

令和 5 年 4 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02544

研究課題名(和文)物質生産のための人工複合微生物系培養システムの構築

研究課題名(英文)Construction of a synthetic complex microbial system for chemical production

研究代表者

花井 泰三 (HANAI, Taizo)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：60283397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：糖化酵素を生産し、十分に酵素が生産された後に自ら細胞を破壊し、培地に糖化酵素を排出する大腸菌(糖化・溶菌株)の設計と構築を行い、次に、糖化・溶菌株と単糖から目的物質を生産する大腸菌(目的物質生産株)を共培養することで、一つのリアクター内で、「糖化酵素の生産」、「糖化酵素の細胞からの回収とバイオマスの糖化」、「単糖からの物質生産」の工程を実現する新しいプロセスの構築と改良を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的に、セルロース系バイオマスからの物質生産では、バイオマスの分解に必要な糖化酵素が必要となることが多く、糖化酵素の生産と精製を行う酵素生産プロセス、バイオマスから単糖に変換する糖化プロセス、物質生産プロセスが必要となる。これらのプロセスの内、およびにおける糖化酵素の生産・精製にかかるコストが全体の20%程度を占めることが、この方法の社会実装を妨げる大きな障害の一つとなっている。そのため、本研究で構築するシステムが実現されれば、社会的なインパクトが高い原油由来の燃料や一般化学製品原料が、バイオマス由来の物質に取って代わることが可能となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We designed and constructed an E. coli strain that produces glycosyltransferases, destroys its own cells after the enzyme is fully produced, and releases the glycosyltransferases into the culture medium ("glycosylation/lysis strain"), Next, by co-culturing the glycosylation/lysis strain and the E. coli strain that produces the target substance from monosaccharides (target substance production strain), we constructed and improved a new process that realizes the processes of "production of glycolytic enzymes," "recovery of glycolytic enzymes from cells and saccharification of biomass," and "production of target substances from monosaccharides" in a single reactor.

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 人工遺伝子回路 合成代謝経路 バイオ物質生産

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 一般的に、セルロース系バイオマスからの物質生産では、バイオマスの分解に必要な糖化酵素が必要となることが多く、組換え微生物により糖化酵素の生産を行う 酵素生産プロセス、生産した酵素を含む菌体の回収と細胞破碎、細胞破碎物からの酵素の回収と精製、バイオマスから単糖に変換する 糖化プロセス、単糖から合成代謝経路を組み込んだ微生物で目的生産物質を生産する 物質生産プロセスが必要となる。これらのプロセスの内、 および における糖化酵素の生産・精製にかかるコストが全体の 20%程度を占めることが、この方法の社会実装を妨げる大きな障害のうちの一つとなっている。そのため、これらの工程を簡略化することができれば、酵素生産・精製にかかるコストを大幅に縮小することが可能となり、使用量がばく大で、社会的なインパクトが高い原油由来の燃料や一般化学製品原料が、バイオマス由来の物質に取って代わることが可能となると考えられる。

(2) 人工遺伝子回路を合成代謝経路研究と組み合わせることで、今までの微生物による物質生産プロセスを大幅に変えることが可能な研究例(例えば、我々のグループが報告した代謝トグルスイッチによるイソプロパノール生産の向上、Metabolic Eng. 2014)も報告されている。以上のことから、合成生物学的なアプローチで、 酵素生産および 糖化プロセスを大幅に簡略化する可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、糖化酵素を生産し、十分に酵素が生産された後に自ら細胞を破壊し、培地に糖化酵素を排出する大腸菌(糖化・溶菌株)の設計と構築を行い、次に、糖化・溶菌株と単糖から目的物質を生産する大腸菌(目的物質生産株)を共培養することで、一つのリアクター内で、「糖化酵素の生産」、「糖化酵素の細胞からの回収とバイオマスの糖化」、「単糖からの物質生産」の工程を実現する新しいプロセスの構築を目的とする。

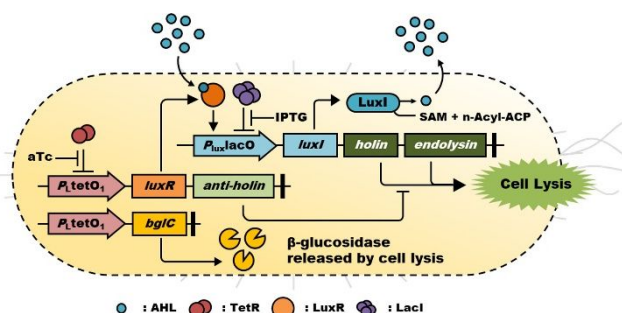
3. 研究の方法

本研究では、モデルバイオマスとしてグルコースの二糖であるセロビオースを、モデル目的生産物質としてはイソプロパノール(IPA)、イソプレノイドの一種であるリコペンなどを、モデル糖化酵素としてはベータグルコシダーゼ BglC を用いることとする。なお、クオラムセンシングのシステムとしては最も研究されており、かつ我々が使用経験のある *Vibrio fischeri* 由来の Lux システム、溶菌酵素は T4 ファージ由来の *holin* と *endolysin* を用いる。また、溶菌のタイミングを調整可能とするために *plux* プロモータのコア配列の前後に *lacO* 配列を導入した *pluxlacO* プロモータを構築し、培養開始時に添加する IPTG 濃度に応じて、溶菌のタイミング(溶菌時の OD) を変更できるように回路を設計した(下図)。この回路では、培養開始時に、aTc および IPTG を添加することで、*pluxlacO* プロモータから *luxI* が発現し、アシルホモセリンラクトン(AHL) が少量生産され、pTet01 プロモータからは *luxR* と *anti-holin*、*bglC* が発現する。AHL は、細胞膜を通過し、細胞内外を行き来し、細胞内では *luxR* と結合し、*pluxlacO* プロモータを活性化する。細胞増殖あるいは培養期間に応じて、細胞外の AHL 濃度は高くなり、指数的に *pluxlacO* プロモータを活性化する。このため、ある菌体密度に達すると *luxI* およびその下流の遺伝子である *holin* と *endolysin* も爆発的に発現する。Anti-holin は、少量生産された Holin と Endolysin による溶菌を阻害するが、爆発的に生産された Holin と Endolysin に量的に圧倒されると糖化・溶菌株は溶菌し、糖化酵素である BglC を放出することとなる。なお、*pluxlacO* プロモータは、細胞内で生産される LacI で阻害され、AHL 濃度が高くなっても下流の遺伝子を発現することができないが、培養初期に添加される IPTG 濃度が高くなると AHL に対する感受性が上昇する。このため、培養初期に添加する IPTG 濃度で溶菌のタイミングを変更することができる。なお、本研究の開始時には、糖化・溶菌株のプロトタイプの作成に成功し、添加する IPTG 濃度によって溶菌タイミングを変更できることを確認済みであり、IPA 物質生産株との混合培養により、セロビオースから IPA を生産することも確認済みである。ただし、糖化・溶菌株の溶菌するタイミングの安定化、リコペンの生産の実施などの検討が必要である。そこで、糖化・溶菌株の動特性の解析と改良、リコペン生産株の構築などを行うこととした。

4. 研究成果

(1) 作成済みの糖化・溶菌株は、周囲の温度の影響を大変受けやすく、エアシェイカーで、同じ培養条件(誘導剤濃度、培地組成 など)で3個のフ

糖化・溶菌株の遺伝子回路

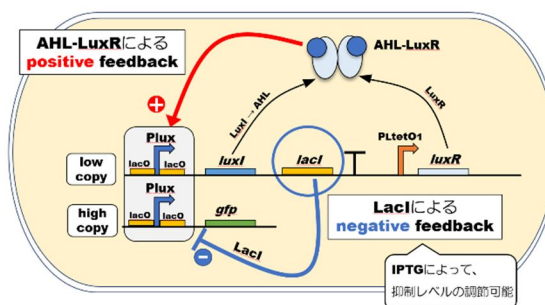


ラスコを用いて実験を行うと、各々のフラスコで溶菌するタイミングが大きく異なるという問題点が存在した。装置内で比較的均一な温度制御が出来るウォーターバス内で往復振とう培養を行うことで、3個のフラスコで同じ実験結果を得ることに成功している。この原因は、LuxシステムのLuxIタンパク質の活性が、20度後半から30度までは高い活性を保つが、30度から急速にその活性が下がり、我々が設定温度としている37度ではほとんど活性を失っているためと考えられた。そこで、培養温度を30度に変更したところ、エアシェイカーでも実験結果は安定したが、LuxIの活性が高くなったため、非常に早いタイミングで溶菌することとなった。溶菌タイミングが早くなったことと、培養温度の低下による菌体増殖速度の低下のため、溶菌時の菌体密度は培養温度37度と比較して非常に低くなり、放出される酵素量もとても少なくなってしまった。結果的に、糖化に十分な酵素量を放出できないという新たな問題が発生した。そのため、RBSカリキュレーターを用いて、luxIの翻訳効率に関連したRBSをより低効率となるように設計し、設計に基づいた糖化・溶菌株を作成することとした。その結果、培養温度30度で、安定して溶菌し、かつ、ある程度の酵素量を放出する株の作成に成功した。しかし、バイオマス量が増加した場合、多くの酵素量が必要となると考えられ、さらに高い菌体密度で溶菌させることが重要になると考えられた。

我々の作成した糖化・溶菌株は、培養開始時に添加するIPTG濃度を低くしていくことで、より高い菌体密度で溶菌させることが可能となる。しかし、明確な原因は明らかとなっていないが、ある濃度以下のIPTGを添加しても、より高い菌体密度で溶菌させることが出来ない。この原因を確認するため、溶菌しない低いIPTG濃度で培養し、溶菌できない高い菌体密度において、外部からAHLを添加したところ、溶菌が観測された。このことから、何らかの原因によって、AHLの合成代謝反応が行われていないと考え、AHLの前駆体と代謝反応に関わる酵素などを調査し、代謝工学的に改変することを考えた。その結果、メチオニン添加、メチオニン代謝関連酵素の発現強化が、これらの問題に大きく関わっていることを明らかにした。

(2)糖化・溶菌株とイソプロパノール生産株を用いて、セロピオースからイソプロパノールを生産することには成功しているため、さらに生産が難しいと考えられるリコピン生産を目指して、リコピン生産合成代謝経路をLuxシステムを用いて発現させる人工遺伝子回路の構築を試みた。基本的にLuxシステムは、ポジティブフィードバックループを形成しているため、一度、遺伝子発現が始まると、遺伝子発現は非常に高いレベルに至るまで増加することとなる。一方、リコピン生産に必要な酵素はその発現量が必要以上に大きくなりすぎると細胞増殖に阻害的に働く可能性があると考えられる。そこで、luxシステムのpluxlacOプロモータ下流に配置したluxI遺伝子のさらに下流に、lacI遺伝子を導入し、pluxlacOプロモータが活性化するとluxI遺伝子によるポジティブフィードバックループが形成されるのと同時に、lacIによるネガティブフィードバックループも形成される様な回路を考案した。この人工遺伝子回路では、ポジティブフィードバックループとネガティブフィードバックループが相互作用することで、IPTG濃度に応じて、遺伝子の発現レベルが一定レベルに制御可能であると考えられた。この設計に基づいて人工遺伝子回路を設計し、レポーターとしてGFPの遺伝子を導入したところ、IPTG濃度に応じて、最終的なGFPの発現レベルを調整できることが、明らかとなった。また、リコピン生産合成代謝経路を、上流、下流の二つの代謝経路に分割し、一方をIPTG、もう一方をaTcで誘導可能なプロモータで遺伝子発現制御するようなシステムを構築した。IPTG濃度、aTc濃度、誘導剤添加タイミングで、細胞増殖、生産量にどのような影響があるかを調べた。

人工luxシステムの改良

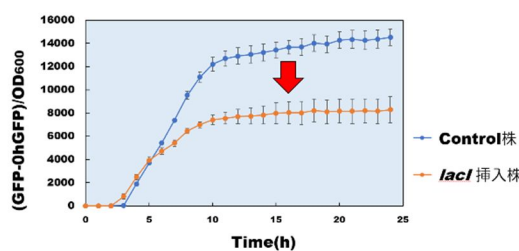


positive feedbackの発現増強をIPTGにより調節可能な人工luxシステムを構築

実験① negative feedbackの導入 (結果1)

24h培養での菌体当たりGFP

- 培養条件: フラスコ培養 (air shaker) LB培地 n = 3
- 誘導剤 (0hで添加): aTc 50 ng/L IPTG 0.1 mM



negative feedbackの働きにより、発現誘導後の目的遺伝子発現量を抑制することに成功した。

この設計に基づいて人工遺伝子回路を設計し、レポーターとしてGFPの遺伝子を導入したところ、IPTG濃度に応じて、最終的なGFPの発現レベルを調整できることが、明らかとなった。

また、リコピン生産合成代謝経路を、上流、下流の二つの代謝経路に分割し、一方をIPTG、もう一方をaTcで誘導可能なプロモータで遺伝子発現制御するようなシステムを構築した。IPTG濃度、aTc濃度、誘導剤添加タイミングで、細胞増殖、生産量にどのような影響があるかを調べた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 門脇潤, 朝田捺暉, 花井泰三, 濱田浩幸, 相馬悠希
2. 発表標題 代謝工学による人工クオラムセンシングのダイナミクス拡張
3. 学会等名 日本生物工学会 九州支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水絵理華, 野間智也, 濱田浩幸, 原田尚志, 花井泰三
2. 発表標題 合成代謝経路を導入した大腸菌による リコペン生産の基礎的検討
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 門脇潤, 濱田浩幸, 花井泰三
2. 発表標題 人工luxシステムにnegative feedback loopを導入した遺伝子回路の構築
3. 学会等名 日本生物工学会 九州支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ジョンアイン, 濱田浩幸, 花井泰三
2. 発表標題 人工 lux システムの温度安定性の向上
3. 学会等名 日本フードファクター学会・日本農芸化学会西日本支部合同大会
4. 発表年 2020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
---------	---------