

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K18851

研究課題名（和文）アンモニアで呼吸し続ける微生物の創製がもたらす物質生産コストの革新的削減

研究課題名（英文）Reduction of production costs through the creation of microorganisms to breathe ammonia

研究代表者

近藤 昭彦（Akihiko, Kondo）

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）：酵素カスケード反応に適した細胞内代謝経路の構築を行った。反応のモデルとの1つとしてバニリン生産経路の構築を進めた。このモデル経路の構築のためにDSD, OMT, ACARの3つの遺伝子を導入して中間体及びバニリン生産を評価した。遺伝子導入によりバニリン生産が確認され、またそれぞれの酵素の発現量に応じて中間体を含む経路のそれぞれの代謝物の変動が示された。炭素源など培養条件の検討を行い、また遺伝子発現量を再度検討することで、中間体がさまざまな割合で生産する微生物株を構築できた。これより、アンモニアを用いた補酵素再生系の土台が構築できたといえる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、微生物を用いた物質生産において重要な補酵素バランスの調整と再生系に資する技術を開発したものであり、そのためにアンモニアを用いて再生可能資源から低炭素社会の構築に至るための新しい知見を提案するものである。

研究成果の概要（英文）：Intracellular metabolic pathways suitable for enzymatic cascade reactions were constructed. We proceeded to construct the vanillin production pathway as one of the models for the reaction. It diverges from dehydroshikimic acid through protocatechuic acid to vanillic acid and protocatechuic aldehyde, from which it converges to vanillin. To construct this model pathway, we introduced three genes, DSD, OMT, and ACAR, and evaluated intermediate and vanillin production. Vanillin production was confirmed by gene transfer, and the respective metabolites of the pathway, including intermediates, were shown to fluctuate according to the expression levels of each enzyme. By examining the culture conditions, such as carbon source, and reexamining the gene expression levels, we were able to construct microbial strains that produced the intermediates at various rates. From this, it can be said that the foundation of the coenzyme regeneration system using ammonia has been established.

研究分野：合成生物学

キーワード：バイオリファイナリー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

バイオリファイナーは、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。微生物を用いた有用物質生産は、上記バイオリファイナーの重要分野の一つである。代謝工学の発展により様々な有用物質生産が可能になってきたが、補酵素については未だ研究開発が遅れている。フラックスを強化すればよいという炭素と異なり、酸化と還元がペアになっている補酵素バランスを考慮した上で最適化する必要があるため、新しい方法論の開発が望まれている。

### 2. 研究の目的

本研究では、酵素カスケード反応と微生物菌体内の代謝系を都合よく組み合わせることで、アンモニアにより補酵素を再生できる仕組みを構築する。酸化還元バランスを整えることで、その効率を大幅に向上させる。これより、有用物質生産を行える新しいシステムの構築を目指す。

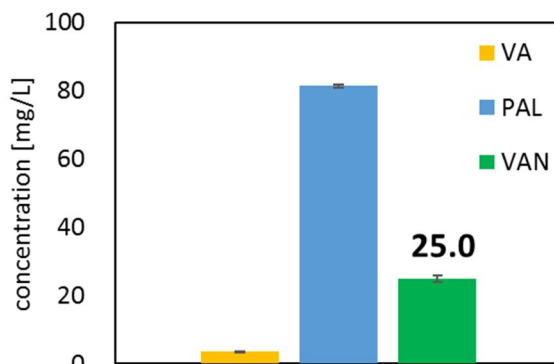
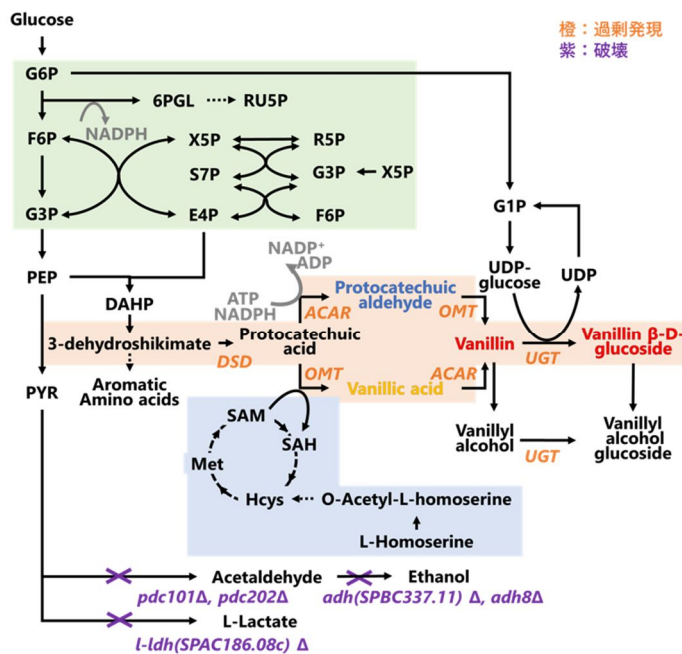
### 3. 研究の方法

目的物質の生産性向上にあたって主要な副産物の生産を抑制する必要があるため、副産物であるエタノールの合成に参与するアルコール脱水素酵素 (ADH) とピルビン酸脱炭酸酵素 (PDC) をコードする遺伝子を破壊した株を親株として使用した。バニリン生産のための発酵試験については前培養、本培養の順に実施し、30、220 rpm の振とう条件下で前培養は YM + Ade 培地により 24 時間、本培養は EMM 最小培地により 48 or 72 時間行った。作製株の評価は分光光度計 (600 nm) を用いた菌体成長 (OD) 及び HPLC を用いた生成物生産量の測定に基づいて行った

### 4. 研究成果

酵素カスケード反応に適した細胞内代謝経路の構築を行った。特に、補酵素である NADH/NAD、NADPH/NADP のそれぞれのバランスに注目した。ペントースリン酸経路、Entner-Doudoroff 経路を強化することでこのバランスを制御できる。また、TCA 回路の流量を制御することで同様にこのバランスをコントロールできる。

反応のモデルとの1つとしてバニリン生産経路の構築を進めた。デヒドロシキミ酸からプロトカテク酸を経てバニリン酸、プロトカテクアルデヒドへと分岐し、そこからバニリンへと収束する。このモデル経路の構築のために DSD、OMT、ACAR の3つの遺伝子を導入して中間体及びバニリン生産を評価した。DSD、OMT、ACAR がそれぞれ望む機能を有することが確認できたため、3種類の遺伝子を全て導入した株を作製し、バニリンの生産を達成することに取り組んだ。PAL-1 株に対して CRISPR-Cas9 システムを利用して、*tdh1p* プロモーターを制御元とした OMT 遺伝子を、キシロース/アラビノースレダクターゼをコードする SPAC2F3.05c 遺伝子座に組み込んだ VAN-1 株を作製した。得られた菌株を培養した結果、培養 48 時間後に 25.0 mg/L のバニリンを生産した。分裂酵母においてバニリンを生産できることが確認できたため、バニリングルコシドの生産を達成することに取り組んだ。VAN-1 株に対して相同組み換えを利用して、*tdh1p* プロモーターを制御元とした UGT 遺伝子を、Leu をコードする *leu* 遺伝子座に組み込んだ VG-1 株を作製した。得られた菌株 VG-1 を培養した結果、培養 72 時間後に 31.0 mg/L のバニリングルコシドの生産を達成した。しかし、VAN-1 株のバニリン生産量が 25.0 mg/L



しかし、VAN-1 株のバニリン生産量が 25.0 mg/L

であることを考えると、このすべてのバニリン (152.15 g/mol) がバニリングルコシド (314.29 g/mol) に変換された場合、VG-1 株では 51.6 mg/L のバニリングルコシドが生産される計算となる。しかし、実際の VG-1 株におけるバニリングルコシド生産量は 31.0 mg/L であり、計算値に満たない。ここで、この原因について、我々は以下の 4 つの仮説を立てた。

分裂酵母の内在遺伝子がバニリングルコシド消費に関与している。

バニリングルコシドが、その分子の大きさのため細胞内に保有されたままである。

バニリングルコシドまたは酵素 UGT がバニリングルコシド生産を阻害している。

バニリンからバニリングルコシドよりもバニリルアルコールへの変換の方が優勢である。

の仮説を検証するために、バニリングルコシド 0.1 g/L を添加した EMM + Leu + Ura 培地条件下で FY12804 ku70 株を培養し、72 時間後におけるバニリングルコシドの残存量を測定した。結果、培養 72 時間後においてもバニリングルコシドは 89.8 mg/L 残存していた。これにより、分裂酵母の内在遺伝子がバニリングルコシド消費に関与している可能性が低いことが示唆された。の仮説を検証するために、株の 72 時間培養後の菌体を収集し、菌体破碎を行って細胞内に残存している物質を溶解させ、その溶液を分析した。結果、溶液中にバニリングルコシドは検出されなかった。これにより、分裂酵母の細胞内にバニリングルコシドが保持され、上清中に排出されにくくなっている可能性が低いことが示唆された。続いて の仮説の検証に取り組んだ。VAN-1 株と VG-1 株を比較すると、VG-1 株では中間体であるプロトカテクアルデヒドの残存量が VAN-1 株と比較して少ないことが分かる。そこで、我々は以下の二つの仮説を立てた。

-1: バニリングルコシドがプロトカテクアルデヒドの変換に関与している

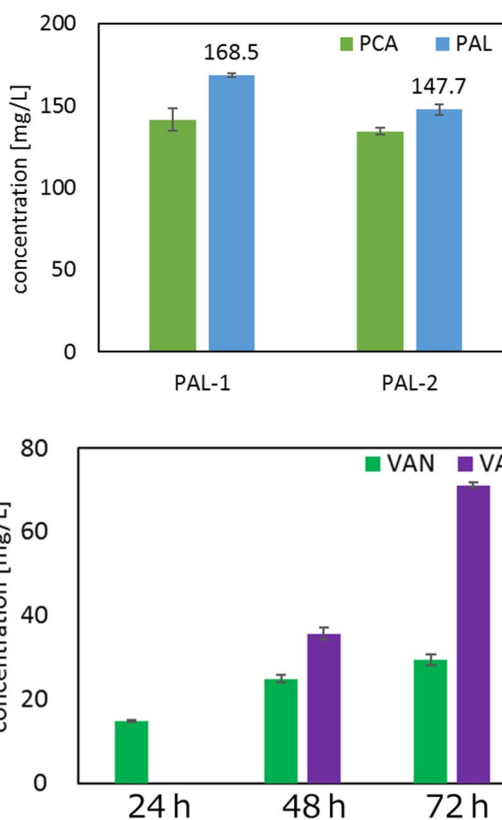
-2: UGT がプロトカテクアルデヒドの変換に関与している

まず、-1 の仮説を検証するために、VAN-1 株をバニリングルコシドを 0 mg/L, 10 mg/L, 100 mg/L 添加した EMM + Leu + Ura 培地条件下で培養し、バニリングルコシドの添加量の違いによるプロトカテクアルデヒド生産量の差を比較した。培養 48 時間後、バニリングルコシドを 10 mg/L, 100 mg/L 添加した場合の VAN-1 におけるプロトカテクアルデヒド生産量はそれぞれ 86.9 mg/L, 77.2 mg/L となり、バニリングルコシドを添加しなかった場合の VAN-1 株のプロトカテク

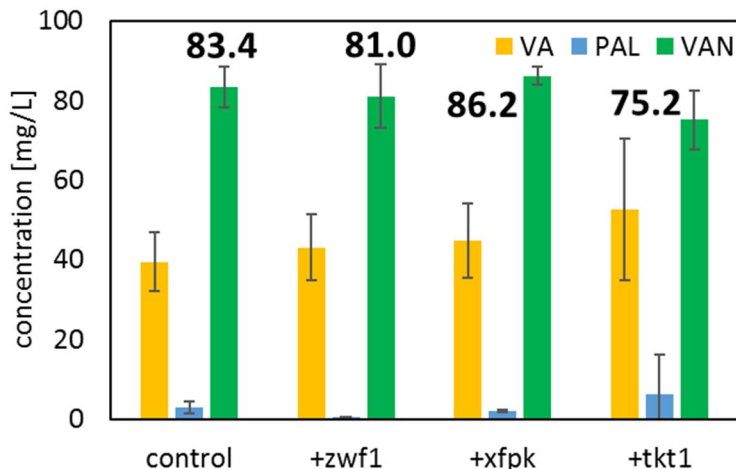
アルデヒド生産量である 84.0 mg/L と大きな差は見られなかった。これにより、バニリングルコシドが ACAR の作用を阻害している可能性は低いことが示唆された。-2 の仮説を検証するために、PAL-1 株に対して相同組み換えを利用して、tdh1p プロモーターを制御元とした UGT 遺伝子を、Leu をコードする leu 遺伝子座に組み込んだ PAL-2 株を作製した。得られた菌株を培養した結果 (図) 培養 48 時間後の PAL-2 株におけるプロトカテクアルデヒド生産量は 147.7 mg/L となり、PAL-1 株のプロトカテクアルデヒド生産量である 168.5 mg/L を下回った。これにより、UGT がプロトカテクアルデヒドの変換に関与している可能性が高いことが示唆された。続いて

の仮説の検証に取り組んだ。右下図から、VAN-1 株ではバニリンからバニリルアルコールへの変換が開始するタイミングは培養を開始して 24 時間から 48 時間の間であることが分かる。一方、VG-1 株ではバニリンからバニリルアルコールへの変換が開始するタイミングは培養を開始して 0 時間から 24 時間の間であることが分かる。そのため、株において培養開始から 24 時間が経過するまではバニリンに対してグルコシド化しか起きていなかったものの、24 時間が経過してバニリンに対してアルコール化も起き始めると、グリコシル化よりアルコール化の方が優勢となり、バニリングルコシド生産速度が下がった可能性が考えられる。対策として、バニリンのアルコール化に関与する遺伝子を破壊する、バニリングルコシド生産の前駆体となるバニリン及び UDP-グルコースの供給量を増加させ、UGT が反応しやすい場を整えることの必要性が考えられた。

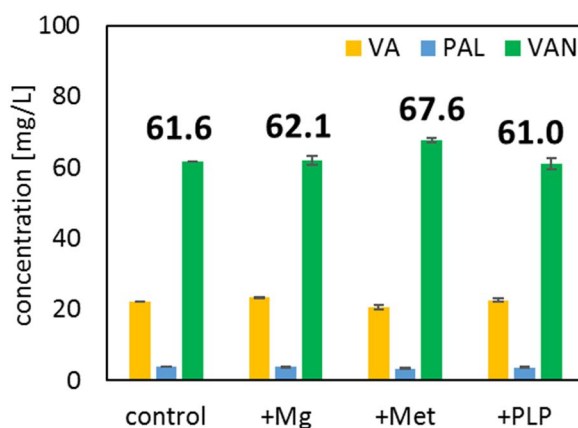
これらの系を用いると、ペントースリン酸経路 (PPP) 上流では G6P から 6-ホスホグルコノ-1,5-ラクトンが生産される際、及び 6-ホスホグルコン酸からリブローズ-5-リン酸が生産される際に、同時に NADPH も生産される。先行研究により、PPP の下流フラックスを強化すると、PPP 全体のフラックスが強まり、結果として NADPH の供給量を向上させることができるとされてい



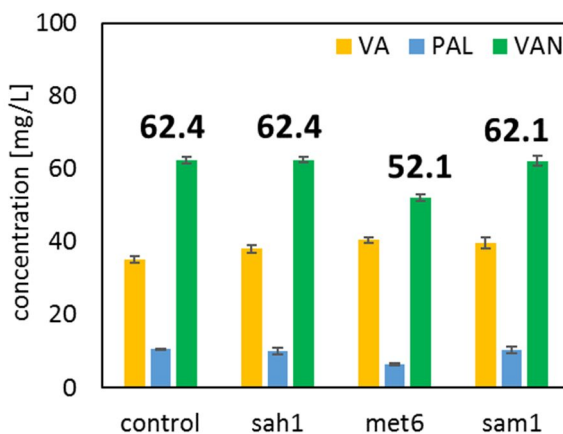
る。そこで、VAN-3 株に対してプラスミド導入を利用して、ef1a-c プロモーターを制御元とした PPP の下流遺伝子である zwf1, xfpk, tkt1 組み込み pDUAL-FFH61 プラスミドをそれぞれ導入した株を作製した。得られた菌株を培養した結果、培養 48 時間後のバニリン生産量は xfpk 導入株でそれぞれ 86.2 mg/L となり、コントロール株のバニリン生産量である 83.4 mg/L をや上回った。



メチル化反応においては SAM の他に補酵素として金属イオン Mg<sup>+</sup>及びピリドキサル 5-リン酸 (PLP) も必要となる。Escherichia coli を用いた先行研究において、ホモセリンからホモシステイン (Hcys) の生成を司る硫化転位経路が機能するにあたって、補酵素として PLP が必要であり、これを培地中に添加した場合、メチル化反応が促進されると報告されている。また、Met から SAM の反応時に必要である金属イオン Mg<sup>+</sup>を培地中に添加した場合にも、メチル化反応が促進されると報告されている。さらに、Met の添加はメチル化反応促進に効果があると報告されている。そこで、VAN-4 株培養時に培地中に Mg<sup>+</sup> (EMM 含有量込みの最終濃度 248 mg/L) PLP (最終濃度 25 mg/L) 及び Met (最終濃度 225 mg/L) を添加し、培養試験を行った。培養した結果、培養 48 時間後のバニリン生産量は Met を添加した場合 67.6 mg/L となり、コントロール株のバニリン生産量である 61.6 mg/L を上回った。



Met の供給量増加により SAM が生成されやすくなり、メチル化反応が促進したと考えられたため、遺伝子導入により Met 供給量の増加に取り組むこととした。SAM は Hcys から生成される Met から生成される物質であり、メチル化反応後は S-アデノシルホモシステイン (SAH) となる。そして、SAH からは Hcys が生成され、メチオニン代謝経路がサイクルとなる。Saccharomyces cerevisiae を用いた先行研究により、Met から SAM を生成する際に必要な酵素である SAM シンターゼをコードする Leishmania infantum 由来の遺伝子 LiMETK1 を導入することにより、メチル化反応が促進すると報告されている。LiMETK1 と同等の機能を有する遺伝子として sam1 が存在する。また、SAH は OMT の阻害剤として働くため、SAH の分解酵素として働く Sah をコードする遺伝子 SAH1 を過剰発現させるとメチル化反応が促進するとも報告されている。分裂酵母において SAH1 と同等の機能を有する遺伝子として sah1 が存在する。加えて、Hcys 生産の上流に位置するホモセリンから Hcys を生成する際に働く MET2 をコードする遺伝子 MET2 を過剰発現することでも、メチル化反応が促進すると報告されている。分裂酵母において MET2 と同等の機能を有する遺伝子として met6 が存在する。そこで、VAN-4 株に対してプラスミド導入を利用して、ef1a-c プロモーターを制御元としたメチオニン代謝経路に関わる遺伝子である sam1, sah1, met6 組み込み pDUAL-FFH61 プラスミドをそれぞれ導入した株を作製した。得られた菌株を培養した結果、培養 48 時間後のバニリン生産量はいずれの遺伝子導入株でもコントロール株のバニリン生産量を上回らなかった。これより、アンモニアで補酵素バランスを評価するための土台が構築できたといえ、引き続きその検討を進めているところである。



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 4件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Akihiko Kondo
2. 発表標題 Construction of Novel Metabolic Pathways with Synthetic Enzymes
3. 学会等名 Thai Society for Biotechnology International Conference Online (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akihiko Kondo
2. 発表標題 Development of biofoundry platform for rapid construction of microbial cell factories
3. 学会等名 The 3rd Synthetic Biology World Forum, 2021 (SBWF 2021) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akihiko Kondo
2. 発表標題 Construction of novel metabolic pathways with artificial enzymes in microbes
3. 学会等名 Metabolic Engineering 14 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akihiko Kondo
2. 発表標題 Construction of novel metabolic pathways with artificial enzymes in microbes
3. 学会等名 Asean Federation Of Biotechnology Symposium (Malaysia Chapter) 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akihiko Kondo
2. 発表標題 Development of biofoundry platform for rapid construction of microbial cell factories
3. 学会等名 2021 AF0B virtual conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 近藤 昭彦
2. 発表標題 合成生物学による新たな産業革命
3. 学会等名 第4回新しい資本主義実現会議 「科学技術立国」
4. 発表年 2022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