

適応的実験室進化による次世代バイオ燃料耐性大腸菌の構築と耐性機構の解明

東洋大学 生命科学部
教授 道久 則之

1. はじめに

循環型社会形成のため、化石資源由来の有用物質を微生物細胞に生産させる、いわゆる再生可能資源を活用する技術の開発が切望されている。合成生物学やシステム工学、代謝工学等の進展により、微生物に様々な有用物質を生産させる手法が開発されている。バイオ燃料については、これまでに、可食性のバイオマスから生産される第1世代バイオ燃料や非可食性のバイオマスから生産される第2世代バイオ燃料が開発されてきた。既存インフラ設備をそのまま活用する場合、ガソリン等の化石燃料に混合して利用するが、従来型（第1世代と第2世代）のバイオ燃料はその混合比率に制限がある。そこで、既存のインフラ設備とより親和性の高いバイオ燃料が求められている。しかし、バイオ燃料や化学製品等（有機溶媒や有機溶媒様化合物）は細胞毒性を示すものが多く、これが生産性の低い要因となっている。そこで、バイオ燃料や化学製品等の生産効率化のため、微生物の有機溶媒耐性機構が注目されている。申請者は、これまでに、大腸菌の有機溶媒耐性に関する研究を行い、高度な有機溶媒耐性を付与する遺伝子変異の特定に成功し、様々な有機溶媒耐性化機構を見出している。また、有機溶媒耐性の向上した大腸菌による高効率な物質生産についても報告している。本研究では、高度に有機溶媒耐性化した大腸菌を構築し、高効率の次世代バイオ燃料生産系を確立することを目的とした。

2. 大腸菌の有機溶媒耐性化

本研究では、大腸菌の有機溶媒耐性化について検討した。有機溶媒は、微生物細胞に蓄積すると、細胞膜、外膜、細胞壁、タンパク質などの正常な機能を阻害する¹⁾。また、活性酸素を発生する場合や、代謝に影響を与えることもある。分子動力学シミュレーション解析により、疎水性有機溶媒が膜に蓄積した場合、膜の面積、弾性、脂質の拡散運動が減少し、膜の厚みが増加するなど膜に大きなダメージを与えることが報告されている。このような膜構造へのダメージに対応して、微生物は膜組成を改変して膜構造を安定化している。このような細胞膜の適応には、脂肪酸の飽和の割合、不飽和脂肪酸のシス-トランス異性化、リン脂質頭部基の変化などの機構が知られている。また、特に、細菌においては、薬剤排出ポンプが主要な有機溶媒耐性機構として知られている。細菌の薬剤排出システムは、構成するタンパク質の構造および共役するエネルギーの違いから、主に、ABC (ATP-binding cassette) 型、RND (resistance-nodulation-division) 型、MF (major facilitator) 型、SMR (small multidrug resistance) 型、MATE (multidrug and toxic efflux) 型の5つのファミリーに分類される。このうち、大腸菌や *Pseudomonas* 属細菌などのグラム陰性細菌の場合には、RND ファミリーの薬剤排出ポンプが有機溶媒耐性に関与することが知られている。RND 型排出ポンプは、外膜に存在するチャネルタンパク質、内膜に存在するトランスポーター、およびそれらを連結するアダプター蛋白質からなる。大腸菌の場合には、有機溶媒耐性に関わる RND 型排出ポンプとして AcrAB-TolC が

知られている（図 1）。AcrB は内膜のトランスポーター、TolC は外膜のチャネルを形成し、アダプター蛋白質である AcrA は、AcrB と TolC との複合体の周辺部にあつて、複合体形成を補強する役割をしていると考えられている。これら 3 者複合体は膜貫通型の薬剤排出ポンプを形成し、プロトン駆動力をエネルギー源として抗生物質、色素、界面活性剤などの薬剤を菌体外へ排出し、これらに対する耐性を付与する。また、シクロヘキサン、ヘキサン、ヘプタンなどの疎水性有機溶媒も排出し、有機溶媒耐性度も向上させる

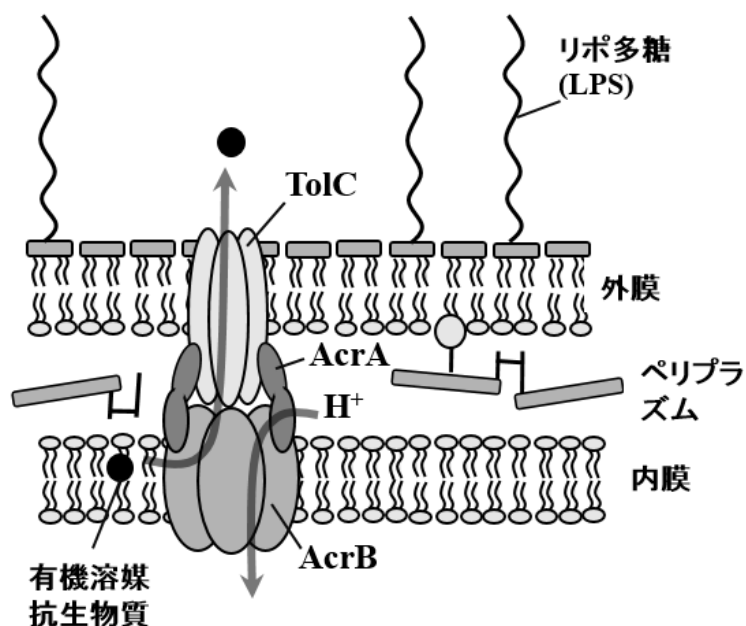


図 1. 大腸菌の細胞表層と AcrAB-TolC 排出ポンプによる種々の物質の排出

また、大腸菌は、AcrAB-TolC ポンプ以外にもそのホモログである AcrEF-TolC ポンプも有しており、AcrEF-TolC ポンプも AcrAB-TolC ポンプと同様な機能があることが知られている。そこで、*acrAB* と *tolC* の 2 つの遺伝子を連結してベクター pMW119 に挿入した AcrAB-TolC ポンプ発現用プラスミド pMW-*acrABtolC* と *acrEF* と *tolC* の 2 つの遺伝子をタンデムに連結した AcrEF-TolC ポンプ発現用プラスミド pMW-*acrEFtolC* を作製した。さらに、これらのプラスミドを大腸菌 BW25113 株に導入した BW25113(pMW-*acrABtolC*)株と BW25113(pMW-*acrEFtolC*)株を構築し、有機溶媒（シクロヘキサン）耐性を調べた（図 2）。シクロヘキサンを寒天培地に重層して、生育頻度を比較した結果、ベクターを導入したコントロール株である BW25113(pMW119)株はシクロヘキサン存在下では生育しなかったが、BW25113(pMW-

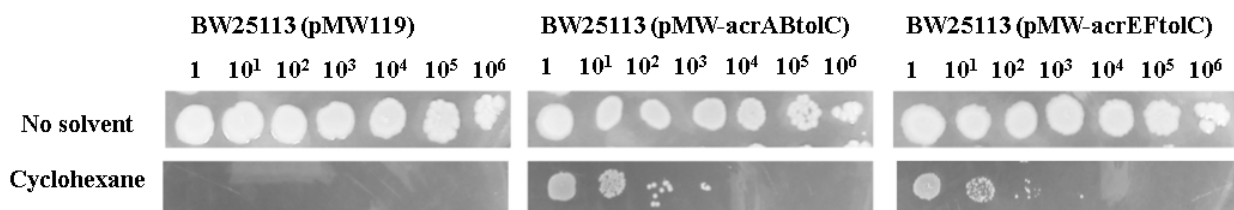


図 2. 有機溶媒存在下における排出ポンプ高発現大腸菌の生育

acrABtolC)株と BW25113(pMW-acrEFtolC)株は、シクロヘキサン存在下において生育可能であり、有機溶媒耐性度が顕著に向上することが示された。

これらのプラスミドを後述するオクタノール生産大腸菌に導入したところ、構築した株の有機溶媒耐性度が著しく低下してした。これは、複数のプラスミドを導入することにより、菌体への負荷が大きくなってしまったことが考えられる。このため、プラスミドを用いた排出ポンプの高発現化ではなく、有機溶媒耐性大腸菌変異株を取得し、この変異株にオクタノール生産のために必要な遺伝子を導入することとした。

これまでに、自然突然変異や変異原を用いた変異誘発により、有機溶媒耐性化した変異株が取得され、多数報告されている。近年、報告例の多い微生物の有機溶媒耐性を向上させる方法として、適応的実験室進化 (ALE, adaptive laboratory evolution) などが報告されている²⁾。ALEは、選択圧下において継代培養を行い、親株に特定の表現型を獲得させる方法である。本研究では、次の方法により、有機溶媒耐性化した変異株を取得する方法を検討した。すなわち、大腸菌 (BW25113 由来株) を LB 改変液体培地で前培養し、培養液を新しい液体培地に植菌して、有機溶媒を重層して培養した。得られた培養液を寒天プレートに塗布し、プレートに出現したコロニーからランダムに数十株を選び、スポット法により各菌株の有機溶媒耐性を調べた。有機溶媒耐性度が最も高かった株を 1 株選択して、同様の操作を有機溶媒の毒性を強くして繰り返した。この結果、強毒性のオクタノールに耐性を示す大腸菌数株を取得することができた (図 3)。

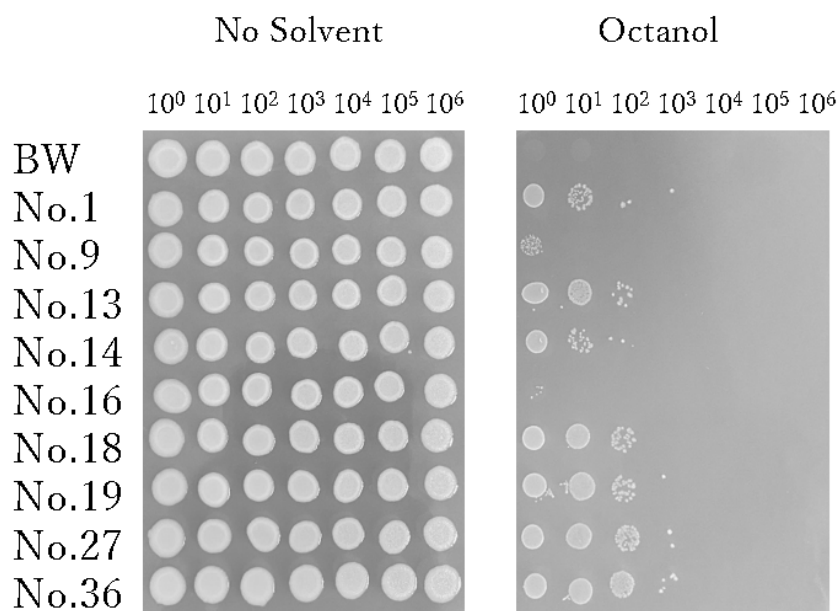


図 3. スポット法による有機溶媒耐性度評価

BW, BW25113 株、No.1~36 は取得した変異株

続いて、BW25113 株と取得した変異株 (4 株) における、タンパク質 AcrA と TolC の発現レベルの変化をウェスタンブロッティングによって調べた (図 4)。この結果、BW25113 株に比べて、取得した有機溶媒耐性変異株では全て、AcrA と TolC の発現レベルが増加していた。この結果から、オクタノール耐性には、AcrAB-TolC ポンプが関与していることが示唆された。



図 4. AcrA と TolC の発現

レーン 1, BW25113 株、レーン 2-5, 取得した変異株

オクタノール生産大腸菌では、後述するように、pET システムを用いた遺伝子発現系を使用する必要がある。そこで、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子が組込まれた JM109(DE3)株を親株として、シクロヘキサンを重層した LB 液体培地で増殖した菌株の中から、シクロヘキサン存在下において良好な生育を示す有機溶媒耐性変異株を取得した（図 5）。この結果、JM109(DE3)株に比べてシクロヘキサン存在下において 1000 倍から 10000 倍の高い生育頻度を示す JM109(DE3)-3 株と JM109(DE3)-12 株を取得することができた。

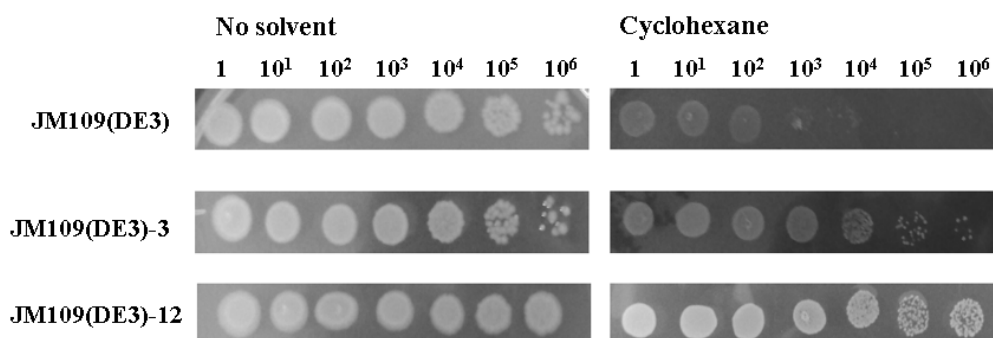


図 5. 有機溶媒存在下における有機溶媒耐性大腸菌変異株の生育

3. 次世代バイオ燃料生産の効率化

本研究では、近年、ディーゼル燃料の代替として期待されている 1-オクタノールの生産効率化を検討した。1-オクタノールは、強毒性であるトルエン等に準じて微生物に対する生育阻害効果が大きい有機溶媒である。効率的な 1-オクタノール生産法を開発することができれば、細胞毒性を示す多くの有用物質生産に適用できることが期待される。JM109(DE3)-3 株と JM109(DE3)-12 株を用いて 1-オクタノール生産株を構築し、1-オクタノール生産性の効率化について検討した。大腸菌において、チオエステラーゼ (TesA)、カルボン酸レダクターゼ (Car)、

ホスホパンテライニル転移酵素 (Sfp)、アルデヒドレクターゼ (Ahr)を高発現化すると、グルコースから 1-オクタノールを効率よく生産できることが報告されている³⁾(図 6)。本研究では同様な手法により、各遺伝子発現用プラスミドを作製し(図 7)、大腸菌に導入して 1-オクタノール生産株を構築した。

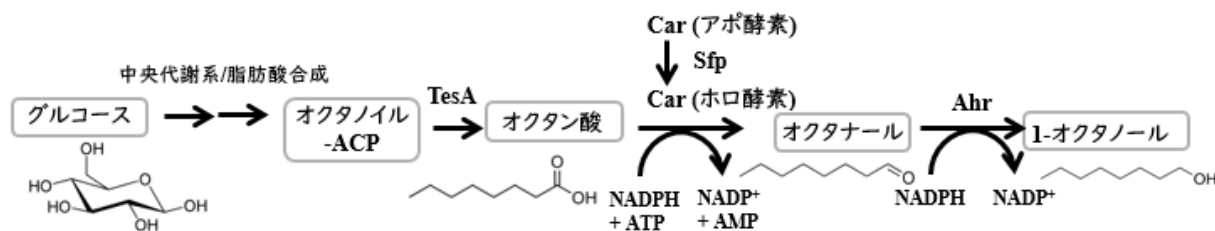


図 6. 大腸菌による 1-オクタノール生産

TesA (*Anaerococcus tetradius* チオエステラーゼ), Car (*Mycobacterium marinum* カルボン酸レダクターゼ), Sfp (*Bacillus subtilis* ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ), Ahr (大腸菌アルデヒドレクターゼ)

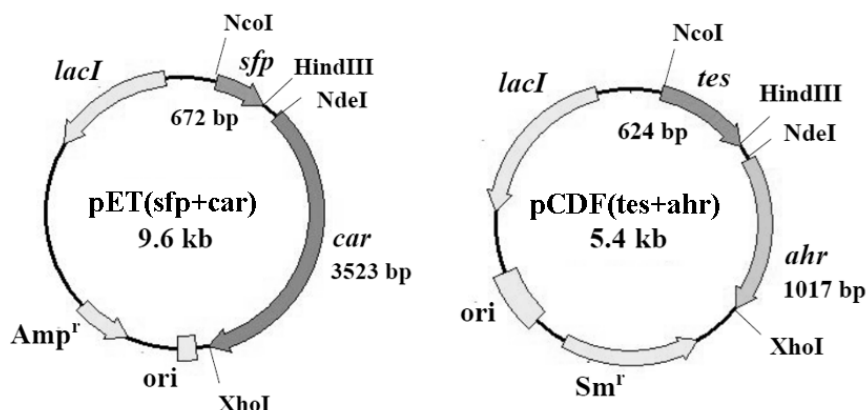


図 7. 1-オクタノール生産用プラスミドの構築

遺伝子発現用のベクターとして Merck Millipore 社の pETDuet-1 と pCDFDuet-1 を用いて、pETDuet-1 に、*sfp* と *car* を導入し、pCDFDuet-1 に *tes* と *ahr* を導入し、それぞれ、pET(*sfp+car*)と pCDF(*tes+ahr*)と呼ぶこととした。これらプラスミドを JM109(DE3)由来株に導入した。また、LB 改変培地を用いて菌株を培養し、1-オクタノール生産を確認した。培養液から、クロロホルムを用いて 1-オクタノールを抽出し、示差屈折器を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により、1-オクタノールの定量を試みたが、検出感度が不十分であったため、ガスクロマトグラフィー-質量分析計 (GC-MS) による 1-オクタノールの定量を行った(図 7)。この結果、コントロール株である JM109(DE3)(pETDuet-1 + pCDFDuet-1)株では 1-オクタノールは未検出であったが(図 8 左)、JM109(DE3)(pET(*sfp+car*) + pCDF(*tes+ahr*))株では 1-オクタノールを検出することができた(図 8 右)。

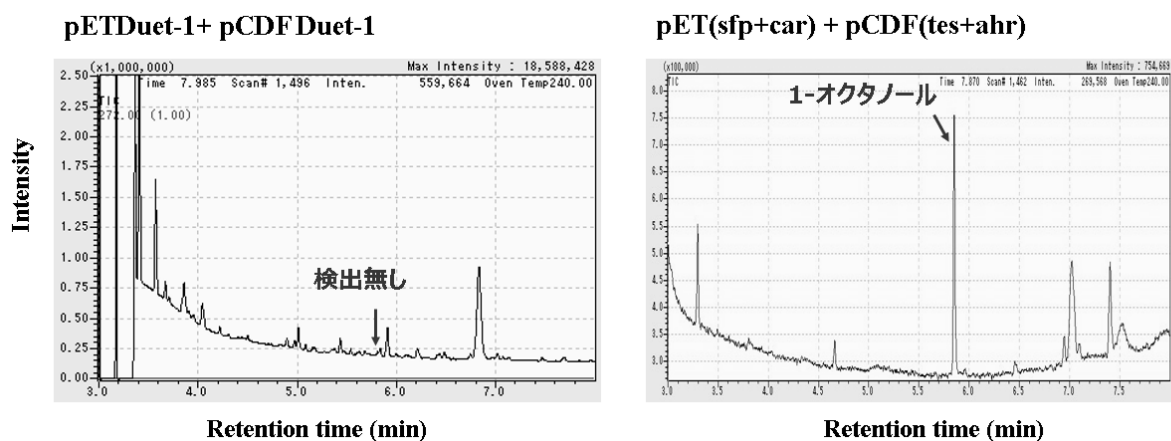


図 8. GC-MS による 1-オクタノールの定量

GC/MS:QP2010 (島津製作所)、イオン化モード: EI、検出器: 1.28 kV、カラム: Rtx-624 (Restek 社製)、キャリアガス: He

さらに、pET(sfp+car)と pCDF(tes+ahr)を JM109(DE3)-3 株と JM109(DE3)-12 株にそれぞれ導入した JM109(DE3)-3(pET(sfp+car) + pCDF(tes+ahr)) 株と JM109(DE3)-12(pET(sfp+car) + pCDF(tes+ahr))株を構築し、1-オクタノール生産を検討した (図 8)。この結果、有機溶媒耐性化前のコントロール株である JM109(DE3)(pET(sfp+car) + pCDF(tes+ahr)) 株に比べて、JM109(DE3)-3(pET(sfp+car) + pCDF(tes+ahr)) 株と JM109(DE3)-12(pET(sfp+car) + pCDF(tes+ahr))株の 1-オクタノール生産量が顕著に向上した。

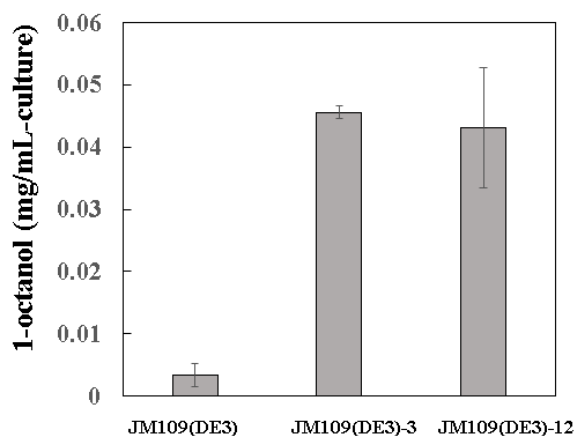


図 8.有機溶媒耐性化した大腸菌による 1-オクタノール生産

9. まとめ

本研究では、適応的実験室進化による手法により有機溶媒耐性大腸菌変異株を取得した。取得した変異株は、溶媒排出ポンプの増加により有機溶媒耐性を向上させていることが示唆された。また、取得した変異株にオクタノール生産のための遺伝子を導入した。この結

果、1-オクタノール生産株を構築することができ、さらに、コントロール株（有機溶媒耐性が比較的低い株）に比べて、有機溶媒耐性変異株を用いた場合には1-オクタノール生産量が顕著に向上し、有機溶媒耐性大腸菌を用いた1-オクタノール生産の効率化に成功した。

謝辞

本研究を遂行するにあたり公益財団法人 天野工業技術研究所から多大なご支援を頂きました。ここに記して謝意を示します。

参考文献

- 1) 伊藤 政博, 鳴海 一成, 道久 則之 (著, 監修) 「極限環境微生物の先端科学と社会実装最前線」 エヌ・ティー・エス出版 (2023).
- 2) Niu FX, He X, Wu YQ, Liu JZ, “Enhancing Production of Pinene in *Escherichia coli* by Using a Combination of Tolerance, Evolution, and Modular Co-culture Engineering,” *Front Microbiol.* 9:1623 2018.
- 3) Akhtar MK, Dandapani H, Thiel K, Jones PR, “Microbial production of 1-octanol: A naturally excreted biofuel with diesel-like properties,” *Metab Eng Commun.*, 2:1-5 2014.