

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23119004

研究課題名（和文）多要素からなる人工代謝経路の構築

研究課題名（英文）Construction of artificial metabolic pathway that is comprised of multiple genes

研究代表者

柘植 謙爾 (TSUGE, Kenji)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特任講師

研究者番号：70399690

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 64,200,000円

研究成果の概要（和文）：一連の代謝遺伝子群を連結した人工オペロンをどのようにデザインすればよいかを、特に遺伝子の人工オペロン内の連結順序に着目して、大腸菌が本来生産しないカロテノイド・アントシアニンといった色素性物質の代謝経路を具体例に取り上げて検証した。

その結果、グルコースからカロテノイドまでの一連の代謝経路を連結した人工オペロンプラスミドによりカロテノイドを生産する大腸菌の創出に成功した。また、*in vitro*の酵素反応で最適な酵素比率を求め、これに基づいたアントシアニンの人工オペロンを構築し、大腸菌に導入したところ、アントシアニンの生産に成功した。これらの結果より、人工オペロンの設計指針を示すことに成功した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to elucidate how to design artificial polycistronic operon, especially in terms of gene order in the operon. We used carotenoid and anthocyanin biosynthetic pathway which don't exist in *Escherichia coli*.

As a result, we succeeded in construction of artificial carotenoid operon plasmid that is fully responsible for carotenoid production starting from glucose. We also succeeded in construction of artificial anthocyanin operon that is designed using information of optimal ration of responsible 4 enzymes by *in vitro* experiment. Through these case studies, we propose possible rule for construction of artificial operon.

研究分野：ゲノムデザイン学

キーワード：ゲノムデザイン 遺伝集積 オペロン 遺伝子発現制御 代謝工学

1. 研究開始当初の背景

生命活動は一次代謝経路 (= 基本代謝) および二次代謝経路 (= ヒトが利用できる生産物) に大別される。それぞれの経路はおおむね 10 を越える遺伝子で構成される。それぞれの代謝系を構成する遺伝子はゲノム中に経路ごとに整然と並んでいることは少なく、位置も方向もばらばらである。このばらばらな遺伝子群をひとまとめにして、それぞれの発現を最適化して別の適切な生産系に移植できれば、その応用展開は計り知れない。この方向性は、全く新しい遺伝子を組み合わせる合成生物学でのボトムアップ的アプローチである。

しかしながら現在の大腸菌を宿主とした遺伝子工学技術で同時に取り扱える遺伝子数はせいぜい数個にとどまっている。従って多数の遺伝子を効率よく集合させ実際に DNA として構築すること自体が困難であり、異なる宿主に経路ごと移植するのは至難の業である。しかし柘植らが独自に開発した枯草菌の遺伝子集積技術 OGAB 法 (引用文献、雑誌論文) はこのステップにブレイクをもたらした。

2. 研究の目的

OGAB 法を基盤技術として、細胞中 (in vivo) で実際に機能する人工遺伝子回路を合成生物学的観点でデザインする技術を発展させることを目的とした。特に、細胞中の代謝経路のような多因子の遺伝子が関与する複雑系において、各遺伝子の協調的な発現調節により定常的な代謝経路を機能させるための手法の確立を目標とした。具体的には大腸菌には本来存在しない代謝経路を対象に取り上げ、これらの代謝経路を構成する一連の遺伝子群を人工オペロン化し異種宿主細胞中で協調的に機能させるようにするための遺伝子の発現調節法の模索を行った。特に色素性化合物の (1) カロテノイド、(2) アントシアニンをアウトプットとしてモニターすることにより、その生産量の増大を指標に評価した。最終的に代謝経路の人工的な遺伝子回路のデザイン技術を確立めざした。

3. 研究の方法

代謝経路ごとに、バクテリアのゲノム中に良く見いだされる複数の遺伝子が 1 つの転写単位で転写されるポリシストロニックオペロン構造を人工的に設計するためにどのようにしたらよいかを検討した。特に、人工オペロン内で、遺伝子断片を、唯一のプロモーターの下流にどのような順序で連結すればよいかを調べるといった観点で行った。そのために、様々に単位遺伝子断片の連結順序を変更した人工オペロンを構築して、その機能性を評価した。これらの複雑な人工オペロンの構築については、枯草菌のプラスミド形質転換法で、一度に 50 個以上の DNA 断片が連結可能な OGAB 法により効率的に行った。

具体的な人工オペロンの題材については、その機能性の評価が容易な点から、大腸菌が本来生産しない色素性化合物の、(1) カロテノイドと、(2) アントシアニンを取り上げ、以下のように行った。

(1) カロテノイド

大腸菌はカロテノイドを生産しないが、その反応前駆体であるイソペンテニル 2 リン酸 (IPP) までの代謝経路は存在するため、これ以降のカロテノイド代謝経路の 5 つの遺伝子を大腸菌に導入することでカロテノイドの一種である、ゼアキサンチンを生産することが可能になる。一方、本来カロテノイドを生産しない大腸菌では、全ての代謝経路、具体的にはグルコースなどの炭素源から IPP に至るまでの解糖系と非メバロン酸経路が、カロテノイドの生産に最適化されているということはないので、これらの 2 つの代謝経路と、カロテノイド経路の 3 つの代謝経路に関わる一連の遺伝子群をカロテノイドの生産に適した形へのデザインを目指した。

まず、大腸菌の解糖系の各代謝経路の遺伝子を、文献データベースなどから選択した。複数のアイソザイム酵素が存在する代謝ステップについては、最も主要な働きをすると考えられる酵素遺伝子 1 つを選択する方法で、一連の代謝酵素遺伝子 10 個を選択した。これらの 10 個の単位遺伝子断片を、野生型の大腸菌中の対象遺伝子の mRNA 量を参考に、転写量の多い順に、ラムダファージ由来の Pr プロモーターに近くなるように OGAB 法を用いて連結した人工オペロン (mRNA 量順オペロン) を持つプラスミドを構築した。

構築した人工オペロンプラスミドを野生型の大腸菌に導入し、その後、大腸菌のゲノム DNA 中に存在するアイソザイムを含む全ての解糖系遺伝子を削除する方法により、ゲノム中の解糖系遺伝子が全くなく、プラスミド中の解糖系遺伝子により生存する大腸菌を構築した。

解糖系の遺伝子の連結順序を変更した人工オペロンについては、上述のゲノム中の解糖系遺伝子を全て削除した大腸菌の解糖系オペロンプラスミドを新しいオペロンと置換 (スワッピング) する方法により得た。

また、大腸菌ではなく、真核生物である出芽酵母の解糖系遺伝子についても、同様の方法により、11 個の一連の遺伝子群を選抜し、酵母人工解糖系オペロンを構築し、上述のゲノム中の解糖系遺伝子を全て削除した大腸菌の解糖系オペロンプラスミドとスワッピングすることにより得た。

非メバロン酸経路についても解糖系オペロンと同様に、代謝経路から 9 個の遺伝子を選択し、mRNA 量順オペロンを構築後、野生型の大腸菌に導入したのち、対応する反応ステップの全ての遺伝子を削除することにより行った。

大腸菌の非メバロン酸経路に対応する、酵

母のメバロン酸経路についても9個の一連の遺伝子群を選抜し、人工酵母メバロン酸経路オペロンを構築し、上述のゲノム中の非メバロン酸経路遺伝子を全て削除した大腸菌の人工非メバロン酸経路オペロンプラスミドと人工酵母メバロン酸経路オペロンプラスミドをスワッピングすることにより得た。

カロテノイドの人工オペロンについては、既に作成済みのものを利用した(引用文献)

これらのオペロンを連結して1つのプラスミドにする工程も OGAB 法により行った。得られたオペロンプラスミドをまず、ゲノム中の解糖系遺伝子を全て削除した大腸菌に導入後、非メバロン酸経路遺伝子群を完全に削除することにより行った。

(2) アントシアニン

アントシアニンは植物のみが合成し、一次代謝産物であるフェニルアラニンからアントシアニン的一种であるペラルゴニジンに至る経路には9段階の生合成ステップで合成される。途中の中間代謝物質としてナリングニンが知られているが、ナリングニンまでを生産する大腸菌は既に構築されており、ナリングニンを境として、前半と後半の代謝経路に分割して取り組んだ。

ナリングニンからペラルゴニジン-0-グリコシドまでの経路は、4つの酵素(F3H, DFR, LDOX, 3-GT)が必要であるがこれらの酵素の必要量比が不明なため、まずはこれを求めるために、シロイヌナズナから対応遺伝子をクローニングし、大腸菌でタンパク質を生産させ、これらを精製した。様々な量比で4つの酵素を *in vitro* 反応系に導入し、最終産物のペラルゴニジン-0-グリコシドと、その代謝ステップ手前の産物であるペラルゴニジンの生産量を調べた。

4. 研究成果

(1) カロテノイド

大腸菌遺伝子を用いた人工解糖系オペロンの遺伝子の連結順序の異なるオペロンを170種類以上構築し、ゲノム上の解糖系遺伝子群を全て削除した大腸菌に導入した。得られた大腸菌株を、グルコースを唯一の炭素源とする培地での比増殖速度を指標にオペロンの機能性を検証した。その結果、最初に構築した mRNA 量順の人工解糖系オペロンが野生株とほぼ同等の比増殖速度を示したのに対して、その他の配列のうち、mRNA 量順と近い順番で連結されている一部のものが、同じように野生株並みに増殖するという例外を除いて、概ね、野生株で mRNA 量が多い遺伝子がプロモーターから遠い場所に動くほどに増殖速度が遅くなる傾向が観察された。

この現象を詳細に調べるために、人工オペロンを持つ各大腸菌株の解糖系遺伝子の mRNA 量とタンパク質量を詳細に調べたところ、プロモーターから離れるにしたがって概

ね単調に減少することが確認され、また、mRNA とタンパク質量との間では、遺伝子の種類ごとにではあるが、ほぼ正比例することが判明した。また、mRNA 量順の人工解糖系オペロンを持つ大腸菌の解糖系タンパク質量は、他の人工解糖系オペロンのタンパク質量と比較して極めて野生株大腸菌の解糖系のタンパク質量に近い存在量を示し、野生型に近いタンパク質の発現量に制御すれば、野生型大腸菌と同じように機能させることが可能であることが判明した。

解糖系は、生物にとって広く普遍的な代謝経路であるため、大腸菌以外の遺伝子であっても、人工オペロンの知見を利用して、各酵素の発現量を最適化できれば大腸菌以外の遺伝子からなる解糖系を大腸菌中に再現可能であると考え、真核生物である酵母遺伝子による人工解糖系オペロンの構築を試みた。酵母内の各遺伝子の発現量を文献により調べたところ、対応する大腸菌遺伝子とほぼ同等の発現順位であったため、大腸菌の mRNA 量順と同様の遺伝子連結順序の酵母人工解糖系オペロンを OGAB 法により構築した。これをゲノム中の解糖系遺伝子を全て削除した大腸菌の解糖系オペロンプラスミドとスワッピングすることにより得て、グルコースを唯一の炭素源とした最少培地で増殖したところ、比増殖速度で野生株大腸菌の半分程度ではあったが、解糖系として機能することが判明し、人工オペロンの有効性を示すことに成功した。

次に、大腸菌の非メバロン酸経路の9遺伝子についても、mRNA 量順に遺伝子を連結した人工オペロンを構築し、これを用いて遺伝子削除を行った。しかしながらゲノム中の遺伝子のうち *dxr* 遺伝子については、mRNA 量順の人工オペロンを持ってゲノムから削除できなかったため、*dxr* 遺伝子の発現量が少ないためであると考え、mRNA 量順の8番目の位置にある *dxs* 遺伝子を先頭に移動することで発現量の増強を期待した mRNA 量順オペロンを作製したところ、こちらは全てのゲノム中の非メバロン酸経路遺伝子の除去を完了することができた。

このように作成したゲノム中の全ての非メバロン酸経路遺伝子を削除した大腸菌を用いて、途中経路は異なるが、最終代謝産物が同一となる、酵母のメバロン酸経路に変換するべく、解糖系と同様に酵母のメバロン酸経路についてオペロンを構築した。複数の人工オペロンの試行を経て、最終的に野生型の大腸菌とほぼ同等の機能性を示す、酵母人工メバロン酸経路オペロンを構築すること成功した。

大腸菌の人工解糖系オペロンと非メバロン酸人工オペロンと、人工カロテノイドオペロンを連結して、一連の代謝経路からなる人工オペロンプラスミドを構築して、その後対応するゲノム中の遺伝子を全て欠損した。グルコースを唯一の炭素源とした最少培地で

培養したところ、特にプラスミドの保持のための抗生物質などの選択圧を入れることなく培養しても、人工オペロンプラスミドが脱落することなく、ゼアキサンチンを生産した。

その後、大腸菌の遺伝子のオペロンを全て酵母の遺伝子のオペロンに置換することを試みた。しかしながら、酵母人工解糖系オペロンを有する人工オペロンプラスミドは増殖が非常に遅かったため、ゼアキサンチン生産用宿主としては、大腸菌人工解糖系オペロンと、酵母人工メバロン酸オペロン、人工カロテノイドオペロンを連結したオペロンプラスミドを持つ大腸菌を選択した。

大腸菌の非メバロン酸経路と、酵母のメバロン酸経路の最終代謝産物は IPP であるが、出発物質が異なっており、非メバロン酸経路では、ピルビン酸とグリセルアルデヒド 3 リン酸を用いるのに対して、メバロン酸はピルビン酸からさらに反応したアセチル CoA と異なっている。この時点で存在する大腸菌は、非メバロン酸経路を利用するにあたっては、ゲノム中の遺伝子を使うことなく、人工オペロンプラスミド中の遺伝子に頼ってゼアキサンチンを生産するが、メバロン酸経路を利用する場合は、宿主ゲノムのピルビン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子群を利用しているので、この遺伝子群についても、人工オペロンプラスミドに搭載し、その後、ゲノムから削除した。

得られた大腸菌は、ゲノム中のグルコースからアセチル CoA を経由して、IPP に至る一連の遺伝子群を欠損し、大腸菌解糖系オペロン、酵母メバロン酸経路オペロン、大腸菌メバロン酸デヒドロゲナーゼオペロン、カロテノイドオペロンの一連の 28 遺伝子からなる人工オペロンにより生育し、カロテノイドを生産した (図 1)。その生産量は過去の論文で知られる最大生産量に匹敵する 2mg/dcw-g 程度のゼアキサンチンを生産し、多数の遺伝子の発現量を協調的に制御することに成功した。

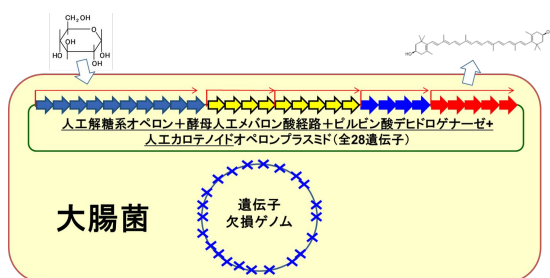


図 1 グルコースからゼアキサンチンまでの一連の代謝経路を人工オペロンプラスミドを持つ大腸菌

(2) アントシアニン

アントシアニンの生産に必要な、後半経路の遺伝子群のそれぞれの発現量のデータがなかったため、invitro 試験により、最適な酵素比率を求めることを行った。まずは、4

つの酵素 (F3H, DFR, LDOX, 3-GT) を精製し、人工オペロンでのプロモーターからの距離が遠くなるほどに発現量が減少する様子をまねるために、最も量の多い酵素のモル比率を 100% としたときに、2 番目以降の酵素のモル比が順次 80% となるように等比的に減少させる invitro 反応系 24 個を準備した。ここに基質となるナリンゲニンを加えて反応を行い、ペラルゴニジン - O - グリコシドとその一つ手前の色素のペラルゴニジンについて生産量を調べた。何れも、F3H, DFR, LDOX, 3-GT の順番に連結するものが最も生産量が多いことを確認した。

この結果を検討したところ、3-GT がなくとも色素のペラルゴニジンを生産することから、反応系を簡単にするために、3-GT を除いて、F3H, DFR, LDOX の順にプロモーターに連結した人工オペロンを構築し、これを発現誘導可能な大腸菌により遺伝子発現したところ、ペラルゴニジンの生産により菌ペレットをわずかに赤く染めることに初めて成功し、人工オペロンの有効性を示すことに成功した (図 2)。

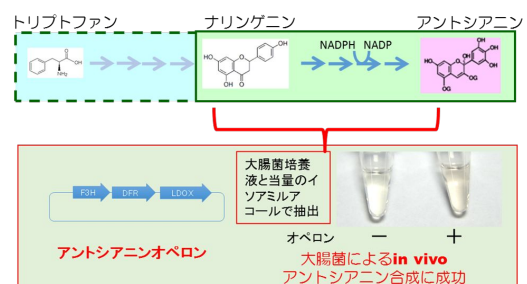


図 2 invitro 解析より得られた結果を元に構築したアントシアニンオペロンによるアントシアニン生産の確認

次に、ここで作成した人工オペロンを削らな作成した 5 遺伝子によりチロシンからナリンゲニンを生産する大腸菌 (引用文献) に導入したところ、ごく微量のペラルゴニジンを検出した。この低生産の理由を 3 種類のプラスミドが 1 つの大腸菌の中に共存することであると考え、これらの 3 つのプラスミドに分散している遺伝子 8 個を、OGAB 法により 1 つの人工オペロンプラスミドに集積したが、残念ながら、顕著なペラルゴニジンの生産は認められなかった。

<引用文献>

Tsuge, K., Matsui, K., and Itaya, M. One step assembly of multiple DNA fragments with a designed order and orientation in *Bacillus subtilis* plasmid. *Nucleic Acids Res.* 31, e133 (2003)

Nishizaki, T., Tsuge, K., Itaya, M., Doi, N., and Yanagawa, H. Metabolic engineering of carotenoid

biosynthesis in *Escherichia coli* by ordered gene assembly in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1355-1361 (2007)

Miyahisa, I., Kaneko, M., Funa, N., Kawasaki, H., Kojima, H., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S. Efficient production of (2S)-flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial biosynthetic gene cluster. *Appl. Microb. Biotech.*, 68, 498-504 (2005)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

柘植謙爾、板谷光泰 第二世代 OGAB 法が可能にした 50 個以上の DNA 断片集積バイオサイエンスとインダストリー 73, 471-475 (2015) 査読無
http://www.jba.or.jp/pc/archive/2015/vol73_no6_1.html

柘植謙爾、板谷光泰 枯草菌を用いた遺伝子集積法の OGAB 法による長鎖 DNA 合成 日本生物工学会誌 93, 527-529 (2015) 査読無

Tsuge, K., Sato, Y., Kobayashi, Y., Gondo, M., Hasebe, M., Togashi, T., Tomita, M., Itaya, M. Method of preparing an equimolar DNA mixture for one-step DNA assembly of over 50 fragments. *Scientific Reports*, 5, 10655 (2015) 査読有 doi: 10.1038/srep10655

Chen, S-K., Chin, W-C., Tsuge, K., Huang, C.C., Li, S-Y. Fermentation approach for enhancing 1-butanol production using engineered butanogenic *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*, 145, 204-209 (2013) 査読有 doi: 10.1016/j.biortech.2013.01.115

板谷光泰、柘植謙爾 長鎖 DNA の合成と合成生物学での活用 日本生物工学会誌 91, 319-321 (2013) 査読無

Hiroe, A., Tsuge, K., Nomura, C. T., Itaya, M., Tsuge, T. Rearrangement of gene order in the *phaCAB* operon leads to effective production of ultra-high-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] in genetically engineered *Escherichia*

coli. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 3177-3184 (2012) 査読有 doi: 10.1128/AEM.07715-11

柘植謙爾、板谷光泰 ゲノムビルダーおよびゲノムデザイナーとしての枯草菌 日本生物工学会誌 90, 280-283 (2012) 査読無

[学会発表](計 37 件)

柘植謙爾 “ゲノムデザインにおける合成生物学の現状” JBA「合成生物学セミナー」-最近の科学技術動向と合成生物学を取り巻く課題について 2015年3月5日 「鉄鋼会館(東京都中央区)」

柘植謙爾 “OGAB法を用いたボトムアップ型ゲノムデザイン戦略” 合成生物シンポジウム 2014年11月26日 「神戸大学(兵庫県神戸市)」

柘植謙爾 “Designing of metabolic pathway by operon strategy” For Innovative Biorefinery in Beijing 2013 2013年10月21日 「北京市(中国)」

柘植謙爾 “Construction of metabolic pathways that are comprised of multi-genes by operon strategy” CBI学会 2013年10月30日 「タワーホール船堀(東京都江東区)」

柘植謙爾 “合成生物学の手法による多要素からなる生物システムの再構築” 第85回日本生化学会大会 2012年12月16日 「福岡国際会議場(福岡県福岡市)」

柘植謙爾 “人工オペロンによるボトムアップ型ゲノムデザイン” 第3回新規材料創製を目指した合成生物学シンポジウム 2012年11月16日 「理化学研究所(埼玉県和光市)」

柘植謙爾 “Construction of metabolic pathway by artificial operon” The 5th International Conference on Industrial Bioprocesses (IFIB-2012) 2012年10月9日 「台北市(台湾)」

柘植謙爾 “Investigation of design rule for artificial operon toward whole genome design” 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS2012) 2012年9月17日 「大邱市(韓国)」

柘植謙爾 “オペロン戦略による代謝経路の構築” 第44回日本化学工学会秋

季大会 2012年9月20日「東北大学
(宮城県仙台市)」

柘植 謙爾 "Genome construction
technology and genome design" 14th
A-IMBN Annual Conference: Life
Science and Frontiers of Biorefinery
Technology、2012年3月1日「パトゥ
ムターニー(タイ)」

〔図書〕(計 4 件)

板谷光泰、金子真也、柘植謙爾 Chapter 4
Efficient and accurate production of
de novo designed large-size gene
clusters by a novel *Bacillus*
subtilis-based system. In *Microbial*
Production, Anazawa, H., and Shimizu,
S. eds. Springer 全 306 ページ
(pp.35-52)(2014)

板谷光泰、柘植謙爾 Chapter 9 Genome
integrity, instability and
construction In *Escherichia coli* and
Bacillus subtilis; the frontiers of
molecular microbiology revisited,
Sadaie, Y., and Matsumoto, K. eds.
Research Signpost 全 362 ページ
(pp.297-318)(2012)

柘植謙爾、板谷光泰 第1章ゲノムから
の視点「ゲノム再構築技術の応用と課
題：汎用性，迅速性，コスト」(pp1-9)
合成生物学の隆起 有用物質の新たな
生産法構築をめざして シー・エム・
シー出版 全 227 ページ(pp.1-9)(2012)

柘植謙爾(他共同執筆者多数)ひらく、
ひらく「バイオの世界」14歳からの生物
工学入門 日本生物工学会編 全 169 ペ
ージ (pp.146-147)(2012)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：単位 DNA 組成物の調製方法及び DNA 連
結体の作成方法

発明者：柘植謙爾、板谷光泰

権利者：高機能遺伝子デザイン技術研究組合

種類：特許出願

番号：PCT/JP2014/073579

出願年月日：平成 26 年 9 月 5 日

国内外の別： 国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.syn-biol.com/research/group03.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

柘植 謙爾 (TSUGE, Kenji)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特
任講師

研究者番号：70399690

(2)連携研究者

板谷 光泰 (ITAYA, Mitsuhiro)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・教
授

研究者番号：60374013

(3)研究協力者

吉積 毅 (YOSHIKUMI, Takeshi)