

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02863

研究課題名(和文)大腸菌の呼吸鎖欠損株が示す異常な糖代謝の機構解明と発酵生産ロバスト化への応用

研究課題名(英文) Metabolic analysis of an Escherichia coli mutant defective in respiratory chain enzymes and its application to the production of 1,3-butanediol and gamma-aminobutyric acid.

研究代表者

横田 篤 (Atsushi, Yokota)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：50220554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、野生株W1485から取得した 株(NDH-IとCytb3を共に欠損)が糖消費活性と呼吸活性の著しい上昇、酢酸の生成、NADHの滞留、グルタミン酸(Glu)の著量蓄積などの異常な糖代謝を示すことを発見した。さらにメタボローム解析、RNA-Seqにより、ペントースリン酸経路、酢酸生成経路に加えて、Gluを  $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)に変換するグルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子gadABなどの発現上昇が認められた。また、 株を用いた発酵生産の効率化について、1,3-ブタンジオールとGABAの高生産化を目指し、どちらの物質に対しても 変異が生産性向上に寄与することを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者は発酵生産の効率化を目的として研究を進め、これまでに酸化的リン酸化の不具合によるエネルギー欠乏の誘導が異化代謝を活性化して生産性向上に有効であることを示してきた。本研究では大腸菌の呼吸鎖酵素二重欠損 株が示すエネルギー欠乏への適応機構を明らかにすることで、有用物質生産のためのロバスト(強靱)な大腸菌宿主が開発可能になる。本研究では、産業界に高い需要があるGABAと1,3-BDの発酵生産向上に変異が有用であることを実証することができた。これらの成果は、大腸菌の生理学と発酵工業における有用物質生産の両方に関わっており、基礎科学と産業応用の双方における大きく貢献できると思われる。

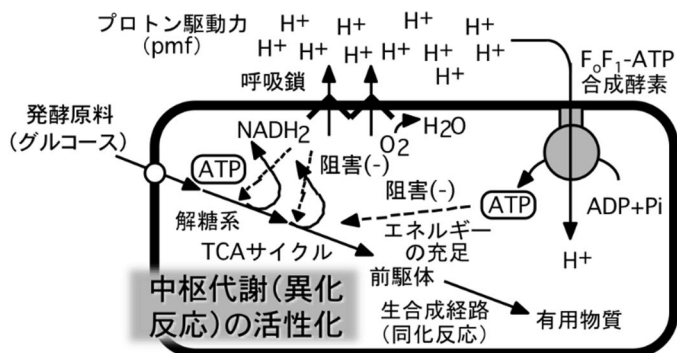
研究成果の概要(英文)：The respiratory chain of Escherichia coli includes NADH dehydrogenase (NDH) and terminal oxidase. We previously knocked out the highest proton-motive force-generating capacity components (NADH dehydrogenase-1 and cytochrome bo3 oxidase) using the E. coli wild-type W1485 strain. In this study, we found that the double knockout mutant strain ( strain) showed an increase in the glucose consumption rate, respiration rate, acetate production, NADH/NAD<sup>+</sup> ratio, and glutamate production. A metabolome analysis and RNA-seq analysis revealed that genes encoding for pentose phosphate pathway, acetate metabolism, and gadAB encoding glutamate decarboxylase were significantly increased. We also demonstrated that the strain can be applied for the production of 1,3-butanediol and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA).

研究分野：応用微生物学

キーワード：大腸菌 呼吸鎖 グルタミン酸  $\gamma$ -アミノ酪酸 1,3-ブタンジオール

1. 研究開始当初の背景

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 (図 1)。



1970年代までの酵素化学的研究から、大腸菌の中枢代謝は解糖系酵素の ADP や AMP による活性化や、ピルビン酸代謝に関わる TCA サイクル酵素の NADH による阻害など、エネルギー代謝関連物質によりアロステリックに調節されることが示されていた (図 1)。これらのことから、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、中枢代謝を活性化できるのではないかと予想した。そのた

図1. 生物反応を利用する「ものづくり」における異化反応と同化反応の関係および酸化的リン酸化反応による活性調節。

めに申請者は、エネルギー獲得の最重要システムである酸化的リン酸化の抑制に着目した。

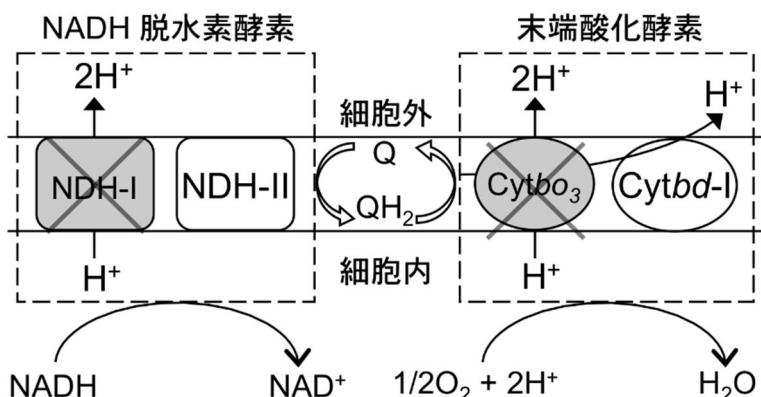


図2.大腸菌の呼吸鎖. Q:ユビキノン. X, ΔΔ株の欠損成分.

その結果、いずれの株もエネルギー欠乏に陥って菌体当たりの糖消費活性が上昇したが、その中でも pmf 形成能が最も低下していると考えられる NDH-I と Cytbo3 を共に欠損した二重欠損株 (以降ΔΔ株、図 2) は異常な糖代謝を示した。すなわち糖消費活性と呼吸活性の著しい上昇、酢酸の生成、細胞内の還元化 (NAD<sup>+</sup>/NADH 比の低下として観測) の他、グルタミン酸 (Glu) の著量蓄積 (グルコース 50g/L から 7g/L) が観察された [Kihira et al. (2012)]。

2. 研究の目的

呼吸鎖欠損ΔΔ株が示す異常な代謝は大腸菌のストレス応答として極めて興味深い、その機構は不明である。従ってその解明は大腸菌のエネルギー欠乏への潜在的な適応能を明らかにする突破口となるだけでなく、その知見を利用して大腸菌を強靱化 (ロバスト化) して発酵生産菌としての機能を強化できる可能性も期待される。そこで本研究では、大腸菌の呼吸鎖酵素二重欠損ΔΔ株が示すエネルギー欠乏への潜在的な適応機構と考えられる異常な糖代謝を材料として、その機構をメタボローム解析やトランスクリプトーム解析を通じて調べることにした。さらにその結果を応用して、有用物質生産のためのロバストな大腸菌宿主の開発を目指した。これらの目的を達成するために、以下の通り研究を進めることにした。

(1) 大腸菌の呼吸鎖欠損ΔΔ株の異常な糖代謝の機構解明

呼吸鎖欠損株では pmf の低下が一次ストレスになると考えられる。そこで、野生株とΔΔ株を含む一連の呼吸鎖欠損株を用いて pmf の低下度合いと代謝産物や遺伝子発現の関係を網羅的に調べ、適応機構の全体像を明らかにする。さらに、ΔΔ株において Glu と -アミノ酪酸 (GABA) 相互変換系 (Glu/GABA 系) 構成遺伝子のノックアウト株を作製するなどして、本系の役割や Glu 異常蓄積機構を解明する。

(2) Glu/GABA 系の強化による大腸菌の酸耐性化

Glu/GABA 系は Glu の代謝に関わることから、本系を中心としたエネルギー欠乏への適応機構の解析を通じて、 $\Delta\Delta$ 株の異常な Glu 蓄積機構が明らかになる可能性がある。

### (3) 呼吸鎖欠損株を活用する 1,3-ブタンジオール生産の効率化

これまでの生理学的解析から、 $\Delta\Delta$ 株では糖代謝が亢進することに起因し、アセチル CoA 供給

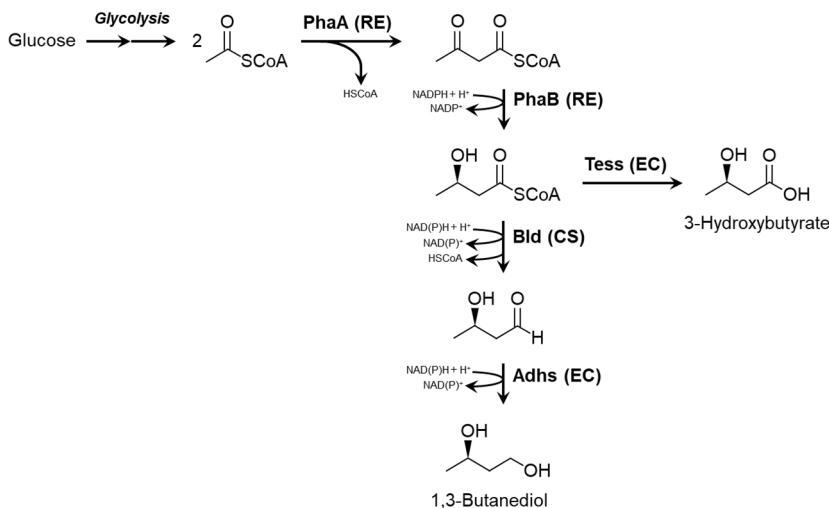


図3. 1,3-ブタンジオール合成代謝経路。

能が高まり、さらに NADH が滞留し、細胞内が還元化していることが予想された。この特徴は、 $\Delta\Delta$ 株がアセチル CoA を重要中間体に、還元的に生成される化合物の生産効率化に有効であることを示唆していた。この考えを実証するべく、 $\Delta\Delta$ 変異活用の有効性を 1,3-ブタンジオール生産を対象に検討することにした。1,3-ブタンジオールは、アセチル CoA から 3 段階の還元反応を経る

ことで生成される有用化合物である (図 3)。

## 3. 研究の方法

### (1) 大腸菌の呼吸鎖欠損 $\Delta\Delta$ 株の異常な糖代謝の機構解明

大腸菌の呼吸鎖酵素二重欠損 $\Delta\Delta$ 株が示すエネルギー欠乏への潜在的な適応機構を明らかにするために、野生型大腸菌 W1485 株と単独欠損株 ( $\Delta$ NDH-I 株及び $\Delta$ Cytbo3 株)、そして二重欠損 $\Delta\Delta$ 株についてトランスクリプトーム解析とメタボローム解析を行った。各株をグルコース無機塩培地でジャーファーマンターを用いたバッチ培養を行い、対数増殖期後期の菌体を回収した。回収した菌体について RNA 抽出したものはトランスクリプトーム解析に、メタノール抽出したものをメタボローム解析に供した。トランスクリプトーム解析は、Illumina HiSeq 250 を用いて行い、メタボローム解析はキャピラリー電気泳動 - 飛行時間型質量分析法 (CE-TOFMS) を用いた。

続いて、エネルギー欠乏への潜在的な適応機構に関連する遺伝子として、トランスクリプトーム解析から抽出された各候補遺伝子については、ファージ由来の Red recombinase を用いた One-step inactivation method [Detsenko & Wanner (2000)] によって染色体の遺伝子を欠損させた株を作成した。作成した欠損株について、グルコース無機塩培地でジャーファーマンターを用いたバッチ培養を行い、生育と糖消費、及び Glu 生産量を測定した。Glu の定量は、定量キット (L-グルタミン酸測定キット「ヤマサ」 NEO, YAMASA Corp.) を用いた酵素法により定量した。

酵素活性測定は、グルコース無機塩培地でジャーファーマンターを用いたバッチ培養を行い、対数増殖期後期である培養 9 時間目の菌体を回収して測定した。得られた回収菌体を、10% のグリセロールが入った Phosphate/citrate buffer (100 mM, pH7.0) に懸濁し、超音波により菌体を破碎した後、超遠心を行って上清を得た。得られた上清を PD-10 セファデックスカラムに通し、フラクションを粗酵素抽出液とした。

### (2) Glu/GABA 系の強化による大腸菌の酸耐性化

プラスミドにより野生型 GadB 遺伝子及び、GadB の変異体(GadB\*) の過剰発現を試みた。野生型 GadB の至適 pH は 3.7~3.8 と酸性条件下で活性が生じるが、変異 (Glu89Gln,  $\Delta$ 452-466) を入れることにより中性付近でも活性を示すようになることが知られている [Thu et al. (2013)]。gadB\*の導入は、ローコピープラスミド pMBL19 の lac プロモーター下流に GadB\*をコードする遺伝子 gadB\*を挿入することにより、IPTG 添加によって GadB\*の発現が誘導されるプラスミド [Soma et al. (2017)] を用いた。GABA の細胞外濃度は、定量キット (エンザイムセンサ社製 GABA ミエール) を用いて測定した。

### (3) 呼吸鎖欠損株を活用する 1,3-ブタンジオール生産の効率化

親株として大腸菌 MG1655 F を用いた。各遺伝子の欠損は、大腸菌 W1485  $\Delta\Delta$  株 [Kihira et al. (2012)] および Keio collection [JW0855 ( $\Delta$ poxB), JW5551 ( $\Delta$ sthA)] を用いて調製した P1 ファージによるトランスダクションにより導入した。Keio collection を用いて作製した欠損株からのカナマイシン耐性遺伝子の除去は pCP20 を用いて行った。1,3-ブタンジオール生産用プラスミドとして pNK3 を用いた。生産試験は 2L 容ジャーファーマンターを用いて行い、培地は 40 g/L のグルコースおよび 10 g/L の酵母エキスを含む M9 培地 1L を用いた。培養は 37°C で行い、培養液中の酸素濃度は培養を通して飽和濃度の 30% 以上 (約 2 ppm 以上) を保つよう設定した。1,3-ブタ

ンジオール生産は、適切な濃度の IPTG (親株: 10  $\mu$ M,  $\Delta$ Cytb3,  $\Delta$ NDH-I,  $\Delta\Delta$ : 2  $\mu$ M,  $\Delta\Delta\Delta$ *proxB*,  $\Delta\Delta\Delta$ *sthA*: 1  $\mu$ M) を対数増殖期前期に添加することで誘導した。流加培養時は、発酵開始 13.5、23.5 時間後にそれぞれ 30 g のグルコースを培地に直接添加した。グルコースおよび代謝産物濃度は、高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いて定量した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 大腸菌の呼吸鎖欠損 $\Delta\Delta$ 株の異常な糖代謝の機構解明

pmf 形成能が異なる野生型大腸菌 W1485 株と単独欠損株 ( $\Delta$ NDH-I 株及び $\Delta$ Cytb3 株)、そして二重欠損 $\Delta\Delta$ 株についてトランスクリプトーム及び、メタボロームを比較することで、pmf に応じた代謝変化と 株でみられる異常な代謝のメカニズムの解明を試みた。トランスクリプトーム解析の結果、解糖系やペントースリン酸経路、ピルビン酸代謝、TCA サイクル、Glu 代謝などにおいて転写及び代謝物レベルで変化がみられ、その変化は単欠損株よりも $\Delta\Delta$ 株で大きかった。 $\Delta\Delta$ 株では、Glu を GABA に変換するグルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子 *gadAB* の発現上昇が認められた。*gadA* の発現量は、野生株と比較して、 $\Delta$ NDH-I 株では 4.0 倍、 $\Delta$ Cytb3 株では、2.0 倍、そして  $\Delta\Delta$  株では 48.5 倍上昇していた。また、*gadB* の発現量も同様に、野生株と比較して  $\Delta$ NDH-I 株では 9.8 倍、 $\Delta$ Cytb3 株では 3.4 倍、そして  $\Delta\Delta$  株では 181 倍上昇していた。また、メタボローム解析の結果、GABA の細胞内濃度は数 mg/L 程度と非常に微量であったが、対数増殖期では野生株 < 単欠損株 <  $\Delta\Delta$  株の順で GABA が蓄積していた。そして、定常期については野生株と比較すると、細胞内 GABA 濃度が  $\Delta$ Cytb3 株で 3.6 倍、 $\Delta\Delta$  株で 5.2 倍増加していた。

GABA シャントは TCA サイクルを 2-OG からコハク酸へとバイパスする経路で、嫌気条件下で活性化することが知られている。トランスクリプトーム解析の結果、本経路を担う 4-aminobutyrate aminotransferase (*gabT*) と succinate-semialdehyde dehydrogenase (*gabD*) の転写量が呼吸鎖酵素欠損株で増加していた。*gabT* の発現量は、野生株と比較して  $\Delta$ NDH-I 株では 2.8 倍、 $\Delta$ Cytb3 株では 2.5 倍、そして  $\Delta\Delta$  株では 11.3 倍上昇していた。また、*gabD* の発現量も同様に、野生株と比較して  $\Delta$ NDH-I 株では 3.2 倍、 $\Delta$ Cytb3 株では 2.5 倍、そして  $\Delta\Delta$  株では 10.6 倍上昇していた。また、メタボローム解析の結果、生成物であるコハク酸の細胞内濃度は、定常期で野生株 < 単欠損株 <  $\Delta\Delta$  株の順に増加していた。これらの変化は pmf 形成能やエネルギーレベル、酸化還元バランスを維持するためのものと考えられた。したがって、大腸菌は pmf 形成能の低下に応じて柔軟に代謝を変化させることで、pmf 形成能やエネルギーレベル、酸化還元バランスを維持する新奇な恒常性維持機構を有していることが示唆された。

上記のオミックス解析より、*gadAB* による H<sup>+</sup>の濃度勾配 ( pH) 生成と、*gadC* による膜電位 ( ) 生成、そして *gadAB* と *gabT* が共役するサイクル反応によって、 $\Delta\Delta$ 株は著しく低下した pmf 形成能を補完している可能性が考えられた。そこで、*gadAB* , *gadC* および *gabT* をそれぞれ  $\Delta\Delta$  株から欠失させた影響を評価した。その結果、*gadC* 欠損株では変化が見られず、 $\Delta\Delta$  株において *gadC* は重要ではないことが明らかとなった。また、*gadAB* 欠損株は若干の生育低下に留まり、代替経路の存在が推測された。一方、*gabT* 欠損株は生育が大幅に低下し、細胞外代謝産物の挙動も変化した。これは TCA サイクルのバイパスやサイクル反応ができなくなり、カーボンロスや pmf 形成能低下が生じたためであると考えられた。以上より、本来嫌気条件下の反応系である GABA シャントが、好気条件下の  $\Delta\Delta$  株における糖代謝で重要な役割を担うことが明らかとなった。

続いて、 $\Delta\Delta$ 株が通常の大腸菌株では見られない Glu を異常に蓄積するメカニズムを明らかにするために、主要な Glu 生成経路である Glu 脱水素酵素 (GDH; *gdhA* 遺伝子にコード) とグルタミン酸合成酵素 (GOGAT; *gltBD* 遺伝子にコード) に着目し、これらを $\Delta\Delta$ 株から欠失させた株 ( $\Delta$ GDH 株、及び $\Delta$ GOGAT 株) を構築した。その結果、 $\Delta$ GDH 株及び、 $\Delta$ GOGAT 株は、 $\Delta\Delta$ 株とほぼ同程の生育、糖消費、及び Glu 生産量を示した。これらの結果から、 $\Delta\Delta$ 株において GDH 及び、GOGAT の単独欠損は、Glu の異常生産にはほとんど影響しないことが明らかになった。続いて、 $\Delta\Delta$ 株から GDH と GOGAT の両方を欠失させた株 ( $\Delta$ Glu 株) を構築したところ、 $\Delta$ Glu 株はグルコース最少培地で増殖できず、Glu 要求性を示した。このことから GDH と GOGAT 以外に Glu を生合成する経路は存在せず、 $\Delta\Delta$ 株における Glu の異常生産においてもどちらか片方の酵素が存在すれば十分であることが明らかになった。

##### (2) Glu/GABA 系の強化による大腸菌の酸耐性化

まず、*GadAB* の反応は大腸菌において酸耐性に寄与するとされるため、野生株を宿主としてプラスミドにより *GadB* 遺伝子の増幅を試みた。*GadB* の至適 pH は 3.8 なので、中性でも活性を持つ変異型酵素 *GadB\** 遺伝子の増幅も検討した。しかしいずれにおいても、酸耐性は向上しなかった。

続いて、 $\Delta\Delta$ 株が有する特異な Glu 高生産能を活用することで、GABA 高生産株の育種を目指した。中性条件下でも活性を示す変異型 *GadB\** 遺伝子を、大腸菌 W1485 株 (野生株) と  $\Delta\Delta$ 株に導入し、フラスコ培養及び、ジャーファーメンターを用いて GABA 生産試験を行った。その結果、 $\Delta\Delta$ 株における GABA 生産量は約 1.5 倍以上増加することが確認され、NDH-I と Cytb3 の二重欠損変異が GABA の高生産に有用な変異であることが示された。

##### (3) 呼吸鎖欠損株を活用する 1,3-ブタンジオール生産の効率化

Cytb3、NDH-I の単一および二重欠損は、1,3-ブタンジオール生産を向上させる

呼吸鎖欠損が 1,3-ブタンジオール生産に及ぼす影響を親株-pNK3,  $\Delta$ Cytb3-pNK3,  $\Delta$ NDH-I-pNK3,  $\Delta\Delta$ -pNK3 を用いて評価した。その結果、図 2 に示すように、全ての呼吸鎖欠損株で顕著な生産収量の増加が確認された。 $\Delta$ Cytb3-pNK3,  $\Delta$ NDH-I-pNK3,  $\Delta\Delta$ -pNK3 における生産収量はそれ

表 1. 各大腸菌組換え株での代謝産物生成。

Strain	Metabolite (mM) <sup>a</sup>				
	1,3-Butanediol	3-Hydroxybutyrate	Pyruvate	$\alpha$ -Ketoglutarate	Acetate
Parent-pNK3	45.1 $\pm$ 3.5	21.6 $\pm$ 1.3	20.8 $\pm$ 0.6	9.99 $\pm$ 0.64	10.1 $\pm$ 1.0
$\Delta$ Cytb3-pNK3	86.6 $\pm$ 1.1	13.8 $\pm$ 0.8	23.0 $\pm$ 1.4	5.79 $\pm$ 0.60	38.9 $\pm$ 3.8
$\Delta$ NDH-I-pNK3	81.4 $\pm$ 4.9	17.9 $\pm$ 1.8	36.9 $\pm$ 0.9	6.55 $\pm$ 0.20	27.3 $\pm$ 1.3
$\Delta\Delta$ -pNK3	92.8 $\pm$ 0.7	6.80 $\pm$ 0.03	20.4 $\pm$ 0.8	1.81 $\pm$ 0.12	96.5 $\pm$ 6.8

<sup>a</sup>The values represent the maxima.

ぞれ親株-pNK3 の 1.9, 1.8, 2.1 倍であった。この時、副産物として 3-ヒドロキシ酪酸、ピルビン酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸および酢酸の蓄積が確認された (表 1)。特に 3-ヒドロキシ酪酸の生成量は、1,3-ブタンジオール生産量と対の関係にあり、3-ヒドロキシ酪酸の生成に必要な還元力は 1,3-ブタンジオールよりも低い (図 3) ことから、細胞内酸化還元レベルが反映された結果と考えられた。増殖と糖代謝の関係は、[Kihira et al. (2012)] で観察された結果、すなわち、呼吸鎖欠損株で細胞あたりの糖代謝活性が上昇する結果と整合していた (図 4)。

$\Delta\Delta$ -pNK3 での流加培養での 1,3-ブタンジオール生産

の結果を踏まえ、 $\Delta\Delta$ -pNK3 を用いて流加培養を試みた。その結果、43.5 時間の培養で 180 mM (16.2 g/L) の 1,3-ブタンジオールを生産した (図 5)。この値は、これまでの結果 [Kataoka et al.

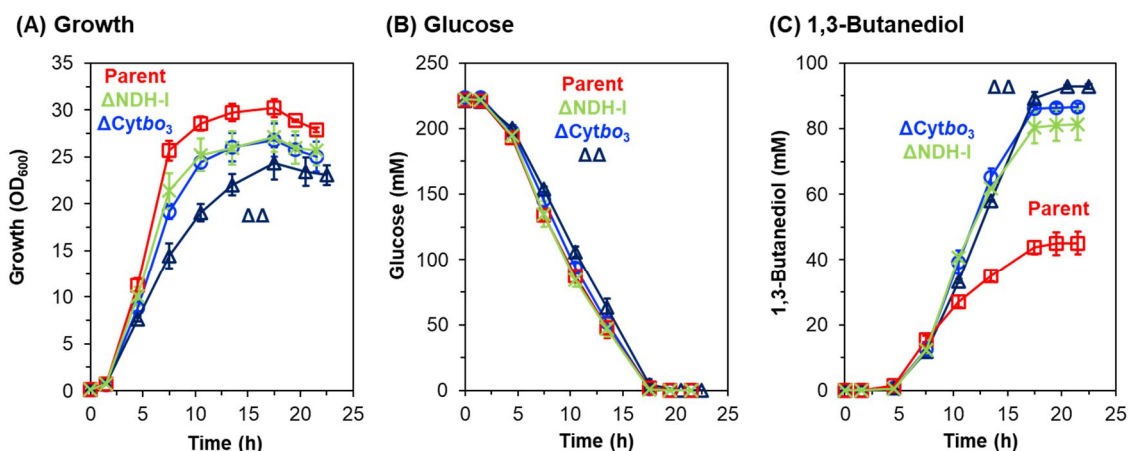


図 4. 呼吸鎖欠損が 1,3-ブタンジオール生産に及ぼす影響。

(2014)] と比較して収量は同等 (180 mM vs. 175 mM) であるものの、発酵時間 (43.5 時間 vs. 98.8

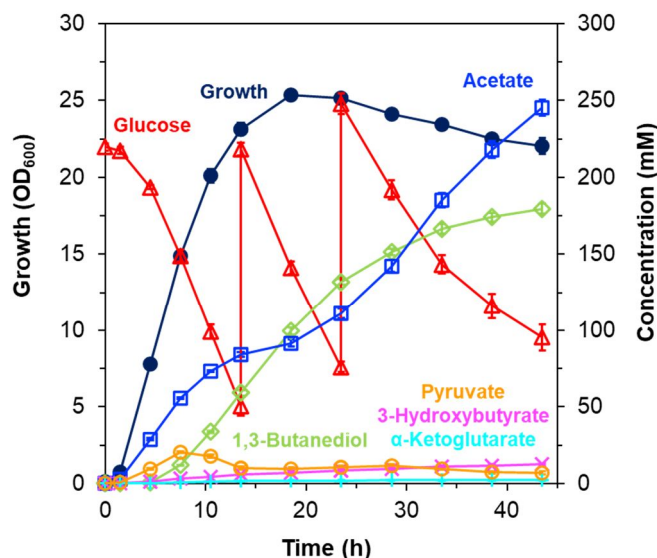


図 5.  $\Delta\Delta$ -pNK3 による流加培養での 1,3-ブタンジオール生産。

時間) が大幅に短縮されている点で産業的に意義を持つと考えられた。副産物に目を向けると、1,3-ブタンジオール生産速度の低下と対の関係で、酢酸生成の活性化が観察された。今後は、培養後期に観察された酢酸生成の生理学的意義の解明とそれを踏まえた代謝改変を検討することで、さらなる 1,3-ブタンジオール生産の効率化が期待されると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横田 篤
2. 発表標題 大腸菌の呼吸鎖欠損変異株が示す異常な糖代謝の解析
3. 学会等名 日本生物工学会 第71回大会（岡山大学）シンポジウム「物質生産や代謝制御における呼吸鎖の役割」
4. 発表年 2019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2022年度大会
4. 発表年 2022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 第73回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2021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異常蓄積機構の解析
3. 学会等名 2021年度第一回オンライン若手シンポジウム
4. 発表年 2021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	前田 智也 (Maeda Tomoya) (10754252)	北海道大学・農学研究院・助教  (10101)	
研究分担者	片岡 尚也 (Kataoka Naoya) (50713509)	山口大学・大学研究推進機構・助教  (15501)	
研究分担者	和田 大 (Wada Masaru) (00301416)	摂南大学・農学部・教授  (34428)	

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