

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22574

研究課題名（和文）二酸化炭素の効率的利用を指向したC1・C2混合炭素源からの物質生産技術の開発

研究課題名（英文）Development of bioproduction technology from C1/C2 mixed carbon sources for efficient use of carbon dioxide

研究代表者

藤原 良介 (Fujiwara, Ryosuke)

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・基礎科学特別研究員

研究者番号：60880797

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、独自の代謝改変技術であるPMPE（Parallel Metabolic Pathway Engineering）を用いて、高収率で目的化合物を生産する微生物の開発を試みた。まず大腸菌を宿主に用い、目的化合物である L-アラニンを高収率で生産するPMPE代謝改変株を作成した。作成した株を培養することでグルコースから L-アラニンを理論収率の81%で生産することに成功し、現時点での世界最高値を達成した。また、PMPEの戦略をメチロトロフである *Methylorubrum extorquens* に応用し、物質生産におけるプラットフォームとなる代謝改変株の構築を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では独自の代謝改変技術であるPMPEを用いて、大腸菌およびメタノール資化性細菌を宿主とした、高付加価値化合物生産技術の開発を行った。持続可能な社会の実現のため、バイオベースでの物質生産技術の発展は急務である。一方で発酵生産においては物質生産と細胞増殖によるトレードオフの関係が収率低下の主因となっている。PMPEは代謝を分断することでこのトレードオフを解消するアプローチであり、その技術発展は社会的意義が大きい。また、宿主微生物の主要な代謝経路を破壊した上で、複数炭素源を用いること増殖能を維持する本研究は、細胞増殖・維持メカニズムの理解を深める学術的意義の高い研究であると言える。

研究成果の概要（英文）：In this research, we developed the technology to produce valuable compounds at high yields using PMPE (Parallel Metabolic Pathway Engineering), our original technology of metabolic engineering. First, using *Escherichia coli* as a host, we created a PMPE strain that produces the target compound, L-alanine, in high yield. This strain succeeded in producing L-alanine from glucose at 81% of the theoretical yield, achieving the world's highest yield at present. In addition, we applied the strategy of PMPE to the methylotroph, *Methylorubrum extorquens*, and constructed a metabolically engineered strain that will serve as a platform for bioproduction.

研究分野：代謝工学

キーワード：大腸菌 *Methylorubrum extorquens* 代謝工学 合成生物学 バイオリファイナリー

1. 研究開始当初の背景

持続可能な社会の実現のため、現在化石資源から生産されている化合物をバイオベースで生産する技術の発展は急務である。また、現状バイオプロダクションでは主に植物資源が原料に用いられているが、糖化処理が高コストであることやプロセスが煩雑であること等、様々な課題がある。本研究では「代謝のユニット化」という新たな技術を用いて、非植物資源である C1・C2 化合物を原料とした高付加価値化合物(マロン酸)の生産を目指す。代謝のユニット化とは、生物が元来持つ代謝系を複数に分断し、それらを組み合わせることで目的に合わせた代謝デザインを構築する技術である。まず、大腸菌を宿主に用いて、マロン酸の生産に特化した物質生産ユニットと、細胞増殖能力を補う増殖ユニットを構築した。これにより、糖からのマロン酸の生産性・収率の向上を目指した。次に、大腸菌で構築した代謝のユニット化技術を、CO<sub>2</sub> から電気化学的に合成可能な C1・C2 化合物を資化可能な微生物に応用し、植物資源を経ずに CO<sub>2</sub> からマロン酸を効率的に生産する技術の開発を目指した。

2. 研究の目的

本研究では効率的なマロン酸生産技術の開発を目指した。マロン酸は多様な化合物の原料であり再生可能資源からの生産が期待される 30 品目の基幹化合物(米国エネルギー省発表)の一つである。本研究ではまず、扱いやすい大腸菌を用いてグルコース-キシロース混合炭素源からマロン酸前駆体である  $\gamma$ -アラニンの高収率生産技術を開発する。続いて、メチロトロフのモデル株である *Methylorubrum extorquens* に技術移植しメタノール-酢酸混合炭素源からの高収率  $\gamma$ -アラニン(マロン酸)生産を目指した。

3. 研究の方法

宿主微生物の代謝改変は一般的な遺伝子組換え及びゲノム編集技術を用いておこなった。なお *M. extorquens* の遺伝子組換えは既存手法を改良したプロトコルを用いた。構築した代謝改変微生物を培養後、生成物等の評価は HPLC や GCMS 等の測定機器を用いて行なった。

4. 研究成果

本研究では、過去に開発に成功した PMPE (Parallel Metabolic Pathway Engineering) という新奇代謝工学技術を応用し、目的化合物であるマロン酸の生産性向上を目指し研究開発を行った。PMPE とは宿主微生物が元来もつ代謝系を分断し、二つの独立した代謝経路を“パラレル”に共存させ、それぞれの代謝系で異なる炭素源を利用する代謝改変戦略である。

大腸菌を宿主とする場合、PMPE で用いる炭素源にはリグノセルロース系バイオマスから得られる主要な糖であるグルコースとキシロースを使用した。目的物質の生産にグルコース、細胞の増殖にキシロースをそれぞれ炭素源として利用し、それぞれの糖に由来する炭素が代謝系内で交わらないように代謝設計を行った。これにより、グルコースが細胞増殖に必要な代謝物の生産に使われず、目的物質の収率の向上が期待できる。また、グルコースから合成されない代謝物はキシロースから合成されるため、リグノセルロース系バイオマスの効率的な利用が可能となる。マロン酸は、オキサロ酢酸(OAA)からアスパラギン酸、 $\gamma$ -アラニン(BA)等を経て生合成される。本研究では、前駆体である BA の生産量増加に焦点を当て、代謝改変株の作成を試みた。OAA は TCA サイクルの中間体であり、Citrate synthase (CS) によりアセチル CoA アセチル CoA の酢酸残基が付加されクエン酸へと変換される。この反応は OAA 由来の化合物生産における最大の競合経路であるが、細胞の増殖・維持には必須の反応である。そのため、グルコース単一炭素源の培地では、CS 破壊株は増殖能を喪失する。そこで本研究では、CS を破壊

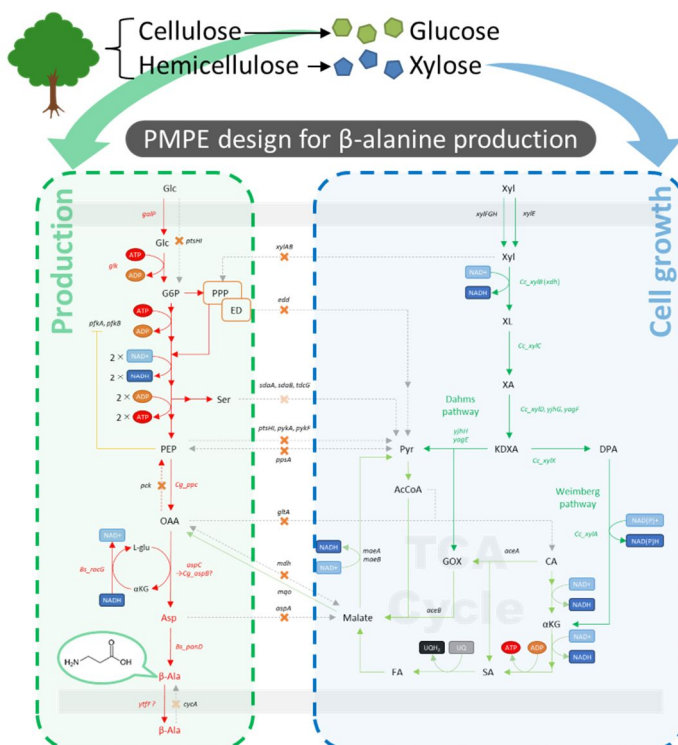


図1 BA 生産に向けた PMPE 代謝系

して BA 生産収率を向上させ、かつ細胞増殖能を再獲得するための代謝デザインを試みた(図 1)。具体的には、CS を含む競合経路への炭素の流出が遮断された代謝改変株を構築し、その株に対して外来のキシロース資化経路(Weimberg 経路)を導入することで、グルコースから講習率で BA を生産し、キシロースから増殖に必要な代謝物を補う代謝系をデザインした。

まず親株である *E. coli* MG1655 株から -アラニン生産と競合する代謝経路を破壊していき、ほぼ完全に競合経路への炭素の流出が遮断された代謝改変株(8 株)を構築した。8 株では解糖系下流の反応であるホスホエノールピルビン酸(PEP)をピルビン酸に転換する反応(*pykA*, *pykF*, *ptsHI*)が破壊されている。これにより解糖系で生産された PEP は補充経路によって

アラニンの前駆体であるオキサロ酢酸へと変換される。さらに 8 株では、CA をコードする *gltA* を破壊した。これによりオキサロ酢酸が TCA サイクルで消費されることを防ぎ、-アラニンをはじめとしたオキサロ酢酸誘導体の飛躍的な収率向上が期待される。

8 株に アラニン生産経路を導入することで、グルコースを炭素源として -アラニンの生産収率 1.62 mol/mol (理論収率の 81%) を達成しており、現時点での世界最高値を達成した。また、8 株に Dahms 経路及び Weimberg 経路を導入しグルコースキシロース混合基質で培養を行った。その結果、Dahms 経路及び Weimberg 経路の導入により細胞増殖が改善することを確認した。しかしながら、野生株と比較すると増殖速度は依然として遅く、糖消費量も少なかった。また、理論上 8 株はグルコースで増殖不可能であるが、実験結果からグルコースでも僅かながら増殖することが分かった。そこで 8 株に対し Phosphoenolpyruvate synthase (*ppsA*) の破壊を行ったところ、グルコース培地での細胞増殖能の喪失が確認された。この結果から、通常ピルビン酸から PEP を合成する反応を触媒している PpsA が、逆方向の反応を触媒していることが示唆された。これを踏まえ、新たな代謝改変株 X 株を作成した。X 株はグルコースを単一炭素源として増殖することが出来ない。X 株に対し Weimberg 経路の導入によりグルコースキシロース混合培地において X 株の細胞増殖が改善することを確認した。X 株は、グルコース存在下において溶存酸素濃度が低い状態では顕著に細胞増殖速度が低下することが確認された。これは細胞内にプロトンが蓄積していることが原因と考えられる。X 株ではグルコース代謝の過程で生産されるプロトン量が増加している一方、ピルビン酸等への炭素流入を遮断しているためプロトンの消費・排出に関わる諸反応が行われない。その結果細胞内にプロトンが蓄積し、細胞増殖が阻害されていると考えられる。これらの本研究で得られた知見は、既存の代謝工学の枠を超えた新奇なものが多く、これらを踏まえた育種法を開発することで生産性の飛躍的向上が期待される。

また大腸菌の代謝改変と並行して、*M. extorquens* に対する PMPE 代謝改変を試みた。一般に *M. extorquens* は、取り込んだメタノールに由来する炭素の約 8 割を、formate dehydrogenase (FDH) によってギ酸から CO<sub>2</sub> へと変換していることが知られている。メタノールを炭素源として物質生産を行うにはこの反応による炭素のロスと低減させることが重要となるが、一方で FDH による NADH 合成は細胞増殖に必須であるため、この反応を破壊することで細胞増殖能が著しく低下するというジレンマを抱えている。そこで本研究では PMPE の戦略を応用し、メタノールとエタノールの 2 つの炭素源を利用して効率的に目的化合物を生産可能な代謝改変株の構築を試みた。メタノールは、CO<sub>2</sub> からの直接生産技術がすでに社会実装されており、カーボンニュートラルな原料として近年注目を集めている。またエタノールは、CO<sub>2</sub> から触媒化学的反応による直接生産が研究されており、将来的な炭素固定のターゲット化合物としても期待されている。現在最も広く用いられているメチロトロフである *M. extorquens* AM1 株は、メタノールを資化可能であるがエタノールを利用することができない。一方、*M. extorquens* PA1 株はメタノールだけでなくエタノールを資化可能であることが知られている。本研究ではこれらの複数炭素源を同時利用する PMPE 代謝系の構築を目指し、PA1 株を宿主に選択した。

前述したように、メタノール由来の炭素を目的生産物に効率的に利用するためには、競合反応を触媒する酵素である FDH の破壊が必須となる。そこで本研究ではまず FDH 破壊株の構築を試みた。既存の接合伝達大腸菌を用いた遺伝子破壊の操作において、大腸菌-*M. extorquens* 混合培養体から *M. extorquens* のみをスクリーニングするために、大腸菌が増殖できないメタノール培地での培養を行うステップがあるが、本研究ではメタノール資化経路の破壊を行うため、別の原理によるスクリーニング法の開発が必要となった。そこでクロラムフェニコール耐性遺伝子をゲノム上に組み込み、新たな遺伝子破壊操作プロトコルを確立した。確立したプロトコルを用いて *M. extorquens* が保有する 4 つの FDH アイソザイムを全て破壊することに成功し、4 重破壊株の構築に成功した。構築した 4 重破壊株をメタノール最小培地およびエタノール最小培地で培養した(図 3)。その結果、メタノール最小培地ではコントロールと比較して顕著に増殖能が低下しており、メタノール消費量が低下していることが確認された。一方、エタノール最

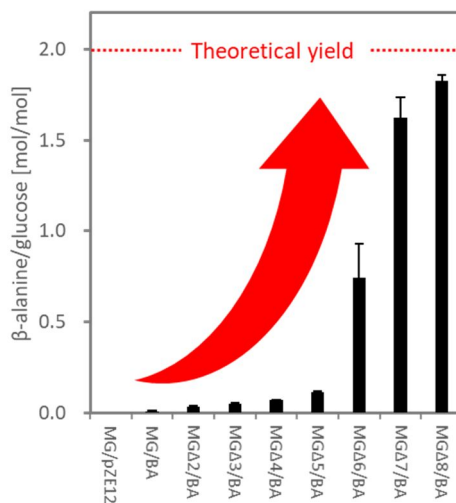


図 2 BA 生産収率

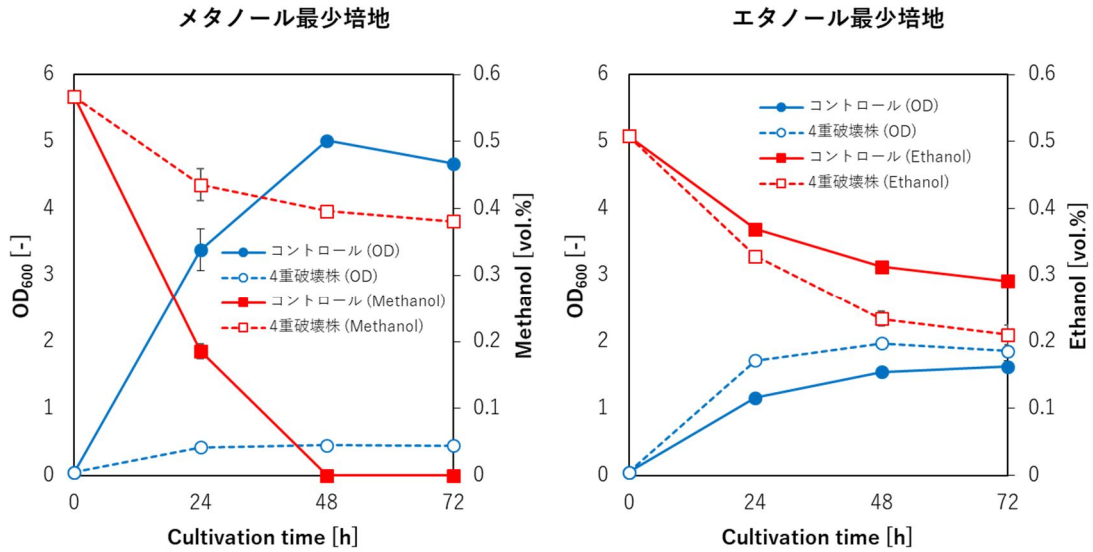


図3 メタノール最少培地およびエタノール最少培地での培養

少培地ではコントロールと比較して増殖速度、最高菌体密度、エタノール消費量が増加していることが確認された。また、メタノール-エタノール混合炭素源を用いた最少培地で4重破壊株を培養したところ、最高菌体濃度(OD<sub>600</sub>)が約0.8と、エタノールのみを用いた場合の約半分であった。メタノール炭素源を用いた場合、4重破壊株ではメタノール由来の代謝中間体が蓄積し、細胞増殖を制限している可能性がある。メタノール代謝物であるホルムアルデヒドが多量に存在する環境下ではEfgAと呼ばれるタンパク質を介した転写制御機構が存在することが知られている。今後、4重破壊株におけるメタボローム解析やトランスクリプトーム解析を行い、さらなる代謝改変によりメタノール資化の制限を解除することで、効率的に目的化合物を生産可能なプラットフォーム株の構築を目指す。*M. extorquens* PA1株は、AM1株と比較して物質生産宿主としての利用報告は少なく、本研究の成果はCO<sub>2</sub>由来炭素源からの物質生産において新たな解決策を提案する基礎となる成果であると言える。今後は構築したFDH破壊株を利用した物質生産技術の開発を行い、植物資源を介さずに合成可能なCO<sub>2</sub>由来低分子化合物を原料とした物質生産プロセスの構築を検討していく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakae Kosuke, Nonaka Daisuke, Kishida Mayumi, Hirata Yuuki, Fujiwara Ryosuke, Kondo Akihiko, Noda Shuhei, Tanaka Tsutomu	4. 巻 164
2. 論文標題 Caffeic acid production from glucose using metabolically engineered Escherichia coli	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Enzyme and Microbial Technology	6. 最初と最後の頁 110193 ~ 110193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.enzmictec.2023.110193	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara Ryosuke, Nakano Mariko, Hirata Yuuki, Otomo Chisako, Nonaka Daisuke, Kawada Sakiya, Nakazawa Hikaru, Umetsu Mitsuo, Shirai Tomokazu, Noda Shuhei, Tanaka Tsutomu, Kondo Akihiko	4. 巻 72
2. 論文標題 G6P-capturing molecules in the periplasm of Escherichia coli accelerate the shikimate pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Metabolic Engineering	6. 最初と最後の頁 68 ~ 81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymben.2022.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nonaka Daisuke, Fujiwara Ryosuke, Hirata Yuuki, Tanaka Tsutomu, Kondo Akihiko	4. 巻 329
2. 論文標題 Metabolic engineering of 1,2-propanediol production from cellobiose using beta-glucosidase-expressing E. coli	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioresource Technology	6. 最初と最後の頁 124858 ~ 124858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biortech.2021.124858	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Noda Shuhei, Mori Yutaro, Fujiwara Ryosuke, Shirai Tomokazu, Tanaka Tsutomu, Kondo Akihiko	4. 巻 67
2. 論文標題 Reprogramming Escherichia coli pyruvate-forming reaction towards chorismate derivatives production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metabolic Engineering	6. 最初と最後の頁 1 ~ 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymben.2021.05.005	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ryosuke Fujiwara, Shuhei Noda, Tsutomu Tanaka, and Akihiko Kondo
2. 発表標題 "Parallel Metabolic Pathway Engineering" for the High Yield Bioproduction in Escherichia coli
3. 学会等名 Metabolic Engineering 14 (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------	---------