

酵素の生産・放出を行う大腸菌と物質生産を行う大腸菌からなる 人工マイクロバイオータの構築とそれを利用した物質生産

Bioproduction from Cellobiose by Engineered *Escherichia coli* Strains with Synthetic Genetic Circuit and Synthetic Metabolic Pathway

花井 泰三*, 岩崎建史朗, 本庄 宏, 相馬 悠希, 盧 鎮榮, 鶴野 圭悟, 濱田 浩幸
TAIZO HANAI*, KENSHIRO IWASAKI, HIROSHI HONJO, YUKI SOMA, JINYEOUNG RHO, KEIGO TSURUNO and HIROYUKI HAMADA

九州大学大学院 農学研究院 合成生物学研究分野 〒819-0395 福岡市西区元岡 744 ウェスト 5 号館 729 号室
* TEL: 092-642-4729

* E-mail: taizo@brs.kyushu-u.ac.jp

Laboratory for Synthetic Biology, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University,
West Building 5-729, 744 Motoooka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan

キーワード：合成生物学，人工遺伝子回路，合成代謝経路，人工複合微生物系，物質生産

Key words: Synthetic Biology, Genetic Circuit, Synthetic Pathway, Synthetic Microbial Consortium, Bioproduction

(原稿受付 2020年2月5日/原稿受理 2020年2月13日)

はじめに

マイクロバイオータとは、複数種類の微生物から構成される集合体であり、構成する様々な微生物が複雑な相互作用することで、単独の微生物では持たない機能を発揮する。マイクロバイオータ内では、異なる微生物間で代謝物の相互利用が行われ、共通の機能性生体分子を利用して異なる微生物間で情報を共有し、これらの情報に基づいた遺伝子発現制御などが行われている。近年、マイクロバイオータを構成する微生物の比率とマイクロバイオータの持つ機能の関係を解析するために、土壌、海洋、腸内など、様々な環境中に存在するマイクロバイオータのメタゲノム解析などが行われている。

合成生物学では、機能が既知の生体分子を組み合わせた人工遺伝子回路を構築することで、二種類の遺伝子の発現状態を相互に入れ替えるトグルスイッチや周期的に遺伝子発現量が増減するオシレータなど様々な生命現象の再構築が行われてきた。近年、合成生物学の分野でも、異なる人工遺伝子回路を持つ二種類の微生物から構成され、共通の機能性生体分子を利用し、捕食者-非捕食者関係を模倣した人工マイクロバイオータの構築などが行われている。また、目的生産物質を生産するための長い合成代謝経路を、代謝経路の上流と下流の二つに分けて、それぞれ別の微生物に導入することで、目的生産物質を生産する人工マイクロバイオータの構築も行われている。合成生物学は、シンプルな人工遺伝子回路からより複雑な人工遺伝子回路を作る研究に進んでおり、異なる人工遺伝子回路を持つ複数の微生物によって構成される人工マイクロバイオータを実現することは、合成生物学の次の目標の一つであると考えられる。

微生物を用いてバイオマスから化学物質やエネルギーを生産することは、持続可能な社会を実現するために重要である。ところで、バイオマスから化学物質やエネルギーを生産する際には、まず、バイオマスを単糖に分解する糖化プロセスが必要であり、続いて、分解された単糖から合成代謝経路を導入した大腸菌や酵母を用いて、目的物質が生産される。合成代謝経路の構築、代謝流束解析の結果に基づいた遺伝子削除、培養条件の最適化など様々な研究が行われており、単糖から高い生産性で、様々な目的生産物を生産できるようになってきている。一方、バイオマスから単糖を得るためには、バイオマスを構成する多糖類を単糖へと加水分解する糖化酵素の添加が必要になることが多い。糖化酵素は、微生物による生産と精製が必要であり、ここで必要とされるコストが、微生物を用いてバイオマスから化学物質生産やエネルギーを生産することを難しくする一つの原因となっている。このため、糖化酵素を微生物の細胞膜に提示させる試みや、目的生産物の生産菌に糖化酵素を生産させ、細胞外に分泌させる試みがなされている。しかしながら、酵素の提示が上手くいかない場合や、酵素の分泌が十分できない場合が多い。

異なる人工遺伝子回路を持つ複数の微生物から構成される人工マイクロバイオータは、それぞれの微生物に様々な機能を持たせることが可能であり、それらを協調的に動作させることで、一つの微生物では難しかった機能を発揮させることができる。このため、人工マイクロバイオータは、微生物を用いた物質生産に対しても、今までは実現できなかったことを行うことができると考えられる。しかしながら、人工マイクロバイオータを用いた物質生産では、上記の長い代謝経路を二つに分けた研

究例がほとんどで、異なる人工遺伝子回路を利用した研究例は少ない。そこで、本研究では、バイオマスから目的生産物質を生産するために、異なる人工遺伝子回路を持つ複数の微生物から構成される人工マイクロバイオータを構築し、このマイクロバイオータを利用することを試みた。具体的には、二糖であるセルビオースからグルコースに変換する糖化酵素を生産し、目的の菌体密度に達したら、細胞を破壊し、酵素を放出する人工遺伝子回路を持つ酵素生産大腸菌と酵素生産菌が酵素を放出するまで増殖すると目的生産物であるイソプロパノール (IPA) を生産するための合成代謝経路の酵素遺伝子の発現誘導をする人工遺伝子回路を持つ IPA 生産大腸菌を構築し、これら二つの細胞からなる人工マイクロバイオータを構築し、セルビオースからイソプロパノールの生産を試みた¹⁾。なお、通常の大腸菌はグルコースを利用できるが、セルビオースを直接利用することはできない。

実験方法と結果

人工遺伝子回路で溶菌システムを構築するため、T4 フェージを持つ大腸菌溶菌関連の二つのタンパクを用いることとした。そのうち、一つは細胞内膜に穴を開ける *Holin* で、もう一つは外膜のペプチドグリカン層を破壊する *Endolysin* である。これらの遺伝子を溶菌させたいタイミングで発現させれば良いこととなるが、これらの遺伝子関わるプロモータのリークにより、予想外の溶菌が起こる場合がある。このため、一定量の *Anti-holin* を発現させることによって、予想外の溶菌を防ぐことができる。Pasotti らが、BioBrickTM の T4 フェージ由来の遺伝子を用いた溶菌システムを利用して、溶菌する大腸菌を構築していたため、本研究では、彼らの人工遺伝子回路の一部遺伝子 (*holin*, *endolysin*, *anti-holin*) を利用した²⁾。大腸菌自身に、*holin* と *endolysin* を発現させて溶菌を引き起こす研究は過去にも行われているが、全て、それらの遺伝子発現の誘導は、試薬の添加等によるものである。本研究で提案する共培養システムでは、溶

菌のタイミングは、菌体がある程度増殖して、糖化酵素を生産した後が好ましいと考えられる。その場合、試薬添加による誘導だと、経時的に菌体密度をモニタリングする必要がある。これは、将来的に大規模化し工業生産等に利用する場合、とても大きな手間となると考えられる。ところで、微生物はクオラムセンシング (QS) と呼ばれる外的環境を感知して、特定の遺伝子発現を行う能力を持っている。この菌体密度を感知して遺伝子発現を行う QS を利用して、大腸菌自身が、自律的に溶菌を引き起こすシステムを構築することとした。Soma らは、*Vibrio fischeri* の持つ QS である *lux* システムを大腸菌内で構築し、目的の菌体密度に達すると遺伝子発現を行う、菌体密度センサーの作製に成功している³⁾。この菌体密度センサーは、LuxI によって生産されるオートインデューサーである Acyl Homoserine Lactone (AHL) と、AHL によって活性化した LuxR によって転写促進される *plux* プロモータから構成されている。なお、LuxR は PLtetO1 によって、発現制御される構造になっており、培養初期に添加する誘導剤 aTc によって発現する。AHL は、細胞内外に自由に拡散する。従って、菌体が増えるほど、培養液中の AHL 濃度が上昇するため、このシステムは菌体密度センサーとしてみなすことができる。また、本システムでは、ネイティブの *plux* プロモータに *lacO* オペレーターを導入した *pluxlacO* プロモータを用いている。この様に改変したプロモータを用いることで、培養開始時に添加した誘導剤 IPTG の濃度によって遺伝子発現が起こる菌体密度を変化させることが可能となる。本研究では、この菌体密度センサーシステムを用いて、自律的に溶菌する大腸菌の作製を行い、その動作を確認することとした (図1)。このため、自律溶菌プラスミドを導入した株 (TA4291 株、以下自律溶菌株) を用いて、培養開始時に aTc 50 ng/ml, IPTG 0.1 mM をそれぞれ添加するあるいは添加しない LB 培地で培養した (図2)。その結果、aTc および IPTG を加えた培地のみ、培養開始約3時間で、OD600 約1.2 で溶菌が生じた。この結果から、今回作製した自律溶菌システムはうまく作動していることが証明され

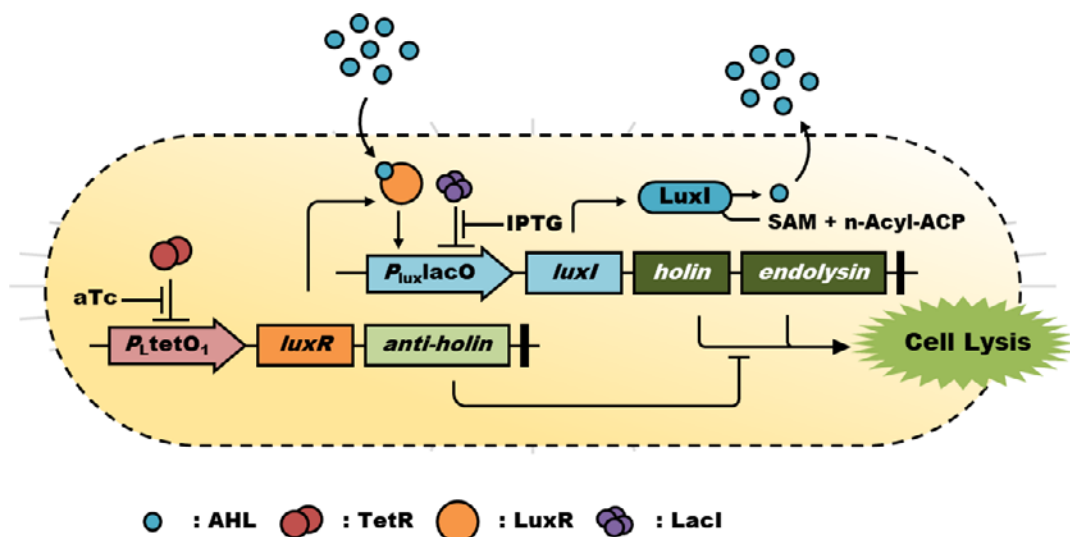


図1. 自律溶菌株の人工遺伝子回路

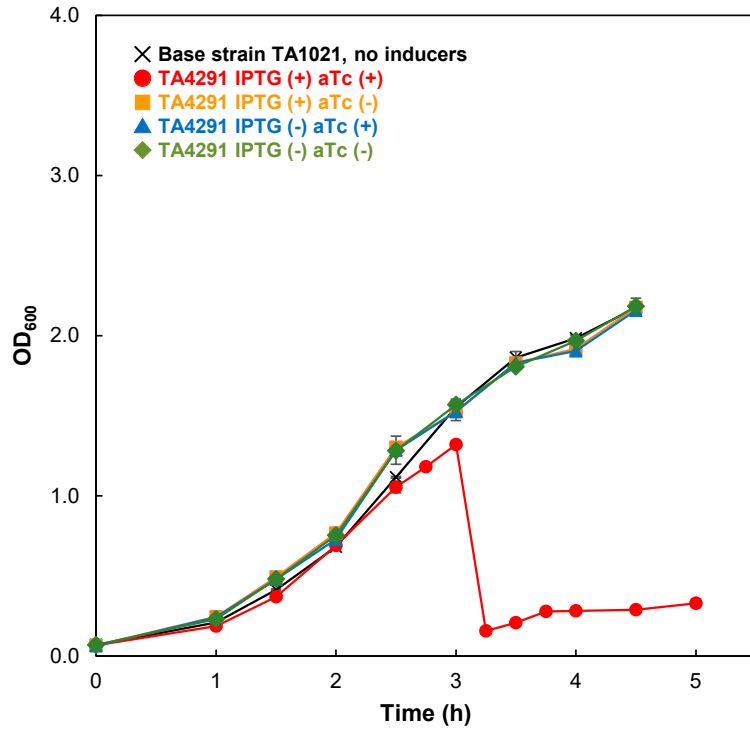


図2. 自律溶菌株の培養結果

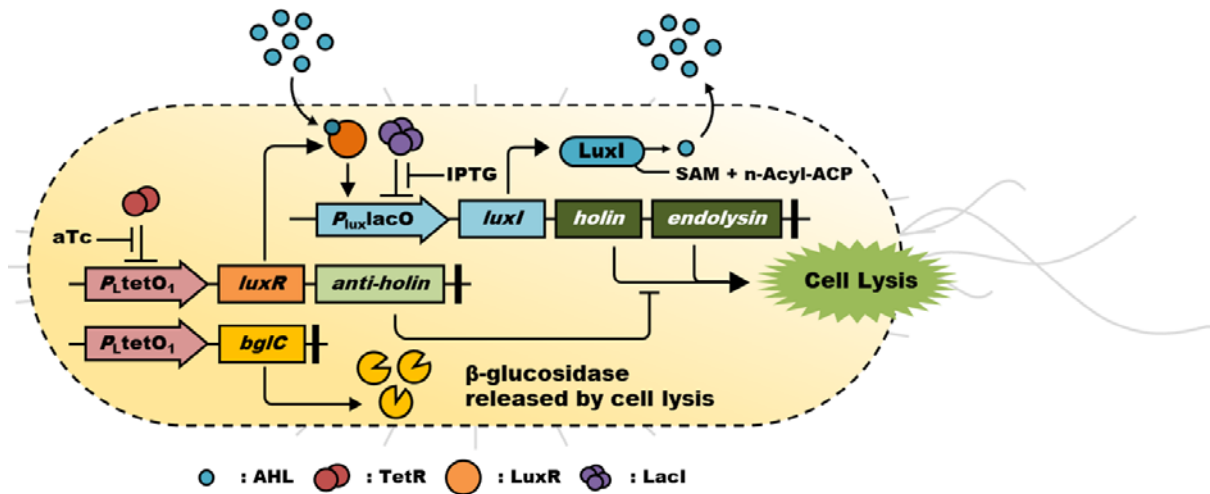


図3. 酵素生産大腸菌の人工遺伝子回路

た。

この、自律溶菌株に、培養開始時に aTc を添加することにより、セルビオースからグルコースに変換するための糖化酵素 BglC を発現するプラスミドを導入した株 (TA4064 株、以下 酵素生産大腸菌) を作製した (図 3)。さまざまなタイミングで溶菌を行わせるために、IPTG 濃度を変えて実験を行った。その結果、IPTG 濃度 0 mM、0.025 mM では溶菌しなかったが、IPTG 濃度 0.050、0.075、0.10、0.25、0.50、1.0 mM では、それぞれ異なるタイミングで溶菌した (図 4)。このように、初発の IPTG 濃度を変えることで、溶菌する菌体密度を制御することが確認できた。また、溶菌したタイミングで、BglC が培養液中に放出され、全てのセルビオース

が急速にグルコースに変換される (糖化) ことが明らかとなった。この劇的な糖化の挙動は、BglC が大量に培養液中に放出されたことを示している。

先に作成した酵素生産大腸菌は、自ら糖化したグルコースを利用して再増殖してしまうことが明らかとなったので、この株のグルコース取込み系を破壊した新たな酵素生産大腸菌 (TA4222 株) を作成した。次に、TA4222 株とグルコースから目的生産物質 (IPA) を生産する物質生産大腸菌とを協調的に培養し、セルビオースから直接 IPA を生産する実験を行った。IPA はバイオ燃料やバイオプラスチックの原料となる有用物質である。なお、IPA を生産するための合成代謝経路は、大腸菌の代謝物である Acetyl-CoA を利用する。大腸菌およ

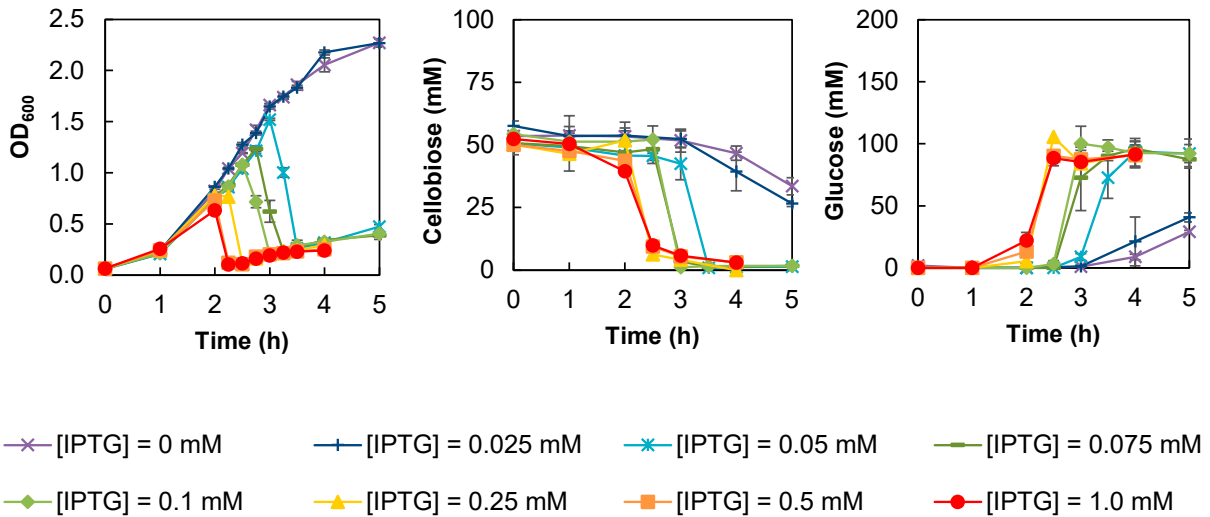


図4. 酵素生産大腸菌の培養結果

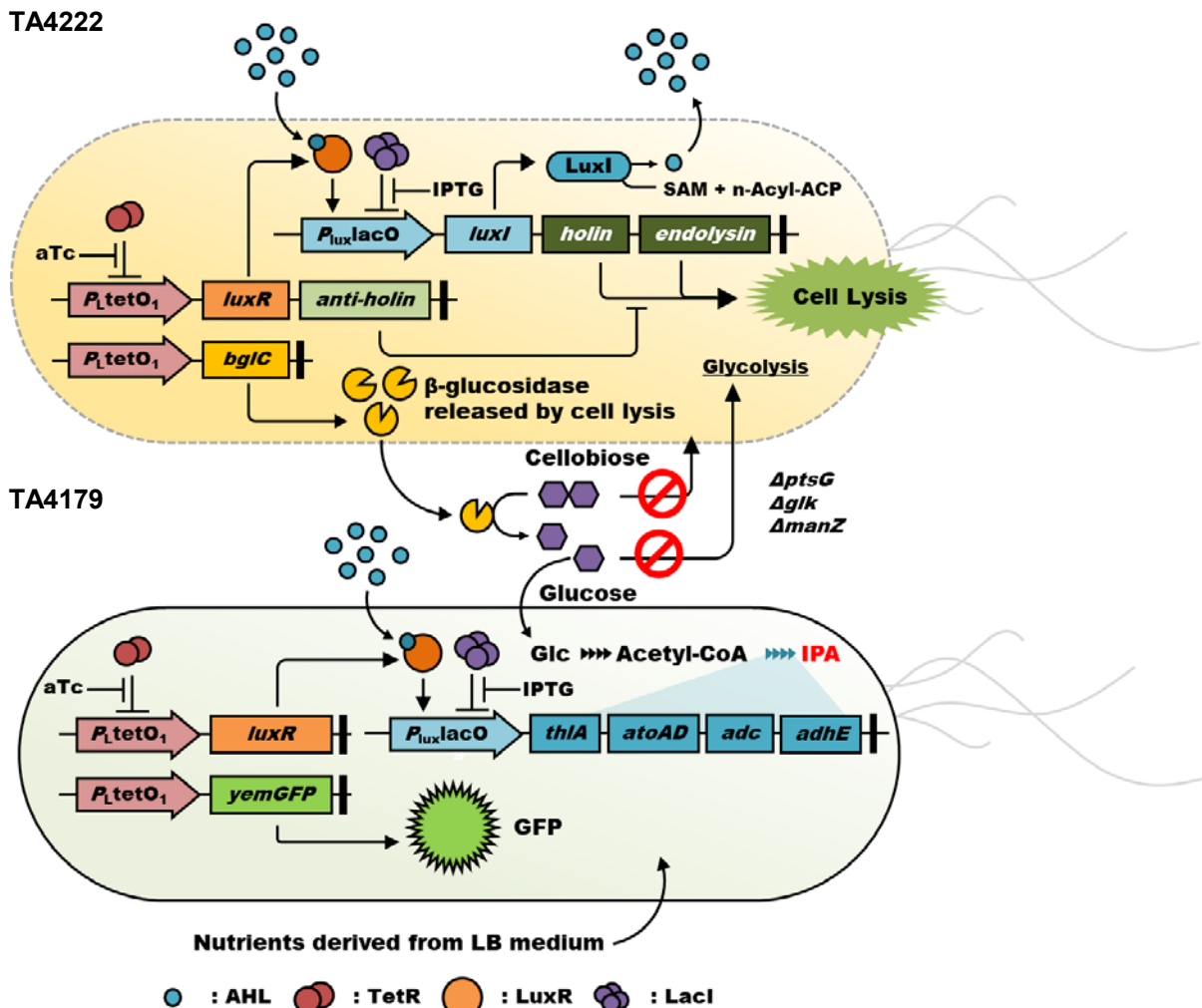


図5. 酵素生産大腸菌 (TA4222) と物質生産大腸菌 (TA4179) の人工遺伝子回路

び *Clostridium acetobutylicum* および *C. beijerinckii* 由来の IPA 生産合成代謝経路構成遺伝子 *thl*, *atoAD*, *adc*, *adh* を物質生産大腸菌に導入した。なお、培養初期から IPA 生産遺伝子群を過剰に発現させると、これ

らのタンパク質生産に多くの炭素源を消費することになり、増殖速度が減少すると考えられる。そのため、物質生産菌大腸菌の細胞内で AHL 受容体である LuxR を PLtetO1 プロモータで発現させ、酵素生産大腸菌によ

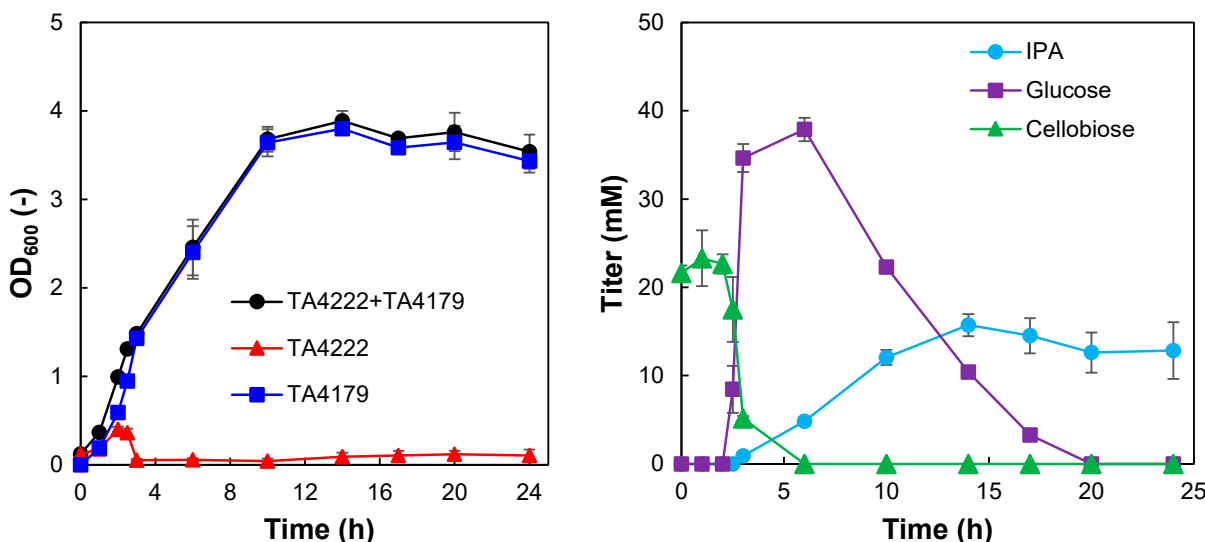


図 6. 酵素生産大腸菌 (TA4222) と物質生産大腸菌 (TA4179) の共培養結果

培地中に大量に放出された AHL に応答して IPA 生産遺伝子群を発現させるようにした (図 5)。このシステムでは, AHL は, 酵素生産大腸菌の「増殖」と「溶菌」の情報を物質生産大腸菌に伝達するシグナル物質であると捉えることができる。なお, 酵素生産大腸菌によるセロビオースの糖化実験の結果より, できる限り多量の酵素を放出できるタイミングを与える初期 IPTG 濃度として 0.10 mM を設定することとした。培養液中の細胞の菌体割合を測定するため, 物質生産大腸菌に PLtetO1 で GFP を発現するプラスミドを導入した (TA4179 株)。ここまで構築した酵素生産大腸菌と物質生産大腸菌を共培養することとした (図 6)。酵素生産大腸菌と物質生産大腸菌の合計の菌体密度は, 培養開始 3 時間目に酵素生産大腸菌の溶菌によって下がり, 溶菌が終わると, 約 4 時間目から再び増殖が始まった。この菌体密度のデータをもとに, フローサイトメトリーによって酵素生産大腸菌と物質生産大腸菌の割合を算出すると, 4 時間目以降の培養液中の細胞の 95% 以上が物質生産大腸菌であることが分かった。このことから, 共培養を行っても酵素生産大腸菌はほぼ完全に溶菌し, 最終的に生育しているのは物質生産大腸菌であることが確認された。また, 培地中の糖濃度を測定すると, 溶菌した 3 時間目にセロビオースからグルコースへと糖化が行われていることが確認できた。その後, 残った物質生産大腸菌がグルコースを資化して IPA を生産していることが分かった。酵素生産大腸菌と物質生産大腸菌との共培養により, セロビオースから IPA を生産することが確認できた。

まとめ

本研究では, 糖化酵素を細胞内生産し, 目的の菌体密度に達したら, 細胞を破壊し, 酵素を放出する人工遺伝子回路を持つ酵素生産大腸菌と, 酵素生産菌が酵素を放出するまで増殖すると目的生産物を生産するための合成代謝経路の酵素遺伝子の発現誘導をする人工遺伝子回路を持つ物質生産大腸菌を構築し, これら二つの細胞からなる人工マイクロバイオータを構築した。なお, このコンセプトを証明するために, モデル基質として単純な構造を持つセルビオース, モデル生産物質として大量生産に成功している IPA を選択し, セルビオースから IPA の生産に成功した。酵素生産株の生産酵素を変更することでさまざまな基質に, 物質生産株の合成代謝経路を変更することでさまざまな目的物質に対応することができ, さまざまな物質生産に応用可能であると考えられる。

文献

- 1) Honjo, H., K. Iwasaki, Y. Soma, K. Tsuruno, H. Hamada, and T. Hanai. 2019. Synthetic microbial consortium with specific roles designated by genetic circuits for cooperative chemical production. *Metabolic Engineering*. 55: 268–275.
- 2) Pasotti, L., S. Zucca, M. Lupotto, M.G.C. De Angelis, and P. Magni. 2011. Characterization of a synthetic bacterial self-destruction device for programmed cell death and for recombinant proteins release. *Journal of Biological Engineering*. 5: 8–19.
- 3) Soma, Y. and T. Hanai. 2015. Self-induced metabolic state switching by a tunable cell density sensor for microbial isopropanol production. *Metabolic Engineering*. 30: 7–15.