

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月21日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18299

研究課題名(和文)木質系バイオマスからの芳香族ポリマー原料生産を志向した工業用乳酸菌の創生

研究課題名(英文) Aromatic compounds production from lignocellulosic biomass by engineered lactic acid bacteria

研究代表者

岡野 憲司 (Okano, Kenji)

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号：40623335

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)：リグノセルロース加水分解産物からの芳香族ポリマー原料生産に向けて、C5・C6糖の同時資化が可能であり、乳酸を生産しない菌株の創製を試みた。乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の破壊による乳酸生産の抑制は、酸化還元バランスの崩壊を招くため、破壊株は極めて低頻度しか得られず、またその後の遺伝子改変が困難であった。そこで、同遺伝子を破壊する代わりに、酸化還元バランスの維持が可能なエタノール生産遺伝子での置換を行った。得られた株は乳酸を生産せず、更なる遺伝子改変が可能であり、C5糖の利用の付加が可能であった。残念ながら、芳香族化合物生産にはいたらなかったが乳酸菌の代謝改変における重要な知見を与えることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脱石油化・低炭素化社会の実現に向け、再生可能資源であるバイオマス資源から生産可能なバイオプラスチックの需要が拡大している。既存市場は脂肪族ポリマーが中心であったが、力学的物性・耐熱性のより高い芳香族ポリマーの生産技術の開発が活発化している。本研究は非可食資源で賦存量の多いリグノセルロース系バイオマスからの芳香族ポリマー原料の生産技術を提供するもので社会的意義は大きい。残念ながら研究期間内には芳香族化合物生産には至らなかったものの、乳酸生産能の欠損が乳酸菌の代謝生理に及ぼす様々な影響が明らかになるとともに、遺伝子改変のための基本的戦略が確立され、その学術的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Construction of an engineered *Lactobacillus plantarum* strain, which produces no lactate and enables simultaneous utilization of C5 and C6 sugars, was performed. Deletion of lactate dehydrogenase gene allowed inhibition of lactate production. However, disruption of redox balance in the resultant strain led decrease of transformation efficiency and further gene modification was impossible. Therefore, lactate dehydrogenase gene was replaced with pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase. This resulting strain allows further gene modification and its C5 sugar utilization was partially improved. Unfortunately, aromatic compound production was not performed due to this transformation barrier. However, this study gave us important findings for gene modification of non-lactate producing strain.

研究分野：生物化学工学

キーワード：乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* エタノール 芳香族化合物 リグノセルロース ホスホケトラーゼ経路 ペントースリン酸経路

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

1. 研究開始当初の背景

脱石油化・低炭素化社会の実現に向け、再生可能資源であるバイオマス資源から生産可能なバイオプラスチックの需要が拡大している。既存市場は脂肪族ポリマーが中心であったが、力学的物性・耐熱性のより高い芳香族ポリマーの生産技術の開発が活発化している。例えば、Suvannasara らは大腸菌の代謝改変により 4-アミノ桂皮酸を生産し、当該モノマーから合成されるポリイミドの耐熱温度 (390 以上) が脂肪族ポリマー (概ね 100 以下) に比べ著しく高いことを示した【*Macromolecules*, 2014, 47:1586-1593】。しかしながら、既往の研究はいずれもトウモロコシなどの食糧資源から得られるグルコースを微生物発酵の原料としており、非可食資源で賦存量の多いリグノセルロース系バイオマスからの芳香族ポリマー原料の生産技術は確立されていない。

2. 研究の目的

このような現状を打破すべく、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* の優れた特徴に着目した。リグノセルロースの利用にはその加水分解産物 (Lignocellulose hydrolysate、以後 LCH) に含まれるグルコース、セロオリゴ糖、キシロースやアラビノースといったペントースを効率的かつ同時に微生物に利用させる技術が必要であるが、*L. plantarum* は元来オリゴ糖の資化能力に優れ、3糖までのセロオリゴ糖の資化が可能である。また、本菌にペントースをキシロース-5-リン酸へと変換する酵素群と、ペントースリン酸経路を導入することで、ペントースの資化が可能となり、グルコースと同時に資化することも可能である。更に *L. plantarum* は数百 μM 程度の微量ではあるがフェニル乳酸を生産する天然の芳香族ポリマー原料生産菌である【Zhang et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 2014, 356: 89-96】。従って、本申請では *L. plantarum* を宿主として、(1) 乳酸の生産能を欠損させた。(2) ペントース資化能を賦与し、(3) フェニル乳酸の生産能力を増強することで、木質系バイオマスから芳香族ポリマー原料を大量生産可能な工業用乳酸菌の創製を目指す。なお、(1)の乳酸生産能の欠損においては、欠失株が乳酸以外の物質生産に利用が可能であることを簡便に示すべく、エタノール生産経路の導入を行い、そのエタノール生産能の評価も行った。

3. 研究の方法

(1) 乳酸生産能の欠損とエタノール生産株の構築

L. plantarum はピルビン酸より L-乳酸および D-乳酸を生成するための L-乳酸デヒドロゲナーゼ (L-LDH) および D-乳酸デヒドロゲナーゼ (D-LDH) 遺伝子を保有している。L-LDH をコードする *ldhL1* 遺伝子の破壊体である ΔldhL1 株は以前の研究で作成した【Okano et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, 75: 462-467】。そこで本研究では、 ΔldhL1 株の D-LDH をコードする *ldhD* 遺伝子の破壊を行った。温度感受性型の複製タンパク質を有する pG+host9 に *ldhD* 遺伝子上流および下流の 1 kbp 領域を組み込んだプラスミド pGh9- ΔldhD を構築した。プラスミドが複製可能な 30 にて ΔldhL1 株の形質転換体を取得した。次に、プラスミドの複製が可能で 42、選択条件下にて培養を行うことで、プラスミドが相同領域を介してゲノムに取り込まれた株を取得した (図 1)。続いて、プラスミドの複製が可能で 30、非選択条件下で培養することで、ゲノムからプラスミドが切り出され、かつプラスミドが脱落した株を取得した。得られた複数コロニーより遺伝子型が野生型ではなく、破壊型にシフトした株を選抜し、 ΔldhL1 ΔldhD 二重破壊株を取得した。

得られた二重破壊株にエタノール生産経路の導入を行った。*Acetobacter pasteurianus*、*Zymomonas mobilis*、*Lactobacillus florum* よりピルビン酸デカルボキシラーゼ (PDC) 遺伝子を、*Z. mobilis*、*Oenococcus oeni* よりアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) 遺伝子を取得し、構成発現プラスミド pKO-2155 に導入した。作成した種々の PDC-ADH 共発現プラスミドを ΔldhL1 ΔldhD に導入した。得られた種々の形質転換体を 100 mL のフラスコを用いて 100 g/L のグルコースと 15 g/L の CaCO_3 を含む改変 MRS 培地で培養し、培養 48 h 後のエタノール生産能の評価を行った。エタノールの定量には王子計測機器のバイオセンサーを使用した。最もエタノール生産能の高かった *A. pasteurianus* 由来 PDC (ApPDC) と *O. oeni* 由来 ADH (OoADH3) の組み合わせについては、これらの遺伝子をオペロン上にし、 ΔldhL1 ΔldhD 株の *ldhD* 座位に組み込み、 $\Delta^2\text{-EtOH}$ 株を作成した。後述の通り、本株は ΔldhL1 ΔldhD 株より形質転換効率が向上しており、今後の遺伝子改変に有用である。

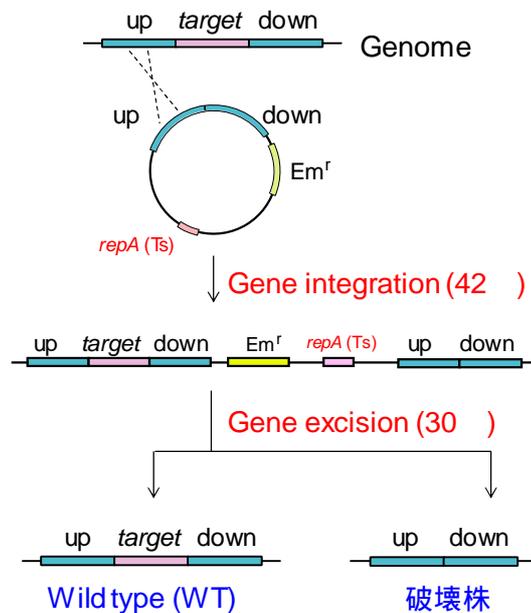


図 1 乳酸菌の遺伝子破壊方法

(2) ペントース資化経路の改変とキシロース資化能の付与

L. plantarum は元来ペントースの一種であるアラビノースの資化が可能である。本株において、アラビノースはキシロース-5-リン酸へと変換された後、ホスホケトラーゼ経路と呼ばれる酢酸とピルビン酸を 1:1 で生成する。従って、本経路では芳香族化合物生産の出発物質となるエリトロース-4-リン酸 (E4P) やホスホエノールピルビン酸 (PEP) は供給されない。従って、ペントースよりこれらの化合物の生成が可能なペントースリン酸経路を導入する必要がある。そこで、 $\Delta ldhL1 \Delta ldhD$ 株においてホスホケトラーゼ遺伝子をコードする *xpk1* 遺伝子を *Lactococcus lactis* 由来のトランスケトラーゼ遺伝子 (*tkt*) で置換した株 $\Delta^2\text{-EtOH } xpk1::tkt$ 株を構築した。続いて、本株にキシロース資化経路の導入を試みた。これにあたって、まずキシロース依存的に発現するホスホケトラーゼ遺伝子である *xpk2* 遺伝子の破壊を行い、 $\Delta^2\text{-EtOH } xpk1::tkt \Delta xpk2$ 株の作成を行った。その後、本株に *Lactobacillus pentosus* 由来の xylose isomerase (*xylA*) および xylulokinase 遺伝子 (*xylB*) を組み込んだプラスミド pCU-XylAB を導入し、キシロース資化能の付与を行った。ペントース資化能や生産物プロファイルを確認するため、得られた各種形質転換体をグルコース、アラビノース、キシロースの濃度や混合比を変化させた改変 MRS 培地にて培養を行った。基質と生産物は島津製作所 HPLC を用いて、検出器として RID 検出器、カラムとして Bio-rad 社のアミネックス HPX-87H を用いた。

(3) フェニル乳酸生産能力の増強

芳香族化合物生産経路であるシキミ酸経路は E4P と PEP から 3-deoxy-D-arabino-heputulosonate 7-phosphate (DAHP) を合成する反応を初発反応とする。本反応を触媒する DAHP 合成酵素はフェニルアラニンやチロシン、トリプトファンなど、本経路より合成される芳香族アミノ酸によってフィードバック阻害を被ることが、大腸菌やコリネ型細菌などにおいて知られる。従って、*L. plantarum* においても同様の阻害が起こりうると想定し、フィードバック阻害の耐性酵素遺伝子を過剰発現させることとした。大腸菌由来のフィードバック阻害耐性酵素遺伝子として *aroG15* を取得し、乳酸菌過剰発現ベクターである pKO-2150 に導入し、pKO-2163 を得た。本プラスミドの種々の乳酸菌株への導入を試みた。後述の通り、形質転換体の取得に多大な時間を費やし、形質転換体の取得に至ったものの、その評価はまだできていない状態である。

4. 研究成果

(1) 乳酸生産能の欠損とエタノール生産株の構築

実験方法に記載の温度感受性プラスミドを用いた遺伝子破壊法により $\Delta ldhL1 \Delta ldhD$ 二重破壊株の候補株を取得した。*ldhD* 遺伝子の上流 500 bp、および下流 500 bp 領域にアニーリングするプライマーを用いてゲノムより PCR を行った結果、*ldhD* 遺伝子の破壊に伴う約 1 kbp のサイズシフトが得られたことから、*ldhD* 遺伝子の破壊を確認することができた。その後、シーケンス解析によっても遺伝子破壊の確認を行った。本破壊株の増殖特性を確認するため、 $\Delta ldhL1$ 株および $\Delta ldhL1 \Delta ldhD$ 株を MRS 培地にて好気条件ならびに嫌気条件で培養を行った (図 2)。興味深いことに、 $\Delta ldhL1$ は好気条件においても嫌気条件においても同等の生育能を示したのに対し、 $\Delta ldhL1 \Delta ldhD$ 株は嫌気条件での生育が著しく低下していた。乳酸デヒドロゲナーゼの生理的意義として、解糖系で生じた NADH を NAD^+ に再酸化することで、生体内の酸化還元バランスを調整する働きがある。嫌気条件下での増殖能の低下は酸化還元バランスの低下によるものかもしれない。

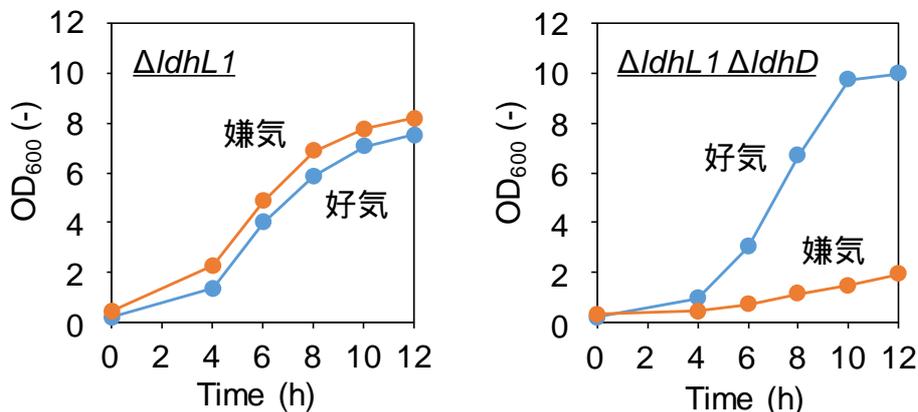


図 2 $\Delta ldhL1$ 株および $\Delta ldhL1 \Delta ldhD$ 株の増殖プロファイル

続いて、 $\Delta ldhL1 \Delta ldhD$ 株が乳酸以外の物質を生産するに資する株であるかを簡便に評価するために本株にエタノール生産経路の導入を試みた。また、本実験は乳酸生産能の欠失による嫌氣的増殖能の欠損が、酸化還元バランスを整えることで回復するかどうかを確認するという狙いもある。3 種の PDC と 2 種の ADH について、単発現、共発現様々な組み合わせで遺伝子発

現を行った乳酸菌株を用いたエタノール生産結果を図3に示す。1と2に示すADHのみを発現した株ではエタノールの生産は確認できず、*L. plantarum*はPDC活性を有さないことが明らかとなった。一方、PDCとの共発現を行った株については、ApPDCまたはZmPDCを発現した株においてエタノールの生産が確認され、ApPDC発現株において顕著なエタノール生産が見られた。また、ApPDC発現株においては、単発現株でも顕著なエタノール生産が確認できたことから、*L. plantarum*はADH活性を有していることが明らかとなった。ApPDCとOoADH3の共発現株が最も高いエタノール生産が見られたことから、本株を用いてジャーフェーマンターでのエタノール生産を試みた。

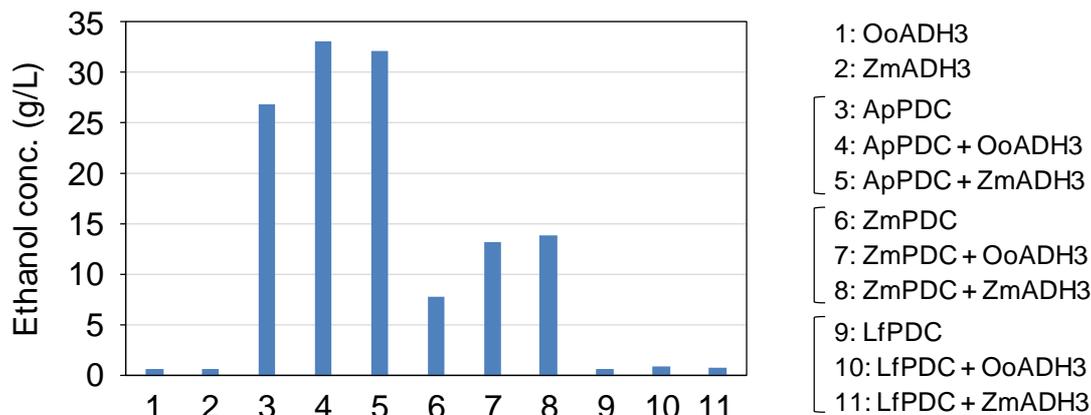


図3 種々のPDC、ADH発現株のエタノール生産能の比較

ジャー培養は150 g/Lのグルコースを基質として温度37℃、pH 6.0に制御下で実施した。図4左に示す通り、菌体の増殖が確認でき、嫌気状態の生育が回復していることが明らかとなった。また、培養約100 hで60 g/L近くのエタノール生産が確認できたことから乳酸菌*L. plantarum*は乳酸以外の化合物の生産にも資する株であることが明らかとなった。

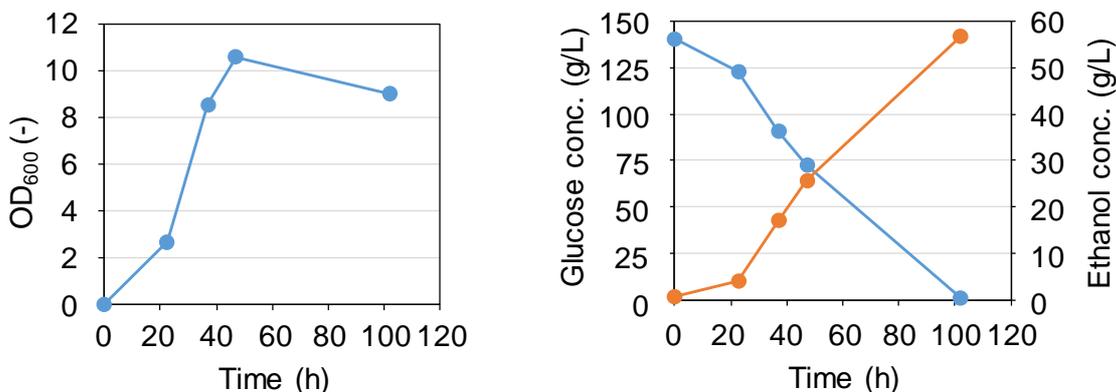


図4 ジャーフェーマンターを用いたエタノール発酵実験

(2) ペントース資化経路の改変とキシロース資化能の付与

実験方法に記載の通り、アラビノースおよびキシロースから芳香族化合物を生産するためにはホスホケトラーゼ経路の遮断とキシロース資化能の付与が必要である。そのため、*xpk1*の遺伝子の*tkt*遺伝子による置換、*xpk2*遺伝子の破壊と*xylAB*オペロンの導入が必要である。しかしながら、 $\Delta ldhL1 \Delta ldhD$ 株は $\Delta ldhL1$ 株と比較して、形質転換効率が著しく低く、これらの遺伝子改変株を取得することができなかった。また、以前に取得した $\Delta ldhL1$ 株のペントース利用能の改善株を出発株として $ldhD$ 遺伝子を破壊し、乳酸生成能を欠損させるという逆のストラテジーも採用したが、こちらでは形質転換効率には問題はないものの、遺伝子破壊株を取得することができなかった。 $\Delta ldhL1 \Delta ldhD$ 株の形質添加効率の低さが、前述の嫌気条件での増殖能の低下と関連するのではないかと、という過程のもと、 $\Delta ldhL1 \Delta ldhD$ 株の $ldhD$ 座位にApPDCとOoADH3遺伝子をオペロン上に組み込んだ Δ^2 -EtOH株を作成した。本株では、嫌気的な増殖が回復するとともに、 $\Delta ldhL1$ には劣るものの形質転換効率の改善が見られた。その結果、本 Δ^2 -EtOH株を出発とした、*xpk1*の遺伝子の*tkt*遺伝子による置換、*xpk2*遺伝子の破壊と*xylAB*オペロンの導入が可能となった。

続いて、得られた株において、ホスホケトラーゼ経路が不活化し、ペントースリン酸経路が導入されていることを間接的に確認するため、種々の糖源からのエタノール生産を行った。なお、 Δ^2 -EtOH株のエタノール生産能が十分でないため、実験にはApPDCとOoADH3の過剰発現プラスミドであるpKO-2155導入株を用いた。pKO-2155/ Δ^2 -EtOH株およびpKO-2155/ Δ^2 -EtOH

xpk1::tkl 株を用いて、50 g/L グルコースと 50 g/L アラビノースからなる混合糖からのエタノール発酵を行った。表 1 に示す通り、発酵 48 h 後、pKO-2155/ Δ^2 -EtOH 株ではホスホケトラーゼ経路が機能しているため、エタノールのみならず、顕著な酢酸の生産が確認された。一方、pKO-2155/ Δ^2 -EtOH *xpk1::tkl* 株では酢酸の生産がかなり低下しており、代謝経路がペントースリン酸経路に切り替わっていることが示唆される。一方で酢酸生成量低下に伴う、エタノール生産量の増加は確認されておらず、物質収支が不自然な結果となっている。表 1 にて記載した化合物以外にも様々な化合物の生産を評価する必要があるとともに、目的化合物生産量向上のための代謝改変が必要である。続いて、pKO-2155/ Δ^2 -EtOH *xpk1::tkl* 株にキシロース資化能プラスミドを導入した株について、キシロースからのエタノール生産を試みたが、本株はキシロースはおろかグルコース培地においても著しい増殖能の低下が見られた。ApPDC、OoADH3、XylA、XylB といった多数の酵素遺伝子を過剰発現することによる菌体への負荷が原因として考えられ、今後これらの発現バランスの最適化が必要である。

表 1 グルコース、アラビノース混合糖からのエタノール発酵結果

Strain	Products (g/L)				
	Glucose	Arabinose	Lactate	Acetate	Ethanol
pKO-2155 / Δ^2 -EtOH	0	21.8	4.4	12.0	20.7
pKO-2155 / Δ^2 -EtOH <i>xpk1::tkl</i>	0	19.9	4.2	4.9	20.4

(3) フェニル乳酸生産能力の増強

Δ^2 -EtOH 株において DAHP 合成酵素のフィードバック阻害耐性酵素を過剰発現させるべく、pKO-2163 の導入を試みたが、形質転換体が取得できなかった。*L. plantarum* は細胞壁の構成成分として D-乳酸を必要としており、D-乳酸生成能の不活化は菌体生育に悪影響を与える可能性がある。そこで、形質転換を行う際の培地に D-乳酸を添加するという手法を採用することで、形質転換体を取得することができた。しかしながら、本形質転換体はまだ取得できたばかりであり、生産物評価には至っていない。引き続き、そのフェニル乳酸生産能の評価が必要である。

総括

本研究では、*L. plantarum* の乳酸生産能欠失株の取得に成功するとともに、エタノール生産の実施により、本株が乳酸以外の物質の生産に対しても有効であることを示した。また、ペントース資化経路の改変にも部分的に成功している。しかしながら、乳酸生産能の欠失による形質転換能の低下という壁に阻まれ、その改善に研究のかなりの時間を費やすこととなった。その結果、目的とする芳香族化合物の生産には至っていない。しかしながら、酸化還元バランスを整えることや D-乳酸を培地に添加するなど、乳酸非生産株の形質転換効率を向上させるための具体的な対策を見出すにいたった。このような知見は今後 *L. plantarum* を宿主とした物質生産技術の開発に向けて、重要な知見となるであろう。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Okano, K., Honda, K., Taniguchi, H., Kondo, A. (2018) *De novo* design of biosynthetic pathways for bacterial production of bulk chemicals and biofuels. *FEMS Microbiol. Lett.* **365**, fny215(査読有り) doi: 10.1093/femsle/fny215

Okano, K., Uematsu, G., Hama, S., Tanaka, T., Noda, H., Kondo, A., Honda, K. (2018) Metabolic engineering of *Lactobacillus plantarum* for direct L-lactic acid from raw corn starch. *Biotechnol. J.* **13**, 1700517 (査読有り) doi: 10.1002/biot.201700517

Okano, K., Hama, S., Kihara, M., Noda, H., Tanaka, T., Kondo, A. (2017) Production of optically pure D-lactic acid from brown rice using metabolically engineered *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 1869-1875 (査読有り) doi: 10.1007/s00253-016-7976-8

岡野憲司、濱真司、田中勉、野田秀夫、近藤昭彦. (2017) 未利用バイオマスからの D-乳酸生産に向けた乳酸菌の代謝工学研究. *JATAFF ジャーナル*. **5**, 33-37 (査読無し)

〔学会発表〕(計 8 件)

岡野憲司. ゼロから始める乳酸菌の遺伝子組換えと培養実験. 日本乳酸菌学会 2018 年度秋期セミナー. 2018.11.16 (京都、京都大学百周年時計台記念館 国際交流ホール) 招待講演

Okano, K. Production of optically pure D-lactic acid from renewable resources. The 8th China-Japan Symposium on Chemical Engineering. 2017.10.15 (北京、中国)

岡野憲司、濱真司、野田秀夫、近藤昭彦、本田孝祐. リグノセルロース系バイオマスからの D-乳酸生産技術の開発. 日本乳酸菌学会 2017 年度大会. 2017.7.11 (福岡、玄海ロイヤルホテル)

岡野憲司、濱真司、野田秀夫、近藤昭彦、本田孝祐. リグノセルロース系バイオマスからの高効率 D-乳酸生産技術の開発. 化学工学会第 82 年会. 2017.3.6 (東京、芝浦工業大学豊洲キャンパス)

Okano, K., Hama, S., Tanaka, T., Ogino, C., Noda, H., Kondo, A. (2016) Production of optically pure D-lactic acid from renewable resources. The 22nd Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community (YABEC2016) 2016.10.28 (宮崎、シーガイアコンベンションセンター)

岡野憲司、濱真司、野田秀夫、近藤昭彦、本田孝祐. 未利用米を原料とした高光学純度 D-乳酸の直接発酵生産技術の開発. 日本乳酸菌学会 2016 年度大会. 2016.9.7 (徳島、徳島大学常三島キャンパス)

岡野憲司、濱真司、野田秀夫、近藤昭彦、本田孝祐. 未利用米を原料とした高光学純度 D-乳酸の直接発酵生産技術の開発. 化学工学会第 48 回秋季大会. 2016.7.10 (東京、北里大学白金キャンパス)

岡野憲司、濱真司、荻野千秋、野田秀夫、近藤昭彦. バイオマスからの乳酸生産のための組換え乳酸期育種. スマートバイオエンジニアリング研究会. 2016.5.20 (宮崎、シーガイアコンベンションセンター) 招待講演

〔図書〕(計 1 件)

岡野憲司、田中勉、本田孝祐、近藤昭彦. 酵母菌・麹菌・乳酸菌の産業応用展開 第 III 編 第 2 章「乳酸菌の遺伝子操作技術の進展」. シーエムシー出版. 2018 年

〔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
無し

(2)研究協力者
無し