



共生由来オルガネラの改変

——共生が駆動する微生物発酵生産

原 清敬 Kiyotaka Hara

静岡県立大学 食品栄養科学部環境生命科学科 准教授

生物の能力は、環境と遺伝子に左右される。これは、食品や医薬品等の発酵生産の現場で働く微生物においても同様であり、人は、発酵効率の向上のため、日々、これら微生物の発酵環境と遺伝子の改良に努めている。本稿では、特に共生由来オルガネラを改良することで発酵微生物の能力を向上させる共生細胞工学に関する研究について紹介する。

1 研究背景

私たちの体を構成している細胞の中では、毎日体重と同じ重さだけ消費されては再生されている物質がある。それは、生命の共通エネルギー物質ATP*である。なぜそんなにも多くのATPが消費されているかといえば、多くの生命反応は、ATPの消費によって生じるエネルギーによって駆動されているからである(図1)。実際に、ATPの関連する生命反応は、2016年1月現在で、604種類が知られているが[データベースKEGG (<http://www.kegg.jp>)], その多くはATPの消費反応である。これに対し

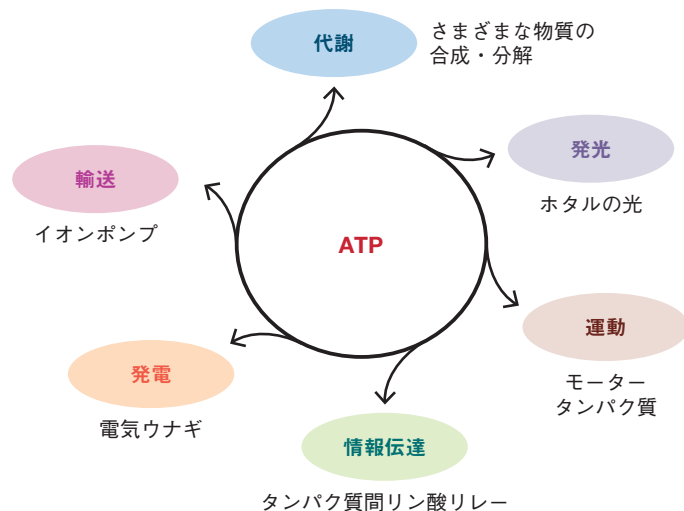


図1 ATPのエネルギーを用いるさまざまな生命反応

【関連する領域】

組織：大学（環境系，食品系，農学系，工学系，理学系），理化学研究所，産業技術総合研究所，食品総合研究所，国立遺伝学研究所，文部科学省，農林水産省，環境省，経済産業省，地方研究所・試験場（工業，農林，畜産，水産）

業界：医学，薬学，化学，食品，農業，水産業，林業，バイオテクノロジー，エネルギー，製造業，廃棄物処理業，環境調査

学科：生物，物理，化学，数学，英語

学問：環境工学，化学工学，数学，生物学，農学，水産学，動物学，植物学，バイオテクノロジー，環境学，材料学，医学，薬学，栄養学

情報源：NBRCデータベース（生物遺伝資源），DDBJデータベース（DNA），PECデータベース（大腸菌），SGDデータベース（出芽酵母），KEGGデータベース（代謝），M-pathデータベース（代謝予測），Brendaデータベース（酵素反応），PubMedデータベース（文献検索）

て、ATPの再生は、主に解糖系と呼吸鎖、光合成生物の場合には光合成でおこなわれている(図2)。

解糖系は、酸素の少ない環境で生きる生物が用いるほか、私たちヒトも、呼吸を止めて走る短距離走等の時に用いているATP再生系であり、糖を分解しながらATPを再生する。一方、呼吸鎖と光合成は、エネルギー源が糖と酸素か、光かの違いはあるが、どちらもプロトン駆動力(PMF)とよばれるエネルギーの蓄積形態を用いている。PMFは水力発電所のダムに蓄えられた水に例えられるが、実際には、原核生物では細胞膜、真核生物の呼吸鎖ではミトコンドリア膜、光合成では葉緑体膜に形成される。生物は、このPMFのエネルギーをATPに変換することで、さまざまな酵素反応に化学エネルギーを供給し生きているのである(図3)。

ミトコンドリアや葉緑体は、もともとは呼吸鎖や光合成のシステムを有するバクテリアが、これらを持たない宿主細胞に入り込み共生した共生由来オルガネラであり、宿主細胞にATPを供給している(詳細は「総論」(p.88-92)参照)。このように、生物が共生しながら進化できたのも、生物がエネルギー物質としてATPを共通に用いているからだ。

2 研究分野の動向

醤油、味噌、パン、納豆、ヨーグルト、酒……これらの食べ物は、すべて微生物による発酵食品である。発酵食品の栄養成分や香り、うま味などの各種成分は、原料に由来するほか、それらの多くを微生物が作り出している(図3)。また、現在、発酵微生物に、代謝工学的な改良を施し、医薬品や機能性化合物、化粧品、燃料、ポリマー原料

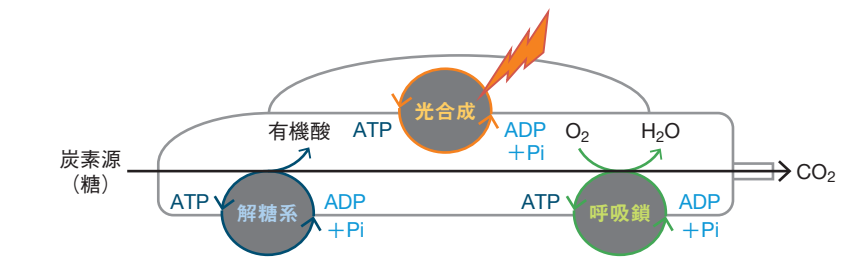


図2 生命におけるATP再生を担う解糖系、呼吸鎖、光合成(光リン酸化)

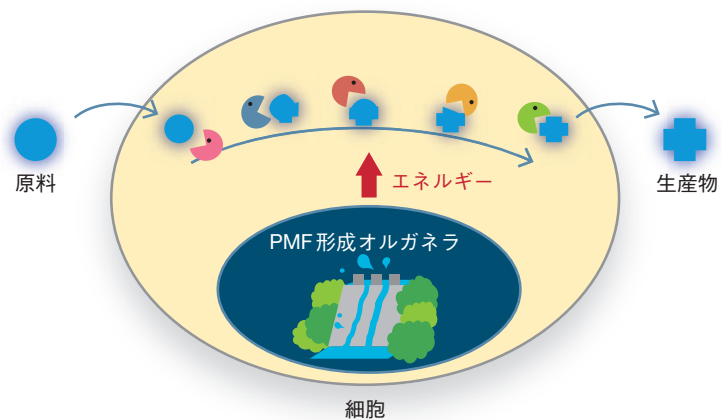


図3 真核微生物発酵におけるPMFによるエネルギー供給

(元図：原陽子)

等のさまざまな有用物質の発酵生産性を向上させる研究が盛んにおこなわれている¹⁾。そのため、発酵研究が関わる産業分野は、食品分野のみならず、医学分野、薬学分野、化学分野、農学分野、工学分野、さらには環境浄化分野など多岐にわたる。しかし、分野を問わず、発酵の現場で働く微生物たちは、もとの生息環境ではありえない偏った重労働を課せられているので、目的物質の生産性が向上するにつれ、しばしば細胞内エネルギー(ATP)不足に陥り、生育の低下や目的物質の生産性の頭打ちを引き起こす。また、通常、有用物質の発酵では、食用部分や純度の高い原料を使用するが、食料や資源の保護、廃棄物の削減による環境への付加低減の必要性から、近年は、資源

作物や非可食資源、未利用資源や廃棄物を原料とする研究が盛んにおこなわれている。しかし、微生物が分解しやすくする目的でこれらの発酵原料を前処理すると、発酵阻害物質が生じることが多く、これらの発酵阻害物質を微

用語解説 Glossary

【ATP】

Adenosine 5'-triphosphate = アデノシン三リン酸。細胞内の共通エネルギー分子。細胞内の多くの生命活動は、このATPが分解される際に放出されるエネルギーを利用している。そのため、エネルギー通貨とよばれることもある。エネルギー放出後のATPはADPとなる。

【ADP】

Adenosine 5'-diphosphate = アデノシン二リン酸。ATPがエネルギー放出した後の分子。細胞内のATP再生(合成)系により、無機リン酸(Pi)と再度結合し、ATPに再生される。

生物が細胞外に汲み出す際には、そのエネルギーとして、やはりPMFやATPが大量に必要となる。

3 これまでの研究

微生物細胞内の代謝（酵素反応による連続的な物質変換）を改変し、目的化合物の生合成経路を強化する代謝工学的なアプローチは、目的生産物の生産性の向上に有効であるが、時として細胞のATP供給の許容範囲を超えた高いATP消費が、ATPの消費と再生のバランスを乱し、細胞増殖の減少や目的化合物の生産性の頭打ち、細胞内で合成した目的化合物や毒性物質の細胞外への排出に障害を引き起こす。このため、細胞内ATP供給（ATP供給とATP消費の差）を人為的にコントロールする研究が、近年おこなわれ始めている²⁾。これらの研究においてATP供給をコン

トロールする方法は、大きく四つに分類することができる。すなわち、① エネルギー化合物の添加、② pHのコントロール、③ ATPの消費または再生に関わる代謝工学的な改変、④ 呼吸鎖によって仲介される反応のコントロールの四つである。これら四つの方法は、それぞれ以下のような利点と欠点を有する。方法① 細胞外からエネルギー化合物を添加するため、その量とタイミングを自由に変えられることが利点であるが、欠点として、これらの化合物の添加にコストがかかる。方法② 細胞外環境を最適なpHに調整するため、酸を用いてpHを低く（細胞外の水素イオン濃度を高く）することで、PMF形成を簡便に補助できるという利点がある。しかし、低pHは、同時に細胞増殖や細胞内代謝を阻害するため、総体的にATPの供給を活性化できるpH範囲は限定されるうえ、外界と接する細胞膜に呼吸鎖をもつ原核微生物には適用できても、

細胞の中に入り込んだミトコンドリア膜に呼吸鎖をもつ真核微生物には適用できないという欠点がある。方法③ ATPを再生する酢酸キナーゼの過剰発現がよくおこなわれるが、炭素源の流れが酢酸に向き、目的の生産物へ代謝を導くことが難しいのが欠点である。今後は、目的生産物に合わせたキナーゼの選択が必要と思われる。方法④ 好気的な発酵に用いられる。発酵液中の酸素濃度のコントロールがよくおこなわれるが、酸素の発酵液への溶解度や微生物の酸素の取り込み能にも限界があるため、今後は、呼吸鎖の遺伝子工学的な改変が有効であると考えられる。

4 光駆動ATP再生小胞の開発

一方、オプトジェネティクス（光遺伝学）とよばれる分野の研究が近年急速に進展している。この分野では、ロ

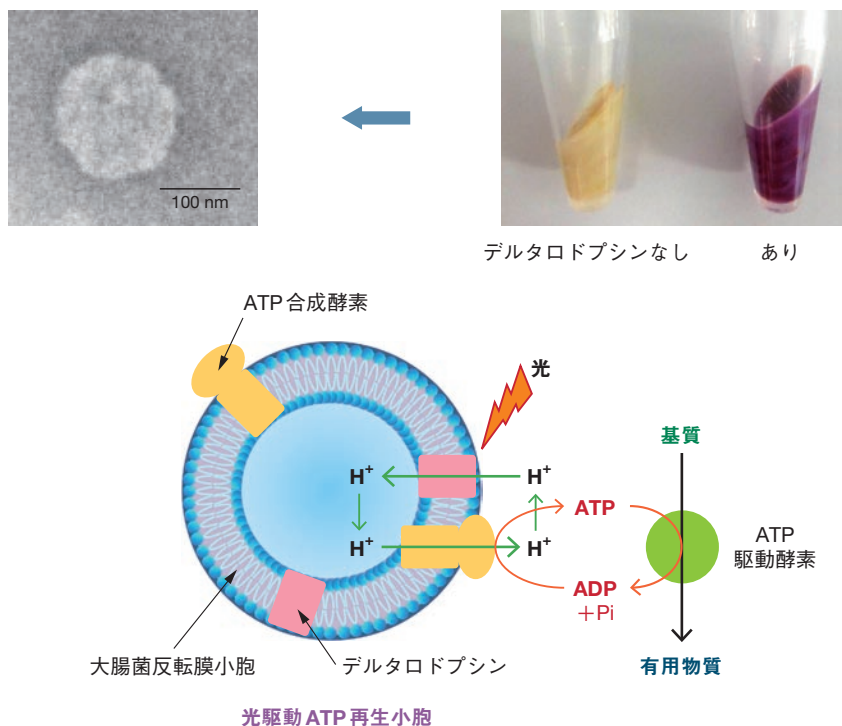


図4 光駆動ATP再生小胞の作製と光駆動有用物質生産

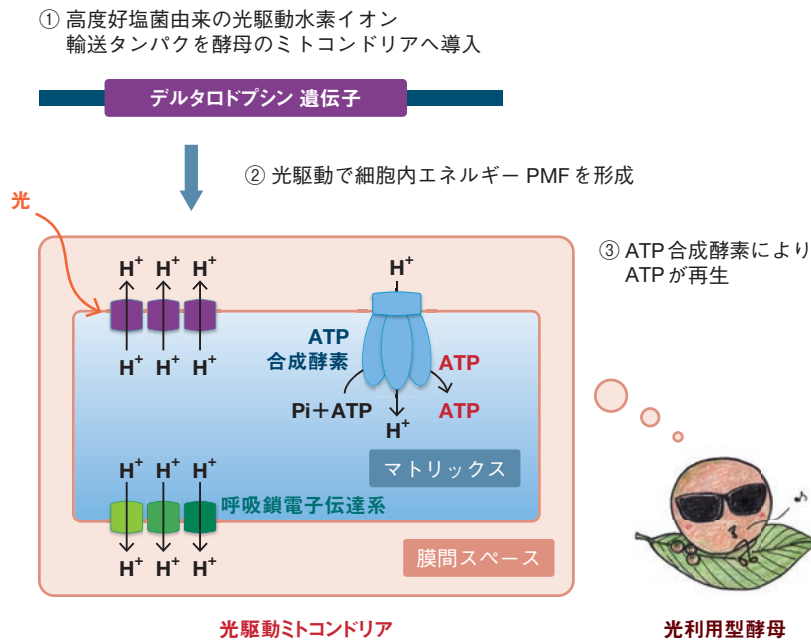


図5 光利用型酵母のからくり

(元図：Ye Xiaoting, 原陽子)

ドプシンといわれる光駆動のイオン輸送タンパクを神経細胞などに発現させ、光刺激により活性化する研究や、ロドプシンをたとえばマウスの脳の細胞に発現させ、マウスの行動を光でコントロールする研究などもおこなわれている。このようなシグナルとしての光の応用研究に対し、筆者らは、エネルギーとしての光を、有用物質生産へ応用することを目指し、ロドプシンを利用した光駆動ATP再生小胞の作製をおこなった(図4)。具体的には、高度好塩菌が有する光駆動水素イオン輸送タンパクであるバクテリオロドプシンに着目した。高度好塩菌は、バクテリオロドプシンを利用して太陽光エネルギーにより細胞膜内外にPMFを形成し、そのエネルギーを用いて塩を輸送し、細胞内外の浸透圧を保つことによって、高塩濃度の環境に生息することができる。さらに、高度好塩菌は、細胞膜に存在するATP合成酵素を用いてPMFのエネルギーをATPのエネルギーに変換

している。ATP合成酵素は、古細菌やバクテリアでは細胞膜に、真核生物ではミトコンドリア膜や葉緑体膜に存在し、PMFによりATPを再生している酵素である。筆者らは、バクテリオロドプシンの一種であり、大腸菌の細胞膜で機能することが知られているデルタロドプシンを大腸菌に発現した。「大腸菌の細胞膜を破碎し膜面積が小さくなると、物理的に安定な本来と反対向きの反転膜小胞が形成される」という性質を利用し、安定な好熱菌由来のATP合成酵素を発現させた大腸菌の反転膜から成る光駆動ATP再生小胞を簡便に調製することに成功した³⁾(図4)。この光駆動ATP再生小胞に光を照射すると光依存的なATPの再生が観察され、このATP再生反応と、ATP駆動酵素によるATP消費反応を共役させることができた³⁾(図4)。このシステムを用いれば、光照射により光駆動ATP再生小胞が持続的にATPを再生することで、継続的な有用物質の生産が可能である。

5 光駆動ミトコンドリアの開発

次に、筆者らはデルタロドプシンを細胞内で働かせることにより光駆動ATP再生細胞を創製することができれば、反転膜の調製が不要な究極の光駆動物質生産プロセスの開発につながると考えた。そして、ミトコンドリアはバクテリア由来であるとする細胞内共生説に基づけば、「大腸菌の細胞膜で機能するデルタロドプシンは、ミトコンドリア膜でも機能するのではないか」と考えた。そこで、図5に示した発酵微生物のミトコンドリアへの光リン酸化能の付与に先立ち、早稲田大学の澤村直哉准教授らと共同で、外来タンパク質のミトコンドリアでの発現が確立されている哺乳類培養細胞での検証を試みた。デルタロドプシンを哺乳動物細胞のミトコンドリアにおいて特異的に発現させた後、この細胞に光照射をおこなうと、哺乳動物細胞ミトコンドリア内で呼吸鎖のPMFが増加した。ま

た、ミトコンドリアの呼吸鎖の阻害による神経細胞死が光照射によって抑制されることを明らかにした⁴⁾。次に筆者らは、この光駆動ミトコンドリア作出技術を発酵生産によく用いられる出芽酵母に應用した。具体的には、出芽酵母のミトコンドリアに哺乳動物細胞と同様の方法でデルタロドプシンを発現させることで、光利用型酵母(図5)を作出し、光エネルギーを用いて細胞内ATP濃度を高めることに成功した。さらに、現在はこの光利用型酵母を用いて、有用物質の生産性の向上に取り組んでいる。

6 おわりに

生体や環境にやさしいクリーンなエネルギーが求められる時代にあって、無尽蔵に存在する光エネルギーを電気エネルギーに変換する太陽光発電や、光エネルギーを有機物として蓄積した植物体(バイオマス)を燃料や化成品の発酵原料として用いようとするバイオリファイナリー*の研究が盛んである⁵⁾⁶⁾。また、光合成細菌や藍藻などの光合成能を元来有する微生物を用いて、光エネルギーにより有用物質を生産させる研究がおこなわれている。しかし、こ

れらの微生物を実際の発酵の現場で用いるには、増殖速度が遅いため、増殖速度を高める必要がある。一方、増殖速度が速い大腸菌や出芽酵母などの実際に発酵の現場で利用されている微生物の場合には、遺伝子工学技術を用いた代謝の改変により、さまざまな有用物質の生産性を向上させる研究がおこなわれている。しかし、目的生産物の生産性が向上するにつれ、細胞の増殖や細胞内エネルギーが低下し、結果的に生産性の向上に行き詰ることが多い。これは、発酵そのものがインプットである資源(Resource)を「細胞自身の材料(Cell)」、「細胞内エネルギー(Energy)」、「目的生産物(Product)」の三つのアウトプットに振り分けるプロセスであり、これらがトレード・オフの関係にあることに、根本的な原因が存在すると考えられる。今回紹介した、真核生物の細胞内エネルギー生産を司るオルガネラであるミトコンドリアに、光リン酸化能を共生生物工学的に付与することで光駆動ミトコンドリアを創製し、元来の呼吸鎖に加えて光エネルギーを利用可能にする新しいハイブリッド型微生物細胞の開発は、三つ巴の状態にある発酵プロセスから「細胞内エネルギー」を切り離す一つの手段である。

本研究のように、共生由来オルガネラに新たな機能を付与し、細胞機能を改変する「共生細胞工学」の研究は、まだ始まったばかりである。これまでのほとんどの代謝工学的な研究では、多くの酵素反応の場である細胞質の改変しかおこなわれてこなかった。しかし、今後は、ミトコンドリアのみならず、共生由来オルガネラの機能改変により抜本的な微生物の改変が重要であろう。それを可能にするためには、オルガネラに関する基本的な理解をさらに進めるとともに、オルガネラの改変技術をより進展させなければならない。

[文献]

- 1) Hara, K.Y., Araki, M., Okai, N., Wakai, S., Hasunuma, T. *et al. Microb. Cell. Fact.* **13**, 173, doi: 10.1186/s12934-014-0173-5. (2014).
- 2) Hara, K.Y. & Kondo, A. *Microb. Cell. Fact.* **14**, 198, doi: 10.1186/s12934-015-0390-6. (2015).
- 3) Hara, K.Y., Suzuki, R., Suzuki, T., Yoshida, M., Kino K *et al. Biotechnol. Lett.* **33**, 1133-8, doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.05.021. (2012).
- 4) Hara, K.Y., Wada, T., Kino, K., Asahi, T., Sawamura, N. *et al. Sci. Rep.* **3**, 1635, doi: 10.1038/srep01635. (2013).
- 5) Kondo, A., Ishii, J., Hara, K.Y., Hasunuma, T., Matsuda, F. *et al. J. Biotechnol.* **163**, 204-16, doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.05.021. (2013).
- 6) Hasunuma, T., Okazaki, F., Okai, N., Hara, K.Y., Ishii, J. *et al. Bioresour. Technol.* **135**, 513-22, doi: 10.1016/j.biortech.2012.10.047. (2013).

用語解説 Glossary

【バイオリファイナリー】

燃料や化成品および機能性化合物(ファインケミカル)などのさまざまな物質を化石資源である石油から生産するオイルリファイナリーに対して、これらを再生可能資源であるバイオマスから生産する技術体系。バイオマスリファイナリーともいう。



原 清敬 Kiyotaka Hara

静岡県立大学 食品栄養学部環境生命科学科 准教授

略 歴：2001年、東京工業大学にて博士(理学)取得後、協和発酵工業(株)、早稲田大学、神戸大学を経て、2015年より現職。

専 門：生化学、応用微生物学、生物工学、合成生物学