

令和元年6月10日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14881

研究課題名（和文）定常期における有用物質生産に向けた微生物の細胞増殖・代謝を制御する化合物の探索

研究課題名（英文）Screening of chemical compounds regulating microbial cell growth and metabolism toward bioproduction during stationary phase

研究代表者

平沢 敬（Hirasawa, Takashi）

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：20407125

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：微生物を用いた有用物質生産においては、微生物細胞の増殖に連動して目的物質を生産させる手法と、増殖と物質生産を切り分け細胞増殖が停止した定常期において目的物質を生産させる手法が主にとられている。定常期で目的物質を生産させる手法は、投入した炭素源や窒素源などの資源を効率よく目的物質生産に利用することができる技術として注目を浴びている。

本研究では、微生物細胞による定常期における有用物質生産技術の開発に向け、培養液に添加するだけで微生物細胞を定常期へと導き、かつ増殖が停止しても目的物質生産のための糖代謝活性を維持させることを可能にする化合物を探索する実験系の構築を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、微生物を用いた定常期における有用物質生産においては、窒素源や金属の枯渇などにより増殖が停止した定常期へと導き、目的物質を生産させる試みがなされてきた。しかしながら、培養の際に常に同じタイミングで窒素源や金属を枯渇させることはむずかしく、再現性よくかつ安価に定常期へと導く新たな技術が必要となる。

本研究は、培養液への化合物の添加のみで微生物細胞を人為的に定常期へと導きかつ有用物質生産を行える新たな技術の開発に向けた研究が展開できるようになると期待される。将来的には、探索した化合物が定常期へと導くメカニズムを明らかにすることができれば、微生物細胞増殖の人為的制御技術の開発にもつながる。

研究成果の概要（英文）：Bioproduction using microorganisms has been conducted by the method coupled with cell growth and that where production of target material(s) has occurred in the absence of cell growth during the stationary phase. Bioproduction during the stationary phase has been realized as one of the effective bioproduction processes in which the resources input, such as carbon and nitrogen sources, can be effectively utilized for only production of the target material(s). In this study, I have attempted to develop screening system of chemical compounds which can lead cell growth to the stationary phase and maintain metabolic activity in spite of suppressed cell growth toward bioproduction during stationary phase.

研究分野：応用微生物学、代謝工学

キーワード：微生物 有用物質生産 定常期 応用微生物 細胞増殖制御

1. 研究開始当初の背景

微生物を用いた有用物質生産においては、微生物細胞の増殖に連動して目的物質を生産させる手法と、増殖と物質生産を切り分け細胞増殖が停止した定常期において目的物質を生産させる手法が主にとられている。定常期で目的物質を生産させる手法は、投入した炭素源や窒素源などの資源を効率よく目的物質生産に利用することができる技術として注目を浴びている。

これまで、窒素源や金属の枯渇などにより細胞増殖を停止させ定常期へと導き、目的物質を生産させる試みがなされてきた (Chubukov and Sauer 2014 Appl. Environ. Microbiol.; Siaux et al. 2011 BMC Biotechnol.)。しかしながら、培養の際に常に同じタイミングで窒素源や金属を枯渇させることはむずかしく、再現性よくかつ安価に定常期へと導く新たな技術が必要となる。

2. 研究の目的

本研究では、微生物細胞による定常期における有用物質生産技術の開発に向け、培養液に添加するだけで微生物細胞を定常期へと導き、かつ増殖が停止しても目的物質生産のための糖代謝活性を維持させることを可能にする化合物を探索する実験系を構築する。そして、実際に化合物(既知化合物や放線菌由来未知天然化合物など)の探索を行う。

3. 研究の方法

① 糖代謝活性を維持しつつ定常期へと導く化合物の探索に向けた検定菌の構築

微生物細胞を定常期へと導き、かつ増殖が停止しても目的物質生産のための糖代謝活性を維持させる化合物の探索に向けて、探索に用いる検定菌を構築する必要がある。本研究では、糖代謝活性に連動して発現する遺伝子のプロモーターの下流に β -ガラクトシダーゼをコードする *lacZ* 遺伝子などのレポーター遺伝子を連結し、微生物細胞に導入することで構築した組換え株を検定菌として用いる。この組換え株に対して化合物を作用させた際に、増殖が停止しつつもレポーター遺伝子が発現していれば、定常期へと導かれた後も糖代謝活性が維持されていると考えられる。

そこで、Overlap extension PCR により大腸菌の解糖系の酵素のうち代謝流量の制御に重要となると考えられるものをコードする遺伝子 (*ptsG*・*pts operon*・*pfkA*・*gapA*・*eno*)のプロモーター配列に *lacZ* 遺伝子を連結させた遺伝子を構築し、In-fusion HD cloning kit (Takara Bio Inc.)を用いて大腸菌低コピープラスミド pMW118 (Nippon Gene Co., Ltd.)にクローニングした。そして、構築したプラスミドを大腸菌 MG1655 株に導入し、得られた組換え株を検定菌の候補とした。

② 糖代謝活性を維持しつつ定常期へと導く既知化合物の探索系の評価

定常期において糖代謝活性と連動して発現する糖代謝関連遺伝子のプロモーター配列の下流と *lacZ* 遺伝子を連結させた遺伝子断片を導入した組換え株を検定菌に用い、既知の抗生物質 (20 mg/mL カナマイシン・20 mg/mL クロラムフェニコール・10 mg/mL リファンピシリン・50 mg/mL ストレプトマイシン・50 mg/mL スペクチノマイシン)に対する挙動を評価した。

[探索方法の概要 (図 1)]

検定菌と β -ガラクトシダーゼの基質である X-gal を含む Lennox (L)寒天培地 (1% hipolypepton, 0.5% dried yeast extracts, 0.5% NaCl, 0.1% glucose, 1.5% agar)に化合物をしみこませたる紙をのせ、培養する。培養により検定菌は十分に定常期に達しているため、検定菌は X-gal の分解による青色の呈色を示すと考えられる。そして、化合物により増殖を定常期に導くということは増殖を低下させることを意味するので、ろ紙の周囲に検定菌の生育が低下するあるいは完全に生育していない生育阻止ゾーンが形成されているかどうかを判断する。また増殖が低下している状況下で糖代謝活性が持続されていることが条件であるため、生育阻止ゾーン内や周辺の検定菌が青色を呈しているかどうかを判断する。このように、ろ紙周辺に生育阻止ゾーンが見られ、かつ生育阻止ゾーン内や周辺の検定菌が

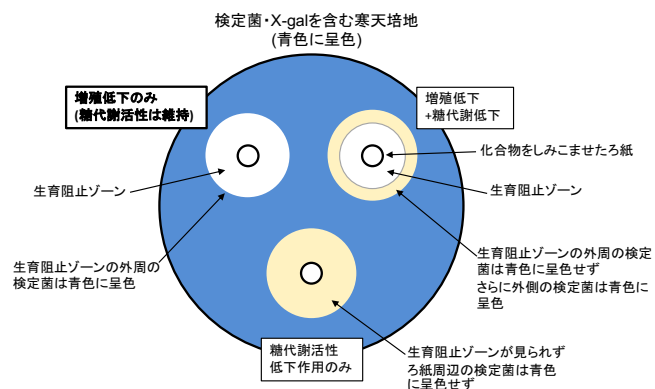


図1 微生物細胞の増殖を定常期へと導く化合物の探索系の概要

定常期において糖代謝活性と連動して発現する糖代謝関連遺伝子のプロモーター配列の下流に *lacZ* 遺伝子を連結させた遺伝子断片を導入した検定菌とし、X-galを含む寒天培地に化合物をしみこませたる紙をのせ、培養する。

青色を呈しているような化合物が探索すべき目的とする化合物となる。探索された化合物については、培養実験により実際に細胞を定常期へと導きさらに糖消費が持続することを別途確認する。

③ 糖代謝活性を維持しつつ定常期へと導く化合物の探索

②と同様の探索系により、放線菌が生産する未知化合物から細胞を定常期へと導く化合物の探索を試みた。放線菌が生産する未知化合物の探索に成功すれば、微生物細胞の増殖制御機構の解明につながると期待される。そのために、土壌中から分離したさまざまな放線菌を寒天培地で培養したものを、ストローを用いて円形にくりぬき、ろ紙の代わりに検定菌と β -ガラクトシダーゼの基質である X-gal を含む寒天培地にのせて培養した。そして、同様の判断基準で目的とする化合物を生産する放線菌の探索を試みた。

4. 研究成果

① 糖代謝活性を維持しつつ定常期へと導く化合物の探索に向けた検定菌の構築

大腸菌の解糖系の酵素のうち代謝流量の制御に重要となると考えられるものをコードする遺伝子 (*ptsG*・*pts operon*・*pfkA*・*gapA*・*eno*) のプロモーター配列に *lacZ* 遺伝子を連結させた遺伝子をクローニングした低コピープラスミドを構築した。そして、大腸菌の野生株 MG1655 に導入し、化合物探索のための検定菌の候補とした。

② 構築した検定菌の評価

構築した検定菌の候補株を用いることで、目的とする化合物を探索することができるのか評価するために、5つの既知の抗生物質 (カナマイシン・クロラムフェニコール・リファンピシン・ストレプトマイシン・スペクチノマイシン) について、上記の探索系により検定菌の評価を行った。その結果、いずれの検定菌候補株を用いた場合においても、円形ろ紙周辺の生育阻止ゾーンの外周に青色に呈色した検定菌のゾーンが存在していることが明らかとなった(図2)。カナマイシンやリファンピシンについては、円形ろ紙周辺の生育阻止ゾーンの外周に濃い青色に呈色した検定菌のゾーンが存在し、その外側に青色呈色のない黄白色に呈色した検定菌のゾーンが存在していた。

次に、大腸菌 MG1655 株を Lennox 液体培地にて培養し、各抗生物質を添加することにより増殖を停止させ、その後のグルコース消費を評価した。いずれの抗生物質による増殖停止後も、グルコースの消費が継続していることが確認され、検定菌の生育阻止と青色呈色を指標にした探索の結果とおおむね一致していた(図3)。しかしながら、現状では大腸菌の生育を阻害するような化合物であればどのようなものでも似たような挙動を示すことも予想されるため、検定菌そのものの改良(さらなるプロモーター配列の選抜やプラスミドの改変)や探索系の最適化(菌体接種量・培養時間など)が必要であると思われる。

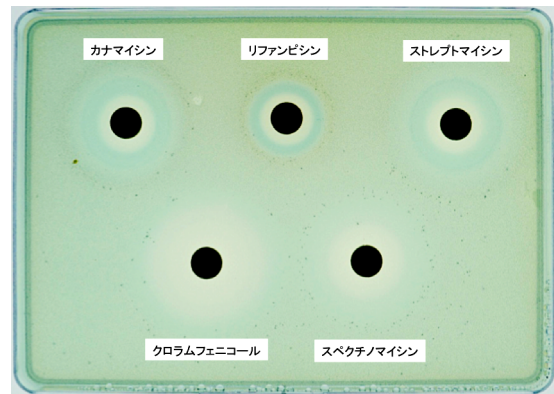


図2 既知抗生物質を用いた検定菌候補株の評価

gapA プロモーターと *lacZ* 遺伝子を連結させた遺伝子を持つ大腸菌組換え株を用いて、既知の抗生物質の影響を観察した例を示す。他の検定菌候補株においても似たような挙動が観察された。

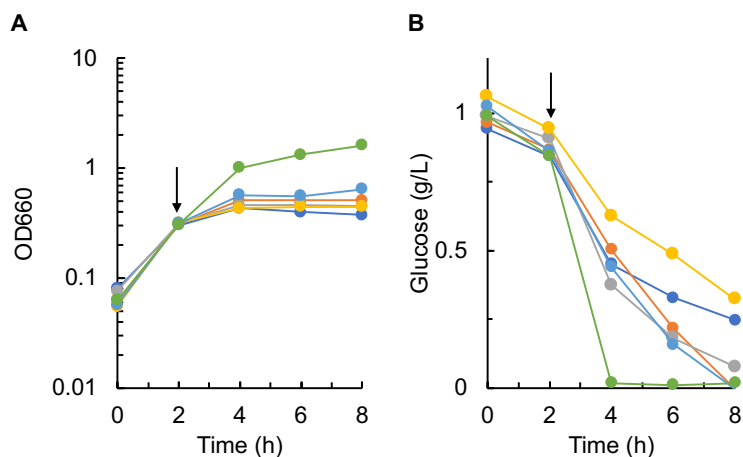


図3 大腸菌の生育 (A)とグルコース消費 (B)に対する抗生物質の影響

Lennox 液体培地にて大腸菌 MG1655 を培養し、培養開始から2時間(矢印の時点)でカナマイシン (40 μ g/mL、●)、リファンピシン (40 μ g/mL、●)、ストレプトマイシン (50 μ g/mL、●)、クロラムフェニコール (20 μ g/mL、●)、スペクチノマイシン (50 μ g/mL、●) となるように添加した。そして、生育 (OD600)とグルコース消費を測定した。なお、●は抗生物質を添加していないコントロールである。

③ 糖代謝活性を維持しつつ定常期へと導く化合物の探索

①・②により構築・評価した検定菌の候補株を用いて、現在放線菌が生産する未知化合物から細胞を定常期へと導く化合物の探索を試みている。放線菌は、各種土壌サンプルから分離したものを使用している。現時点では、目的とするような化合物を生産すると予想される放線菌の特定には至っていない。今後、探索を継続する計画である。

④ 今後の展望

構築した組換え株を用いた探索系は、現状では大腸菌の生育を阻害するような化合物であればどのようなものでも陽性と評価してしまう可能性が排除できない。今後は、探索系の改良・最適化を行い、実際の化合物の探索を試みる。

本研究は当初、大腸菌のみならず、アミノ酸生産菌として知られるコリネ型細菌やタンパク質などの生産に用いられる枯草菌も対象とした探索系の構築も計画していたが、それを行うには至らなかった。今後は、大腸菌以外の微生物を用いた探索系の拡張も検討していきたいと考えている。

また本研究は、培養液への化合物の添加のみで微生物細胞を人為的に定常期へと導きかつ有用物質生産を行える新たな技術の開発に向けた研究へと展開することができる。将来的に、探索した化合物について、定常期へと導くメカニズムを明らかにすることができれば、化合物添加によらずに遺伝子やタンパク質の発現制御による微生物細胞増殖の人為的制御技術の開発も期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

- ① Kazuki Kawai, Yu Kanesaki, Hirofumi Yoshikawa, Takashi Hirasawa (2019) Identification of metabolic engineering targets for improving glycerol assimilation ability in *Saccharomyces cerevisiae* based on adaptive laboratory evolution and transcriptome analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering* (In press) 査読有
- ② Mariko Kondoh, Takashi Hirasawa (2019) L-Cysteine production by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103:2609-2619. 査読有
- ③ Takashi Hirasawa, Masaki Saito, Katsunori Yoshikawa, Chikara Furusawa, Hiroshi Shimizu (2018) Integrated analysis of the transcriptome and metabolome of *Corynebacterium glutamicum* during penicillin-induced glutamic acid production. *Biotechnology Journal* 13:e1700612. 査読有
- ④ Takashi Hirasawa, Hiroshi Shimizu (2016) Recent advances in amino acid production by microbial cells. *Current Opinion in Biotechnology* 42:133-146. 査読有

〔学会発表〕(計17件)

- ① 平沢 敬 コリネ型細菌によるグルタミン酸発酵～メカニズムを理解し応用する 日本生物工学会代謝工学研究部会第5回シンポジウム 2019年
- ② 松久和歩, 平沢 敬 実験室進化によるコリネ型細菌のシステイン耐性株の取得と解析 第13回日本ゲノム微生物学会年会 2019年
- ③ 落合貴子, 平沢 敬 コリネ型細菌によるグルタミン酸生産におけるピオチン関連因子の関与 2018年度グラム陽性菌ゲノム機能会議 2018年
- ④ 平沢 敬 銅添加によるコリネ型細菌のグルタミン酸生産誘導 平成30年度遺伝研研究会「微生物生態から見えてくる新しい生理機能とその応用」 2018年
- ⑤ 矢島宙岳, 平沢 敬 大腸菌によるメタノール資化に向けた *Bacillus* 属細菌由来メタノール資化代謝経路の実装 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017年
- ⑥ 平沢 敬 微生物の代謝工学:人工進化実験を有用宿主創製に活用する 平成29年度遺伝研研究会「細菌の構造と代謝の根幹解析研究会～大規模ゲノム交換による微生物育種～」 2017年
- ⑦ 岸野真弓, 近藤麻梨子, 松久和歩, 平沢 敬 コリネ型細菌におけるシステイン排出系の探索 第69回日本生物工学会大会 2017年
- ⑧ 尾形駿介, 平沢 敬 *Corynebacterium glutamicum* における銅 (II) 添加によるグルタミン酸生産機構の解明 第69回日本生物工学会大会 2017年
- ⑨ 湯澤太路, 河合一輝, 白井智量, 近藤昭彦, 平沢 敬 長期継代培養によりグリセロール資化能を獲得した出芽酵母の代謝フラックス解析 第69回日本生物工学会大会 2017年
- ⑩ 河合一輝, 兼崎 友, 吉川博文, 平沢 敬 長期間の継代培養を基盤とした出芽酵母へのグリセロール資化能の賦与 第69回日本生物工学会大会 2017年
- ⑪ 矢島宙岳, 平沢 敬 *Bacillus* 属細菌由来メタノール資化代謝経路の構築と大腸菌への実装 2017年度グラム陽性菌ゲノム機能会議 2017年
- ⑫ Mariko Kondoh, Takashi Hirasawa Effect of disruption of cystine uptake protein homologs on cysteine production in *Corynebacterium glutamicum*. *International Union of Microbiological Societies (IUMS2017)* 2017
- ⑬ Takashi Hirasawa, Kazuki Kawai Adaptive laboratory evolution for creating glycerol-assimilating

strains of *Saccharomyces cerevisiae*. International Union of Microbiological Societies (IUMS2017) 2017年

- ⑭ 近藤麻梨子、平沢 敬 コリネ型細菌のシステイン生産におけるシスチン取り込みタンパク質ホモログ欠損の効果 日本農芸化学会 2017年度大会 2017年
- ⑮ 近藤麻梨子、平沢 敬 コリネ型細菌によるシステイン発酵生産に向けたシスチン取り込みタンパク質ホモログの探索 第11回日本ゲノム微生物学会年会 2017年
- ⑯ 尾形駿介、齊藤正輝、吉川勝徳、古澤 力、清水 浩、平沢 敬 *Corynebacterium glutamicum* によるグルタミン酸生産に対するストレスの影響 第68回日本生物工学会大会 2016年
- ⑰ 岸野真弓、平沢 敬 コリネ型細菌のシステイン排出に関する因子の同定 2016年度グラム陽性菌ゲノム機能会議 2016年

〔図書〕(計3件)

- ① Hiroshi Shimizu, Chikara Furusawa, Takashi Hirasawa, Katsunori Yoshikawa, Yoshihiro Toya, Tomokazu Shirai, Fumio Matsuda (2017) Omics-integrated approach for metabolic state analysis of microbial processes. In Applied Bioengineering. Volume 5, Innovations and Future Directions. Toshiomi Yoshida (ed), Wiley. pp. 213-236.
- ② Takashi Hirasawa, Masaaki Wachi (2017) Glutamate fermentation-2: mechanism of L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. In Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Volume 159. Amino Acid Fermentation. Atsushi Yokota and Masato Ikeda (eds), Springer. pp. 57-72.
- ③ Takashi Hirasawa, Hiroshi Shimizu (2016) Glutamic acid fermentation: Discovery of glutamic acid-producing microorganisms, analysis of the production mechanism, metabolic engineering, and industrial production process. In Industrial Biotechnology: Products and Processes. Christoph Wittmann and James C. Liao (eds), Wiley. pp. 339-360.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hirasawa-lab.bio.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号 (8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：和地 正明
ローマ字氏名：(WACHI Masaaki)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。