

令和元年5月21日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14866

研究課題名（和文）酸素に応答する代謝経路のスイッチング機構の解明と新規バイオプロセスへの応用

研究課題名（英文）Bidirectional switching of carbon flux between glycolysis and pentose phosphate pathway by oxygen level in *Corynebacterium glutamicum*

研究代表者

柘植 陽太 (Tsuge, Yota)

金沢大学・新学術創成研究機構・助教

研究者番号：00647422

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では酸素を代謝スイッチとして用いることで、コリネ型細菌の解糖系とペントースリン酸経路の切り換えに成功した。解糖系とペントースリン酸経路の切り換えは分岐点であるグルコース-6-リン酸を基質とするグルコース-6-リン酸イソメラーゼ遺伝子のプロモーターを置換することで実現した。本代謝スイッチを用いることで、樹脂原料であるカダベリンとコハク酸を好気条件と嫌気条件それぞれ効率的に生産する菌株を作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では酸素という環境因子をスイッチとして用いることで、微生物の中央代謝経路を酸素レベルに応答して自動的に切り換える回路を設計した。本システムを用いることで、樹脂原料として注目されているカダベリンとコハク酸を好気条件下と嫌気条件下で効率的に生産する菌株を作製することに成功した。本システムで確立した代謝スイッチは他の有用化合物の生産にも利用可能であるため、高い汎用性を持つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Controlling carbon flow in the metabolic pathway is critically important for improving production titer and yield in metabolic engineering. When synthesizing target chemicals from glucose, carbon is firstly passed through either glycolysis or pentose phosphate pathway. The split ratio between glycolysis and pentose phosphate pathway largely affects the titer and yield of the target chemicals. Here, we demonstrate that the switching of the carbon flow between glycolysis and pentose phosphate pathway by oxygen level in *Corynebacterium glutamicum*. By using the metabolic switch, cadaverine and succinate were efficiently produced under aerobic and anaerobic conditions, respectively. This approach is a useful and practical strategy to automatically redirect carbon flow into a desirable metabolic pathway using environmental factor as a metabolic switch.

研究分野：代謝工学

キーワード：代謝スイッチ コリネ型細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物による物質生産は発酵食品分野をはじめ、古くから人類の生活に重要な地位を占めている。近年の遺伝子工学技術の発展により、元来、生産できない化合物でも合成生物学的手法により効率的に生産する菌株の作製が可能になっており、21世紀においても微生物による物質生産は産業上重要な地位を占めると考えられる。近年、地球温暖化問題により、石油由来ではなく、植物由来の樹脂原料の生産が望まれており、微生物を改変して効率的に樹脂原料を生産する研究が推進されている。

2. 研究の目的

コリネ型細菌は、グルタミン酸やリジンの生産菌として工業利用されている有用細菌である。本菌はリジン脱炭酸酵素遺伝子 (*ldcC*) の導入により、好気条件下で増殖とともに C5 のジアミンであるカダベリンを生産する。一方、嫌気条件下では、コリネ型細菌は増殖を停止するが代謝活性は維持され、乳酸やコハク酸を生産する。カダベリンはナイロン 6,6 の原料であるヘキサメチレンジアミンの代替化合物として注目されており、コハク酸は既にポリブチレンサクシネートなどの樹脂原料の原料として使用されている重要な樹脂原料である。これまでは両樹脂原料とも独立した生産株で生産されてきたが、効率的なカダベリンとコハク酸生産のためには同一菌株でこれら二つの樹脂原料を生産できることが望ましい。そこで本研究では代謝工学的改変により、好気条件下ではカダベリンを、嫌気条件下ではコハク酸を効率的に生産する菌株の作製を目的とした。

1 分子のカダベリン生産には 4 分子の還元型ニコチンアミドアデニンヌクレオチドリン酸 (NADPH) が必要である。NADPH は主にペントースリン酸経路で合成されるため、好気条件下でより多くの炭素をペントースリン酸経路に流すことが理想的である。そこで本研究では、酸素をスイッチとして用いることで解糖系とペントースリン酸経路の切り換えを行い、好気条件下では解糖系のスイッチを OFF にすることで、より多くの炭素をペントースリン酸経路に流して効率的にカダベリンを生産し、嫌気条件下では解糖系のスイッチを ON にすることでコハク酸を生産するシステムの確立を目指した。解糖系とペントースリン酸経路の切り換えは分岐点であるグルコース-6-リン酸を基質とするグルコース-6-リン酸イソメラーゼ遺伝子 (*pgi*) のプロモーターを置換することで実現した。

3. 研究の方法

カダベリンとコハク酸生産株である親株 (ATCC13032 Δ *ldhA* Δ *pta-ack* Δ *cat* Δ *pqo* *lysC::lysC*^{T3111} *P_{ldhA}::pgi* *P_{trf}::pyc*^{P458S} *icd::icd*^{A1G} Δ *lysE::P_{trf}-ldcC*) を作製した(図 1)。初めにコハク酸生産の際の副生成物である乳酸と酢酸の生合成遺伝子 (*ldhA*, *pta-ack*, *cat*, *pqo*) を欠損させた。リジンのフィードバック阻害解除のため、アスパルトキナーゼ遺伝子に一塩基置換 (*lysC*^{T3111}) を導入するとともに、大腸菌由来のリジン脱炭酸酵素遺伝子 (*ldcC*) を導入した。また、活性増加を目的としてピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子に一塩基置換 (*pyc*^{P458S}) を導入すると共にプロモーター置換により高発現した。さらに活性低下を目的としてイソクエン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子に一塩基置換を導入した (*icd*^{A1G})。最後に *pgi* 遺伝子のプロモーター、好気条件下で発現が抑制され、酸素の欠乏に伴い発現が誘導される乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*ldhA*) のプロモーターで置換した株 (プロモーター置換株) と、*P_{ldhA}-pgi* 遺伝子セットをセカンドコピーとしてゲノム内に導入した株 (セカンドコピー導入株) を作製して生産実験に供した。

カダベリン生産は、フラスコ条件下でグルコースを炭素源とした最少培地を用い、30°C で培養して反応を行った。コハク酸生産は、栄養培地を用いて 30°C で 16 h 培養後、遠心分離、洗菌し、菌体を無機塩培地で 6% の細胞懸濁液を調製した。最後にグルコースを添加して 30°C、pH7.0 で反応を行った。カダベリンとコハク酸、グルコースの測定には、高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用い、細胞内の代謝産物の測定は高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) を用いた。

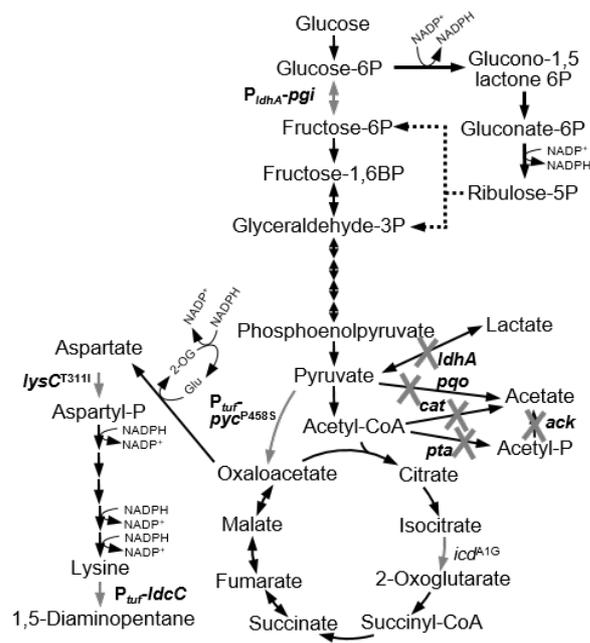


図 1 カダベリン・コハク酸生産のための代謝改変

4. 研究成果

4.1 代謝改変株による化合物生産

代謝改変したカダベリン・コハク酸生産株（親株）を用いてカダベリン、コハク酸を好気条件、嫌気条件下でそれぞれ生産させたところ、それぞれの化合物生産のためののみを施した株と同等の生産量を示した。従って、互いの代謝改変はそれぞれの生産性に影響を及ぼさないことが分かった。

4.2 プロモーター置換株による化合物生産

次に *pgi* 遺伝子のプロモーターを *ldhA* 遺伝子のプロモーターに置換したプロモーター置換株を用いてカダベリン、コハク酸の生産実験を行った。その結果、カダベリン対糖収率は親株より 4.2 倍増加して 0.10 g/g であった（図 2）。一方、コハク酸の生産速度は、親株より 27% 減少した（1.31 g/L h g-CDW; 図 3）。これらの結果から、酸素をスイッチとした代謝経路の切り換えに成功したと考えられた。また、コハク酸の対糖収率は変わらなかったことから、コハク酸生産速度の減少は PGI の酵素活性が不足しているためと考えられた。

4.3 セカンドコピー導入株による化合物生産

プロモーター置換によって減少したコハク酸生産量を回復させるべく、 $P_{ldhA-pgi}$ の遺伝子セットをゲノム中にもう 1 コピー導入したセカンドコピー導入株を作製した。その結果、PGI の比活性は、プロモーター置換株と比較して嫌気条件下で 1.9 倍増加したが、好気条件下でも 1.5 倍増加した（図 4）。コハク酸生産速度は予想通り親株と同等まで回復した（1.77 g/L h g-CDW; 図 3）。一方、カダベリン収率は 27% 減少したが（0.07 g/g）、親株よりは 3.7 倍高い値を保った（図 2）。これらの結果から、*pgi* 遺伝子のセカンドコピー導入によりコハク酸生産速度が回復するまで PGI 比活性は増加した一方で、好気条件下における PGI 比活性の「漏れ」により、解糖系を通過する炭素が増加した結果、カダベリン収率が減少したと考えられた。

4.4 作製株の代謝解析

本研究で作製した 3 株の代謝解析を行った結果、グルコース-6-リン酸の細胞内濃度はカダベリン収率が高い、つまりペントースリン酸経路への炭素流量が多いほど蓄積し、セカンドコピー導入株のグルコース-6-リン酸濃度はプロモーター置換株より 23% 減少したが、親株よりは 3.8 倍高い値を示した（図 5）。従って、コリネ型細菌では解糖系の方がペントースリン酸経路よりも代謝活性が高いと考えられた。また、グルコース-6-リン酸よりも下流の解糖系の代謝産物はグルコース-6-リン酸とは逆に解糖系への炭素流量が多いほど蓄積した。

以上の結果から、*pgi* 遺伝子のプロモーター置換により、解糖系・ペントース

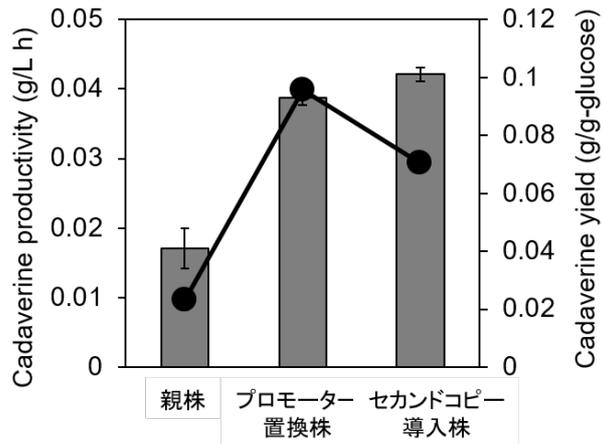


図 2 代謝改変株によるカダベリン生産速度（棒グラフ）とカダベリン対糖収率（折れ線グラフ）

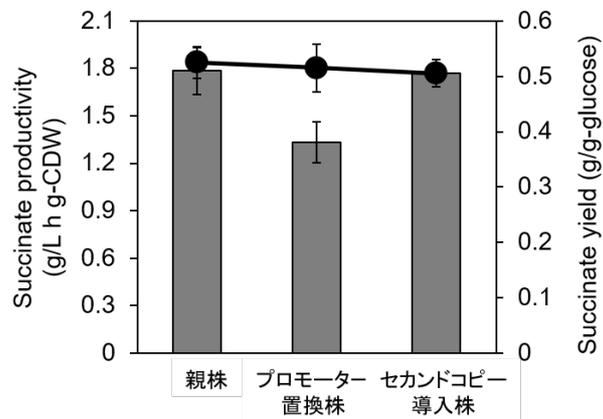


図 3 代謝改変株によるコハク酸生産速度（棒グラフ）とコハク酸対糖収率（折れ線グラフ）

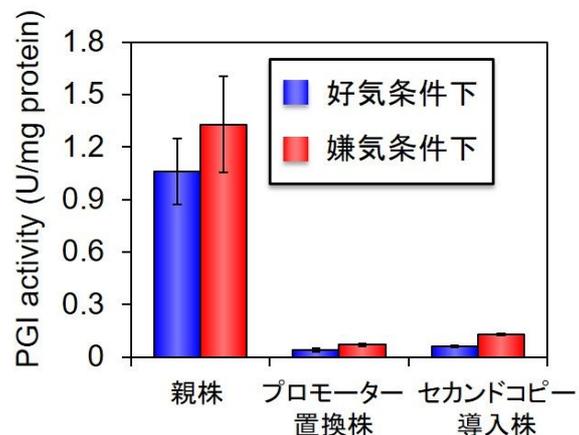


図 4 PGI 比活性

リン酸経路の代謝経路の切り換えに成功した。

本研究では、酸素をスイッチとして代謝経路を切り換えることでコハク酸の生産性を保ちながら、カダベリンの生産性を飛躍的に増加させた。本研究の酸素をスイッチとして同一菌株で二つの化合物を生産するシステムは、他の化合物においても適用可能であると考えられる。今後は、より厳密に酸素による ON/OFF が可能なプロモーターの探索が必要である。

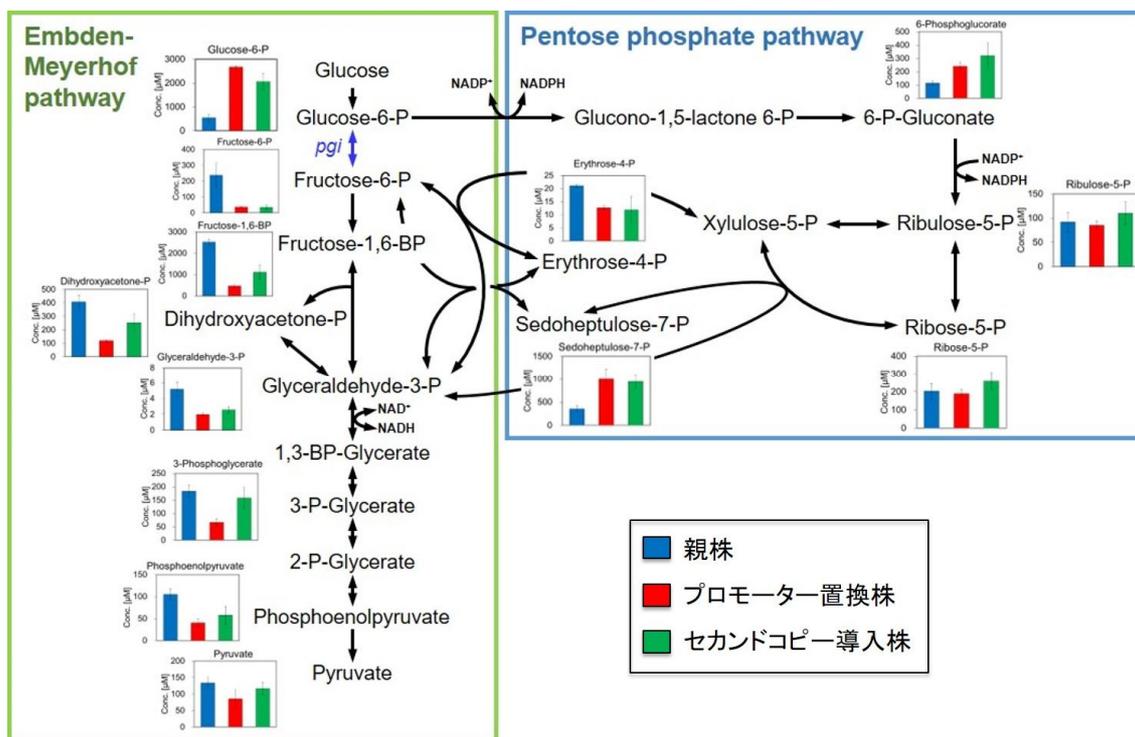


図5 代謝解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Tsuge Y, Kato N, Yamamoto S, Suda M, Jojima T, Inui M Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for hyper production of polymer grade L- and D-lactic acid. Applied Microbiology and Biotechnology, 103:3381–3391 (2019) DOI: 10.1007/s00253-019-09737-8

Tsuge Y, Kato N, Suda M, Inui M Enhanced production of D-lactate in *Corynebacterium glutamicum* from a mixture of glucose and xylose overexpression of glycolytic genes encoding phosphofructokinase and triosephosphate isomerase. Journal of Bioengineering and Biotechnology, 127:288–293 (2019) DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.08.002

小林 俊介、柘植 陽太
酸素をスイッチとした二つの樹脂原料の微生物生産
月刊アグリバイオ (2018) 2:70–72

柘植 陽太
増えるために食べる～細胞増殖と中央代謝の接合点～
生物工学会会誌, 96 (5):272 (2018)

水野 光、柘植 陽太
有機酸生産におけるコリネ型細菌の耐熱性
月刊アグリバイオ (2017) 1:91–93

〔学会発表〕(計6件)

Shunsuke Kobayashi, Katsuki Murai, Hideo Kawaguchi, Kazuaki Ninomiya, Kenji Takahashi, Akihiko Kondo, Yota Tsuge

Bidirectional switching of carbon flow between glycolysis and pentose phosphate pathway by oxygen level in *Corynebacterium glutamicum*

The 10th International Symposium of Innovative BioProduction Kobe、神戸、2019年1月24-25日

小林俊介、村井克輝、川口秀夫、仁宮一章、荻野千秋、高橋憲司、近藤昭彦、柘植陽太
酸素をスイッチとしたコリネ型細菌中央代謝経路の切り換え

第11回北陸合同バイオシンポジウム、富山、2018年10月26-27日

小林俊介、岩崎還帰、川口秀夫、仁宮一章、荻野千秋、高橋憲司、近藤昭彦、柘植陽太
酸素をスイッチとしたコリネ型細菌中央代謝経路の切り替え

日本農芸化学会2018年度大会、名古屋、2018年3月15-18日

小林俊介、岩崎還帰、川口秀夫、仁宮一章、荻野千秋、高橋憲司、近藤昭彦、柘植陽太、
酸素を代謝スイッチとした二つの樹脂原料の微生物生産

第10回北陸合同バイオシンポジウム、富山、2017年11月10-11日

柘植陽太、川口秀夫、近藤昭彦
酸素をスイッチとした二つの樹脂原料の微生物生産
化学工学会金沢大会、金沢、2017年12月7日

小林俊介、柘植陽太、岩崎還帰、川口秀夫、仁宮一章、荻野千秋、高橋憲司、近藤昭彦
酸素をスイッチとした二つの樹脂原料の個別生産

第69回日本生物工学会、東京、2017年9月11-14日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
<https://sites.google.com/site/ytsugelab/>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。