

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2020

課題番号：16K07665

研究課題名(和文)大腸菌による芳香族化合物発酵の飛躍的効率化につながるバイオマス由来発酵阻害の克服

研究課題名(英文)Overcoming fermentation inhibition for improved production of aromatic compounds by recombinant Escherichia coli

研究代表者

川口 秀夫 (Kawaguchi, Hideo)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・特命准教授

研究者番号：50463873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、大腸菌による芳香族化合物発酵の飛躍的効率化につながるバイオマス由来発酵阻害の克服であり、そのために芳香族化合物生合成における基盤代謝であるシキミ酸経路の“発酵阻害”メカニズムの解明に取り組んだ。実バイオマス(リグニン成分含量が異なる複数の植物系統品種)を材料に、成分分析による発酵阻害物質の特定、発酵生産のメタボロームによる阻害作用点の特定、阻害作用点の代謝改変による発酵阻害の克服、の3つの研究項目を実施した。その結果、発酵阻害にはソルガムの品種間差があり、化合物の基本構造によって発酵阻害様式が異なることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イネ科の大型植物であるソルガムは、収量が高く(サトウキビと同等)、栽培可能地域が広範囲で、かつ農業に適さない耕作限界地でも栽培可能であるため、農業と競合しない産業利用を目的とする“バイオマス植物”としての社会利用が近年注目されている。

しかしこれまで実施例は、搾汁液を用いた酵母によるエタノール発酵しかなく、未利用残渣や他の生産菌への応用が研究されていなかった。本研究を通じて、ソルガム残渣利用の実現可能性を初めて証明し、予想される発酵阻害の程度とその主要な原因物質を特定できたことは、学術的な新しさだけでなく、将来の社会実装に向けた基盤情報として重要な意義がある。

研究成果の概要(英文)：The aims of this study was to understand the mechanisms of fermentation inhibition in Escherichia coli for the production of an aromatic compound, phenyllactic acid (PhLA).

To achieve the goal, the residue of a biomass crop, sorghum, was used as a model lignocellulosic feedstock, and the enzymatic hydrolysate was used as carbon source for PhLA fermentation by recombinant E. coli to investigate the fermentation inhibition.

This study was composed of the following three activities: (i) chemical analysis of the enzymatic hydrolysate of sorghum residue to identify potential fermentation inhibitors, (ii) identification of point(s) in the fermentation inhibition by metabolome analysis, and (iii) metabolic engineering to develop a robust cell against fermentation inhibition. Consequently, we clarified that fermentation inhibition was depend on the cultivars of sorghum and the structure of chemicals contained in enzymatic hydrolysate of the sorghum residues.

研究分野：農芸化学

キーワード：Escherichia coli Fermentation inhibition Metabolism Biomass

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物による芳香族化合物の発酵生産は、抗インフルエンザ薬や高機能ポリマーの原料を糖類から製造する新規技術として近年注目されている。芳香族化合物は糖からシキミ酸経路を経て生合成される。シキミ酸発酵は 2000 年代から大腸菌で研究が始まり、これまでにキーエンザイムの特定と機能改変による増産に成功しているが、バイオマス利用に関する研究基盤が今日まで極めて乏しい。これから予想される障害は、エタノール発酵では 90 年代から研究されている、バイオマス由来成分による“発酵阻害”である。今後、バイオマスから芳香族化合物を高効率に発酵生産するには、従来の代謝改変による増産と生産物の多様化に加えて、代謝改変の基盤である宿主の発酵阻害を克服する必要がある。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、大腸菌による芳香族化合物発酵の飛躍的効率化につながるバイオマス由来発酵阻害の克服であり、そのために芳香族化合物生合成における基盤代謝であるシキミ酸経路の“発酵阻害”メカニズムの解明を研究する。イネ科の高バイオマス植物であるソルガムをモデル植物バイオマスとして、成分分析による発酵阻害物質の特定、発酵生産のメタボロームによる阻害作用点の特定、阻害作用点の代謝改変による発酵阻害の克服、の 3 つの研究項目を実施した。これにより、医薬品や高機能ポリマーの原料となる芳香族化合物をバイオマスから生産するための基盤となる宿主大腸菌の創出に取り組んだ。

3. 研究の方法

上記の背景とこれまでの研究成果をもとに、本研究では研究代表者が発見したシキミ酸代謝に特異的な発酵阻害について、芳香族化合物発酵の飛躍的効率化につながる発酵阻害を克服するための基盤となる研究を行った。以下の 3 つの課題を設定した(図 1)。

- (1) ソルガムのバイオマスからフェニル乳酸発酵における阻害成分の特定
- (2) バイオマス由来成分による発酵阻害作用点の特定
- (3) 阻害作用点の代謝改変による大腸菌のシキミ酸代謝の発酵阻害耐性化

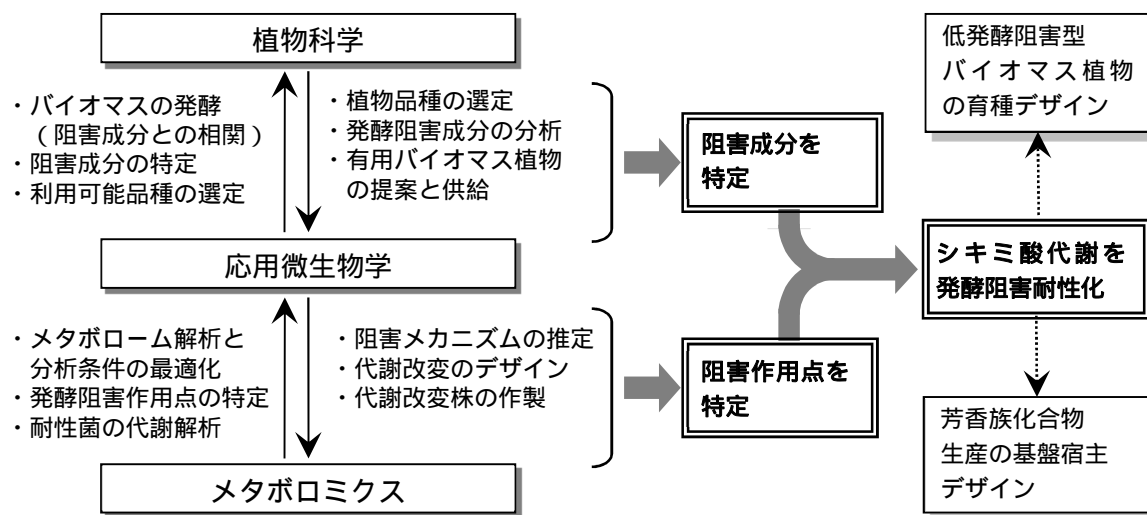


図 1 研究計画概要(成分と作用点の特定による発酵阻害耐性化のアプローチ)

(1) 発酵阻害物質の特定

研究代表者らはこれまでに、ソルガム残渣に含まれるリグニン由来成分(クマル酸やフェルラ酸)がフェニル乳酸発酵の顕著な阻害作用を示すことを明らかにしている(Kawaguchi et al. 2015)。発酵阻害に関与する候補化合物をさらに探索するため、複数の植物系統の成分をガスクロマトグラフィー - 質量分析計(GC-MS)で定性分析した。リグニン生合成に関与する遺伝子 *bmr* に変異あり/なしのソルガムの複数系統をサンプルとして用意し、植物体を粉碎した微粉末を調製した。調製した微粉末に希硫酸を加えて 180 で加水分解したのち、水溶性画分と残渣に分離した。分離した残渣は乾燥させた後、“希硫酸前処理バイオマス”としてその主要構成成分(セルロース、ヘミセルロース、リグニン)を測定するとともに、続く酵素糖化に試供した。希硫酸前処理バイオマスの酵素糖化は 50、72 時間反応させ、遠心分離により得た上清を“酵素糖化液”として発酵における炭素源として利用するとともに、液中に含まれる発酵阻害候補化合物の

濃度を GC-MS を用いて定量分析した。

(2) 発酵阻害作用機序の解明

シキミ酸代謝の発酵阻害を克服した大腸菌を創出するために、発酵阻害作用機序の解明と阻害耐性代謝経路の構築に取り組んだ。

(2) - シキミ酸代謝中間体の解析法の最適化

発酵阻害物質によるシキミ酸代謝への影響を調べるために、メタボロームによる解析法を改良した。フェニル乳酸の生合成経路であるシキミ酸経路の代謝中間体を分析対象化合物として追加し、また液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた分析条件を最適化することで、発酵阻害物質によるフェニル乳酸生合成への影響をより詳細に解析可能な網羅的解析手法を設計した。

(2) - 発酵阻害作用点の特定

ソルガム糖化液による発酵阻害の作用点を明らかにするため、項目(1)で調製した酵素糖化液を炭素源とするフェニル乳酸発酵を行った。発酵はジャーを用いて温度、pH、溶存酸素濃度を制御しながら行い、培養液を発酵途中で回収したあと低温下で遠心分離することで、メタボローム解析に供する細胞を回収した。回収した細胞は液体窒素下で速やかに反応を停止させ、いったん-80 で保管したのちに、液 液抽出により代謝中間体を分離・精製した。また、項目(1)で同定した発酵阻害物質標品の個別添加によるフェニル乳酸発酵への影響を調べることで、各種化合物によるフェニル乳酸発酵の阻害力価 (IC_{50}) を算出・比較した。

(3) 発酵阻害耐性代謝経路の構築

特定した阻害作用点の酵素反応を遺伝子組換えにより機能改変した、代謝改変株の作製に取り組んだ。項目(2)より得た情報をもとに阻害作用点を推定し、その作用点の反応を担う酵素を過剰発現することで、発酵阻害に対する機能強化株を作製した。

4. 研究成果

(1) 発酵阻害物質の特定

17 品種のソルガムを材料に、その微粉末と希硫酸前処理バイオマスとを調製し、その主要構成成分(セルロース、ヘミセルロース、リグニン)を測定した結果、品種間あるいは年度間での有意差が認められた。また希硫酸前処理バイオマスを用いた酵素糖化では、酵素糖化効率を求めるとともに、糖化液に含まれる阻害候補化合物の各濃度を測定した。

化学分析の結果と酵素糖化効率の相関関係を調べるために主成分分析を行った結果、希硫酸前処理バイオマスの酸可用性リグニン含量が、酵素糖化効率(セルロースからグルコースへの変換効率)に最も高い寄与率を示すことを明らかにした(図2)。

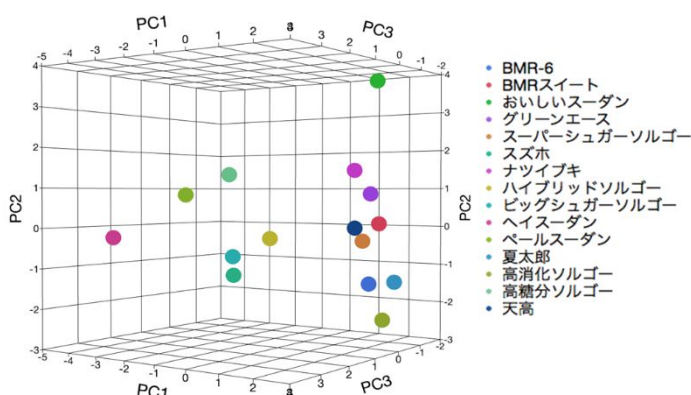


図2 15 品種のソルガムの物理化学的特性と酵素糖化効率に関する主成分分析

(2) 発酵阻害作用機序の解明

シキミ酸代謝の発酵阻害を克服した大腸菌を創出するために、発酵阻害作用機序の解明と阻害耐性代謝経路の構築に取り組んだ。

(2) - シキミ酸代謝中間体の解析法の最適化

発酵阻害物質によるシキミ酸代謝の変動を調べるために、メタボロームによる解析法を改良する。申請者がこれまでに確立した、液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた解析法を最適化すると共に、フェニル乳酸の生合成経路であるシキミ酸経路の代謝中間体を分析対象化合物として追加することで、発酵阻害物質によるフェニル乳酸生合成への影響をより詳細に解析可能な網羅的解析手法を設計した。

(2) - 発酵阻害作用点の特定

ソルガム糖化液に由来する発酵阻害の作用点を明らかにするため、項目(1)で調製した酵素糖化液を炭素源とするフェニル乳酸発酵を行った。発酵はジャーを用いて温度、pH、溶存酸素濃度を制御しながら行い、発酵途中で培養液を回収し、低温下で遠心分離することで、メタボローム解析に供する細胞を回収した。回収した細胞は液体窒素下で速やかに反応を停止させ、いったん-80 で保管したのちに、液 液抽出により代謝中間体を分離・精製した。精製した代謝物をサンプルとしてメタボローム解析を行ったが、ソルガム品種間での差異やシキミ酸経路の代謝ファイル変動など、有意差のある新たな知見を得ることができなかった。

そこで評価の手法を見直し、項目(1)で特定した発酵阻害化合物標品を個別に添加してフェニル乳酸発酵への影響を調べることにした。項目(1)における酵素糖化液中の阻害候補化合物の定性解析結果をもとに、分子構造から発酵阻害候補化合物を5つに分類した(表1)。5つに分類した化合物種をそれぞれ濃度を変え添加し、フェニル乳酸発酵に対する発酵阻害を調べ、その阻害力価(IC₅₀)を算出した。その結果、すべての化合物群が添加容量依存的な発酵阻害を示したが、なかでもB群は低濃度から顕著な阻害作用を示した(図3)。

表1 ソルガム酵素糖化液に含まれる5種の発酵阻害候補化合物

Group	Type	Compound
A	Frans	Furfural, 5HMF, 5-Methyl-2-furaldehyde
B	Aldehydes, phenyl	4-Hydroxybenzaldehyde, Vanillin, Syringaldehyde
C	Benzoic acid, (4-OH)	Benzoic acid, Syringic acid, <i>p</i> -Hydroxybenzoic acid
D	Cinnamic acid, 4-OH	<i>trans</i> -Ferulic acid, <i>p</i> -Coumaric acid, Sinapinic acid
E	Aliphatic acid	Levulinic acid

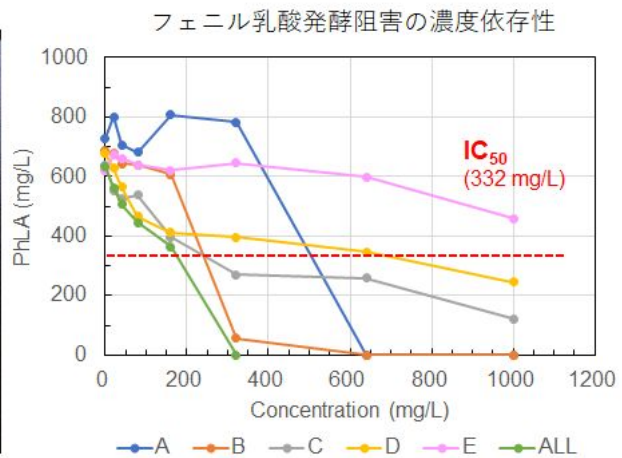
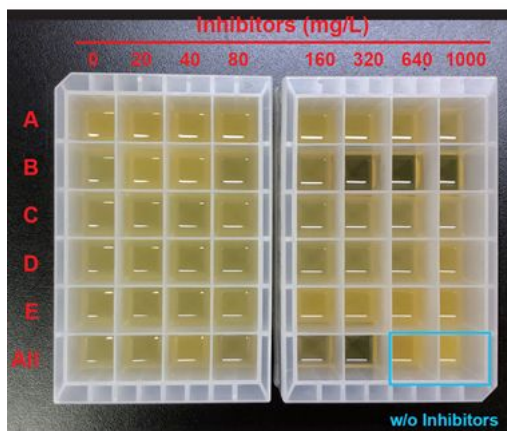
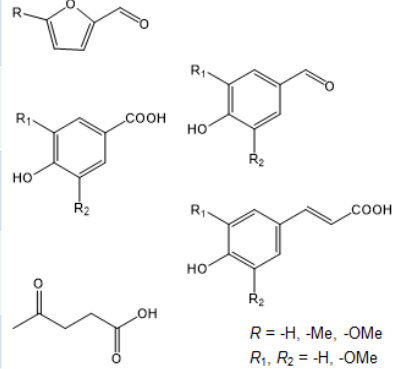


図3 発酵阻害候補化合物の添加によるフェニル乳酸発酵への影響:(左)培養28時間後における増殖阻害阻害の様子と、(右)フェニル乳酸発酵に対する阻害作用の濃度依存性

(3) 発酵阻害耐性代謝経路の構築

項目(2) - ではメタボロームによるシキミ酸経路における、明確な発酵阻害作用点を特定することができなかった。そこで、シキミ酸経路の代謝フラックスを制御している2つのアロステリックなキーエンザイム 3-deoxy-7-phosphorheptulonate synthase (*aroG* 遺伝子がコード)と chorismate mutase / prephenate dehydratase (*pheA* 遺伝子がコード)を高発現することで、フェニル乳酸発酵における発酵阻害耐性代謝経路の構築を試みた(図4)。その結果、両遺伝子の高発現によって、とりわけ *aroG* の高発現が発酵阻害の緩和に関与していることを明らかにした。

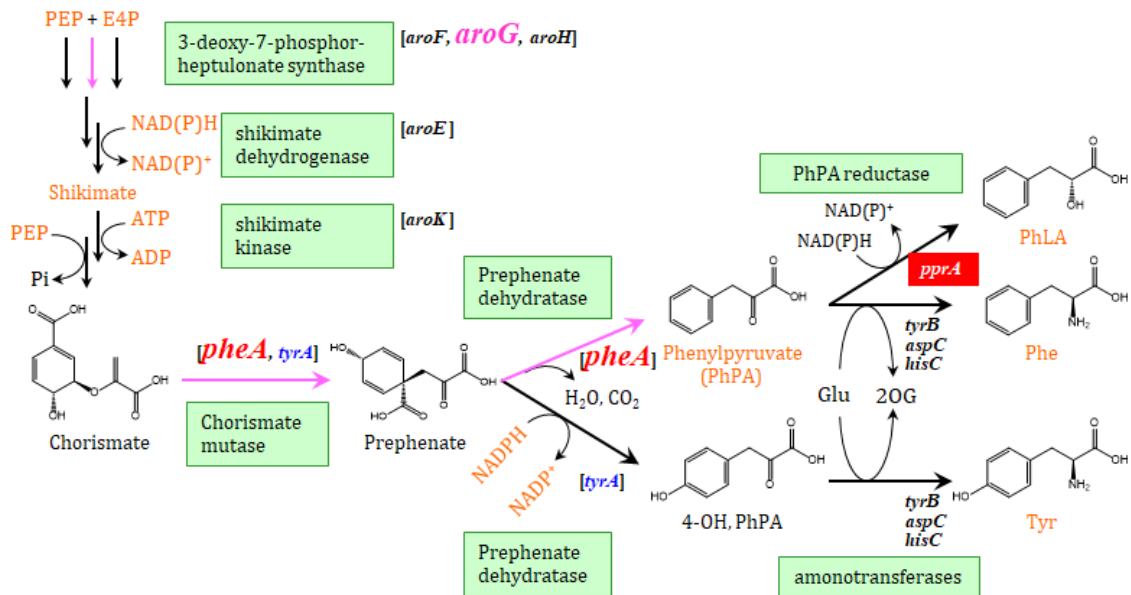


図4 遺伝子組み換え大腸菌におけるフェニル乳酸 (PhLA) 生成の代謝経路

< 引用文献 >

Kawaguchi, H., Teramura, H., Uematsu, K., *et al.* (2015) Phenyllactic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of pretreated sorghum bagasse. *Bioresource Technology*, 182:169–178. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.01.097

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5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 Hideo Kawaguchi, Hiroki Miyagawa, Sachiko Nakamura-Tsuruta, Naoki Takaya, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo	4. 巻 14
2. 論文標題 Enhanced phenyllactic acid production in Escherichia coli via oxygen limitation and shikimate pathway gene expression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 1800478
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/biot.201800478	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 Hideo Kawaguchi, Hiroki Miyagawa, Sachiko Nakamura-Tsuruta, Naoki Takaya, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo	4. 巻 14
2. 論文標題 Enhanced phenyllactic acid production in Escherichia coli via oxygen limitation and shikimate pathway gene expression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 1800478
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/biot.201800478	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 Hideo Kawaguchi, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo	4. 巻 245(Part B)
2. 論文標題 Microbial conversion of biomass into bio-based polymers	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioresource Technology	6. 最初と最後の頁 1664-1673
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biortech.2017.06.135	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 Kengo Sasaki, Yota Tsuge, Hideo Kawaguchi, Masahiro Yasukawa, Daisuke Sasaki, Takashi Sazuka, Eiji Kamio, Chiaki Ogino, Hideto Matsuyama, Akihiko Kondo	4. 巻 101(15)
2. 論文標題 Sucrose purification and repeated ethanol production from sugars remaining in sweet sorghum juice subjected to a membrane separation process	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 6007-6014
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00253-017-8316-3	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 Hiroshi Teramura, Kengo Sasaki, Hideo Kawaguchi, Fumio Matsuda, Jun Kikuchi, Tomokazu Shirai, Takashi Sazuka, Masanori Yamasaki, Shigeo Takumi, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo	4. 巻 81(8)
2. 論文標題 Differences in glucose yield of residues from among varieties of rice, wheat, and sorghum after dilute acid pretreatment	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1650-1656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2017.1336922	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 川口 秀夫、近藤 昭彦	4. 巻 62
2. 論文標題 リグノセルロース系バイオマスからのバイオモノマー発酵生産	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ケミカルエンジニアリング	6. 最初と最後の頁 13-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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16件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 川口 秀夫、福本 妙子、佐塚 隆志
2. 発表標題 ソルガムの酵素糖化効率品種間差を決定する物理化学特性の探索
3. 学会等名 第10回 ソルガムワークショップ
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 川口 秀夫、佐々木 大介、福本 妙子、森田 健太、竹中 武蔵、富田 康平、佐塚隆志、松本 拓也、西野孝、近藤 昭彦
2. 発表標題 ソルガムバガスの酵素糖化効率支配因子の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会関西・中部支部2019年度合同神戸大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 川口 秀夫
2. 発表標題 微生物を活用してバイオマスからバイオプラスチックを作る
3. 学会等名 みえバイオリファイナリー研究会公開セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Hideo Kawaguchi, Kumiko Yoshihara, Tomohisa Hasunuma, Takashi Sazuka, Naoki Takaya, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo
2. 発表標題 Phenylactic acid Production by recombinant Escherichia coli from sorghum bagasse: fermentation inhibition by the enzymatic hydrolysate
3. 学会等名 ASM Microbe 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 佐塚隆志、川口秀夫
2. 発表標題 ソルガムのゲノムデザイン/ソルガムを利用したバイオリファイナリー
3. 学会等名 第9回 ソルガムワークショップ
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 川口 秀夫、Hasan Sharif Moinul、若井 桂子、榎尾 俊介、高谷 直樹、近藤 昭彦
2. 発表標題 溶存酸素濃度がシキミ酸誘導体の発酵生産に与える影響
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部 第507回講演会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Hiroki Miyagawa, Hideo Kawaguchi, Chiaki Ogino, Ken-Ichi Oinuma, Naoki Takaya, Akihiko Kondo
2. 発表標題 Effects of glucose concentration and any other condition on gene expression patterns during phenyllactic acid production by recombinant Escherichia coli
3. 学会等名 23rd Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community (YABEC 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 Akihiko Kondo, Shuhei Noda, Hideo Kawaguchi
2. 発表標題 Development of microbial cell factories for production of aromatic chemicals and derivatives
3. 学会等名 The 13th Asian Congress on Biotechnology 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 川口 秀夫、吉原 久美子、佐塚 隆志、高谷 直樹、蓮沼 誠久、寺村 浩、荻野 千秋、近藤 昭彦
2. 発表標題 組換え大腸菌によるフェニル乳酸における多様な草本系バイオマス糖化液の発酵阻害とその成分の比較
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部例会 第501回講演会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 富永 大介、川口 秀夫、堀 良美、蓮沼 誠久、荻野 千秋、油谷 幸代
2. 発表標題 時系列データと代謝マップからの実反応経路の推定
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年～2017年

1. 発表者名 寺村 浩、佐々木 建吾、白井 智量、川口 秀夫、荻野 千秋、菊地 淳、佐塚 隆志、近藤昭彦
2. 発表標題 疎水性アルコールを用いた植物バイオマスの効率的な成分分離法の開発
3. 学会等名 第61回リグニン討論会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 宮川 寛規、川口 秀夫、荻野 千秋、老沼 研一、高谷 直樹、近藤 昭彦
2. 発表標題 遺伝子組換え大腸菌を用いたフェニル乳酸生産に影響を与える遺伝子の発現解析
3. 学会等名 第68回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2016年～2017年

1. 発表者名 川口 秀夫、近藤 昭彦
2. 発表標題 バイオリファイナリー：植物資源の利用によるホワイトバイオテクノロジー
3. 学会等名 第19回ケナフ等植物資源利用研究発表会・第 22 回特別講演会（招待講演）
4. 発表年 2016年～2017年

1. 発表者名 川口 秀夫
2. 発表標題 微生物を活用したバイオリファイナリー研究：植物からつくるバイオプラスチック
3. 学会等名 北勢バイオコミュニティ研究会キックオフセミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Hideo Kawaguchi, Tatsuo Kaneko, Takashi Sazuka, Tomohisa Hasunuma, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo
2. 発表標題 Microbial production of aromatic compounds applied to synthesize bioplastics from plant biomass
3. 学会等名 JAIST World Conference 2020 International Symposium for Innovative Sustainable Materials & The 7th International Symposium for Green-Innovation Polymers (GRIP2020) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 川口 秀夫、蓮沼 誠久、佐塚 隆志、高谷 直樹、近藤 昭彦
2. 発表標題 遺伝子組換え大腸菌によるフェニル乳酸発酵をモデルとする発酵阻害メカニズムの解明
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度仙台大会 (オンライン)
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 川口 秀夫、荻野 千秋	4. 発行年 2017年
2. 出版社 JST/CRDS	5. 総ページ数 11
3. 書名 研究開発の俯瞰報告書：ライフサイエンス・臨床医学分野 (2017年)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室HP http://www2.kobe-u.ac.jp/~akondo/kawaguchi.html 研究室HP http://www2.kobe-u.ac.jp/~akondo/
--

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	蓮沼 誠久 (HASUNUMA Tomohisa) (20529606)	神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授 (14501)	
研究分担者	寺村 浩 (TERAMURA Hiroshi) (10645089)	神戸大学・科学技術イノベーション研究科・学術研究員 (14501)	2018年度より東京理科大学に異動(先進工学部生命システム工学科・助教)

	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
連携研究者	佐塚 隆志 (SAZUKA Takashi) (70362291)	名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授 (13901)	

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