

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18298

研究課題名(和文)細胞内代謝可視化技術を利用した培養プロセス制御法の開発

研究課題名(英文)Development of process control method based on metabolic visualization technique

研究代表者

戸谷 吉博 (Toya, Yoshihiro)

大阪大学・情報科学研究科・助教

研究者番号：70582162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：微生物発酵による有用化合物の生産においては、目的物質を安定に高生産することが重要であり、これを実現するには培養中の代謝状態を適切に維持することが必要である。また、細胞内の代謝情報を可視化することで、代謝状態の制御に有益な情報が得られると考えた。本研究において、解糖系やTCA回路の反応速度を可視化する蛍光タンパク質センサーを開発した。また、大腸菌によるメバロン酸の生産を例に、解糖系とペントースリン酸経路のフラックス比の制御がメバロン酸の収率に与える影響を実験的に評価した。最適なフラックス比におけるメバロン酸収率は、フラックス比を制御しなかった場合に比べて25%増加することが示された。

研究成果の概要(英文)：In production of useful compounds via fermentation using microorganisms, it is important to maintain high target productivity. In order to achieve this, the metabolism of the cells should be maintained an ideal state during the fermentation. Visualization of intracellular metabolic state using a fluorescent protein provides useful clues for controlling the metabolism. In this work, we developed sensors for visualizing the metabolic flux of glycolysis or the TCA cycle. In the mevalonate production of Escherichia coli, we evaluated that the effect of the flux ratio control between glycolysis and the pentose phosphate pathway on the mevalonate production. It was shown that the mevalonate yield at the optimal flux ratio was increased by 25% compared to without control of the flux ratio.

研究分野：代謝工学

キーワード：代謝フラックス プロセス制御 大腸菌 解糖系 メバロン酸 有用物質生産 ペントースリン酸経路
NADPH

1. 研究開始当初の背景

バイオ燃料や化成品、医薬品原料など様々な有用化合物が微生物発酵によって生産されている。このようなバイオプロダクションの実用化においては、目的物質を安定に高生産することが重要であり、培養プロセスの適切な制御が必要である。また、細胞の代謝を理想的な流れ(フラックス)になるように改変することで、目的物質の生産性を向上させる取り組みも盛んに行われているが、代謝経路のフラックスをファインチューニングすることは難しいという課題があった。近年、細胞内の代謝情報について蛍光タンパク質を利用して可視化するための技術が発展してきた。オンラインに取得可能な可視化情報を培養プロセス制御に利用することで、微生物の培養プロセスを代謝レベルで直接制御することが可能になると考えた。

本研究では目的化合物としてメバロン酸を生産する。メバロン酸は医薬品やゴムの原料として有用な化合物である。メバロン酸は3分子のアセチル CoA から2分子の NADPH を還元力として消費して合成される(図 1 A)。グルコースからアセチル CoA を合成するには、解糖系とペントースリン酸経路が主に働き、解糖系がアセチル CoA の供給には有利であるが、還元力の NADPH が生産されない。一方、ペントースリン酸経路では炭素の一部が CO₂ として失われるが、NADPH が生産される。そのため、メバロン酸の高生産には解糖系とペントースリン酸経路のバランスが重要である。図 1B に解糖系とペントースリン酸経路のフラックス比とメバロン酸生産の関係を示した。メバロン酸の高生産を実現するには解糖系とペントースリン酸経路の適切な比率を維持することが重要であり、化学量論的には、解糖系とペントースリン酸経路のフラックス比が 4 : 6 のときに最大のメバロン酸収率を実現する。

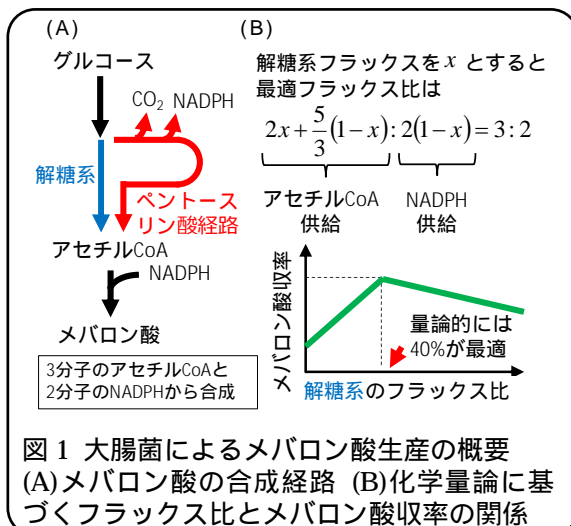


図 1 大腸菌によるメバロン酸生産の概要 (A)メバロン酸の合成経路 (B)化学量論に基づくフラックス比とメバロン酸収率の関係

2. 研究の目的

本研究では、大腸菌によるメバロン酸生産について、可視化した代謝情報に基づいて代

謝フラックス分布を制御する培養プロセス技術を開発する。大腸菌のメバロン酸生産株に、解糖系とペントースリン酸経路のフラックス比を自在に制御するシステムを実装し、フラックス比がメバロン酸の生産に及ぼす影響を実験的に評価した。

3. 研究の方法

(1) 解糖系フラックスセンサーの開発と評価

解糖系フラックスは、転写因子 Cra の活性として可視化した。Cra が遺伝子発現量を制御する *pykF* 遺伝子のプロモーター下流に GFP 遺伝子を導入したプラスミドを利用した。Cra 活性はプロモーターの Cra 結合部位をランダムな配列に置き換えた場合との GFP の生産量の比から計算した。GFP の生産量は励起波長 485 nm、蛍光波長 535 nm における蛍光強度として測定した。

大腸菌 BW25113 株に、解糖系フラックスセンサーや *pgi* 遺伝子の発現量制御のためのプラスミド (Usui *et al.*, 2011) を導入した。遺伝子の破壊には P1 ファージを利用した。大腸菌はグルコース炭素源の合成培地で培養し、*pgi* の発現量制御株では必要量のイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加した。解糖系のフラックスは、¹³C 代謝フラックス解析により実測した。細胞を [1-¹³C]グルコースで培養し、タンパク質由来アミノ酸の ¹³C 濃縮度をフラックスの推定に利用した。

(2) メバロン酸生産株の構築とフラックス比制御の培養実験

大腸菌は元来メバロン酸の生合成経路を持たないため、*Enterococcus faecalis* 由来の *mvaE* と *mvaS* 遺伝子を大腸菌での発現用にコドン最適化し、恒常発現プロモーター下に挿入した。恒常発現プロモーターとして、*fliY*, *lpp*, *recA*, *trp* の遺伝子のプロモーターを検討した。

上記のメバロン酸生産遺伝子を保有するプラスミドを *pgi* 遺伝子の発現量制御株に導入した。培養はグルコース炭素源の合成培地を用い、異なる濃度の IPTG 存在下で解糖系フラックスを制御しながら回分培養を行った。また、*trp* プロモーターでの発現量を強化するため、10 μM の 3-インドールアクリル酸を加えた。また、定常期におけるメバロン酸の生産を評価した。定常期の培養では、増殖させた細胞を遠心分離により集菌し、硫黄源を含まない合成培地に懸濁して、培養試験を実施した。培養液中のメバロン酸や酢酸の濃度は HPLC によって定量した。解糖系とペントースリン酸経路のフラックス比は、¹³C 代謝フラックス解析により決定した。

(3) TCA 回路のフラックスセンサーの開発と評価

フラックスを可視化できる対象の反応を拡大するため、TCA 回路のフラックスセンサ

収率 (赤矢印) は、フラックス比を制御しなかった場合 (青矢印) に比べて約 2 倍に増加した。

本実験から、メバロン酸の生産には最適なフラックス比が存在することを実証でき、また、フラックス比を制御することでメバロン酸の収率を増加できることを示した。

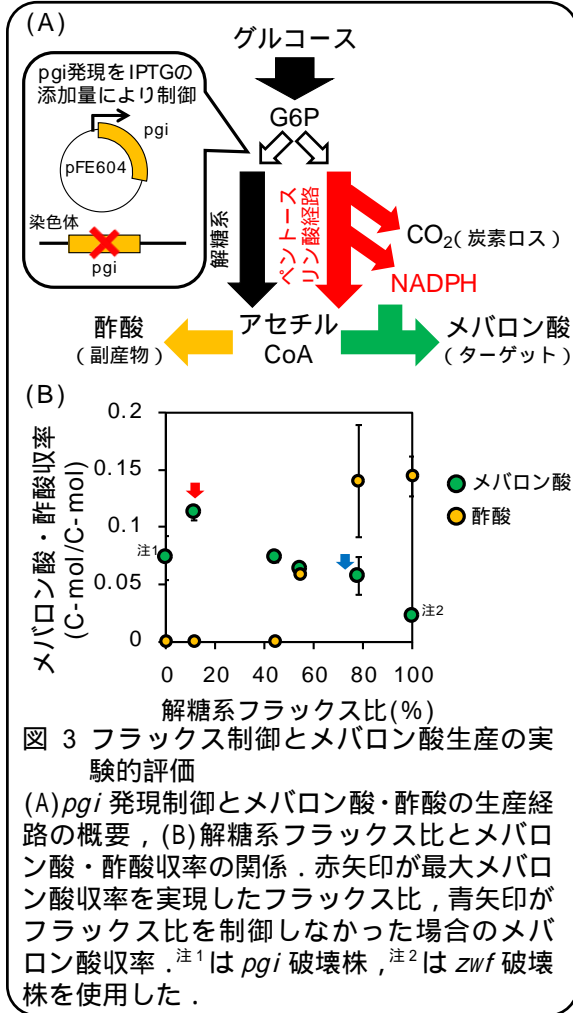


図 3 フラックス制御とメバロン酸生産の実験的評価

(A) *pgi* 発現制御とメバロン酸・酢酸の生産経路の概要, (B) 解糖系フラックス比とメバロン酸・酢酸収率の関係。赤矢印が最大メバロン酸収率を実現したフラックス比, 青矢印がフラックス比を制御しなかった場合のメバロン酸収率。注¹は *pgi* 破壊株, 注²は *zwf* 破壊株を使用した。

(3) 定常期におけるフラックス比制御

これまでの実験によって、メバロン酸の生産には最適な解糖系のフラックス比が存在することを確認したが (図 3B), その比は 10% 程度であり, NADPH の収支から見積もることができる理論値 40% (図 1B) とは異なっていた。この原因として考えられるのは細胞増殖による影響である。細胞増殖にもアセチル CoA や NADPH は使われており, 理論値にはこの影響が考慮されていないためと考えた。そこで, 増殖を抑制した定常期において, フラックス比とメバロン酸の生産性を評価することを試みた。

大腸菌によるメバロン酸生産において, メバロン酸の生産を損なわずに増殖を抑制する方法として, 増殖必須因子の硫黄を制限する方法を見出し, *Bioresource Technology* 誌に発表した (Masuda *et al.*, 2017)。図 4 に定常期において, 解糖系フラックスを変化させた際のメバロン酸と酢酸の収率を示した。

定常期では, 解糖系フラックスが約 40% の条件が最大のメバロン酸収率であり, それ以上でも以下でも収率は低下することが示された。このフラックス比は, NADPH の収支から見積もった理論値 40% (図 1B) と一致しており, 大腸菌におけるメバロン酸の生産では, アセチル CoA と NADPH の供給バランスが重要であり, 解糖系とペントースリン酸経路のフラックス比を制御することの重要性を実証することができた。

また, 定常期では細胞増殖に炭素が消費されないため, メバロン酸収率の最大値が増殖期の約 2 倍に増加した。また, 最大のメバロン酸収率 (赤矢印) は, フラックス比を制御しなかった場合 (青矢印) に比べて約 25% 増加することが示された。定常期においても, 解糖系フラックスが 50% 以上になると, 副産物である酢酸の生産が増加した。

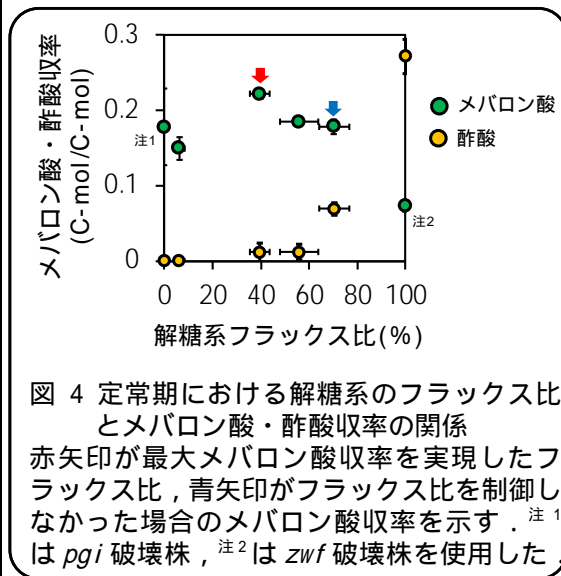


図 4 定常期における解糖系のフラックス比とメバロン酸・酢酸収率の関係

赤矢印が最大メバロン酸収率を実現したフラックス比, 青矢印がフラックス比を制御しなかった場合のメバロン酸収率を示す。注¹は *pgi* 破壊株, 注²は *zwf* 破壊株を使用した。

(4) TCA 回路フラックスセンサーの開発

図 4 に示したようにメバロン酸生産においては, 解糖系のフラックス比が生産性に大きく影響する。一方, TCA 回路の中間体から合成される有用化合物も多く知られている。また, 生合成に必要な還元力として, NADH を使用する有用化合物では, 呼吸鎖のフラックスが重要である。

そこで, 本技術を他のターゲットにも拡大するため, フラックスを可視化する反応の拡大を試みた。TCA 回路や呼吸鎖のフラックスを可視化するため, 転写因子 ArcA の活性に着目した。大腸菌は細胞外の酸素レベルを二成分制御系の ArcA/ArcB を介して感知し, ArcA のリン酸化により電子伝達鎖や TCA 回路, 発酵経路など多数の代謝酵素の発現量を調節する。そのため, ArcA のリン酸化度合い (転写因子活性) を調べることで, 大腸菌が感知する酸素レベルを評価できると考えた。

蛍光タンパク質を用いて, ArcA の制御を受ける複数の遺伝子について, そのプロモーター活性を好気条件と嫌気条件において比較した結果, *icd* 遺伝子のプロモーター活性が

条件間で変化することを見出した。そこで、*icd*プロモーター配列の ArcA 結合部位に変異を導入し、ArcA の転写因子活性を測定するためのセンサープラスミドを構築した (図 5A)。構築したセンサーの好気条件と嫌気条件における活性値は、それぞれ 0.49 と 0.77 であり、酸素レベルが低下すると ArcA 活性が増加するという先行研究の知見と一致した。

中枢代謝と ArcA 活性の関係性を解析するため、増殖速度と酸素供給速度の異なる培養条件について連続培養を実施した。希釈率 0.1, 0.2, 0.4 h⁻¹ の 3 条件について、それぞれ攪拌速度を 100, 300, 500 rpm の 3 条件、計 9 条件について調査した。

酸素消費速度と ArcA 活性の関係を調べたところ、強い負の相関があることを発見した (図 5B)。また、この関係性に対して増殖速度の違いは影響しないことが確認できた。この結果より、このセンサーは反応で酸素を消費する電子伝達鎖のフラックスを可視化できることがわかった。なぜ呼吸鎖のフラックスという速度の情報が転写因子活性と相関していたのだろうか。ArcA のリン酸化は ArcB のリン酸化によって調節されており、ArcB のリン酸化はキノンによって阻害されることが知られている。呼吸鎖のフラックスはキノンとキノールの比率に変換され、それによって ArcA/B のリン酸化度合 (活性) が制御されたと考えられる (図 5D)。

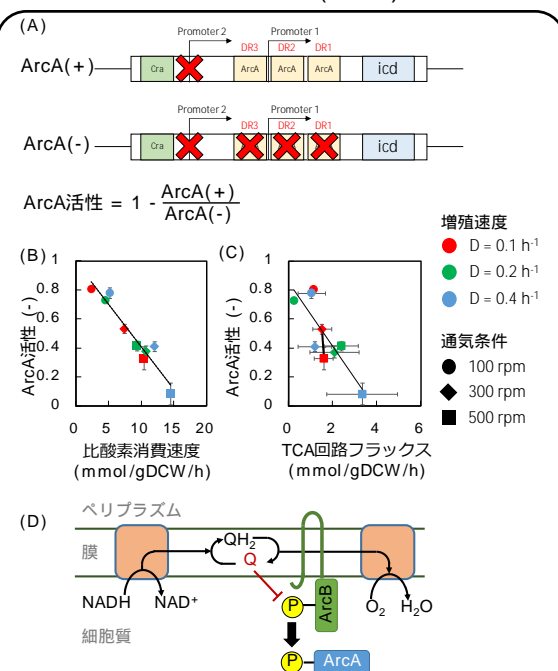


図 5 TCA 回路フラックスセンサーの概要と性能評価

(A)センサーの原理, (B)酸素消費速度と ArcA 活性の関係, (C)TCA 回路フラックスと ArcA 活性の関係, (D)呼吸鎖フラックスが ArcA 活性に影響を与える機構の仮説. TCA 回路のフラックスはイソクエン酸脱水素酵素の反応を示した. フラックスについてのエラーバーは, フラックスバライアビリティ解析によって計算した実現可能範囲を示す.

呼吸鎖と TCA 回路は, 補酵素 NADH を介して繋がっている. そこで, TCA 回路のフラックスと ArcA 活性の関係も評価したところ, ArcA 活性は TCA 回路のフラックスに対しても負の相関があることを確認した (図 5C). 本研究で明らかになった, ArcA 活性と酸素消費速度や TCA 回路のフラックスの関係は, 本プロセスの目的化合物を拡大する上で, 有効なツールとなるであろう.

(5) 光スイッチによる代謝フラックスの制御

本研究では, 解糖系とペントースリン酸経路のフラックス比の制御に IPTG 誘導による遺伝子発現調節システムを利用してメバロン酸の生産性を評価した. しかし, 連続培養プロセスにおいては, IPTG は培養液に加えことは容易でも, 培養液から即時に抜き取ることができないため, 発現をオフに制御するには時間がかかるという課題が生じた. そこで, 物理刺激である光を用いて, 大腸菌の中枢代謝経路のフラックス分布を制御するシステムを開発した. シアノバクテリア由来の照射光の波長による遺伝子発現制御系である CcaS/CcaR を大腸菌に実装し, 緑色光もしくは赤色光の照射により標的遺伝子の発現量を制御した.

本研究では, フラックスを制御する対象として, 大腸菌の中枢代謝経路のジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) をグリセルアルデヒド 3 リン酸 (GAP) に変換する反応に着目した. この反応は *tpiA* がコードするトリオスリン酸イソメラーゼによって触媒される. この遺伝子を破壊すると DHAP が蓄積し, 1,3-propanediol など様々な有用物質の収率が向上することが報告されている. しかし, *tpiA* を破壊すると解糖系のフラックスが低下し, 増殖に悪影響を及ぼす. そこで, *tpiA* 発現を制御することで, 物質生産性を向上しつつ増殖速度も向上できると考えた (図 6A).

大腸菌 BW25113 *envZ tpiA* 株を宿主として, 光感知システムに必要な色素の合成遺伝子である *pcyA*, *ho1* と *ccaS* が挿入されたプラスミド (pSR43.6r) と *ccaR* を保有するプラスミド (pSR58.6) (Schmidl *et al.*, 2014) を導入した. さらに, *cpcG2* プロモーターの下流に *tpiA* が挿入されたプラスミドを構築し (pBbS4a-PcpcG2-*tpiA*), 親株に導入した.

構築した株を緑色光照射下, および赤色光照射下で培養した結果を図 6B に示した. 比増殖速度は緑色光下で 0.40 h⁻¹, 赤色光下で 0.31 h⁻¹ だった. これは緑色光下で *tpiA* の発現が促進され, 増殖速度が回復したものと考えられる. すなわち, 期待した通り増殖速度を光照射により制御することに成功した.

今後は, 蛍光タンパク質によりフラックスを検知し, 光照射によりフラックスを制御するというプロセスに発展できると期待できる. pSR43.6r と pSR58.6r は Rice 大学の Tabor 教授より提供されたプラスミドを使用した (Addgene ID 63197, 及び 63176).

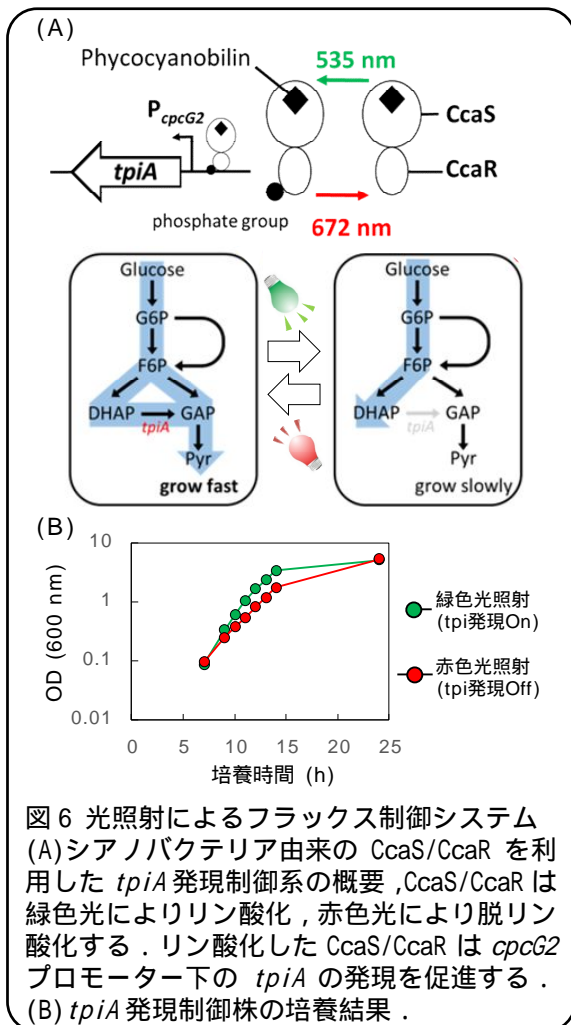


図6 光照射によるフラックス制御システム
(A)シアノバクテリア由来の CcaS/CcaR を利用した *tpiA* 発現制御系の概要、CcaS/CcaR は緑色光によりリン酸化、赤色光により脱リン酸化する。リン酸化した CcaS/CcaR は *cpcG2* プロモーター下の *tpiA* の発現を促進する。
(B) *tpiA* 発現制御株の培養結果。

本研究により、大腸菌の解糖系について IPTG 添加によりフラックス比を制御し、それを蛍光強度として検出するシステムを開発した。また、大腸菌のメバロン酸生産において、解糖系のフラックス比を制御することで、収率を向上させることに成功した。このように外部からフラックス比を制御し、目的物質の生産性を向上した例は、国内外の研究でも余り報告されておらず、他の目的物質にも応用可能な重要な知見だと考えている。さらに、呼吸鎖や TCA 回路のフラックスを可視化するセンサーを開発し、可視化対象の反応を拡大することができた。また、光照射による代謝フラックス制御システムの開発に成功した。これはフラックスのオン・オフ制御による、今後のプロセス開発への可能性を示した。

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 1 件)

Masuda A, Toya Y, Shimizu H, Metabolic impact of nutrient starvation in mevalonate-producing *Escherichia coli*, *Bioresource Technology*, 査読有, 245(Pt B)巻, 1634-1640, 2017.

DOI: 10.1016/j.biortech.2017.04.110.
〔学会発表〕(計 12 件)

後野 直哉, 戸谷 吉博, 清水 浩, 酸素レベルに応じた大腸菌の代謝制御の可視化と解明, 化学工学会第 83 年会, 2018, 大阪.

妹尾 幸枝, 戸谷 吉博, 清水 浩, 光照射による大腸菌の中核代謝経路のフラックス制御, 化学工学会第 83 年会, 2018, 大阪.
Toya Y, Application of ^{13}C -metabolic flux analysis for efficient mevalonate production in *Escherichia coli*, KoMetS, 2017, 韓国.

戸谷 吉博, 増田 亜美, 和田 圭介, 徳山 健斗, 坂野 聡美, 吉川 勝徳, 松田 史生, 清水 浩, ^{13}C 代謝フラックス解析に基づくメバロン酸生産大腸菌の評価, 第 11 回メタボロームシンポジウム, 2017, 大阪.

鎌田 健太郎, 増田 亜美, 和田 圭介, 戸谷 吉博, 清水 浩, 中核代謝のフラックス制御がメバロン酸経路に及ぼす影響の解析, 化学工学会第 49 回秋季大会, 2017, 愛知.

妹尾 幸枝, 戸谷 吉博, 清水 浩, 光による遺伝子発現制御系を利用した大腸菌代謝制御の検討, 化学工学会第 49 回秋季大会, 2017, 愛知.

増田 亜美, 徳山 健斗, 戸谷 吉博, 清水 浩, 定常期における大腸菌メバロン酸生産株の ^{13}C 代謝フラックス解析, 化学工学会第 82 年会, 2017, 東京.

Toya Y, Wada K, Masuda A, Tokuyama K, Yoshikawa K, Matsuda F, Shimizu H, Metabolic flux measurement for efficient mevalonate production in *Escherichia coli*, iBio-P, 2016, 韓国.
増田 亜美, 戸谷 吉博, 徳山 健斗, 坂野 聡美, 吉川 勝徳, 清水 浩, メバロン酸生産大腸菌の定常期における代謝状態の解明, 第 68 回日本生物工学会大会, 2016, 富山.
Toya Y, Masuda A, Shiraki T, Shimizu H, Computational pathway design for efficient bio-production during stationary phase, *Metabolic Engineering* 11, 2016, 兵庫.

戸谷 吉博, 和田 圭介, 増田 亜美, 徳山 健斗, 坂野 聡美, 吉川 勝徳, 松田 史生, 清水 浩, 大腸菌による効率的なメバロン酸生産のための代謝解析, 化学工学会第 48 回秋季大会, 2016, 徳島.

後野 直哉, 戸谷 吉博, 清水 浩, 蛍光タンパク質を利用した大腸菌の酸素レベルに応じた代謝の解析, 化学工学会第 48 回秋季大会, 2016, 徳島.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸谷 吉博 (TOYA, Yoshihiro)

大阪大学・大学院情報科学研究科・助教
研究者番号: 70582162