

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580105

研究課題名(和文) コリネ型アミノ酸生産菌における還元力高生産宿主の開発

研究課題名(英文) Development of a *Corynebacterium glutamicum* strain with an NADPH-generating glycolytic pathway

研究代表者

池田 正人 (IKEDA, Masato)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：00377649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：ミュータンス菌(う蝕菌)は、ペントースリン酸経路でNADPHを生成できない代わりに、解糖系でそれを生成することができる。この特異なレドックス代謝系をコリネ菌内で再構築した。これを宿主としてリジン生産を行うと、元株の倍以上の高いリジン生産能が得られた。さらに、元株のリジン生産能がペントースリン酸経路の遮断によって半減したのに対し、育種株では同経路を遮断しても高いリジン生産能が維持されていた。すなわち、本菌のリジン生産は、狙い通り、還元力をペントースリン酸経路に依存しない代謝系になっていることが確かめられた。ペントースリン酸経路に依存しないリジン発酵はこれが初めてである。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus mutans, a tooth decay bacterium, has an unusual glycolytic pathway that can generate NADPH at the step of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. We engineered *Corynebacterium glutamicum* with an *S. mutans*-type NADPH-generating glycolytic pathway. A lysine producer derived from the engineered strain produced more than twice as much lysine as the reference strain. The production of lysine remained high after the pentose phosphate pathway was interrupted, while a drastic decrease in lysine production was observed in the case of the reference strain.

研究分野：応用微生物学

キーワード：コリネバクテリウム・グルタミカム 還元力 NADPH GapN リジン発酵

1. 研究開始当初の背景

(1) アミノ酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* (以下、コリネ菌) では、NADPH の主な供給源であるペントースリン酸経路への代謝フローを高める育種が一般的な戦略になっており、種々の具体策が報告されている。しかし、その戦略では、発酵原料の1つであるフラクトースの炭素をペントースリン酸経路に向けることが難しく、加えて同経路では脱炭酸による炭素ロスが発生するという欠点を伴う。特に後者は同経路への代謝フローを高めるほど炭素ロスが大きくなるというジレンマになっていた。

(2) 近年、ゲノム情報に基づいて *in silico* で全代謝マップを構築することが可能になった。既に多くの微生物で、その生命活動を支えている多様な代謝経路がネット上に公開されている。我々はその中にペントースリン酸経路が不完全な細菌がいることに目を留めた。このような細菌はグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (Gap) の段階で NADPH を産生する特異な解糖系を有していることが報告されている。もしそれを模した解糖系をコリネ菌で構築できれば、上記の問題をクリアして、より効率的な物質生産系が構築できるはずであるが、そのような研究はなかった。

2. 研究の目的

(1) 産業的に重要なコリネ菌において、NADPH の産生を、脱炭酸を伴うペントースリン酸経路でなく解糖系で行うことができる還元力高産生宿主を開発する。そのために、一部の細菌がもつ特異な解糖系をモデルとして、コリネ菌のレドックス代謝の再設計を試みる。

(2) 具体的には、う蝕菌 *Streptococcus mutans* (以下、ミュータンス菌) の NADP 完全依存型 GapN 酵素を用いてコリネ菌の解糖系を再構築し、解糖系で NADPH を産生するミュータンス菌型のレドックス代謝系をもつアミノ酸生産菌を開発する (図 1)。

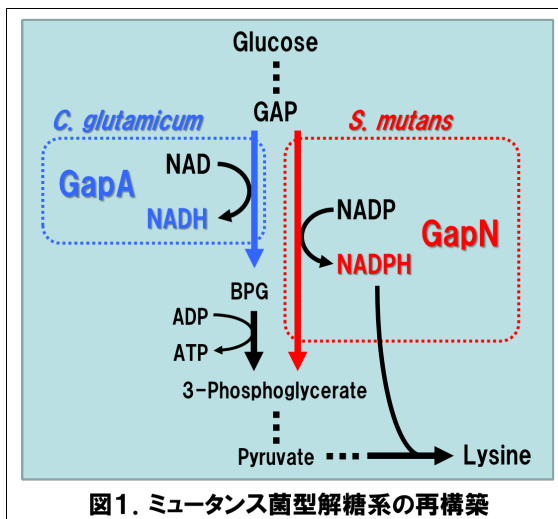


図1. ミュータンス菌型解糖系の再構築

3. 研究の方法

(1) ミュータンス菌の NADP 型 GapN 遺伝子をゲノム上で発現する RE2 株は、自前の NAD 型 GapA 遺伝子との ORF 置換により育種した。

(2) GapA と GapN の両用型宿主 RE2A^{ioi} 株は、上記 RE2 株のゲノムにイノシトール誘導型 GapA 遺伝子を組み込むことにより育種した。

(3) 上記 RE2A^{ioi} 株の評価は、GapA 株 (GapA のみ保有) と RE2 株 (GapN のみ保有) を対照に、各々の宿主にリジン生産用プラスミドを導入して、リジン力価と発酵時間を菌株間で比較することにより行った。

(4) リジン生産試験は、シード培養をグルコース 2%、本培養をグルコース 5%で行い、これを基本条件とした。RE2A^{ioi} 株におけるシード培地へのイノシトール添加は、グルコースとイノシトールの炭素源としての総和が一定になるように調整した。

(5) GapA 株、RE2 株、および RE2A^{ioi} 株におけるペントース-リン酸経路の遮断は、同経路の初段酵素グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼの遺伝子 *zwf* を破壊することにより行った。

4. 研究成果

(1) 対照株 GapA 株 (GapA のみ) と RE2 株 (GapN のみ) のリジン発酵特性：

GapA 株は 25 時間以内に発酵を終了でき、リジンを最大 10%の対糖収率で生産できること (図 2 上)。一方、RE2 株はその約 2 倍以上の生産能を示すも、発酵が 10 時間以上遅延する欠点が認められた (図 2 中)。

(2) GapA と GapN の両用型宿主 RE2A^{ioi} 株のリジン発酵特性：

RE2A^{ioi} 株は、至適条件、すなわち、シード培養に少量のイノシトールを添加する条件で、RE2 株並みの高いリジン収率を維持したまま、発酵時間は GapA 株並に大幅に短縮された (図 2 下)。

(3) 本培養中のイノシトール濃度の推移：

gapA の誘導発現のためシード培養に 0.5 ~ 2%添加したイノシトールは、本培養移行後、濃度が徐々に低下し、その残存期間は予想通り、イノシトール添加量に相関していた。

(4) RE2A^{ioi} 株の発酵過程における *gapA* と *gapN* の発現量推移：

リアルタイム PCR による発現解析の結果、*gapN* の構成発現と、*gapA* のイノシトール依存的発現という期待通りの結果が得られた。従って、イノシトールによる生育改善は、生育期の *gapA* の適切な発現による効果であり、一方、リジン高収率は *gapN* の構成発現による効果であると結論した。

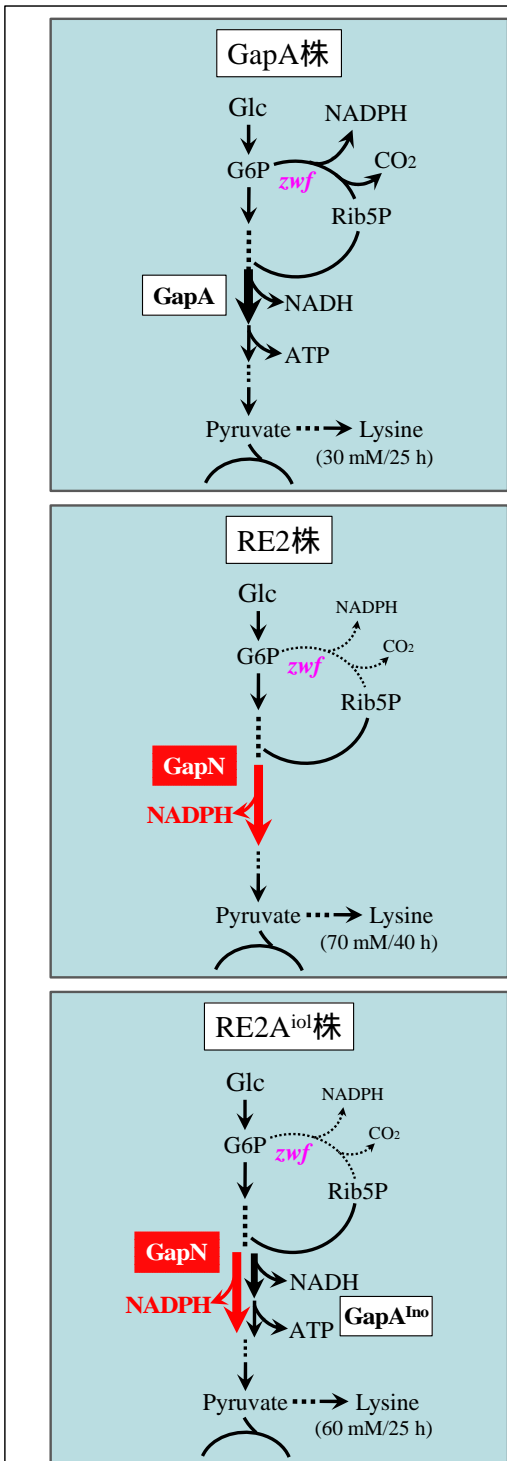


図2. *S. mutans* のレドックス代謝をモデルとした還元力高産生宿主の開発

コリネ菌のGapA株(図上)は、自前のgapAを発現する対照株である。RE2株(図中)は、gapAに代えて*S. mutans*のgapNを発現するGapN発現株である。RE2A^{iol}株(図下)は、RE2株にイノシトール誘導型gapAをゲノムに組み込んで得た宿主で、GapNとGapAの両用型になっている。この菌株では、シード培地へのイノシトール添加量に応じて生育フェーズのGapA活性を制御でき、生育フェーズではGapA依存、生産フェーズでGapN依存になるような条件を設定することができる。これら3宿主にリジン生産用プラスミドを導入してグルコース5%で培養したときのリジン生産量と発酵時間を図に示した。対照株であるGapA株のリジン生産量がペントースリン酸経路の遮断(zwf)によって半減したのに対し、RE2株およびRE2A^{iol}株では同経路を遮断しても高いリジン生産量が維持されていた。

(5) NADPH 産生をペントースリン酸経路でなく解糖系に依存していることの検証:

GapA 株、RE2 株、RE2A^{iol} 株の各々から、ペントースリン酸経路の初段酵素の破壊株(zwf)を造成し、リジン生産への影響を調べた。GapA zwf 株のリジン収率は予想通り、親株(GapA 株)の半分以下に低下したのに対し、RE2 zwf 株とRE2A^{iol} zwf 株のリジン収率は高いまま維持されていた。すなわち、本研究で育種した菌株の高いリジン生産能にペントースリン酸経路の代謝は不要であることが確かめられた。ペントース-リン酸経路に依存しないリジン発酵はこれが初めてである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計5件)

竹野誠記、見村晃紀、三橋 敏、池田正人: ミュータンス菌型のレドックス代謝をもつ還元力高産生コリネ菌の開発、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 27 日、岡山大学

堀 一将、大谷幸子、三橋 敏、竹野誠記、池田正人: 還元力高産生コリネ菌によるペントース-リン酸経路非依存リジン発酵、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 27 日、岡山大学

池田正人: アミノ酸を生み出す菌の作り

方、第3回有用微生物応用研究会、長野市ものづくり支援センター、2013 年 10 月 11 日

Ikeda M: Design of *Streptococcus mutans*-type redox metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. The 13th Swiss-Japanese Joint Meeting on Biotechnology and Bioprocess Development, Walzenhausen, Switzerland, 2012 年 11 月 5 日

Ikeda M: Engineering of Glutamic Acid Bacteria on the model of the unique redox metabolism of Tooth Decay Bacteria. 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS2012), Daegu, Korea, 2012 年 9 月 18 日

〔図書〕(計3件)

池田正人: シーケンス革命がもたらしたコリネ菌育種の新規方法論、シーエムシー出版、生命のビッグデータ利用の最前線、2014、pp129-137

Ikeda M, & Takeno S: Amino acid production by *Corynebacterium glutamicum*. Springer, Microbiology monographs 23, *Corynebacterium glutamicum*. 2013, pp107-147

池田正人: ゲノム情報のコリネ菌育種への展開、シーエムシー出版、微生物を活用した新世代の有用物質生産技術、2012、pp78-85

〔その他〕

ホームページ等

<http://karamatsu.shinshu-u.ac.jp/lab/ferment/index.htm>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

池田 正人 (IKEDA Masato)
信州大学・学術研究院農学系・教授
研究者番号：00377649

(2) 研究分担者

竹野 誠記 (TAKENO Seiki)
信州大学・学術研究院農学系・助教
研究者番号：30422702