

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05795

研究課題名（和文）有機溶媒耐性コクリア属細菌の分子育種および有用物質生産への展開

研究課題名（英文）Molecular breeding of organic solvent tolerant microorganism *Kocuria rhizophila* and its application to production of useful compounds.

研究代表者

戸田 弘 (Toda, Hiroshi)

富山県立大学・工学部・講師

研究者番号：60608321

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：*Kocuria rhizophila* DC2201 の糖代謝関連遺伝子破壊株や代謝改変株を作成し、各種物質生産を試みた。解糖系酵素であるグルコースリン酸イソメラーゼ(PGI)遺伝子破壊株において顕著な生育速度低下およびグルコース消費速度低下が見られた。*K. rhizophila* DC2201 の代謝系を改変し、styrene およびカロテノイド化合物の生産を試みた。PALおよびFDC導入によりstyrene 生産が確認され、*crtEb*破壊および*crtWZY*遺伝子の導入によりzeaxanthin, canthaxanthin の生産が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年のSDGsへの関心の高まりから、再生可能資源であるバイオマス由来を原料とした物質生産の研究が盛んに行われている。こうした物質生産プロセスにおいて主要な宿主は大腸菌であるが、ターゲット化合物の物性や細胞毒性によっては生産が困難である場合もある。こうした問題解決のために有機溶媒耐性菌などを積極的に利用したバイオプロセス開発もなされている。我々が研究対象とする*K. rhizophila* DC2201は高い有機溶媒耐性を持ち、こうした有用化合物生産の宿主として今後の応用が期待できる。我々は本菌株で利用可能な遺伝子改変ツールや遺伝子発現系の開発を完了しており、今後様々な物質生産への展開を目指す。

研究成果の概要（英文）：We have tried to produce useful compounds by genetic and metabolic modification of *Kocuria rhizophila* DC2201. Disruption of the glucose phosphate isomerase (PGI) gene resulted in a marked reduction in growth rate and glucose consumption rate. We modified the metabolic system of *K. rhizophila* DC2201 to produce styrene and carotenoid compounds. By introducing the PAL and FDC genes into *K. rhizophila* DC2201, a small amount of styrene production was observed. The production of zeaxanthin and canthaxanthin was confirmed by disruption of the *crtEb* gene and introduction of the *crtWZY* gene in *K. rhizophila* DC2201.

研究分野：遺伝子工学、酵素工学、代謝工学

キーワード：*Kocuria rhizophila* 有機溶媒耐性菌 代謝改変 物質生産

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

放線菌属細菌である *Kocuria rhizophila* DC2201 は高い有機溶媒耐性および耐塩性を有し、難水溶性化合物を対象とする物質生産バイオプロセスへの利用が期待される。我々はこれまでの研究において、コクリア属細菌 *K. rhizophila* DC2201 を宿主としたスチレン酸化酵素(SMO)の発現と光学活性エポキシ化合物生産を試み、本菌株が毒性の高いアルケン化合物を効率よくエポキシ化できる有望な宿主であることを見出している。また、本菌株を宿主としたバイオプロセスの開発を目指し、*Kocuria* 属細菌で利用可能な遺伝子発現ベクターやゲノム改変ツールの開発を行ってきた。さらに、*K. rhizophila* DC2201 が示す有機溶媒耐性について解明するために、網羅的 RNA 解析を行いその関連遺伝子の探索および変異株の作製と有機溶媒耐性への関連を検討してきた。

### 2. 研究の目的

(1) 有機溶媒耐性菌 *K. rhizophila* DC2201 を用いた物質生産プロセス開発に際し、糖代謝速度の向上や NAD<sup>+</sup>/NADH バランスの改善などが求められる。そこで本研究において、中央代謝系遺伝子やグローバルレギュレーター候補遺伝子の破壊等を行い、破壊株における糖代謝速度の変化や生育速度への影響を検討する。

(2) *K. rhizophila* DC2201 へ各種外来遺伝子を導入し、有用物質生産を試みる。対象化合物として、アスタキサンチンやゼアキサンチンといったカロテノイド類や、スチレン等の芳香族化合物類の生産を試みる。

### 3. 研究の方法

(1) *K. rhizophila* DC2201 中央代謝系遺伝子の破壊及び糖代謝速度の変化：*K. rhizophila* DC2201 の解糖系酵素および酢酸代謝酵素をコードする各遺伝子破壊株を作成し、そのグルコース消費速度及び生育速度への影響を検討した。また、データベースに登録されている配列情報から、糖代謝関連酵素を制御していると推測されるグローバルレギュレーターのリボソーム遺伝子を探索し、それらの破壊株構築及び解糖系酵素、ペントースリン酸(PP)経路酵素、TCA 回路酵素の発現への影響を検討した。

#### (2) *K. rhizophila* DC2201 の分子育種および各種有用物質生産

*K. rhizophila* DC2201 への各種外来遺伝子の導入及び代謝改変を行い、有用物質生産を試みた。ターゲット化合物としてスチレン、カロテノイド類およびメチル化フラボノイド類を設定した。

・スチレン生産を目的とし、*A. thaliana* 由来フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(AtPAL)、*S. cerevisiae* 由来フェルラ酸脱炭酸酵素(ScFDC1, ScPAD1)をそれぞれ *Kocuria* 用発現ベクター pKITE101P および pKITE303P を用いて導入した。また、フェニルアラニン高生産株構築のため、トリプトファン合成およびチロシン合成関連酵素(TrpE, TyrA)遺伝子の破壊株を構築し、二相系培養によるスチレン生産を検討した。

・カロテノイド化合物として astaxanthin、zeaxanthin および canthaxanthin をターゲットとした。*K. rhizophila* DC2201 が有するカロテノイド合成遺伝子である CrtEb を破壊することで、リコペンを蓄積する変異株を作成した。本破壊株に、各種微生物由来 CrtZ<sub>WY</sub> 遺伝子を導入することで各カロテノイド生産を試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) *K. rhizophila* DC2201 中央代謝系遺伝子改変株の糖代謝速度の変化

解糖系酵素のうち、ペントースリン酸経路との分岐に關与するグルコース 6-リン酸イソメラーゼ(PGI)および ATP 合成に關与するピルビン酸キナーゼ(PYK1, PYK2)が特に糖代謝のコントロールに重要な役割を担うと考えられることから、これらの遺伝子破壊株を作成しその生育速度およびグルコース消費速度を検討した。その結果、PYK 破壊株においては PYK1, PYK2 を各単独破壊した株では生育速度、グルコース消費速度ともに大きな影響は見られなかった。一方、PYK1, PYK2 両遺伝子を破壊した二重破壊株においては、グルコース消費速度の若干の低下が見られたが、生育速度に大きな影響は見られなかった。この結果から、*K. rhizophila* におけるグルコースの取り込みにおいて PTS(PEP 依存性ホスホトランスフェラーゼシステム)の関与が大きいことが推測される。一方、PGI を破壊した株では生育速度の低下およびグルコース消費速度の低下が顕著にみられた。取り込まれたグルコースが強制的に PP 経路へ流れるため、細胞内の NADH/NADPH バランスの変化などが生育に大きく影響することが示唆される。

#### (2) *K. rhizophila* DC2201 の分子育種および有用物質生産

細胞への毒性が強い疎水性化合物などの生産や変換において、大腸菌等を宿主としたバイオプロセスではその細胞毒性に起因する酵素失活や細胞死が起こり、菌体触媒の活性低下を引き起

こす。このことから長期間における活性保持が困難であり、物質生産効率の向上が困難となる。*K. rhizophila* DC2201 が示す高い有機溶媒耐性は、こうした細胞毒性が強い疎水性化合物をターゲットとしたバイオリファイナーやバイオコンバージョンにおいて有用な性質であり、その細胞機能を利用した物質生産プロセスの構築を試みた。

### *K. rhizophila* DC2201 によるスチレン生産

ターゲット化合物として、芳香族化合物である styrene の生産を試みた。スチレンは報告族アミノ酸であるフェニルアラニンを出発物質として、PAL および FDC の活性により桂皮酸を経て生成される。そこでまず、*K. rhizophila* DC2201 内で発現が可能な PAL の探索を試みた。データベースに登録されている各種植物および微生物由来の PAL 遺伝子 (*A. thaliana*; AtPAL, *Rhodotorula glutinis*; RgPAL, *Rhodotorula toruloides*; RtPAL, *Streptomyces maritimus*; SmEncP) を合成し、それらを発現ベクター-pKITE101P を用いて *K. rhizophila* DC2201 へ導入した。その結果、AtPAL, RgPAL, RtPAL 導入株において、細胞破碎液中に有意な PAL 活性が見いだされ、フェニルアラニンを基質としたときに桂皮酸の生産が確認された。続いて、フェルラ酸脱炭酸酵素として *S. cerevisiae* 由来 FDC1 をクローニングし、pKITE303P を用いて *K. rhizophila* DC2201 による発現を試みた。しかし、FDC1 単独発現株においては有意な FDC 活性が得られなかった。この原因として、FDC のコファクターであるプレニル化 FAD の欠乏が推測された。*S. cerevisiae* においては、phenylacrylic acid decarboxylase (PAD1) が FAD のプレニル化を行い、FDC のコファクターとなる。また、大腸菌においては UbiX が同様の機能を果たしていると推測されるが、*K. rhizophila* DC2201 ゲノム DNA 中にはこれらのホモログ遺伝子は存在していなかった。よって、*K. rhizophila* による FDC 活性発現には PAD1 を同時に発現させることが必須であると考え、*S. cerevisiae* 由来 PAD1 (ScPAD1) をタンデムにクローニングした pKITE303P-ScFDC1-ScPAD1 を構築し、*K. rhizophila* DC2201 へ導入した。形質転換体の細胞破碎液を用いて、桂皮酸を基質とした酵素反応を行った結果、styrene の生成を確認することができた (図 1)。

*K. rhizophila* DC2201 において PAL, FDC, PAD をそれぞれ発現可能となったことから、これらを同時に導入した株を作成し、グルコースからの styrene 生産を試みた。pKITE101P-AtPAL/RgPAL/RtPAL および pKITE303P-ScFDC1-ScPAD1 の共発現株を作成した結果、pKITE101P-RgPAL を用いた場合のみ形質転換体を得られ、AtPAL および RtPAL と FDC1/PAD1 共発現株は得られなかった。両遺伝子を単独でそれぞれ導入した株では問題なく形質転換体を得られていることから、FDC1/PAD1 との同時導入により細胞内スチレン濃度が上昇し、形質転換体に対する毒性が高いことが推測される。今後、誘導プロモーターを利用した発現系構築などを行い、これらの遺伝子についても導入を試みる。RgPAL と FDC1/PAD1 の組み合わせにおいては形質転換体を得られたことから、この菌株を用いてスチレン生産を検討した。その結果、グルコースを基質として培養した培地上清中に、スチレン生産を確認することができた (図 2)。しかしながらその濃度は、培養液あたり 0.1 mg/L 程度であり、生産性として十分とは言えない。また、桂皮酸が著量蓄積していることから、RgPAL 活性は十分に発現している一方、FDC1 および PAD1 活性が低く抑えられていることが示唆された。上述の通り、PAL/FDC/PAD の同時発現により細胞内でスチレンが生産されることから、得られる形質転換体はこれらの酵素活性が低く抑えられているものが優先的に生育していると推測される。また、TrpE および TyrA 破壊株への上記の遺伝子導入株を試みたが、やはり有意な形質転換体を得られていないことから、上記の推測が裏付けられていると考えられる。よって今後、誘導プロモーターなどを用いた発現系構築により、styrene 生産時にのみ PAL/FDC/PAD 活性を高発現できるようなシステムが必要であると考えられる。

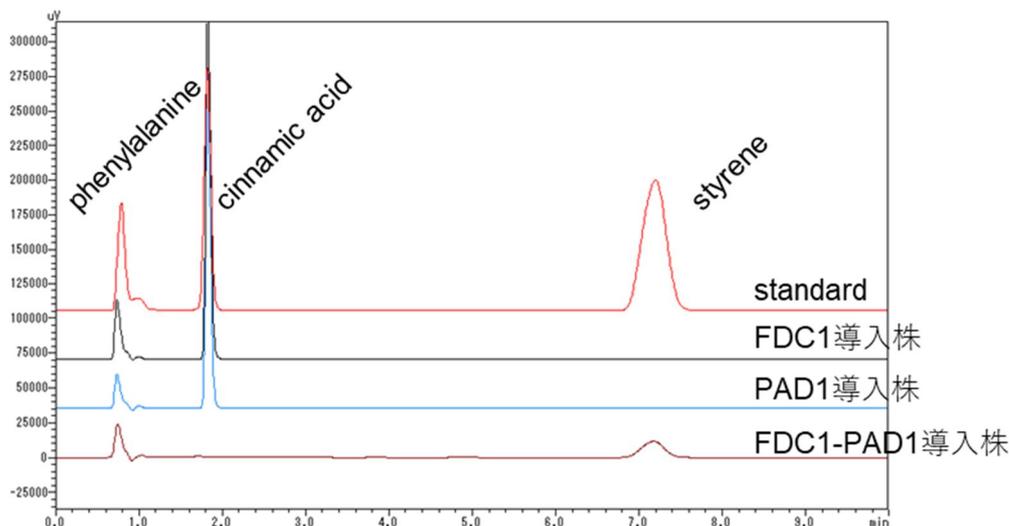


図 1 FDC1-PAD1 共発現株によるスチレン生産

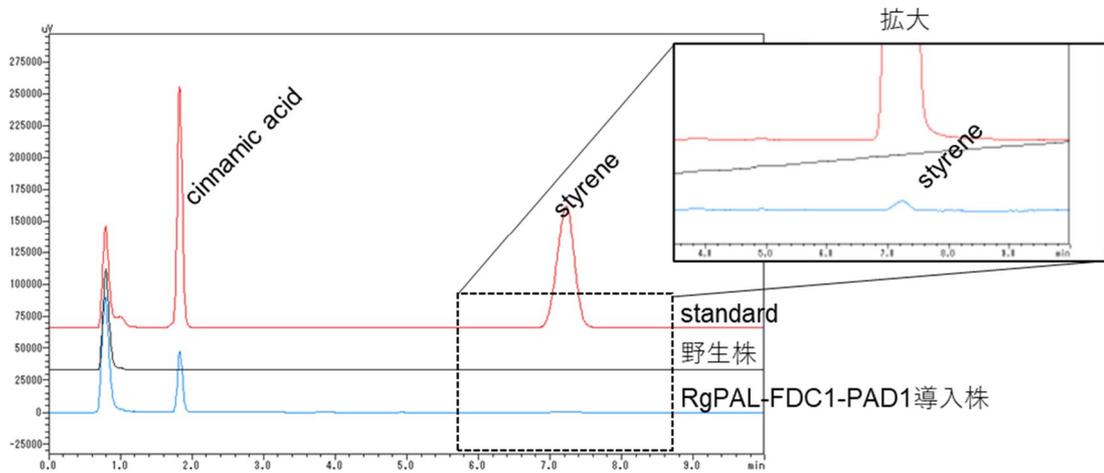


図2 RgPAL-ScFDC1-ScPAD1 導入株による styrene 生産

### K. rhizophila DC2201 によるカロテノイド類生産

*Kocuria* 属細菌の多くはカロテノイド合成経路を有し、その種に特有な各種カロテノイドを生産している。*K. rhizophila* DC2201 のゲノム配列中に、カロテノイド合成遺伝オペロンである *crtEBIYeYfEb* が見いだされ、野生株では decaprenoxanthin, sarprenoxanthin および sarcinaxanthin などの C50 カロテノイドを生成していることが予測された(図3)。そこでこれらのオペロンのうち、*crtEb* を破壊することで lycopene 蓄積株を得ることができると考え、その破壊株の作製を行った。その結果、*crtEb* 破壊株ではコロニー色が黄色からピンクへと変化することが確認され(図4)、また HPLC により lycopene の蓄積が確認された(図5)。この破壊株に、各種カロテノイド合成遺伝子を導入することで様々なカロテノイド類が合成可能であると考え、astaxanthin や zeaxanthin の生産を試みた。*Paracoccus haerendensis* 由来 *crtWZY* 遺伝子を合成し、pKITE101P を用いて *K. rhizophila* DC2201 *crtEb* 破壊株へ導入したが、優位なカロテノイド生産は得られなかった。そこで各遺伝子をそれぞれ単独で導入した株を作成し、その遺伝子発現を確認した結果 *crtY* 導入株においてのみ有意な活性が発現し、lycopene から  $\beta$ -carotene の生成が確認された。そこで各種微生物由来 *crtW*, *crtZ* について発現を検討した結果、*Pantoea ananatis* 由来 *crtZ* および *Brevundimonas aurantiaca* 由来 *crtW* においてそれぞれ優位に活性が得られた。これらの遺伝子を組み合わせた共発現株を作成し、*crtYW* 導入株において canthaxanthin が、*crtYZ* 導入株において zeaxanthin がそれぞれ生産されていることが確認された(図6)。しかし、3 遺伝子を同時発現させた株においては astaxanthin 生産が確認できなかった。この原因として、各酵素の活性不足が考えられることから、今後プロモーターの変更等による活性の増強、代謝系改変によるテルペノイド合成能の強化による astaxanthin 生産を試みる。

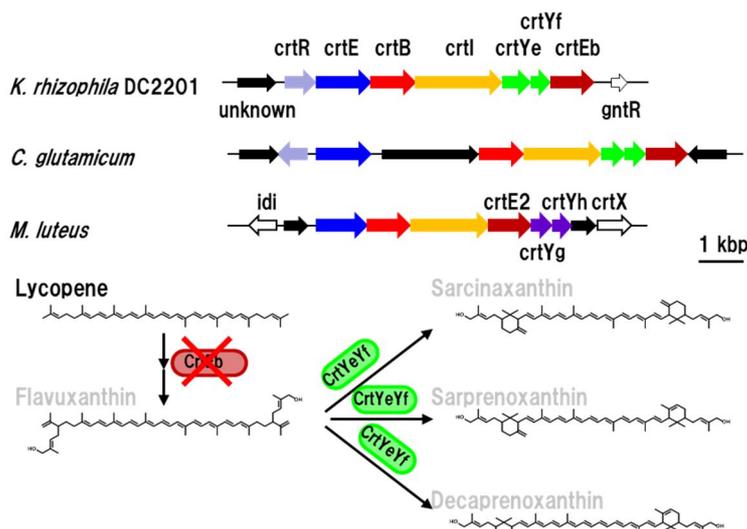


図3 K. rhizophila DC2201 におけるカロテノイド合成経路

WT  $\Delta crtEb$

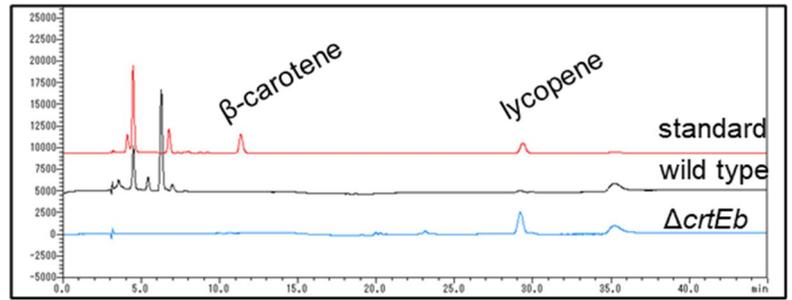


図 4 *crtEb* 破壊株コロニー

図 5 *crtEb* 破壊株における lycopene 蓄積

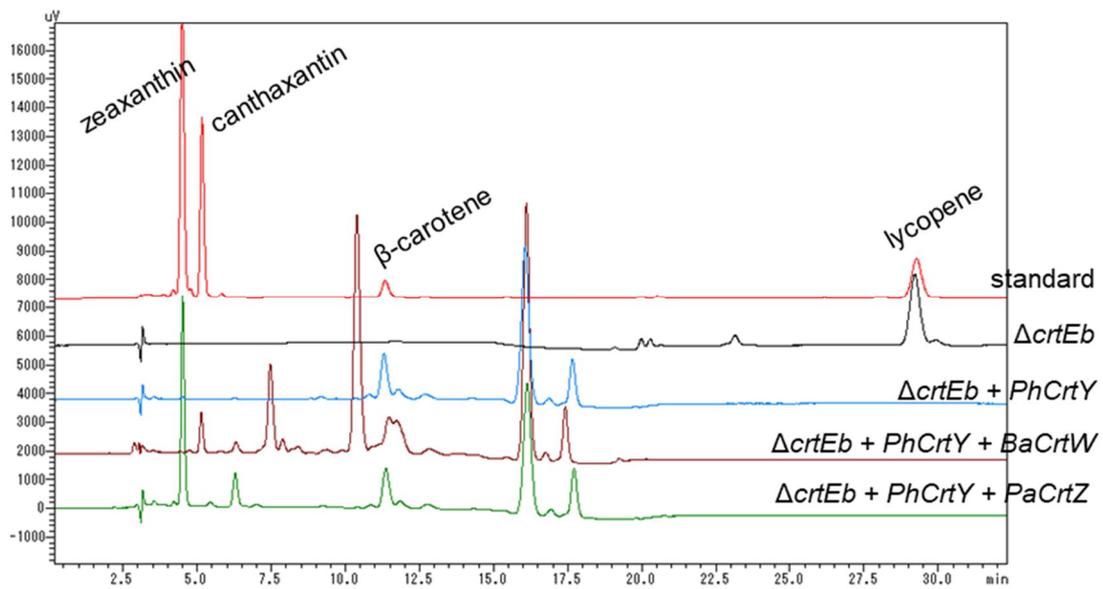


図 6 *crtY*, *crtW*, *crtZ* 導入株におけるカロテノイド化合物生産

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0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 戸田 弘	4. 巻 50
2. 論文標題 有用化合物生産プラットフォームとしての有機溶媒耐性菌利用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本防菌防黴学会誌	6. 最初と最後の頁 89-95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 戸田 弘	4. 巻 5
2. 論文標題 有機溶媒耐性コクリア属細菌の分子育種および有用物質生産への応用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 65-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 戸田弘、小野木奈々、金井保
2. 発表標題 有機溶媒耐性菌 <i>Kocuria rhizophila</i> DC2201 を利用したカロテノイド類化合物の生産
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 戸田弘・小野木奈々
2. 発表標題 有機溶媒耐性 <i>Kocuria</i> 属細菌の代謝改変 およびカロテノイド類生産
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 H. Toda, N. Itoh
2. 発表標題 Bioprocess development for producing useful chemical compounds with the organic solvent-tolerant microorganism <i>Kocuria rhizophila</i> .
3. 学会等名 Pacifichem2021
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 N. Itoh, H. Toda
2. 発表標題 Screening of gene-specific amplicons from metagenomes for useful biocatalysts.
3. 学会等名 Pacifichem2021
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 戸田 弘
2. 発表標題 有機溶媒耐性菌をプラットフォームとした有用物質生産プロセスの開発
3. 学会等名 日本生物工学会若手研究者の集い オンラインセミナー
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 近藤 諒、戸田 弘、伊藤伸哉、朝子弘之
2. 発表標題 4-メチルチオ-1,2-ブタンジオールの一位水酸基酸化酵素の探索と応用
3. 学会等名 第22回 生体触媒化学シンポジウム
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 戸田 弘、伊藤伸哉
2. 発表標題 Kocuria rhizophila DC2201 の有機溶媒耐性メカニズムの解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2019年～2020年

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関