

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19169

研究課題名（和文）中央代謝経路改造による物質生産効率強化への挑戦

研究課題名（英文）Improvement of production efficiency of useful substance by modification of central metabolic pathway

研究代表者

折田 和泉 (Orita, Izumi)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：70525964

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,400,000円

研究成果の概要（和文）：メタノール資化性菌の細胞増殖と物質生産を両立させるために、中央代謝経路そのものを物質合成経路に作り変え、代替の資化経路を構築するチャレンジな育種に挑戦した。代替資化経路によるメタノール消費や取り込んだメタノールの固定を認めただが、中央代謝経路を破壊した株にメタノール資化性を相補するには至らなかった。一方、中央代謝経路を逆行させる酵素を導入した変異株に代替資化経路を導入したところ、低下していたメタノール生育能が回復した。今後、物質生産経路を強化した株で代替資化経路の効果を検討していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でモデルメタノール資化性菌内に構築した種々のメタノール人工資化経路は、有用物質の収率向上のために今後応用できることが期待され、持続供給可能な材料として注目されているメタノールを原料にした発酵生産に資する微生物の開発に貢献する成果といえる。また、メタボローム解析で得られた知見はメタノール資化性菌の代謝改変をすすめるうえで重要であり、学術的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：In order to make cell growth compatible with microbial production of value-added compounds on methanol, this study aimed to establish the pathway substitutes for methanol assimilation pathway in the methylotrophic bacterium. Although methanol was assimilated by introduced substitute pathway, restoration of methylotrophic growth was not observed in the cells disrupted central metabolic pathway. On the other hand, reduced growth of the cells in which enzyme catalyzing reaction opposite to central metabolic pathway was introduced, was restored by introducing substitute pathway. This observation might be useful to achieve high production yield of value-added compounds from methanol.

研究分野：応用微生物

キーワード：メタノール資化性菌 ポリヒドロキシアルカン酸

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

持続供給可能資源であるメタノールなどの C<sub>1</sub> 化合物は発酵生産の原料としても注目されてきた。このような C<sub>1</sub> 化合物を単一炭素源として生育するメタノール資化性菌のモデル微生物である *Methylobacterium (Methylobacterium) extorquens* はメタノールを原料にして海洋生分解性プラスチックとして実用化が進んでいるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) を生合成する。しかし、*M. extorquens* の PHA 生産においては、PHA モノマー合成経路が C<sub>1</sub> 資化のための中央代謝経路と一部オーバーラップしていることからメタノール生育と PHA 合成が競合し、資化経路中間体を PHA 合成に導くと増殖能が低下するトレードオフの関係が PHA 生産の弊害となっていた。そこで *M. extorquens* の中央代謝経路であるセリン経路とエチルマロニル-CoA 経路を PHA 合成経路として機能させる系を構築するために、研究開始前までに、本菌のエチルマロニル-CoA 経路上の酵素遺伝子を破壊し、メタノール生育能を失った株を構築していた。さらに、この破壊株に代替 C<sub>1</sub> 資化経路としてリブローズモノリン酸経路の鍵酵素遺伝子を発現させたがメタノール資化能は回復しなかった。

### 2. 研究の目的

有用物質を発酵生産する際、代謝物の流れを細胞増殖と物質生産が両立できるようにコントロールすることが重要である。本研究では *M. extorquens* において PHA モノマー前駆体を合成するセリン経路とエチルマロニル-CoA 経路を物質生産経路として利用し、代替経路により C<sub>1</sub> 化合物を資化することで良好なメタノール生育と PHA 合成を両立させることを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 代謝改変株の構築とメタノール生育能および活性評価

広宿主域ベクター上のメタノールデヒドロゲナーゼプロモーターの下流に代替資化経路に関わる遺伝子を連結したベクターを構築し、エチルマロニル-CoA 経路破壊株を形質転換した。組換え株はコハク酸含有最少培地で前培養した後、OD<sub>600</sub>=0.1 となるようにメタノールを添加した最少培地に移して 30 分で振とうし OD<sub>600</sub> を測定することでメタノール生育能を評価した。このとき、希土類金属であるランタン添加培地も適宜使用した。同様に、コハク酸培地で生育した菌体をメタノール培地に移すことでメタノール誘導した菌体から無細胞抽出液を調整し、導入遺伝子産物の活性測定を行った。

#### (2) 代謝改変株のメタボローム解析

24 時間メタノール含有培地で振とうした菌体に冷却したメタノール溶液を添加することでクエンチングし、凍結融解法により代謝物を抽出した。LC-MS/MS を用いたメタボローム解析は大阪大学工学研究科 福崎英一郎教授、新田克章氏のご協力のもと行った。

#### (3) 包括的転写機構改変の適用

<sup>70</sup> をコードする *rpoD* 遺伝子を広宿主域ベクターに連結し、エラープローン PCR によりランダム変異を導入した。代替資化経路導入株をランダム変異導入プラスミドで形質転換した。形質転換体をメタノールを単一炭素源とする培地に植菌した。

#### (4) メタノール濃度および PHA 濃度測定

培養上清中のメタノール濃度を測定の際は、組換え株をコハク酸含有最少培地で前培養した後、OD<sub>600</sub>=0.1 となるように植菌して 30 分で振とうした培養液の上清をガスクロマトグラフィーにより測定した。一方、PHA 測定の際は前培養液から集菌した菌体を全量、メタノール培地に植え継ぎ 72 時間から 96 時間振とうした。集菌後の菌体を凍結乾燥し、メタノリシス処理した後ガスクロマトグラフィーに供した。

### 4. 研究成果

#### (1) リブローズモノリン酸経路鍵酵素遺伝子の発現

上述のように、研究開始前までにリブローズモノリン酸経路鍵酵素である 3-ヘキスロース-6-リン酸シンターゼ (Hps)、6-ホスホ-3-ヘキスロイソメラーゼ (Phi) の発現株を構築していたが、発現量が十分でない可能性を考慮し、改良したベクターに当該遺伝子を連結し、エチルマロニル-CoA 経路破壊株に導入した。その結果、HPS-PHI 連続反応の比活性が約 2 倍に増加したが、メタノール生育能は回復しなかった。メタノール代謝の初発反応を触媒するメタノールデヒドロゲナーゼ活性測定の結果、エチルマロニル-CoA 経路破壊株ではメタノール酸化活性が低下している可能性が示唆されたため、メタノール酸化に影響を与えることが知られているランタンを添加したメタノール培地でも培養を試みたが、生育はみられなかった。そこで、代謝状態を解析するために、メタノール培地で振とうした菌体から代謝物を抽出しメタボローム解析に供したところ、コントロール株と比較して各種鎖長の糖リン酸の細胞内濃度が顕著に低く、リブローズ

モノリン酸経路を維持するためのペントースリン酸の再生が不十分であることが予想された。

### (2) 糖リン酸代謝の強化を目的とした代謝改変

リブローズモノリン酸経路導入株のメタボローム解析から、糖リン酸代謝を強化する必要性が示された。そこで、非酸化的ペントースリン酸経路また、Entner-Doudoroff (ED) 経路上の遺伝子を Hps-Phi 遺伝子と共発現するための発現株を作製した。しかし、非酸化的ペントースリン酸強化株では SDS-PAGE において発現したタンパク質を確認できなかった。一方、ED 経路導入株では SDS-PAGE で発現したタンパク質を検出した。Hps-Phi 発現株では、エチルマロニル-CoA 経路破壊株に比べて培地中のメタノールの消費速度が低下していたが、ED 経路導入株ではエチルマロニル-CoA 経路破壊株と同程度の消費速度を示した。いずれの組換え株もメタノール単一炭素源での生育能は示さなかった。

### (3) 包括的転写機構改変の適用と培養条件の検討

<sup>70</sup>をコードする *rpoD* 遺伝子にランダム変異を導入することで包括的に代謝バランスを変化させる「包括的転写機構改変」を用いると、一度に複数遺伝子の発現量を変化させることができる。リブローズモノリン酸経路導入株でメタノール生育能が回復しなかったことから、すでに構築していた *M. extorquens* <sup>70</sup> 変異ライブラリーで当該組換え株を形質転換し、メタノールを単一炭素源とした液体培地および固体培地に植菌したが、生育能を示す株の取得には至らなかった。

### (4) PHA 合成能強化株内における代替資化経路の構築

エチルマロニル-CoA 経路の逆行反応を触媒するエチルマロニル-CoA デカルボキシラーゼ (Emd) を発現すると PHA 前駆体合成能が強化され PHA 蓄積率が增加する一方で、メタノール培地での生育能が低下する (Orita et al., *Microorganisms*, 10, 184, 2022)。そこで、この Emd 発現株に構築した代替資化経路発現用プラスミドを導入したところ、Emd 非導入株と同程度までメタノール生育能が回復した。またこのとき、PHA 蓄積率はプラスミド導入前と同等の値を維持していた。これらの結果から、本研究で開発した代替資化経路は限定的ではあるものの C<sub>1</sub> 化合物の資化に寄与していることが示された。

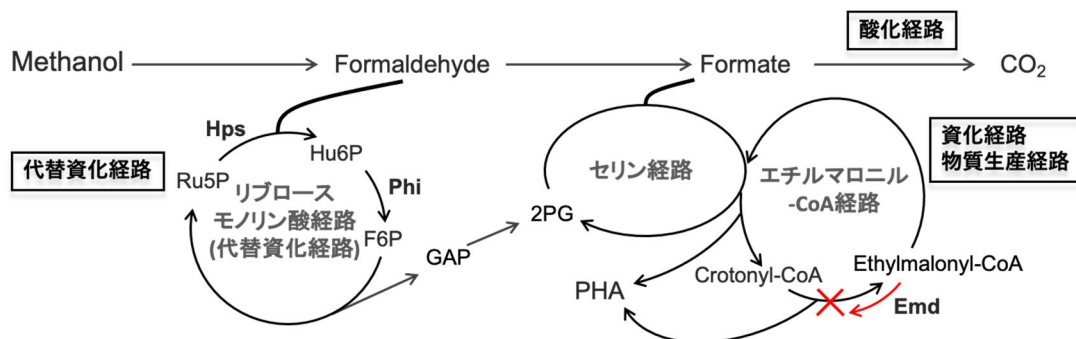


図1. 代替資化経路構築によるメタノール生育と物質生産の両立戦略

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>折田 和泉、平林 翼、新田 克章、福崎 英一郎、福居 俊昭 |
| 2. 発表標題<br>メタノール資化性菌内でのC1化合物資化 代替経路の構築   |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2021年度大会               |
| 4. 発表年<br>2021年                          |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>平林 翼、折田 和泉、新田 克章、中村 聡、福崎 英一郎、福居 俊昭          |
| 2. 発表標題<br>Methylorubrum extorquensにおける C1化合物代替資化経路の構築 |
| 3. 学会等名<br>第71回日本生物工学会大会                               |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>平林 翼、折田 和泉、新田 克章、中村 聡、福崎 英一郎、福居 俊昭          |
| 2. 発表標題<br>Methylorubrum extorquensにおける C1化合物代替資化経路の構築 |
| 3. 学会等名<br>第13回メタボロームシンポジウム                            |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>平林 翼、折田 和泉、新田 克章、中村 聡、福崎 英一郎、福居 俊昭 |
| 2. 発表標題<br>メタノール資化性菌での代替経路によるC1化合物資化に向けた代謝改変  |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2020年度大会                    |
| 4. 発表年<br>2020年                               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>平林 翼、折田 和泉、中村 聡、福居 俊昭                              |
| 2. 発表標題<br>Methylorubrum extorquensにおける中央代謝経路破壊がメタノール酸化に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名<br>第17回微生物研究会   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>鶴田 爽、平林 翼、折田 和泉、福居 俊昭                          |
| 2. 発表標題<br>Methylorubrum extorquens内でのメタノール代替資化経路の構築とその影響 |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2022年度大会                                |
| 4. 発表年<br>2022年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)     | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|-------|-------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 福崎 英一郎<br>(Fukusaki Eiichiro) | 大阪大学<br><br>(14401)   |    |
| 研究協力者 | 新田 克章<br>(Nitta Katsuaki)     | 大阪大学<br><br>(14401)   |    |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|