

令和 2 年 7 月 15 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07726

研究課題名(和文)ものつくりを指向した大腸菌宿主の開発とタンパク質の高生産メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanistic analysis of high-yield protein production in *E. coli* for the production of natural products

研究代表者

鮎 信学 (FUba, Nobutaka)

静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授

研究者番号：70361574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌の脂肪酸合成酵素を破壊した結果、細胞内のmalonyl-CoA、acetyl-CoA量が親株と比較して増加した。本破壊株にポリケタイド(malonyl-CoAを原料とする)の合成酵素を発現させたところ、ポリケタイドの生産量が顕著に増加した。以上より、脂肪酸合成酵素の破壊株は、ポリケタイドの生産に適した宿主であることが分かった。興味深いことに、脂肪酸合成酵素の破壊株では、FadR(脂肪酸合成の制御因子)の転写量が増加していた。これは、FadRレギュロンを介した脂肪酸生合成のフィードバック制御により、malonyl-CoA、acetyl-CoA量の増加が起こったことを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物には一つの代謝経路が遮断されても、別の経路が活性化することにより物質を作り出すロバスト性がある。本研究では、大腸菌*E. coli*において、生命維持に必須な脂肪酸合成経路の遺伝子を破壊することにより、中枢代謝経路の亢進および抑制を誘発した。脂肪酸合成経路の破壊株ではmalonyl-CoAおよびacetyl-CoA(二次代謝産物の前駆体)の過剰蓄積が起こる。我々は、脂肪酸合成経路の破壊株で如何なる代謝経路が亢進または抑制させるのかを解明し、何故malonyl-CoAが蓄積するのかを解明した。本研究課題は、植物二次代謝産物を効率良く大腸菌で生産させるための宿主改良の基盤となる。

研究成果の概要(英文)：The fatty acid biosynthetic pathway was blocked by gene disruptions of *fabF*, *fabB*, and *fabH*, KS enzymes that resume the intracellular malonyl-CoA to elongate the fatty acyl intermediates. As a result, the intracellular malonyl-CoA level was greatly increased in the *fab* knockout strains. Overexpression of *RppA* in *fab* knockout strains resulted in the enhanced production of polyketides, indicating that these strains would be useful for the production of important natural products where the intracellular malonyl-CoA level is the rate-limiting factor. Interestingly, the transcriptional level of *fadR*, a transcriptional regulation of the fatty acid biosynthesis and metabolism, was increased compared to the parent strain, suggesting that the inherent negative feedback system accompanied with fatty acid biosynthesis was alleviated. Surprisingly, the intracellular level of acetyl-CoA was also increased, suggesting the existence of an unprecedented feedback regulation system.

研究分野：応用微生物学

キーワード：大腸菌 malonyl-CoA 二次代謝産物

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

天然有機化合物は多様な生理活性を示すが、未開拓「生物資源」の減少に伴い、新規な天然有機化合物の発見数は減少している。我々は以前、イネゲノムのゲノム情報解析により（このような研究をゲノムマイニングと呼ぶ）、新規酵素、クルクミノイド合成酵素を発見した。また、コンビナトリアル合成により非天然型の curcumin 誘導体の大腸菌による生産に成功している。このように未利用「遺伝子資源」を活用することで、新規な天然有機化合物が創生できる。

天然有機化合物の微生物生産は脚光を浴びている。例えば、抗マラリア剤 Artemisinin の前駆体の酵母生産 (Nature 496, 528-32 (2013))、疼痛緩和剤 Morphine の前駆体の酵母生産 (Science 349, 1095-100 (2015))、抗がん剤 Taxol の前駆体の大腸菌生産 (Ajikumar et al. Science 330, 70-4 (2010)) などである。我々は、これらのケースにおいて、acetyl-CoA などの一次代謝産物の代謝流量を改善することで、更に収量を上げることができると考えている。ポリケタイドは酢酸を構成単位とする天然有機化合物であり、前駆体は malonyl-CoA である。テルペノイドはイソプレンを構成単位とし、前駆体は acetyl-CoA である。つまり、ポリケタイドやテルペノイドの微生物発酵では、acetyl-CoA や malonyl-CoA が十分に供給されなければならない。ところが、大腸菌において malonyl-CoA の生合成は脂肪酸合成経路と共に厳格に制御されており (Magnuson et al. Microbiol. Rev. 57, 522-542 (1993))、malonyl-CoA の濃度は低く抑えられている (Takamura & Nomura J. Gen. Microbiol. 134, 2249-2253 (1988))。

2. 研究の目的

微生物には一つの代謝経路が遮断されても、別の経路が活性化することにより物質を作り出すロバスト性がある。本研究では、大腸菌 *E. coli* において、生命維持に必要な脂肪酸合成経路の遺伝子を破壊することにより、中枢代謝経路の亢進および抑制を誘発する。脂肪酸合成経路の破壊株では malonyl-CoA および acetyl-CoA (二次代謝産物の前駆体) の過剰蓄積が起こる。我々は、脂肪酸合成経路の破壊株で如何なる代謝経路が亢進または抑制させるのかを解明し、何故 malonyl-CoA が蓄積するのかを解明する。本研究課題は、植物二次代謝産物を効率良く大腸菌で生産させるための宿主改良の基盤となる。

3. 研究の方法

(1) 破壊すると中枢代謝経路の亢進および抑制させる遺伝子のスクリーニング

大腸菌の Keio collection (*E. coli* K-12 株を親株とした 3,985 種類の非必須遺伝子の単一遺伝子欠損株コレクション) に III 型ポリケタイド合成酵素 RppA (malonyl-CoA を赤色色素 flaviolin に変換する。flaviolin を定量することで化合物の生産能を簡便に評価できる) の発現プラスミドを形質転換し、flaviolin 生産能の増強に関与する遺伝子を約 4000 株からスクリーニングした。

(2) スクリーニング陽性株の ATP、malonyl-CoA の定量

上記 (1) のスクリーニングの陽性株で flaviolin の生産量が増えた理由は、次のア～ウ) が考えられる。

ア) malonyl-CoA の代謝流量が増強された。

イ) 細胞内 ATP などの発酵エネルギーが上昇した。

ウ) プラスミド、mRNA、蛋白の安定性が向上し、RppA 量が増えた。

我々は、BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay (Promega 社) を用い ATP 量を、LC-tripleQ MS (Thermo 社) を用い、malonyl-CoA の定量を行った。ウ) の可能性については、SDS-PAGE によりその可能性を評価した。

(3) 脂肪酸合成酵素 (FAS) の破壊株の取得と acetyl-CoA、malonyl-CoA、flaviolin 量の定量

上記 (2) の結果、FAS 破壊株では acetyl-CoA、malonyl-CoA 量が増加しており、中枢代謝経路が活性化されている可能性が示唆された。そこで、大腸菌 *E. coli* BL21 株の FAS 破壊株を作製し、その acetyl-CoA、malonyl-CoA 量の経時変化を定量した。また、各種 FAS 破壊株に RppA を強制発現させ、flaviolin を定量した。

(4) FAS 破壊株における一次代謝の流量増加の機構解明

上記 (3) の結果、我々は、大腸菌 *E. coli* BL21 株に複数存在する FAS 遺伝子の破壊に成功した。FadR (脂肪酸の合成・代謝の制御因子) は IclR (acetyl-CoA carboxylase (AccABCD) と glyoxylate cycle の負の転写因子) の転写を活性化する。我々は、malonyl-CoA 量の増大の機構を解明するため、関連遺伝子の転写量を RT-PCR で定量し、FAS 破壊株と親株とで比較した。以上により、FAS 破壊株が中枢代謝経路の亢進を引き起こすメカニズムの解明を目指した。

4. 研究成果

(1) 破壊すると中枢代謝経路の亢進させる遺伝子のスクリーニング

大腸菌の Keio collection に RppA を強制発現させ、形質転換体の flaviolin 生産能を評価した結果、約 40 種の破壊株で親株よりも flaviolin の生産量が増えていた (図 1)。

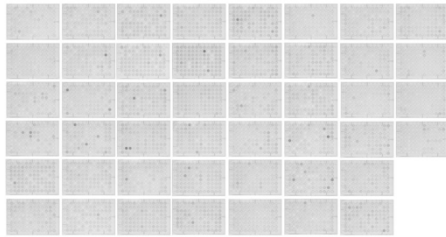


図1 スクリーニング結果 96穴 x 46枚

陽性株において flaviolin 生産量が増加した原因として、腸菌の細胞内 malonyl-CoA 濃度の上昇および細胞内 ATP などの発酵エネルギーが上昇した可能性が挙げられる。陽性株の中で FAS の破壊株が有望であった。脂肪酸合成経路は malonyl-CoA、NADPH、ATP を消費する。FAS 破壊株は、malonyl-CoA を消費しないため、カーボンフラックスが flaviolin の発酵に流れたと予想できる。

(2) スクリーニング陽性株の ATP、malonyl-CoA の定量

陽性株において flaviolin 生産量 (図1) が増加した原因として、大腸菌の細胞内 malonyl-CoA 濃度の上昇および細胞内 ATP などの発酵エネルギーが上昇した可能性が挙げられる。RppA を発現していない陽性株に対する実験の結果、一部の陽性株では、対数増殖期の malonyl-CoA と ATP 量が親株と比較して増加していた (図2)。中でも脂肪酸合成酵素 (FAS) の破壊株において、顕著に malonyl-CoA 濃度が上昇していたため、FAS 破壊株を中心に解析を進めることにした。SDS-PAGE に関しては、親株と比較して顕著な相違はみられなかった。

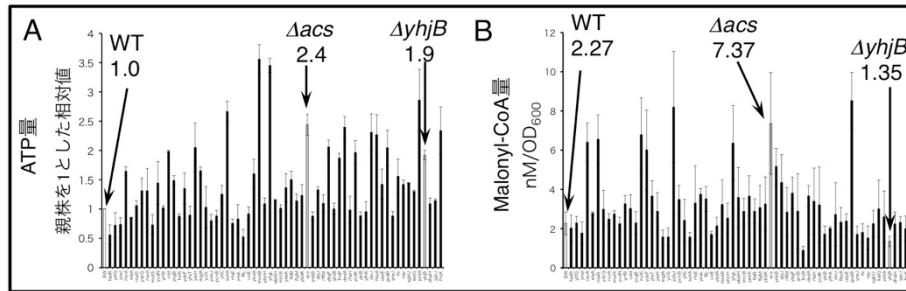


図2 陽性株の ATP 量 (A) と malonyl-CoA 量(B)

(3) 脂肪酸合成酵素 (FAS) の破壊株の取得と acetyl-CoA、malonyl-CoA、flaviolin 量の定量

脂肪酸は malonyl-CoA を前駆体として FAS により合成される。大腸菌の脂肪酸合成経路において FabH、FabF、FabB が malonyl-CoA を消費する酵素である。そこで、λ Red recombinase による相同組換えおよび Cre/loxP 系を用い、大腸菌の FAS 遺伝子 *fabH*、*fabF*、*fabB* の in-frame mutant を作製した。大腸菌 *E. coli* BL21 株を用いた結果、*fabH*、*fabF*、*fabB* の単独破壊株、*fabB*/*fabH*、*fabH*/*fabF* の二重破壊株の作製に成功した。なお、破壊株の取得には脂肪酸添加培地を用いたが、*fabB*/*fabF*破壊株は取得できなかった。我々は、大腸菌 *E. coli* BL21 株および FAS 破壊株において、RppA と MomA を発現させた。その結果、Δ*fabBH*株において 113 μg/ml と親株と比較して 37 倍の flaviolin を生産していることが判明した (図3A)。LC-tripleQ MS を用いて細胞内 acetyl-CoA および malonyl-CoA を定量した結果、Δ*fabFH*株において acetyl-CoA、malonyl-CoA の生体内量は親株と比較してそれぞれ 6 倍、45 倍であった (図3B)。

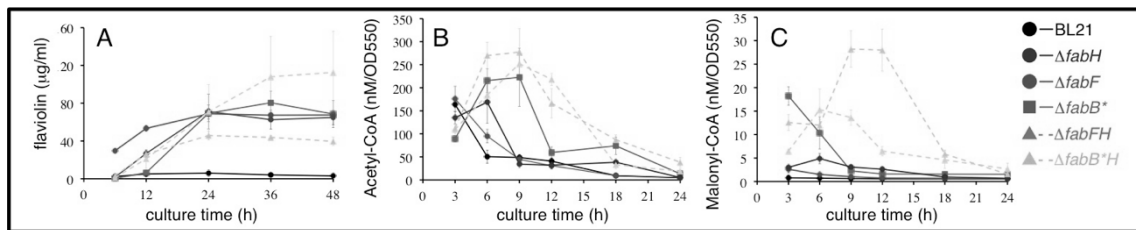


図3 脂肪酸合成酵素破壊株の flaviolin 量 (A)、acetyl-CoA (B) および malonyl-CoA (C) 量

(4) FAS 破壊株における一次代謝の流量増加の機構解明

我々は、脂肪酸の生合成を正に制御する制御因子 FadR に注目し、FadR やそのレギュロン (図4) の転写量解析を行った (図5)。

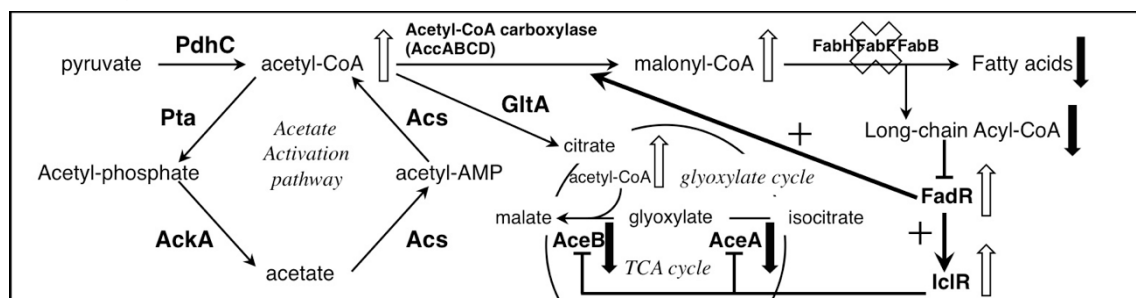


図4 脂肪酸破壊株における主要代謝経路の亢進または抑制のメカニズム

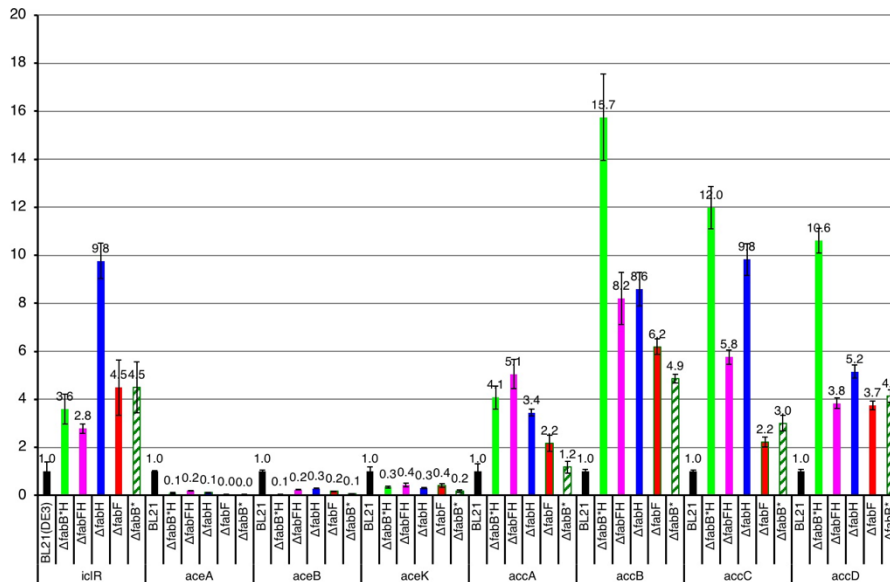


図5 FadR レギュロンの転写量

その結果、FAS 破壊株において、FadR、Ic1R、AccABCD の転写量が増加、AceAB の転写量が減少していた (図 5)。また、GC-MS を用いて脂肪酸の定量を行ったところ、 $\Delta fabBH$ 株や $\Delta fabFH$ 株において、脂肪酸の量が顕著に減少していることが分かった (図 6)。

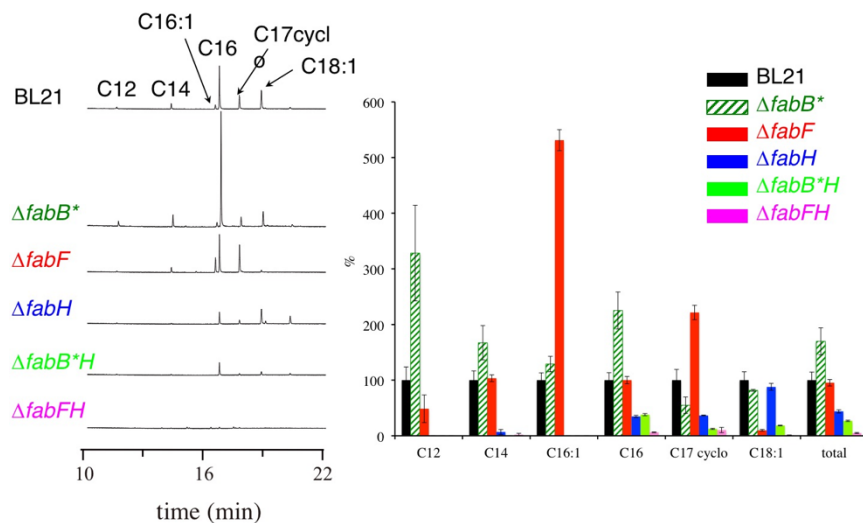


図6 脂肪酸の定量

以上より、FAS 破壊株において、一次代謝が昂進した理由を図 5 に示すように提唱する。今後は acetate activation pathway、GltA など、TCA cycle の転写量解析を行う。我々は、GltA や TCA cycle の転写量が、FAS 破壊株において親株よりも減少していると予想している。 Δacs では ATP、malonyl-CoA 量が顕著に増加している (図 2)。Acs は ATP を消費するため、acs の欠損が malonyl-CoA が増加に繋がった可能性がある。しかしながら、対数増殖期に Acs (対数増殖期に貯めた acetate を定常期に再利用する) が重要であるとは考えにくい。我々は、 Δacs や FAS 破壊株では acetyl-phosphate が親株よりも多く存在し、acetyl-phosphate による非酵素的な一次代謝酵素のリジンアセチル化が代謝を制御しているのではないかと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sone Yusuke, Nakamura Shuto, Sasaki Makoto, Hasebe Fumihito, Kim Seung-Young, Funa Nobutaka	4. 巻 84
2. 論文標題 Bacterial Enzymes Catalyzing the Synthesis of 1,8-Dihydroxynaphthalene, a Key Precursor of Dihydroxynaphthalene Melanin, from Sorangium cellulosum	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e00258-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.00258-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	長谷部 文人 (Fumihito Hasebe) (30781801)	静岡県立大学・食品栄養科学部・助教 (23803)	