

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：15501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25892021

研究課題名(和文) 分岐鎖低分子アルデヒド還元酵素の同定とその“非天然型”バイオケミカル生産への応用

研究課題名(英文) Identification of short and branched-chain aldehyde reductases and its application for unnatural biochemical production

研究代表者

片岡 尚也 (KATAOKA, Naoya)

山口大学・農学部・助教

研究者番号：50713509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに構築していた1,3-ブタンジオール合成代謝経路を賦与した大腸菌を用いて、培養条件を最適化することで生産性を向上させた。大腸菌に内在するadhP, eutG, yqhDの3つが3-ヒドロキシブチルアルデヒドの1,3-ブタンジオールへの還元に関するアルコール脱水素酵素遺伝子であると同定した。1,3-ブタンジオール合成代謝経路を拡張することで新規ブタノール合成代謝経路を設計し、大腸菌に賦与することで好氣的ブタノール生成を可能にした。

研究成果の概要(英文)：The fermentation conditions including pH and overall oxygen transfer coefficient (kLa) were optimized to improve 1,3-butanediol production by metabolically engineered Escherichia coli. AdhP, EutG, and YqhD in E. coli were identified as alcohol dehydrogenases that catalyze the reduction of 3-hydroxybutyraldehyde to 1,3-butanediol. A CoA-dependent butanol synthetic pathway that functions under aerobic conditions was constructed in E. coli, by expanding the previously reported 1,3-butanediol synthetic pathway.

研究分野：微生物代謝

キーワード：1,3-ブタンジオール ブタノール 3-ヒドロキシブチルアルデヒド 大腸菌 合成代謝経路 アルコール脱水素酵素 代謝工学 合成生物学

1. 研究開始当初の背景

原油や天然ガスは、輸送原料や各種化学物質・先端材料などの化成品を製造する際の主要原料およびプロセス運転のエネルギー源として用いられている。しかし、近年の環境問題や不安定な化石燃料価格に対する関心の高まりにより、植物原料などの再生可能資源の利用、低エネルギーかつ廃棄物や温室効果ガス排出量削減を可能にする持続可能なプロセス開発に注目が集まっている。生物機能を活用する代謝工学は、この必要性に取り組む上で、効果的なアプローチである。

これまで主に、遺伝子組換えが容易、ゲノム情報が完備、代謝経路がよく知られている、増殖速度が速い、という特徴を持つ大腸菌を宿主として分子育種することで、様々な化合物の生産が行われてきた。しかしそれらは全て、生物が天然に生産する報告例のあるもので、代謝経路が既に存在するものであった。代謝工学の未来を考えるなら、今後は、生物機能を最大限活用し、生物が天然に持たない、非天然型の代謝経路を人工的に設計することによる有用物質生産に挑戦して行くことが、新規フィールドの一つになりうる。そこで、我々の研究グループは、合成ゴムの重要中間体であるブタジエンに容易に化学変換できることから、合成ゴムのバイオベース化という観点から注目されている 1,3-ブタンジオール (1,3-BD) を標的とし、ポリヒドロキシ酪酸生産微生物 *Ralstonia eutropha* およびブタノール生産微生物 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* の持つ代謝系を組み合わせることで人工 1,3-BD 合成代謝経路を設計 (図1) するとともに、大腸菌に賦与することでフラスコレベルでのグルコースからの 1,3-BD 生産を達成した。この経路は、1,3-BD 生合成における不完全な経路の付与しか行っていないにもかかわらず、1,3-BD が生成していた。つまり、3-ヒドロキシブチルアルデヒド (3-HBA) の 1,3-BD への還元は宿主に用いた大腸菌に内在する酵素が触媒することが明らかになった。

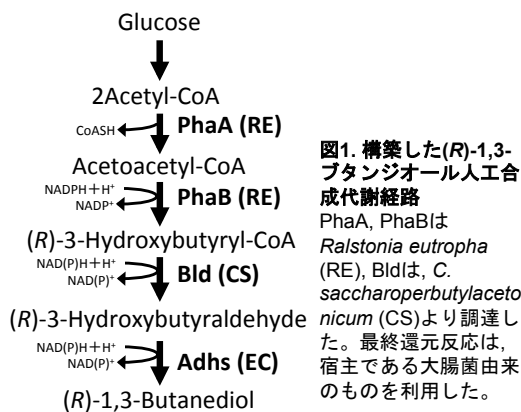


図1. 構築した(R)-1,3-ブタンジオール人工合成代謝経路  
PhaA, PhaBは *Ralstonia eutropha* (RE), Bldは、*C. saccharoperbutylacetonicum* (CS)より調達した。最終還元反応は、宿主である大腸菌由来のものを利用した。

2. 研究の目的

(1) 培養条件の最適化による 1,3-BD 生産の効率化

前述のように、我々は、フラスコレベルで

の 1,3-BD 生産を達成することに成功したが、その培養条件は最適化していなかった。そこで、バイオリアクターを用いて培養条件を最適化することで 1,3-BD 生産の効率化を検討する。

(2) 大腸菌に内在する 3-HBA 還元酵素と 3-HBA 生産

前述のように、3-HBA の 1,3-BD への還元は宿主として用いた大腸菌の内在性酵素が触媒していると考えられる。3-HBA は、産業的に重要な中間体であり、主に、ポリマー原料である 3-ヒドロキシ酪酸やアセタール、オキシム、アミンの合成中間体としての用途を持つ有用物質である。そこで、大腸菌において 3-HBA の還元を担う酵素の遺伝子の同定を行うことに加え、同定した酵素遺伝子を欠損した株を作製することで、グルコースからの 3-HBA 生産を試みる。

(3) 1,3-BD 合成代謝経路の拡張による好氣的ブタノール生産技術の開発

ブタノールは、有機合成における溶媒のほか、プラスチックや塗料、ラテックスなど化成品の原料として広く利用されている。さらに近年では、エタノールに代わる次世代バイオ燃料としても大きく期待されている化合物である。これまで、ブタノール発酵微生物である *Clostridium* 属を用いたブタノール生産研究のほか、大腸菌に *Clostridium* 属の持つ代謝経路を基盤に改変された合成代謝経路を賦与することによる、ブタノール生産に関する研究が報告されている。しかし、好気培養でのブタノール生産に関する報告例は極めて少ない。

我々は、バイオリアクターでの 1,3-BD 生産の効率化を検討した際に、1,3-BD が、高い酸素供給条件で効率的に生産される結果を得た。また、我々の構築した 1,3-BD 合成代謝経路は、さらに二つの遺伝子を導入することで原理的に、ブタノールの合成代謝経路となる特徴を持っていた。そこで、本研究では、1,3-BD 合成代謝経路を拡張し、新規ブタノール合成代謝経路を設計するとともに、大腸菌に賦与することで、好気培養条件でブタノールを生産しうるか検証する。

3. 研究の方法

(1) 培養条件の最適化による 1,3-BD 生産の効率化

バイオリアクターを用いて、様々な pH、酸素供給速度での 1,3-BD 生産を評価した。

(2) 大腸菌に内在する 3-HBA 還元酵素と 3-HBA 生産

3-HBA を 1,3-BD へ還元する酵素は、アルコール脱水素酵素 (Adhs) であると考えられるため、大腸菌に存在する Adhs 遺伝子 *adhP*, *eutG*, *yiaY*, *yjgB*, *yqhD* がその候補遺伝子となる。3-HBA 還元活性を持つ株では、1,3-BD 生

産が低下もしくは消失すると予想されるため、Keio knockout collectionの一遺伝子欠損株に、1,3-BD 合成代謝経路を賦与した後、1,3-BD 生産を評価した。

3-HBA 還元活性を有すると考えられる複数の酵素遺伝子を欠損させた株を作製した後、1,3-BD 合成代謝経路を賦与することでプラスコレベルでのグルコースからの 3-HBA 生産を評価した。

### (3) 1,3-BD 合成代謝経路の拡張による好氣的ブタノール生産技術の開発

1,3-BD 合成代謝経路を基盤に、新規ブタノール合成代謝経路を設計し、大腸菌に賦与することでブタノール生産株を作製した。新規ブタノール合成代謝経路でのブタノール生産の可能性を評価するべく、バイオリアクターを用いて、生産の効率化を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 培養条件の最適化による 1,3-BD 生産の効率化

培養工学的アプローチによるバイオリアクターでの 1,3-BD 生産の向上に取り組んだ。1,3-BD は、グルコースがアセチル CoA に代謝された後、三段階の還元反応を経ることで生成される。すなわち、培地への酸素供給速度が、レドックスバランスの観点から 1,3-BD 生産における重要な因子の一つであると考えられた。また、主な副産物である酢酸の培地への蓄積は、代謝の阻害を引き起こすことから、長期間の培養では低濃度に保つことが望ましい。そこで、1,3-BD 生産時における総括酸素移動容量係数 ( $k_{La}$ ) および pH を制御することによる生産の効率化を検討した。その結果、初発グルコース 222 mM (40 g/L) を含む発酵培地で、 $k_{La}$ : 82.3 h<sup>-1</sup>, pH: 5.5 に制御した回分培養を行うことで、36 時間の培養の後、98.5 mM (8.88 g/L) の 1,3-BD を収率 0.444 mol/mol glucose, 生産速度 2.34 mM/h (0.211 g/L/h), (*R*)-体光学純度 98.6% ee で生産することに成功した。さらに、同条件下で、基質であるグルコースを枯渇させないよう一定時間おきに添加する流加培養を試みたところ、96 時間の培養で 1,3-BD 生産量は 175 mM (15.8 g/L) に達した (図 2)。

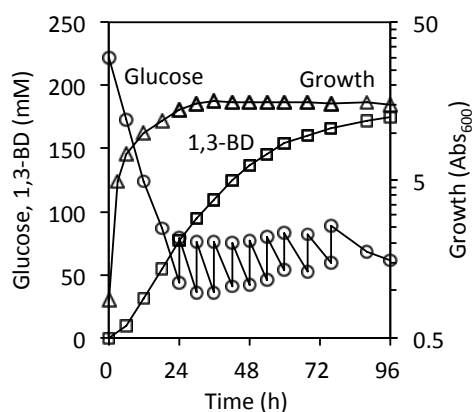


図2. 流加培養による1,3-BD生産

副産物としては、酢酸のほか、エタノールの副産物が観察されていたことから、これら副産物の生合成遺伝子を欠損することで更なる生産の効率化が見込めると考えられた。

### (2) 大腸菌に内在する 3-HBA 還元酵素と 3-HBA 生産

まず、3-HBA 還元酵素遺伝子の同定に取り組んだ。大腸菌の一遺伝子欠損株ライブラリーである Keio knockout collection を用いて、3-HBA 還元活性を有すると考えられる五つのアルコール脱水素酵素遺伝子 (*adhP*, *eutG*, *yiaY*, *yjgB*, *yqhD*) 欠損株にこれまでに構築に成功している 1,3-BD 生産ベクターを賦与し、1,3-BD 生産性を評価した。その結果、*adhP*, *eutG*, *yqhD* それぞれを欠損した三株で 1,3-BD 生産の顕著な低下が観察された。この結果は、これら三遺伝子のコードする酵素が 3-HBA の還元活性を有することを示唆している。

次いで、上で得られた知見を基に、3-HBA 還元酵素遺伝子三つ全てを欠損した三重破壊株 ( $\Delta adhP \Delta eutG \Delta yqhD$ ) を作製した後、1,3-BD 生産ベクターを賦与し、従来の方で生産を試みた。その結果、3-HBA の生産は確認されず、乳酸の顕著な蓄積が確認された。そこで、乳酸脱水素酵素遺伝子である *ldhA* の欠損を先の三遺伝子欠損株に導入することで四遺伝子欠損株 ( $\Delta adhP \Delta eutG \Delta yqhD \Delta ldhA$ ) を作製し、同様の方法にて生産を試みたが、ここでも 3-HBA の生産は確認できなかった。これは、アセチル CoA からの 3-HBA 生産の場合、1,3-BD 生産と比較して還元反応数が二段階と少なく、余剰の還元力の吐き出し口がなく、結果として発酵がうまく回らなかったことが原因の一つとして考えられた。そこで、通常の通気量よりも高い通気条件でさらなる検討を続けたが、3-HBA の生産は最後まで観察することができなかった。生産が確認されなかった他の原因としては、3-HBA の持つ生物毒性が挙げられる。そのため、3-HBA 生産は、3-HBA への耐性を有する株を活用する、または、大腸菌に 3-HBA 耐性を賦与するといった試みが必要であるのかもしれない。

### (3) 1,3-BD 合成代謝経路の拡張による好氣的ブタノール生産技術の開発

1,3-BD 合成代謝経路を基盤とした新規ブタノール合成代謝経路を設計、賦与することで大腸菌を宿主とした好氣的ブタノール生産に取り組んだ。

まず、1,3-BD 合成代謝経路に、*Treponema denticola* 由来 *ter* および *Aeromonas caviae* 由来 *phaJ* を加え、図 3 に示す新規ブタノール合成代謝経路を設計し、大腸菌に賦与した。作製した株を用いて、様々な通気レベルでのブタノール生産を試みた。その結果、1,3-BD 生産と同様に、高い通気レベルでブタノール生産を確認することができた。これは、発現した異種由来の全ての遺伝子が機能するかた

ちで発現されたことに加え、設計した合成代謝経路でブタノールを生産可能であることを示している。

次いで、構築した新規ブタノール合成代謝経路のブタノール生産への可能性を評価すべく、培養条件の最適化に取り組んだ。

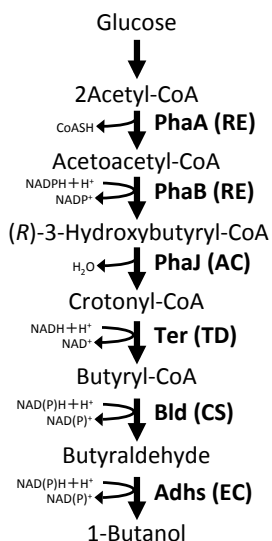


図3. 構築した新規ブタノール合成代謝経路 (R)-1,3-ブタンジオールの系に *Aeromonas cavise* (AC)由来PhaJ, *Treponema denticola* (TD)由来Terを加えた。

1,3-BD の時と同様に、様々な pH,  $k_{La}$  でのブタノール生産を回分培養にて評価した。その結果、初発グルコース 222 mM (40 g/L) を含む発酵培地で、 $k_{La}$ :  $76.6 \text{ h}^{-1}$ , pH: 6.0 に制御した際に、24 時間の培養の後、84.7 mM (6.28 g/L) のブタノールを生産することに成功した。さらに、同条件下で、基質であるグルコースを枯渇させないように一定時間おきに添加する流加培養を試みたところ、46 時間の培養で 1,3-BD 生産量は 116 mM (8.60 g/L) に達した (図 4)。副産物としては、1,3-BD 同様に、酢酸、エタノールの副生が観察されていたことから、これら副産物の生合成遺伝子を欠損することで更なる生産の効率化が見込めると考えられた。

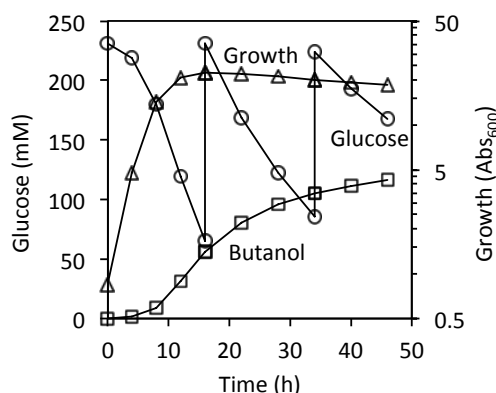


図4. 流加培養によるブタノール生産

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Kataoka N, Vangnai AS, Pongtharangkul T, Tajima T, Yakushi T, Matsushita K, Kato J. Construction of CoA-dependent 1-butanol synthetic pathway functions under aerobic conditions in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, 査読有, 204: 25-32. (2015). doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.03.027.
- ② Kataoka N, Vangnai AS, Ueda H, Tajima T, Nakashimada Y, Kato J. Enhancement of (R)-1,3-butanediol production by engineered *Escherichia coli* using a bioreactor system with strict regulation of overall oxygen transfer coefficient and pH. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, 78(4): 695-700. (2014). doi: 10.1080/09168451.2014.891933.
- ③ 片岡 尚也, 加藤 純一. 組換え大腸菌による非天然型(R)-1,3-ブタンジオールの発酵生産. *バイオサイエンスとインダストリー*, 査読無, 72(1): 32-33. (2014).
- ④ Kataoka N, Vangnai AS, Tajima T, Nakashimada Y, Kato J. Improvement of (R)-1,3-butanediol production by engineered *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, 115(5): 475-480. (2013). doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.11.025.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 片岡 尚也, Vangnai Alisa S., 加藤 純一, 薬師 寿治, 松下一信. 組換え大腸菌による好氣的ブタノール生成. 第 66 回日本生物工学会, 2014 年 9 月 9 日 -11 日, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市).
- ② 片岡 尚也, Vangnai Alisa S., 田島 誉久, 中島田 豊, 加藤 純一. 大腸菌による 1,3-ブタンジオール生産の効率化. 第 65 回日本生物工学会, 2013 年 9 月 18 日 -20 日, 広島国際会議場 (広島県広島市).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片岡 尚也 (KATAOKA, Naoya)

山口大学・農学部・助教

研究者番号: 50713509