

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：84307

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18305

研究課題名(和文) 低コストかつ高効率な物質生産を可能にする迅速な代謝経路切り替えシステムの構築

研究課題名(英文) Development of a rapid metabolic switching system for cost-effective and high-efficient bioprocess

研究代表者

久保田 健 (Kubota, Takeshi)

公益財団法人地球環境産業技術研究機構・その他部局等・主任研究員

研究者番号：40455340

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)：酵素の分解促進と遺伝子の転写抑制を組み合わせることで、酵素の細胞内活性を速やかに消去できる。任意のタイミングで活性を消去できれば代謝経路の切り替えが可能となる。微生物による高効率なシキミ酸生産を具体例として定め、この代謝切換え技術の開発を目指した。シキミ酸代謝酵素に分解タグを融合させ、さらにこの酵素をコードする遺伝子を誘導型転写抑制因子の支配下に配置した。これにより誘導物質の非存在下ではシキミ酸の代謝が進み微生物は増殖するが、誘導物質の存在下ではシキミ酸を蓄積させることができるシステムを構築した。

研究成果の概要(英文)：Induction of protein degradation with down-regulation of transcription achieves rapid decrease of the enzyme activity. I tried to develop a high-efficient microbial shikimate production method by *Corynebacterium glutamicum* using this induction system. For this purpose, a degradation signal *ssrA* of *E. coli* was added to the C-term of shikimate kinase of *C. glutamicum*. Then the gene encoding the shikimate kinase (*aroK*) was put under the control of an inducible transcriptional repressor. With these gene manipulation, the system for shikimate production was developed that the microorganism could grow in the absence of an inducer, whereas the microorganism could accumulate shikimate in the presence of the inducer.

研究分野：バイオプロセス

キーワード：転写制御 タンパク質分解 分解シグナル 発現誘導 シキミ酸

1. 研究開始当初の背景

微生物を活用した発酵生産において、微生物の「増殖期間」と「生産期間」を分離し、それぞれのフェーズにおいて増殖および生産活動に専念させることで全体として高効率な物質生産を達成できる。実際に研究代表者が所属する研究グループではこの概念を応用し、微生物を利用したバイオ燃料、バイオ化成品生産研究において多くの実績を上げている。つまり、菌の増殖フェーズと生産フェーズを分離し、高密度の菌体を利用することで高い生産性（時間、体積当たりの生産量）を達成する技術を確認済みである。

遺伝子組換えを利用した生産株の育種では一般に次の 2 種の方法を行うことが多い。すなわち 染色体から副生経路遺伝子の削除、生産経路遺伝子の高発現、である。そのため生産株は常に生産に特化した遺伝子構成となる。しかし「3. 研究の方法」の項で説明するように、実際には増殖と生産の各フェーズで必要な遺伝子構成、代謝経路は異なっている。IPTG 等で一過的に生産に必要な遺伝子を発現させる手法も存在するが、この誘導物質が比較的高価であるため実用化を念頭に置いた場合は使用が難しい。これらの課題を克服すべく本研究を開始した。

2. 研究の目的

副生経路遺伝子の転写抑制とそれがコードするタンパク質の分解促進機構を融合させることにより、任意のタイミングで狙った酵素活性を消失させられる。これを代謝経路上のキーとなる酵素に適用することで、代謝経路を増殖フェーズから生産フェーズに最適化された状態に迅速に切り替えられるシステムを構築することを目的とする。これにより産業化を視野に入れた低コストかつ高効率なバイオ生産プロセス技術を確認することができる。

3. 研究の方法

研究対象としてシキミ酸生産技術開発を選択し、活性制御対象の酵素としてシキミ酸キナーゼ (SK) を選択した。シキミ酸は抗インフルエンザウイルス薬であるタミフルの主原料としての価値が高い。宿主としてはアミノ酸の生産株として知られる コリネ型細菌 (*Corynebacterium glutamicum* R 株)を用いた。シキミ酸をこの微生物で生産させるにはシキミ酸を代謝する SK をコードする遺伝子 *aroK* をゲノムから削除することが効果的である。これによりシキミ酸以降の代謝が遮断され、シキミ酸が培養液中に蓄積する。しかし *aroK* を削除すると下流の代謝物の合成が進まなくなるため、菌は増殖できず、栄養要求性株となる。そのため代謝経路下流に位置するトリプトファン、チロシン、フェニルアラニン等を適量培地に添加する必要があるが生じ、全体的な生

産コストの上昇につながる。これに対し、*aroK* をゲノムから削除せず、生産フェーズで *aroK* の転写を抑制しただけでは増殖フェーズで翻訳された SK の活性が残存し、シキミ酸がシキミ酸 3-リン酸に変換されるため生産効率を悪化させる (図 1)。つまり、増殖フェーズでは SK 活性を示し、逆に生産フェーズでは完全に SK 活性を示さないことがシキミ酸生産における最適な代謝経路状態となる。



	SK活性有り	SK活性無し
増殖フェーズ	○ 正常に増殖	✕ 必要な代謝が進まず増殖停止
生産フェーズ	✕ シキミ酸が代謝され生産効率低下	○ シキミ酸が蓄積

図 1 SK 活性は増殖フェーズで必要、生産フェーズで不要

このような代謝経路の切り替えを実現するため、誘導物質によりシキミ酸キナーゼ (SK) をコードする遺伝子 *aroK* の新たな転写を抑制しつつ SK の分解を促進するシステムの構築を目指した。制御誘導因子として 5 炭糖であるアラビノースを利用する。アラビノースはバイオマス由来の混合糖に含まれるため、生産フェーズで混合糖を利用すれば代謝の切り替えを誘導可能だと期待できる。これによりあえて誘導物質を原料に追加する必要がなく、原料コストを抑えた生産が可能となる。

4. 研究成果

まず、宿主となるコリネ型細菌のゲノムを改変し、シキミ酸生産可能な株の作製を行った。すなわち、*aroK* の破壊を施し、シキミ酸を蓄積できるようにした。さらにシキミ酸経路の初発酵素である 3-デオキシ-D アラビノ 2-ヘプツロソリン酸 7-リン酸 (DHAP) 合成酵素をコードする *aroG* を、高発現プロモータの下、ゲノムに 2 か所導入した。この酵素は芳香族アミノ酸によってフィードバック阻害がかかることが知られている。そのため大腸菌由来の *aroG* を用い、さらにフィードバック阻害耐性となるアミノ酸変異を導入した。シキミ酸生産検討に使用した株を表 1 に示した。

表 1 作成したシキミ酸生産基本株

Strain	Genotype
Strain01	<i>C. glutamicum</i> Wild-type
Strain02	$\Delta aroK$, <i>aroG</i> ^{FBR}
Strain03	$\Delta aroK$, <i>aroG</i> ^{FBR} (1), <i>aroG</i> ^{FBR} (2)
Strain04	$\Delta aroK$, <i>aroG</i> ^{FBR} (1), <i>aroG</i> ^{FBR} (2), <i>araE</i> (<i>C. glutamicum</i> ATCC 31831 由来)

なお、*aroK* 破壊株は栄養要求性であるため増殖しない。これらを培養する際は 3 種の芳香族アミノ酸と 4 アミノ安息香酸を適量培地に加えた。これらの株を 24 時間培養し、上清のシキミ酸濃度を HPLC にて分析した。その結果、野生株は全くシキミ酸を培地中に蓄積しなかったのに対し、*aroK* 破壊株は 5.3 mM のシキミ酸を蓄積した。さらに *aroG* を高発現した株ではより高いシキミ酸蓄積濃度を示した(図 2)。これにより、システムの効果を確認するためのシキミ酸生産基本株を構築した。

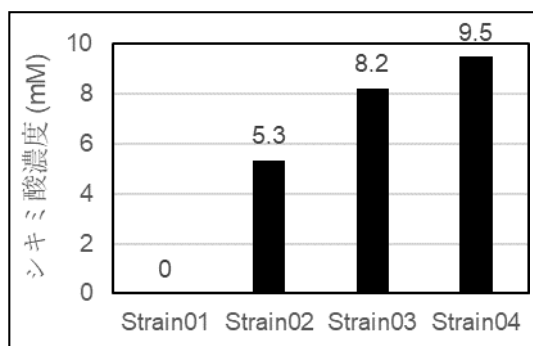


図 2 新たに構築した株によるシキミ酸生産検討結果

次にコリネ型細菌で、タンパク質のアラビノース誘導発現が可能かどうかの検討を行った。大腸菌が持つアラビノース誘導型の P_{BAD} プロモータ下流に *lacZ* 遺伝子を配置したプラスミドを作製し、シキミ酸生産基本株に導入した。この株に対し、様々な濃度のアラビノースを加え、X-gal 含有プレート上で培養したところ、青色コロニーは得られなかった。*C. glutamicum* R 株はアラビノースの細胞内取込み能が低いと考え、*C. glutamicum* ATCC 31831 株由来のアラビノーストランスポーター遺伝子 *araE* をゲノムに組み込み (Strain04)、新しくシキミ酸生産基本株とした。この株に誘導型 *lacZ* 遺伝子を含んだプラスミドを導入し、同様の検討を行った。その結果、アラビノース非添加プレートではコロニーは青くならず、アラビノース添加プレートでは明らかな青色を呈した。これにより *C. glutamicum* R 株でもアラビノースによる誘導が可能であることを示した。

次に *aroK* の発現を制御するためのプラスミドの構築を行った。上記 P_{BAD} プロモータ下流に転写抑制因子である *lacI* を配置した。さらに *lacO* 配列の下流にコリネ型細菌の *aroK* を挿入した(図 3)。これにより、アラビノース依存的に *LacI* を発現させ、*aroK* の転写を抑制する構成とした。

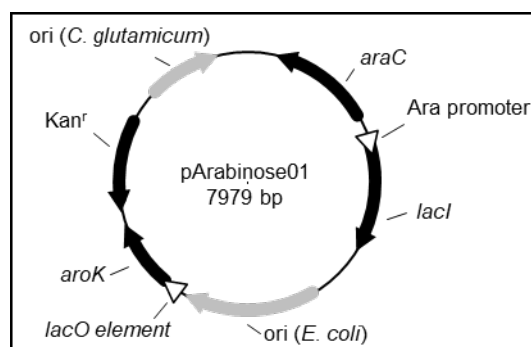


図 3 アラビノース依存的に *aroK* の発現を抑制するためのコリネ型細菌 - 大腸菌シャトルベクター

SK 活性を速やかに消去するため、大腸菌で報告のあるタンパク質分解機構を利用した。大腸菌の ATP 依存型プロテアーゼ ClpX は SsrA ペプチドの C 末端側を認識し、タンパク質を分解する。コリネ型細菌は大腸菌の ClpX と相同性を示す ClpX (CgR_2269) を有するため、これを利用した分解促進を目指した。

コリネ型細菌で機能した実績のある *ssrA* 分解シグナルを 3 種類選びそれぞれ上述のプラスミドの *aroK* 末端に付加した(図 4)。これにより通常よりもタンパク質分解速度が上昇することを期待した。

AroK-WT	..QQVVAAVLHHLEID
mod1	..QQVVAAVLHHLEIDAAEKSQRDYALVA
mod2	..QQVVAAVLHHLEIDAAEKSQRDYAASV
mod3	..QQVVAAVLHHLEIDAAEKSQRDYAAAV
AroK C-term 分解シグナルを付加	

図 4 SK の C 末端配列(野生株)と、3 種類の分解シグナルを付加した配列

これらの改変を施したプラスミドを用いて Strain04 を形質転換し、検討株を得た。

以上のようにアラビノース依存的に SK 活性を切り替えられるシステムを考案、構築した。今後、アラビノースの有無に依存した *aroK* mRNA の発現量、SK、増殖曲線の比較を行い、さらにシキミ酸の蓄積状態等の検討を進め、実用的なシステムの開発を目指す。

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)

久保田健, 乾 将行「コリネ型細菌が生み出す
バイオ化学品多様性の拡大」化学と生物 55:
690-698. 2017.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rite.or.jp/bio/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

久保田 健 (KUBOTA TAKESHI)

公益財団法人地球環境産業技術研究機構

バイオ研究グループ・主任研究員

研究者番号:

40455340