

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15372

研究課題名（和文）混合糖の取込能力の向上を指向した適応進化による高発酵性大腸菌株の創出

研究課題名（英文）Generation of *Escherichia coli* strain aimed at improving mixed sugar uptake by adaptive laboratory evolution

研究代表者

和田 圭介（Wada, Keisuke）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・研究員

研究者番号：70828300

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、木質バイオマスの糖化液の主成分であるグルコースおよびキシロースについて、両糖を並列かつ高速に取り込める株の創出を目指している。この目標に向けて研究代表者は実験室進化に着目し、まず混合糖の取込能力強化株の効率的なスクリーニングが可能なシステムの構築に着手した。富栄養培地、ならびにグルコースあるいはキシロース含有最少培地における大腸菌野生型株の遺伝子発現量の解析を通して、各糖存在下において誘導的な発現を示す遺伝子群を抽出した。次に、それらの遺伝子のプロモーター配列を推定し、特に顕著な誘導性を示す候補を見出した。さらにそのプロモーターを組み込んだ実験室進化用のプラスミドを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物による物質生産において、糖などの原料の取込速度は目的化合物の生産速度の上限を規定する。本研究を通して創出を目指している混合糖の取込能力強化株は、物質生産能力の最大ポテンシャルの向上した株として、あらゆる目的化合物の生産宿主として有用だと考えられる。また、本研究において構築している実験室進化システムは、増殖速度と直結していない微生物の能力を強化の対象にできなかった従来の手法とは異なり、任意の微生物の能力を強化の対象にできるため、目的に合わせた汎用性の高い実験室進化システムとしての利用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, I aimed to generate a strain of *Escherichia coli* with strengthened the uptake rates for mixed sugars such glucose and xylose contained in saccharified solution of woody biomass through the adaptive laboratory evolution. First, an enable efficient screening system for a strain with strengthened the mixed sugars uptake rates was constructed. Through the analyses of gene expression level of the *E. coli* MG1655 strain in the LB, M9-glucose, and M9-xylose medium, groups of genes showing inducible expression in the presence of glucose and xylose were extracted. Next, the promoter sequences of those genes were estimated by promoter estimation tools, and the candidates showing particularly remarkable inducibility were found. Furthermore, a plasmid for the adaptive laboratory evolution incorporating the glucose- and xylose-inducible promoters was constructed.

研究分野：代謝工学

キーワード：大腸菌 実験室進化 代謝工学 グルコース キシロース

1. 研究開始当初の背景

環境保護や石油資源の枯渇問題を背景に、微生物を利用した物質生産プロセスに注目が集まっている。このプロセスでは、木質バイオマスの糖化液等の非可食成分を原料とし、微生物の代謝反応を利用した物質変換により、燃料や機能性化学品等の有用物質を生産できる。木質バイオマスの糖化液の70~90%はグルコースとキシロースで占められているため、物質生産プロセスの高度化にはこれらの混合糖を並列かつ高速に取り込める能力が望ましい。しかし、一般にグルコース存在下では他の糖の取り込みは抑制されること(グルコース効果)、またグルコーストランスポーター遺伝子の破壊株(*AptsG*株)は混合糖を同時に取り込めるようになる一方で取込速度は親株よりも低下することなどが知られている。糖の取り込みは全体像の不明瞭なネットワークによって複雑に制御されているため、取込能力の向上に寄与する改変箇所を人為的に決定することは困難である。これに対し、非人為的かつ合理的な変異導入を見込める実験室進化法は混合糖の取込能力の強化に向けて有効な手段だと考えられる。しかし、培養中にリアルタイムで糖の取込能力の評価は困難であるため、効率的に変異株を選択することができない。

2. 研究の目的

典型的な実験室進化法では、増殖速度の違いを利用することで変異株を選択している。一方、糖の取込速度のような、必ずしも増殖速度と直結していない現象を進化の対象とした場合、変異株の効率的な選択は困難である。そこで研究代表者は、各糖の取り込みに付随した細胞内の応答と細胞死を融合させたシステムを着想した。このシステムを活用することで、混合糖の取り込みと増殖速度を直結させられるため、適切な選択圧下において混合糖の取込能力の強化を指向した変異導入を期待できる。

本研究では、指向的な自然突然変異の導入および蓄積を促進できる新たなシステムの構築およびそのシステムを用いた混合糖の並列かつ高速な取り込みが可能な大腸菌株の創出を目的としている。それに向けて以下のチェックポイントを設計した。

- (1) 混合糖の取込能力の強化に有効な変異が導入された株の選択システムの構築
- (2) 構築したシステムの大腸菌への適用および混合糖の取込能力強化株の創出
- (3) 混合糖の取込能力強化株の評価システムの構築

3. 研究の方法

(1) 各糖誘導型プロモーターの探索

グルコースまたはキシロース存在下における対数増殖期中に各糖誘導的に機能するプロモーターを探索するため、大腸菌 MG1655 株を富栄養培地 (LB 培地)、M9 最少グルコース (MU) 培地、ならびに M9 最少グルコース (MX) 培地で培養した。対数増殖期 ($OD_{600} \approx 1$) に細胞を回収し、RNA-seq に供した。その解析データについて、各培地での発現量 (LB、MU、MX) および培地間での発現比 (MU/LB、MX/LB、MU/MX) に基づいて各糖誘導的な発現を示した遺伝子を抽出した。抽出した遺伝子のプロモーター領域は文献に基づいて推定した。

(2) 蛍光タンパク質を用いたプロモーターアッセイ

推定したプロモーター配列の上流および下流に結合するプライマーを設計し、MG1655 株のゲノム抽出物を鋳型として DNA 断片を作製した。その配列を pDsRedExpress2-1 ベクターに導入し、培地条件によって赤色蛍光タンパク質の蛍光量に変化するベクターを作製した (グルコース誘導型 4 種、キシロース誘導型 3 種)。これらのベクターを MG1655 に導入し、マイクロウェルプレートリーダーを用いて LB 培地、MU 培地、および MX 培地における OD_{600} あたりの蛍光量の経時変化を測定した。

(3) 実験室進化用プラスミドの構築

グルコース誘導型プロモーターの配下に赤色蛍光タンパク質および細胞死誘導遺伝子、キシロース誘導型プロモーターの配下に緑色蛍光タンパク質および細胞死抑制遺伝子をそれぞれタンデムに連結した。さらに、それらの DNA 断片、薬剤耐性遺伝子、および大腸菌用のプラスミド複製起点と連結することで、実験室進化用プラスミドを構築した。

(4) 物質生産能力の付与

混合糖の取込能力強化株による物質生産能力の評価の指標として、D-乳酸 (1 遺伝子の導入) ならびにイソブタノール (5 遺伝子の導入) を選択した。pETIK に *Lactococcus lactis* 由来の *ldhA* 遺伝子を連結し、D-乳酸生産用プラスミドとした。pCOLADuet-1 に *Bacillus subtilis* 由来の *alsS* 遺伝子および *Escherichia coli* 由来の *ilvCD* 遺伝子を、pCDFDuet-1 に *L. lactis* 由来の *kivd* 遺伝子および *Saccharomyces cerevisiae* 由来の *ADH2* 遺伝子をそれぞれ連結し、イソブタノール生産用プラスミドとした。

4. 研究成果

(1) 各糖誘導型プロモーターの探索

大腸菌 MG1655 株を LB 培地、MU 培地、ならびに MX 培地で培養し、対数増殖期中の遺伝子発現量を RNA-seq で分析した。グルコース誘導型プロモーターとしては、以下の条件を全て満たしている必要がある；①LB 培地での発現量が低いこと、②MU 培地での発現量が高いこと、③MU/MX 比が 1 よりも大きいこと。この条件に適合する遺伝子は 8 遺伝子存在した。その内 2 遺伝子分および 4 遺伝子分は同一オペロン上の遺伝子であったため、最終的に 4 プロモーター分を抽出できた。一方、キシロース誘導型プロモーターとしては、以下の条件を全て満たしている必要がある；①MX 培地での発現量が高いこと、②MU/MX 比が 1 よりも小さいこと。この条件に適合する遺伝子は 4 遺伝子存在した。その内 2 遺伝子分は同一オペロン上の遺伝子であったため、最終的に 3 プロモーター分を抽出できた。

(2) 蛍光タンパク質を用いたプロモーターアッセイ

4 種類のグルコース誘導型プロモーターおよび 3 種類のキシロース誘導型プロモーターについて、MG1655 株のゲノム抽出物を鋳型とした PCR で DNA 断片を増幅し、pDsRedExpress2-1 に連結した（グルコース誘導型プラスミド：pU1~4、キシロース誘導型プラスミド：pX1~3）。これらのプラスミドを導入した MG1655 株を、LB 培地、MU 培地、ならびに MX 培地に植菌し、マイクロウェルプレートリーダーを用いて蛍光強度の経時変化を測定した（図 1）。グルコース誘導型プラスミドについて、pU1 および pU2 は RFP 値が低く、MU 培地とそれ以外での発現量の差がほとんど見られなかった。pU3 はいずれの培地においても RFP を検出できなかった。pU4 は、RNA-seq の発現量データと一致した性能を示し、グルコース存在下において誘導的な発現を示すこと確認できたため、これをグルコース誘導プロモーターとして利用することにした。キシロース誘導型プラスミドについて、全てキシロース存在下において誘導的な発現を示すことを確認できた。図 1 における pX2 および pX3 の MX 培地中での RFP 値は、ゲイン値を高く設定していたため途中で検出限界に到達したが、ゲイン値の設定を pX1 と合わせたところ、pX1 の発現量および MU 培地での RFP 値との比が最も大きかったことから（データ非掲載）、これをキシロース誘導プロモーターとして利用することにした。

(3) 実験室進化用プラスミドの構築

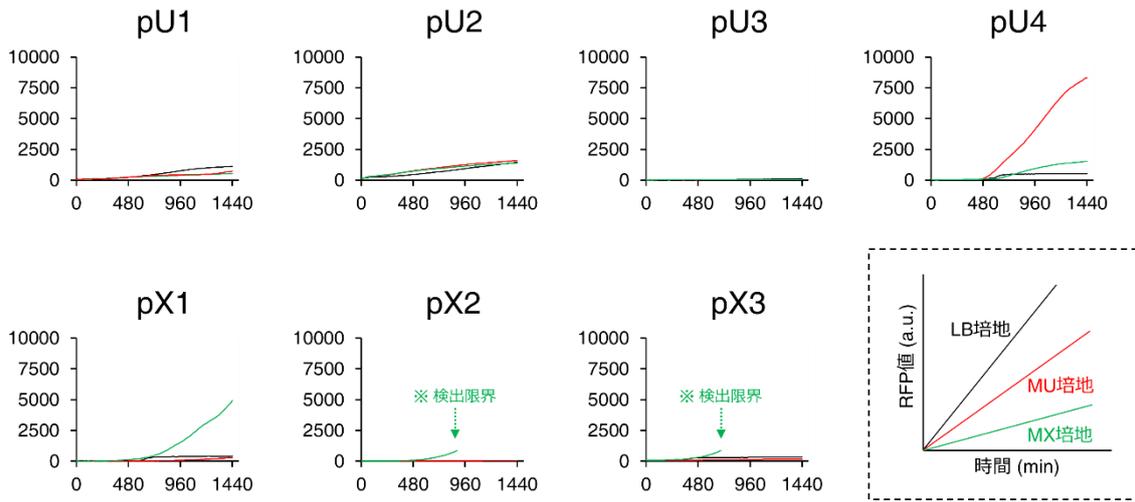
pU4 に含まれるグルコース誘導型プロモーター下に赤色蛍光タンパク質および細胞死誘導遺伝子を配した DNA 断片、pX1 に含まれるキシロース誘導型プロモーター下に緑色蛍光タンパク質および細胞死抑制遺伝子を配した DNA 断片、薬剤耐性遺伝子、および大腸菌用のプラスミド複製起点を連結した、実験室進化用のプラスミドを構築した。このプラスミドを導入した MG1655 株を LB 培地、MU 培地、ならびに MX 培地で培養したところ、MU 培地で大幅な生育遅延が見られた。しかし、MU 培地における赤色蛍光タンパク質および MX 培地における緑色蛍光タンパク質の発現はいずれも確認できなかった。今のところ原因は不明であり、この部分に関する原因究明および修正を要する。

(4) 物質生産能力の付与

D-乳酸生産用プラスミドならびにイソブタノール生産用プラスミドをそれぞれ MG1655(DE3)株に導入し、D-乳酸生産大腸菌 (LAC 株) ならびにイソブタノール生産大腸菌株 (IB 株) を構築した。これらの株は IPTG を添加することで各物質の生産が誘導できる。混合糖の取込能力の評価では、酵母エキス等の雑多な栄養素による影響を排除できる最少培地で培養することが望ましい。LAC 株および IB 株を MU 培地ならびに MX 培地で培養したところ、LAC 株はどちらの培地下においても D-乳酸の生産を確認できた。一方 IB 株では、LAC 株に比べて生育に遅滞が見られ、添加した糖を完全消費した段階においても IB の生産が確認できなかった。ただし、酵母エキスを追加した最少培地では IB の生産を確認できたため、プラスミド設計レベルでは正しく機能していることが分かった。IB 生合成のための 5 遺伝子は、強力な T7 プロモーターによって発現誘導されるため、糖を単一炭素源とした最少培地下では十分なタンパク質量が確保できないことが原因かもしれない。

本研究では、異なる培地下における大腸菌の RNA-seq データに基づいてグルコースならびにキシロース誘導的に機能する複数のプロモーターの候補配列を推定し（研究目的 1、研究成果 1）、各糖存在下において当該配列下の蛍光タンパク質が誘導的に発現することを確認した（研究目的 1、研究成果 2）。抽出した各糖誘導型プロモーターの配列を利用した実験室進化用のプラスミドを構築した（研究目的 1、研究成果 3）。しかし、蛍光タンパク質の発現を確認できなかったため、この部分に関する原因究明および修正を要する。また、混合糖の取込能力強化株の物質生産能力を評価するためのプラスミドを 2 種類分構築し、特に D-乳酸生産プラスミドは最少培地下における物質生産能力の評価に利用できることを確認した（研究目的 3、研究成果 4）。今後はこのプラスミドを導入した MG1655 株を実験室進化の培養に供することで混合糖の取込能力強化株の取得を目指す（研究目的 2）。さらに、構築した 2 種類の物質生産能力評価用プラスミドを用いて混合糖の取込能力強化株の有用性を示す（研究目的 3）。

図 1



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 1件）

1. 著者名 Wada K, Fujii T, Inoue H, Akita H, Morita T, Matsushika A	4. 巻 6
2. 論文標題 Application of a Pyruvate-Producing Escherichia coli Strain LAFCCPt-accBC-aceE: A Case Study for d-Lactate Production	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fermentation	6. 最初と最後の頁 70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/fermentation6030070	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------