

令和元年6月3日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04578

研究課題名(和文) ネガティブレギュレーションを全て解除した基幹化合物生産細胞工場の創製

研究課題名(英文) Development of feedback regulation free cell factories

研究代表者

近藤 昭彦 (Kondo, Akihiko)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授

研究者番号：40205547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、基幹化合物に対するネガティブレギュレーションが解除された微生物を創製する。微生物を用いたものづくりは、必ず代謝系に存在する有機酸やアミノ酸などの基幹化合物から合成されるが、これらの化合物の生産は、フィードバック阻害をはじめとして厳密に、かつ適量に制御されている。アミノ酸生産に関する合成制御をそれぞれ解除した有用化合物生産のための基幹化合物を生産する微生物の構築を行い、またバイオマス資化能と組み合わせることで高効率な物質生産技術の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CO2削減や持続可能な社会の構築に向けたCSRの観点から、再生可能なバイオマスを原料とする微生物を用いた有用物質生産・エネルギー生産に関する研究開発に取り組む企業が増えてきている。しかし、微生物は、導入された遺伝子回路をそのまま発現することはほとんどない。その原因は生産量を制限するネガティブ制御がはたらくために、導入した生産経路が発揮されないからである。本研究では、その制御・阻害を解除することで、生産量を大きく向上させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Recent years, environmental problems such as exhaustion of fossil resources and global warming are concerned. One of the solution is substance production from lignocellulosic biomass by bioprocess. In this study, to produce cadaverine from xylooligosaccharide using *Corynebacterium glutamicum* as a first step of cadaverine production from hemicellulose. Deregulation of feedback regulation was evaluated and cadaverine productivity was improved by metabolic engineering. Finally, we demonstrated direct cadaverine production from xylooligosaccharides.

研究分野：生物化学工学

キーワード：バイオリファイナリー 代謝工学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CO2 削減や持続可能な社会の構築に向けた CSR の観点から、再生可能なバイオマスを原料とする微生物を用いた有用物質生産・エネルギー生産に関する研究開発に取り組む企業が増えてきている。しかし、目的物質の生産性を実用化レベルに上げるのに、試行錯誤、長い研究開発期間、多額の資金が必要な場合が多く、実用化できない物質も多い。しかし、微生物は、導入された遺伝子回路をそのまま発現することはほとんどない。その原因は生産量を制限するネガティブ制御がはたらくために、導入した生産経路が発揮されないからである。その制御・阻害を解除してやれば、生産性は大幅に向上できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、基幹化合物に対するネガティブレギュレーションが解除された微生物を創製する。微生物を用いたものづくりは、必ず代謝系に存在する有機酸やアミノ酸などの基幹化合物から合成されるが、これらの化合物の生産は、フィードバック阻害をはじめとして厳密に、かつ適量に制御されている。アミノ酸生産に関する合成制御をそれぞれ解除した有用化合物生産のための基幹化合物を生産する微生物の構築を行い、またバイオマス資化能と組み合わせることで高効率な物質生産技術の開発を行う。

3. 研究の方法

遺伝子組み換えは相同組み換え法を用いて行い、得られた菌株は CGXII 培地を基本として培養評価を行った。また、生成物の分析は HPLC を用いて行った。

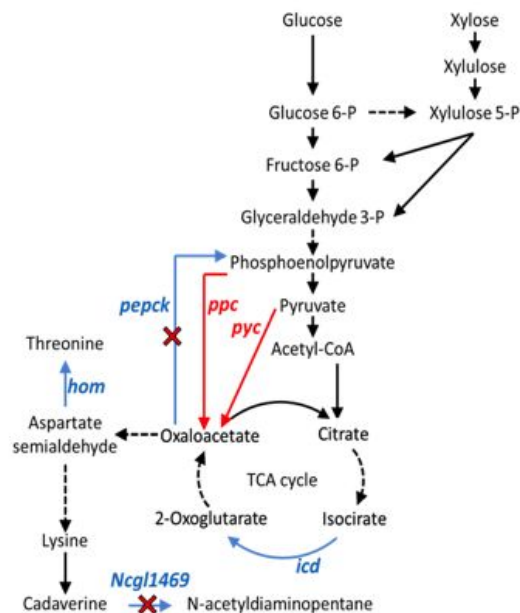
4. 研究成果

本研究ではコリネ菌を用いたヘミセルロースからのカダベリン生産の第一段階として、キシロオリゴ糖からの生産を行う。そのためには、大きく分けて「キシロオリゴ糖の分解」「キシロースの資化」「リジンの脱炭酸」の3つの要素が必要となる。

キシロオリゴ糖の分解は XYL (beta-xylosidase) の細胞表面提示によって解決を試みる。XYL の活性が確認されている *Bacillus subtilis* 由来の XYL をコードする *Bsu17580* を細胞表面提示することで解決を図る。

続いて、キシロースの資化についてである。細菌の多くでは 1. Xylose isomerase (XylA) によってキシロースをキシルロースに異性化し、2. Xylulokinase (XylB) によってキシルロースをキシルロース-5-リン酸にリン酸化する。という、2段階での変換が行われた後、代謝が進んでいく。しかし、*C. glutamicum* は XylA を有していないためキシロースを資化できない。そのため XylA を導入することでキシロースの資化は可能になるが、本研究では資化能力を強化するために *E. coli* 由来の XylA, XylB オペロン (*xylAB*) を導入する。キシロース炭素源でのカダベリン生産量はグルコースに比べて低く、中央代謝の改良の必要性が示唆される一方で、基質の中央代謝への入り口は細胞内フラックス、代謝物質、生産能力に大きな影響を及ぼすことも示されている。このことから、基質特異的な代謝改変が求められており、カダベリン生産量の向上にあたってはキシロースの中央代謝への入り口である非酸化ペントースリン酸経路を考慮する必要があると予想される。

最後に「リジンの脱炭酸」についてである。先述のようにカダベリンはリジンの脱炭酸によって生成されるが、*C. glutamicum* は Lysine decarboxylase (LDC) を有していないため、リジンまでしか生成できない。そこで *E. coli* 中に存在する2つの LDC のうちの1つである *ldcC* を導入することで、リジンからカダベリンへの変換を行う。*LdcC* は至適 pH 7.6 であり、広い範囲の pH で機能している。しかし、LDC を導入するだけではカダベリン生産量は少ないと考えられる。それは、アスパルトキナーゼをコードする *lysC* がリジンおよびスレオニンによってフィードバック阻害を受けるため、本研究では *lysC* に点変異 T311I を加えることでその解決を図った。更なる代謝改変を加えることで *C. glutamicum* PIS-6, PI-8 を創製した。以上のことより、カダベリン生産量の向上を図るとともに、プラスミドによって XYL, XylA, LDC 遺伝子を導入することでキシロオリゴ糖からのカダベリン生産を行った。



Aspartate semialdehyde → Oxaloacetate → Citrate → 2-Oxoglutarate → Isocitrate → N-acetyldiaminopentane → Cadaverine. The diagram also shows the conversion of Threonine to Aspartate semialdehyde, and the conversion of Lysine to Cadaverine. The diagram includes labels for various enzymes and metabolites: pepck, ppc, pyc, hom, Ncg1469, and lysC. Red 'X' marks indicate inhibition points at the conversion of Phosphoenolpyruvate to Pyruvate and the conversion of N-acetyldiaminopentane to Cadaverine.

本研究では以下の株を構築した。

C. glutamicum PIS-1:C. glutamicum ldhA, ack, pta, cat, pqq+ pepck

C. glutamicum PIS-3:C. glutamicum PIS-1+ pepck, icd atg gtg, Ncg11469

C. glutamicum PIS-4a:C. glutamicum PIS-3+ pyc P485S

C. glutamicum PIS-4b:C. glutamicum PIS-3+ hom V59A

C. glutamicum PIS-4c:C. glutamicum PIS-3+ ppc N917G

C. glutamicum PIS-6 : C. glutamicum PIS-3+ pyc P485S, hom V59A, ppc N917G

これらの株は、リジン/カダベリン生産量向上に向けた点変位の導入(icd atg gtg, pyc P485S, hom V59A, ppc N917G) や破壊(pepck, Ncg11469) を行った株である。ここに XYL, XylIA 共発現プラスミド pCC-XX を導入し、キシロースを炭素源としてリジン発酵試験を行った。以降、株の名前は省略して記載する。

PIS-1 PIS-3

ここではリジン生産量が増大したが、Ncg11469 はカダベリンのアセチル化に関する遺伝子であることから、増大の要因は icd への変異である。これは過去に行われたリジン生産株 LYS-9 に対して icd atg gtg の変異を導入した LYS-10 でリジン生産量が増大した結果と一致した。この時 TCA 回路のフラックスは減少した反面、アナプレロティック回路へのフラックスが増大してオキサロ酢酸生成が促進されていたことが原因だとされている。さらに、リンゴ酸デヒドロゲナーゼが活性化され、PPP に加わる NADPH 生成源となっていた。このことから、本研究においてもオキサロ酢酸以下の代謝経路の強化や NADPH の生成について考慮する必要がある。

PIS-3 PIS-4a

pyc P485S の変異導入は、アセチル CoA・TCA 回路を介さないオキサロ酢酸への直接的なフラックスの増大を目的としていたが、リジン生産量は減少した。これはオキサロ酢酸が増大したこととその代謝物であるアスパラギン酸が増大し、ppc がフィードバック阻害を受けていると考えられる。このことから、ppc の活性を維持することの重要性が示唆された。

PIS-3 PIS-4b

hom V59A の変異はホモセリンの生成を抑える狙いがある。これはホモセリンの生成を抑えることにより、ホモセリンの代謝物質で、リジンと共に lysC へのフィードバック阻害を引き起こす物質である「スレオニン」の生成を抑えるためである。しかし YTK444 の lysC には T311I の変異が加えられているため、PIS-3 で生産された 8.98 mM のリジンではフィードバック阻害が起きていなかった可能性がある。また測定は行っていないが、PIS-3 におけるスレオニン生産量が乏しかったため、hom の活性を弱めても炭素フラックスに大きな変化がなかったと考えられる。以上のことより、PIS-3 に hom V59A の変異のみを加えてもその効果が現れなかったと考えられる。

PIS-3 PIS-4c

PIS-3 に対する ppc N917G の変異は有効な手段であり、「リジン生産量は増大した」。これは上記のように、ppc に変異を加えたことによってアスパラギン酸およびリンゴ酸から受けていたフィードバック阻害を解除できたためである。

PIS-3 PIS-6

PIS-3 に対する pyc P485S のみの変異導入はリジン生産量の減少に繋がったが、アスパラギン酸からのフィードバック阻害を解除した ppc N917G とともに導入することによって相乗効果が得られた。また、pyc P485S, ppc N917G の効果によってオキサロ酢酸へのフラックスが増大していることから、ホモセリン生産を抑制する hom V59A の効果もあったものと思われる。これらの代謝改変の結果、PIS-6(pCC-XX) では培養 72 h で 20 g/L のキシロースから PIS-1(pCC-XX) の 1.77 倍となる 14.5 mM (106 (mg-Lys)/(g-Xyl)) のリジン生産に成功した。しかしこの収率はグルコースを炭素源としてリジン発酵試験を行った Lys-12 株での報告の 209(mg-Lys)/(g-Gul) の約半分程であった。よって更なる代謝改変が必要になると考えられる。

代謝改変が XYL 活性に及ぼす影響

これらの株および、更なる代謝改変株 PIS-8(pCC-XX) に対して XYL assay を行った。PIS-8(pCC-XX) は 3.51 U/L/OD600 と他よりも高かったが、その他の株の活性値はほぼ同様であり、変異による影響は見られなかった。これはアンカータンパク質の Porin や XYL の Bsu17580 の発現はリジン高生産に向けて代謝改変を行った遺伝子と直接的に関係なかったことを示している。

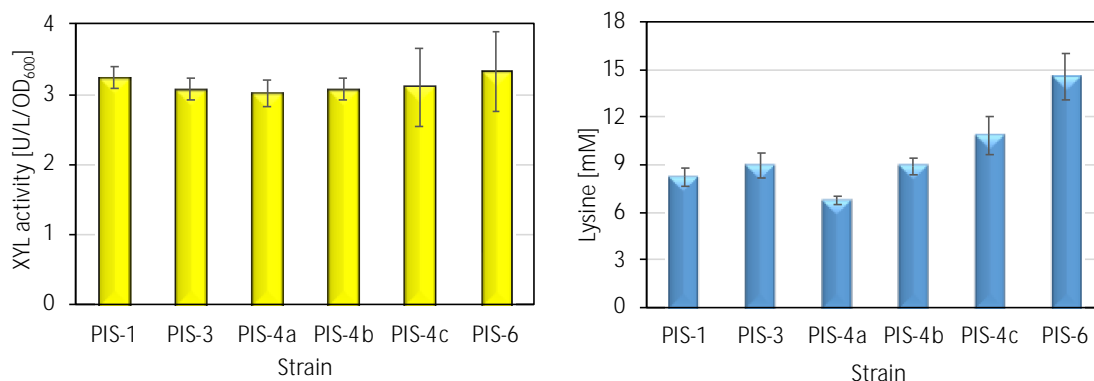
LDC の導入によるカダベリン生産能の賦与

本研究で用いるリジン高生産株に *E. coli* 由来の *ldcC* を導入することによってカダベリンが生産されるか、グルコース炭素源での発酵試験を行った。その結果 PIS-6(pCC-H30-*ldcC*), PIS-8(pCC-H30-*ldcC*) のどちらの株においてもカダベリン生産が確認された(PIS-6:17.0 mM, PIS-8:8.21 mM)。しかしこれらの値は、カダベリン高生産株である DAP-16 が培養 12 h で 17.5 mM のカダベリンを生産したという報告に劣っている。さらに収率は本研究の PIS-6(pCC-H30-*ldcC*) で 86.9 (mg-Lys)/(g-Glu) であったのに対して、DAP-16 は 229.7 (mg-Lys)/(g-Glu) と、2 倍以上の差があった。DAP-16 と PIS-6 で重複する代謝改変を行っているものがあるがそれらは点変異あるいは破壊であり、本研究では DAP-16 で行われているようなゲノム上のプロモーターの改変や過剰発現を行っていない。このことからカダベリン生産量の向上には、グルコースの取り込みおよびその効率的な利用に向けたプロモーターの改変や過剰発現を行うことが必要だと考えられる。

本研究で用いた PIS-6(pCC-H30-*ldcC*), PIS-8(pCC-H30-*ldcC*) の株間での違いに着目すると、カダベリン生産量のみならずグルコース消費・菌体増殖でも差異が生じた。グルコース消費は特に 24 h までの差が大きく PIS-6(pCC-H30-*ldcC*) で 0.358 g/L/h、PIS-8(pCC-H30-*ldcC*) で 0.133 g/L/h と 2.69 倍の速度差があった。同じく OD600 も 24 h までの差が大きく、PIS-6(pCC-H30-*ldcC*) で 0.462 h⁻¹、PIS-8(pCC-H30-*ldcC*) で 0.157 h⁻¹ という差異が見られた。PIS-8 は PIS-6 の *pgi* および *zwf* に変異を導入した株で、その狙いは 1. *pgi* の変異により、炭素をペントースリン酸経路(PPP)に流すこと。2. *zwf* への変異により、PPP において、カダベリン生産に必要な補酵素 NADPH を増大させることであった。これにより、PIS-8 ではカダベリン生産量が增大すると予想したが、結果はいずれの値も大きく減少した。その原因として 2 つのことが考えられる。1 つ目は炭素を PPP に流すことでグルコースの代謝に時間がかかり、グルコース消費遅滞・成長遅滞が生じてしまったことである。これによって炭素フラックスが大きく変化した可能性や細胞にストレスがかかった可能性が考えられる。2 つ目は *zwf* の変異によって菌体内の補酵素バランスが崩れてしまった可能性である。先行研究には、*zwf* を含む *tkt* オペロンおよび NADPH を使う反応を触媒する *ddh* を強化したものや本研究と同じ *zwf* A243T のプロモーターを改変しているものなどがある。そのため、本研究で用いた株に最適な NADPH のバランスを考慮して *zwf* に関する代謝改変を行うことの必要性が示唆された。

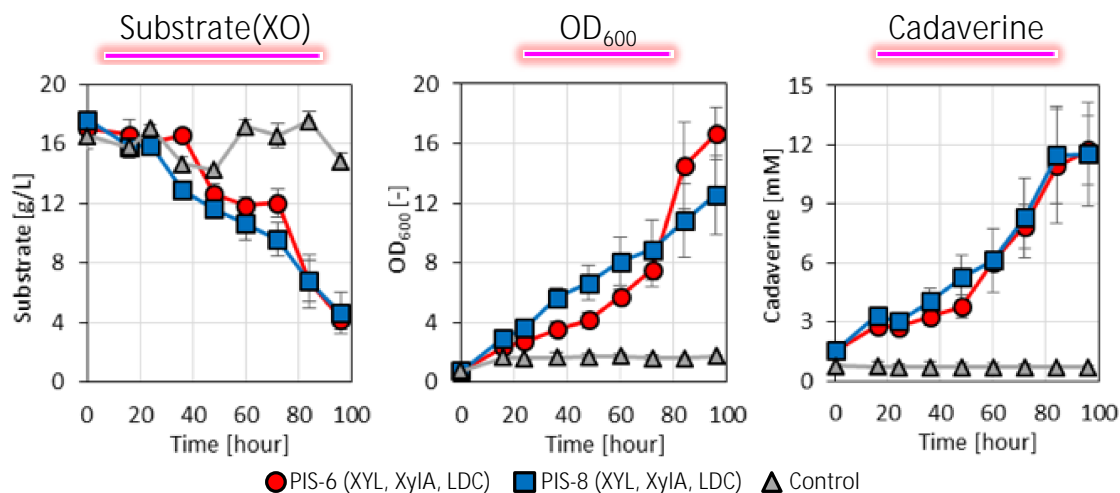
XYL, XylIA, LDC 共発現株によるキシロオリゴ糖からのカダベリン生産

XYL, XylIA, LDC の共発現によるキシロオリゴ糖からのカダベリン生産を試みた。まずは、試験管培養およびフラスコ培養を行う際の前々培養液の菌体に対して XYL assay を行った。結果、XYL 活性が認められ、活性値は「PIS-8 の方が PIS-6 よりも大きい」「pCC-XX 導入時よりも小さい」となった。前者については pCC-XX 導入時に行った XYL assay の結果と一致した。XYL assay を行うための菌体は BHI 培地によって増殖させたものであり、その BHI 培地には 2 g/L のグルコースが含まれる。そのため *pgi*, *zwf* への変異の有無によって発現機構までは変化しないものの、Porin, Bsu17580 の発現に差が生じ、活性値に影響を及ぼした可能性がある。後者については、3 遺伝子の発現を行っているため菌体に負担がかかったことや、プラスミドに



において Bsu17580 の上流にある *ldcC* を高発現プロモーターである H30 で発現しているため、Bsu17580 の翻訳がしづらくなっている可能性などが考えられる。

実際にキシロオリゴ糖を炭素源とするカダベリン発酵試験では MMYE+XO 培地で菌体増殖・カダベリン生産が確認されたが CGXII+XO 培地ではそのどちらも確認されなかった。この問題を、資化可能な糖を加えることによって菌体を増やし培養系の XYL 活性を高めることで解決できると考え、グルコース/キシロース添加実験を行った。その結果、培養 24 h, 48 h において菌体増殖やカダベリン生産が確認されたが、これは 24 h で全て消費された単糖によるものがほ



とんだと考えられる。また、キシロオリゴ糖の消費は単糖を添加していない CGXII+XO 培地を用いた時(2.20 g/L)よりも進んだが、キシロース添加時で 3.28 g/L、グルコース添加時で 2.65 g/L と、MMYE+XO 使用時の 11.1 g/L には及ばなかった。これらの結果から、キシロオリゴ糖分解の促進に炭素源のみの添加は適しておらず、MMYE 中に含まれる成分、中でも豊富な栄養を含む Yeast extract が有効に働いた可能性が高い。しかし、現状では MMYE+XO 培地を用いることでキシロオリゴ糖からのカダベリン生産に成功したということができ、この培地を用いてスケールアップ実験を行った。MMYE+XO 培地を用いたフラスコ培養を行った結果、培養 96 h で PIS-6(pCC-H30-LXX) が 11.7 mM、PIS-8(pCC-H30-LXX) が 11.6 mM のカダベリン生産に成功した。途中、基質消費・OD600 において株間で差異が見られたが、これは XYL 活性の差異によって PIS-8(pCC-H30-LXX) の方が早くキシロオリゴ糖を分解し、菌体増殖に繋がったものと考えられる。キシランからのリジン生産報告では、*C. glutamicum* KCTC 1857(pCHCBP275)を用いて、本研究とほぼ同等の培養時間において約 10 g/L のキシランを分解して 1.12 g/L (7.66 mM) のリジンが生産されており、本研究におけるキシロオリゴ糖からのカダベリン生産量の方が多という結果であった。しかし、PIS-6, 8(pCC-H30-LXX) にキシラン分解酵素 endoxylanase (XynA) を導入することによるキシランからのカダベリン生産を試みた場合、タンパク質の発現に炭素が使われることや菌体へのストレスといった原因から収率および生産速度の低下が予想される。そのため今後、遺伝子の破壊や変異、過剰発現といった代謝改変をすることに加え、XYL, XyIA, LDC および XynA の発現の最適化を図ることも必要になる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Fujiwara, R., Noda, S., Tanaka, T.*, Kondo, A. (2018) Muconic acid production using gene-level fusion proteins in *Escherichia coli*, *ACS Synthetic Biology*, 7(11), 2698-2705

Matsumoto, T., Tanaka, T., Kondo, A. (Review) (2017) Engineering metabolic pathways in *Escherichia coli* for constructing a “microbial chassis” for biochemical production. *Bioresource Technology*, 245, 1362-1368

Imao, K., Konishi, R., Kishida, M., Hirata, Y., Segawa, S., Adachi, N., Matsuura, R., Tsuge, Y., Matsumoto, T., Tanaka T., Kondo, A. (2017) 1,5-Diaminopentane production from xylooligosaccharides using metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* displaying beta-xylosidase on the cell surface. *Bioresource Technology*, 245, 1684-1691

Matsumoto, T., Furuta, K., Tanaka, T., Kondo, A. (2016) Sortase A-Mediated Metabolic Enzyme Ligation in *Escherichia coli*, *ACS Synthetic Biology*, 5(11), 1284-1289

〔学会発表〕(計 5 件)

松浦礼奈・岸田真裕美・田中勉・近藤昭彦 *Corynebacterium glutamicum* を用いたセロピオースからのカダベリン生産技術の開発 化学工学会第 50 回秋季大会 鹿児島大学 2018/9/19

佐藤直樹・田中勉・近藤昭彦 コリネ菌を用いたセロピオースからのシキミ酸生産技術の開発 化学工学会第 50 回秋季大会 鹿児島大学 2018/9/19

松浦 礼奈, 岸田 真裕美, 平田 有希, 田中 勉, 近藤 昭彦「Corynebacterium glutamicum を用いたセルロース系バイオマスからのカダベリン生産技術の開発」 第 69 回日本生物工学会大会、早稲田、2017.9.11-14

松浦礼奈、田中勉、近藤昭彦「コリネ菌を用いたセルロース系バイオマスからのカダベリン生産技術の開発」 酵素工学会 第 78 回講演会、秋田、2017.10.6.

今尾 健太, 瀬川 将太, 田中 勉, 近藤 昭彦 Corynebacterium glutamicum を用いたバイオマスからのカダベリン生産 第 67 回日本生物工学会大会 2016/10/26-28

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：田中 勉

ローマ字氏名：TANAKA Tsutomu

所属研究機関名：神戸大学

部局名：工学研究科

職名：准教授

研究者番号 (8 桁): 90436551

研究分担者氏名：松本 拓也

ローマ字氏名：MATSUMOTO Takuya

所属研究機関名：神戸大学

部局名：科学技術イノベーション研究科

職名：特命助教

研究者番号 (8 桁): 40727161

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。