

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：84307

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19100

研究課題名（和文）毒性生産物への高耐性化を基盤とした重要香料バニリンの発酵高生産菌の開発

研究課題名（英文）Development of vanillin overproducer strains based on enhanced tolerance toward fermentation inhibition by the toxic product.

研究代表者

小暮 高久（KOGURE, Takahisa）

公益財団法人地球環境産業技術研究機構・その他部局等・主任研究員

研究者番号：80422244

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：コリネ型細菌において見出したバニリン高耐性化関連遺伝子の機能解析を通じて、本菌におけるバニリンの細胞毒性の作用機作として、翻訳阻害と酸化ストレスが関係している可能性を示した。また、バニリン応答遺伝子に関するトランスクリプトーム解析の結果、酸化ストレス応答、呼吸鎖機能、グリコーゲン代謝、分子シャペロン、及び多種の転写制御因子がバニリンに対する生理応答に関与している可能性を示した。さらに、フェルラ酸を原料としてバニリンを生産可能な菌株を異種遺伝子導入と代謝改変により構築するとともに、二段階菌体反応プロセスを適用することにより、フェルラ酸から高濃度のバニリン生産を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バニリンが微生物にもたらす細胞毒性の作用機作やバニリンに対する生理応答機構の解明は、バニリンの生産物毒性を回避可能な発酵生産菌株を創出するための重要課題である。本研究では、コリネ型細菌におけるバニリン毒性の作用機作として翻訳阻害と酸化ストレスが関与する可能性を新たに見出すとともに、遺伝子改変の組合せにより耐性がさらに向上した菌株の育種を達成した。また、フェルラ酸を原料とするバニリン生産菌株を育種するとともに、菌体反応プロセスの検討により高濃度のバニリン生産を達成した。これらの研究成果は、微生物の毒性物質に対する応答機構の解明とバニリンの発酵生産法の確立につながる重要な成果と考えられる。

研究成果の概要（英文）：We evaluated the molecular function of the vanillin resistance-related genes in *Corynebacterium glutamicum*, and found that translation inhibition via ribosome and oxidative stress would play important roles in molecular mechanisms of the vanillin toxicity in this organism. We also identified possible candidates of the molecular functions involved in the response to vanillin via transcriptome analysis, which included oxidative stress response, function related to the respiratory chain, glycogen metabolism, molecular chaperone, and various transcription factors. Furthermore, we constructed an engineered *C. glutamicum* strain producing vanillin from ferulic acid, and achieved vanillin production at high titer from ferulic acid via the optimization of fermentation conditions.

研究分野：応用微生物学

キーワード：バニリン コリネ型細菌 フェルラ酸 耐性機構 発酵生産 耐性遺伝子 応答機構

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

天然のバニラの香気成分であるバニリンは重要な香料化合物であるが、現在その大半は石油原料からの化学合成によって製造されている。その一方で、食品や化粧品用途のバニリンとしては、微生物発酵を利用して天然原料から生産される「バイオバニリン」が注目されている。しかしながら、バニリンの発酵生産に当たっては、バニリンが強い細胞毒性を有しており、生産物阻害を引き起こすことが問題として存在し、このため、バニリンを発酵高生産させるためには、微生物宿主のバニリン耐性を高めてバニリン毒性を回避することが重要と考えられた。

このような背景のもと私は、アミノ酸の工業生産菌であるコリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* が、酵母や大腸菌など他の微生物と比べて顕著に高いバニリン耐性を保持していることを見出した。さらに本菌のバニリン耐性度が野生型株よりも向上した高耐性化変異株を2種の変異導入手法(ミューテーター変異導入法および変異原処理法)を用いて多数取得するとともに、10株のバニリン高耐性化株の全ゲノム解析を行い各株のゲノム中に存在する変異遺伝子を特定した。そして、複数の高耐性化株に共通して存在する遺伝子変異をバニリン耐性に関与する可能性の高い候補遺伝子変異として選択し、各遺伝子変異をそれぞれ野生型株に導入した株を構築し、構築株のバニリン耐性が向上するかどうかを調べた。その結果、16種の遺伝子における変異(アミノ酸置換変異、またはフレームシフト変異)がバニリンに対する耐性向上をもたらすことを見出していた。そこで、これらの遺伝子の機能解析を通じて本菌におけるバニリン耐性の分子機構を明らかにするとともに、バニリン耐性をもたらす遺伝子改変を組み合わせることで、バニリンに対する耐性をさらに高めた菌株を育種可能と考えた。

2. 研究の目的

これまでに特定したコリネ型細菌のバニリン耐性の向上に寄与する変異遺伝子(バニリン高耐性化関連遺伝子)を手掛かりとして、本菌におけるバニリン耐性の分子機構を解明すること、及び、耐性関連遺伝子の遺伝子改変によりバニリン耐性をさらに向上させたバニリン高耐性化菌株を分子育種すること、さらには、本菌において代謝設計に基づいてバニリン生産経路を構築し、フェルラ酸を含む再生可能な天然原料からのバニリン生産菌株を分子育種することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) バニリン高耐性化関連遺伝子の機能解析

C. glutamicum のバニリン耐性向上に寄与することが確認された各遺伝子の生理機能とバニリン耐性との関係を解明するため、各遺伝子の破壊株および高発現株を構築し、それら遺伝子改変がバニリン耐性および各種生理機能に対してどのような影響を及ぼしているのかについて、遺伝学および生化学的手法を用いて解析する。

(2) バニリンの毒性ストレスに対する遺伝子発現応答に関するトランスクリプトーム解析

C. glutamicum におけるバニリン添加に反応した遺伝子発現の変動を調べるため、トランスクリプトーム解析(RNA-seq解析)を実施する。これにより、バニリンに反応して発現変動する遺伝子を網羅的に特定することで、本菌においてバニリン耐性に関係する遺伝子候補を新たに特定するとともに、バニリンが *C. glutamicum* の生理機能に及ぼす影響に関わる情報を取得する。

(3) バニリン高耐性化菌株の育種

特定したバニリン高耐性化関連遺伝子の改変を複数組み合わせることにより、バニリン耐性度が単独遺伝子の改変株と比べさらに高まった菌株を育種する。この際、菌の増殖等への悪影響を及ぼすことなくバニリン耐性を最大化する遺伝子改変の組み合わせを特定する。

(4) バニリン生産経路の構築による天然原料としてのフェルラ酸からのバニリン生産の実証

C. glutamicum に内在するフェルラ酸の資化経路と異種由来の芳香族カルボン酸還元酵素を利用することにより、天然原料であるフェルラ酸からバニリンを生産可能な菌株の分子育種を行う。また、フェルラ酸をバニリンに変換する菌体反応プロセスを検討し、フェルラ酸からの高濃度バニリンの生産を目指す。

4. 研究成果

(1) バニリン高耐性化関連遺伝子の機能解析

バニリン高耐性化変異株のゲノム解析を通じてこれまでに特定していたバニリン高耐性化関連遺伝子について、各遺伝子の破壊株と高発現株をそれぞれ構築し、バニリン耐性度への影響をプレートアッセイ法により調べた。その結果、*tlyA* (16S rRNA メチル化酵素)、*fasR* (脂肪酸合成関連遺伝子の転写制御因子)、*glgC* (グルコース-1-リン酸アデニル化酵素)、*scrB* (スクロース-6-リン酸ヒドロラーゼ)、*cgR_2729* (β -グルコシド特異的 PTS 輸送体)、*cgR_2607* (膜タンパク質)の遺伝子破壊株では、野生型株と比べてバニリン耐性が向上することが示された。この結果から、各遺伝子産物の機能欠損がバニリン耐性を向上させる効果があることが示された。一方、高発現株においては、*ndh* (II 型 NADH デヒドロゲナーゼ)、*aftC* (アラビノフラン-3-O-アラビノシル転移酵素)、*cgR_2680* (GNAT ファミリー N-アセチル化酵素と相同性あり)、*glgC* (グルコース-1-リン酸アデニル化酵素)、*cgR_2898* の 5 種の遺伝子の発現増強によってバニリンに対する感受性が高まることを示唆している。高発現によりバニリン耐性に影響を与えた上記遺伝子のうち、*ndh* はコリネ型細菌における呼吸鎖構成因子の一つである II 型 NADH デヒドロゲナーゼをコードしており、Ndh は NADH や NADPH の酸化に伴って、スーパーオキシドや過酸化水素といった活性酸素種の発生源にもなっていることが報告されている。一方、大腸菌や他の細菌において、バニリンは呼吸鎖の活性を阻害すること、及び活性酸素種の蓄積やそれに伴う酸化ストレス応答を引き起こすことも報告されている。*ndh* については、バニリン耐性変異株の解析から、1 アミノ酸変異をもたらす変異遺伝子の発現がバニリン耐性を向上させることが示されていることから、該アミノ酸変異は Ndh の酵素活性を低下または消失させている可能性や、Ndh による活性酸素種生成活性の低下または消失に寄与している可能性も考えられる。この点については現時点では不明であり、今後詳細に検証する必要がある。

一方、コリネ型細菌において見出したバニリン高耐性化関連遺伝子のうち、*tlyA* 遺伝子の機能解析を通じて、本菌におけるバニリンの増殖阻害の作用機作の一つとして、翻訳機構の阻害が関係していること示唆する結果を得た。マイコバクテリウム属細菌において、*tlyA* 遺伝子は 16S リボソーム RNA のメチル化酵素をコードしており、本遺伝子を欠損させた菌においては、アミノグリコシド系タンパク質合成阻害薬であるカプレオマイシンに対して耐性を獲得することが知られていた。これは、TlyA により、細菌のリボソームを構成する 16S リボソーム RNA がメチル化されていることが、カプレオマイシンが標的とするリボソームに結合する際に重要な役割を果たすためと考えられている。一方、コリネ型細菌の *tlyA* 遺伝子の破壊によっても、結核菌の場合と同様にカプレオマイシンに対して耐性化することが示された (図 1)。このことから、本菌においても TlyA の 16S rRNA メチル化活性がカプレオマイシンの薬効に関与していることが示唆された。この結果と、コリネ型細菌において *tlyA* の欠損がバニリンに対する耐性向上をもたらすことを合わせて考えると、次のような仮説が考えられた。すなわち、バニリンがカプレオマイシンの場合と同様に、リボソームへの結合を介した翻訳阻害を引き起こしており、この阻害作用が *tlyA* の機能欠損により緩和または回避された結果、バニリンに対する耐性が向上することが推察された。本仮説を検証するためには、今後さらに詳細な生化学的解析を行って明らかにする必要がある。

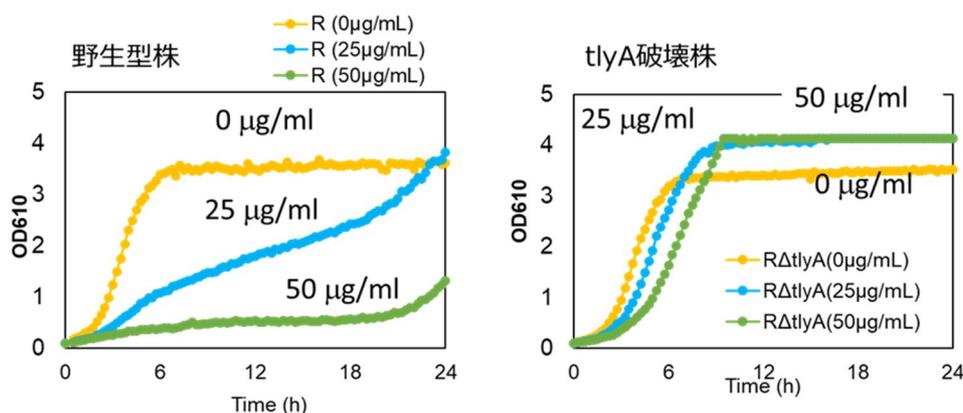


図 1 *tlyA* 遺伝子の欠損によるカプレオマイシンへの耐性化

(2) バニリンの毒性ストレスに対する遺伝子発現応答の解析

C. glutamicum の野生型株を用いて、バニリンを添加しない通常の培地で培養した菌体と、各濃度のバニリンを添加して培養した菌体の双方から全 RNA を抽出し、RNAseq (トランスクリプトーム) 解析を行ってバニリンに応答した遺伝子発現変動を調べた。その結果、呼吸鎖関連の酸化還元酵素、複数種の分子シャペロン、グリコーゲン代謝酵素、及び多くの転写制御因子や膜輸送体をコードする遺伝子の発現(mRNA)がバニリンの存在によって強く発現誘導されることが確認された。呼吸鎖関連の酸化還元酵素やグリコーゲン代謝酵素はバニリン高耐性化変異株に

おける変異遺伝子としても見出されていることから、これらの生理機能がバニリンの毒性ストレスに対する生理応答に関与する可能性が高いことが考えられた。また、コリネ型細菌における多種の転写制御ネットワークがバニリンに応答した遺伝子発現調節に関与していることが考えられ、各遺伝子の発現変動から、どの転写制御因子がバニリンに応答して活性化しているかといった、バニリン応答に際した遺伝子発現ネットワークについて、*in silico* 解析により今後特定する予定である。

(3) バニリン高耐性化菌株の育種

特定したバニリン高耐性化関連遺伝子の遺伝子改変を組み合わせることにより、バニリン耐性が単独遺伝子の改変株よりもさらに向上する可能性について、多重遺伝子改変菌株を構築して検証を試みた。その結果、*tlyA* 遺伝子破壊と *fasR* 遺伝子破壊、*fasR* 遺伝子破壊と *ndh(A369V)* 変異導入、及び *tlyA* 遺伝子破壊、*fasR* 遺伝子破壊および *ndh(A369V)* 変異導入の各二重または三重遺伝子改変株は、各単独遺伝子改変株と比較してバニリン耐性がさらに向上することを確認した(図2)。この結果から、バニリン高耐性化関連遺伝子の多重改変によるバニリン高耐性化菌株の育種に成功した。



図2 バニリン高耐性化関連遺伝子の多重改変によるバニリン耐性の向上

(4) フェルラ酸からのバニリン生産の実証

バニリン生産の原料としては、米糠等に多く含まれる天然成分であるフェルラ酸の利用を考えた。その理由としては、*C. glutamicum* はフェルラ酸の資化能力を保持しており、異種由来の芳香族カルボン酸還元酵素遺伝子を本菌において機能発現させることで、数段階の代謝ステップでフェルラ酸をバニリンに変換可能と考えられたためである(図3)。糖を原料としてプロトカテク酸を経由してバニリンを生産する経路の構築も試みたが、異種由来のカテコール-O-メチル化酵素によりプロトカテク酸の芳香環3位の水酸基をO-メチル化してバニリン酸に変換する活性が非常に弱く、本反応段階が律速となってバニリンは微量の生成にとどまることが示された。*C. glutamicum* において、フェルラ酸はバニリン酸とプロトカテク酸を中間体とする異化代謝経路によって分解されて炭素源として利用される。そこでまず、バニリンの前駆体となるバニリン酸をプロトカテク酸に変換する内在性酵素をコードする *vanAB* 遺伝子を破壊することでフェルラ酸を代謝変換してバニリン酸を蓄積する宿主菌株を構築した(図3)。また、*C. glutamicum* は、バニリン酸を還元してバニリンを生成する反応を触媒する芳香族カルボン酸還元酵素(Aromatic carboxylic acid reductase, ACAR)を保有していないため、本酵素をコードする異種遺伝子を探索した。その結果、*C. glutamicum* においてバニリン酸をバニリンに高効率に変換可能な ACAR 遺伝子を特定した。そこで、*vanAB* 破壊株に ACAR を導入した菌株を構築し(図3)、フェルラ酸からのバニリン生産を検証したところ、前駆体のバニリン酸が蓄積し、バニリンも微量生成したものの、バニリン酸からの変換効率が低いことが示された(25 mM のフェルラ酸から 0.9 mM のバニリンが生成)。そこで、フェルラ酸からのバニリン生成反応を、フェルラ酸からのバニリン酸生成とバニリン酸からのバニリン生成に分けて、各反応の効率をそれぞれ調べたところ、ACAR が触媒する、バニリン酸からバニリンを生成する反応がフェルラ酸によって強く阻害されることが明らかとなった。そこで、フェルラ酸からのバニリン生産反応について、バニリン酸生成の反応上清をバニリン酸生成反応に用いる2段階反応プロセスを考案した。すなわち、1段階目の菌体反応でフェルラ酸をバニリン酸に完全に交換させた後、2段階目の菌体反応では、生成したバニリン酸を含む培養上清と同じ菌株を用いてバニリン酸をバニリンに変換することを試みた。その結果、フェルラ酸による ACAR の阻害が回避され、図3に示すように、90 mM のフェルラ酸を原料として 68 mM の高濃度バニリンが生成することが実証された(図4)。

今後は、ACAR のフェルラ酸による活性阻害を回避するための酵素改変の検討や、フェルラ酸からバニリン生成に至る別の異種代謝経路の利用、及びバニリン高耐性化株をベースとしてバニリン生産株を構築することで、バニリンの生産物毒性が緩和されてバニリンの生産性向上に

つながるかどうかについて検証を行う予定である。

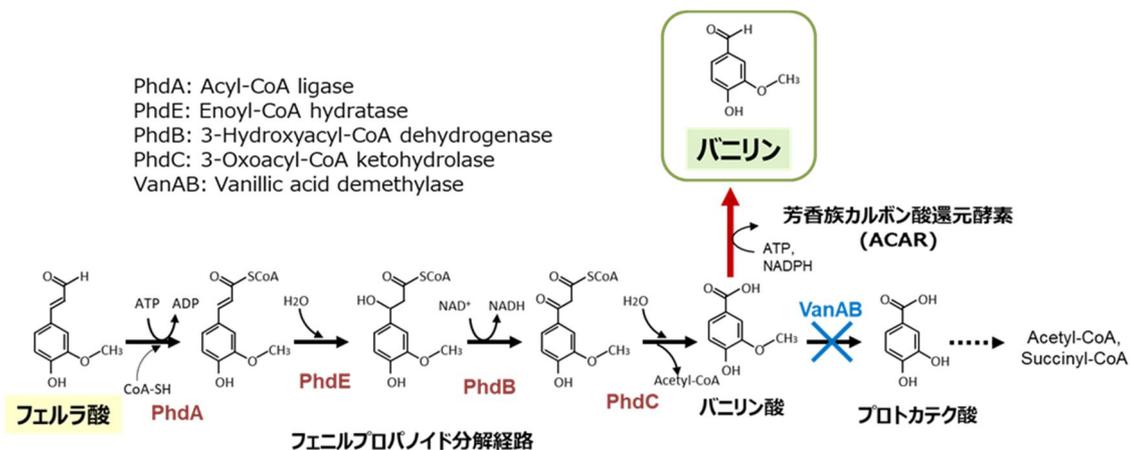


図3 *C. glutamicum* におけるフェルラ酸からのバニリン生産経路

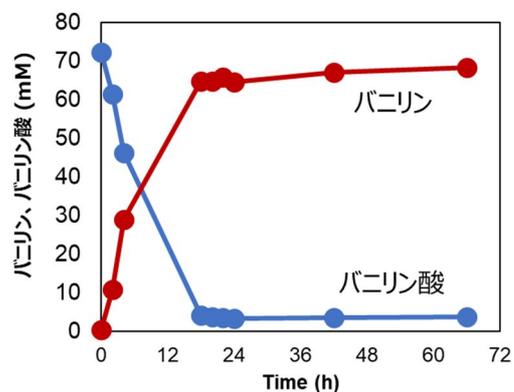


図4 菌体反応によるフェルラ酸由来のバニリン酸からのバニリン生産 (2段階目反応)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小暮 高久、田中 辰樹、松富 優一、須田 雅子、平賀 和三、乾 将行
2. 発表標題 コリネ型細菌によるバニリンおよびプロトカテクアルデヒドの発酵生産
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松富 優一、小暮 高久、乾 将行
2. 発表標題 コリネ型細菌によるフェルラ酸からのバニリン生産
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024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
---------	---------