

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14777

研究課題名（和文）複数の炭素源の同時利用を前提とした合理的代謝設計による高収率物質生産技術の開発

研究課題名（英文）Development of rational metabolic design techniques based on co-utilization of multiple carbon sources for high-yield production of valuable chemicals

研究代表者

藤原 良介 (Fujiwara, Ryosuke)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：60880797

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：廃グリセロールの資源化を目指し、メタノールおよびグリセロールを同時に資化可能な *M. extorquens* 代謝改変株の構築を行った。内在遺伝子 *Mext_4066* を過剰発現させることで、グリセロール単一炭素源で増殖させることに成功した。またメタノール由来の炭素を目的生産物に効率的に利用するため、競合反応を触媒するギ酸デヒドロゲナーゼ (FDH) の破壊を行った。4つのFDH遺伝子を破壊した4重破壊株の作成に成功し、ギ酸デヒドロゲナーゼ活性が喪失していることを確認した。しかしながら、ギ酸の蓄積により増殖阻害が引き起こされ、メタノールを物質生産に利用する際はギ酸代謝の改善が必要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

廃グリセロールは未活用の再生可能資源であり、微生物発酵生産の有望な原料である。本研究では、メタノール資化性細菌 *M. extorquens* を用いて、廃グリセロール中に含まれるグリセロール及びメタノールから、高付加価値化合物を高収率で生産する技術の開発を試みた。まず、*M. extorquens* にグリセロール資化能を付与した。グリセロールを資化可能にすることで、元来 *M. extorquens* の細胞増殖に必須である、メタノールのCO₂酸化経路の破壊が可能となる。この代謝改変により、原料メタノールを全て物質生産に利用することができ、目的生産物収率の飛躍的な向上が期待される。

研究成果の概要（英文）：In order to utilize crude glycerol as a resource, we constructed a metabolically engineered strain of *M. extorquens* that can simultaneously utilize both methanol and glycerol. By overexpressing the endogenous gene *Mext_4066*, we succeeded in growing the strain on glycerol as a sole carbon source. In addition, to efficiently utilize the carbon derived from methanol to produce the target product, we disrupted formate dehydrogenase (FDH), which catalyzes a competing reaction. We successfully constructed a quadruple-knockout strain in which four FDH genes were disrupted, and confirmed that formate dehydrogenase activity was lost. However, growth inhibition was caused by the accumulation of formate, suggesting that improvement of formate metabolism is necessary when using methanol as a substrate for bioproduction.

研究分野：代謝工学

キーワード：Methylorubrum extorquens Metabolic engineering 発酵生産 廃グリセロール メタノール グリセロール

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

持続可能な社会に向け、現在利用されずに廃棄されている、未活用な再生可能資源を有効利用する技術の開発は急務である。廃グリセロールは、バイオディーゼル燃料 (BDF) 生産の副産物であり、世界で年間約 300 万トンが生産されている。精製することでグリセロールとして商品化できるが、低単価でコストメリットが無いためその多くは焼却処分されている。また、廃グリセロールには不純物として 15~20% 程度のメタノールが含有しており、利用方法を制限する原因となっている (図 1)。

近年、廃グリセロールの有効利用に向け、グリセロールを原料とした微生物発酵生産に関する研究が盛んに行われているが、それらの研究では炭素源としてグリセロールにのみ着目している。グリセロールを単一原料とした発酵生産では、原料の精製プロセスが必要な上、メタノールを資源として利用できない点が課題となる。プロセスを簡略化し、廃グリセロールを資源として無駄なく利用するには、グリセロールだけでなくメタノールも炭素源として同時に利用する技術が求められる。

また、微生物による有用化合物の発酵生産において、宿主や目的化合物、炭素源の種類によらず、炭素収率の低さは共通の課題である。バイオプロセスでは「生産工場」である細胞自身の増殖にも、原料の炭素源が利用される。炭素収率の向上には細胞増殖に利用される炭素量を減らす必要があるが、必須代謝経路の破壊等を行うと、細胞構成要素やエネルギーが十分に供給されず、生産性が著しく低下するというジレンマを抱えている。言い換えれば、必須代謝経路の破壊のような致命的な代謝改変を行っても、細胞増殖を維持できる技術の開発は、宿主や目的化合物を問わず、バイオプロダクションの発展に大きく貢献する。

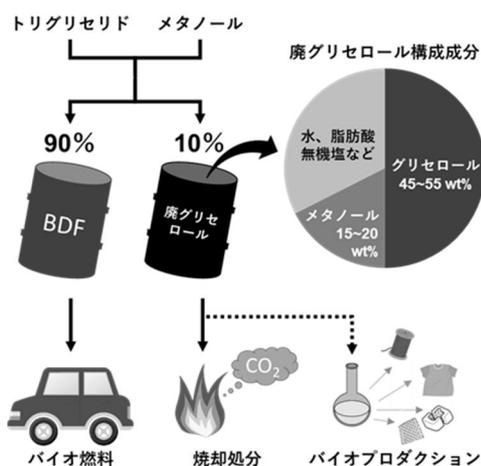


図 1 廃グリセロールの利用

2. 研究の目的

本研究はメタノール資化性細菌 *Methylorubrum extorquens* にグリセロール資化能を付与・強化することで、廃グリセロールを直接炭素源として利用した物質生産技術の開発を試みた。*M. extorquens* は取り込んだメタノールを CO₂ に酸化してエネルギーを獲得する代謝経路を保有しており、メタノールの 8 割以上がこの経路で消費される (Peyraud et al. *BMC Systems Biology*, 2011)。そのためメタノールを炭素源とした、物質生産における基質当たりの目的生産物の収率が非常に低い。本研究では *M. extorquens* にグリセロール資化能を付与し、元来細胞増殖に必須であるメタノールの CO₂ 酸化経路の破壊を可能にする。この改変によりメタノールを全て物質生産に利用でき、収率の飛躍的向上が期待される。

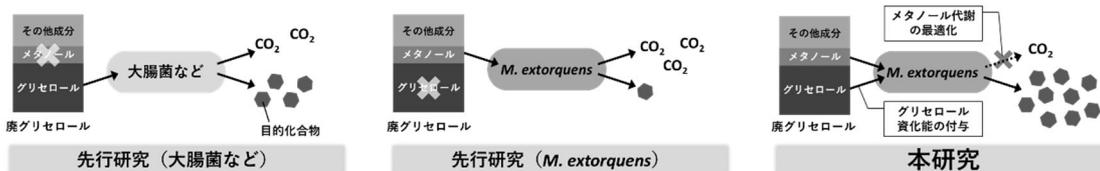


図 2 本研究の独自性 (先行研究との比較)

3. 研究の方法

本研究では *M. extorquens* PA1 株を宿主に用いた。PA1 株はグリセロール代謝に関連すると推定される遺伝子群を有するが、実際に PA1 株をグリセロールで培養した報告は無い。予備実験において、グリセロール単一炭素源条件では PA1 株は極めて遅い増殖速度を示したことから、関連遺伝子の過剰発現等を行いグリセロール資化能の強化を検討した。次に、メタノールの資化において主要な競合経路の破壊を行った。具体的には formate dehydrogenase をコードする遺伝子を破壊することでメタノールから生成されるギ酸の CO₂ 酸化を行わない代謝改変株を構築する。これにより、メタノールとグリセロールを同時に資化可能な代謝改変株を構築した。

4. 研究成果

M. extorquens PA1 野生株に対して putative glycerol kinase (Mext_4066) をプラスミドを利用して過剰発現させることで、グリセロール単一炭素源での増殖を確認した (図 2)。 *M. extorquens* PA1 株をグリセロール炭素源で増殖させた報告は過去に無く、本研究が初となる。続いてゲノム上に

同遺伝子を組み込んだ株を構築し、同様の培地での培養を行ったが、細胞増殖速度は野生株と同程度であった。このことからグリセロールの効率的な資化には Mext_4066 をプラスミドにより高発現させる必要があることが示唆された。Mext_4066 過剰発現株においてグリセロール資化代謝の最適化を行うため、継代培養を検討した。5代目まで継代を行うことで増殖初期における細胞増殖速度の向上が確認された。しかしながら、メタノール単一炭素源培地と比較すると依然として増殖速度は遅い結果となった。また最大菌体密度は1回目の継代によって低下した。これらの結果から、グリセロール炭素源での増殖速度の更なる向上には、グリセロール資化に関わる Mext_4066 以外の遺伝子群の過剰発現が必要ではないかと示唆された。具体的には、グリセロール資化においてより下流の反応である Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (Mext_0730, Mext_4792) などの過剰発現株を構築することで、グリセロール資化能を改善した代謝改変株が構築可能であると期待され、現在当該の代謝改変株を構築中である。

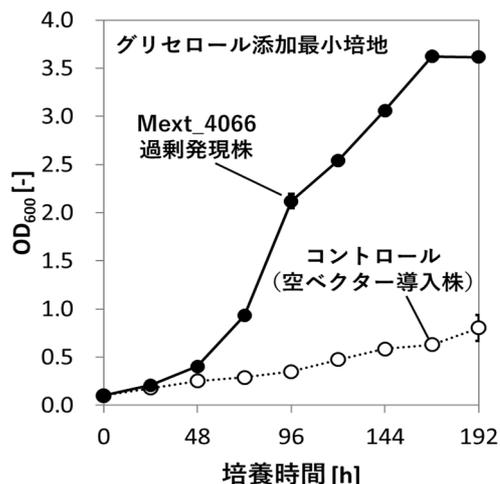


図 3 PA1 株 細胞増殖

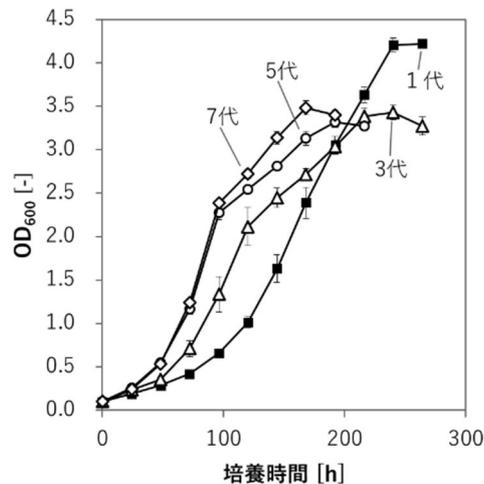


図 4 グリセロール培地での継代培養

また、メタノール由来の炭素を目的生産物に効率的に利用するため、競合反応を触媒する酵素である formate dehydrogenase (FDH)の破壊を検討した。接合伝達大腸菌を用いた遺伝子破壊の操作において、大腸菌-*M. extorquens* 混合培養体から *M. extorquens* のみを得るために大腸菌が増殖できないメタノール培地での培養を行うステップがあるが、本研究ではメタノール資化経路の破壊を行うため、別の原理によるスクリーニング法の開発が必要となった。そこでクロラムフェニコール耐性遺伝子をゲノム上に組み込み、新たな遺伝子破壊操作プロトコルを確立した。この遺伝子破壊プロトコルを用いて、内在する4つのFDH遺伝子(Mext_4582, Mext_0389, Mext_4405-4406, Mext_2105)を破壊した4重破壊株の作成に成功した。FDH単一破壊株及び、2重、3重破壊株では、メタノール単一炭素源培地において野生株と増殖速度及び最大菌体密度に有意な差は確認されなかった。一方、4重破壊株では増殖速度及び最大菌体密度が顕著に低下していた(図5)。また、4重破壊株では培地中にギ酸の蓄積が確認されたことから、ギ酸デヒドロゲナーゼ活性が完全に喪失していることが示唆された。FDHの破壊によるギ酸の蓄積は想定していた結果であるが、遺伝子破壊操作が想定以上に時間を要したため、ギ酸代謝改善のを改善した代謝改変株の構築には至らなかった。今後、引き続きギ酸代謝改変株の構築を行うことで、メタノールから高収率で物質生産が可能な技術の確立を目指す。

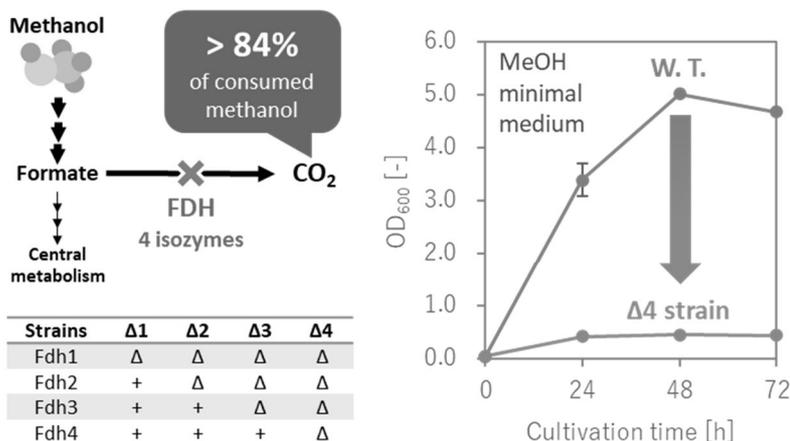


図 5 FDH 4 重破壊株 (4 株) 細胞増殖

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2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 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 Fujiwara Ryosuke, Nakano Mariko, Hirata Yuuki, Otomo Chisako, Nonaka Daisuke, Kawada Sakiya, Nakazawa Hikaru, Umetsu Mitsuo, Shirai Tomokazu, Noda Shuhei, Tanaka Tsutomu, Kondo Akihiko	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 Doke Misa, Kishida Mayumi, Hirata Yuuki, Nakano Mariko, Horita Mayo, Nonaka Daisuke, Mori Yutaro, Fujiwara Ryosuke, Kondo Akihiko, Noda Shuhei, Tanaka Tsutomu	4. 巻 1
2. 論文標題 Hydroxybenzoic Acid Production Using Metabolically Engineered Corynebacterium glutamicum	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Synthetic Biology and Engineering	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35534/sbe.2023.10010	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 Noda Shuhei, Fujiwara Ryosuke, Mori Yutaro, Dainin Mayumi, Shirai Tomokazu, Kondo Akihiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Styrene Production in Genetically Engineered Escherichia coli in a Two-Phase Culture	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 BioTech	6. 最初と最後の頁 2 ~ 2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biotech13010002	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Rysuke Fujiwara, Tomokazu Shirai, and Akihiko Kondo
2. 発表標題 Bioproduction of aromatic compounds from C1-C2 compounds using metabolic engineered methylotroph
3. 学会等名 European Biotechnology Congress 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Rysuke Fujiwara, Tomokazu Shirai, and Akihiko Kondo
2. 発表標題 Metabolic Engineering of Methylobacterium extorquens for Bioproduction of Aromatic Compounds from C1-C2 Compounds
3. 学会等名 The 35th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------