

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：24405

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21287

研究課題名（和文）嫌氣的呼吸能の付与による、余剰還元力を活用した微生物物質生産系の開拓

研究課題名（英文）Development of anaerobic biorefinery utilize anaerobic respiratory chain

研究代表者

中澤 昌美（Nakazawa, Masami）

大阪公立大学・大学院農学研究科 ・講師

研究者番号：90343417

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：低い酸化還元電位を有するキノン化合物「ロドキノン」の合成能力を生物に与えることによって、嫌氣的環境における余剰還元力を利用することを可能とし、物質生産能力向上を向上させる、という代謝改変コンセプトを立て、モデル生物を用いた検証を行った。対象としては、大腸菌、酵母、真核紅藻シゾンを用いた。酵母ではロドキノン含量の高い細胞が獲得できなかった。ロドキノン合成能力を付与した大腸菌およびシゾンでは嫌氣処理を行った細胞におけるコハク酸生産量がコントロールに比べ増加するとともに、細胞内のNADH/NAD<sup>+</sup>比が低下していたことから、嫌氣的呼吸鎖を介した還元力利用による物質生産向上が達成されたと結論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

電子の流れを制御して物質生産を変換するという方法論として、従来は電極との細胞外電子伝達などの方法が開発されてきた。本研究では、細胞内での電子の流れをコントロールしうる新たなコンセプトとして、低い酸化還元電位を持つキノン化合物の合成能力を人工的に付与することによって、細胞内の物質生産能力を改変することを提案し、実際にコハク酸生産への炭素の流れを高めることに成功した。今後、既存の代謝改変による物質生産向上との相加効果を検証することで、物質生産宿主の改善に広く活用しうる系へとつなげていく。

研究成果の概要（英文）：A concept of metabolic modification by providing organisms with the ability to synthesize rhodoquinone, a quinone compound with a low redox potential, to enable them to utilize the excess reducing power in anaerobic environments and improve their ability to produce compounds was developed and validated using model organisms. *E. coli*, yeast, and the eukaryotic red alga *Cyanidioschyzon* were used for this study. The results showed that the succinate production in anaerobically treated cells of *E. coli* and *Cyanidioschyzon* with rhodoquinone synthesis ability increased and the intracellular NADH/NAD<sup>+</sup> ratio decreased compared to the control cells.

研究分野：生化学・細胞生物学

キーワード：バイオリファイナリー 嫌氣的呼吸鎖 低酸化還元電位型キノン ロドキノン 嫌氣 低酸素

## 1. 研究開始当初の背景

**嫌気・低酸素は「化合物の酸化分解が抑制され、多彩な物質の生産ポテンシャルがある」環境である。**従来、主に細菌を材料に、嫌気的な物質生産の研究が多く行われてきた。しかし嫌気環境では、酸素を最終電子受容体とした好気呼吸が低下するため余剰の還元力が生じ、酸化型補酵素の再生を妨げるため、**代謝が停滞し、期待通りの物質生産能力が発揮されない**という問題があった。

嫌気下での余剰還元力を消費する代謝として、多くの生物は「発酵」の仕組みを有し、乳酸やエタノール等の生成に伴った酸化型補酵素再生を行う。しかし、発酵のみで嫌気下の生存を維持できる生物は非常に少ない。一方、好気環境に加えて嫌気環境でも生存できる「通性嫌気性生物」においては、**酸素以外の化合物を最終電子受容体とした「嫌氣的呼吸」**により、還元力を消費すると同時に ATP を獲得できるメカニズムを持つ種が存在する。

申請者は、真核藻類ユーグレナが嫌気下で、キノンの一種である**ロドキノン(RQ)**を介した**呼吸鎖電子伝達**との共役により、ATP を生成しながら、一般に不可逆とされるアシル-CoA デヒドロゲナーゼに還元的な逆反応を駆動させ、 $\beta$  酸化完全逆行による脂肪酸合成を達成していることを見出してきた[Nakazawa (2018) FEBS Lett. Editor's choice]。限られた数種の生物にのみ存在する RQ は、酸化還元電位が  $-63 \text{ mV}$  と低く、ユーグレナ嫌氣的呼吸の電子伝達体として良好に機能していた。

ごく最近、光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* 由来 *rquA* 遺伝子の発現により、大腸菌・酵母が「好気呼吸で機能するユビキノン(UQ)を基質として、RQ を合成する能力」を獲得することが見出された[Bernert (2019)]。申請者は、当該生物に存在しない RQ の合成能を付与することで、**嫌気下で生じる余剰の還元力を活用した「嫌氣的呼吸能」を各種生物に付与できるのではないかと考えた。**好気的な生物が潜在的に有する「嫌氣的に生きる能力」を嫌氣的呼吸により引き出し、本来好気環境でしか培養できない生物に嫌気的な物質生産を行わせる、**前人未踏の挑戦**を構想するに至った。

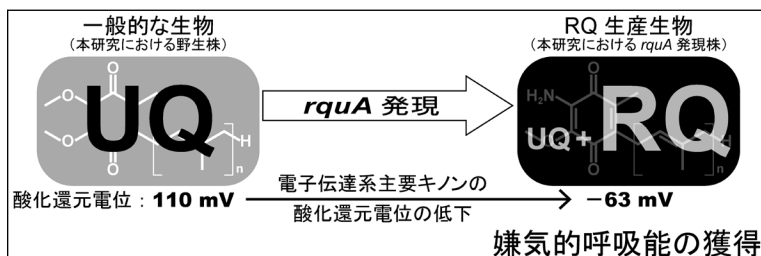


図1 本研究の全体像。

*rquA* 遺伝子を発現させることで、ユビキノン(UQ)合成生物に酸化還元電位が低い「ロドキノン(RQ)」を合成させ嫌氣的呼吸能を与える。

## 2. 研究の目的

本研究では、生物に低い酸化還元電位を有するキノンを合成させることで、「嫌氣的呼吸」能力を与え、嫌気下で生じる余剰還元力を、円滑に物質生産に活用することに挑戦する。最終目的として、好気的な光合成生物に嫌気的環境での生存能力や物質生産能力を与え、好気呼吸による  $\text{CO}_2$  放出を伴わずに、光合成で固定した炭素を利用する、「**低炭素社会構築につながる革新的な物質生産系**」の開発に道筋をつける。これらの研究を通じ、「**嫌氣的呼吸能の付与による余剰還元力活用**」という新たなコンセプトを実証する。

## 3. 研究の方法

UQ を有するモデル生物を研究対象とした。原核生物として大腸菌、真核生物として酵母、好気性光合成生物として紅藻シズンを用い、ユーグレナ *rquA* を発現させ、細胞内で RQ を合成した。RQ 合成量を変化させ、嫌気・低酸素環境での ATP 量、補酵素の酸化還元バランスや物質生産能に及ぼす影響を解析した。研究は以下の3つのステップで構成した。

#### <ステップ 1> 大腸菌・酵母(嫌氣的代謝可能)における RQ 生産株の解析

嫌氣的代謝が可能な、野生株大腸菌・酵母を宿主として、嫌氣的呼吸能を付与する。ユーグレナ *rquA* 発現株が細胞内で RQ を合成することは、予備的検討で既に確認済みである。

#### <ステップ 2> 大腸菌・酵母(嫌氣的代謝の欠損株)における RQ 生産株の解析

大腸菌の嫌氣的呼吸における電子受容体メナキンの合成欠損株、酵母の主要発酵経路の欠損株を宿主として、嫌氣的代謝を持たない生物に嫌氣的呼吸能を付与する。

#### <ステップ 3> シズン(好氣性光合成生物)における RQ 生産株の解析

好氣性光合成生物シズンを宿主として用い、好氣性生物への嫌氣的代謝能の付与に挑戦する。

本研究では、嫌氣下有用物質生産系として、還元反応が律速となるコハク酸(バイオプラ原料)と脂肪酸(化成品・燃料)を対象に、生産促進効果を検証した。これらはユーグレナにおいて、RQ を介した電子伝達と共役して合成される。RQ から電子を受け取ると想定される酵素は、生物界に広く存在するフラビン酵素であり、好氣下では酸化反応を触媒する。RQ により、従来の代謝工学では制御困難な嫌氣的環境における電子の流れを制御し、余剰還元力を還元反応に利用する。コハク酸生産系では、フマル酸還元が律速となり、コハク酸への炭素流入速度と量が約 50%に低下している例がある[Hasunuma (2016)]。電子の流れを、RQ により制御し、コハク酸生産を親株より増加させることを目指して研究を進めた。

## 4. 研究成果

研究開始時には、酵母も対象として挙げていたが、ミトコンドリアに *rquA* を発現させた場合出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では RQ が全く検出されず、また分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* では最も高い株で UQ の約 2%程度と非常に低い濃度の RQ しか検出されなかったため、今回の科研費研究における検証は進めないこととした。

まず、大腸菌 BL21(DE3)に対して pET16b ベクターを用いたユーグレナ *rquA* 遺伝子発現を行った。その結果、UQ+RQ 総量の約 90%を RQ が占める株の作出に成功した。このことから、大腸菌は RQ 合成の付与が容易で、今後の検討に適した生物であることが明らかとなった。

次に、代謝改変による電子伝達能の変化が代謝物の流れの変化に及ぼす影響を詳細に検討するために、Keio コレクションから分与を受けた *AmenA* 株を用いて検討を行った。この株は、大腸菌が有する低還元電位型キノンであるメナキンの合成能を欠いており、RQ 合成による影響を解析しやすいと考えたためである。発現ベクター系として、アラビノースによる厳密な誘導コントロールが可能な pBAD24 を用いた。結果は図 1 にまとめた。RQ 合成能力を付与した大腸菌株では、48 時間嫌氣処理時のコハク酸合成量が約 2 倍に上昇していた。このことから、菌体内の電子伝達を変化させ、物質生産を転換させることに成功したと判断した。また RQ 合成株では嫌氣処理後の ATP 量が有意に高値を示した。しかし、好氣状態に比べるとどちらの株でも大きく ATP 量は低下しており、嫌氣的呼吸鎖の完全移植には至っていないと判断した。

最後に光合成真核生物である *Cyanidioschyzon merolae* (シズン) への RQ 合成能付与を行った。シズン由来ミトコンドリア移行シグナルをユーグレナおよび *Rhodospirillum rubrum* 由来の *rquA* に付加し、相同組換えにより発現させることで、様々な RQ 含量のシズン作出に成功した。最も RQ 含量が高かった株に対して、嫌氣処理 24 時間後のコハク酸分泌量を調べた結果、コントロール株に比べ上昇している傾向が見られた。さらに嫌氣処理後の ATP 量についても RQ 合成株で高値を示しており、大腸菌での表現型とほぼ同様の結果が得られた。

以上のことから、RQ 合成能の付与は、細胞の電子伝達を変化させ、還元力を利用した物質生産能の向上に寄与すると結論した。

図1 大腸菌 ΔmenA 株における結果

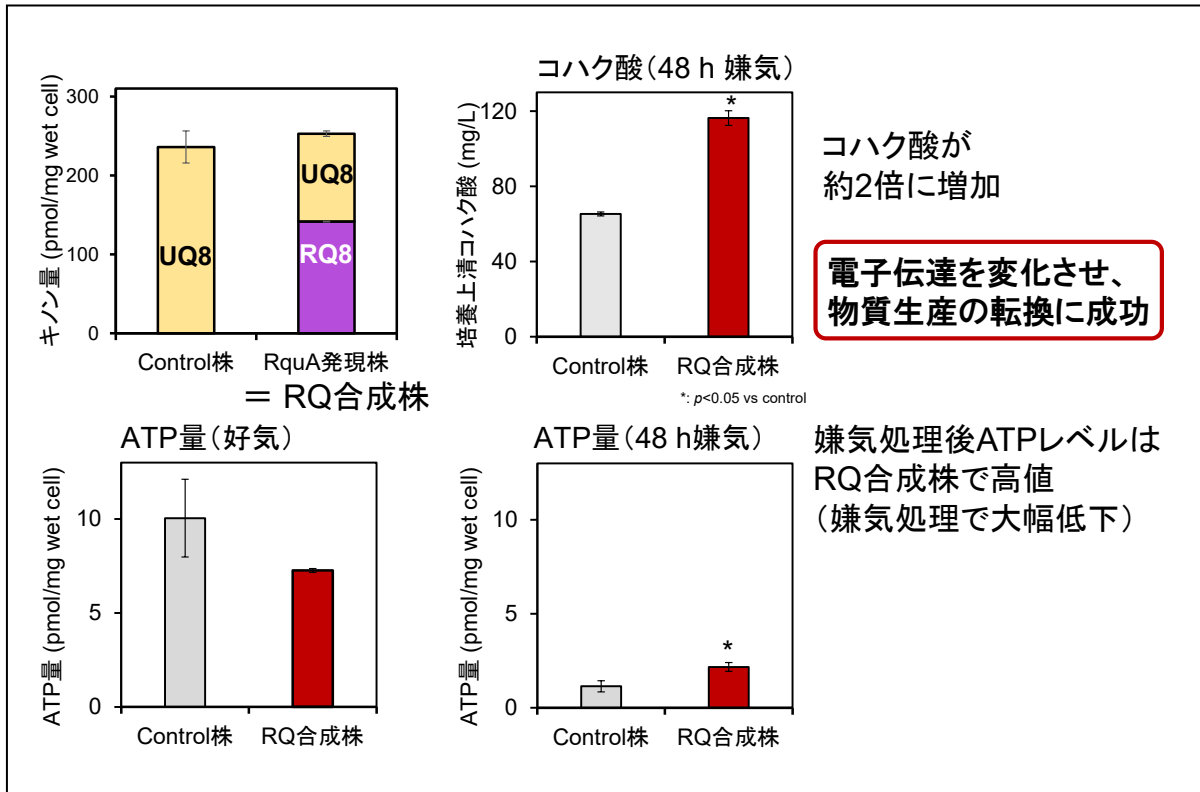
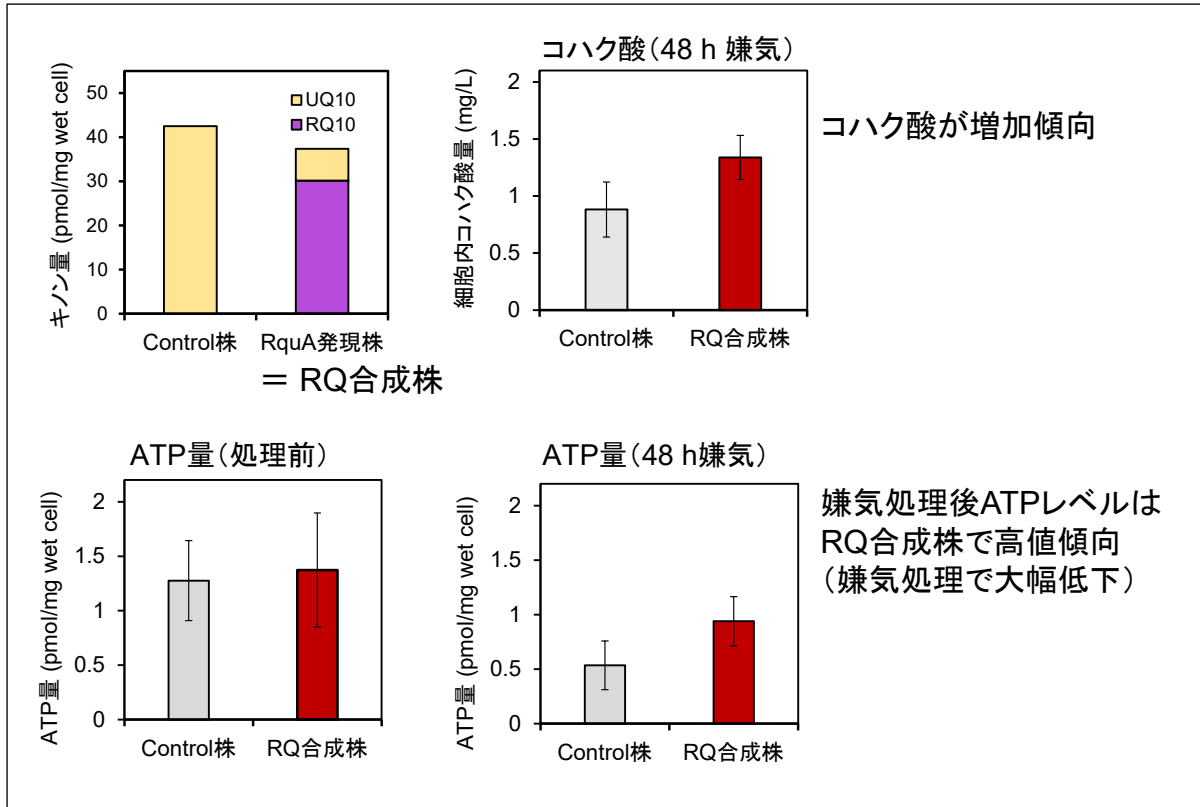


図2 シズンにおける結果



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>長谷川雅樹、中澤 昌美、坂元 君年、柏山祐一郎、上田 光宏、阪本 龍司 |
| 2. 発表標題<br>電子伝達体キノンの構成改変による物質生産転換法の開発          |
| 3. 学会等名<br>第31回イソプレノイド研究会                      |
| 4. 発表年<br>2021年                                |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>中澤昌美、高橋夢月、乾 博、坂元君年、上田光宏、阪本龍司    |
| 2. 発表標題<br>ロドキノンを介する嫌氣的呼吸鎖と共役した長鎖脂肪酸合成系の解明 |
| 3. 学会等名<br>第30回イソプレノイド研究会                  |
| 4. 発表年<br>2020年                            |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                            | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)               | 備考 |
|-------|--|-------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 柏山 祐一郎<br><br>(Kashiyama Yuichiro)<br><br>(00611782) | 福井工業大学・環境情報学部・教授<br><br><br>(33401) |    |
| 研究分担者 | 坂元 君年<br><br>(Sakamoto Kimitoshi)<br><br>(50361465)  | 弘前大学・農学生命科学部・准教授<br><br><br>(11101) |    |

6. 研究組織（つづき）

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                          | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                          | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 藤原 崇之<br><br>(Fujiwara Takayuki)<br><br>(10595151) | 国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・助教<br><br><br><br><br>(63801) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|         |         |