

令和元年5月30日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14870

研究課題名(和文)ピルビン酸バイパス/リサイクル技術を拡張した芳香族化合物合成プラットフォームの開発

研究課題名(英文) Development of aromatic compounds synthesis platform extending pyruvate bypass/recycling system

研究代表者

野田 修平 (Noda, Shuhei)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：30710131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：微生物菌体触媒を用いた芳香族化合物生産は、バイオリファインリーにおける重要な分野の一つである。近年注目されているシェールオイル革命により、今後、メタン等の炭素数の少ないエネルギー・化成品原料コストは低下すると考えられる。よって、芳香族化合物のような、より複雑な構造をした化合物の需要が急激に高まってくると予想されている。本研究では、ピルビン酸バイパス/リサイクル技術という独自技術を適用した微生物を用いて芳香族化合物を高収率で生産可能なプラットフォームの開発を目指し、本システムを実現するための基盤となる株の創製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、目的化合物合成の最終反応において生じるPYRを細胞増殖/収率の向上にバイパス/リサイクルする点、そのバイパス/リサイクルを酵素活性レベルで制御可能な代謝スイッチを開発する点、ピルビン酸バイパス/リサイクルを産業応用を指向した宿主である酵母に拡張する点、以上の3点に学術的意義が存在する。また、微生物を用いた物質生産研究において、産業応用可能なレベルでの生産収率、生産量を実現する可能性があるため、社会的意義も非常に大きいと言える。

研究成果の概要(英文)：Aromatic compound production using microbial cell catalyst is one of the important research areas in biorefinery. Due to the shell oil revolution, which has been attracting attention in recent years, it is expected that the cost of bulk-chemical compounds with a small number of carbons such as methane will rapidly increase the demand for compounds with more complex structures such as aromatic compounds. It is expected. In this research, we aim to develop a platform that can produce aromatic compounds with high yield using microorganisms that apply our proprietary technology of pyruvate bypass/recycling technology, and we will use this as the foundation for realizing this system.

研究分野：代謝工学

キーワード：代謝工学 大腸菌 芳香族化合物 合成生物学

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

資源・エネルギー問題、環境問題を克服し、安全で持続的に発展できる低炭素循環型未来社会を実現する上で、再生可能な資源バイオマスから様々なバイオベース製品の生産を行なうバイオリファイナリーへの転換を図るグリーン・イノベーションの実現は極めて重要である。バイオリファイナリーは、巨大な市場を創出して工業及び農林水産業を活性化するという側面を持っており、化石資源への全面依存から脱却して低炭素社会を構築することができる。バイオ化成品市場も世界規模で拡大の一途をたどっており、2025年に世界市場は6,000億ドルを超えると推定されており、CO<sub>2</sub>排出低減の期待と相まって社会からの要請は非常に高い。微生物菌体触媒を用いた芳香族化合物生産は、バイオリファイナリーにおける重要な分野の一つである。近年注目されているシェールオイル革命により、今後、メタン等の炭素数の少ないエネルギー・化成品原料コストは低下すると考えられる。よって、芳香族化合物のような、より複雑な構造をしたエネルギー・化成品原料の需要が急激に高まってくると予想されている。微生物を用いた芳香族化合物生産に関しても様々な報告が存在するが、産業応用可能なレベルでの収率を実現した例はほとんどなく、産業的な利用を考えた場合に大きなブレイクスルーが必要とされている現状がある。大腸菌やコリネ型細菌を用いた芳香族化合物の生産において、芳香族アミノ酸合成経路の最適化、芳香族化合物修飾酵素のスクリーニング・高活性化等の側面から生産収率向上が検討されている。しかしながら、解糖系近傍の前駆体から生産されるイソプロパノール、イソブタノール等のアルコール類がほぼ理論収率近く生産される一方、芳香族モノマーについては収率面で大幅な改善の余地がある(理論収率の1/3以下)。

### 2. 研究の目的

酵素を活性レベルで制御可能な代謝スイッチの開発により培養のフェーズ毎にピルビン酸のバイパスとリサイクルを切り替えるスイッチの開発により、増殖阻害を回避したピルビン酸バイパス/リサイクルを構築することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、「ピルビン酸バイパス/リサイクル技術を拡張した芳香族化合物合成プラットフォームの開発」に向けて、以下の3つのステップで研究を遂行した。

- (1) ピルビン酸バイパス/リサイクルを自在に切り替える代謝スイッチの開発
- (2) ピルビン酸バイパス/リサイクル技術の酵母への拡張
- (3) 様々な芳香族化合物を高収率で合成可能な微生物プラットフォームの開発

上記より、これまでの研究の精度を極限まで高めつつ、それを産業応用可能な宿主に拡張していくことにより、実生産を指向した芳香族化合物合成微生物のプラットフォームを開発を目指した。

### 4. 研究成果

まず、ピルビン酸バイパス/リサイクル技術を開発する上でのベースとなる菌体の作製を行った。ピルビン酸を効率よくTCA回路(増殖)、もしくは、サリチル酸生産(物質生産)へと向かわせるため、ピルビン酸の獲得がサリチル酸生産時に制限された菌体の開発を行った。具体的には下記に示す。まず、大腸菌のグルコース取り込み系であるホスホトランスフェラーゼ(PTS)システムがATPを用いてグルコースを直接リン酸化するグルコースキナーゼ系に置換し、さらに、解糖系中のピルビン酸キナーゼ(PykF及びPykA)を不活化した。その後、ピルビン酸の獲得をサリチル酸合成時に完全に制限した菌体を創製するため、ホスホエノールピルビン酸(PEP)からTCA回路への補充経路である

PEPカルボキシラーゼ(Ppc)、PEPカルボキシキナーゼ(Pck)、ピルビン酸をPEPに変換するPEP合成酵素(PpsA)を不活化した菌体を創製した。更に、偶発的にエントナードロフ経路(解糖系の一つ。通常、稼働しているのはエムデン-マイヤーホフ経路であるが、大腸菌はエントナードロフ経路にかかわる遺伝子も保有しており、リプレッサーにより転写が抑制されている。)が活性化されないように、この経路の入り口の反応を司るホスホグルコン酸脱水酵素(edd)の不活化も併せて行った。創製した菌体の代謝マップを図1に示す。

本研究で創製した株にフェニルアラニンを合成する能力を付与し、本当に代謝経路が分断されているか否かを<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-グルコース及び<sup>12</sup>C-

図1 本研究で創製した大腸菌の代謝経路

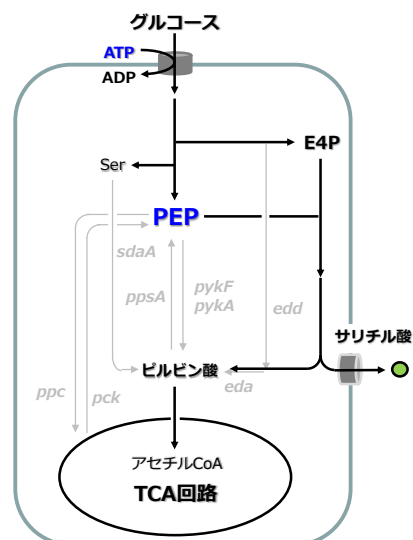
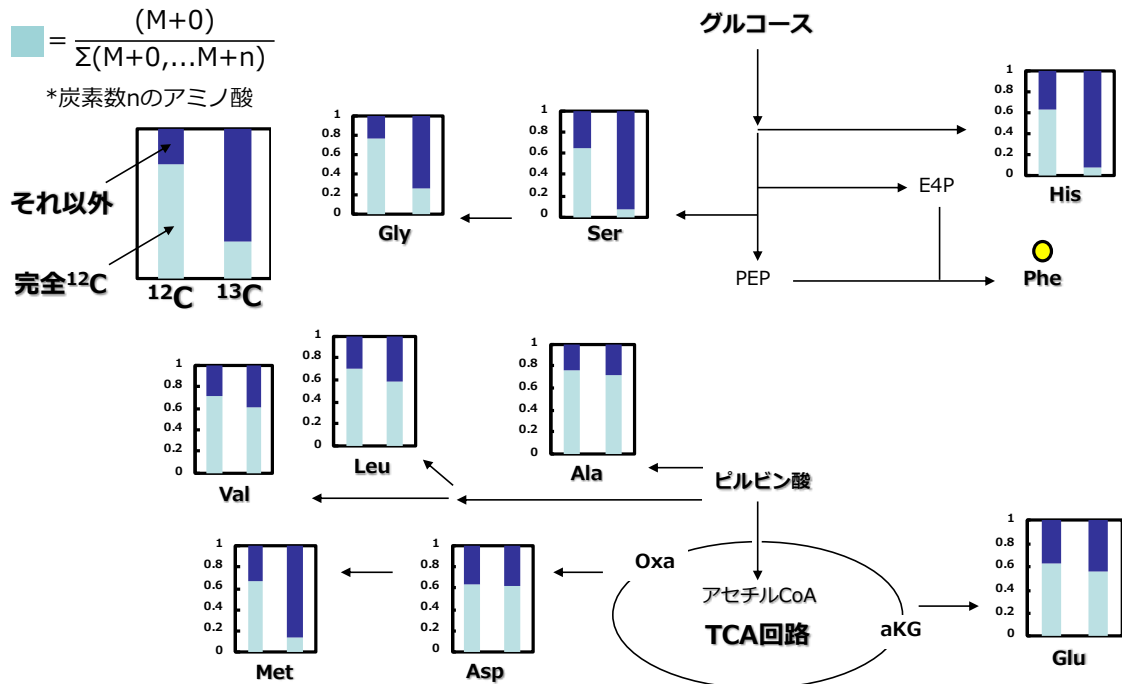


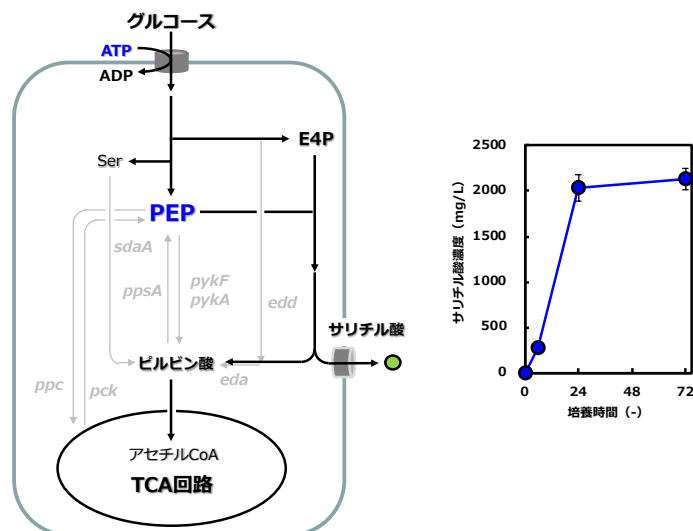
図2 <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-グルコースを用いた細胞構成アミノ酸分析



ピルビン酸を用いた細胞 構成アミノ酸標識化実験を行い検証した。図2にその 結果を示す。この結果より、PEP 上流部の細胞構成アミ ノ酸は <sup>13</sup>Cに染まり、ピルビン酸下流の細胞構成アミノ 酸は <sup>13</sup>Cで染まっていないことが証明された。

この株が実際にサリチル酸を生産するか否かを調査するため、創製した株にサリチル酸合成 遺伝子を導入し、5mL 試験管培養を行った。その結果を図3に示す。本研究で創製した株を用 いてサリチル酸を生産可能であることが示された。このように、研究期間を通じてピルビン酸 バイパス/リサイクルシステムの開発を行う上での土台作りに成功した。今後、誘導剤や細胞内 の代謝物の濃度勾配に応じてピルビン酸のバイパスやリサイクルをコントロールする技術の開 発が飛躍的に進むであろう。

図3 サリチル酸生産試験



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 3 件)

- ① 野田修平、有用バルクケミカル合成大腸菌プラットフォーム開発における質量分析機器の活用、質量分析インフォマティクス研究会(招待講演)、2019 年
- ② **Shuhei Noda**, Microbial platform to synthesize aromatic chemicals and the derivatives, **FEBS2018, 2018**
- ③ 野田修平、芳香族化合物合成プラットフォームの開発~芳香族モノマー合成に理想的な大腸菌代謝デザイン~、第 75 回日本生物工学会、2018

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔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：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (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。