

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870363

研究課題名(和文)汎用的な細菌の凝集誘導システムの開発とそれを利用した二段階物質生産システムの構築

研究課題名(英文)Construction of versatile flocculation system and its application for two-stage production system

研究代表者

柘植 陽太(Tsuge, Yota)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環・特命助教

研究者番号：00647422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：発酵阻害物質であるフルフラールのアミノ酸生産菌の増殖と発酵に対する影響を調べた。その結果、増殖は影響を受けるが、時間経過とともにフルフリルアルコールと2-フランカルボン酸に変換されることが分かった。遺伝子欠損株の解析から、フルフラールをフルフリルアルコールに変換する遺伝子を見出した。本遺伝子の精製タンパク質は試験管内でNADPHを補因子にフルフラールをフルフリルアルコールに変換した。また、酸素を代謝スイッチとして好気条件下でアミノ酸のリジン、嫌気条件下で有機酸であるコハク酸を同一株で生産する代謝改変株を作製した。

研究成果の概要(英文)：We firstly investigated cell growth of amino acid producing *Corynebacterium glutamicum* under furfural stress. The growth was inhibited by furfural, but furfural was degraded into furfuryl alcohol and 2-furoic acid overtime. Through constructing deletion strains of alcohol dehydrogenase genes, we identified the gene responsible for the conversion of furfural into furfuryl alcohol. Purified protein of this gene converted furfural into furfuryl alcohol in vitro using NADPH as a co-factor. We moreover constructed a strain by metabolic engineering producing amino acid lysine under aerobic conditions and organic acid succinic acid under anaerobic conditions using oxygen as a metabolic switch.

研究分野：Applied Microbiology

キーワード：コリネ型細菌 有機酸 アミノ酸 フルフラール 発酵

1. 研究開始当初の背景

近年、食糧と競合しないリグノセルロースを原料とする物質生産研究が進んでいる。しかし、リグノセルロースから糖液を調製する際に生じる発酵阻害物質により、微生物の増殖や発酵が阻害されることが知られている。フルフラールは代表的な発酵阻害物質として知られており、大腸菌ではその阻害効果や分解遺伝子の同定も進んでおり、阻害効果を低減させた報告も行われている。本研究で利用したアミノ酸生産菌であるコリネ型細菌では分解遺伝子は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では代表的な発酵阻害物質であるフルフラールのコリネ型細菌の増殖と糖消費への影響を調べるとともに、その分解遺伝子の同定を試みた。

3. 研究の方法

コリネ型細菌 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032 株を用いて実験を行った。

4. 研究成果

(1) コリネ型細菌におけるフルフラール阻害と分解遺伝子の同定

はじめに好気条件でコリネ型細菌を培養して、フルフラールに対する挙動を調べたところ、20 mM のフルフラール下で約 40% の生育阻害が見られた。GC-MS で分析を行った結果、フルフラールはフルフリルアルコールと 2-フランカルボン酸に分解されていることが分かった。またその割合は初発フルフラール濃度に比例し、20 mM のフルフラールを用いた場合、約 6 割がフルフリルアルコールに変換されており、残りの 4 割が 2-フランカルボン酸に変換されていた (図 1)。大腸菌や酵母

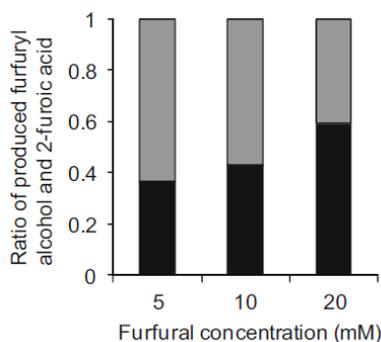


図 1 好気条件下におけるフルフラールからの変換物質の組成

ではフルフラールはほぼ全てフルフリルアルコールに変換されるため、この結果はコリネ型細菌に特徴的であった。さらに、細胞内の酸化還元バランスを LC-MS を用いて調べた結果 NADH/NAD⁺比と NADPH/NADP⁺比がともにフルフラール濃度に反比例して低下した (図 2)。これはフルフラールの分解に還元力として NADH と NADPH をともに利用し

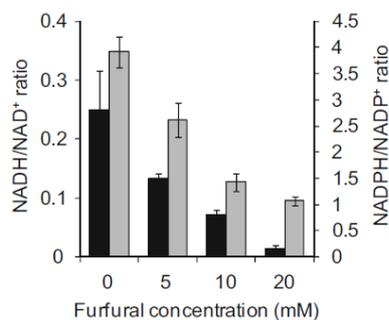


図 2 フルフラール濃度と細胞内酸化還元バランスの関係

ていることが示唆された。

一方、嫌気条件下においてはフルフラールによる阻害は見られず、グルコース消費速度は 60 mM のフルフラール存在下でも大きな減少は見られなかった。興味深いことに、フルフラールは 9 割以上がフルフリルアルコールに変換されており、2-フランカルボン酸に変換されているのは 1 割弱に留まった (図 3)。これはフルフラールを 2-フランカルボン酸に

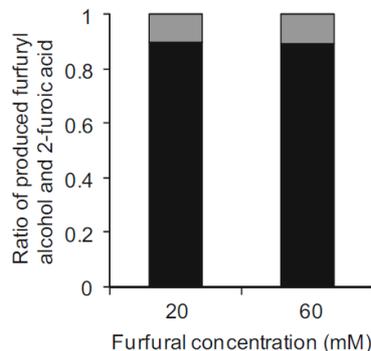


図 3 嫌気条件下におけるフルフラールからの変換物質の組成

変換する酵素が酸素を必要とする可能性が考えられた。

次にフルフラールを分解する遺伝子の同定を進めた。はじめにフルフラールをフルフリルアルコールに変換する候補遺伝子を 4 つ抽出し、それぞれ欠損株を作製したところ、*cgl0331* の欠損株でフルフラールの分解速度とフルフリルアルコールの生成速度の低下が見られた (図 4)。一方、2-フランカルボン酸の生成速度に変化は見られなかった。

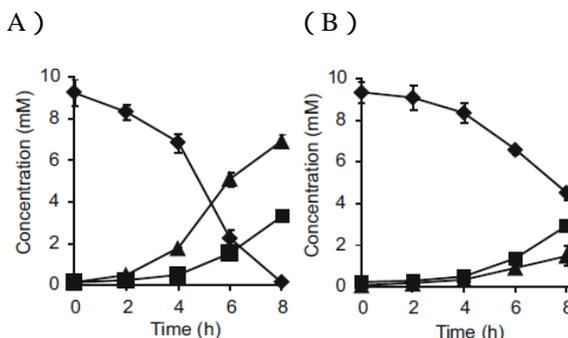


図4 野生株 (A) と *cgl0331* 欠損株 (B) のフルフラール濃度 (○) とフルフリルアルコール濃度 (▲)

cgl0331 の欠損株においてもわずかにフルフリルアルコールの生成が確認できたため、他の3つの候補遺伝子も欠損させた四重欠損株を作製したが、まだフルフリルアルコールの生成が認められたため、コリネ型細菌は基質特異性の広い、他のアルコール脱水素酵素遺伝子を保有することが示唆された。

以上の結果から、*Cgl0331* がコリネ型細菌においてフルフラールの分解に主に寄与していることが分かったため、大腸菌において *Cgl0331* 精製タンパク質を調製し、試験管内での実験に供した (図5)。

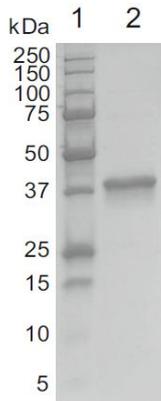


図5 *Cgl0331* タンパク質の精製

精製タンパク質を用いた実験の結果、*Cgl0331* は試験管内で NADPH を還元力として用いてフルフラールをフルフリルアルコールに変換した (図6)。興味深いことに、上

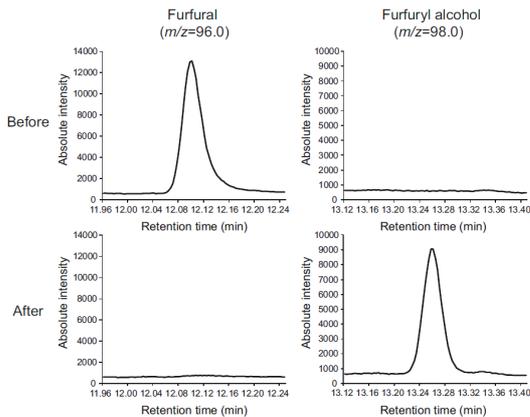


図6 GC-MS分析による *Cgl0331* タンパク質のフルフラールからフルフリルアルコールへの変換

記の細胞破砕液を用いた実験と異なり、NADH は利用することは出来なかった。上記の結果は *Cgl0331* 以外のフルフラール分解酵素が NADH を利用してフルフラールの分解を行ったためと考えられた。

フルフラール分解遺伝子の同定に成功したため、高発現によりフルフラールの分解速度を上げ、阻害効果の低減を目指した。しかし、*cgl0331* 高発現株ではフルフラールの

増殖阻害に変化は見られなかった。今後はコリネ型細菌におけるもう一つのフルフラール代謝産物である 2-フランカルボン酸の生成遺伝子の同定を行い、二つの遺伝子の高発現を組み合わせることで、フルフラールによる増殖阻害解消の実現が望まれる。

(2) 酸素をスイッチとした二段階物質生産株の作製

コリネ型細菌は好気条件ではアミノ酸のリジンやグルタミン酸を、嫌気条件では有機酸である乳酸やコハク酸を生産する。この特性を生かし、一つの株でリジンとコハク酸を酸素をスイッチとして高生産する株を作製した。施した代謝改変を図6に示す。

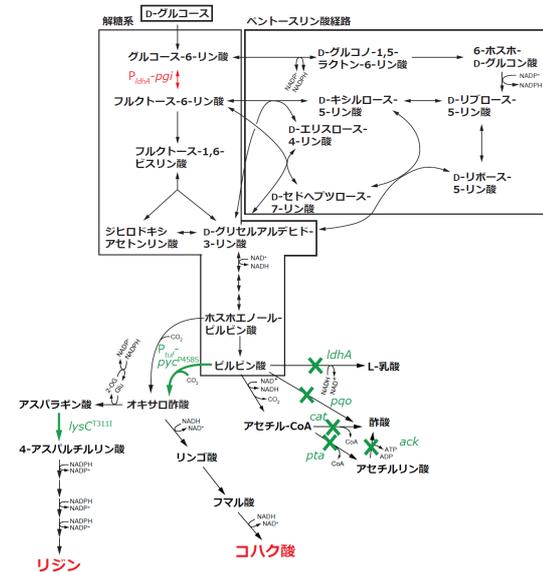


図6 二段階生産のための代謝改変

初めにリジン高生産のための代謝改変としてアスパルトキナーゼをコードする *lysC* に一塩基変異を導入した (*lysC*^{T3111})。次に前駆体であるオキサロ酢酸に代謝フラックスを誘導するため、ピルビン酸カルボキシラーゼをコードする *pyc* 遺伝子に高活性型と報告されている一塩基変異を導入すると同時にプロモーター置換による高発現を行った (*P*_{tuf}-*pyc*^{P4585S})。 *pyc* の高発現はコハク酸の高生産にも重要であるため、本代謝改変はリジンとコハク酸双方の高発現に寄与する。次に嫌気条件下におけるコハク酸生産の副生成物である乳酸と酢酸の生成を抑えるために、乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*ldhA*)、ピルビン酸:キノンオキシドレダクターゼ遺伝子 (*pqo*)、アセチル CoA:CoA トランスフェラーゼ遺伝子 (*cat*)、ホスホトランスアセチラーゼ遺伝子 (*pta*)、酢酸キナーゼ (*ack*) の各遺伝子を欠損させた。1分子のリジンを生産するためには4分子のNADPHが必要であり、還元力の供給が常に問題となる。NADPHの主な供給源はペントースリン酸経路である。そこで、好気条件下において代謝フラックスをペントースリン酸経路に流すため、ホスホ

グルコースイソメラーゼのプロモーターを嫌気条件下でのみ働く乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*ldhA*) のプロモーターと置換した。これにより、好気条件下では代謝フラックスはペントースリン酸経路に流れ、嫌気条件下では解糖系に優先的に流れる株の作製に成功した (図7)。

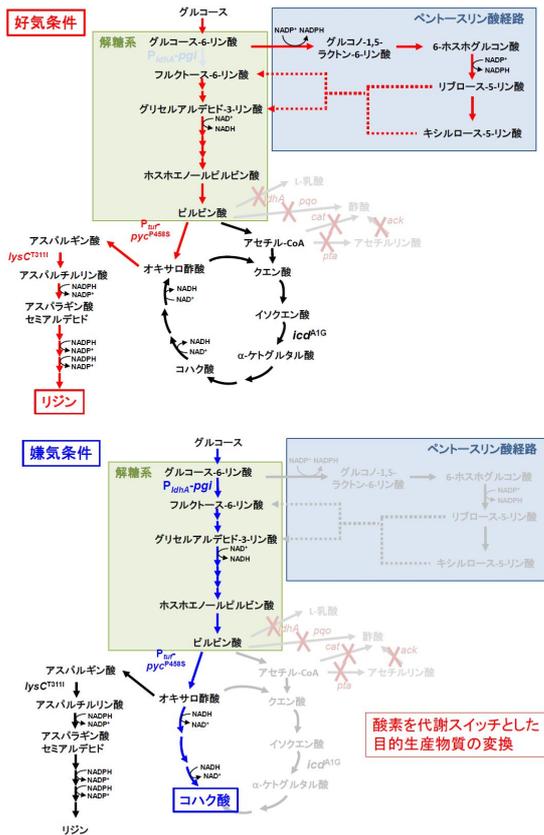


図7 酸素を代謝スイッチとした二段階物質生産

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8件)

1. Tsuge Y, Kawaguchi H, Sasaki K, Kondo A. Engineering cell factories for producing building block chemicals for bio-polymer synthesis. *Microbial Cell Factories*, 15:19 (2016)、査読有、DOI: 10.1186/s12934-016-0411-0
2. Tsuge Y, Kudou M, Kawaguchi H, Ishii J, Hasunuma T, Kondo. FudC, a protein primary responsible for furfural detoxification in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100:2685–2692 (2016)、査読有、DOI: 10.1007/s00253-015-7115-y
3. Tsuge Y, Yamamoto S, Kato N, Suda M, Vertès AA, Yukawa H and Inui M.

Overexpression of the phosphofructokinase encoding gene is crucial for achieving high production of D-lactate in *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99:4679–4689 (2015)、査読有、DOI: 10.1007/s00253-015-6546-9

4. Tsuge Y, Uematsu K, Yamamoto S, Suda M, Yukawa H, Inui M. Glucose consumption rate critically depends on redox state in *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99:5573–5582 (2015)、査読有、DOI: 10.1007/s00253-015-6540-2

5. Tsuge Y, Hasunuma T, Kondo A. Recent advances in the metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of lactate and succinate from renewable resources. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42:375–389 (2015)、査読有、DOI: 10.1007/s10295-014-1538-9

6. 柘植 陽太, 近藤 昭彦 代謝工学を利用した *Corynebacterium glutamicum* による乳酸およびコハク酸の生産 バイオサイエンスとインダストリー (2015) 73:362-368、査読無

7. Tsuge Y, Hori Y, Kudou M, Ishii J, Hasunuma T, Kondo A. Detoxification of furfural in *Corynebacterium glutamicum* under aerobic and anaerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98:8675–8683 (2014)、査読有、DOI: 10.1007/s00253-014-5924-z

8. Tsuge Y, Kawaguchi H, Sasaki K, Tanaka T, Kondo A. Two-step production of D-lactate from mixed sugars by growing and resting cells of metabolically engineered *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98:4911–4918 (2014)、査読有、DOI: 10.1007/s00253-014-5594-x

[学会発表](計4件)

1. 柘植 陽太, 山本 省吾, 曾田 匡洋, 荻野 千秋, 近藤 昭彦 コリネ型細菌によるUV 吸収性アミノ酸の生産 日本農芸化学会大会、2016.3.30、札幌(北海道)
2. 柘植 陽太, 近藤 昭彦 乳酸菌の二段階乳酸生産反応 バイオプロダクション次世代農工連携拠点部門会、2014.10.3、神戸(兵庫県)

3. 柘植 陽太、堀 良美、蓮沼 誠久、近藤 昭彦 コリネ菌におけるフルフラールの分解
日本生物工学会大会、2014.9.9、札幌（北海道）

4. 柘植 陽太、山本 省吾、加藤 直人、須田 雅子、湯川 英明、乾 将行 コリネ型細菌を用いた D-乳酸生産における解糖系遺伝子高発現の効果 生物工学会若手研究者の集い、2014.7.12、神戸（兵庫県）

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

柘植 陽太 (TSUGE, Yota)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環・

特命助教

研究者番号：00647422