

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06142

研究課題名（和文）適応的実験室進化による産業微生物のエネルギー欠乏への潜在的な適応能力の解明

研究課題名（英文）Adaptive laboratory evolution of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* mutant strains lacking genes encoding respiratory chain enzymes and/or NADH dehydrogenases.

研究代表者

前田 智也 (Tomoya, Maeda)

北海道大学・農学研究院・助教

研究者番号：10754252

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、産業微生物である大腸菌やコリネ型細菌の発酵生産効率向上を目的として、様々な酸化的リン酸化変異株の適応的実験室進化を行った。先行研究により、呼吸鎖欠損株やNADH酸化系を破壊した株では、糖代謝が亢進する一方、生育が悪化することが明らかになっていた。そこで、生育が著しく悪化する酢酸を単一炭素源とした場合における適応的実験室進化を行うことで、酢酸最少培地における生育が回復した各種進化株を得る事に成功した。これらの進化株のいくつかはグルコース最少培地における生育速度も向上していた。さらに、全ゲノムリシーケンス解析や、変異導入実験などを行い、進化をもたらしたメカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地球環境の保全や化石燃料の枯渇に対処するために、微生物と再生可能なバイオマス資源を用いた有用物質生産の効率化を達成する方法の解明が求められている。こうした背景から、産業上重要な大腸菌やコリネ型細菌における発酵の効率化は学術的にも社会的にも重要である。先行研究により、呼吸鎖やその他NADH酸化系などを不活性化すると、細胞当たりの発酵効率が向上する一方、生育が著しく悪化することが明らかになっていたため、これらの変異株を用いた物質生産は実用化に至らなかった。こうした課題に対し本研究では、こうした変異株の適応的実験室進化を行うことで、中枢代謝が強化された状態で生育を回復させる方法を見出すことができた。

研究成果の概要（英文）：We are aiming to improve the fermentative production efficiency of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*, which are pivotal industrial workhorses. Previous studies have shown that mutant strains lacking genes encoding respiratory chain enzymes and/or NADH dehydrogenases exhibit enhanced glucose metabolism but impaired growth. Additionally, some of these mutant strains were unable to grow on acetate as the sole carbon source. Therefore, in this study, we performed adaptive laboratory evolution on such mutant strains using acetate as the sole carbon source. This approach successfully yielded various evolved strains that demonstrated restored growth in acetate minimal media. In addition, some of the evolved strains showed improved growth rates in glucose minimal media. Furthermore, we elucidated the mechanisms underlying this evolutionary adaptation through whole-genome sequencing and mutational analysis.

研究分野：応用微生物学

キーワード：適応的実験室進化 酸化的リン酸化 中枢代謝 呼吸鎖 NADHデヒドロゲナーゼ 酸化還元バランス
大腸菌 コリネ型細菌

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

化石燃料の枯渇に伴い、再生可能なバイオマス資源を用いる有用物質の生産方法として微生物による発酵生産が選択肢の一つとなっている。しかし、生物反応を利用する「ものづくり」は化学反応に比べて反応速度が遅いこと、しばしば低収率であることなどが実用化の妨げになっている。発酵生産の効率を高めるためには、原料となるグルコースなどの糖代謝、すなわち解糖系や TCA サイクルなどの中枢代謝による異化反応を活性化し、前駆体、還元力、エネルギーを速やかに取り出すこと、次にそれらを利用して有用物質を生成する生合成反応すなわち同化反応を効率よく行わせることが重要になる。研究分担者の横田らは、細胞のエネルギー充足度を低下させること (ATP 濃度の減少、NADH 濃度の減少) により、発酵生産の効率化につながる解糖系などの中枢代謝が活性化されると考え、エネルギー獲得の最重要システムである酸化リン酸化を抑制することで中枢代謝を強化できることを発見した (Yokota et al. 1994 Biosci. Biotechnol.; Noda et al. 2006 J. Bacteriol.)。好気性細菌は、酸素が存在する場合、主に ATP の収量が多い酸化リン酸化によってエネルギーを獲得している。酸化リン酸化は呼吸鎖によるプロトン (H⁺) の細胞膜外への排出によるプロトン駆動力 (PMF) の形成と、それを駆動力とした FoF₁-ATP synthase による ATP 合成の二段階からなっている。横田らは、通性好気性の大腸菌や偏性好気性のコリネ型細菌において FoF₁-ATP synthase や、その他の呼吸鎖酵素を不活性化させた変異株において、糖代謝活性の上昇による解糖系フラックスの増大が生じていることを明らかにした (Sekine et al. 2000 Appl. Microbiol. Biotechnol.; Kihira et al. 2012 J. Biotechnol.)。一方、中枢代謝の活性化を引き起こす FoF₁-ATP synthase 欠損などの変異導入は著しい増殖速度の低下を引き起こしてしまうため (Sawada et al. 2012 J. Biosci. Biotechnol.)、これらの変異株を直接発酵生産に応用することは難しい。人為的に酸化リン酸化を阻害した状態では、エネルギー欠乏状態に適応進化できていないため、一定の選択圧をかけた状態で継代培養するという適応的実験室進化により変異株を適応進化させることで増殖速度の向上が期待できると考えた。大腸菌やコリネ型細菌 (*Corynebacterium glutamicum*) は産業微生物として様々な有用物質の発酵生産に利用されている。そのため本研究では、大腸菌とコリネ型細菌を研究対象として使用した。

2. 研究の目的

本研究の問いは、「酸化リン酸化が阻害された時、好気性細菌が取り得る増殖の最適化戦略とは何か」ということである。酸化リン酸化を阻害すると中枢代謝が活性化して細胞当たりの発酵生産の効率が向上する一方、増殖阻害が原因で発酵生産に必要な細胞数が低下し、バッチ当たりの生産性向上が達成されないというジレンマが存在する。そこで本研究では、体系的な進化実験から研究の問いに対する答えを導き出すことで、産業微生物の細胞増殖と目的物質生産のバランスを最適化する方法の確立を目指した。そのため、本研究では、細菌が有するエネルギー欠乏への潜在的な適応能力を明らかにすることを第一の目的とした。また、エネルギー欠乏による代謝の活性化と細胞増殖のバランスを最適化させる方法を確認し、産業微生物の発酵生産効率を向上させることを第二の目的として研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌変異株の酢酸最少培地における適応的実験室進化

まず、大腸菌において、呼吸鎖、ATP 合成酵素 (F_oF₁-ATP synthase) および NADH と NADPH を相互変換するトランスヒドロゲナーゼに着目し、これらの単独、および多重欠損株の構築を Red と CRISPR/Cas9 を用いて行った。構築した様々な欠損株において、F_oF₁-ATP synthase の欠損、トランスヒドロゲナーゼである SthA の欠損、2 種類の NADH デヒドロゲナーゼ NDH I (*nuo* オペロンにコード) と NDH-II (*ndh* にコード) の二重欠損、および NDH-I とシトクロム *bo* オキシダーゼ (*cyo* オペロンにコード) の二重欠損株はいずれも酢酸を唯一の炭素源とした場合、増殖できないまたは、著しく生育開始が遅延することを見出した。そこで、これらの大腸菌変異株を親株として、酢酸最少培地において継代培養するという適応的実験室進化を行った。

実験室進化の方法は以下の通りである (図 1)。まず、大腸菌野生株 MG1655 株および、NDH-I 欠損株 (Δnuo 株)、FoF₁-ATP synthase 欠損株 (Δatp 株)、NDH-I と NDH-II の二重欠損株 ($\Delta nuo\Delta ndh$ 株)、NDH-I とシトクロム *bo* オキシダーゼの二重欠損株 ($\Delta nuo\Delta cyo$ 株)、およびシトクロム *bo* オキシダーゼと SthA の二重欠損株 ($\Delta cyo\Delta sthA$ 株) をそれぞれ祖先株とし、LB 液体培地で前培養した後、2 回菌体洗浄を行い、M9 酢酸最少培地に植菌した。培養は 37 °C で振とう培養し、培養中の菌体の生育はタイテック社製自動 OD モニターを使用した。生育が確認されるまで培養を継続し、対数増殖期中期に到達したカルチャーを再び新鮮な M9 酢酸最少培地に継代した。生育の安定的な回復または増殖速度の向上が十分確認された時点で、実験室進化を終了とした。実験室進化は各株 4 つの独立培養系列を維持した。実験室進化後の集団から M9 酢酸最少培地を用いて、シングルクローン化することで、各進化株を取得した。

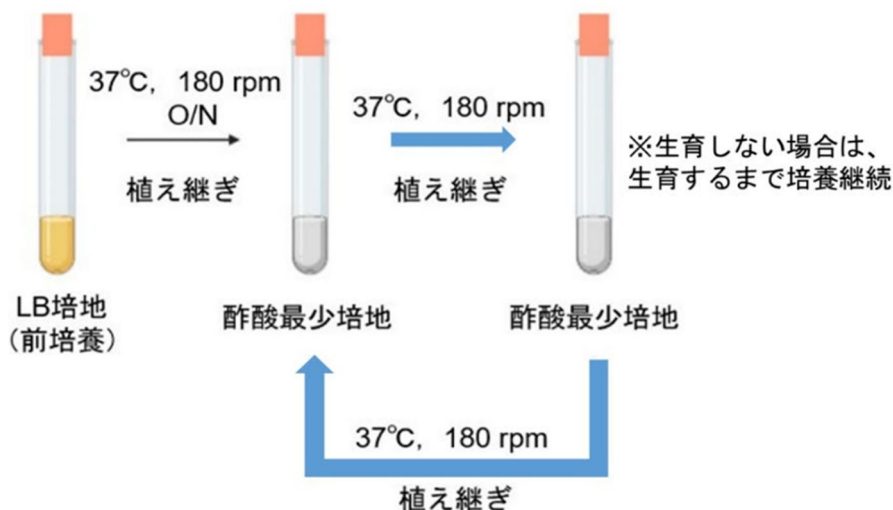


図 1. 酢酸最少培地における適応的実験室進化の方法

(2) コリネ型変異株の酢酸最少培地における適応的実験室進化

研究代表者はこれまでに、コリネ型細菌における NADH 再酸化に重要な二つの遺伝子 (NDH-II をコードする *ndh* とリンゴ酸デヒドロゲナーゼ MDH をコードする *mdh*) を欠損させた株 ($\Delta ndh\Delta mdh$ 株) が、グルコース最少培地において著しい増殖阻害を示す他、酢酸最少培地では生育できないことを発見していた (Maeda et al. 2021 Front Bioeng Biotechnol.). コリネ型細菌は、大腸菌とは異なり、プロトン駆動力形成能を有する呼吸鎖の NDH-I を有しておらず、NDH-II のみを有している。一方、コリネ型細菌は NDH-II 以外に、MDH と L-乳酸デヒドロゲナーゼ LDH が NDH-II の代替となる NADH 再酸化系として機能している。このうち MDH は、リンゴ酸:メナキノン酸化還元酵素 MQO とカップル反応を触媒し、正味の反応が NDH-II と等価であることが知られている (Molenaar et al. 2000 J. Bacteriol.). そこで本研究では、コリネ型細菌 *C. glutamicum* ATCC13032 株における $\Delta ndh\Delta mdh$ 株を祖先株として、(1)と同様に酢酸採用培地における適応的実験室進化を行った。ただし、*C. glutamicum* の場合、前培養には BHI 培地、最少培地には CGXII 培地を使用し、培養温度は 30 °C とした。

(3) 進化株の全ゲノムリシーケンス解析

実験室進化後にシングルクローン化した各種進化株に関して、ゲノム DNA を抽出し、Illumina Miseq を使用した全ゲノムのショートリードシーケンス解析を行った。変異の同定は BRESEQ を使用した。

4. 研究成果

(1) 大腸菌変異株の酢酸最少培地における適応的実験室進化

酢酸最少培地における適応的実験室進化の結果、 Δatp 株を除く他全ての変異株および野生株において、酢酸最少培地における生育が回復または、生育速度が向上した進化株が得られた。なお進化株が得られるまでに要した継代培養の回数は、MG1655 株、 Δnuo 株、および $\Delta cyo\Delta sthA$ 株では 10 回だった。一方、進化前の祖先株において酢酸最少培地における生育が確認できなかった $\Delta nuo\Delta ndh$ 株および $\Delta nuo\Delta cyo$ 株においては比較的少ない継代回数 (それぞれ 2 回および 4 回) で進化株を取得することができた。 $\Delta nuo\Delta ndh$ 株および $\Delta nuo\Delta cyo$ 株では、培養 1 回目の際、培養開始 3 日後において吸光度の上昇が観察されたため、比較的短期間で酢酸最少培地における生育を回復する復帰変異が獲得されたと思われる。一方、 Δatp 株では培養 1 回目において 1 週間培養を継続しても生育が開始された系列は確認されなかった。そのため実験室進化における継代操作として、1 週間培養を継続したカルチャーを一度 LB に酢酸ナトリウムを添加した液体培地で増菌した後、M9 酢酸最少培地に植え継ぎ、再び 1 週間培養を継続するという操作を 10 回繰り返した。しかしながら、10 回継代しても M9 酢酸最少培地における生育が見られた系列は存在しなかった。このように、FoF1-ATP synthase が存在しない場合、酢酸最少培地における生育を回復させるような進化は観察されなかったことから、酢酸を単一炭素源とした場合に、その生育には酸化的リン酸化が必須であり、発酵のみによる ATP 合成では生育を賄うのに十分な ATP を合成することが非常に困難であることが示唆された。

続いて、得られた進化株シングルクローンの M9 酢酸最少培地における生育を調べた (図 2)。野生型 MG1655 株においては元来生育の悪化は生じていないため、わずかな増殖速度の向上が見られた程度であるが、その他の Δnuo 株、 $\Delta cyo\Delta sthA$ 株、 $\Delta nuo\Delta ndh$ 株および $\Delta nuo\Delta cyo$ 株ではいずれも祖先株に比べて著しく生育が向上していた。また、 $\Delta nuo\Delta ndh$ 株由来の進化株 Line 4 は、他の進化株と比較して大幅な生育の改善が見られた。 $\Delta nuo\Delta ndh$ 株は、グルコース最少培地においても著しい生育阻害を示す一方、 $\Delta nuo\Delta ndh$ 株由来の進化株はグルコース最少培地における生育も親株と比較して著しく改善されていた (図 2)。

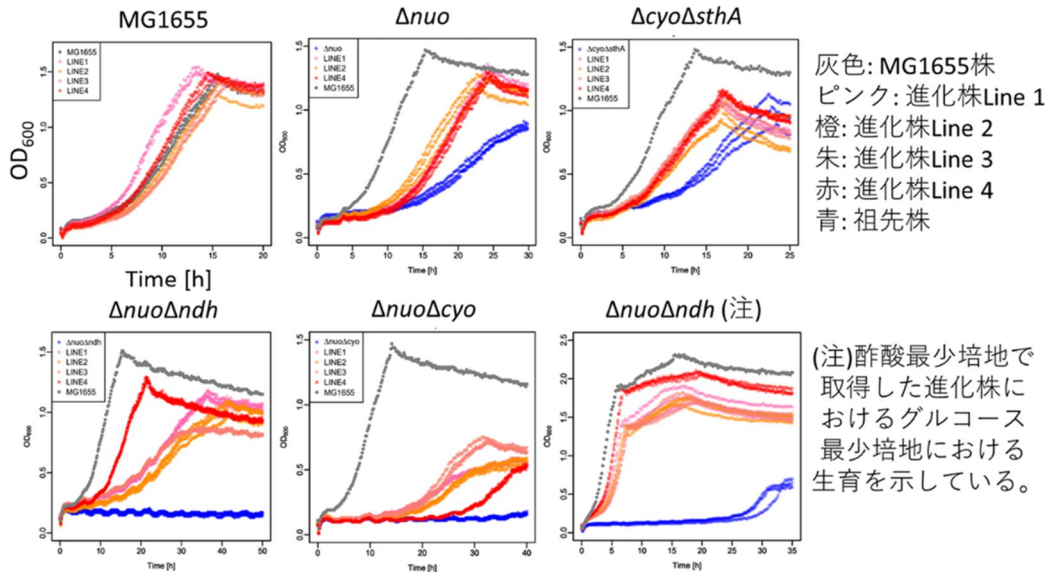


図2. 大腸菌進化株 (シングルクローン) のM9 酢酸最少培地における生育

(2) コリネ型変異株の酢酸最少培地における適応的実験室進化

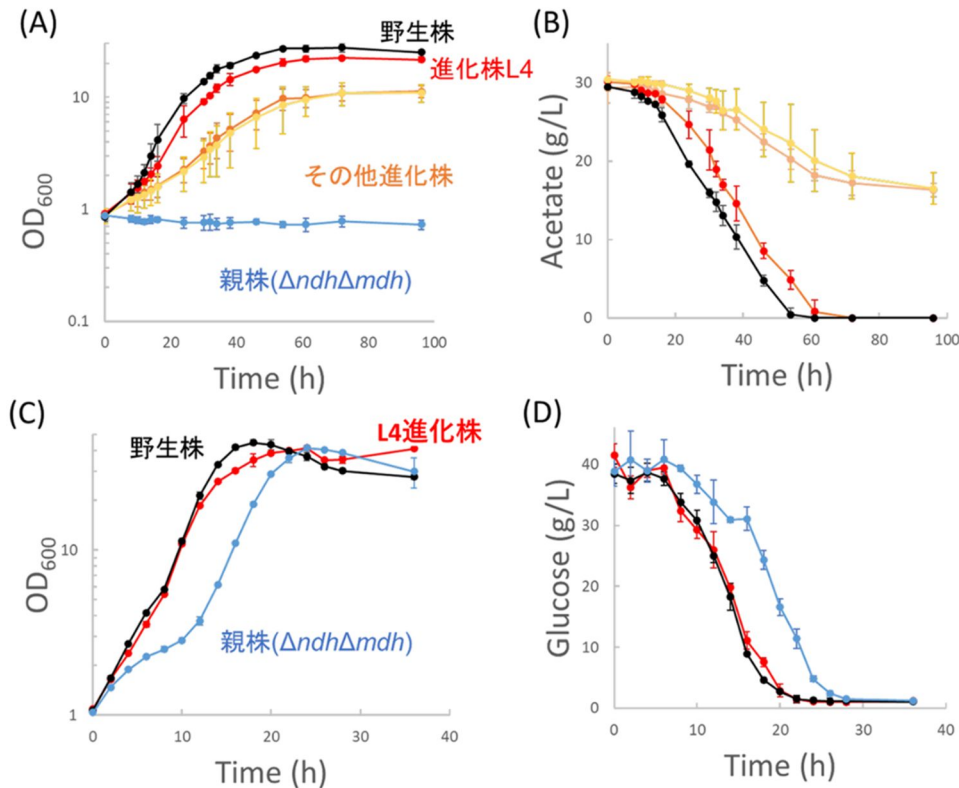


図3. コリネ型細菌 $\Delta ndh\Delta mdh$ 株における適応的実験室進化。進化株 (シングルクローン) の酢酸最少培地における生育 (A) および酢酸の消費 (B)。進化株 L4 のグルコース最少培地における生育 (C) とグルコース消費 (D)。

酢酸最少培地における適応的実験室進化の結果、 $\Delta ndh\Delta mdh$ 株において酢酸最少培地における生育が回復した進化株の出現が観察された。続いて、6つの独立培養系列から得られた進化株のシングルクローン6株のCGXII酢酸最少培地における生育を調べた(図3)。その結果、6系列全てにおいて酢酸最少培地における生育の回復が確認され、そのうちの1系列では残り5系列と比べて大幅な生育の改善が見られた。続いてこれら6系列のうち、生育の大幅な改善が見られたL4進化株に加え、残り2系列の進化株について、酢酸の消費をHPLCにより確認した(図3B)これらの結果、生育が回復した進化株の内、生育が比較的悪い2系列では酢酸を完全に消費しきれていなかった一方、L4進化株では培地中の全ての酢酸を消費しつくしていた。このことから、L4進化株以外の進化株は、酢酸の利用において生育を抑制する代謝中間体が蓄積している可能性が示唆された。

続いて、L4進化株に関して、グルコース最少培地における生育も改善しているのか調べた結

果、親株と比較して生育が大幅に改善し、野生株にほぼ匹敵する生育を示した（図 3C）。また、対数増殖期前期における糖消費速度を算出したところ、野生型 ATCC13032 株では 81.7 nmol/min/mgCDW、 $\Delta ndh\Delta mdh$ 株では 148.6 nmol/min/mgCDW であったのに対し、L4 進化株では 130.4 nmol/min/mgCDW であった。これらのことから、L4 進化株では祖先型の $\Delta ndh\Delta mdh$ 株には及ばないものの、野生型と比べて高い糖消費速度を維持できていることが確認された。

(3) 大腸菌進化株の全ゲノムリシーケンス解析

大腸菌進化株が獲得した変異を同定するために、各遺伝子欠損条件につき、4つの独立培養系から得られた進化株の全ゲノムリシーケンス解析を行った。その結果、 Δnuo 株および $\Delta nuo\Delta cyo$ 株由来の進化株では、それぞれ *ndh* および、*pdhR* または *cydA* のプロモーター領域に変異が見られた。*PdhR* はピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体 (PDHc) の転写制御因子として知られ、NDH-II の発現を抑制していることが先行研究より知られている (Ogasawara et al. 2007 J. Bacteriol)。一方 *CydA* は、呼吸鎖のシトクロム *bd* オキシダーゼのサブユニットであり、シトクロム *bo* オキシダーゼとはプロトン駆動力形成能が異なるアイソザイムの関係にある。これらのことから、 Δnuo 株および *nuo cyo* 株のように呼吸鎖のアイソザイムが残っている場合、その発現量を増大させることで、欠損した機能を補っていることが推察された。

一方、全ての *nuo ndh* 株の進化株において、*CipAXP* プロテアーゼの基質認識アダプターとして機能するシャペロンタンパク質 *CipA* をコードする遺伝子が破壊されていた。先行研究では *CipX* のターゲットとして glycerol-3-phosphate dehydrogenase や L-lactate dehydrogenase などキノンに電子伝達を行う酵素が同定されている (Flynn et al. 2003 Mol. Cell)。*cipA* 変異の効果を検証するため、*nuo ndh* 株から *cipA* を欠損させたところ、*nuo ndh* 株とは異なり、酢酸最少培地における生育が観察された他、グルコース最少培地における生育も改善していた。また、*nuo ndh* 株の進化株の内、一番生育が向上していた Line 4 進化株には、*cipA* 変異に加えて *MQO* をコードする *mgo* 遺伝子のプロモーター領域にも変異が入っていた。この *mgo* のプロモーター変異は、発現量の上昇を引き起こしている可能性が考えられたため、ローコピープラスミドベクターを元に、IPTG 誘導プロモーター制御によって *mgo* の発現を誘導可能なプラスミド *pmgo* を作成し、*nuo ndh* 株および *nuo ndh cipA* 株にそれぞれ形質転換し、酢酸最少培地における生育を確認した。その結果、いずれの株においても生育が確認された上、*nuo ndh cipA* 株のベクター導入株と比較して、*nuo ndh cipA* 株の *Mgo* 過剰発現株ではさらなる生育の向上が見られた。*Mgo* もキノンに電子伝達を行うことから、呼吸鎖の NADH デヒドロゲナーゼを欠損させても、キノンに電子伝達を行える酵素の活性を上昇させることでエネルギー欠乏に適應できることが示唆された。これらの結果から、*nuo ndh* 株の酢酸最少培地における生育回復には *cipA* の欠損および *mgo* の過剰発現のいずれかで十分であり、これらの変異を組み合わせるとさらなる生育の向上が引き起こされることが明らかになった。

cyo sthA 株の進化株では、反復系列進化株間において共通して見られた変異は、RNA ポリメラーゼのシグマ因子 *RpoS* をコードする *rpoS* 遺伝子および、tagatose 1,6-diphosphate aldolase をコードする *gatY* 遺伝子上に見られた。tagatose 1,6-diphosphate aldolase はガラクトールの代謝に関与する酵素であり、酢酸最少培地における生育との関連は不明である。一方、*RpoS* に関しては、定常期やストレス応答時における転写制御に関与するシグマ因子であるため、*cyo sthA* 株における酢酸代謝の問題を改善する上で、*rpoS* の変異によるトランスクリプトームの変化が生育の改善に寄与している可能性が考えられる。

(4) コリネ型細菌進化株の全ゲノムリシーケンス解析

コリネ型細菌進化株が獲得した変異を同定するために、L4 進化株を含む 3 進化株および祖先株について全ゲノムリシーケンス解析を行ったところ、進化株間における共通変異遺伝子として、推定 NAD(P)H-キノンデヒドロゲナーゼをコードする *lpdA* が同定された。本遺伝子に関しては研究報告が無く、酸化還元バランス調節に関与する新規酵素の可能性が考えられる。また、進化株 L4 には、*lpdA* の変異に加え、残りの進化株には見られない変異として転写因子 *SugR* をコードする遺伝子が破壊されている可能性が示唆された。研究代表者による先行研究により、コリネ型細菌の NADH 再酸化系は、NDH-II に加え、MDH/MQO のカップル反応の他に、NADH 依存型乳酸デヒドロゲナーゼの LDH とメナキノン依存型乳酸デヒドロゲナーゼ *LldD* によるカップル反応の合計 3 つが知られており、これら 3 つ以外には存在しないことが示唆されている (Maeda et al. 2021 Front Bioeng Biotechnol.)。そのため $\Delta ndh\Delta mdh$ 株では、NADH 再酸化系に関して、LDH/*LldD* カップル反応のみに依存していると考えられる。転写因子の *SugR* は、糖が存在しない条件において LDH をコードしている *ldhA* を含む解糖系酵素をコードする遺伝子群の転写を抑制することが知られている (Toyoda et al. 2009 Appl Microbiol Biotechnol.)。そのため、酢酸最少培地において $\Delta ndh\Delta mdh$ 株では、残り唯一の NADH 再酸化系である LDH の発現が抑制された状態となっていると考えられる。このような状況下において L4 進化株では、*SugR* が破壊されるような変異を獲得したことにより、LDH の発現量が増加し、その結果 NADH の再酸化における問題が改善して生育の大幅な向上が生じたと推察された。

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 Hirasawa Takashi, Maeda Tomoya	4. 巻 11
2. 論文標題 Adaptive Laboratory Evolution of Microorganisms: Methodology and Application for Bioproduction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 92～92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms11010092	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4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前田 智也
2. 発表標題 大腸菌におけるエネルギーおよび酸化還元レベルと 表現型の関係
3. 学会等名 日本遺伝学会第94回大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山上 晃汰郎、小谷 葉月、吹谷 智、古澤 力、前田 智也
2. 発表標題 実験室進化による大腸菌のエネルギーおよび 酸化還元バランスの不均衡化に対する適応機構の解明
3. 学会等名 第17 回 日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今壮太、前田智也、吹谷智、和田大、横田篤
2. 発表標題 大腸菌の呼吸鎖変異株におけるグルタミン酸脱水素酵素及び、グルタミン酸合成酵素の欠損がグルタミン酸異常蓄積に及ぼす影響
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 若原洋輝、溝越拓哉、前田智也、吹谷智、横田篤
2. 発表標題 呼吸鎖変異大腸菌株を用いたグルコースからのGABAの高生産
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022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	横田 篤 (Yokota Atsushi) (50220554)	北海道大学・農学研究院・教授 (10101)	

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		
ドイツ	Forschungszentrum Juelich		