

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22084

研究課題名（和文）CO₂を出さずに有用物質を生産する非遺伝子組換え微生物（non-GMO）の構築研究課題名（英文）Bio-production toward non-GMO without CO₂ emission

研究代表者

近藤 昭彦（Kondo, Akihiko）

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授

研究者番号：40205547

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：微生物を用いた有用物質生産に代表されるバイオリファイナリーは、数々の利点を持つグリーン・イノベーションであり、社会からの要請は非常に強い。しかし、バイオマス原料を用いても、微生物によるモノづくりの過程でCO₂を再排出したのでは全く意味がない。そこで本研究では、CO₂バイパス・リサイクルを用いて、CO₂を全く出さない微生物による物質生産プロセスの開発を行なった。ターゲット化合物の1つとしてメバロン酸の生産量と収率の向上を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物を用いたバイオプロセスにおいて、二酸化炭素の排出を削減することで目的化合物の生産量と収率を大きく向上させる技術を開発した。これにより持続可能な低炭素社会の構築に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：Biorefinery is represented by the production of useful substances using microorganisms. It is a green innovation with many advantages, and the demand from society is very strong. However, even if biomass raw materials are used, it is completely meaningless if CO₂ is re-emitted in the process of manufacturing by microorganisms. Therefore, in this study, we developed a substance production process using microorganisms that do not emit CO₂ at all, using CO₂ bypass recycling. An improvement in the production amount and yield of mevalonate as one of the target compounds was achieved.

研究分野：生物化学工学

キーワード：バイオリファイナリー 代謝工学

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物を用いた有用物質生産に代表されるバイオリファイナリーは、数々の利点を持つグリーン・イノベーションであり、社会からの要請は非常に強い。低炭素社会の構築、エネルギー問題の解決に向け、再生可能な資源であるバイオマスの有効利用法の開発が急務である。微生物を用いた有用物質生産は、上記バイオリファイナリーの重要分野の一つである。微生物プロセスは温和な条件(約37度および1気圧)かつ低エネルギーでの生産が可能とされているにも関わらず、現状では化学プロセスが主流である。燃料及び化学物質の原料としてバイオマスを利用することは、持続可能な経済成長の発展につながると考えられ、現在注目が集まっている。特に、リグノセルロース系バイオマスは、大量に存在する、安価であるといった特徴から有望な原料としてみなされている。しかし、多くの微生物は、このリグノセルロース系バイオマスを直接資化することができないため、この原料を分解するために高価で複雑な工程が必要だという問題点がある。一方で、バイオマスはカーボンニュートラルという特性を持つため、バイオマスの有用利用は低炭素社会の構築として有望である。しかし、バイオマス原料を用いても、微生物によるモノづくりの過程で二酸化炭素を再排出したのでは全く意味がない。二酸化炭素の排出を抑えつつ物質生産を行うための方法論の開発が求められている。

2. 研究の目的

そこで本研究では、二酸化炭素バイパス・リサイクルを用いて、二酸化炭素を出さない微生物による物質生産プロセスの開発を目指し、低炭素社会および環境問題の解決への貢献を目指す。

現在までなされてきた微生物での物質生産に関する多くの研究は、他種微生物の遺伝子や培養条件について主に検討していた。そこで、本研究では、重要な補酵素または前駆体である NADPH や Acetyl-CoA に注目し、微生物内の代謝改変を行い、目的化合物の生産量を向上させることに挑戦した。具体的には、メバロン酸をターゲット化合物の一つとして選定し、大腸菌内にメバロン酸合成経路を構築し、その後大腸菌内の代謝改変を行った。一つ目の戦略は、解糖系の代謝改変である。大腸菌で主に使用されている EMP 経路を改変し、より多くの NADPH を生産する ED 経路や PP 経路に炭素を多く流すことで、NADPH を補充した。2つ目の戦略は、tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) を改変し、メバロン酸合成に使用できる acetyl-CoA 量の増加を図った。これにより、二酸化炭素として放出されている炭素を極力少なくしつつ、物質生産の向上を図った。

3. 研究の方法

3-1 遺伝子破壊株の作製

遺伝子破壊は、Jian らが提案した CRISPR-Cas two-plasmid system のプロトコルに従い行った。遺伝子 *pgi*, *pfkA*, *pfkB*, *gnd*, *aceBA*, *ppc*, *gltA* の破壊には、それぞれプラスミド pTΔ*pgi*, pTΔ*pfkA*, pTΔ*pfkB*, pTΔ*gnd*, pTΔ*aceBA*, pTΔ*ppc*, pTΔ*gltA* を使用した。

3-2 培地

メバロン酸生産には、M9Y 培地を用いた。M9Y 培地とは、M9 最小培地に以下のものを加えたものである。5 g/L yeast extract, 0.008 g/L D-(+)-biotin, 0.2 g/L citrate, 0.008 g/L nicotinic acid, 0.032 g/L, pyridoxine and 1 mL/L trace metal solution。また、必要に応じて 100 mg/L の ampicillin もしくは 20 mg/L の kanamycin を加えた。

3-3 培養条件

最初に、代謝改変した菌株を 5 mL の LB 培地が入った試験管に植菌し、37 °C、220 rpm で一晩前培養した。次に、前培養液を 5 mL の M9Y 培地が入った試験管に移した。この際、optical density at 600 nm (OD600) が 0.05 になるようにした。この試験管を、37 °C、220 rpm で 48 h 振とうした。また、培養開始から 3 時間後に誘導剤として isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 0.1 mM になるように添加した。

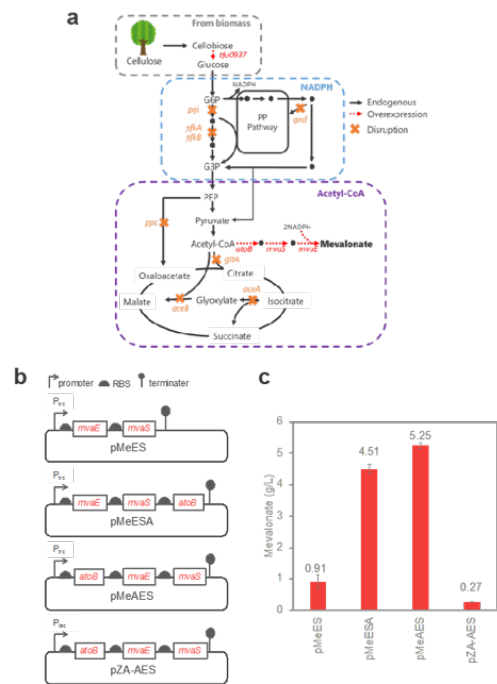


Fig. 1 メバロン酸生産

3-4 分析方法

メバロン酸は、ガスクロマトグラフィー(GC)を用いて分析を行った。まず、分析を行うためにサンプルの調整を次のように行った。サンプリングした 300 μ L の培養液に HCl を 50 μ L 加え、この混合液を 60 $^{\circ}$ C、1000 rpm で 30 分間振とうを行った。この操作により、メバロン酸をメバロノラクトンへと変換させた。そして、350 μ L の酢酸エチルをこの混合液に加え、メバロノラクトンを抽出した。この際、内部標準物質として beta-caryophyllene を加えた。抽出したメバロノラクトンは、GC-2025 を使用して分析した。カラムには、SH-stabilwax を使用した。キャリアガスにはヘリウムを使用し、Linear velocity を 33.8 cm/sec に設定した。注入量は 1 μ L で注入方法はスプリットを採用した。カラム温度は、120 $^{\circ}$ C(1 min)-(30 $^{\circ}$ C/min)-250 $^{\circ}$ C(4 min) で、トータルの分析時間が 15 分になるように設定した。

4. 研究成果

4-1. メバロン酸合成経路の構築

メバロン酸合成経路を Fig. 1a に示す。HMG-CoA synthase と HMG-CoA reductase を発現させる遺伝子は、それぞれ E. faecalis 由来の mvaS と mvaE を選択した。本研究では、メバロン酸生産のためにプラスミドを 4 つ作成し(Fig. 1b)、それぞれを大腸菌 MG1655 株に導入し、メバロン酸生産量を調査した。pMeES には、trc プロモーター制御化の下で mvaE と mvaS を導入した。より多くの Acetyl-CoA をメバロン酸合成経路に引き込むために、acetoacetyl-CoA synthase を発現する大腸菌内在の遺伝子 atoB を過剰発現させるプラスミド pMeESA を作成した。pMeESA には、mvaE-mvaS-atoB の順序で遺伝子が導入されている。atoB の発現量をより多くさせるように、pMeAES では遺伝子の順序を atoB-mvaE-mvaS へと変更している。

Fig. 1c にそれぞれのプラスミドを使用した時のメバロン酸生産量を示している。pMeES を導入した大腸菌では、0.25 g/L と少量のメバロン酸しか生産しなかった。pMeES に比べて、atoB を導入している pMeESA と pMeAES では大きく生産量が向上した。特に、pMeAES で最も高い生産量 (5.25 g/L) を示した。一方、Lac プロモーターを採用している pZA-AES では 0.27 g/L 少量のメバロン酸しか生産しなかった。これらの結果から、atoB の発現量を高くすることで、より多くの acetyl-CoA をメバロン酸合成経路に引き込むことが重要だと分かった。今後の実験では、全て pMeAES を採用している。

4-2. 遺伝子破壊による acetyl-CoA の蓄積

Acetyl-CoA は、メバロン酸合成の前駆体である。また、メバロン酸合成経路の競合経路である TCA サイクルの前駆体でもある。そこで、競合経路である TCA サイクルの流れを弱くすることが重要だと考えた。本研究では、phosphoenolpyruvate carboxylase をコードする遺伝子 ppc と citrate synthase をコードする遺伝子 gltA に注目した。phosphoenolpyruvate carboxylase は、phosphoenolpyruvate (PEP) から oxaloacetate を生成する反応を触媒する。遺伝子 ppc の破壊は、oxaloacetate の供給を弱めることで、TCA サイクルの流れを悪くすることで知られている。citrate synthase は、oxaloacetate と acetyl-CoA を縮合し、citrate を生成する反応を触媒する。この反応は、TCA サイクルの入り口の重要な反応であり、菌体増殖のペースメイキングをすることで知られている。そのため、遺伝子 gltA の破壊は菌体増殖に大きく影響を及ぼすので、代謝改変に用いられることは滅多にない。また、もう一つの acetyl-CoA を消費する経路 Glyoxylate shunt にも注目した。この経路は、malate synthetase をコードする

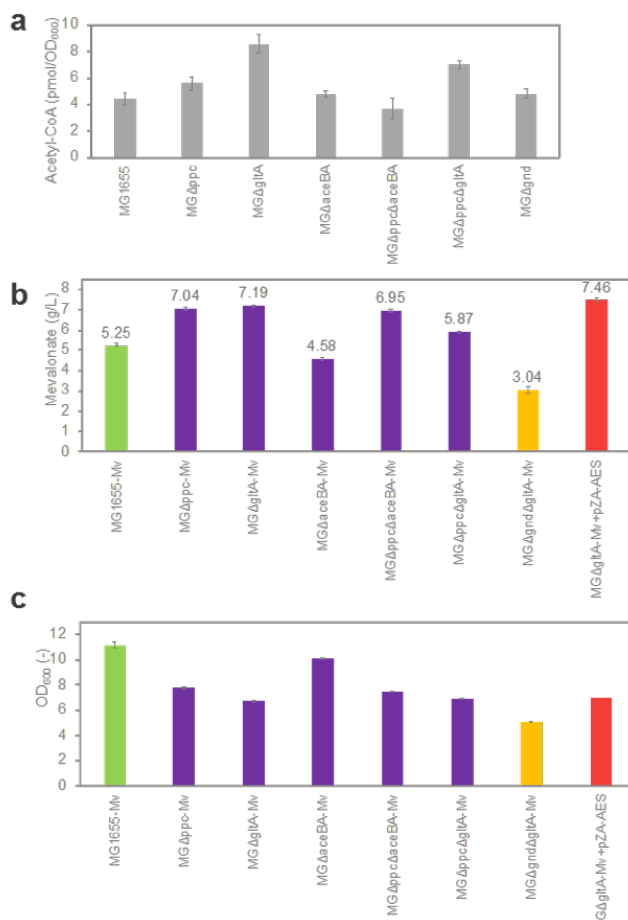


Fig. 2 各破壊株におけるメバロン酸生産

遺伝子 *aceB* と *isocitrate synthetase* をコードする遺伝子 *aceA* で構成されている。

そこで、それぞれの遺伝子破壊株 $MG \Delta \text{gltA}$ 、 $MG \Delta \text{ppc}$ 、 $MG \Delta \text{aceBA}$ を作成し、菌体内の *acetyl-CoA* 量を評価した (Fig. 2a)。 $MG \Delta \text{gltA}$ は、野生株に比べて約 2 倍の *acetyl-CoA* 量を示し、 $MG \Delta \text{ppc}$ は約 1.25 倍の *acetyl-CoA* 量を示した。 $MG \Delta \text{aceBA}$ は、野生株と同じ程度の *acetyl-CoA* 量を示した。さらに遺伝子を二重破壊した $MG \Delta \text{ppc} \Delta \text{aceBA}$ と $MG \Delta \text{ppc} \Delta \text{gltA}$ を作成した。野生株と比べて、 $MG \Delta \text{ppc} \Delta \text{aceBA}$ は *acetyl-CoA* 量に変化はなかったが、 $MG \Delta \text{ppc} \Delta \text{gltA}$ は約 1.5 倍の *acetyl-CoA* 量を示した。

これらの株に pMeAES を導入し、メバロン酸生産量を評価した (Fig. 2b)。これらの株の菌体増殖は減少した (Fig. 2c)。野生株 (5.25 g/L) に比べて、 $MG \Delta \text{gltA-Mv}$ と $MG \Delta \text{ppc-Mv}$ は、それぞれ高い生産量 7.19 g/L と 7.04 g/L を示した。 $MG \Delta \text{aceBA-Mv}$ は、野生株より低い生産量 4.58 g/L を示した。二重破壊を行った株についても評価を行った。 $MG \Delta \text{ppc} \Delta \text{gltA-Mv}$ は、5.87 g/L のメバロン酸を生産した。これは、 $MG \Delta \text{gltA-Mv}$ より低い生産量となっている。 $MG \Delta \text{ppc} \Delta \text{aceBA-Mv}$ は、 $MG \Delta \text{ppc-Mv}$ と同じ程度の 6.95 g/L のメバロン酸を生産した。これらの結果は、メバロン酸生産には *acetyl-CoA* 量の増加の方が効果的だということを示している。

また、 $MG \Delta \text{gnd}$ の *acetyl-CoA* 量を分析したが、野生株と変わりはない (Fig. 2a)。遺伝子 *gnd* の破壊は、NADPH と *acetyl-CoA* 量の向上には寄与していないという過去の報告と一致する結果を示した。遺伝子 *gnd* と *gltA* の二重破壊を行った $MG \Delta \text{gnd} \Delta \text{gltA}$ を作成したが、メバロン酸生産量は向上しなかった (Fig. 2b)。さらに、メバロン酸合成遺伝子の発現が足りているかどうかを調査するため、pZA-AES を $MG \Delta \text{gltA-Mv}$ に追加で導入した。しかし、メバロン酸生産量はわずかに向上したのみであった。この結果は、メバロン酸合成遺伝子の発現量は十分であることを示唆している。

メバロン酸生産においては、NADPH がメバロン酸合成に補酵素として十分に使用できる量があることが重要なポイントである。本研究では、遺伝子 *pgi*、*pfkA*、*pfkB* を破壊することで PP 経路により多く炭素を流すという戦略をとった。過去の報告と一致して、遺伝子 *pgi* または *pfkA* 破壊株では NADPH 量が向上した。しかし、これらの株では野生株より、メバロン酸生産量は減少した。これらの結果は、NADPH はメバロン酸生産に十分足りているということを示している。*pfkB* 破壊株では、野生株と同程度の NADPH を示した。これは、PFK の 90 % 異常が *pfkA* によって担われているということが原因だと考えられる。また、これらの株はすべて菌体増殖が増加している。これは、菌体内の NADPH が増加したためだと考えられる。

Acetyl-CoA は、様々な生合成経路と関与している。また、様々な高価値化合物合成のプラットフォームの役割を担うような化合物である。メバロン酸生産にとっても、*acetyl-CoA* は最も重要な前駆体となっている。*Acetyl-CoA* 由来の化合物を生合成する際は、*acetyl-CoA* を消費する経路をブロックすることが有効だと分かっている。しかし、本研究においては最も酢酸を生産していた $MG \Delta \text{gnd-Mv}$ ですら、0.81 g/L と少量の酢酸しか生産していなかった。このことから、メバロン酸生産においては、酢酸合成経路の効果が小さいと判断した。

TCA サイクルの流れを弱くすることは、*acetyl-CoA* の消費を抑えることに有効である。一つの手段として Genetic toggle switches というものが用いられている報告例もある。この手法では、特定の代謝を制御することで菌体増殖と物質生産の段階を区別する。しかし、この手法では誘導剤を投入するタイミングなどの問題が残る。よって本研究では、遺伝子破壊によって TCA サイクルの流れを弱くすることに焦点を当てた。遺伝子 *gltA* の破壊は、*acetyl-CoA* を蓄積し、*citramalate* の生産量を向上するという報告がある。また、遺伝子 *gltA* もしくは *ppc* の破壊は、TCA サイクルを弱くすると報告されている。さらに遺伝子 *ppc* の破壊は、*glyoxylate shunt* の入り口の反応を担う酵素 *isocitrate dehydrogenase* の活性を低下させることも報告されている。そこで、本研究ではこれらがメバロン酸生産に有効かどうかを検証した。また、*glyoxylate shunt* の欠損も有効かどうかを検証した。*glyoxylate shunt* 欠損株では、*acetyl-CoA* 量は増加したが、メバロン酸生産量ではなく菌体増殖が向上することが分かった。*gltA* また *ppc* 破壊株では、*acetyl-CoA* レベルとともにメバロン酸生産量も増加した。またこの二つ株の NADPH/NADP⁺ も測定したが、野生株と大きな変化はなかった。これらの結果は、*acetyl-CoA* の蓄積がメバロン酸生産量の向上の主な原因だと示している

3-5. セロビオースからのメバロン酸生産

セロビオースからメバロン酸を直接生産するために、BGL 共発現プラスミド (pMeAES-BGL) を作成した。発現方法には、細胞表面提示を採用した。pMeAES-BGL を導入した菌株を、セロビオースを唯一の炭素源とし、48 時間培養を行った (Fig. 3a)。グルコースを炭素源とした時、野生株は 5.25 g/L のメバロン酸を生産した。しかし、セロビオースからでは $MG1655-MvBGL$ は 1.75 g/L のメバロン酸しか生産しなかった (Fig. 3b)。遺伝子 *gnd* 破壊株ではグルコースから 5.49 g/L のメバロン酸を生産した (Fig. 3b)。セロビオースを炭素源とした場合でも、 $MG \Delta \text{gnd-MvBGL}$ は、5.27 g/L とほとんど同じメバロン酸生産量を示した。 $MG \Delta \text{ppc-Mv}$ と $MG \Delta \text{gltA-Mv}$ は、グルコースからの培養では高いメバロン酸生産量を示した (Fig. 3b)。しかし、 $MG \Delta \text{ppc-MvBGL}$ と $MG \Delta \text{gltA-MvBGL}$ は、セロビオースからの培養では野生株と同程度のメバロン酸しか生産しなかった。一方、 $MG \Delta \text{ppc} \Delta \text{aceBA-MvBGL}$ は、 $MG \Delta \text{gnd-MvBGL}$ と同程度の 5.03 g/L を生産した。これらを踏まえて、遺伝子 *ppc*、*aceBA*、*gnd* の三重破壊を行った $MG \Delta \text{ppc} \Delta \text{aceBA} \Delta \text{gnd-MvBGL}$ を作成し、メバロン酸生産量を評価したが、さらなるメバロン酸生産量の向上は確認できなかった。また、こ

これらの株の菌体増殖を Fig. 3b に示した。野生株に比べて、遺伝子破壊株の菌体増殖はすべて減少した。MG1655-MvBGL、MG Δ gnd-MvBGL、MG Δ ppc Δ aceBA-MvBGL、MG Δ gltA-MvBGL、MG Δ ppc Δ gltA-MvBGL のセロビオースからのメバロン酸生産量の経時変化を調査した。培養開始から 24 時間後、MG1655-MvBGL は、1.7 g/L のメバロン酸生産を示した (Fig. 3a)。メバロン酸を最も多く生産したのは、24 時間後の MG Δ gnd-MvBGL (5.7 g/L) であった。続いて、48 時間後の MG Δ ppc Δ aceBA-MvBGL が 5.0 g/L と高い生産量を示した。菌体増殖においては、MG1655-MvBGL が最も高い値を示し、それに次いで高い菌体増殖を示したのは MG Δ gnd-MvBGL であった (Fig. 3b)。ほとんどの株では、24 時間後にはセロビオースは完全に消費されていた (Fig. 3c)。また、Fig. 3d には培地中に存在するグルコースを示している。MG Δ gnd-MvBGL では、ごく少量のグルコースしか検出しなかった。この結果は、セロビオースの加水分解が律速になっていないことを示している。一方、MG1655-MvBGL と MG Δ ppc Δ aceBA-MvBGL では、24 時間後に 3.8 g/L、8.3 g/L とそれぞれグルコースを多く残していることが分かった。MG Δ gltA-MvBGL は、野生株と同程度のメバロン酸生産を示したが、菌体増殖は低い値を示し、糖もほとんど消費しないことが分かった (Fig. 6b, 6c)。

結論として、本研究では大腸菌の代謝経路の最適化と BGL を発現させることで、グルコースとセロビオースからのメバロン酸生産の強化に成功した。本研究は、重合や精製などの下流のプロセスと組み合わせることで、経済的に易しく、持続可能なメバロン酸生産を成功させる重要なプロセスを提案した。

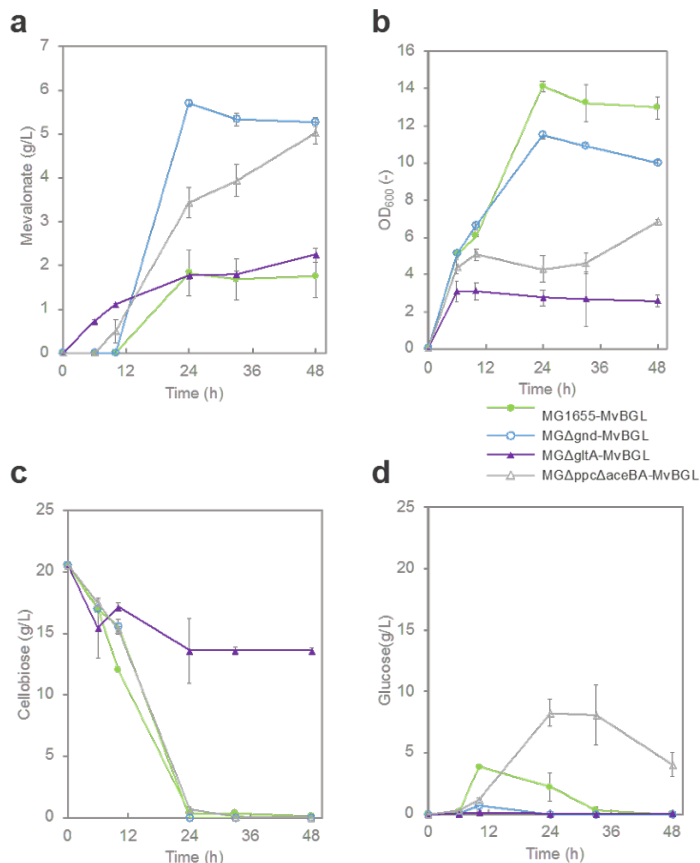


Fig. 3 メバロン酸生産の経時変化

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 3件）

1. 発表者名 内尾匠吾, 里和大地, 田中 勉, 近藤昭彦
2. 発表標題 大腸菌を用いたイソペンテノール生産のための代謝改変
3. 学会等名 酵素工学研究会第82回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 里和大地, 藤原良介, 田中 勉, 近藤昭彦
2. 発表標題 メバロン酸生産 のための新規ターゲット遺伝子の探索
3. 学会等名 酵素工学研究会第82回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤美紀, 田上満里奈, 田中 勉, 近藤昭彦
2. 発表標題 分裂酵母の代謝改変による β -カロテン生産
3. 学会等名 酵素工学研究会第82回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 里和大地, 藤原良介, 田中 勉, 近藤昭彦
2. 発表標題 The effect of single gene knockout on mevalonate production by Escherichia coli
3. 学会等名 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCChE 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shogo UCHIO, Daichi SATOWA, Tsutomu TANAKA, Akihiko KONDO
2. 発表標題 Metabolic engineering of Escherichia coli for isopentenol production
3. 学会等名 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCCHE 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 里和大地, 藤原良介, 田中 勉, 近藤昭彦
2. 発表標題 The effect of gene knockout on mevalonate production orelectricity generation by Escherichia coli
3. 学会等名 14th International symposium on Biocatalysis and Biotransformations (Biotrans 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------