

「つくって利用する生物学」の実践 ～分子微生物学研究室の紹介～



研究室紹介

Bottom-up Studies for the Development of Artificial Biological System

Key Words : Synthetic biology, Thermophiles, Actinomycetes, Microbiota

本田 孝 祐*

はじめに

生物学は、遺伝子やタンパク質といった各種の生体分子を単離し、その構造や機能を精査することにより発展を遂げてきた。一方、ヒトゲノムプロジェクトが完了した2000年代初頭ごろを境に、こうした要素還元型の研究に加え、ボトムアップ型の研究アプローチが台頭してきている。すなわち、機能が解明（あるいは推定）された生体分子を組み合わせ、ある特定の機能を担う生体システムを人為的に再構築し、その働きを検証・理解しようとする研究アプローチである。このような「つくって理解する生物学」は現在、合成生物学というひとつの研究分野として広く認知されている。遺伝子組換え技術の充実などに伴い、合成生物学で取り扱うことが可能な生体システムのレパートリーも拡大が続けている。また、こうしたボトムアップ型のアプローチにより、天然には存在しない生物機能、あるいは天然の生物

機能を凌駕する能力をもった新たなシステムを創出し、これを産業利用しようという試みも活発化している。例えば、DNAにコードされた遺伝情報をタンパク質へと転写・翻訳する過程で働く一連の生体分子を細胞外で駆動させる無細胞翻訳システムは、合成生物学の分野で比較的古くから利用されてきたシステムのひとつであるが、ペプチドリーム社は、この無細胞翻訳システムに独自の人工RNA触媒を組み合わせ、多種多様な非天然ペプチドを迅速に創出・評価する創薬技術をコアコンピタンスとしてわが国を代表するバイオベンチャー企業のひとつへと成長を遂げた。

筆者らの研究室でも同様に、様々な生体分子をボトムアップ式に組み合わせることで、これまで存在しなかったユニークなシステムを創出する「つくって利用する生物学」の実践に取り組んでいる。筆者らは特に、微生物の示す多様性に着目し、これらに

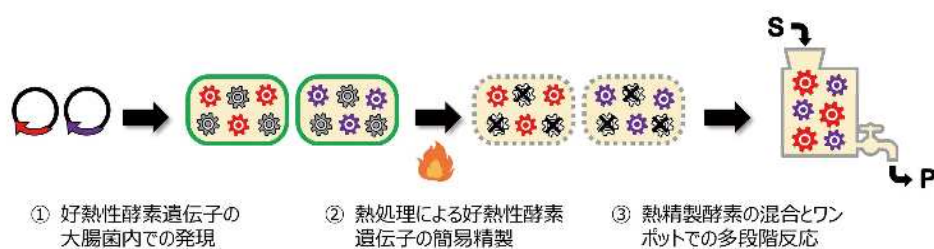


図1 好熱菌由来酵素を用いた細胞外での人工代謝経路構築のスキーム



* Kohsuke HONDA

1975年12月生まれ
京都大学 大学院農学研究科 応用生命
科学専攻 (2003年)
現在、大阪大学 生物工学国際交流セン
ター 教授 博士(農学)
専門/応用微生物学
TEL : 06-6879-7438
E-mail : honda@icb.osaka-u.ac.jp

由来する生体分子をシステム構築のパーツとして用いている。本稿ではこれまでに得られた成果と現在実施中の取り組みの一端を紹介する。

好熱菌由来酵素を用いた人工代謝経路の細胞外構築

グルタミン酸ナトリウム（うま味調味料）をはじめとする各種アミノ酸の工業的発酵に代表されるように、微生物を利用した有用代謝産物の発酵生産は、

古くよりわが国が得手としてきた技術分野である。近年では、遺伝子組換え技術などを用いて微生物の代謝機能を改良し、より多様な化合物を、より高速・高収率で発酵生産しようという取り組みも活発化している。こうした研究は代謝工学と総称され、わが国のほか、欧米や中韓などでも精力的な研究開発が進められている。しかしながら、代謝工学のスキームに則って微生物に所定の機能改変を加えても目的とする物質の生産性が向上しないことも少なくない。その理由は極めて単純である。微生物にとって最も重要なタスクとは、自身の増殖に必要な代謝物を生産することであり、我々が所望する物質を量産することではない。従って、例えば我々が作りたい物質が、その微生物の増殖を阻害するものであった場合、いくら精巧な代謝改変を施したところで、この物質の発酵生産は実現しないのである。

こうした制限を取り払う方策として筆者らは、目的とする代謝物の生産を微生物の増殖から切り離すことを着想した。すなわち、目的物質の合成に関わる代謝酵素群を生体から取り出し、これらをボトムアップ式に組み上げることで、代謝経路を模したカスケード反応を細胞外で構築したのである。筆者らは、このカスケード反応のパーツとなる代謝酵素として、好熱菌由来の酵素を採用した。好熱菌とは通常の微生物に比べ、より高い温度条件下で良好に生育する微生物の総称であり、その最適生育温度は45℃～100℃を超える範囲にまで分布する [1]。好熱菌は高温環境に適応していることから、これらが有

する生体分子も熱に対して優れた安定性を示す。酵素をはじめとするタンパク質は熱に弱い生体分子のひとつであるが、好熱菌由来のタンパク質は、一般的な微生物由来のそれらに変性する温度域であっても、その構造を保つことができる。従って、好熱菌由来の代謝酵素をコードする遺伝子を一般的な微生物（大腸菌など）で発現させたのち、この微生物の抽出液を加熱すれば、大腸菌由来の酵素群は熱により不活化され、所望の代謝酵素のみが簡単に単離・精製されるのである。こうして熱精製された酵素をボトムアップ式に組み上げることで、物質生産に特化した人工代謝経路が創出できる（図1）。

また、これらの人工経路は天然に存在する代謝経路の一部を単にコピー & ペーストしただけではなく、様々な創意工夫のうえ設計されたものであることを申し添えたい。その一例として、キメラ型 Embden-Meyherhof 経路 (EM 経路、いわゆる解糖系) の構築に取り組んだ成果を紹介させていただく。EM 経路では、グルコースがピルビン酸へと酸化される過程で、アデノシン-2-リン酸 (ADP) からアデノシン-3-リン酸 (ATP) が生成する。ATP は種々の生化学反応でエネルギー供与体として用いられる物質であり、生物にとって EM 経路はグルコースが有する自由生成エネルギーを ATP として取り出す重要な役割を担う代謝経路である。一方でこの事実は、EM 経路を用いたグルコースからのピルビン酸生産には、当量の ADP の消費が伴うことを意味する。ADP は高価な物質であり、有用物質の商業

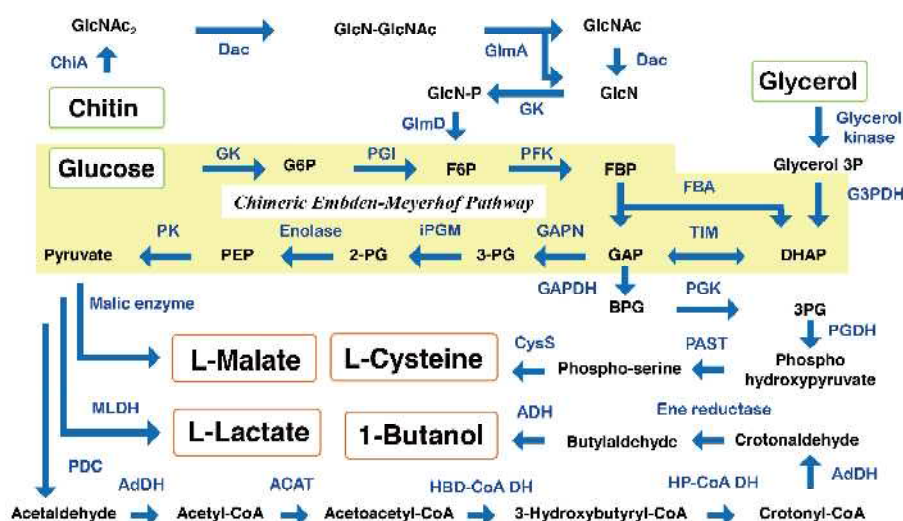


図2 筆者らが構築した代表的な人工代謝経路

生産を目的とした変換反応において、これを浪費することはナンセンスである。そこで筆者らは、超好熱性アーキアと呼ばれる微生物群の一部で特徴的に見られる変形 EM 経路に着目した。詳細は既報 [2] に委ねるが、本経路は通常の EM 経路とは似て異なる独特の酵素反応で構成されている。筆者らは、通常の EM 経路を構成する酵素の一部を、変形 EM 経路由来のもので置換することにより、ADP の消費 (=ATP の生成) を伴わないキメラ型の EM 経路を構築した。同経路は図 1 のスキームに則り、熱精製された好熱菌由来酵素を用いて、細胞外で構築されたものである。従って、夾雑酵素による副反応も生じず、グルコースをモル収率 100% でピルビン酸へと変換することができる。筆者らは、このキメラ型 EM 経路に、さらに複数の好熱性酵素を組み合わせることで、L-乳酸 [2-4]、L-リンゴ酸 [5]、1-ブタノール [6]、L-システイン [7] などの物質を生産することに成功している (図 2)。

微生物群集の制御と利用に向けて

以上のように筆者らは、好熱菌をはじめとする様々な微生物に由来する生体分子をボトムアップ式に組み上げ、天然にはない生物機能を有したシステムを創出することに取り組んできた。一方で、同様の考え方は、生体分子だけではなく、生きた微生物そのものをパーツとしたボトムアップ型研究にも拡張できる。あらゆる生物は自然界において、他の生物との相互作用のもと生存しており、微生物もその例外ではない。これらの微生物群集 (菌叢) を構成する細胞間の相互作用を理解し、その機能を人為的に制御することができれば、新たな応用価値を有したシステムが形成できるものと期待できる。現在までに筆者らが取り組んできたのは、2 種類~数種類の少数の微生物を組み合わせただけにとどまるが、このようなシンプルな研究からも微生物の相互作用が生み出すユニークな機能の一端が観察されている。

ここでは一例として、ある種の放線菌が他の微生物との相互作用により産出する二次代謝産物の例を挙げたい。放線菌と呼ばれる微生物の一群は、抗生物質などの様々な二次代謝産物を産生することが知られている。しかし放線菌は、これらの二次代謝産物を常に生産し続けているわけではなく、生育条件の変化など外部環境からのある種の刺激により生産

を開始する。筆者らは、他の微生物との相互作用が放線菌における二次代謝産物生産のトリガーのひとつになるのではないかと考え、探索研究を行った。この結果、ともに *Streptomyces* 属に分類される 2 種類の異なる放線菌を共培養したときにのみ生産される代謝物が存在することを見出している (図 3)。現在、この代謝物の同定を進めるとともに、両微生物間の相互作用の詳細を解析中である。このほかにも筆者らは、菌叢を構成する微生物のうち、ある特定の属種の微生物の生育を選択的に阻害し、菌叢の構成微生物種を減算的に改変するための技術開発にも取り組んでいる。

種々の生体分子を組み合わせ、新たな生物機能を創り出すための研究を合成生物学と称するなら、微生物群集の機能開発を目指して筆者らが取り組む一連の研究は、合成「生態」学とでも呼ぶべき新たな研究分野を開拓するものとなるかもしれない。

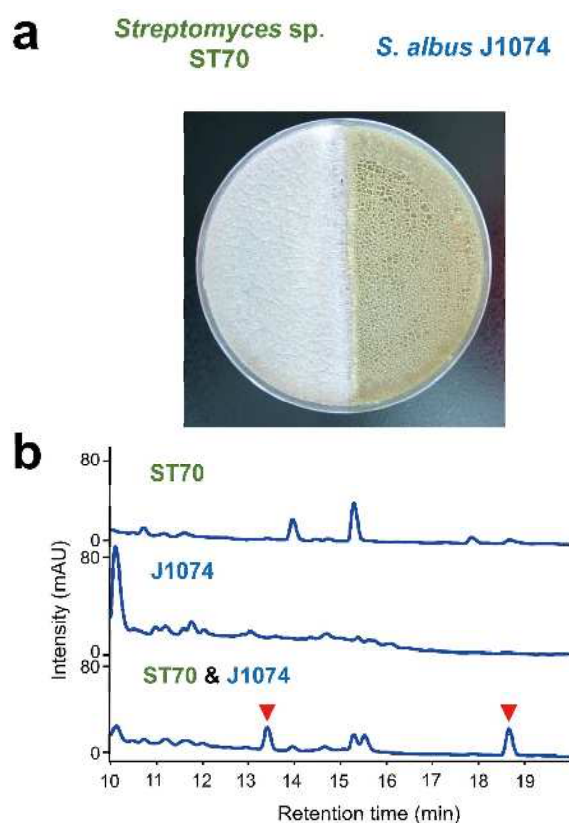


図3 異種微生物間の相互作用による二次代謝産物生産。(a) 2 種類の *Streptomyces* 属細菌 (左: *Streptomyces* sp. ST70 株、右: *Streptomyces albus* J1074 株) を同一の寒天培地上に生育された。(b) 寒天培地上で、ST70 株、J1074 株が優先的に生育している部分、ならびにその境界領域に生育した菌体から抽出した代謝物を液体クロマトグラフィにて分析した。境界領域のサンプルでのみ赤矢印で示す代謝物が検出された。

参考文献

- 1) Sato, Y., Okano, K., Kimura, H., Honda, K. *Microb. Environ.* **35**, ME20074 (2020).
- 2) Ye, X., Honda, K., Sakai, T., Okano, K., Omasa, T., Hirota, R., Kuroda, A., Ohtake, H. *Microbial Cell Fact.* **11**, 120 (2012).
- 3) Jaturapaktrarak, C., Napathorn, S. C., Cheng, M., Okano, K., Ohtake, H., Honda, K. *Bioresour. Bioprocess.* **1**, 18 (2014).
- 4) Okano, K., Zhu, Q., Honda, K., J. *Biosci. Bioeng.* **129**, 269-275 (2020).
- 5) Ye, X., Honda, K., Morimoto, Y., Okano, K., Ohtake, H. *J. Biotechnol.* **164**, 34-40 (2013).
- 6) Krutsakorn, B., Honda, K., Ye, X., Imagawa, T., Bei, X., Okano, K., Ohtake, H. *Metab. Eng.* **20**, 84-91 (2013).
- 7) Hanatani, Y., Imura, M., Taniguchi, H., Okano, K., Toya, Y., Iwakiri, R., Honda, K. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 8009-8019 (2019).

