

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H00321

研究課題名(和文) 増殖にとられずに様々な前駆体を十分量供給できるプラットフォーム微生物群の構築

研究課題名(英文) Creation of a platform strains capable of supplying sufficient quantities of various precursors without being restricted by cell growth

研究代表者

近藤 昭彦 (Akihiko, Kondo)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授

研究者番号：40205547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では様々な前駆体群を十分量供給できるプラットフォーム微生物を構築することで、微生物を用いて生産される様々な有用化合物の生産性と収率を向上させる基盤技術の開発を行った。代謝経路には炭素の分配が起こる膨大な数の分岐点・結合点が存在する。経路の分断、経路の結合、そして様々な炭素源の利用による収率向上を進め、1,2-プロパンジオールおよびレスベラトロールの生産量を向上させることに成功し、本技術の有用性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で化合物ごとにそれぞれ最適な経路を再設計することができるようになり、様々な化合物のビルディングブロックとなる化学物質の理論収率を向上できる。さらに、近年メタノールやCO₂を独立炭素源として菌体の生育を可能にするという研究が発表されており、本研究の技術と組み合わせることでこれらの炭素源を物質生産へ利用することで、低炭素社会の実現や地球温暖化等の環境問題の解決に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a platform microorganism capable of supplying sufficient quantities of various precursor groups, thereby developing a fundamental technology to improve the productivity and yield of various useful compounds produced using microorganisms. Metabolic pathways contain a vast number of branching and joining points where carbon partitioning occurs. We have succeeded in increasing the production of 1,2-propanediol and resveratrol by breaking up pathways, combining pathways, and improving yields by using various carbon sources, demonstrating the usefulness of this technology.

研究分野：合成生物学

キーワード：バイオリファイナリー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バイオリファイナリーは、数々の利点を持つグリーン・イノベーションであり、社会からの要請は非常に強い。微生物を用いた有用物質生産は、上記バイオリファイナリーの重要分野の一つである。2050年までにCO₂排出量を実質ゼロとする宣言が国から出されており、バイオプロセスはこの目標の実現に大きく寄与できる。しかし、現時点でのバイオプロセスでは理論収率が低いため実用化には至らないという課題がある。収率を上げるため競合経路の破壊・遺伝子の発現量の検討など様々なアプローチからの研究があるものの、発酵生産が盛んに行われているエタノールでさえ供給した炭素のおよそ半分が菌体の維持のために消費されてしまうように、理論収率の低さはバイオプロセスの実用化にとって大きな課題である。

2. 研究の目的

本研究は経路の分断と再構築により炭素の流れをコントロールし様々な化合物の理論収率を増加させることを目的とする。生物は糖を取り込んだ後、多種の物質を合成するために炭素の分配を行う。そのため代謝経路には炭素の分配が起こる膨大な数の分岐点・結合点が存在する。まず経路の分断、その後、経路の結合、最後に様々な炭素源の利用による収率向上を実現させることで多様な化合物生産のプラットフォームになる技術の開発を目指す。

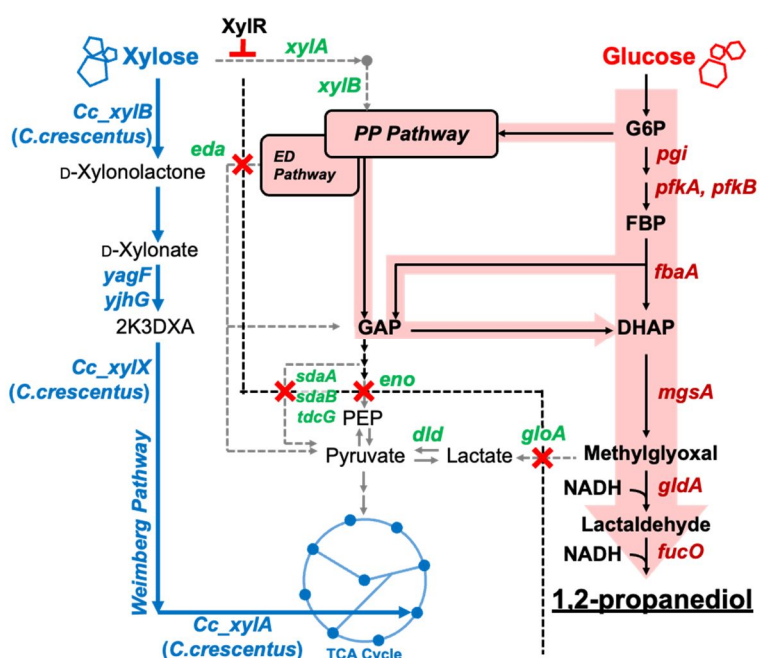
3. 研究の方法

各化合物生産における中間体であるジヒドロキシアセトンリン酸(DHAP)・ホスホエノールピルビン酸(PEP)を蓄積するように代謝経路を分断した。さらにグルコースとキシロースの混合糖培地で生育させるために外来のキシロース資化経路を導入し、PMPE デザインに基づく代謝分断株をそれぞれ作製した。1,2-プロパンジオール生産ではM9最小培地に5 g/L Yeast extract、10 g/L グルコース、10 g/L キシロースを加えた混合糖培地を用い、220 rpm、初期OD₆₀₀=0.1の条件で試験管培養を行った。レスベラトロール生産では上記の培地に40 mg/L L-Phenylalanineと40 mg/L L-Tryptophanを添加し30 で培養を行った。遠心分離により培養上清を採取しHPLCにて分析をおこなった。

4. 研究成果

生育のために多くの炭素が消費されることが要因であると推測し、経路の分断で2種の糖を物質生産と菌体増殖に供給するParallel Metabolic Pathway Engineering(PMPE)に着目した。しかしPMPEは経路の分断をして炭素量を分割しているだけである。PMPEに加えて経路の再構築をすることにより通常生育に使われる炭素を再供給することでこれまでの理論収率を約2倍に増加できるか検討した。有用物質の生産経路についても再構築を行い、様々な化合物の理論収率を大幅に増加させることができるかについても検討を行った。

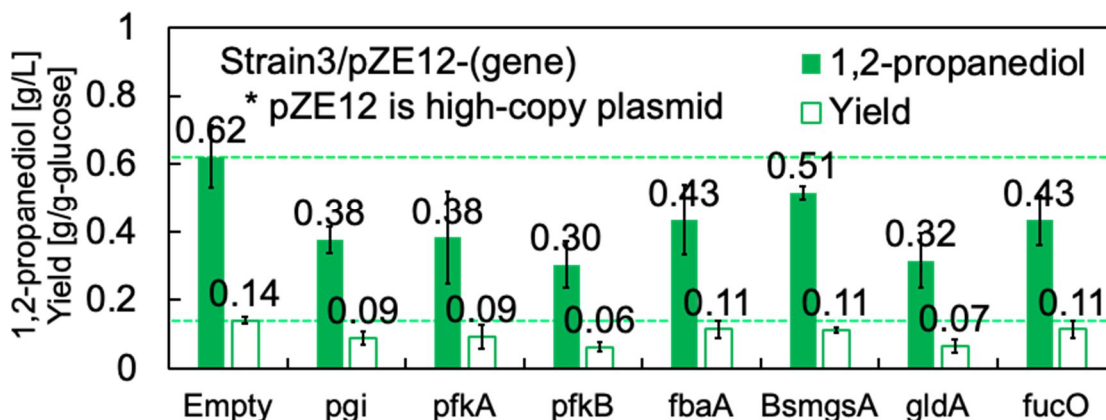
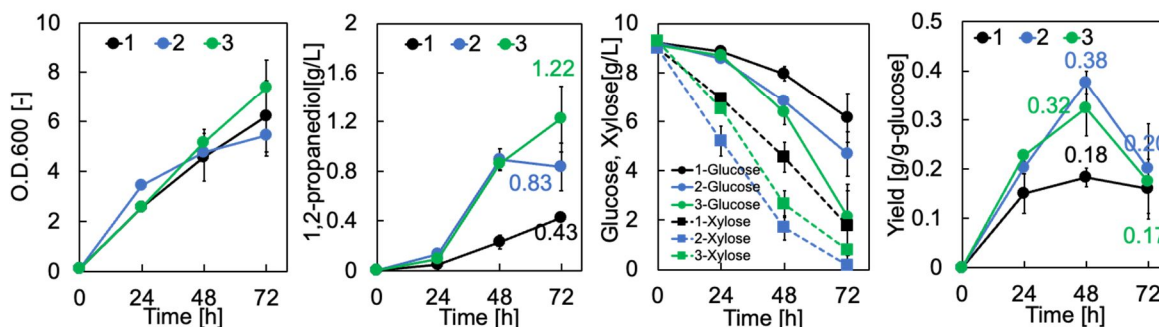
解糖系における主要な分岐点にフルクトース 1,6-ビスリン酸(FBP)の開裂がある。開裂で生じるグリセルアルデヒド 6-リン酸(GAP)は下流経路に流れてしまうため、ジヒドロキシアセトンリン酸(DHAP)は蓄積しにくい。GAPの消費経路を分断することでその流出を無くし、従来の経路では1gのグルコース当たり0.94 g/gであったDHAPの収率を2倍の1.89 g/gに増加させることが可能となる。本研究では、DHAPから合成される物質のうち1,2-プロパンジオールを選択した。この物質は炭素量の確保のため酸素量を制限した条件下で生産されてきたが、この条件下では生育が抑制され生産量が下がるという問題があった。本研究では経路を分



断することで酸素のある好気条件での生産を可能にし、生産量と収率を同時に増加させることができる。

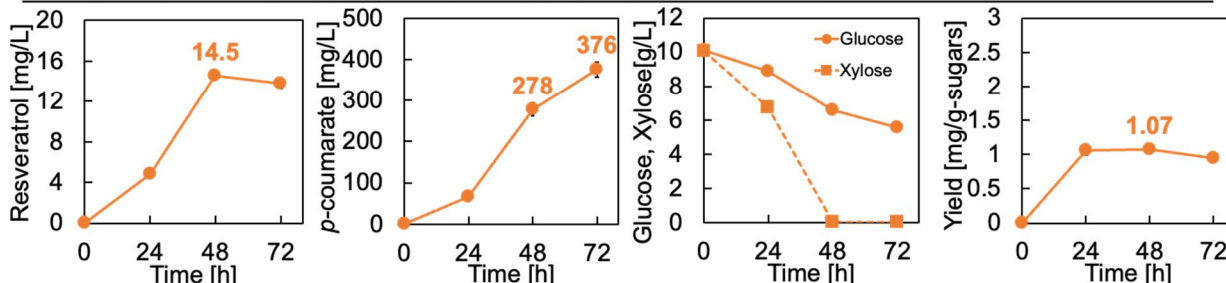
まずゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 システムを用い代謝経路の分断を行った。キシロース資化経路と 1,2-プロパンジオール合成経路を大腸菌株に導入し、生産を確認する。生産の確認後、グルコースやキシロースの供給量や遺伝子の発現量等を検討し、条件の最適化を進めた。キシロースの資化速度によって菌体増殖が遅くなる可能性があるが、その場合はピルビン酸などのクエン酸回路まわりの化合物や、アミノ酸等の微量を添加することによって増殖を促進させた。分断株に Weimberg 経路をプラスミドで導入し好気条件での発酵生産を確認した。その後 Weimberg 経路遺伝子をゲノム上に組み込むことで菌体量及び生産量が増加し、72 時間で 1.22 g/L の 1,2-プロパンジオール生産を達成した。また、1,2-プロパンジオール生産の律速段階はそれぞれの酵素の発現量には依存していないことも確認できた。

| No. | Strain | Plasmid |
|-----|---|--------------------------------------|
| 1 | PM4(MG1655ΔgloAΔenoΔedaΔsdaAΔsdaBΔtdcG) | pSAK-CcxyI/AXB |
| 2 | PM4ΔxyI/B::P _{A1lacO-1} -CcxyI/AXB | pSAK(Empty vector, Low copy plasmid) |
| 3 | PM4Δdld::P _{A1lacO-1} -CcxyI/AXB | pSAK |



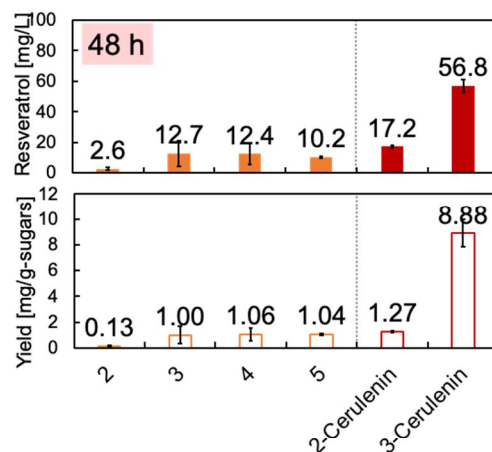
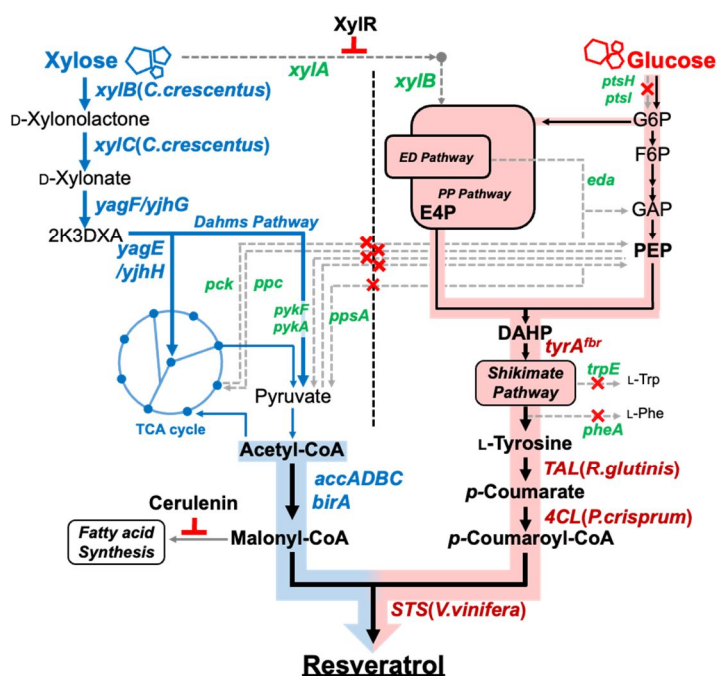
様々な化合物の前駆体であるアセチル CoA は、通常では供給した炭素が二酸化炭素になり放出されるため、理論収率が低い。経路の分断を行うことで二酸化炭素の放出を無くし、さらに Nonoxidative glycolysis (NOG) 経路を組み合わせてグルコースを物質生産に利用することでアセチル CoA の理論収率を増加させる。本研究では機能性材料等に含まれるレスベラトロールの生産収率の増加を進めた。経路の分断を行いキシロースだけでクエン酸回路の駆動を可能にした後、N 再構築した経路を使ってグルコースからアセチル CoA を供給する。レスベラトロール生

| No. | Strain | Plasmid |
|-----|--|----------------------------|
| 1 | ATCC31882ΔpheAΔppsAΔprkAΔppcΔpykAΔpykFΔedaΔtrpE::P _{trc} - tyrA ^{fbr} ΔptsHI::P _{A1lacO-1} -glk-galPΔxyI/AB::P _{LlacO-1} -CcxylB-CcxylC | pTrcHisB-RgTAL-Pc4CL-VvSTS |



産では、分断株に Dahms 経路遺伝子をゲノム上に、レスベラトロール生産遺伝子をプラスミドで

導入し 14.5 mg/L のレスベラトロール生産を確認した。分子量の大きいポリケチド類の合成は炭素鎖の伸長のためにマロニル CoA を必要とし、通常その供給量が少ないことが問題である。グルコースからの理論収率の向上を可能にした後、その収率をさらに上げるためにはアセチル CoA の供給を増やす必要がある。そこで様々な炭素源の利用に着目した。セルレニンを用いた実験から、大腸菌内在のアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) を過剰発現させることが更なる生産量増加につながることを確認した。



| No. | Strain | Plasmid-1 | Plasmid-2 |
|-----|---------|----------------------------|-------------------|
| 2 | | | pSAK |
| 3 | Strain1 | pTrcHisB-RgTAL-Pc4CL-VvSTS | pSAK-accADBC |
| 4 | | | pSAK-birA |
| 5 | | | pSAK-accADBC-birA |

以上より、本研究で化合物ごとにそれぞれ最適な経路を再設計することができるようになり、様々な化合物のビルディングブロックとなる化学物質の理論収率を向上できる。さらに、近年メタノールや CO₂ を独立炭素源として菌体の生育を可能にするという研究が発表されており、本研究の技術と組み合わせてこれらの炭素源を物質生産へ利用することで、低炭素社会の実現や地球温暖化等の環境問題の解決に貢献できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Fujiwara, R., Nakano, M., Hirata, Y., Otomo, C., Nonaka, D., Kawada, S., Nakazawa, H., Umetsu, M., Shirai, T., Noda, S.*, Tanaka, T.*, Kondo, A. | 4. 巻 72 |
| 2. 論文標題 G6P-capturing molecules in the periplasm of Escherichia coli accelerate the shikimate pathway | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Metabolic Engineering | 6. 最初と最後の頁 68-81 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ymben.2022.03.002 | 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 - |
| 1. 著者名 Sakae Kosuke, Nonaka Daisuke, Kishida Mayumi, Hirata Yuuki, Fujiwara Ryosuke, Kondo Akihiko, Noda Shuhei, Tanaka Tsutomu | 4. 巻 164 |
| 2. 論文標題 Caffeic acid production from glucose using metabolically engineered Escherichia coli | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Enzyme and Microbial Technology | 6. 最初と最後の頁 110193 ~ 110193 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.enzmictec.2023.110193 | 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 - |
| 1. 著者名 Fujie Naofumi, Ito Miki, Kishida Mayumi, Hirata Yuuki, Kondo Akihiko, Tanaka Tsutomu | 4. 巻 358 |
| 2. 論文標題 Metabolic engineering of Schizosaccharomyces pombe for itaconic acid production | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Biotechnology | 6. 最初と最後の頁 111 ~ 117 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiotec.2022.09.006 | 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 - |
| 1. 著者名 Noda Shuhei, Mori Yutaro, Fujiwara Ryosuke, Shirai Tomokazu, Tanaka Tsutomu, Kondo Akihiko | 4. 巻 67 |
| 2. 論文標題 Reprogramming Escherichia coli pyruvate-forming reaction towards chorismate derivatives production | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Metabolic Engineering | 6. 最初と最後の頁 1 ~ 10 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ymben.2021.05.005 | 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 - |

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Nonaka Daisuke, Fujiwara Ryosuke, Hirata Yuuki, Tanaka Tsutomu, Kondo Akihiko | 4. 巻 329 |
| 2. 論文標題 Metabolic engineering of 1,2-propanediol production from cellobiose using beta-glucosidase-expressing <i>E. coli</i> | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Bioresource Technology | 6. 最初と最後の頁 124858 ~ 124858 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biortech.2021.124858 | 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 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Satowa Daichi, Fujiwara Ryosuke, Uchio Shogo, Nakano Mariko, Otomo Chisako, Hirata Yuuki, Matsumoto Takuya, Noda Shuhei, Tanaka Tsutomu, Kondo Akihiko | 4. 巻 117 |
| 2. 論文標題 Metabolic engineering of <i>E. coli</i> for improving mevalonate production to promote NADPH regeneration and enhance acetyl CoA supply | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biotechnology and Bioengineering | 6. 最初と最後の頁 2153 ~ 2164 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bit.27350 | 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 - |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Sato Naoki, Kishida Mayumi, Nakano Mariko, Hirata Yuuki, Tanaka Tsutomu | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Metabolic Engineering of Shikimic Acid-Producing <i>Corynebacterium glutamicum</i> From Glucose and Cellobiose Retaining Its Phosphotransferase System Function and Pyruvate Kinase Activities | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology | 6. 最初と最後の頁 1-14 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fbioe.2020.569406 | 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17件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 8件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 Akihiko Kondo |
| 2. 発表標題 Construction of Novel Metabolic Pathways with Synthetic Enzymes |
| 3. 学会等名 Thai Society for Biotechnology International Conference Online (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 近藤 昭彦 |
| 2. 発表標題 新たな経済社会「バイオエコノミー」を加速する「バイオ×デジタル」融合 |
| 3. 学会等名 KTC講演会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 近藤 昭彦 |
| 2. 発表標題 データベース空間からの新規酵素リソースの創出 |
| 3. 学会等名 第8回 SBJシンポジウム -カーボンリサイクル実現に向けたバイオ生産技術開発-（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Akihiko Kondo |
| 2. 発表標題 Metabolic genome engineering project: Overview and examples in microorganisms |
| 3. 学会等名 Hope for the Future |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 近藤 昭彦 |
| 2. 発表標題 合成生物学・バイオファクトリーのエコシステム形成に関する国内外の動向と課題 |
| 3. 学会等名 バイオエコノミー勉強会(第7回バイオ×デジタル×共創的エコシステムの構築 - バイオファクトリー とゲノム編集技術/(第105回STIG PoPセミナー)（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Akihiko Kondo |
| 2. 発表標題 Development of biofoundry platform for rapid construction of microbial cell factories |
| 3. 学会等名 The 3rd Synthetic Biology World Forum, 2021 (SBWF 2021) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 近藤 昭彦 |
| 2. 発表標題 バイオファウンドリによるバイオマスからの多様な化学品、燃料生産の実現 |
| 3. 学会等名 第2回バイオマスプレミアムイブニングセミナー (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Akihiko Kondo |
| 2. 発表標題 Construction of novel metabolic pathways with artificial enzymes in microbes |
| 3. 学会等名 Metabolic Engineering 14 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Akihiko Kondo |
| 2. 発表標題 Development of biofoundry platform for rapid construction of microbial cell factories for production of chemicals and fuels from bioresources |
| 3. 学会等名 Asean Federation Of Biotechnology Symposium (Malaysia Chapter) 2021 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Akihiko Kondo;Yoichiro Ito;Yasuyuki Nakamura;Daisuke Sasaki;Jun Ishii |
| 2. 発表標題 Development of engineering tools for methylotrophic yeast <i>Pichia pastoris</i> and their applications to small antibody secretory production |
| 3. 学会等名 International Congress on Yeast (ICY) 15 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Akihiko Kondo |
| 2. 発表標題 Development of biofoundry platform for rapid construction of microbial cell factories |
| 3. 学会等名 2021 AF0B virtual conference (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Akihiko Kondo |
| 2. 発表標題 BioFoundry for rapid development of innovative treatments |
| 3. 学会等名 2021 World Alliance Forum in San Francisco (WAFSF) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 近藤 昭彦 |
| 2. 発表標題 日本からの合成生物学産業化への挑戦 Challenge to the industrialization of synthetic biology in Japan |
| 3. 学会等名 MEDTECH CONNECT OSAKA 2022 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Akihiko Kondo |
| 2. 発表標題 The impact of synthetic biology on Helthecare |
| 3. 学会等名 World Healthcare Game Changers Forum (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 近藤 昭彦 |
| 2. 発表標題 合成生物学による新たな産業革命 |
| 3. 学会等名 第4回新しい資本主義実現会議 「科学技術立国」 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 近藤 昭彦 |
| 2. 発表標題 合成生物学とバイオファウンドリ開発動向 |
| 3. 学会等名 関西バイオものづくりフォーラム2022 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 野中 大輔・藤原 良介・田中 勉・近藤 昭彦 |
| 2. 発表標題 大腸菌の代謝改変による1,2-プロパンジオール生産技術の開発 |
| 3. 学会等名 化学工学会第86年会 |
| 4. 発表年 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 |
|---------------|--|-----------------------------------|----|
| 研究 分担 者 | 田中 勉 (Tanaka Tsutomu) (90436551) | 神戸大学・工学研究科・准教授 (14501) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|