

〈一般研究課題〉 酵素複合体を導入したシアノバクテリアによるバイオエチレン生産の相乗機構の解明と大量生産の研究
助成研究者 名城大学 神藤 定生



酵素複合体を導入したシアノバクテリアによるバイオエチレン 生産の相乗機構の解明と大量生産の研究

神藤 定生
(名城大学)

An Engineered Platform for Bioethylene Production by a Cyanobacterium Expressing a Chimeric Complex of Plant Enzymes.

Sadanari Jindou
(Meijo University)

Abstract :

With the advent of global warming, cyanobacteria is becoming an attractive cell factories for producing renewable chemicals due to their ability to capture solar energy and CO₂. Ethylene is a significantly important industrial raw material for the production of various petrochemical products. However, petroleum is a limited resource and emit excessive CO₂ into the atmosphere during its combustion and heat degradation process. Anaerobic cellulolytic bacteria produce enzyme complex, which is called cellulosome. In 1994, Bayer and Lamed first proposed the construction of enzyme complexes by utilizing dockerins and cohesins from cellulosomal systems. To reduce the rate of global warming, we have developed a novel bio-ethylene synthetic process using the both cellulosomal system and cyanobacteria. *In vivo* synergistic effect of chimeric enzyme complex on ethylene production was demonstrated. In order to produce more bio-ethylene from cyanobacteria, the investigation was performed as follows. First, to produce ethylene from SAM via ACC in a concerted fashion with less inhibition of ACS, we have constructed two chimeric enzyme complexes, SOC3D1 and SOC3D2, based on cellulosomal system. Second, two chimeric enzyme complexes were introduced into *Synechococcus elongatus* PCC7942. Then, we have examined the *in vivo* ethylene accumulation of engineered *S. elongatus* PCC7942 cells to determine whether the expressed chimeric enzymes produce more ethylene.

1. 緒言

現在の社会は、石油由来エチレンを利用した化成品の大量生産によって支えられている[1]。いっぽう、それら生産活動によって排出される二酸化炭素の削減は喫緊の課題である。我々は、光合成細菌の光合成産物をバイオエチレンとして回収し、さらに、嫌気性微生物のバイオマス分解システムを模倣した酵素複合体化技術[2]により、エチレン生合成酵素を効率よく機能させる試みを行った[3]。すなわち、植物由来のエチレン生合成に関わる1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) 合成酵素 (ACS) およびACC酸化酵素 (ACO) を、セルロソームエンジニアリングで複合体化させ、酵素複合体 (Ethylenome SOC2) を構築した。これを合成生物学の手法によりシアノバクテリアへ導入した結果、本細菌はバイオエチレンを3.4 nl/ml/O.D.₇₃₀/hの効率で生産した (図1)。さらに、Ethylenome SOC2の形成により3.7倍高いバイオエチレン合成活性を得た[4]。しかし、実用化を目指すとき、これは微量の生産量としか言えない。さらなるバイオエチレン生産効率の向上を目的として、本研究ではEthylenomeの酵素反応系および発現の最適化を行った。具体的には、既存の酵素複合体 (SOC2) を構成するところのACSおよびACOへ、*Arabidopsis thaliana*由来メチルチオアデノシン (MTA) ヌクレオシダーゼ (MTAN) 1および2を新規に組み込んだ。MTAN1および2はACSの反応副産物MTAをメチルチオリボースへ加水分解させる。これによりMTAのACS活性阻害が期待できる[5]。本報告では、これら3種の酵素が保持される酵素複合体 (SOC3D1および2) を導入したシアノバクテリアのバイオエチレン生成活性を検討したので、これを報告する。

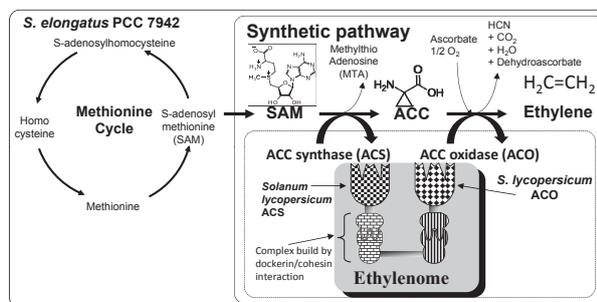


図1 Pathway for bio-ethylene production by “Ethylenome” in *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

2. 材料と方法

2.1. 発現ベクターpUC303-SOC3D1およびpUC303-SOC3D2の構築

理研BRCより提供された*Arabidopsis thaliana*由来cDNAクローン (pda00477, pda20265) からMTAN1および2遺伝子を、*Clostridium josui*ゲノムDNAからCel8A由来ドックリン遺伝子を、それぞれPCR法で増幅させ、これらを融合させたキメラサブユニットAtMTAN1-CjdocおよびAtMTAN2-Cjdocをそれぞれ構築した。上記で得たキメラサブユニットを保持するキメラ骨格タンパク質、既存のCip2へ*C. josui* CipA由来コヘシン2を1つ追加したCip3C、を構築した。

以上、構築した3つのキメラ遺伝子ORFを既存のpUC303-SOC2ベクターへIn-Fusion法で連結させpUC303-SOC3D1およびpUC303-SOC3D2を得た (図2)。最後に、

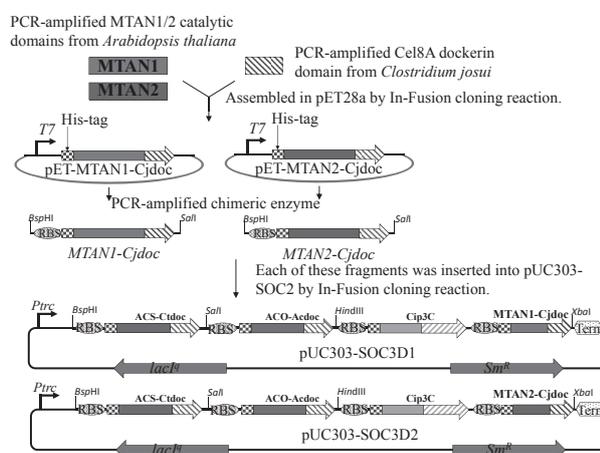


図2 Map of the plasmids used in this study.

これら構築プラスミドを用いて*Synechococcus elongatus* PCC7942 (R2-PC)株を形質転換し、得られた組換え体をstrain SOC3D1およびSOC3D2とした。

2.2. 組換えシアノバクテリアstrain SOC3D1およびSOC3D2のタンパク質発現量の解析

形質転換によって発現した単一コロニーを釣菌し、BG-11液体培地を80 mL分注した大型試験管に植菌した。培養は27°C、エアープンプによるバブリング(0.5 L/min)、白色蛍光灯の光による連続照明条件下でおよそO.D._{730nm}=0.6となるまで培養後、集菌を行った。超音波破碎後、遠心分離により無細胞抽出液を調製し、これを用いてSDS-PAGEおよび抗Hisタグ抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。

2.3. 組換えシアノバクテリアstrain SOC3D1およびSOC3D2のバイオエチレン生成能の測定

培養液10 mLを20 mLバイアル瓶に分注し、最終濃度50mMとなるようアスコルビン酸を添加した。つぎに、気相を二酸化炭素で置換し、密閉させた後、27 °C、115 rpmで明光下で一晩振とう培養した。バイアル瓶のヘッドスペースからシリンジを用いて200 μL抜き取り、これをFID検出器を装備したガスクロマトグラフィーGC-2014 (GC)で分析し、生成されたバイオエチレンを定量した。

3. 結果

3.1. 組換えシアノバクテリアによるEthyleneome構成タンパク質の共発現

組換えシアノバクテリアstrain SOC3D1およびstrain SOC3D2のEthyleneome構成タンパク質発現量を観察するため、IPTGで発現誘導を行った後、可溶性画分中の組換えタンパク質を抗Hisタグ抗体によるウェスタンブロット解析した。その結果、それぞれの株からAtMTAN1-CjdocおよびAtMTAN2-Cjdocを、既存のACS-CtdocおよびACO-Acdocと共に目的サイズのバンドで検出した。しかしながら、AtMTAN1-CjdocおよびAtMTAN2-Cjdocのバンド強度は、既存のEthyleneome構成タンパク質であるACS-CtdocおよびACO-Acdocのそれと比較したとき、より低い結果となった。一方、野生株ではバンドが検出されなかった(図3)。

3.2. Ethyleneomeの酵素組成によるエチレン生成効率の比較

Ethyleneomeの酵素組成の違いによるエチレン生成効率の比較をstrain SOC2, strain SOC3D1およびSOC3D2を用いて検討した。結果、strain SOC3D1はstrain SOC2の1.6倍、strain SOC3D2はstrain SOC2の1.9倍のバイオエチレン生産効率向上を観察した。

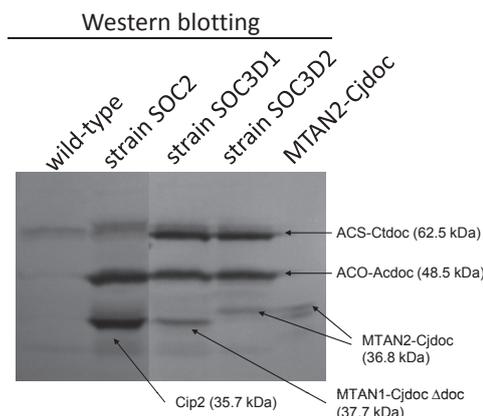


図3 Effects of MTAN on the enzyme complex expression in *S. elongatus* PCC 7942.

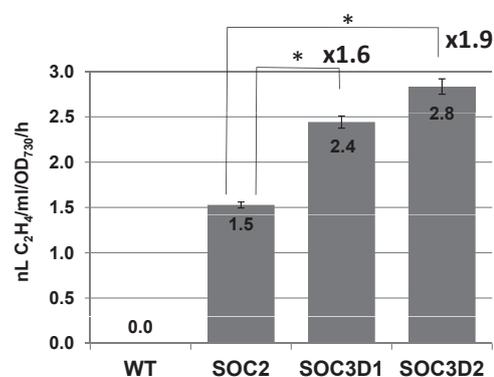


図4 The accumulation of ethylene in the headspace of closed cultures of *S. elongatus* PCC7942 strains SOC 2, SOC 3D1 and SOC 3D2.

4. 考察

本研究で着目したMTAはACSの触媒作用によって生じるACCの副産物であり、これはACS活性を阻害することが分かっている。そこで、MTANを既存のEthyleneomeへ組込むことで、ACS阻害物質のMTAを分解させ、バイオエチレン生産効率を向上させた。すなわち、本研究では*A. thaliana*由来のAtMTAN1および2を酵素複合体に含むstrain SCO3D1、SOC3D2を構築し、これら組換え体のバイオエチレン生産効率を既存のバイオエチレン生産株(SOC2)と比較した。その結果、MTANを含むstrain SOC3D1及びSOC3D2においては、どちらにおいても既存のEthyleneome SOC2より高いバイオエチレン生産効率を観察した。また、strain SOC3D2はstrain SOC3D1より高いバイオエチレン生産効率を示した。いっぽうで、AtMTAN1および2のMTAに対する K_m 値はそれぞれ27.6 μM 及び33.4 μM であり、AtMTAN1がより高い親和性をもつことがParveenらにより示唆されている[5]。これは本研究と異なる結果を示唆するものとなる。しかしながらAtMTAN2はMTAのみならずS-アデノシルホモシステイン (SAH)をも分解することが出来る、二機能性酵素である。SAHはSAMの脱メチル化により生成され、メチオニンの代謝経路であるところのSAMサイクルにおいてメチルトランスフェラーゼ活性を阻害し、また、SAH蓄積で細胞増殖阻害を引き起こすことが分かっている。したがって、AtMTAN2が独自に持つSAH分解活性によってSAMの前駆体のメチオニンを合成する代謝経路が活性化し、その結果、AtMTAN2を含むstrain SOC3D2がより高いバイオエチレン生産効率を示したと考えられる。いっぽう、本研究と競合する既存のバイオエチレン生産系(Ethylene Forming Enzyme保持株)の生産能力は12g/日である[6, 7]。そこで、当該バイオエチレン生産系との生産効率比較をEFE株を得て、これを培養し、strain SOC3D2を保持する株とのエチレン生産効率を比較した。その結果、EFE株は4.7 nl/ml/O.D.₇₃₀/hの効率で、SOC3D2は2.8 nl/ml/O.D.₇₃₀/hの効率でバイオエチレンを生産した。strain SOC3D2はEFE株の60%の効率でバイオエチレンを生産することを明らかとした。今後、種々の条件下におけるエチレン合成の最適化、さらに合成生物学的手法による酵素複合体技術を生かした有用物質生産の開発において、本研究により確立された手法は極めて有用であると期待される。

参考文献

1. Ghanta, M., D. Fahey, and B. Subramaniam, *Environmental impacts of ethylene production from diverse feedstocks and energy sources*. Applied Petrochemical Research, 2013.
2. Caspi, J., et al., *Conversion of Thermobifida fusca free exoglucanases into cellulosomal components: comparative impact on cellulose-degrading activity*. J Biotechnol, 2008. **135**(4): p. 351-7.
3. You, C. and Y.H. Zhang, *Annexation of a high-activity enzyme in a synthetic three-enzyme complex greatly decreases the degree of substrate channeling*. ACS Synth Biol, 2013.
4. Jindou, S., et al., *Engineered platform for bioethylene production by a cyanobacterium expressing a chimeric complex of plant enzymes*. ACS Synth Biol, 2014. **3**(7): p. 487-96.
5. Parveen, N. and K.A. Cornell, *Methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase, a critical enzyme for bacterial metabolism*. Mol Microbiol, 2011. **79**(1): p. 7-20.
6. Takahama, K., et al., *Construction and analysis of a recombinant cyanobacterium expressing a chromosomally inserted gene for an ethylene-forming enzyme at the psbAI locus*. J Biosci Bioeng,

2003. **95**(3): p. 302-5.
7. Guerrero, F., et al., *Ethylene synthesis and regulated expression of recombinant protein in *Synechocystis sp. PCC 6803**. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50470.