

令和元年6月14日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18677

研究課題名（和文）合成代謝経路の構築による“非天然型”短鎖脂肪酸生産技術の開発

研究課題名（英文）Development of a technology for the production of an unnatural short-chain fatty acid by constructing a synthetic metabolic pathway

研究代表者

片岡 尚也 (Kataoka, Naoya)

山口大学・大学院創成科学研究科 ・助教

研究者番号：50713509

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：基質特異性の低い大腸菌内在性チオエステラーゼを活用することで、これまで微好気又は嫌気条件下での生産に限定されていた酪酸生産を好気培養条件下で可能にする合成代謝経路を大腸菌内で構築した。加えて、これまでに構築した1,3-ブタンジオール合成代謝経路を改変することで、グルコース及びプロピオン酸、イソ酪酸又はグリコール酸混合物から1,3-ペンタンジオール、4-メチル-1,3-ペンタンジオール、1,2,4-ブタントリオールをそれぞれ生成可能な1,3-ジオール類プラットフォーム経路を大腸菌内で構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、代表的な再生可能資源であるグルコースを原料に酪酸及び1,3-ジオール類の生産に成功した。これは、再生可能資源から有価物を生産する点で、持続可能な社会形成に貢献するものと考えられる。加えて、本研究で生成に成功した1,3-ペンタンジオール、4-メチル-1,3-ペンタンジオールの発酵生産はこれまで報告例がなく、学術的にも高い意義を持つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Synthetic pathway for butyrate production under aerobic growth conditions were constructed in *Escherichia coli* by utilizing the inherent thioesterase(s). Additionally, to widen the diversity of chemical compounds produced by microbial conversion, a platform synthetic pathway for the production of widely used industrial chemicals, 1,3-diols, was engineered in *E. coli*. The engineered *E. coli* strains produced 1,3-pentanediol, 4-methyl-1,3-pentanediol, and 1,2,4-butanetriol from mixtures of glucose and propionate, isobutyrate, and glycolate, respectively.

研究分野：微生物代謝

キーワード：大腸菌 合成代謝経路 1,3-ブタンジオール 1,3-ジオール類 プロピオン酸-CoA転移酵素 酪酸 グリセロール 再生可能資源

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

原油や天然ガスは、輸送原料や各種化学物質・先端材料などの有用物質を製造する際の主要原料及びプロセス運転のエネルギー供給源として用いられている。しかし、近年の環境問題や化石燃料価格に対する関心の高まりから、植物原料などの再生可能資源の利用、低エネルギーかつ温室効果ガス排出量削減を可能にする持続可能なプロセス開発に注目が集まっている。生物機能を活用する代謝工学は、この必要性に取り組む上で効果的なアプローチである。

これまで主に、遺伝子組換えが容易、ゲノム情報が完備、代謝経路がよく知られている、増殖速度が速い、という特徴を持つ大腸菌を宿主として育種することで、様々な化合物の生産が報告されてきた。しかしその多くが“天然化合物”を対象としていた。バイオプロダクションの実用可能性を広げるには“非天然化合物”を生産する新たな技術の開発が求められるが、ここでは、新規代謝経路の設計とその機能的な構築が必要となる。こういった背景のもと我々は、“非天然化合物” 1,3-ブタンジオールを標的とし、ポリヒドロキシ酪酸生産菌 *Ralstonia eutropha* 由来 PhaAB 及びブタノール発酵細菌 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* 由来 Bld を組み合わせることで 1,3-ブタンジオール合成代謝経路を設計、大腸菌内で機能的に発現させることでグルコースから 1,3-ブタンジオールを生成可能であることを示した。この時、副産物として 3-ヒドロキシ酪酸の蓄積が観察され、これは、これまでに報告されている基質特異性の低い大腸菌に内在するチオエステラーゼにより、中間体である 3-ヒドロキシブチリル CoA が加水分解を受けた結果であると推測された。

2. 研究の目的

前述の背景を受け本研究では、大腸菌内在性チオエステラーゼの基質特異性の低さを活用し、有機酸への CoA 転移酵素を鍵反応とする短鎖脂肪酸を生産し得る合成代謝経路を大腸菌を宿主に構築することで、再生可能資源から抗生物質やポリマー原料としての用途を持つ有価物 3,5-ジヒドロキシペンタン酸の効率的生産プロセスを開発することを最終目的に設定した。目的達成に向けて、研究期間中に以下の実験を行った。

(1) 代謝改変した大腸菌による好気培養条件での酪酸生産

我々の研究グループでは、前述の 1,3-ブタンジオール合成代謝経路を拡張することで、好氣的に 1-ブタノールを生成可能な合成代謝経路の大腸菌内での構築を報告した。この時、少量の酪酸が蓄積していた。これは、これまでに述べたように基質特異性の低い大腸菌内在性チオエステラーゼの働きによるものと予測された。酪酸は、食品香料やプラスチックの原料といった用途を持つ産業的に広く利用されている直鎖脂肪酸であり、生物学的には *Clostridium* 属細菌や代謝改変された大腸菌による生産報告が存在する。しかし、その多くが酸素供給を絞った微好気及び嫌気培養条件でのもので、好気培養条件での報告例はほとんど存在しなかった。そこで好気培養条件における酪酸生成及びその生産性の評価を目的に研究を行った。

(2) 大腸菌による 1,3-ジオール類の生産

本研究の目的達成に最重要となる反応は、有機酸を CoA 誘導体に活性化させる CoA 転移酵素により触媒される反応である。そこで、前述の 1,3-ブタンジオール合成代謝経路を基盤に有機酸とグルコースを出発基質に CoA 転移酵素を活用する 1,3-ジオール類を生産し得る合成代謝経路を大腸菌内で機能的に構築可能であるかを目的に研究を行った。

(3) 大腸菌による 3,5-ジヒドロキシペンタン酸の生産

(2) での結果を受けて、大腸菌内で機能的に発現可能な CoA 転移酵素を活用して、グルコース及びグリセロールを出発基質に本研究の最終目的物である 3,5-ジヒドロキシペンタン酸の生成を目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 代謝改変した大腸菌による好気培養条件での酪酸生産

我々が構築した 1-ブタノール合成代謝経路は、アセチル CoA を重要中間体に *R. eutropha* 由来 PhaAB, *Aeromonas caviae* 由来 PhaJ, *Treponema denticola* 由来 Ter, *C. saccharoperbutylacetonicum* 由来 Bld 及び内在性アルコール脱水素酵素で構成されていた。酪酸はブチリル CoA にチオエステラーゼが作用したことにより生成したと予想されたため、ブチリル CoA までを供給可能である合成代謝経路を大腸菌内で構築するとともに、酸素供給、pH、窒素源濃度の影響を検証することでグルコースからの酪酸生産を評価した。

(2) 大腸菌による 1,3-ジオール類の生産

我々が構築した 1,3-ブタンジオール合成代謝経路を基盤に、① 有機酸の CoA 誘導体化を触媒する *Megasphaera elsdenii* 由来 Pct の付加、② PhaA の幅広いアシル CoA への活性を有する *R. eutropha* 由来 BktB への変換、の改変を施すことにより 1,3-ジオール類プラットフォーム経路を設計、大腸菌内で機能的に発現させた。得られた組換え株をグルコース及びプロピオン酸又はイソ酪酸、グリコール酸の混合物を出発基質に好氣的に培養した。

(3) 大腸菌による 3,5-ジヒドロキシペンタン酸の生産

(2) で構築した 1,3-ジオール類プラットフォーム経路から、修飾アシル CoA のアルコールへの還元の前駆酵素である Bld を除いた遺伝子群 (*pct*, *bktB*, *phaB*) を発現させた組換え大腸菌を作製し、Pct の本来の基質であるプロピオン酸とグルコースからの 3-ヒドロキシペンタン酸生産を検討した。次いで、目的化合物である 3,5-ジヒドロキシペンタン酸生成に必要な 3-ヒドロキシプロピオン酸をグリセロールから誘導する *Klebsiella pneumoniae* 由来の代謝経路を構成する遺伝子群 (*dhaB123*, *gdrAB*, *aldH*) を大腸菌内で機能的に発現させ、グリセロールの 3-ヒドロキシプロピオン酸への変換が可能であることを確認した。また、グリセロールから直接 3-ヒドロキシプロピオニル CoA へと誘導可能な *K. pneumoniae* 由来代謝経路 (*DhaB123*, *GdrAB*, *PduP* により構成) を持つ大腸菌を作製し、3-ヒドロキシプロピオン酸代謝経路を持つ組換え大腸菌と共にグルコース及びグリセロール混合物からの 3,5-ジヒドロキシペンタン酸の生成を試みた。

4. 研究成果

(1) 代謝改変した大腸菌による好気培養条件での酪酸生産

グルコースがアセチル CoA を経てブチリル CoA へと代謝されるよう、*phaAB*, *phaJ*, *ter* を IPTG 誘導型プロモーターの支配下に配置した発現用プラスミドを構築し、大腸菌 BW25113 F' (F' は *lacP* の付与に用いている) に付与した。得られた組換え大腸菌を 222 mM のグルコースを出発基質にフラスコを用いて 30°C で好氣的に培養したところ、24 時間の培養で 24.4 mM の酪酸が生成した。これは、酪酸合成代謝経路が大腸菌内で機能的に構築されていること、内在性チオエステラーゼはブチリル CoA の加水分解を触媒すること、を示していた。本経路での酪酸生産の場合、酪酸はアセチル CoA から二つの還元反応を経ることで生成される。そのため、培地への酸素供給が酸化還元状態の観点から酪酸生産における重要な因子の一つであると考えられた。加えて、有機酸の生成は pH に大きく影響されること、窒素源濃度の低下により有機酸発酵が促進されること、が報告されていた。そこで、酪酸生産時における酸素濃度、pH、無機窒素源濃度を最適化することで生産の効率化を検討した。その結果、培養を通しての溶存酸素量を 4 ppm 以上に保ち、pH を 7.0、2 g/L の塩化アンモニウムを無機窒素源に用いた回分培養を行った際に、最大収量 85.7 mM の酪酸を生産した。さらに最適化した培養条件での流加培養を行った結果、54 時間の培養で 140 mM の酪酸を生産した。

(2) 大腸菌による 1,3-ジオール類の生産

pct, *bktB*, *phaB*, *bld* を IPTG 誘導型プロモーターの支配下に配置した発現用プラスミドを構築し、大腸菌 BW25113 F' に付与した。まず初めに Pct の本来の基質であるプロピオン酸とグルコースから生成される 1,3-ペンタンジオールの生産を試みた。組換え大腸菌をグルコースとプロピオン酸を出発基質とした培地で好氣的に培養した。グルコース (111 mM) 及びプロピオン酸 (20 mM) は同時に消費され、48 時間の培養で完全に枯渇した。その間に、4.43 mM の 1,3-ペンタンジオールが生成した。この結果は、設計した 1,3-ジオール類プラットフォーム経路が大腸菌内で機能的に発現され、1,3-ジオールの生産に利用できることを示していた。次いで、本プラットフォーム経路の汎用性を実証するべく、プロピオン酸の代わりに代表的な分岐鎖及びヒドロキシル基を持つ有機酸であるイソ酪酸 (20 mM) 又はグリコール酸 (40 mM、この時のグルコース濃度は 56 mM) を基質に用いて生産を行った。その結果、48 時間の培養で 702 μ M の 4-メチル-1,3-ペンタンジオール、36.5 μ M の 1,2,4-ブタントリオールをそれぞれ生成した。これらの結果は、新たに設計・構築した 1,3-ジオール類プラットフォーム経路が様々な化学骨格を有する 1,3-ジオール類の生産に活用できることを示していた。

(3) 大腸菌による 3,5-ジヒドロキシペンタン酸の生産

pct, *bktB*, *phaB* を IPTG 誘導型プロモーターの支配下に配置した発現用プラスミドを構築し、大腸菌 MG1655 F' に付与した。得られた組換え大腸菌をプロピオン酸およびグルコース混合物を出発基質とした培地で好氣的に培養した。その結果、目的産物である 3-ヒドロキシペンタン酸の生成を確認した。この結果は、設計した短鎖脂肪酸類プラットフォーム経路が大腸菌内で機能的に発現され、短鎖脂肪酸の生産に利用できることを示していた。次いで、本研究の目的化合物 3,5-ジヒドロキシペンタン酸の生産に本プラットフォーム経路が活用できるかを調べるべく、3-ヒドロキシプロピオン酸及びグルコース混合物を出発基質とした培地で好氣的に培養を行った。しかし、目的化合物の生成は確認できなかった。そこで、外的に 3-ヒドロキシプロピオン酸を添加する方法ではなく、細胞内でグリセロールを変換し 3-ヒドロキシプロピオン酸を供給する方法を試みることにした。その第一段階として、グリセロールの 3-ヒドロキシプロピオン酸への変換を検討した。*dhaB123*, *gdrAB*, *aldH* を IPTG 誘導型プロモーターの支配下に配置した発現用プラスミドを構築し、大腸菌 MG1655 F' に付与した。得られた組換え大腸菌をグリセロールを出発基質とした培地で好氣的に培養を行った。その結果、3-ヒドロキシプロピオン酸の生成が確認された。この結果を受けて、本 3-ヒドロキシプロピオン酸生産経路と短鎖脂肪酸類プラットフォーム経路を両方保有する組換え大腸菌を作製し、グリセロール及びグルコースを出発基質とする培地で好氣的に培養を行ったが、ここでも目的化合物の生成は確認できなかった。グリセロール及びグルコースからの 3,5-ジヒドロキシペンタン酸の生成には、グリセロー

ルが 3-ヒドロキシプロピオニル CoA へと活性化される必要がある。ここまで、グリセロールからの 3-ヒドロキシプロピオニル CoA 供給を, Pct により触媒される 3-ヒドロキシプロピオン酸を中間体に用いる代謝経路を用いていた。Pct の本来の基質はプロピオン酸であるため, 3-ヒドロキシプロピオン酸に対する活性が不十分であり, 結果として目的化合物である 3,5-ジヒドロキシペンタン酸を生成することが出来なかった可能性が考えられたため, グリセロールから 3-ヒドロキシプロピオン酸を経由せず 3-ヒドロキシプロピオニル CoA を供給可能である代謝経路 (DhaB123, GdrAB, PduP で構成) の構成遺伝子群及び *bktB*, *phaB* を IPTG 誘導型プロモーターの支配下に配置した発現用プラスミドを構築し, 大腸菌 MG1655 F' に付与した。得られた組換え大腸菌をこれまでと同様にグリセロール及びグルコース混合物を出発基質とする培地で好氣的に培養した結果, 目的化合物ではなく, 3-ヒドロキシプロピオン酸が生成していた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① [Kataoka N](#), Vangnai AS, Pongtharangkul T, Yakushi T, Matsushita K.
Production of 1,3-diols in *Escherichia coli*.
Bioresour. Technol., 査読有, 245(Pt B): 1538-1541. (2017).
doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.082.
- ② [Kataoka N](#), Vangnai AS, Pongtharangkul T, Yakushi T, Matsushita K.
Butyrate production under aerobic growth conditions by engineered *Escherichia coli*.
J. Biosci. Bioeng., 査読有, 123(5): 562-568. (2017).
doi: 10.1016/j.jbiosc.2016.12.008.

[学会発表] (計 3 件)

- ① [片岡 尚也](#), Alisa S. Vangnai, 薬師 寿治, 松下 一信.
大腸菌による 1,3-ジオール類の生産.
第 69 回日本生物工学会大会, 2017 年 9 月.
- ② [片岡 尚也](#).
代謝改変した大腸菌での “非天然化合物” 1,3-ブタンジオールの生産.
日本農芸化学会中四国支部第 47 回講演会, 2017 年 1 月.
- ③ [片岡 尚也](#), Alisa S. Vangnai, 薬師 寿治, 松下 一信.
代謝改変した大腸菌による好気培養条件での酪酸生産.
第 68 回日本生物工学会大会, 2016 年 9 月.