利用することが重要となる。しかし、こうした工夫を施してもなお、人工代謝経路を用いた生産反応の過程でニコチンアミド補酵素の枯渇が問題となるケースが多く見られた。その後の調査により、これはニコチンアミド補酵素の熱安定性の低さによるものであることが判明した。好熱菌に由来する酵素を人工代謝経路の構成因子とする筆者らのアプローチでは、通常の酵素反応に比べて高い温度域(50~70℃程度)で生産反応を

実施することが望ましい。しかし、ニコチンアミド補酵素はこうした温度条件下では容易に分解されてしまうのである。このジレンマを解決すべく筆者らは、ニコチンアミド補酵素をその熱分解物から再合成(サルベージ合成)するための人工代謝経路を構築することに取り組んだ。ニコチンアミド補酵素のうちNAD⁺を対象に、その熱分解物がニコチンアミドとADP-リボースであることを同定し、これらの物質からNAD⁺を再合成するために必要な耐熱性酵素を各種の好熱菌のゲノム情報をもとに探索した。得られた酵素群を用いて、図2に示すとおり的人工代謝経路を細胞外構築し、その効果を評価した。反応温度60℃にて試験を行ったところ、人工代謝経路の非存在下ではおよそ6時間で初発濃度の半分程度にまで分解されたNAD⁺が、同経路の存在下では15時間程度まで「見かけ上」安定に保たれる(分解はされるが再合成される)ことが示された^{3,4)}。

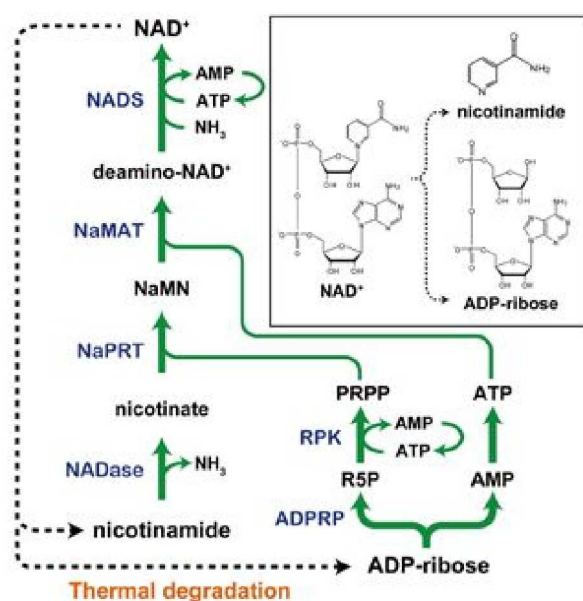


図2 筆者らが構築したNAD⁺サルベージ合成のための人工代謝経路。右上のパネルはNAD⁺とその熱分解物であるニコチンアミドとADP-リボースの構造を示す。

4. NAD⁺サルベージ合成経路が好熱菌の生育温度に及ぼす影響

さて、こうした研究を進めるうちに、筆者はある疑問を抱くに至った。上でも述べたとおりNAD⁺をはじめとするニコチンアミド補酵素はあらゆる生物で共通して用いられる物質であり、好熱菌もその例外ではない。にも関わらず、ニコチンアミド補酵素は好熱菌の最適生育温度付近では容易に分解を受ける熱安定性に乏しい物質である。では好熱菌はいかにして細胞内のニコチンアミド補酵素を安定化しているのであろうか？

実は上記の取り組みで構築されたNAD⁺のサルベージ合成経路は、筆者ら自身が新たにデザインしたものではなく、天然に存在する同様の経路を模倣して設計されたものである。事実、筆者らがゲノム情報を精査した結果からも、原核生物から哺乳類に至る多くの生物がNAD⁺サルベージ合成経路を保有していることが確認できた。そこで筆者らは、本経路が高温条件における好熱菌のニコチンアミド補酵素の細胞内濃度の維持に重要な寄与を果たすとの仮説を立て、好熱性細菌 *Thermus thermophilus* (最適生育温度70~75℃) を対象とした逆遺伝学的研究(特定の遺伝子の過剰発現やノックアウトが表現型に及ぼす影響を評価し、当該遺伝子の機能を探る研究手法)に取り組んだ。NAD⁺サルベージ合成経路の初発酵素であるニコチンアミダーゼ(NADase, 図2)を同定するとともに、そのノックアウト株を作成し、高温での生育速度を野生株のそれと比較した。この結果、最適生育温度付近の70℃では野生株、ノックアウト株の生育速度にほとんど差が見られない一方で、培養温度を80℃にまで高めた場合、ノックアウト株では顕著な生育阻害が認められた。またこの生育阻害は、NADaseが触媒する反応の生産物であるニコチン酸を培地に添加することにより緩和されたことから、同遺伝子のノックアウト(すなわちサルベージ合成経路の欠損)により生じた現象であることが確認された(図3)⁵⁾。少々大げさに表現するならば、本発見は好熱菌の生育温度の上限を規定する因子のひとつ

を明らかにしたものであり、微生物の多様な生態の一端を分子レベルで解明した成果ということもできる。人工代謝経路を用いた有用物質生産の効率を高めたいという動機で開始した応用研究が、思わぬ形で基礎的な発見につながったわけである。

5. おわりに

新規人工代謝経路の設計を目的に、様々な生物の代謝反応データベースを眺めていると、既知の代謝反応にはまだまだ多くのミッシングリンクが残されていることに気づく。これらのミッシングリンクの穴埋め作業は、これまでに知られていない酵素反応や代謝経路の発見に直結するものである。筆者らの専門分野に限らず、日頃から社会のニーズに応えるために知恵を絞る工学者であればこそ、様々なシーズを調査・探索する機会も多く、未着手の謎や疑問に気づくチャンスにも恵まれているのではないだろうか？ 応用研究から少し寄り道して、こうした疑問の解明に向き合うことも工学部/工学研究科で研究を行う楽しみのひとつといえよう。

参考文献

- (1) 本田孝祐; バイオサイエンスとインダストリー 2018, 76, 158-159
- (2) 本田孝祐; 生物工学会誌 2019, 97, 115-121
- (3) Honda, K.; Hara, N.; Cheng, M.; Nakamura, A.; Mandai, K.; Okano, K.; Ohtake, H.; *Metab. Eng.* 2016, 35, 114-120
- (4) Taniguchi, H.; Imura, M.; Okano, K.; Honda, K.; *Microb. Cell Factories* 2019, 18, 75
- (5) Taniguchi, H.; Sungwallek, S.; Chotchuang, P.; Okano, K.; Honda, K.; *J. Bacteriol.* 2017, 199, e00359-17

(京都大学 農学部農芸化学科 平成10年卒
応用生命科学専攻 12年修士 15年博士)

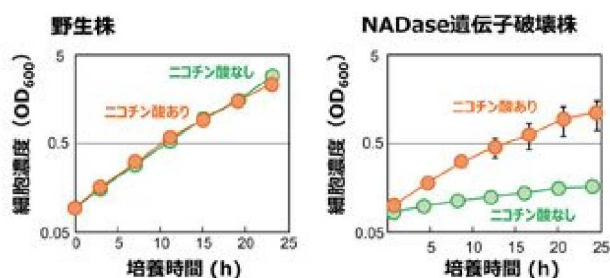


図3 *T. thermophilus*の野生株およびNADase遺伝子破壊株の80℃における生育。細胞濃度は、波長600nmで測定した培養液の濁度(OD₆₀₀)を指標に定量した。