

PDF issue: 2025-07-11

大腸菌を用いたシキミ酸経路誘導体の高収率生産技 術の開発

藤原, 良介

<mark>(Degree)</mark> 博士(工学)

(Date of Degree) 2020-03-25

(Date of Publication) 2022-03-25

(Resource Type) doctoral thesis

(Report Number) 甲第7771号

(URL) https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007771

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

大腸菌を用いたシキミ酸経路誘導体の

高収率生産技術の開発

2020年1月

神戸大学大学院工学研究科

藤原良介

目次

緒言3	
Ⅰ バイオマス資源	3
II 大腸菌 Escherichia coli について	5
Ⅲ 芳香族化合物	5
IV 本研究の目的と内容	9
第一章:タンパク質融合技術を用いたシキミ酸経路誘導体の生産量向上11	
1-1 緒言	11
1-2 実験結果及び考察	12
1-2-1 MA 生産経路候補の選別	12
1-2-2 経路1及び経路3の最適化	13
1-2-3 融合タンパクの発現による MA 生産量の向上	13
1-2-4 pH 調整による培養条件の最適化及びジャーファーメンターによる MA 生産	14
1-3 結言	15
1-4 実験方法	16
1-5 図表	
第二章:"Parallel Metabolic Pathway Engineering"によるシキミ酸経路誘導体の高生産	38
2-1 緒言	38
2-2 実験結果及び考察	39
2-2-1 平行代謝経路(Parallel Metabolic Pathway)のデザイン	39
2-2-2 CFT5 への Dahms 経路の導入	40
2-2-3 解糖系及び PPP から TCA サイクルへの炭素流入の遮断	40
2-2-4 Dahms 経路の導入によるグルコース-キシロース混合糖での増殖能力の再獲得	42
2-2-5 PMPE 株の代謝解析	42
2-2-6 PMPE 株によるグルコース-キシロース混合糖からの MA 生産	43
2-2-7 ¹³ C 標識化グルコースによる MA 生産株の炭素フラックス解析	44
2-2-8 PMPE 株による MA 生産のための培養条件検討	45
2-2-9 PMPE 株による好気及び微好気条件下での Tyr 生産	46
2-2-10 非シキミ酸経路代謝物への PMPE の応用	47
2-3 結言	49
2-4 実験方法	50
2-5 図表	55
第三章:細胞表層工学によるシキミ酸経路の強化	
3-1 緒言	87
3-2 実験結果及び考察	89
3-2-1 BGL のペリプラズム局在化による Phe 生産量向上	89
3-2-2 BGL 発現量の変化が Phe 生産に与える影響	90

3-2-3 不活性化 BGL が Phe 生産に与える影響	
3-2-4 PTS 破壊株における BGL のペリプラズム局在化の影響	
3-2-5 BGL のペリプラズム局在化に関与する PTS 関連遺伝子の同定	
3-2-6 BGL のペリプラズム局在化に関与する代謝物の探索	
3-2-7 G6P による BGL の活性阻害	
3-2-8 G6P 補足タンパク質のペリプラズム局在化による Phe 生産量の向上	
3-2-9 BGL のペリプラズム局在化による Tyr 生産量の向上	
3-3 結言	
3-4 実験方法	
3-5 図表	101
総括 1	13
参考文献 1	14
謝辞1	19

緒言

| バイオマス資源

I-I 化石資源依存型社会からの脱却

石油や石炭、天然ガスなどの化石資源はエネルギー生産や有機化合物生産の原料として広く 利用されている。産業革命以降、これらの化石資源の利用は我々の生活に大きな変化と恩恵をも たらした一方で、地球全体での物質循環のバランスを崩し、大気中の CO₂濃度の上昇などの環境 問題を引き起こした。世界人口の増加や近代化に伴い、これらの地球規模の環境問題は深刻化し ている。化石資源依存型の社会から脱却し、持続可能な社会の構築に向け、再生可能資源による エネルギー生産、有機化合物生産を実現する技術の構築は急務である。

I-II 再生可能資源

再生可能資源とは、人間の利用速度を上回る速度で自然から補給されるエネルギー及び物 質の総称である。再生可能資源は、自然現象により供給される太陽光、風力、水力、潮汐、地熱な どの一次的なエネルギーだけでなく、それらを利用して生産される、生物に由来する有機化合物 (バイオマス資源)も含まれる。電力などのエネルギーは、前述の一次的なエネルギーを直接利用 することで供給が可能である(風力発電、太陽光発電等)。一方、ジェット燃料等の高エネルギー 化合物や、化成品原料を再生可能資源から生産する場合、バイオマスを原料として微生物による発 酵を利用して生産することで、持続可能な生産プロセスが構築可能である(図1)。



図| 炭素循環サイクルの模式図

I-III バイオマス資源

現在、地球上には、森林や海洋をはじめとする広範な地域にわたって膨大な量のバイオマス がストックとして存在し、世界の陸上の総バイオマス量は乾重量で約 1.8 兆トン、海洋中に約 40 億トン、土壌中にも陸上バイオマスに匹敵する量のバイオマスが賦存している。陸上の総バイオマ ス量をエネルギー換算すると 33,000 EJ (EJ=10¹⁸J)となり、世界の年間エネルギー消費量の 80 倍以上に相当する。また、地球上では光合成によって常に新たなバイオマスがフローとして生産さ れている。その年間の純一次生産量は陸上で約 1,150 億トン、海洋で約 550 億トンであり、エネ ルギー換算すると世界の年間エネルギー消費量の 10 倍近くになる¹。ここで試算された総バイオ マス量には、人間を含む生物の食料として利用される生物資源や、その他の用途で既に利用されて いる生物資源も含まれるため、実際の利用可能量はより少なくなる。しかしながら、相当量のバイ オマスが未利用な状態で存在していることには変わりなく、他の再生可能資源と組み合わせるこ とで持続可能なエネルギー・物質生産プロセスの構築は可能であるといえる。

I-IV リグノセルロース系バイオマス

地球上に存在するバイオマスのうち、光合成により大気中の炭素を固定化する植物は、その 存在量や生産性の高さから、エネルギー生産や物質生産の資源として最も適していると考えられる。 植物由来のエネルギー生産の事例として、サトウキビ等の糖質原料やトウモロコシ等の澱粉質原 料を発酵・蒸留して生産されるバオエタノールが有名である。バイオエタノールは 2000 年代に国 際原油価格の高騰により、石油代替エネルギーとして世界中で導入・普及が進められた。しかしな がら、サトウキビやトウモロコシを原料として利用するため、食糧と競合するといった問題が存在 する。一方、植物の細胞壁を構成する成分は非可食であり、食糧との競合が発生しないため、有用 物質生産の原料としての利用が期待される。植物の細胞壁は主にセルロース、ヘミセルロース、リ グニンから構成されており、これらを主な構成要素とするバイオマスを、リグノセルロース系バイ オマスと呼ぶ。セルロース、ヘミセルロースは糖を構成単位とした高分子(多糖)であり、リグニ ンはフェノールを構成単位とする芳香族ポリマーである。物質生産の原料としてのリグノセルロー ス系バイオマスでは、微生物が利用可能な糖で構成されるセルロース、ヘミセルロースが特に重 要となる。セルロースはグルコースがβ-1.4-結合により直鎖状に結合した構造を持ち、分解物と してグルコースが得られる。ヘミセルロースは、細胞壁多糖のうちセルロースとペクチンを除くア ルカリ可溶性の成分の総称であり、植物によりその成分及び比率は異なる。キシランは最も多く 存在しているヘミセルロースであり、キシロースがβ-1,4-結合により直鎖状に結合した主鎖に、 様々な糖からなる側鎖が結合した構造を持つ²。



図 II 物質生産の原料としてのリグノセルロース系バイオマス

|| 大腸菌 Escherichia coli について

大腸菌は地球上でもっとも解析が進み、生物学的知見の蓄積がもっとも大きい生物の一つ である。大腸菌自体は1885年に発見された腸内細菌である。1930年代にはバクテリアの代謝に 関する研究に利用され、その後遺伝子の実体がDNAであること、性接合の存在と遺伝学が可能で あることが示されたことで大腸菌を用いた研究が急加速した。1973年にはDNA断片をプラスミ ドベクターに組み込み大腸菌を形質転換することに成功し、*in vitro*でのDNA操作が可能となっ た。1997年には日本で大腸菌K-12株の全ゲノム構造を明らかにすることに成功した。その後、世 界と共同で確認作業を進め、配列決定後も日米欧の共同作業により遺伝子アノテーション作業が 進められた。これらの作業により集められた情報はデータベース化され、現在では誰でもアクセ スできるようになった。また、大腸菌は工業的利用にも成功した生物種である。最初に遺伝子組 換えが利用された製品は、大腸菌で作製されたヒトインスリンである。1977年にはヒトインスリ ンの遺伝子が、1979年にヒト成長ホルモンの遺伝子が続けて大腸菌でクローン化され、遺伝子工 学による創薬が始まった。現在では、医薬品のほかにもアミノ酸など、様々な有用物質生産の宿 主として大きく活用されている³。

Ⅲ 芳香族化合物

III-I 芳香族化合物の用途と需要

芳香族の代表的な化合物にはベンゼン、トルエン、キシレンがあり、それぞれの頭文字をと って BTX と呼ばれる。ベンゼンは基礎化学原料として様々な用途で用いられる化合物である。 ベンゼンとエチレンから得られるスチレンは、合成樹脂や合成ゴムの原料として欠かすことはで きない。また、ベンゼンを還元しシクロヘキサンとした後にシクロヘキサンからε-カプロラク タムやアジピン酸、ヘキサメチレンジアミンを生成し 6-ナイロンや 6,6-ナイロンの原料として 利用されている。他にもフェノールや無水マレイン酸等の様々な化合物の出発原料として利用さ れており、その用途は多岐にわたる。トルエンは溶剤として利用されるほか、それ自身の需要が 比較的低いことからベンゼンやキシレンの原料としても利用される。キシレンには *o*-キシレン、 *m*-キシレン、*p*-キシレン、エチルベンゼンの 4 つの構造異性体が存在し、それらの混合物(混 合キシレン)は溶剤として広く利用されている。それぞれの異性体に分離生成したものは様々な 化合物の化学原料として利用されている。2015 年における世界のベンゼン、トルエン、キシレ ンの需要実績は、それぞれ 43.3 百万トン、20.1 百万トン、35.1 百万トンであった。BTX の需 要は今後も増加していくと見込まれている⁴。

III-II 芳香族化合物の工業生産

歴史的に、芳香族化合物の生産は石炭を乾留してコークスを得る際に副産物として生成され

るコールタールを原料として始まった。コールタールには、複数の芳香族化合物が含まれており、 これを分離精製することで様々な芳香族化合物を得ることが出来た。19世紀後半、自動車が普 及し始めるとともにガソリンに対する大量需要が生まれ、それに付随して20世紀前半からは炭 化水素原料の主役も石炭から石油へとシフトしていった。芳香族化合物も、粗ガソリンから分離 精製する技術が確立されたことで、石油化学による生産が主流となった。現在では、主に次の2 つの方法により芳香族化合物が生産されている: ① エチレン生産工程で得られる副産物(分解 ガソリン)からの抽出 ② 改質ガソリンの生産の際に副生する改質油からの抽出。分解ガソリン は芳香族炭化水素濃度が高いので、共沸蒸留によってベンゼンを精製できる。また、抽出蒸留に よって芳香族炭化水素濃度をさらに高めたあとベンゼン、トルエンなどを精製することもでき る。改質油は、分解ガソリンに比べて芳香族炭化水素濃度が高くないため、まず溶剤抽出法によ って改質油から芳香族炭化水素だけを抽出し、その後精製する⁵。このように、現在に至るまで、 芳香族化合物生産の原料は化石資源に依存しており、化石資源依存型社会からの脱却にはバイ オベースでの芳香族化合物(及びその誘導体)の生産技術の開発が必須である。

|||-||| 芳香族化合物の微生物による生産

天然に存在する芳香族化合物として最も一般的であるのは、芳香族アミノ酸である L-フェ ニルアラニン(Phe)とL-チロシン(Tyr)、L-トリプトファン(Trp)であろう。これらの芳香 族アミノ酸は、シキミ酸と呼ばれる六員環炭素骨格を有する中間体を経る共通の代謝経路から 合成される。この経路はシキミ酸経路と呼ばれ、芳香族アミノ酸だけでなく、様々な芳香族化合 物の生合成に利用される重要な代謝経路である。例えば、植物中のリグニンも、シキミ酸経路を 経て合成されるモノリグノールが重合することで形成される。シキミ酸経路は、ホスホエノール ピルビン酸(PEP)とエリトロース-4-リン酸(E4P)が 3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプツロソン 酸 7-リン酸(DAHP)シンターゼにより縮合され DAHP を生じる反応から開始する。大腸菌に は、3 つの異なる DAHP シンターゼのアイソザイム(AroF、AroG、AroH)が存在し、それらは aroF、aroG、aroHの3つの遺伝子にコードされている。AroF、AroG、AroH はそれぞれ Phe、 Tyr、Trp による負のフィードバック阻害を受けることにより、シキミ酸経路の開始反応が調節 されている。DHAP は 3-デヒドロキナ酸 (DHQA) シンターゼにより DHQA となり、次に DHQA は DHQA デヒドラターゼにより 3-デヒドロシキミ酸(DHSA)に変換される。DHSA はシキミ 酸デヒドロゲナーゼによりシキミ酸へと変換され、その後 3 つの酵素反応によりコリスミ酸が 生成される。コリスミ酸はシキミ酸経路における最終代謝物であり、コリスミ酸から芳香族アミ ノ酸合成経路を含む様々な代謝経路へと分岐する(図 Ⅲ)。芳香族アミノ酸等の生成物によるフ ィードバック阻害の解除は、芳香族化合物の生産量を向上させるための戦略として一般的であ る。前述の DAHP シンターゼではアミノ酸変異導入により、芳香族アミノ酸によるフィードバ ック阻害を解除できることが知られており、この変異体を大腸菌に過剰発現させることでシキ

ミ酸経路を強化することが出来る。



図Ⅲ 大腸菌のシキミ酸経路 概略図

III-IV 微生物による L-フェニルアラニン生産

III-III で述べたように、Phe は生物にとって最も身近な芳香族化合物の一つである。Phe は産業的に医薬品や食品添加物として広く使用されており、特に低カロリーの甘味料であるアス パルテームの原料として重要である。アスパルテームの需要は増加傾向にあり、年間 30,000 ト ン以上の Phe が必要とされている⁷。また Phe は、抗炎症薬、中枢神経系神経ペプチド、HIV プ ロテアーゼ阻害剤などの薬学活性を有する化合物の製造に広く使用されている[®]。更に、Phe は 様々な芳香族代謝物の前駆体としても重要である。Phe をフェニルアラニンアンモニアリアーゼ により脱アミノすることで桂皮酸が得られ、更に桂皮酸をプレフェン酸デヒドロゲナーゼにより 脱炭酸することでスチレンが得られる。スチレンは芳香族ポリマーの主要な原料であり、ポリス チレン(スチロール)やスチレンブタジエンゴムとして広く利用されており、工業的に極めて重 要である⁹。そのため、Phe の生産性の向上は、スチレンを含む Phe 誘導体の生産技術向上にも 大きく寄与すると考えられる。Phe の生産性向上のために最もよく用いられる手法は、III-III で も述べたフィードバック阻害の解除である。DAHP シンターゼにおける 147 番目から 149 番目、 およびその隣接領域のアミノ酸残基は、各 DAHP シンターゼのアロステリック制御に関与してい ると考えられている。Tyr によってフィードバック阻害を受ける DAHP シンターゼである AroF では、148 番目のプロリン残基および 152 番目のグルタミン残基の点変異により Tvr によるフィ ードバック阻害が解除される。同様に AroG では 146 番目のアスパラギン酸残基および 150 番目 のプロリン残基、AroH では 147 番目のバリン残基および 149 番目のグリシン残基の点変異によ り、それぞれ Phe 及び Trp からのフィードバック阻害を解除することができる¹⁰。これらの変異 を加えた DAHP シンターゼの利用により、シキミ酸経路の炭素フラックスが増大し、Phe 収率が 向上する。また、シキミ酸経路以降の代謝を最適化することでも、Phe の生産性が向上されてい る。一般的な手法の一つとして、コリスミ酸から Phe を合成する最初の反応を触媒するコリスミ 酸ムターゼ/プレフェン酸デヒドラターゼ(PheA)の強化がある。PheA は生産物である Phe に よってフィードバック阻害を受けるため、これを解除することで Phe への代謝が強化される。こ

7

れにより、副産物である Tyr 及び Trp への炭素フラックスの流出を防ぎ、Phe の生産量を向上す ることが出来る¹¹。より単純な戦略としては、Tyr や Trp の合成経路の破壊がある。Takagi 氏ら は、Tyr 要求性大腸菌にフィードバック阻害を解除した AroF 及びフィードバック阻害を解除した PheA を過剰発現させた株を構築し、フェドバッチ培養の条件を最適化することで、グルコース を基質として 405 g/L の Phe を生産することに成功している¹²。

III-V 微生物による cis,cis-ムコン酸生産

cis,cis-ムコン酸(MA)は2つの炭素-炭素二重結合を持つ炭素数6のジカルボン酸であり、 MA の二重結合に水素を付加することでアジピン酸が得られる。アジピン酸は様々な化成品の原 料として利用される重要な化合物であるが、特に 6,6-ナイロンの原料としての需要が大きく、2016 年ではアジピン酸の総消費量の約57%を占めている。現在、生産されるアジピン酸のうち、その 半分以上はシクロヘキサンを原料としており、シクロヘキサンを酸化させてシクロヘキサノンと シクロヘキサノールの混合物(KA オイル)とした後に、これを硝酸酸化することで生産されてい る。アジピン酸の需要は年々増加しており、今後も増加していくと見込まれている^{13,14}。近年、化 石資源依存から脱却し持続可能な社会の構築を目指し、アジピン酸の微生物による発酵生産技術 の開発が注目を集めている。Yu 氏らは、アセチルコエンザイム A(アセチル CoA)とスクシニル CoA を出発原料とするアジピン酸合成経路を大腸菌に導入することで 10g/L のグルコースを原料 として 639 ± 34 μg/L のアジピン酸生産に成功した¹⁵。また、Cheong 氏らは同様にアセチル CoA とスクシニル CoA を出発原料とする別の代謝経路を構築することで、2.5 g/L(モル収率 4.1%) のアジピン酸を生産することに成功している¹⁶。しかしながら、これらの代謝経路を用いたアジピ ン酸生産は、収率が低いため大規模生産には適していない。我々は、アジピン酸の前駆体として MA に注目した。MA は、*Pseudomonas putida や Klebsiella pneumoniae* 等の微生物が持つ芳香族 化合物分解経路の中間体として存在する。Niu 氏らは微生物によって生産された MA を触媒反応に おいて水素化し、アジピン酸を生産することに成功しており、MA はバイオ由来ナイロンの原料と して期待されている¹⁷。また、MA はアジピン酸だけでなくポリエチレンテレフタレートの主原料 背あるテレフタル酸の前駆体でもあり、MA の生産技術の開発は、化成品生産プロセスのバイオシ フトに大きく寄与すると言える^{18,19}。 微生物による MA 生産は、これまでに様々な報告がなされて いる。これらの先行研究では多様な代謝経路によって MA が生産されているが、そのすべてがシ キミ酸経路の中間体である DHSA もしくは最終産物であるコリスミ酸を出発原料としている ²⁰⁻²³。 そのため、シキミ酸経路の強化は、MA の生産性向上のために最もよく用いられる戦略である²⁰⁻ 23

8

IV 本研究の目的と内容

本研究では、シキミ酸経路を経て合成される化合物(シキミ酸経路誘導体)の生産量及び収 率の向上を目指し、多角的なアプローチを用いてその実現を試みた。微生物による芳香族化合物 生産に関して、シキミ酸経路の強化に焦点を当てた研究は数多く存在する²⁴。シキミ酸経路誘導体 の収率を向上させるためには、シキミ酸経路そのものの強化だけでなく、より上流もしくは下流 の代謝経路の最適化や、細胞が持つ代謝調節機構の理解及び応用が必要となる。本研究では、大腸 菌を宿主として用い、シキミ酸経路誘導体の生産に適した代謝をデザインするため、タンパク質工 学、代謝工学、細胞表層工学等の多角的な視点から検討を行った。

IV-I 第一章:タンパク質融合技術を用いたシキミ酸経路誘導体の生産量向上

本章では、タンパク質工学の技術を用いて、目的化合物である cis, cis-ムコン酸(MA)の生 産量向上を試みた。MA は、コリスミ酸もしくは DHSA を出発原料として合成されるシキミ酸経 路誘導体である。シキミ酸経路の最終生成物であるコリスミ酸は、様々な代謝経路の出発物質と して利用される化合物であり、代謝の分岐点となっている。競合する代謝経路でコリスミ酸が利用 されることが、目的化合物(MA)の生産量および収率の低下の一因となっている。しかしながら、 これらの競合代謝経路は細胞の増殖・維持に必須な代謝物の合成に関わるため、破壊することが 出来ない。そこで、タンパク質工学的手法により目的の代謝経路への炭素フラックスの増加を試 みた。連続する二つの反応を触媒する二種のタンパク質を人工的に融合し、大腸菌内に発現させる ことで、競合代謝経路を破壊することなく目的の代謝経路を強化した。この手法を用いることで、 MAの生産量及び収率を向上させることに成功した。

IV-II 第二章: "Parallel Metabolic Pathway Engineering"によるシキミ酸経路誘導体の高生産

第一章では、シキミ酸経路より下流、すなわちコリスミ酸を出発物質とする代謝経路を最適 化することによって、目的生産物である MA の生産量に向上した。本章ではシキミ酸経路より上 流、すなわち解糖系とペントースリン酸経路 (PPP) からシキミ酸経路へと流れる炭素フラックス の向上により、シキミ酸経路誘導体の生産量向上を目指した。シキミ酸経路は PEP と E4P を出発 化合物としているが、シキミ酸経路の強化においては PEP の利用可能性を向上させることが重要 である。PEP はシキミ酸経路だけでなく、トリカルボン酸サイクル (TCA サイクル) で利用され るピルビン酸やオキサロ酢酸 (OAA) の原料としても利用される。先行研究においても、PEP がピ ルビン酸や OAA へと変換される諸反応を破壊することでシキミ酸経路を強化する戦略が行われて きた。しかしながら、PEP から TCA サイクルへと流れる代謝経路を完全に破壊すると、グルコー スやキシロースなどの糖を炭素源として増殖することが出来なくなる。この章では、グルコース及 びキシロースを、それぞれ完全に分離された二つの代謝経路の基質として利用する戦略(Parallel Metabolic Pathway Engineering, PMPE) により、PEP の利用可能性の向上と細胞増殖の両立を 試みた。PMPE を実現するには、グルコースとキシロースが異なる代謝経路で異化される必要が ある。しかしながら、元来大腸菌が保有しているグルコース及びキシロースの異化経路は、どちら も解糖系もしくは PPP を経るため、これらの糖を異なる代謝経路で利用することは出来ない。こ の問題を解決するため、貧栄養細菌である *Caulobacter crescentus* が持つキシロース異化経路 (Dhams 経路)に着目した。Dahms 経路では、解糖系及び PPP を経ることなく、キシロースか らピルビン酸とグリオキシル酸が生成される。PEP から TCA サイクルへと流れる代謝経路を完全 に破壊した大腸菌に Dahms 経路を導入することにより、グルコースを MA 生産に利用し、キシロ ースを細胞増殖及び維持に利用する、PMPE 株を構築した。この PMPE 株を用いることで、MA の生産量及び収率の向上に成功した。また PMPE 株の利用により、シキミ酸経路誘導体だけでな く、解糖系の中間体から派生する化合物である 1,2-プロパンジオールの収率の向上にも成功した。

IV-III 第三章:細胞表層工学によるシキミ酸経路の強化

第一章、第二章ではタンパク質工学ならびに代謝工学的手法を用いてシキミ酸経路誘導体 (MA)の生産量の向上に成功した。これらの手法は、目的化合物の生産に関わる代謝経路を改変 しており、直接的な手法といえる。一方で細胞の代謝は、様々な低分子化合物や、代謝調節因子と して働くタンパク質等の要素によって複雑に調整されている。これらの調節因子の働きは、微生物 による物質生産にも大きな影響を与えると考えられるが、未だに解明されていない調整機構や、発 見されていない調製機構が存在する。そのため、未知の代謝調節機構の解明やその応用は、バイオ プロダクションにおいて非常に重要な課題である。本章では、細胞表層の環境を変化させること で、シキミ酸経路が強化される現象を見出し、その機構に関連する要素を探索した。β-グルコシ ダーゼ(BGL)はセロビオースやセロオリゴ糖を加水分解し、グルコースを生じる酵素である。セ ロビオースはグルコース2分子がβ-1,4-結合した二糖であり、同様にグルコースが3分子以上か らなるものがセロオリゴ糖である。BGL を細胞表層に発現させることによって、大腸菌はセロビ オースやセロオリゴ糖を炭素源として利用することができる。この技術を用いてセロビオース等 から様々な有用物質が生産されている。過去の報告において、BGL を細胞表層に発現(局在化) させた際に代謝物の生産量が変化する現象は確認されていたが、その機構は未知であった。本章で はシキミ酸経路の代表的な誘導体である Phe の生産量を指標として、細胞表層への BGL の局在化 による影響を調べた。BGL を細胞表層に局在化させた大腸菌では、発現させていない大腸菌と比 較して Phe の生産量が有意に増加した。また、グルコースの取り込み機構であるホスホトランス フェラーゼシステム (PTS システム)を構成する膜貫通タンパク質である EIICB^{Glc}を破壊した大腸 菌では、BGL の表層発現による Phe の生産量向上が確認されなかった。また、BGL が G6P によ って阻害を受けることや、BGL だけでなくグルコース 6-リン酸(G6P)に基質特異性を持つ酵素 の不活化変異体を細胞表層に発現させることでも Phe 生産が向上することなどから、G6P がこの 現象において重要な因子であることが示唆された。

第一章:タンパク質融合技術を用いたシキミ酸経路誘導体の生産量向上

1-1 緒言

本章では、シキミ酸経路誘導体のモデル化合物として cis,cis-ムコン酸(MA)を選択した(図 1)。大腸菌を宿主とした MA 生産では、DHSA もしくはコリスミ酸を出発化合物とした、複数の MA 生産経路が報告されているが、どちらの出発原料もシキミ酸経路の中間体及び最終化合物であ る。そのため、MA の生産量増加にはシキミ酸経路の強化が必須である。代表的な MA 生産経路を 図 2 に示す。経路1では出発原料であるコリスミ酸からサリチル酸を経て、サリチル酸 1-デヒド ロゲナーゼ (NahG) とカテコール 1,2-ジオキシゲナーゼ (CatA) によって MA が生産される。経 路 2 では、コリスミ酸から 4-ヒドロキシ安息香酸 (PHB) を経てプロトカテク酸 (PCA) を生成 し、PCA が PCA デカルボキシラーゼ (AroY) 及び CatA により MA へと変換される。経路 3 では DHSA を出発原料とし、DHSA デヒドラターゼ (AroZ) 及び AroY、CatA により MA を生産する。

我々の研究グループでは、これまでにシキミ酸経路を強化した大腸菌株(CFT5)の構築に 成功している²³。CFT5 は、*E. coli* ATCC31882 株を親株として構築された。ATCC31882 株は、 Phe を高生産するために、シキミ酸経路における芳香族アミノ酸によるフィードバック阻害を解 除する変異が加えられている。また、Tyr 及び Trp の合成経路を破壊する変異が加えられており、 シキミ酸経路からの炭素フラックスが Phe 生産へと流れるように設計されている

以下に、ATCC31882 からの CFT5 の構築手順を簡単に示す。まず、ATCC31882 の PTS シ ステムを破壊した。ATCC31882 を含む大腸菌は PTS システムにより、グルコースを含む様々な糖 を細胞内に取り込む。PTS システムでは、1 モルのグルコースを取り込む際に1 モルの PEP がピ ルビン酸へと変換される。この反応による PEP の消費を防ぐため、ATCC31882 の PTS システム をガラクトースパーミアーゼ (GalP) 及びグルコキナーゼ (Glk) からなる GalP/Glk システムに 置換した。GalP/Glk システムでは、GalP により細胞内にグルコースが取り込まれた後、Glk によ りグルコースに ATP 由来のリン酸基が付与され G6P となる。次に、ATCC31882 が保有するピル ビン酸キナーゼを破壊することで、PEP の利用可能性を向上させた。ピルビン酸キナーゼは 1 モ ルの PEP から ATP とピルビン酸をそれぞれ 1 モル生成する反応を触媒する酵素である。大腸菌内 在のピルビン酸キナーゼは *pykA*及び *pykF*と呼ばれる遺伝子にコードされている。これら 2 遺伝 子を破壊し、シキミ酸経路で利用可能な PEP の量を向上させた。更に、シキミ酸経路から Phe へ の炭素フラックスを抑えるために、コリスミ酸ムターゼをコードする遺伝子 *pheA*を破壊した。以 上の変異を加えた大腸菌株が CFT5 であり、本章では CFT5 をプラットフォーム株とした(図 1)。

本章では、融合タンパク質を用いて目的化合物である MA の生産量向上を目指した。融合 タンパク質とは、二つの異なるタンパク質(酵素)を人工的に融合させ、一つのタンパク質として 発現させたものを指す。融合タンパク質を微生物に発現させることで、目的の代謝経路への炭素 フラックスを増加させ、競合する代謝経路への炭素フラックスを減少させることが可能となる。 このような代謝の制御技術を代謝チャネリングと呼び、代謝チャネリングは微生物による様々な 有用物質生産に応用されている。融合タンパク酵素を構築するには大きく二種類の方法がある。一 つは、特定のアミノ配列を認識してタンパク質同士を連結する酵素(ソルターゼ)の働きによって、 二つのタンパク質を融合する方法である²⁵。この方法では、タンパク質に翻訳された後に融合され るため、正しくフォールディングされた酵素同士を融合でき、それぞれの酵素が失活しにくいとい った利点がある。もう一つの方法として、遺伝子レベルでの融合がある。目的の酵素をコードした 2 つの遺伝子配列を、酵素同士の繋ぐペプチド(リンカー)をコードした DNA 配列を挟んで、連 続して並べることで、一つのタンパク質として転写・翻訳させる手法である²⁶。この方法では、DNA の時点で一つの融合タンパク質としてコードされているため、これを転写・翻訳するだけで融合タ ンパク質を発現できる。転写・翻訳の時点で融合されているため、正しくフォールディングされず に一方または両方の酵素が失活してしまう恐れはあるものの、ソルターゼを用いる手法よりも単 純で操作が簡単である、融合されていない各酵素を発現する可能性が無い、といった利点がある。 本章では、遺伝子レベルでの融合を用いて MA 生産経路の 2 つの酵素を融合タンパク質として発 現させることで、MA の生産量向上を試みた。

1-2 実験結果及び考察

1-2-1 MA 生産経路候補の選別

CFT5 に最適な MA 生産経路を選別するため、経路 1、経路 2、経路 3 の各 MA 合成経路に よる MA 生産を評価した。実験方法 1-4 に従い、経路1及び経路 2、経路 3 の各遺伝子群を発現 する3種のプラスミドを構築し、それぞれCFT5に導入することでCFT51a、CFT52a、CFT53b の3株を構築した(図2)。これら3株を実験方法1-4の条件によって培養を行った。CFT51aと CFT53a では、それぞれ培養 72 時間後に 1.00 ± 0.11 g/L 及び 1.34 ± 0.07 g/L の MA を培養上 清中に生産した(図 3)。一方、CFT52a では培養 72 時間後に MA の生産は確認されなかった。全 ての株は培養48時間でグルコースを完全に消費し、細胞増殖に大きな違いは見られなかった(図 4)。全ての株において、中間体であるサリチル酸、PHB、PCA、カテコールの蓄積は確認できなか った。また、CFT52aの培養上清中において、わずかに PHB が蓄積(0.108 ± 0.00 g/L)してい た。経路2及び経路3において AroY 及び CatA が触媒する反応は共通である。経路3では MA が 生産されていることから、AroY 及び CatA が触媒する反応が経路 2 における律速段階ではないと 推察される。SDS-PAGE を用いて CFT52a のタンパク質発現を分析したところ、コントロールで ある空ベクターを保持した CFT5 と比較して、 コリスミ酸を PHB に変換する酵素である UbiC (約 18.8 kDa) 及び PHB を PCA に変換する酵素である PobA(約 44.2 kDa) の過剰発現は確認でき なかった(図 5)。この結果から、PobA 及び UbiC の発現量が不十分である可能性が示唆された。 これらの結果から、経路 2 は CFT5 をプラットフォーム株として用いる場合において MA 生産に 適さないとし、候補から除外した。

1-2-2 経路1及び経路3の最適化

MA の生産量を向上させるため、シキミ酸経路から各 MA 合成経路への分岐点となる中間代 謝物の、利用可能性を向上させることを試みた。1-2-1の結果より、経路1及び経路3の中間体(サ リチル酸、PCA、カテコール)の蓄積が確認されなかったことから、経路1及び経路3は MA 生産 における律速段階ではないことが示唆された。これを受けて、より上流の代謝経路を強化すること で MA の生産量を増加させることが出来ると考えた。経路1及び経路3では、それぞれコリスミ酸 と DHSA を出発化合物としている。これらの出発化合物への炭素フラックスを高めるため、経路1 ではコリスミ酸シンターゼ(AroC)、経路3では DHSA デヒドラターゼ(AroD)を追加で過剰発現 させた。経路1の酵素に加え AroC を過剰発現するプラスミド及び経路3の酵素に加え AroD を過剰 発現するプラスミドを構築し、それぞれを CFT5 に導入することで CFT51b 及び CFT53b の 2 株を |構築した(図 2)。これら 2 株を実験方法 1-4 の条件によって培養を行った。培養 72 時間後におい て、CFT51b では CFT51a の 1.6 倍に当たる 1.59 ± 0.10 g/L の MA を生産した (図 3)。Lu["]tke-Eversloh 氏らの報告では、シキミ酸経路を経て合成される Tyr の生産において AroC が重要な酵素 であることが示唆されており、本実験の結果と一致する²⁷。一方、CFT53b では MA の生産量は検出 限界以下であった。AroD の過剰発現が経路3での MA 生産に対し負の効果をもたらした理由として は、AroD の過剰発現によりシキミ酸経路下流(DHSA からコリスミ酸を生成する一連の反応)への 炭素フラックスも強化されてしまった可能性がある。

1-2-3 融合タンパクの発現による MA 生産量の向上

MA の生産量を向上させるために代謝チャネリングによる MA 合成経路の炭素フラックス強 化を試みた。代謝チャネリングの手法としては、遺伝子レベルでの融合タンパク質発現を用いた。経 路1及び経路3では、それぞれコリスミ酸と DHSA において MA 合成経路とその他の競合経路に分 岐する。経路1では AroC と MenF の融合タンパク質 (AroC-MenF)を、経路3では AroD と AroZ の融合タンパク質 (AroD-AroZ)発現させることで、各 MA 合成経路の強化を試みた。なお、融合タ ンパク質をつなぐリンカーにはフレキシブルなグリシン-セリンリンカー ((GGGGS)₃ リンカー)を 用いた。経路1の酵素に加え AroC-MenF を過剰発現するプラスミド、及び経路3の酵素に加え AroD-AroZ を過剰発現するプラスミドを構築し、それぞれを CFT5 に導入することで CFT51c 及び CFT53cの2株を構築した(図2)。これら2株を実験方法1-4の条件によって培養を行った。培養 72時間後において、CFT51c 及び CFT53c はそれぞれ 3.45 ± 0.04g/L 及び1.20 ± 0.10g/L の MA を生産した(図3)。CFT51c の MA 生産量は CFT51b と比較して約2.16 倍向上した。この結果か ら、AroC 及び MenF を各々単独の酵素として発現させるより、融合タンパク質 (AroC-MenF)とし て発現させる方が、MA 合成経路のフラックス向上に有効であることが示唆された(図6)。CFT51b 及び CFT51c のウエスタンブロッティングによる MenF 及び AroC-MenF 融合タンパク質の分析結 果を図 7 に示す。図 7 より、CFT51c では AroC-MenF の分子量である 88.9 kDa 付近にバンドが存 在し、これら2つの酵素が融合タンパク質として発現していることが確認された。また、経路3に おいても、AroD 単体での過剰発現(CFT53b) では MA 生産が減少したにもかかわらず、AroD-AroZ の発現(CFT53c)により CFT53a よりやや少ない MA を生産した。CFT53b 及び CFT53c の SDS-PAGE による分析結果を図8 に示す。CFT53b では AroD の過剰発現が確認できるのに対し、CFT53c では AroD-AroZ の分子量の位置のバンドが薄く発現量が低いことが分かる。CFT53b では、AroD の 発現量の増加に伴い DHSA 周辺の代謝バランスが崩れ、フラックスが MA 合成経路(経路 3)から シキミ酸経路の下流にシフトしたために MA 生産量が減少したと考えられる。CFT53c では MA 生 産量が回復たものの、CFT51a よりも生産量が低く、代謝チャネリングによる MA 合成経路への炭 素フラックス強化の効果がみられなかった。これは、AroD-AroZ における AroD ドメインが正しく フォールディングされずに失活し、AroZ 活性のみを有しているためであると考えられる。ネイティ ブな状態での AroD はホモ二量体を形成することが知られている²⁸。 AroD-AroZ では AroD ドメイン が二量体を形成できず、4 次構造がネイティブの AroD と異なるために失活した可能性がある。この 問題は、ソルターゼを用いた融合タンパク質発現の技術を適用することで解決できると考えられる。 AroD を単独の酵素として発現させ、活性状態の 4 次構造を有した状態でソルターゼにより AroZ と 融合させることで、失活することなく AroD-AroZ 融合タンパク質を発現できると考えられる。しか しながら、代謝チャネリングによる MA 合成経路の炭素フラックス強化だけでなく、AroD の過剰発 現による炭素フラックスのシフトも発生すると考えられるため、必ずしも MA 生産量が増大すると は言えない。以上を踏まえ、これまでの結果を総合すると、融合タンパク質を用いた MA 生産では、 経路1 (CFT51c) が最も適していると示唆された。

1-2-4 pH 調整による培養条件の最適化及びジャーファーメンターによる MA 生産

MA の生産量の更なる増大のために、培地 pH の最適化を試みた。一般に大腸菌は pH5 から pH8 の間で生育可能であるが、その範囲内においても細胞外部の pH によって細胞内の pH が変化 し様々な影響を及ぼす²⁹。酸性条件では、外部 pH が 6 を下回ると細胞内の pH が大きく変化するこ とが知られている³⁰。1-2-3 の条件で CFT51c を培養した際、培養 72 時間後の培養上清の pH は 5.51 ± 0.0 に低下しており、細胞内部の pH 低下を引き起こす酸性条件であることが確認された。 Thompson 氏らの報告では、pH 非制御下において大腸菌による MA 生産を行ったところ、3.15 g/L の MA を生産した³¹。この値はこれまでに報告されている pH 非制御下における MA 生産量の最大 値であり、CFT51c の pH 非制御下における MA 生産量(3.45 g/L)と同程度である。これらの結果 から、CFT51c による MA 生産量は、pH 非制御条件での上限に達している可能性が示唆された。そ こで、炭酸カルシウムによる pH 制御を行った条件での MA 生産を試みた。1-2-3 と同様の条件で CFT51c の培養を開始し、培養 24 時間後に終濃度 10 g/L となるように炭酸カルシウムを加えた。 炭酸カルシウム添加条件での CFT51c の MA の生産量は、培養 72 時間後において 4.45 ± 0.12 g/L であり、pH 非制御下の約 1.29 倍であった(図 9)。培養終了時(72 時間)の培養上清の pH は 7.05 ± 1.4 であった。さらに、ジャーファーメンターを用いた pH 制御条件での、CFT51c による MA 生 産を行った。培養 72 時間において、4.55 g/L の MA を生産し、MA の最大生産速度は 2.20 g/L/day であった(図 10)。これらの結果より、pH 条件の最適化が大腸菌における MA 生産で重要であるこ とが示唆された。

1-3 結言

本章では、3つの MA 合成経路を比較し、CFT5 由来株での MA 生産に最適な経路を選択し た。3つの異なる MA 合成経路を導入した株では、MA 産生量が大きく異なっていた。一般に、微生 物を用いた物質生産ではいくつかの候補となる経路が存在する。本章の結果が示すように、利用可能 な経路の中から最適な経路を選択することは、高生産量・高収率を実現するためには不可欠である。 さらに本章では MA の生産量を向上させるために、融合タンパク質技術を用いた。発現された融合 タンパク質は、シキミ酸経路から MA 合成経路へと炭素フラックスを誘導し、2.77g/L/day の最大 生産速度で 4.45 g/L の MA の生産をもたらした。グルコースからの MA 収量は 207mg/g であり、 これは初期株である CFT51a と比較し 4.44 倍の値である。またこの値は、フラスコまたは試験管で のバッチ培養において最高値である。この結果は、遺伝子レベルの融合タンパク質を使用した代謝 チャネリングが、特定の経路に炭素フラックスを誘導する強力なツールであることを示唆している。 しかしながら、遺伝子レベルの融合タンパク質は、多量体タンパク質など、より複雑な構造を持つ タンパク質に使用できないといった問題がある。生産量及び収量を更に高めるには、遺伝子破壊、 複数の生産経路の同時利用、ソルターゼを用いた融合タンパク質技術など、複数のアプローチを組 み合わせることが重要である。

1-4 実験方法

プラスミドの構築

本章で用いたプラスミドを表1に示す。プラスミドのクローニングには *E. coli* NovaBlue (Novagen, Cambridge, MA, USA)を用いた。ポリメラーゼ連鎖反応は Quick Taq HS (TOYOBO, Osaka, Japan)を用いた。Custom DNA オリゴヌクレオチドプライマーは Invitrogen Custom DNA Oligos (Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan)にて合成した(表 2)。コドンの最適化及 び人工遺伝子合成 (*pobA* from *P. putida* KT2440、*aroY* from *K. pneumoniae*、及び *aroZ* from *Bacillus thuringiensis*) は Invitrogen GeneArt Gene Synthesis service (Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan)にて行った。

プラスミドの構築方法を以下に示す。pZA23-ncml、pZA23-ncaml、pZA23-nca/ml、 pZA23-UpYc、pZA23-ZYc、pZA23-DZYc、pZA23-D/Zyc を次のように構築した pchB 合成遺伝 子断片をテンプレートとして使用し、プライマーpchB_f及び pchB_r を用いて PCR により増幅し た。増幅された断片を pZA23MCS の HindIII 部位にクローニングした。得られたプラスミドを pZA23-Iと命名した。menF遺伝子断片は、E. coli MG1655 ゲノム DNA をテンプレートとして使 用し、プライマーmenF_f 及び menF_r を用いて PCR により増幅した。増幅断片を pZA23-l の Kpnl 部位にクローニングし、得られたプラスミドを pZA23-ml と命名した。menF-pchB 遺伝子 断片は、テンプレートとして pZE12-ml を使用し、プライマーmenF_f2 と pchB_r2 を用いて PCR によって増幅した。増幅された断片を pZA23-nGcA の Kpnl 部位にクローニングし、得られたプ ラスミドを pZA23-mInc と命名した。*nahG-catA* 遺伝子断片は、プライマーペア nahG_f と catA_r を用いたテンプレートとして pZE12-nGcA を使用して PCR により増幅した。増幅断片を pZA23ml の Kpnl 部位にクローニングし、得られたプラスミドを pZA23-ncml と命名した。aroC 遺伝子 断片(3'末端側に(GGGGS)₃リンカーを含む)を、*E. coli* MG1655 ゲノム DNA をテンプレートと して使用し、プライマーaroC_f 及び aroC_r を用いて PCR により増幅した。増幅断片を pZA23ml の Kpnl 部位にクローニングし、得られたプラスミドを pZA23-a/ml と命名した。pZA-nca/ml の nahG-catA 遺伝子断片は、テンプレートとして pZE12-nGcA を使用し、プライマーnahG_f と catA_r2 を使用して PCR で増幅した。増幅断片を pZA23-a/ml の Kpnl 部位にクローニングし、 得られたプラスミドをpZA23-nca/mlと命名した。テンプレートとしてpZA23-nca/mlを使用し、 プライマーペア inv f 及び inv r をもちいてインバース PCR によって増幅し、pZA23-ncaml 線状 化断片を作成した。この際にリンカー配列を、停止コドンとリボソーム結合部位(RBS)に置き換 えた。In-FusionHDCloningKit(Takara)を使用して増幅断片を環状化し、得られたプラスミドを pZA23-ncamlと命名した。aroY遺伝子断片は、aroY合成遺伝子をテンプレートとして使用し、 プライマーaroY_f 及び aroY_r を用いて PCR により増幅した。 増幅断片を pZA23MCS の Kpnl 部 位と EcoRV の間にクローニングし、得られたプラスミドを pZA23-Y と命名した。catA 遺伝子断

片は、pZE12-nGcA をテンプレートとして使用し、プライマーcatA_f2 及び catA_r2 を用いて PCR により増幅した。増幅された断片を pZA23-Y の EcoRV にクローニングし、得られたプラスミド を pZA23-Yc と命名した。pobA 遺伝子断片は、pobA 合成遺伝子をテンプレートとし、プライマ -pobA_f 及び pobA_r を用いてて使用する PCR により増幅した。増幅断片を pZA23-Yc の Kpnl にクローニングし、得られたプラスミドを pZA23-pYc と命名した。pZA23-pYc をテンプレートと して使用し、プライマーペア inv_f2 及び inv_r2 を使用して、インバース PCR によって増幅し、 pZA23-UpY 線状化断片を作成した。ubiC 遺伝子断片は、プライマーペア ubiC_f と ubiC_r を使 用して、大腸菌 MG1655 ゲノム DNA をテンプレートとして使用した PCR で増幅した。増幅され た断片を pZA23-UpY 線状化断片にクローニングし、得られたプラスミドを pZA23-UpYc と命名 した。aroZ遺伝子断片は、aroZ合成遺伝子をテンプレートとして使用し、プライマーaroZ_f及び aroZ_r を用いて PCR により増幅した。増幅断片を pZA23-Yc の Kpnl にクローニングし、得られ たプラスミドを pZA23-ZYc と命名した。プライマーペア inv f3 及び inv r3 を使用して、pZA23-ZYc をテンプレートとして使用するインバース PCR によって増幅し pZA23-ZYc 線状化断片を作 成した。aroD 遺伝子断片は、E. coli MG1655 ゲノム DNA をテンプレートとして使用し、プライ マーaroD_f と aroD_r を使用して PCR で増幅した。増幅された断片を pZA23-ZYc 線状化断片に クローニングし、得られたプラスミドを pZA23-DZYc と命名した。*aroD* 遺伝子フラグメント(3' 末端側にフレキシブル(GGGGS)₃リンカーフラグメントを含む)は、テンプレートとして E. coli MG1655 ゲノム DNA を使用し、プライマーaroD_f 及び aroD_r2 を使用して PCR により増幅し た。増幅された断片を pZA23-ZYc 線状化断片にクローニングし、得られたプラスミドを pZA23-DZYc 及び pZA23-D/ZYc と命名した。

融合タンパク質の構築

以下の方法により、2つのタンパク質を1つの融合タンパク質として発現させた。フレ キシブルな(GGGGS)₃リンカーを、上流側のタンパク質(AroC または AroD)のC 末端と下流側 のタンパク質(MenF または AroZ)のN 末端の間に挿入し、(上流側のタンパク質 C 末端)-GGGGSGGGGGGGGGGGG-(下流側のタンパク質 N 末端)となるようにした。融合タンパク質を発 現するプラスミドを次のように構築した。リンカー配列を上流側の遺伝子の3'末端(*aroC*また は *aroD*)と下流側の遺伝子の5'末端(*menF*または *aroZ*)の間に挿入し、上流側の遺伝子の停 止コドンを削除した。すなわち、

CFT5 由来株の形質転換

CFT5 由来株の形質転換は Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を用

いてエレクトロポレーション法により行った(1350 kV、 600 Ω、10 µF、0.1 cm キュベット を使用)。CFT5 に pZA23-ncml、 pZA23-ncaml、 pZA23-nca/ml、 pZA23-UpYc、 pZA23-ZYc、 pZA23-DZYc 及び pZA23-D/ZYc を導入した株をそれぞれ CFT51a、CFT51b、 CFT51c、CFT52a、CFT53a、CFT53b、及び CFT53c とした。

培地

MA 生産は M9YP 培地、培養体積 5 mL の試験管培養にて検討した。M9YP 培地は、M9 最小培地に 5 g/L の乾燥酵母エキス及び 10 mM のピルビン酸ナトリウムを添加して作成され た。M9 最小培地には、1L あたりグルコース 20 g、NaCl 0.5 g、Na₂HPO₄ · 12H₂O 17.1 g、 KH₂PO₄ 3 g、NH₄Cl 1 g、MgSO₄ · 7H₂O 246 mg、CaCl₂ · 2H₂O 14.7 mg、FeSO₄ · 7H₂O 2.78 mg、チアミン塩酸塩 10 mg に加え、Tyr 40 mg、Trp 40 mg、及び Phe 100 mg(ATCC31882 は これらのアミノ酸に対して栄養要求性であり、CFT5 派生株は Phe に対して栄養要求性であるた め)を含み、必要に応じて、カナマイシン 20 mg/L を添加した。pH 制御下での試験管培養で は、オートクレーブ処理した 100 g/L CaCO₃(蒸留水に分散)を培養液に加え、最終濃度を 10 g/L とした。LB 培地は、2.0 L ジャーファーメンターでのバッチ培養での MA 生産に使用した。 LB 培地にはグルコース 20 g/L、トリプトン 10 g/L、乾燥酵母エキス 5 g/L、NaCl 5 g/L、カナ マイシン 20 mg/L を含む。

培養条件

試験管での MA 生産は次のように行った。15 mL 試験管、浸透速度 220 rpm、37 °Cで1 日間、4 mL M9YP 培地で前培養した。前培養培地を初期 OD₆₀₀=0.1 となるよう、15 mL 試験管 内の 5 mL M9YP 培地(0.1 mM イソプロピル β -D-1-チオガラクトピラノシドを添加)に植菌し た。本培養は、浸透速度 220 rpm、37 °Cで行った。pH 制御下での試験管培養では、植菌後 24 時 間で CaCO₃を培地に添加した。ジャーファーメンターを用いた培養は、2.0 L ジャーファーメン ターを用いて作業容量 400 mL にて実施した。培地には LB 培地を使用した。初期 OD₆₀₀=0.05 となるよう前培養液を植菌した。1 M HCI 及び 7%NH₄OH を自動的に添加し、pH を 7.0 に維持 するよう制御した。培地中に 400 mL/min で空気を流入させ、溶存酸素(DO)を 0.69 ppm 以上 に維持するよう、攪拌速度を 200~600 rpm の間で自動的に制御した。ジャーファーメンター培 養では、培養開始の 3 時間後に 0.1 mM IPTG を培地に添加した。

分析方法

細胞増殖は UVmini-1240 spectrophotometer (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)を 用いて波長 600 nm における光学密度(OD₆₀₀)にて測定した。 グルコース濃度は Prominence HPLC System (Shimadzu)を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC)を用いて分析した。分析条件は、次の通り。

移動相:蒸留水(0.8 mL/min)

カラム: Shodex SUGAR KS-801 column

 $(6 \ \mu m, L \times I.D. = 300 \ mm \times 8.0 \ mm, Shodex)$

カラム温度:50 ℃

検出器: Refractive index detector

MA 濃度は次の条件にて HPLC を用いて分析した。

移動相: 5 mM *p*-トルエンスルホン酸 (1.0 mL/min)

カラム: SCR-102H column

$$(7 \ \mu m)$$
, L × I.D. = 300 mm × 8.0 mm, Shimadzu)

カラム温度: 40 °C

検出器: Conductivity detector

```
PHB、PCA 及びカテコールは次の条件にて HPLC を用いて分析した。
```

移動相: A= 0.2 % リン酸

B=メタノール (1.0 mL/min)

グラジエント: A:B = 80:20 (0-15 min)

A:B = 50:50 (15-20 min)

A:B = 80:20 (20-25 min)

カラム: PBr column

(5 µm、L × I.D. = 250 mm × 4.6 mm、Nacalai Tesque) カラム温度: 40 ℃ 検出器: UV-VIS detector (240 nm)

SDS-PAGE

培養液から1mLサンプリングし、遠心分離により菌体を回収する。菌体ペレットを1mLのPBS(-)バッファー(リン酸二水素カリウム 0.2 g/L、KCl 0.2 g/L、リン酸水素二ナトリウム 1.15 g/L、NaCl 8 g/L)に懸濁し、ガラスビーズによって振盪破砕した。菌体破砕液を遠心分離し、上清を SDS-PAGE に供した。サンプルと等量の 2×サンプルバッファー(2% SDS、10% グリセロール、5% 2-メルカプトエタノール、0.002% ブロモフェノールブルー、0.125 M Tris-HCl、pH6.8)を混和し、95°Cで5 min、加熱した。加熱後のサンプルを SDS-PAGE ゲル (e-PAGEL、ゲル濃度 5-20%、ATTO) に 10 μ L ずつ添加し、ゲル 1 枚当たり 60 mA、50 min で電気泳動を行った。電気泳動後、Coomassie Brilliant Blue R-250 (Nacalai Tesque) により染色を行った。

ウエスタンブロッティング

転写装置は AE-6678(ATTO)、PVDF 膜は Amersham Hybond-P(GE helthcare)、濾紙 は Fillter Paper(BIO RAD)を用いた。PVDF 膜をゲルと同じ大きさに切り、メタノールに 1 min 浸した後、濾紙と共に Transfer buffer(グリシン 11.53 g/L、Tris-HCl 2.43 g/L、20% メタノー ル)に浸した。続いて、SDS-PAGE ゲルと PVDF 膜、濾紙を重ね、108 mA で 45 分間転写した。 転写後、PVDF 膜を Blocking One(Nacalai Tesque)に浸して緩やかに 1 時間振盪し、ブロッキ ングを行った。PVDF 膜を TBST(0.1% 1 M Tris-HCl、0.03% 5M NaCl、0.005% Tween20)で軽 く 1 度洗浄したのち、TBST 15 mL に浸し、そこへ適当な抗体を加え 1 時間緩やかに振盪した。 PVDF 膜を 20 mL の TBST に浸して 20 min 緩やかに振盪して洗浄した。TBST を交換し、この洗 浄操作を 3 回繰り返した。TBST に適切な二次抗体を加えた TBST 15 mL に浸し、1 時間緩やか に振盪した。PVDF 膜を TBST 20 mL 中で 5 min 緩やかに振盪し、洗浄した。TBST を交換し、 この洗浄操作を 3 回繰り返した。PVDF 膜を AP 発色バッファー(Tris-HC 12.3 g/L、NaCl 5.7 g/L、MgCl₂·6H₂O 0.5 g/L、pH9.0) 5 mL、NBT 33 µL、BCIP 16.5 µL 中に浸し、10 min 程度 発色を行った。

遺伝子配列

本章で用いた人工合成遺伝子の DNA 配列を以下に示す。

Sequence of *pobA* from *Pseudomonas putida* KT2440.

ATGAAAACCCAGGTTGCAATTATTGGTGCAGGTCCGAGCGGTCTGCTGCTGGGTCAGCTG CTGCATAAAGCAGGTATTGATAACATTATTGTGGAACGTCAGACCGCAGAATATGTTCTGG GTCGTATTCGTGCCGGTGTTCTGGAACAGGGCACCGTTGATCTGCTGCGTGAAGCCGGTG GTCGTCGTCGGCGTCTGGATCTGAAAGCACTGACCGGTGGTAAAACCGTTATGGTTTATG GTCAGACCGAAGTTACCCGTGATCTGATGCAGGCACGTGAAGCAAGTGGTGCACCGATT ATCTATAGCGCAGCAAATGTTCAGCCGCATGAACTGAAAGGTGAAAAACCGTATCTGACC TTTGAAAAAGATGGTCGTGTTCAGCGTATCGATTGTGATTATATTGCAGGTTGTGATGGCT TTCATGGTATTAGCCGTCAGAGCATTCCGGAAGGTGTGCTGAAACAGTATGAACGTGTTT ATCCGTTTGGTTGGCTGGGTCTGCTGAGCGATACCCCTCCGGTTAATCACGAACTGATTTA TGCACATCATGAACGTGGTTTTGCACTGTGTAGCCAGCGTAGTCAGACCCGTAGCCGTTA TTATCTGCAGGTTCCGCTGCAGGATCGTGTTGAAGAATGGTCAGATGAACGTTTTTGGGA TGAGCTGAAAGCCCGTCTGCCTGCAGAAGTTGCAGCCGATCTGGTTACCGGTCCGGCAC TGGAAAAAGCATTGCACCGCTGCGTAGCCTGGTTGTTGAACCGATGCAGTATGGTCACC TGTTTCTGGTGGGTGATGCAGCACATATTGTTCCGCCTACCGGTGCAAAAGGTCTGAATC TGGCAGCAAGTGATGTGAATTATCTGTATCGTATTCTGGTGAAAGTGTATCATGAAGGCCG TGTGGATCTGCTGGCACAGTATAGTCCGCTGGCACTGCGTCGTGTTTGGAAAGGCGAACG TTTTAGCTGGTTTATGACCCAACTGCTGCATGATTTTGGTAGCCATAAAGATGCATGGGAC CAGAAAATGCAAGAAGCAGATCGCGAATATTTTCTGACCAGTCCGGCAGGTCTGGTGAAT ATTGCAGAAAATTATGTTGGTCTGCCGTTTGAAGAAGTTGCCtaa

Sequence of aroY from Klebsiella pneumonia.

ATGACCGCACCGATTCAGGATCTGCGTGATGCAATTGCCCTGCTGCAACAGCATGATAATC AGTATCTGGAAACCGATCATCCGGTTGATCCGAATGCAGAACTGGCAGGCGTTTATCGTC ATATTGGTGCCGGTGGCACCGTTAAACGTCCGACACGTATTGGTCCGGCAATGATGTTTAA GCAGCACTGCTGCTGGGTTGTGAAGCAAGTCAGCTGGCACTGGAAGTTGGTAAAGCAGT TAAAAAACCGGTTGCACCGGTGGTTGTTCCGGCAAGCAGCGCACCGTGTCAAGAGCAGA ACCGATTGATGCAGGTCCGTTTTTTTGTCTGGGTTTAGCACTGGCAAGCGATCCGGTGGA TGCAAGCCTGACCGATGTTACCATTCATCGTCTGTGTGTTCAGGGTCGTGATGAACTGAG CATGTTCCTGGCAGCAGGTCGCCATATTGAAGTTTTTCGTCAGAAAGCAGAAGCAGCAGCAG GTAAACCGCTGCCGATTACCATTAATATGGGTTTAGATCCGGCAATCTATATCGGTGCATGT TTTGAAGCACCGACAACACCGTTTGGTTATAATGAACTGGGTGTTGCGGGTGCACTGCGT CAGCGTCCGGTTGAACTGGTTCAGGGTGTTAGCGTTCCGGAAAAAGCAATTGCACGTGC CGAAATTGTTATTGAAGGTGAACTGTTACCGGGTGTTCGTGTGTGAAGATCAGCATAC CAATAGCGGTCATGCAATGCCGGAATTTCCGGGGTTATTGTGGTGGTGCAAATCCGAGCCT GCCGGTTATTAAAGTTAAAGCCGTTACCATGCGCAATAATGCAATTCTGCAGACCCTGGTT TGCAGTTGAAGCAGCAATTCCGGGTTTCCTGCAGAATGTTTATGCACATACCGCAGGCGG TGGTAAATTTCTGGGTATCCTGCAGGTAAAAAACGTCAGCCTGCAGATGAAGGTCGTCA GGGTCAAGCAGCCCTGGCCCTGGCAACCTATAGCGAACTGAAAAATATCATTCTGGT GGATGAGGATGTGGACATTTTTGATAGTGATGATATTCTGTGGGCAATGACCACACGTATG CAGGGTGATGTTAGCATTACCACCATTCCGGGTATTCGCGGTCATCAGCTGGATCCGAGCC AGACACCGGAATATTCACCGAGCATTCGTGGTAATGGTATTAGCTGCAAAACCATCTTTGA TTGTACCGTTCCGTGGGCACTGAAAAGCCATTTTGAACGTGCACCGTTTGCAGATGTTGA TCCGCGTCCGTTTGCACCTGAATATTTTGCACGTCTGGAAAAAAATCAGGGTAGCGCAAA Ataa

Sequence of aroZ from Bacillus thuringiensis.

1-5 図表



Figure 1. The synthetic metabolic pathway for the production of chorismate derivatives, including MA, in *E. coli* CFT5-derived strains. The red X indicates deletion of the *ptsH*, *ptsI*, *pykA*, *pykF*, *pheA*, and *tyrA* genes. The blue arrows indicate the GalP/Glk system (GGS) revised by introducing *galP* and *glk* genes. The green arrows indicate the MA synthesis pathways introduced. The orange arrow indicates the conversion of MA to various products by chemical catalysis. GalP, galactose permease; Glk, glucokinase; G6P, glucose 6-phosphate; ATP, adenosine triphosphate; ADP, adenosine diphosphate; E4P, erythrose 4-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; Acetyl-CoA, acetyl-coenzyme A; AA, adipic acid; TPA, terephthalic acid.



Figure 2. (A) Diagram of MA synthesis pathways in CFT5-derived strains. DQA, dehydroquinate; DHS, dehydroshikimate; EPSP, 5-O-(1-Carboxyvinyl)-3-phosphoshikimate; PHB, *p*-hydroxbenzoate; ICA, isochorismate; PCA, protocatechuate; Red arrows, Pathway 1; Blue arrows, Pathway 2; and Green arrows, Pathway 3. (B) Diagram of MA synthesis gene cassette in each plasmid.



Figure 3. MA production titer in CFT5-derived strains. Red, blue, and green bars indicate MA production via Pathway 1, Pathway 2, and Pathway3, respectively. n.c. is empty vector control (CFT5 containing pZA23MCS). The data are presented as the average of three independent experiments, and error bars indicate the standard error.



Figure 4. Glucose consumption by CFT51a, CFT52a, and CFT53a. The data are presented as the average of three independent experiments, and error bars indicate the standard error.



Figure 5. SDS-PAGE analysis of CFT52a. Both outer lanes: protein marker, Lane1: control (CFT5 horboring pZA23MCS), Lane2: CFT52a



Figure 6. Effect of AroC-MenF fusion protein expression on MA production. (A) Diagram of the shikimate pathway in CFT51b. (B) Diagram of shikimate pathway in CFT51c. Black and red Pacman shapes indicate the AroC and MenF, respectively. Orange and purple Pac-man shapes indicate the enzymes consuming chorismate as substrate. Yellow band indicates the flexible (GGGGS)₃ linker. Light gray circles, 5-O-(1-Carboxyvinyl)-3-phosphoshikimate (EPSP); dark gray diamonds, chorismate; red squares, isochorismate; and yellow stars, MA. Orange pentagons and purple triangles indicate the byproducts derived from chorismate.



Figure 7. Western blotting analysis of CFT51b and CFT51c. Left side lane: protein marker, Lane1: CFT51b, Lane2: CFT51c. An ANTI-FLAG M2 Monoclonal Antibody (Sigma-Aldrich) and an anti-Mouse IgG (H+L), HRP Conjugate (Promega Corp.) were used to detect MenF and fused AroC/MenF.



Figure 8. SDS-PAGE analysis of CFT53b and CFT53c. Both outer lanes: protein marker, Lane1: control (CFT5 horboring pZA23MCS), Lane2: CFT53b, Lane2: CFT53c.



Figure 9. Culture profiles of CFT51c. Red closed circles, non–pH-controlled cultivation; red open circles, pH-controlled cultivation (CaCO₃ added). (A) Bacterial cell growth (CFT51c). (B) Glucose consumption by CFT51c. (C) MA production by CFT51c. Blue arrows indicate when CaCO₃ was added in to the culture medium. The data are presented as the average of three independent experiments, and error bars indicate the standard error.



Figure 10. Culture profiles of CFT51c with jar fermentor. (A) Bacterial cell growth (CFT51c). (B) Glucose consumption by CFT51c. (C) MA production by CFT51c.

Dlagmida	Plasmids Construe	Source or
riasinids Genotype	reference	
pZE12MCS	P _{LlacOl} , colE ori, Amp ^r	Expressys
pZA23MCS	P _{AllacO-1} , p15A ori, Km ^r	Expressys
pZE12-mI	pZE12MCS containing <i>menF</i> from <i>E. coli</i> and <i>pchB</i>	Node at $a123$
	from P. aeruginosa	Noua et al.
	pZA23MCS containing <i>nahG</i> from <i>P. putida</i> KT2440	Noda et al. ²³
pZA25-IIOCA	and <i>catA</i> from <i>P. putida</i> DOT-T1E	
pZA23-I	pZA23MCS containing pchB from P. aeruginosa	This study
pZA23-mI	pZA23-I containing menF from E. coli	This study
pZA23-mInc	pZA23MCS containing menF, pchB, nahG and catA,	This study
pZA23-ncmI	pZA23MCS containing <i>nahG</i> , <i>catA</i> , <i>menF</i> , and <i>pchB</i>	This study
ZA23-ncamI	pZA23-ncmI containing aroC	This study
	pZA23MCS containing <i>nahG</i> , <i>catA</i> , <i>pchB</i> , and	
	<i>aroC/menF</i> , which is a gene expressing fusion protein	This study
pZA23-nca/ml	composed of AroC and MenF connected by flexible	
	linker	
	pZA23MCS containing <i>nahG</i> , <i>catA</i> , <i>pchB</i> , and	
n7422 noo.ml	<i>aroC/menF</i> , which is a gene expressing fusion protein	This study
pZA25-nca*mi	composed of AroC and MenF connected directly	This study
	(without linker)	
	pZA23MCS containing <i>nahG</i> , <i>catA</i> , <i>pchB</i> , and	
pZA23-nca//mI	<i>aroC/menF</i> , which is a gene expressing fusion protein	This study
	composed of AroC and MenF connected by rigid linker	
-7422 V	pZA23MCS containing aroY from K. pneumoniae	This study
рда23-ү	(codon optimized for <i>E.coli</i>)	This study
pZA23-Yc	pZA23-Y containing <i>catA</i>	This study
pZA23-pYc	pZA23-Yc containing <i>ubiC</i> from <i>E. coli</i>	This study
pZA23-UpYc	pZA23-pYc containing <i>pobA</i> from <i>P. putida</i>	This study
	KT2440(codon optimized for <i>E.coli</i>)	
pZA23-ZYc	pZA23-Yc containing aroZ from Bacillus thuringiensis	This start-
	(codon optimized for <i>E.coli</i>)	i ilis study
pZA23-DZYc	pZA23-ZYc containing aroD from E.coli	This study

Table 1. Plasmids used in this study.
	pZA23-Yc containing AroD-AroZ, which is a gene
pZA23-D/ZYc	expressing fusion protein composed of AroD and AroZ This study
	connected by flexible linker
	pZA23-Yc containing AroD-AroZ, which is a gene
pZA23-D·ZYc	expressing fusion protein composed of AroD and AroZ $$ This study $$
	connected directly (without linker)
	pZA23-Yc containing AroD-AroZ, which is a gene
pZA23-D//ZYc	expressing fusion protein composed of AroD and AroZ This study
	connected by rigid linker

Table 2 Oligonucleotide primers used in this study.

Oligonucleotide	Sequence
primers	
pchB_f	5'- GTCGACGGTATCGATAAAGAGGAGAAAAAGCTTATGAAAACCCCTGAAGATTG -3'
pchB_r	5'- CAGGAATTCGATATCTAAATGATGATGATGATGATGGGCTGCACCACGGGTCTGAC -3'
menF_f	5'- ATTAAAGAGGAGAAAGGTACCATGCAATCACTTACTACGGC -3'
menF_r	5'- CTCGAGGGGGGGGCCCTTACTTGTCATCGTCATCCTTGTAGTCTTCCATTTGTAATAAAGTAC -3'
menF_f2	5'- TTAAAGAGGAGAAAggtaccATGCAATCACTTACTACGGC -3'
pchB_r2	5'- GTACTGTTCTGCATgtaccAAGCTTTTTCTCCTCTTTttaggctgcaccacgggtctgac -3'
nahG_f	5'- TTAAAGAGGAGAAAggtaccATGCAGAACAGTACCAGCGC-3'
catA_r	5'- gtaagtgattgcatggtaccAAGCTTTTTCTCCTCTTTctattaACCTTCTTGCAGTG -3'
aroC_f	5'- TTAAAGAGGAGAAAGGTACCatggctggaaacacaattggacaac -3'
aroC_r	5'- gtaagtgattgcatGGAACCACCGCCTGAACCACCGCCACCACTACCACCACCACCcagcgtggaatatcagtcttcaca -3'
catA_r2	5'- gtgtttccagccatggtaccAAGCTTTTTCTCCTCTTT ctattaACCTTCTTGCAGTG -3'
inv_f	5'- cattaaagaggagaaaggatgcaatcacttactacggcgctgg -3'
inv_r	5'- ttctcctctttaatgctattaccagcgtggaatatcagtcttcac -3'
aroY_f	5'- TTAAAGAGGAG AAAggtaccATGACCGCACCGATTCAGGATCTGC -3'
aroY_r	5'- CTGCAGGAATTCgatatcCTATTA TTTTGCGCTACCCTGATTTTTTTCC -3'
catA_f2	5'- AGCGCAAAATAATAG gatate AAAGAGGAGAAAAAGCTT ATGACCGTGAAAATTAGCCATACCG -3'
catA_r2	5'- CTGCAGGAATTCgatCTATTAACCTTCTTGCAGTGCACGC -3'
pobA_f	5'- TTAAAGAGGAGAAAggtacc ATGAAAACCCAGGTTGCAATTATTG -3'

- pobA_r 5'- ATCGGTGCGGTCATggtaccAAGCTTTTTCTCCTCTTTctattaGGCAACTTCTTCAAACGGCAGACCA -3'
- inv_f2 5'- AAAGAGGAGAAAAAGCTTATGAAAACCCAGGTTGCAATTATTGGTGC -3'
- inv_r2 5'- ggtaccTTTCTCCTCTTTAATGAATTCTGTGTGAAATTG -3'
- ubiC_f 5'- GAGGAGAAAggtacc ATGTCACACCCCGCGTTAACGC -3'
- ubiC_r 5'- CTTTTTCTCCTCTTTctattaGTACAACGGTGACGCCGGTAAAAACA -3'
- aroZ_f 5'- TTAAAGAGGAGAAAggtaccATGAAATATAGCCTGTGCACCATTAG -3'
- aroZ_r 5'- ATCGGTGCGGTCATggtaccAAGCTTTTCTCCTCTTTctattaGCTGGTAACAACTTCCAGTTTACGG -3'
- inv_f3 5'- ATGAAATATAGCCTGTGCACCATTA -3'
- inv_r3 5'- GGTACCTTTCTCCTCTTTAATGAATTC -3'
- aroD_f 5'- GAGGAGAAAggtacc atgaaaaccgtaactgtaaaagatc -3'
- aroD_r 5'- CAGGCTATATTTCATAAGCTTTTTCTCCTCTTTctattatgcctggtgtaaaatagttaatacc -3'
- aroD_r2 5'- CAGGCTATATTTCATTGAACCACCGCCTGAACCACCGCCACCACCACCACCACCACCtgcctggtgtaaaatagttaatacc -3'
- inv_f4 5'- CTGGggtaccATGCAATCACTTACTACGGCGCTGGAAAAT -3'
- inv_r4 5'- TGCATggtaccCCAGCGTGGAATATCAGTCTTCACATCG -3'
- inv_f5 5'- GCCGCTGCCAAAGAAGCGGCAGCGAAAATGCAATCACTTACTACGGCGCTGGAAAAT -3'
- inv_r5 5'- TTCTTTGGCAGCGGCTTCTTTTGCTGCAGCTTCCCAGCGTGGAATATCAGTCTTCACATCG -3'
- inv_f6 5'- GCAggatccATGAAATATAGCCTGTGCACCATTAGCTTTCGT -3'
- inv_r6 5'- TTTCATggatccTGCCTGGTGTAAAATAGTTAATACCGTGCG -3'
- inv_f7 5'- GCCGCTGCCAAAGAAGCGGCAGCGAAAATGAAATATAGCCTGTGCACCATTAGCTTTCGT -3'
- inv_r7 5'- TTCTTTGGCAGCGGCTTCTTTGCTGCAGCTTCTGCCTGGTGTAAAATAGTTAATACCGTGCG -3'

第二章:"Parallel Metabolic Pathway Engineering"によるシキミ酸経路誘導体の高生産

2-1 緒言

第一章では、酵素工学的な手法を用いて、シキミ酸経路より下流の炭素フラックスの強化を 試みた。本章では、シキミ酸経路へ流入する炭素フラックスを強化することで、目的生産物の生産量 増大を試みた。その手法として、Parallel Metabolic Pathway Engineering (PMPE) という代謝工 学における新たなアプローチの開発を行った。

リグノセルロース系バイオマスを構成する糖のうち、最も多量に存在するのははグルコース であり、次点で多く存在する糖はキシロースである^{2.32}。第一章のように、グルコースを原料として 有用物質の生産量を増加させる技術は、化合物生産プロセスのバイオシフトにおいて必須である。 一方で、リグノセルロース系バイオマスを資源として無駄なく利用するためには、ヘミセルロースの 主成分であるキシロースの活用も重要となる。これまでも様々な方法でキシロースの利用方法が検 討されてきたが、最も代表的なものはグルコースと共にキシロースも基質として物質生産に利用する 方法である³³⁻³⁵。この混合糖を用いた場合に起こる主な問題としてカタボライト抑制(CCR)がある ^{36.37}。グルコース存在下では、キシロースの異化代謝が抑制されグルコースが優先的に消費される。 そのためキシロースの消費に時間がかかり、生産効率の低下を引き起こす。CCR の解消には、PTS システムを構成するタンパク質の発現抑制や、L-アラビノース転写レギュレーターの破壊、グルコー スとキシロースをそれぞれ消費する 2 種類の大腸菌株の共培養など、様々な手法が開発されている ³⁸⁻⁴⁰。しかしながら、これらの手法には、収率の低下や培養操作の複雑化など、依然として様々な問 題が存在する。

第一章でも触れたように、競合経路への炭素フラックスの流出はバイオプロダクションにお ける大きな課題である。代謝経路のより上流側での炭素フラックスの流出は、収率の大幅な低下を 引き起こすが、細胞の増殖や維持に致命的なダメージを与えるために競合経路の破壊が出来ない。シ キミ酸経路の出発物質である PEP はピルビン酸や OAA の前駆体としても利用されており、TCA サ イクルへの炭素フラックスの供給源となっている⁴¹。TCA サイクルは細胞構成要素の合成や NADH の再生など細胞の増殖・維持に重要な役割を担っているため、PEP から TCA サイクルへと流れる代 謝経路を完全に遮断すると細胞増殖が出来なくなる。すなわち、シキミ酸経路を経る化合物の生産 と細胞増殖はトレードオフの関係にある。このような細胞増殖と物質生産のトレードオフを克服す るため、代謝トグルスイッチと呼ばれる技術が開発されている。代謝トグルスイッチとは、特定の誘 導体を培地に添加することにより遺伝子発現の ON/OFF を制御し、誘導剤の添加前後で細胞内の代 謝を大きく変化させる技術である。相馬氏らの研究ではアセチル CoA を代謝の分岐点として、周辺 の酵素の発現を代謝トグルスイッチによりコントロールした⁴²。培養初期はアセチル CoA から TCA サイクルに流れるようにクエン酸シンターゼ (GltA)を発現させ、培養後期になると Glt の発現を抑 制し、アセチル CoA からの炭素フラックスを目的の代謝経路へと誘導する。この技術によりイソプ ロパノール生産量を 3.7 倍増大さることに成功している。代謝工学のツールとして代謝トグルスイッ チは有用であるが、代謝スイッチの ON/OFF (誘導剤の添加)のタイミング等の培養操作の複雑さ は、克服すべき課題である。

本章では、Parallel Metabolic Pathway Engineering (PMPE) と名付けた新たな代謝工学技 術の開発及び応用により、細胞増殖能力を維持したままグルコースとキシロースからのシキミ酸経 路誘導体の高収率生産を試みた。まず、解糖系及び PPP と TCA サイクルを完全に分離し、解糖系と PPP から TCA サイクルへの炭素供給を完全に遮断した株を構築した。続いて、TCA サイクルへの炭 素供給を補うために、代謝改変株に Dahms 経路を導入した (図 1)。Dahms 経路は貧栄養細菌であ る *C. crescentus* が持つキシロース異化経路であり、解糖系及び PPP を経ることなく、キシロース からピルビン酸とグリオキシル酸を供給する経路である (図 2)⁴³。これらの改変により、グルコー スに由来する炭素は TCA サイクルに流れることなく目的化合物の生産に利用され、キシロースに由 来する炭素を TCA サイクルで利用することで細胞増殖・維持を行う代謝系をデザインした。この代 謝デザインでは、グルコース及びキシロースを利用する二つの代謝経路は、それぞれが交わることな く "パラレル"に存在する。このように完全に分離された二つの代謝系を単一の生物内に構築する手 法 (PMPE)の実用性を確かめるため、第一章と同様に MA をモデル化合物として PMPE による生 産量向上を試みた。

2-2 実験結果及び考察

2-2-1 Parallel Metabolic Pathway のデザイン

シキミ酸経路を物質生産経路のモデルとして、PMPEの実現を目指した。シキミ酸経路の 出発化合物である PEP が TCA サイクルへと流入する代謝経路を破壊することで、グルコースから シキミ酸経路への炭素フラックスを増加させる。PMPE を実現するため、まず解糖系及び PPP か ら TCA サイクルへと炭素が流入しない代謝改変株を構築する必要がある。そこで、PMPE を構築 する親株として CFT5 を用いた。CFT5 は過去の研究や第一章でも示したように、ピルビン酸キナ ーゼ (*pykA、pykF*) 及び PTS システム (*ptsH*) の破壊によりシキミ酸経路誘導体の生産に適し た株である²³。

CFT5 における、解糖系及び PPP からの TCA サイクルへの炭素の流入を検討するため、 グルコースを炭素源として M9 最小培地で CFT5 を培養した。その結果、CFT5 は M9 最小培地で は増殖しなかった。次に、M9 最小培地に 20 mM ピルビン酸、リンゴ酸 20 mM、またはピルビン 酸 10 mM+リンゴ酸 10 mM を添加した条件で CFT5 の培養を行った。その結果、ピルビン酸の みを添加した条件では CFT5 は増殖しなかったが、リンゴ酸を含む培地条件では CFT5 は増殖し た (図 3)。リンゴ酸の添加により増殖能力が回復したものの、その増殖速度は野生株と比較して 極めて遅かった。CFT5 は GalP/Glk システムによりグルコース 1 mol を取り込む際に ATP を 1 mol 消費する。また大腸菌野生株ではピルビン酸キナーゼにより PEP から ATP とピルビン酸が供 給されるが、CFT5 では PykA 及び PykF が破壊されているため、この反応は起こらない。これらの理由により、CFT5 は菌体内の ATP レベルが低いために増殖速度が低下したと考えられる。これらの結果より、CFT5 は TCA サイクルへの炭素フラックスが不足しておりグルコースを単一炭素源として増殖できない事が示唆された。

2-2-2 CFT5 への Dahms 経路の導入

2-2-1 において、CFT5 ではグルコースからの炭素フラックスが TCA サイクルへ流れないこ とが示唆された。PMPE の実現には、解糖系及び PPP を経ることなくキシロースから TCA サイ クルへと炭素を供給する代謝経路を導入する必要がある。キシロースの資化経路として、貧栄養細 菌 *C. crescentus* が保有する Dahms 経路に注目した。Dahms 経路は解糖系及び PPP を経ること なく、キシロースからピルビン酸とグリオキシル酸を生産する経路である。Dahms 経路では、ま ず *C. crescentus* 由来のキシロースデヒドロゲナーゼ (*xdh*) によりキシロースがキシロノラクト ンに転化される。続いて *C. crescentus* 由来のキシロノラクトナーゼ (*xdh*) によりキシロノラク トンからキシロン酸が生成される。キシロン酸は大腸菌内在のキシロン酸デヒドラターゼ (*yjhG*) によって 2-デヒドロ-3-デオキシ-D-キシロン酸 (DHDOX) となり、その後大腸菌内在の DHDOX アルドラーゼ (*yjhH*) によって DHDOX からピルビン酸とグリコールアルデヒドが生成される。グ リコールアルデヒドは大腸菌内在の経路によってグリオキシル酸へと代謝される(図 2)。

Dahms 経路の酵素を発現する遺伝子群 (*xdh、xylC*及び *yjhHG*)を導入したプラスミド pZE12-x を構築した。CFT5 に pZE12-x を導入し、この株を CFT5x とした。CFT5x をグルコー ス、キシロース、又はグルコース-キシロース混合糖を炭素源として M9 最小培地で培養した。そ の結果、CFT5x はキシロースを単一炭素源とした培地では増殖しなかったが、グルコース及びグ ルコース-キシロース混合糖を炭素源として用いた培地で増殖した(図 4)。Dahms 経路はキシロ ースを基質とする経路であるため、グルコースを単一炭素源として用いた培地では CFT5x は増殖 出来ないと考えられたが、予想に反する結果となった。この理由として、Dahms 経路に関わる酵 素が、グルコースの代謝において何らかの反応を触媒している可能性が考えられる。そこで、Xdh、 XyIC、又は YjhHG をそれぞれ CFT5 に発現させた株を構築し、グルコースを単一炭素源として培 養を行った。その結果、XyIC 及び YjhHG を発現させた CFT5 由来株は増殖しなかったのに対し、 Xdh を発現させた株は増殖した(図 5)。Xdh はキシロースに対して高い基質特異性を有するが、 グルコースや G6P に対しては全く、もしくはほとんど基質特異性を有していない ⁴³。これらの結 果から、Xdh は 6-ホスホグルコン酸等、他の PPP 内の代謝物に対する基質特異性を示し、グルコ ース代謝に影響を与えた可能性が示唆された。

2-2-3 解糖系及び PPP から TCA サイクルへの炭素流入の遮断

Xdh の発現によりグルコース単一炭素源下での細胞増殖能力が回復した理由として、

Entner-Doudoroff 経路(ED 経路)が活性化された可能性がある。ED 経路では、ホスホグルコン 酸デヒドラターゼ(Edd, EC:4.2.1.12)により 6-ホスホグルコン酸が 2-ケト-3-デオキシグルコン-6-リン酸へと転化される。その後、2-ケト-3-デオキシグルコン-6-リン酸アルドラーゼ(Eda)に より、2-ケト-3-デオキシグルコン-6-リン酸からピルビン酸とグリセルアルデヒド-3-リン酸が生 成される。Xdh が 6-ホスホグルコン酸に対するデヒドロゲナーゼ活性(Edd 活性)を有している 場合、Xdh の過剰発現により ED 経路が活性化されると考えられる(図 6)。

ED 経路からの TCA サイクルへの炭素流入を防ぐため、CFT5 から Eda をコードする遺伝 子(*eda*)を破壊した株(GXa)を構築した。驚くべきことに、GXa は Dahms 経路を導入してい ない状態で、グルコースを炭素源とした M9 最小培地で増殖した(図 6、図 7)。この結果は *eda* の破壊により、TCA サイクルへと流れる他の代謝経路が活性化されたことを示唆している。GXa は、内在の PEP カルボキシラーゼ(Ppc)及び PEP カルボキシキナーゼ(Pck)を有している。 Ppc 及び Pck は PEP を OAA に転換する反応とその逆反応をそれぞれ触媒する酵素である。ED 経 路の破壊により、Ppc 及び Pck による PEP-OAA 相互変換反応のバランスが変化した可能性があ る。CFT5 から Ppc または Pck をコードする遺伝子(*ppc、pck*)を破壊した株(GXb、GXc)を 構築し、グルコース単一炭素源 M9 最小培地で培養を行ったところ、GXb は増殖しなかったが、 GXc は増殖した(図 6、図 7)。また同様の条件で、CFT5 から *ppc と pck*を破壊した株(GXf)、 及び CFT5 から *eda と pck*を破壊した株(GXe)は増殖し、CFT5 から *eda と ppc*を破壊した株 (GXd)は増殖しなかった(図 6、図 7)。

野生株の大腸菌では、Ppc と Pyk によって解糖系と TCA サイクル間の代謝が調整されてい る。ピルビン酸キナーゼ (*pykA、pykF*) を破壊した株では、Ppc 及び Pck が活性化されことが報 告されている^{44,45}。CFT5 は *pykA* 及び *pykF* が破壊されているため、PEP-OAA 相互変換反応が活 性化されていると考えられる。また、Ppc 及び Pck は TCA サイクルの中間代謝物の濃度により活 性が制御されている^{46,47}。すなわち、CFT5 と GXb の細胞増殖能力の喪失は、炭素の供給不足と いうよりも、代謝物による Pck の調節を含む PEP 周辺の代謝調節に起因すると考えられる。した がって、代謝調節の予期せぬ変化が細胞増殖に与える影響を排除するためにも、解糖系及び PPP から TCA サイクルへの炭素フラックスの完全な遮断、すなわち ED 経路と PEP-OAA 相互変換の 完全な破壊が必要であると考え、破壊株の構築を試みた。

CFT5 から eda、ppc、pck、及び ppsA を破壊した株(GX1)を構築した。ppsA はピルビ ン酸を PEP へ変換する PEP シンターゼをコードしている遺伝子である。GX1 はグルコースを単 一炭素源とした M9 最小培地で生育しなかった(図 6、図 7)。GX1 をピルビン酸のみを添加した 培地(M9P 培地)及びピルビン酸とリンゴ酸を添加した培地(M9PM 培地)で培養を行った結果、 M9PM 培地でのみ増殖した(図 8)。TCA サイクルの最初の反応であるクエン酸の合成には、ピル ビン酸と OAA が必要となる。OAA とピルビン酸はリンゴ酸を介して相互に変換可能であるが、リ ンゴ酸からピルビン酸への変換反応を触媒するリンゴ酸デヒドロゲナーゼが NAD(P)*依存である ため、細胞内の補酵素バランスによって反応の方向が制御される。GX1 が M9P 培地で増殖しなか ったことから、ピルビン酸から OAA への変換反応が進行せず、TCA サイクルの第一反応であるク エン酸の合成が出来なかったと考えられる。M9PM 培地では、添加されたリンゴ酸がリンゴ酸デ ヒドロゲナーゼによって OAA に変換されることで、OAA の供給不足を補っていると考えられる。 この結果から、GX1 では PEP から TCA サイクルへの炭素フラックスが完全に破壊されており、 TCA サイクルの出発物質であるクエン酸が合成できないことが示唆された。

2-2-4 Dahms 経路の導入によるグルコース-キシロース混合糖での増殖能力の再獲得

糖を炭素源とした培地での細胞増殖能力を再獲得するため、GX1 に対して Dahms 経路を導 入した株(GX1x)を構築した。図9に培養結果を示す。GX1x はグルコース-キシロース混合糖を 炭素源とした M9 最少培地で増殖し、OD600の最大値は ATCC31882 と同程度であった。また、グ ルコースのみ、もしくはキシロースのみを炭素源とした M9 培地では GX1x は増殖しなかった。 これらの結果より、GX1x ではグルコースを単一炭素源とした場合 TCA サイクルに炭素が供給さ れず、細胞増殖に必須な代謝物合成やエネルギー生産等に支障をきたすことが示唆された。また、 グルコース-キシロース混合糖では、Dahms 経路によりピルビン酸及びグリオキシル酸が供給され ることで TCA サイクルへの炭素供給を行い、増殖できることが確認された。キシロースを単一炭 素源とした条件では GX1x が増殖しなかったが、これは内因性のキシロース異化経路(XyIA 及び XyIB)の活性が不十分なためであると推察した。そこで GX1x に由来し、XyIA 及び XyIB を過剰発 現する株(GX1xAB)を構築した。予想に反して、GX1xABはキシロースを単一炭素源とした M9 最小培地では増殖しなかった (図 10)。さらに、Dahms 経路酵素 (Xdh、XyIC、YjhH、及び YjhG) 及び/又は内因性キシロース異化経路の酵素(XyIA 及び XyIB)を過剰発現する CFT5 に由来する 株も、同様の条件において成長しなかった(図10)。次に XyIA 及び XyIB を過剰発現する GX1 に 由来する株 (GX1AB)、GX1x、GX1xAB の3株を、酵母エキスを添加した高栄養培地を用いて、 キシロースを糖源として培養した。その結果、GX1x 及び GX1xAB はこの培地で増殖し、特に GX1xAB の OD₆₀₀は GX1x の 2 倍以上に達した。一方、GX1AB はこの条件で増殖しなかった。こ れらの結果から、GX1x 及びそれに由来する株は、内在性のキシロース資化経路(XyIA、XyIB)が +分に機能せず、PPP や解糖系への炭素フラックスが不十分であるため、増殖できなかったので はないかと考えられる。(図 11)

2-2-5 PMPE 株の代謝解析

PMPE が代謝に与える変化を調査するため、CFT5x、GX1x 及び対象株として ATCC31882 に pZE12-x を導入した株(ATCC31882x)を、次の条件で培養・分析した。初期 OD₆₀₀=0.05 で 培養を開始し、細胞を 5.5 時間(ATCC31882x)または 14 時間(CFT5x 及び GX1x)に回収した。 回収したサンプルを LC-MS にて分析し、G6P、フルクトース 6-リン酸(F6P)、フルクトース 1,6ビスリン酸(F16BP)、3-ホスホグリセリン酸(3PG)、2-ホスホグリセリン酸(2PG)、PEP、ピ ルビン酸、6-ホスホグルコン酸(6PG)、リブロース 5-リン酸(Ru5P)、リボース 5-リン酸(Ro5P)、 セドヘプツロース 7-リン酸(S7P)、及びエリトロース 4-リン酸(E4P)の定量を行った。

図 12 に、ATCC31882x を基準とした、OD₆₀₀ あたりの代謝物の相対量を示す。GX1x では、 PEP の蓄積量が ATCC31882x と比較して 28.6 倍、CFT5x と比較して 5.2 倍増加した。CFT5x で は ATCC31882x よりも PEP の蓄積量が増加したが、同時にピルビン酸の蓄積量も増加した。一 方、GX1x に蓄積されたピルビン酸は ATCC31882x と同程度であった。ATCC31882x と CFT5x の 間で、3PG と 2PG の合計量に有意差は認められなかったが、GX1x では ATCC31882x と比較して 2.0 倍増加した。また、CFT5x 及び GX1x に蓄積された F16BP は、ATCC31882 よりも有意に低 かった。

PEP は F6P から F16BP を合成する 6-ホスホフルクトキナーゼ1 (*pfkA*) を阻害し、F16BP から F6P を合成するフルクトース 1,6-ビスホスファターゼ (*fbp*) を活性化する ^{48,49}。CFT5x 及び GX1x における F16BP の蓄積量低下は、PEP の蓄積が原因であると考えられる。すなわち、PEP の蓄積は解糖系のフラックスを低下させ、PPP のフラックスを強化すると考えられる ⁵⁰。実際に、GX1x では、PPP の中間代謝物である、6PG、Ru5P、Ro5P、及び S7P が ATCC31882x よりも大幅に増加した。

また、LC-MS を用いて各菌株における ATP、ADP、AMP、NADH、NAD+、NADPH、及び NADP+のレベルを調査した(図 13)。GX1x では、ATP レベルは ATCC31882x 及び CFT5 と比較 して大幅に減少した。GX1x の NADH レベルは ATCC31882x と比較して有意に減少し、NADH は CFT5x で検出限界以下であった。これらの結果は、TCA サイクルにおける NADH 再生が制限され ており、酸化的リン酸化による ATP 合成が十分に機能しなかったことを示唆している。さらに、 CFT5x 及び GX1x の NADPH は検出限界以下であった。シキミ酸デヒドロゲナーゼは 3-デヒドロ シキミ酸から 1 モルのシキミ酸を合成する際に 1 モルの NADPH を消費する。CFT5x 及び GX1x における NADPH レベルの低下は、シキミ酸経路の強化によって NADPH の消費量が増大したた めであると考えられる。

2-2-6 PMPE 株によるグルコース-キシロース混合糖からの MA 生産

GX1x 由来の株を用いて、シキミ酸経路を介した MA 生産を試みた。MA 生産経路には第一 章における経路 3 を用いた。経路 3 は、すべての MA 合成経路の中で最も理論収率が高い(0.68 g/g-グルコース)⁵¹。経路 3 の酵素群を発現する、最適化されたプラスミド(pSAK-MA)を構築 しGX1x 及び CFT5x に導入することで、GX1xMA 及び CFT5xMA を構築した。また、グルコース 及びキシロースを同時に資化可能な株のコントロールとして、CTR2 株を構築した。CTR2 は、 ATCC31882 から、CCR 及び Phe 生産に関与する *ptsG* 及び *pheA* を破壊することにより構築し た。この CTR2 に pSAK-MA を導入することで、CTR2MA を構築した。図 14 及び図 15 に、グル コース-キシロース混合糖を炭素源として用いた M9 最小培地での GX1xMA、CFT5xMA 及び CTR2MA の培養結果を示す。GX1xMA 株は、96 時間の培養後に 1.60 ± 0.08 g/L の MA を産生 し、72 時間後における消費グルコースあたりの MA 収率は 0.30 ± 0.02 g/g であった (図 15)。 CFT5xMA 株は、80 時間の培養後に 0.71 ± 0.22 g/L の MA を産生し、60 時間後における消費グ ルコースあたりの MA 収率は 0.12 ± 0.05 g/g であった (図 15)。CTR2MA は培養 48 時間後に 0.53 ± 0.01 g/L の MA を生産し消費グルコースあたりの MA 収率は 0.09 ± 0.00 g/g であった (図 14)。GX1xMA のグルコースからの MA 産生量は、それぞれ CFT5xMA 株及び CTR2MA 株よ り 2.3 倍及び 3.0 倍高く、収量は CFT5xMA より 2.6 倍高かった。これらの結果から、TCA サイク ルへの炭素フラックスを完全に遮断する PMPE が、MA 産生の改善に有効であると示唆された。

2-2-7¹³C 標識化グルコースによる MA 生産株の炭素フラックス解析

PMPE 株におけるグルコース及びキシロースの代謝フラックスを分析するために、GX1xMA を[U-¹³C]標識化グルコースと非標識キシロースを含む M9 最小培地で培養した。培養後、培養上 清中の MA と 5 つの主要なアミノ酸(ヒスチジン、グリシン、アラニン、グルタミン酸、及びリジ ン)を GC-MS で分析した。培養液の初期 OD₆₀₀=0.5 とし、OD₆₀₀ が 2.40±0.47 に達したときに 細胞を回収し GC-MS 分析を行った。図 16 に、それぞれの代謝物のアイソトポマー分布を示す。 MAは¹³Cで完全に標識されており、生成されたMAが全てグルコースに由来することを示してい る。またヒスチジンの構成炭素は¹³ C でほぼ完全に標識されていた。ヒスチジンは、PPP 中間体 5-ホスホリボシルニリン酸から合成される。この結果は、PPP への炭素フラックスはグルコース にのみ由来し、キシロースは PPP で使用されなかったことを示唆している。一方、アラニン、グ ルタミン酸、及びリジン中の¹³Cで標識された炭素の割合は非常に低かったことから、これらのア ミノ酸は、非標識キシロースから合成されたと考えられる。これらの結果は、大腸菌の内因性キシ ロース異化経路(すなわち、XyIA 及び XyIB)を保持していても、キシロースのほとんどが Dahms 経路を介して異化されていることを示唆しており、2-2-4の結果と一致する。キシロース異化に関 連する内因性遺伝子の偶発的な活性化を防ぐために、xyIA及び xyIB が破壊された GX1xMA 由来 の GX2xMA 株を構築した。GX2xMA 株の ¹³C 代謝分析を行ったところ、GX1xMA と同様の代謝プ ロファイルが得られた(図 16)。この結果は、xyIABの有無に関わらず、解糖系または PPP の中 間体に由来する代謝産物が、キシロースから合成されていないこと示唆している。また、予想に反 して、グリシンとアラニンでは標識炭素原子と非標識炭素原子の両方が検出された。これは、sdaA によってコードされたセリンデアミナーゼ (SDA) によって触媒される、セリンとピルビン酸の相 互変換によって引き起こされたと考えられる⁵²。セリンとピルビン酸の相互変換は、グルコースに 由来する解糖系及び PPP とキシロースに由来する TCA サイクルの「接合部」であると考えられ る。GX1xMA の sdaA を破壊した株である GX3xMA を構築したが、 GX3xMA 株は、混合糖を含 む M9 最小培地では増殖できなかった。これらの結果は、SDA によって媒介される炭素代謝が M9

最小培地での GX1 由来株の成長に不可欠であるが、グルコースもしくはキシロース由来の炭素の 混入が限定的であることから、「接合部」からの炭素漏出の割合は大腸菌の代謝全体の炭素フラッ クスに対して小さいため、PMPE に対して与える影響が小さいことを示唆している。

2-2-8 PMPE 株による MA 生産のための培養条件検討

MA 生産量の向上を目指し、GX1xMA を使用して最適なグルコース:キシロース比を検討し た。GX1xMA を、200 mL フラスコで糖濃度 20 g/L、酵母エキス 5 g/L を含む培地(M9Y 培地) を使用して培養した。全糖に対するグルコースの比率は、0%、25%、50%、75%、または100% で培養を行った。図 17 にそれぞれの条件での培養結果を示す。予想された通り、グルコースまた はキシロースのみを含む培地では十分に増殖しなかった。これは 2-2-4 に示した結果と一致して いる。細胞増殖にはグルコースとキシロースの両方が必要であり、十分な増殖には 50%を超える グルコース含有量が必要であった。GX1xMA は、25%、50%、75%のグルコース含有培地で 48 時 間培養後、それぞれ 0.84、1.94、3.13 g/L の MA を生産した。消費したグルコースに対する MA 収率はこれらのグルコース比の間で大きな差は見られなかった。また、[U-¹³C]グルコースと非標 識キシロースを基質として使用した M9Y 培地においても、生成された MA は ¹³C で完全に標識さ れていた(図 18)。M9Y 培地を用いてグルコース:キシロース比を最適化することにより生産量 は増加したが、収率は M9 最小培地を用いた試験管培養と比較して減少した(生産量 1.60 ± 0.08 g/L、収率 0.30 ± 0.02 g/g)。25%、50%、75%グルコース含有培地での MA の最大生産性は、そ れぞれ 0.078、0.072、0.114 g/L/h であった。MA 合成経路の中間体(PCA 及びカテコール)及び シキミ酸経路誘導体(Phe、Tyr、Trp、p-アミノ安息香酸、及び p-ヒドロキシ安息香酸)は培地中 に検出されず、これらの経路が律速段階ではないことが示唆された。また、培養上清中に有機酸が 副産物として蓄積されていることが確認された(図 19)。特に、培地中のキシロース比が増加する と、酢酸及び乳酸の生成が認められ、25%グルコース培地(グルコース:キシロース=1:3)では、 48 時間の培養後に 1.87 g/L の酢酸と 1.29 g/L の乳酸が生成された。これは過剰に消費されたキ シロースがこれらの有機酸にオーバーフローしたためであると考えられる。酢酸の蓄積は、PEP の蓄積によるリン酸アセチルトランスフェラーゼ(Pta)の活性化によって引き起こされたと考え られる。Pta はピルビン酸をアセチルリン酸に変換し、アセチルリン酸は酢酸キナーゼによって酢 酸に変換される。PEP は Pta の制御因子として機能し、リン酸アセチルの生成を活性化し、逆反 応を抑制する⁵³。乳酸の蓄積は、pHの低下によって引き起こされた可能性がある。全てのグルコ ース含有率において、72時間の培養後、pHは5.0未満に低下した(グルコース0%、25%、50%、 75%において pH 4.59、pH 4.46、pH 4.85、pH 4.98)。低 pH 条件は、ピルビン酸を乳酸に変換す る乳酸脱水素酵素を活性化するため、これにより酢酸が蓄積したと考えられる54。さらに、キシロ ン酸及びグリオキシル酸の蓄積は、キシロース濃度に比例して増加した。キシロースを単一炭素源 として含む培地の場合、72時間の培養後に11.11 g/Lのキシロン酸が生成された。キシロン酸の

蓄積は、Dahms 経路を介した物質生産において、収率を低下させる共通の問題である⁵⁵⁻⁵⁸。キシ ロン酸の蓄積を減らす戦略としては、ラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼ (AldA) の過剰発現が考 えられる。Dahms 経路を介して合成されたグリコールアルデヒドは、AldA によりグリコール酸に 変換され、グリコール酸はグリコール酸オキシダーゼによりグリオキシル酸に変換される。 Cabulong 氏らは、AldA を過剰発現させることで、Dahms 経路を用いたキシロースからのグリオ キシル酸生産を向上させることに成功している⁵⁷。したがって、AldA とグリコール酸オキシダー ゼを過剰発現させ、グリコールアルデヒドからグリオキシル酸に流れる炭素フラックスを強化す ることで、キシロン酸の蓄積を改善できる可能性がある。一方、グリオキシル酸蓄積は、アセチル CoA の不足によるものであると考えられる。グリオキシル酸とアセチル CoA は、リンゴ酸シンタ ーゼによってリンゴ酸塩に変換される。アセチル CoA はピルビン酸から合成されるが、酢酸が蓄 積していることから、ピルビン酸がアセチル CoA ではなく酢酸の生成に利用されていると考えら れる。Pta の破壊及びリンゴ酸をピルビン酸に変換するリンゴ酸デヒドロゲナーゼの過剰発現によ り、グリオキシル酸の蓄積を解消できる可能性がある。

第一章でも述べたように、pHの最適化は MA 生産にとって重要である。そこで、グルコース 75% 培地に培養 24 時間時点で CaCO₃ を終濃度 10 g/L となるように添加した条件で GX1xMA の培養を行った。この条件下で、GX1xMA 株は、72 時間培養後に 4.09±0.14 g/L の MA を生産し、CaCO₃ 添加なしの条件と比較して生産量は 1.31 倍増加した(図 17)。消費したグルコースに対する MA 収率は培養 80 時間後に 0.31 ± 0.003 g/g に達し、M9 最小培地と同じレベルまで改善された。理論収率(0.68 g/g)と比較すると依然として低い値であるが、これはグルコースからの炭素がシキミ酸経路のより下流の代謝物に流れた、またはそれらの代謝物の分解によりバイオマスのターンオーバーが起こったためであると考えられる。生産量及び収率をさらに増加させるには、MA 合成経路(経路 3)と競合する代謝経路を破壊する必要があり、シキミ酸デヒドロゲナーゼをコードする aroEと vdiB などが候補として考えられる^{17.51}。

ここまでの結果において、PMPE株(GX1xMA)を使用した MA 生産の有用性を実証した。 図 15 及び図 17 は、GX1xMA 株では CCR がほぼ解消され、グルコースとキシロースが同時に消 費されたことを示す。これまでの CCR の解除に関する多くの研究では、XyIAB を介してキシロー スを異化している。一般に、XyIAB によって触媒されるキシロース代謝経路は、解糖系を介したグ ルコース異化作用よりも活性が低い。Dahms 経路を利用した PMPE 株では、キシロースを効率的 に代謝し、細胞増殖と高い MA 生産を両立させることに成功した。さらに、PMPE の戦略は、複 数の菌株を用いる共培養と比較して、プロセスを簡略化するといった利点を有する²¹。

2-2-9 PMPE 株による好気及び微好気条件下での Tyr 生産

シキミ酸経路における PMPE の汎用性を確認するために、PMPE 株を使用して Tyr の生産 を試みた。フィードバック耐性変異を加えたコリスミ酸ムターゼ/プレフェン酸デヒドロゲナーゼ

をコードする *tvrA^{for}を*発現するプラスミドを構築し、これを CFT5x 及び GX1x に導入することで、 CFT5xTYR 及び GX1xTYR を構築した。これらの株をグルコース 3.75 g/L 及びキシロース 1.25 g/L を含む M9Y 培地で培養した。好気条件では、GX1xTYR 株は 96 時間の培養後に 1.34 ± 0.05 g/Lの Tyr を生成し、CFT5xTYR と比較して 1.73 倍増加した(図 20)。CFT5xTYR 及び GX1xTYR の Tyr の最大生産速度は、それぞれ 0.026 及び 0.021 g/L/h であった。CFT5xTYR 及び GX1xTYR の培養上清中に蓄積したキシロン酸、グリオキシル酸、乳酸、及び酢酸は検出限界以下であった。 GX1xTYR の消費グルコースに対する Tyr 収率は培養 96 時間後に 0.35 ± 0.01 g/g に達した。こ れは、CFT5xTYRと比較して 2.15 倍増加しており、細胞増殖を考慮しない場合の理論収率(0.55 g/g)の64%に達した⁵⁹。微好気条件では、GX1xTYR と CFT5xTYR はそれぞれ0.32 ± 0.02 g/L (培養 96 時間後) と 0.40 ± 0.02 g/L (72 時間)の Tyr を生成した (図 20)。GX1xTYR におけ る消費グルコースに対する Tyr 収率は 0.32 ± 0.10 に達し、CFT5xTYR と比較して 5.22 倍増加し た。これらの結果から、PMPE が微好気条件でも収率を改善する有望な戦略であることが示唆さ れた。Juminag 氏らは、Tyr 生合成経路のボトルネック反応(AroB 及び AroK)を解消することに より、Tyr の生産を改善した⁶⁰。最適化された株は 2.17 g/L の Tyr を生成し、これは理論収量の 80%に相当する。PMPE 株ではシキミ酸経路内の酵素の過剰発現や最適化を行っていないが、高 い Tyr 収率を達成した。これは、シキミ酸経路と競合する TCA サイクルへの炭素の流れを遮断す ることで、シキミ酸経路の酵素発現を最適化することなく収率の向上が可能であることを示して いる。PMPE 株のシキミ酸経路酵素の発現を最適化することで Tyr 産生の更なる改善が期待でき る。また、第一章で述べたように、シキミ酸経路誘導体の収率低下の主な理由として、シキミ酸経 路の最終産物であるコリスミ酸から生産される副産物の生成が挙げられる。第一章ではコリスミ ン酸シンターゼとイソコリスミン酸シンターゼの融合によりこの問題を改善した。融合タンパク 質の技術と PMPE を組み合わせることで、Tyr 生産を含むシキミ酸経路誘導体生産のさらなる改 善が期待される。

2-2-10 非シキミ酸経路代謝物への PMPE の応用

シキミ酸経路以外の代謝経路を経て合成される代謝物の生産に対して、PMPE が応用可能 であることを実証するため、PMPE 株を用いて 1,2 プロパンジオール (12PD) の生産を試みた (図 21)。*Bacillus subtilis* 由来のメチルグリオキサルシンターゼ、大腸菌内在のグリセロールデヒド ロゲナーゼ、及び 12PD オキシドレダクターゼをそれぞれコードする *Bs_mgsA、gldA、*及び *fucO* を含むプラスミド pSAK-PD を構築し、これを GX1x 及び CTR2PD に導入することで、GX1xPD 及び CTR2PD を構築した。なお、*Bs_mgsA* は大腸菌に対してコドンの最適化を行った。これらの 株を、グルコース 20 g/L、キシロース 5 g/L を含む M9Y 培地で、微好気性条件で培養した。培養 結果を図 22 に示す。培養 96 時間後において、GX1xPD は 0.53 ± 0.01 g/L の 12PD を生産し、 これは CTR2PD と比較して 1.40 倍の値であった。12PD の最大生産速度は CTR2PD 及び GX1xPD において 0.010、 0.015 g/L/h であった。GX1xPD の消費したグルコース当たりの 12PD 収率は、 培養 96 時間後で 0.53 ± 0.16 g/g であり、CTR2PD と比較して 11.4 倍であった。この収率は細 胞増殖を考慮しない場合の理論収率(0.84 g/g)の約 62%に相当する⁶¹。Jain 氏らはトリオースリ ン酸イソメラーゼをコードする遺伝子である *tpiA* を破壊することで、大腸菌による 12PD の生産 量の向上に成功している⁶²。しかしながら *tpiA* 欠損株では最大で 1 モルのグルコースから 1 モル の 12PD が生産可能であり、理論収率は 0.42 g/g である。GX1xPD では *tpiA* 欠損株の理論収率を 上回る収率で 12PD を生産しており、PMPE がグルコースからの 12PD 生産量の向上に有効な戦 略であることを示している。GX1 はシキミ酸経路誘導体生産に最適化された代謝デザインのため、 12PD 生産をさらに向上させるには、代謝の最適化が必要である。例えば、NADH 再生を向上させ ることは必須である。1 モルの 12PD を生産する場合、2 モルの NADH が消費される。PMPE 株 における NADH レベルは非常に低いため、 NADH/NAD⁺の酸化還元バランスを改善することに より、12PD 生産量のさらなる増加が期待できる。

2-3 結言

本章では PMPE がグルコース-キシロース混合糖の効率的な利用を可能にし、この戦略がシ キミ酸経路誘導体の生産に適用できることを実証した。TCA サイクルへの炭素フラックスの完全 な遮断によって引き起こされる細胞増殖能力の欠損は、Dahms 経路を導入することで回復可能で あることを示した。PMPE 株では、TCA サイクルから合成される必須代謝物は Dahms 経路を介 してキシロースから供給し、グルコースが目的の代謝物生産に使用することで、高収量での MA 及 び Tyr の生産が達成された。一方で、細胞増殖速度の改善や、キシロン酸を含む有機酸蓄積の改善 は、PMPE 株における課題である。Dahms 経路において、キシロン酸デヒドロゲナーゼが律速酵 素であるため、大腸菌内在の YagF など、より酵素活性が高いアイソザイムの利用により、改善が 期待される。また、グリオキシル酸の蓄積も解決すべき問題である。例えば別のキシロース異化経 路である Weimberg 経路はグリオキシル酸を生成せずに、キシロースから α-ケトグルタル酸を供 給する。Weimberg 経路を使用した PMPE は、検討の価値があるといえる。

本章ではシキミ酸経路に焦点を当て、PEP と TCA サイクルを代謝的に分断するデザインを 構築した。代謝を分断する点を変更することにより、PMPE はピルビン酸、アセチル CoA、及び 解糖系の上流代謝物から分岐する他の経路に適用できると考えられる。本章で開発した、シキミ 酸経路に最適化された PMPE 株を用いて、12PD の生産量を向上できることも実証したが、目的 生産物に合わせた PMPE 株を開発することで更なる生産量の向上が期待される。本章で実証した PMPE は、シキミ酸経路だけでなく様々な経路から合成される代謝物の生産に、大きく貢献する と期待される。 培地

LB 培地にはグルコース 20 g/L、トリプトン 10 g/L、乾燥酵母エキス 5 g/L、NaCl 5 g/L を 含む。M9 最小培地には、1L あたりグルコース 20 g、NaCl 0.5 g、Na₂HPO₄ · 12H₂O 17.1 g、 KH₂PO₄ 3 g、NH₄Cl 1g、MgSO₄ · 7H₂O 246 mg、CaCl₂ · 2H₂O 14.7 mg、FeSO₄ · 7H₂O 2.78 mg、 チアミン塩酸塩 10 mg に加え、Tyr 40 mg、Trp 40 mg、及び Phe 100 mg(ATCC31882 はこれら のアミノ酸に対して栄養要求性であり、CFT5 派生株は Phe に対して栄養要求性であるため)を含 む。M9P 培地は M9 最少培地に 10 mM ピルビン酸ナトリウムを添加して作製した。M9PM 培地 は M9P 培地に 10 mM のリンゴ酸を添加して作製した。フラスコ培養での MA 生産には、M9Y 培 地を用いた。M9Y 培地は M9 最少培地に 5 g/L の酵母エキスを添加して作製した。PH 制御下での試 験管培養では、オートクレーブ処理した 500 g/L CaCO₃(蒸留水に分散)を培養液に加え、最終 濃度を 10 g/L とした。フラスコ培養による Tyr 生産では、Tyr を除いた M9Y 培地を用いた。すべ ての培地において、必要に応じて、アンピシリン 100 mg/L、クロラムフェニコール 30 mg/L を 添加した。

培養条件

15 mL 試験管、浸透速度 220 rpm、37°Cで1日間、4 mL LB 培地で前培養した。前培養液 は 12000 rpm × g 、3 min 遠心分離し、糖を含まない M9 最少培地で1 度洗浄した。洗浄した菌 体ペレットを本培養で用いる培地に懸濁させ、初期 OD₆₀₀ = 0.1 となるように植菌した。好気条件 における試験管培養は、 37°C、浸透速度 220 rpm にて行った。微好気条件における試験管培養で は、スクリューキャプ付き試験管を用い浸透速度 150 rpm で培養を行った。pH 制御下でのフラス コ培養では、植菌後 24 時間で CaCO₃を培地に添加した。フラスコ培養では 200 mL フラスコを 用い、培養体積 10 mL にて行った。12PD 生産では、30 °C、微好気条件の試験管培養にて行った。

プラスミド構築

本章で用いたプラスミドを表 1 に示す。プラスミドのクローニングには *E. coli* NovaBlue (Novagen, Cambridge, MA, USA)を用いた。ポリメラーゼ連鎖反応は KOD FX Neo (TOYOBO, Osaka, Japan)を用いた。Custom DNA オリゴヌクレオチドプライマーは Invitrogen Custom DNA Oligos (Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan)にて合成した (表 2)。コドンの最適化及び人工 遺伝子合成 (*xdh* and *xy/C* from *Caulobacter crescentus*) は Invitrogen GeneArt Gene Synthesis service (Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan)にて行った。

pZE12-x は次の手順で作製した。xdh 合成遺伝子をテンプレートとし、ブライマーpZ-xdh

Fw 及び pZ-xdh Rv を用いて PCR により増幅した。増幅した断片を pZE12-MCS の Kpnl 部位と HindIII 部位の間にクローニングし、得られたプラスミドを pZE12-xdh とした。*xylC* 合成遺伝子 をテンプレートとしプライマーpZ-xylC Fw 及び pZ-xylC Rv を用いて PCR により増幅した。増幅 した断片を pZE12-xdh の HindIII 部位と EcoRV 部位の間にクローニングし、 得られたプラスミ ドを pZE12-xdh-xylC とした。*yjhHG* 遺伝子断片は、*E. coli* MG1655 ゲノム DNA をテンプレート として、プライマーyjhH Fw 及び yjhG Rv を用いて PCR により増幅した。pZE12-xdh-xylC をテ ンプレートとし、プライマーpZ-xdh-xylC Inv. Rv 及び pZ-xdh-xylC Inv. Fw を用いてインバース PCR により増幅し、線状化 pZ-xdh-xylC 断片を得た。線状化 pZ-xdh-xylC 断片及び *yjhHG* 断片 を In-Fusion HD Cloning Kit (Takara)を用いて環状化し、得られたプラスミドを pZE12-x とした。

pSAK-ZYc は次の手順で作製した。第一章で作製した pZA23-ZYc をテンプレートとして、 プライマーZYc insert Fw 及び ZYc insert Rv を用いて PCR により増幅し、*aroZ-aroY-catA* 断片 を得た。pSAK をテンプレートとし、プライマーpZYc vector Fw 及び pZYc vector Rv を用いて、 インバース PCR により増幅し、線状化 pSAK 断片を得た。線状化 pSAK 断片及び *aroZ-aroY-catA* 断片を NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs Japan, Tokyo, Japan) を用いて環状化し、得られたプラスミドを pSAK-ZYc とした。

pSAK-*tyrA*^{fbr} は次の手順で作製した。Ptrc 断片を、pTrcHisB をテンプレートとして、プラ イマーPtrc Fw 及び Ptrc を用いて PCR により増幅した。pSAK をテンプレートとして、プライマ ーpSAK inv. Fw 及び pSAK inv. Rv を用いて、インバース PCR により増幅し線状化 pSAK 断片を 得た。Ptrc 断片及び線状化 pSAK 断片を NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix を用いて環 状化し、得られたプラスミドを pSAK-Ptrc とした。*E. coli tyrA*^{fbr} 合成遺伝子をテンプレートとし て、プライマーtyrAfbr insert Fw 及び tyrAfbr を用いて増幅し、*tyrA*^{fbr} 断片を得た。pSAK-Ptrc を テンプレートとして、プライマーpSAK-Ptrc inv. Fw 及び pSAK-Ptrc inv. Rv を用いて、インバー ス PCR により増幅し、線状化 pSAK-Ptrc 断片を得た。Ptrc 断片及び線状化 pSAK 断片を NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix を用いて環状化し、得られたプラスミドを pSAK-*tyrA*^{fbr} とした。

pSAK-PD は次の手順で作製した。*gldA* 断片は、*E. coli* MG1655 ゲノム DNA をテンプレートとし、プライマーgldA Fw 及び gldA Rv を用いて PCR により増幅した。*Bs_mgsA-gldA* 断片は *gldA* 断片及び *Bs_mgsA* 合成遺伝子をテンプレートとし、 プライマーBs_mgsA fw 及び gldA Rv を用いて、オーバーラップエクステンション PCR により増幅した。*fucO* 断片は *E. coli* MG1655 ゲノム DNA をテンプレートとし、fucO Fw 及び fucO Rv を用いて PCR により増幅した。*Bs_mgsAgldA-fucO* 断片は *Bs_mgsA-gldA* 断片及び *fucO* 断片をテンプレートとして用い、プライマー Bs_mgsA fw 及び fucO Rv を用いてオーバーラップエクステンション PCR により増幅した。 *Bs_mgsA-gldA-fucO* 断片を pSAK の Kpnl 部位と HindIII 部位の間にクローニングし、得られた プラスミドを pSAK-PD とした。

pT∆eda は次の手順で作製した。pTargetF をテンプレートとし、プライマーsgRNA eda Rv

及び sgRNA eda Fw を用いてインバース PCR により増幅した。得られた断片を In-Fusion HD Cloning Kit により環状化し、得られたプラスミドを pT Δ edaF とした。*E. coli* MG1655 ゲノム DNA をテンプレートとし、プライマーHomSeq Up eda Fw 及び HomSeq Up eda Rv を用いて PCR により増幅し、H.S. eda Up 断片を得た。*E. coli* MG1655 ゲノム DNA をテンプレートとし、 プライマーHomSeq Dw eda Fw 及び HomSeq Dw eda Rv を用いて PCR により増幅し、H.S. eda Dw 断片を得た。H.S. eda Up 断片及び H.S. eda Dw 断片をテンプレートとし、 プライマーHomSeq Dw eda Rv を用いてオーバーラップエクステンション PCR により増幅 し、H.S. eda 断片を得た。H.S. eda 断片を pT Δ edaF の EcoRI 部位及び HindIII 部位にクローニ ングし、得られたプラスミドを pT Δ eda とした。

pTΔptsG は、プライマー sgRNA ptsG Rv、sgRNA ptsG Fw、HomSeq Up ptsG Fw、 HomSeq Up ptsG Rv、HomSeq Dw ptsG Fw、及び HomSeq Dw ptsG Rv を用いて、pTΔeda と 同様の方法で作製した。pTΔppc は、プライマーsgRNA ppc Rv、sgRNA ppc Fw、HomSeqUp ppc Fw、HomSeq Up ppc Rv、HomSeq Dw ppc Fw、及び HomSeq Dw ppc Rv を用いて、pTΔeda と同様の方法で作製した。pTΔpckWas constructed by the same procedure as pTΔeda using primers sgRNA pck Rv, sgRNA pck Fw, HomSeqUp pck Fw, HomSeq Up pck Rv, HomSeq Dw pck Fw, and HomSeq Dw pck Rv. pTΔppsA は、プライマーsgRNA ppsA Rv、sgRNA ppsA Fw、 HomSeqUp ppsA Fw、HomSeq Up ppsA Rv、及び HomSeq Dw ppsA Fw を用いて、pTΔeda と 同様の方法で作製した。pTΔxJIAB は、プライマー sgRNA xJIAB Rv、sgRNA xJIAB Fw、HomSeq Up xJIAB Fw、HomSeq Up xJIAB Rv、HomSeq Dw xJIAB Fw、及び HomSeq Dw xJIAB Rv を用 いて、pTΔeda と同様の方法で作製した。pTΔsdaA は、プライマー sgRNA sdaA Rv、sgRNA sdaA Fw、HomSeq Up sdaA Fw、HomSeq Up sdaA Rv、HomSeq Dw sdaA Fw、及び HomSeq Dw sdaA Rv を用いて、pTΔeda と同様の方法で作製した。

遺伝子破壊

Jiang 氏らの報告の手法に従い、CRISPR-Cas two-plasmid system を用いて遺伝子破壊を 行った⁶³。各遺伝子破壊株は、適切なプライマーを用いてコロニーダイレクト PCR により標的遺 伝子を増幅し、*E. coli* MG1655 野生株と比較して遺伝子鎖長短くなっていることを確認した。*ptsG*、 *pheA、eda、ppc、pck、ppsA、xyIAB、*及び *sdaA* の破壊には、それぞれ pTΔ ptsG、pTΔ pheA、 pTΔ eda、pTΔ ppc、pTΔ pck、pTΔ ppsA、pTΔ xyIAB、及び pTΔ sdaA を用いた。

形質転換

各大腸菌株の形質転換は Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を用い てエレクトロポレーション法により行った(1350 kV、 600 Ω、10 μF、0.1 cm キュベットを使 用)。各大腸菌株が保持しているプラスミド等の詳細を表1に示す。

¹³Cを用いた炭素フラックス解析のためのサンプル調製

菌体サンプルを得るための本培養培地には、 $[U^{-13}C]$ グルコース及び非標識キシロースを含む M9 最小培地 (0.1-mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside を含む)を用いた。初期 OD₆₀₀ = 0.5 となるように植菌し、OD₆₀₀ が 2.0 に到達した時点でサンプルを採集した。得られたサンプルを遠心分離し、上清を MA 分析用サンプルとした。遠心分離によって得られた菌体ペレットは PBS (-)バッファーにて 2 回洗浄した後、 400 µL の 5N HCI に懸濁し、100°Cで一晩加熱した。加熱後、室温まで冷却した後に 400 µL の 5N NaOH を加えて中和した。中和液を遠心分離した後 に上清を回収し、代謝物測定サンプルとした。

MA 分析用サンプルは、20 μL を一晩真空乾燥した後、乾燥残渣に 50 μL の N-メチル-N-ト リメチルシリルトリフルオロアセトアミド及び 20 μL のピリジンを加え 37 °C、30 min 振盪し、 誘導体化を行った。誘導体化液を遠心分離した後、上清を GC-MS 分析に供した。

代謝物測定サンプルは、20 μL を一晩真空乾燥した後、乾燥残渣に 30 μL の N-*tert*-ブチル ジメチルシリル-N-メチルトリフルオロアセトアミド(1% *tert*-ブチルジメチルクロロシラン)及 び 30 μL の N,N-ジメチルホルムアミドを加え 80 °C、60 min 振盪し、誘導体化を行った。誘導体 化液を遠心分離した後、上清を GC-MS 分析に供した。

分析方法

細胞増殖、グルコース、MA、PHB、PCA 及びカテコールは 1-4 に示した方法で測定した。 乾燥菌体重量(DCW)は図 23 で求めた検量線を用いて、OD₆₀₀ から算出した。

酢酸、乳酸、及びキシロン酸は、MAと同様の条件で測定した。キシロースはグルコースと 同様の条件で測定した。Phe、Tyr、Trp、及び *p*-アミノ安息香酸、は、PHB、PCA 及びカテコー ルと同様の条件で測定した。

グリオキシル酸は Chihara 氏らの報告の手法に従い、HPLC を用いて分析した⁶⁴。次の方 法において、グリオキシル酸の誘導体化を行った。培養上清及び標品 50 μL を 950 μL のエタノ ールに混合した。サンプル-エタノール混合液 100 μL に 100 mM 1-ピレンボロン酸(溶媒:エタ ノール)50 μL 及び 200 mM メチルブチルアミン(溶媒:エタノール)50 μL を混合し、十分に撹 拌した。混合液を密閉容器にて 80°C, 1000rpm で 60min 加温振盪した。室温に冷却した後、300 μL の水を添加し、過剰なピレンボロン酸を沈殿させた。遠心分離した後、上清を HPLC 用サン プルとした。HPLC の条件を以下に示す。

移動相: A= アセトニトリル-50mM 酢酸バッファー(pH 4.0, 35:65)混合液

B=アセトニトリル (1.0 mL/min)

グラジエント: A:B = 100:0 (0-15 min)

A:B = 0:100 (15-15.5 min)

A:B = 0:100 (15.5-26 min)

カラム: 5C₁₈-MS-II column

 $(5 \ \mu m)$, L × I.D. = 250 × 4.6 mm, Nacalai Tesque)

カラム温度: 30 ℃

検出器: UV-VIS detector (450 nm)

¹³C 標識化グルコースを用いた炭素フラックス解析は、GC-MS-QP2010 Ultra instrument (Shimadzu) を用いたガスクロマトグラフィー-質量分析法(GC-MS)を用いて行った。分析条件 を以下に示す。

カラム: CP-Sil 8 CB-MS capillary column

(film thickness, 0.25 μ m; L \times I.D., 30 m \times 0.25 mm; Agilent)

キャリアガス: ヘリウム(流速 2.1 mL/min)

注入量:1 µL (スプリット比 1:10)

インターフェース温度: 300°C

イオン源温度:150°C

イオン化法:電子イオン化(70 eV)

GC-MS による MA 分析は次のように行った。

オーブン温度: held at 150 °C for 1 min) raised to 240 °C at 15 °C/min raised to 300 °C at 120 °C/min held at 300 °C for 3 min

アミノ酸分析は次のように行った。

オーブン温度: held at 150 °C for 5 min raised to 300 °C at 10 °C/min

held at 300 °C for 5 min

PMPE 株の代謝解析

グルコース 10 g/L 及びキシロース 10 g/L を含む M9Y 培地を用いて、それぞれの株を培養 し、対数増殖期においてサンプリングを行った(ATCC31882x, 5.5 h; CFT5x, 14 h; GX1x, 14 h)。 サンプル 2 mL を迅速にフィルター濾過し、菌体を回収した。Shirai 氏らの報告の手法に従い、抽 出混合液 (CHCl3:CH3OH:H2O, 2:2:1, v/v/v)を用いて代謝物の抽出を行った⁶⁵。15,000 × g、4 °C、 15 min 遠心分離後、上清 400 μ L を回収した。抽出液を LCMS-8040 triple quadrupole LC/MS/MS spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan)を用いた液体クロマトグラフィー-質量分析法を用いて 代謝物の定量を行った。 2-5 図表



Fig. 1. The concept of "parallel metabolic pathway engineering." (a) Glucose and xylose carbon fluxes in common strains. Glucose and xylose are catabolized by the same pathways, glycolysis and the pentose phosphate pathway, and a large amount of the liberated carbon is used to synthesize biomass constituents and produce energy. (b) Glucose and xylose carbon fluxes in the engineered "parallel metabolic pathway" strain. Metabolic pathways of glucose and xylose do not intersect, making them metabolically "parallel." Blue, yellow, and green arrows represent carbon flow from glucose, xylose, and both, respectively. The red-bordered yellow arrow represents the introduced exogenous xylose catabolite pathway. The thickness of arrows represents the proportion of carbon flow. Red crosses and dotted lines indicate the disruption of metabolic pathways.



Fig. 2. Diagram of the xylose catabolite pathway. Green and blue framed pathways are the Dahms and isomerase pathways, respectively.



Fig. 3. Growth of the CFT5 strain. (A) Blue, gray, and yellow symbols indicate M9 minimal medium supplemented with glucose, a glucose–xylose mixture, and xylose, respectively. (B) Green, blue, and yellow symbols indicate the use of minimal medium containing glucose supplemented with 10-mM sodium pyruvate, 10-mM sodium malate, and mixture of 5-mM pyruvate and 5-mM malate, respectively. The data are presented as the average of three independent experiments, and error bars indicate standard errors.



Fig. 4. Strain construction and cell growth examination. (a) Metabolic design of CFT5x. (b) Bacterial cell growth. Blue, black, and red symbols indicate the growth of the CFT5x strain and ATCC31882 cultured in medium supplemented with glucose, a glucose–xylose mixture, and xylose, respectively. (c) Glucose and xylose consumption. Filled blue symbols indicate glucose consumption in glucose-containing medium. Filled red symbols indicate xylose consumption in xylose-containing medium. Open blue and open red symbols indicate glucose and xylose consumptions in mixed sugar-containing medium, respectively. G6P, glucose-6-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; E4P, erythrose 4-phosphate; DHS, dehydroshikimate; and Gluconate-6P, gluconate-6-phosphate. The data are presented as the average of three independent experiments, and error bars indicate standard errors.



Fig. 5. Growth of the CFT5 derived strain expressing each Dahms pathway enzyme in M9 minimal medium containing glucose as a sole carbon source. Green, blue, and yellow symbols indicate the bacterial cell growth of CFT5 harboring pZE12-*xdh*, CFT5 harboring pZE12-*CcxylC*, and CFT5 harboring pZE12-*yjhHG*, respectively.



Fig. 6. Metabolic pathway and growth of CFT5-derived strains. " Δ " indicates gene disruption. Orange highlighted "+" indicates that the strain grew in M9 minimal medium with glucose as the sole carbon source. ED Pathway, Entner–Doudoroff Pathway; PEP, phosphoenolpyruvate; E4P, erythrose 4-phosphate; and 6PG, 6-phosphogluconate.



Fig. 7. Bacterial cell growth in M9 minimal medium with glucose as the sole carbon source. (A) Time courses of cell growth. (B) Cell density after 72 h of cultivation. The data are presented as the average of three independent experiments, and error bars indicate standard errors. P values are computed using the two-tailed Student's *t*-test (**P < 0.01).



Fig. 8. The growth of the GX1 strain. Red and orange symbols indicate M9 minimal medium supplemented with pyruvate (M9P) medium and M9P minimal medium supplemented with 10-mM malate (M9PM), respectively. The data are presented as the average of three independent experiments, and error bars indicate standard errors.



Fig. 9. Examination of the growth of the strain in which the Dahms pathway was introduced. (a) Metabolic design of the GX1x strain. (b) Bacterial cell growth in minimal medium. Gray, blue, and orange symbols indicate the growth of the GX1x strain cultured in medium containing only glucose, a glucose–xylose mixture, and xylose alone, respectively. Yellow symbols indicate the growth of the GX1 strain (i.e., a strain lacking the Dahms pathway) cultured in medium containing a glucose–xylose mixture. Black symbols indicate the growth of the ATCC31882 (control strain) cultured in medium containing a glucose–xylose mixture. G6P, glucose-6-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; E4P, erythrose 4-phosphate; and DHS, dehydroshikimate. The data are presented as the average of three independent experiments, and error bars indicate standard errors.



Fig. 10. The effect of overexpressing XylA and XylB on the cell growth in M9 minimal medium with xylose as a sole carbon source. Green, blue, and yellow symbols indicate the bacterial cell growth of CFT5 harboring pZA23-*xylAB*, CFT5 harboring pZE12-*xdh*-*CcxylC*-*yjhHG*, and CFT5 harboring pZE12-*xdh*-*CcxylC*-*yjhHG* and pZA23-*xylAB*. Purple symbols indicate the bacterial cell growth of GX1 harboring pZE12-*xdh*-*CcxylC*-*yjhHG* and pZA23-*xylAB*.



Fig. 11. Bacterial cell growth in the rich medium. Blue, orange, and gray symbols indicate the growth of the GX1AB, GX1x and GX1xAB cultured in the medium conteining 5 g/L of yeast extracrt supplemented with xylose, respectively. The data are presented as the average of three independent experiments, and error bars indicate standard errors.



Fig. 12. Metabolome analysis of PMPE strains. Figures indicate the specific accumulated amount of metabolites per OD_{600} , used that in ATCC31882x as a benchmark. In 3PG and 2PG, these were evaluated as a combined value. Gray, orange, and red bars indicate the results of ATCC31882, CFT5x, and GX1, respectively. The data are presented as the average of three independent experiments, and error bars indicate standard deviations.



Fig. 13. The relative abundance of ATP, ADP, AMP, NADH, NAD⁺, NADPH, and NADP⁺ in PMPE strains. (a) Blue, yellow, and orange bars indicate ATP, ADP, and AMP, respectively. (b) Dark green, and light green bars indicate NADH, and NAD⁺, respectively. (c) Dark purple, and light purple bars indicate NADPH, and NADP⁺, respectively. Figures indicate the specific accumulated amount of metabolites per OD₆₀₀. CFT5x was used as a benchmark in NADP⁺ and ATCC31882x was used as a benchmark in other metabolites. n.d., not detected. The data are presented as the average of three independent experiments and error bars indicate standard deviations.



Fig. 14. Culture profiles of CTR2MA in M9 minimal medium. (a) Black, blue, and red symbols indicate bacterial cell growth, glucose consumption, and xylose consumption, respectively. (b) MA production in CTR2MA. Black, blue, and red symbols indicate bacterial cell growth, glucose consumption, and xylose consumption, respectively. The data are presented as the average of three independent experiments, and error bars indicate standard errors.



Fig. 15. Culture profiles of *cis,cis*-muconic acid (MA)-producing strains in M9 minimal medium. (a) Black, blue, and red symbols indicate bacterial cell growth, glucose consumption, and xylose consumption, respectively. (b) Green symbols indicate the produced amounts of MA. All open and filled symbols indicate the results for the CFT5xMA and GX1xMA strains, respectively. The data are presented as the average of three independent experiments, and error bars indicate standard errors. P values were computed using the two-tailed Student's *t*-test (*, P < 0.05).



Fig. 16. ¹³C-metabolic analysis. Blue, red, and yellow bars indicate the mass isotopomer distributions of six metabolites [glycine, alanine, lysine, histidine, glutamic acid, and *cis, cis*-muconic acid (MA)] from tracer experiments with [U-¹³C]glucose and non-labeled xylose in ATCC31882xMA, GX1xMA, and GX2xMA, respectively. The vertical axis indicates the relative abundance. The horizontal axis is M+, which denotes the difference with a fully unlabeled isotopomer regarding the m/z of a mass fragment (fully unlabeled isotopomer, M+ = 0). The maximum value of M+ for each metabolite is the number of constituent carbons of the metabolite in the mass fragment. Red closed crosses indicate disrupted metabolic pathways in the GX1 and GX2 strains. Red open cross indicates the disrupted metabolic pathway in the GX2 strain. G6P, glucose-6-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; E4P, erythrose 4-phosphate; and α KG, alpha-ketoglutarate. The data are presented as the average of three independent experiments, and error bars indicate standard errors.


Fig. 17. Culture profiles of the GX1xMA strain in M9 minimal medium containing 20-g/L sugar(s) and 5-g/L yeast extract. (a) Bacterial cell growth. (b) Produced amounts of MA. (c) Glucose consumption. (d) Xylose consumption. (e) Production yield of *cis,cis*-muconic acid (MA) from glucose (g of produced MA/g of consumed glucose). Red, orange, yellow, purple, and blue symbols indicate the results of cultivation in 0%, 25%, 50%, 75%, and 100% glucose medium, respectively, in a–h. (f) Culture profiles of the GX1xMA strain with the addition of CaCO₃. The final sampling time is after 80h cultivation. Blue, red, and yellow symbols indicate the glucose concentration, xylose concentration, and the produced amount of MA, respectively. The data are presented as the average of three independent experiments, and error bars indicate standard errors.



Fig. 18. ¹³C-metabolic analysis of produced *cis,cis*-muconic acid (MA) in the flask fermentation of the GX1xMA strain. Orange bars indicate the mass isotopomer distributions of MA from tracer experiments with [U- 13 C]glucose and non-labeled xylose in the GX1xMA strain. The vertical axis presents relative abundance. The horizontal axis is M+, which denotes the difference with a fully unlabeled isotopomer, in m/z of a mass fragment (fully unlabeled isotopomer, M+ = 0). The maximum value of M+ is the number of constituent carbons of MA in the mass fragment. The data are presented as the average of three independent experiments, and error bars indicate standard errors.



Fig. 19. Culture profiles of the GX1xMA strain in M9 minimal medium containing 20-g/L sugar(s) and 5-g/L yeast extract. (a) Acetate accumulation. (b) Lactate accumulation. (c) Glyoxylate accumulation. (d) Xylonate accumulation. (e) Xylonate accumulation in 75% glucose medium with CaCO₃ addition condition. Red, orange, yellow, purple, and blue symbols indicate the results of cultivation in 0%, 25%, 50%, 75%, and 100% glucose medium, respectively, in a–d. The data are presented as the average of three independent experiments, and error bars indicate standard errors.



Fig. 20. Cultures profiles of L-tyrosine-producing strains. (**a**, **b**) aerobic condition. (**c**, **d**) micro-aerobic condition. (**a**, **c**) Black, blue, and red symbols indicate bacterial cell growth, glucose consumption, and xylose consumption, respectively. (**b**, **d**) Green symbols indicate the produced amounts of L-tyrosine. All open symbols and filled symbols indicate the results for the CFT5xTYR and GX1xTYR strains, respectively. The data are presented as the average of three independent experiments, and error bars indicate standard errors. P values were computed using the two-tailed Student's *t*-test (*, P < 0.05; **, P < 0.01).



Fig. 21. Diagram of metabolic pathway incruding 1,2-propanediol synthesis pathay. ED Pathway, Entner– Doudoroff Pathway; PEP, phosphoenolpyruvate; F16BP, fructose 1,6-biphosphate; G3P, Glyceraldehyde 3phosphate; DHAP, Dihydroxyacetone phosphate; and 6PG, 6-phosphogluconate.



Fig. 22. Culture profiles of 1,2-propanediol-producing strains in M9 minimal medium. (a) Black, blue, and red symbols indicate bacterial cell growth, glucose consumption, and xylose consumption, respectively. (b) Green symbols indicate the produced amounts of 1,2-propanediol. All open and filled symbols indicate the results for the CTR2PD and GX1xPD strains, respectively. The data are presented as the average of three independent experiments, and error bars indicate standard errors. P values were computed using the two-tailed Student's *t*-test (*, P < 0.05; **P < 0.01).



Fig. 23. Calibration curve for obtaining DCW from OD.

1	2		
Strains and Plasmids	Genotype	Source or reference	
Strains			
Nova Blue	endA1 hsdR17(rK12-mK12 ⁺) supE44 thi-I gyrA96 relA1 lac recA1/F' [proAB ⁺ lacIq Z Δ M15::Tn10(Tet		
	<i>r)]</i> ; used for gene cloning		
ATCC31882	L-Phenylalanine-overproducing strain	ATCC	
CTR2	ATCC31882 $\Delta ptsG \Delta pheA$	This study	
CFT5	ATCC31882 $ptsHI::P_{AIIacO-1}$ -glk-galP $\Delta pykF\Delta pykA \Delta pheA \Delta tyr$	Noda et al. ²³	
GXa	CFT5 Δeda	This study	
GXb	CFT5 Δppc	This study	
GXc	CFT5 Δpck	This study	
GXd	CFT5 $\Delta eda \Delta ppc$	This study	
GXe	CFT5 \triangle eda \triangle <i>pck</i>	This study	
GXf	CFT5 $\Delta ppc \Delta pck$	This study	
GX1	CFT5 $\Delta eda \ \Delta ppc \ \Delta pps A$	This study	
GX2	$GX1 \Delta xylAB$	This study	

Table 1. Strains and plasmids used in this study

GX3	$GX1 \Delta s daA$	This study
ATCC31882x	ATCC31882 harboring pZE12-x	
CTR2MA	CTR2 harboring pSAK-ZYc	This study
CTR2PD	CTR2 harboring pSAK-PD	This study
CFT5x	CFT5 harboring pZE12-x	This study
CFT5xMA	CFT5 harboring pZE12-x and pSAK-ZYc	This study
CFT5xTYR	CFT5 harboring pZE12-x and pSAK-tyrA ^{fbr}	This study
GX1x	GX1 harboring pZE12-x	This study
GX1xMA	GX1 harboring pZE12-x and pSAK-ZYc	This study
GX1xTYR	GX1 harboring pZE12-x and pSAK-tyrA ^{fbr}	This study
GX1xPD	GX1 harboring pZE12-x and pSAK-PD	This study
GX1xAB	GX1 harboring pZE12-x and pZA23-xylAB	
GX2xMA	GX2 harboring pZE12-x and pSAK-ZYc	This study
Plasmids		
pZE12MCS	P_{LlacOl} , colE ori, and Amp^r	Expressys
pTrcHisB	Ptrc, pBR322 ori, and Ampr	Life Technologies

	A plasmid containing aroZ from Bacillus thuringiensis (codon-optimized for E. coli), aroY from			
pZA23-ZYc	Klebsiella pneumoniae (codon-optimized for E. coli), and catA from Pseudomonas putida DOT-T1EFujiwara et al. ⁶⁶			
	(codon-optimized for E. coli)			
pSAK	P_{AlacOI} , SC101 ori, and Cm^r	Noda et al. ⁶⁷		
pSAK-P _{trc}	P_{trc} , SC101 ori, and Cm^r	This study		
n7E10 v	pZE12 containing xdh from Caulobacter crescentus (codon-optimized for E. coli), Cc_xylC from C.			
pzeiz-x	crescentus (codon-optimized for E.coli), and yjhHG			
pSAK-ZYc	pSAK-P _{trc} containing <i>aroZ</i> , <i>aroY</i> , and <i>catA</i>	This study		
pSAK-tyrA ^{fbr}	pSAK-P _{trc} containing <i>tyrA</i> ^{fbr} and feedback-inhibition-resistant (fbr) derivatives of <i>tyrA</i>	This study		
pSAK-PD	pSAK-P _{trc} containing Bs_mgsA from Bacillus subtilis (codon-optimized for E. coli), gldA, and fucO	This study		
pTargetF	Constitutive expression of sgRNA	Addgene		
pCas	Constitutive expression of cas9 and inducible expression of λ RED and sgR	Addgene		
pT∆ptsG	Constitutive expression of sgRNA with donor editing template DNA for $ptsG$ disruption	This study		
pT∆pheA	Constitutive expression of sgRNA with donor editing template DNA for <i>pheA</i> disruption	This study		
pT∆eda	Constitutive expression of sgRNA with donor editing template DNA for eda disruption	This study		
рТ∆ррс	Constitutive expression of sgRNA with donor editing template DNA for ppc disruption	This study		

pT∆pck	Constitutive expression of sgRNA with donor editing template DNA for <i>pck</i> disruption	This study
pT∆ppsA	Constitutive expression of sgRNA with donor editing template DNA for <i>ppsA</i> disruption	This study
pT∆xylAB	Constitutive expression of sgRNA with donor editing template DNA for xylAB disruption	This study

Table 2. Primers used in this study

Plasmids	Primers	Sequences
	pZ-xdh Fw	TTAAAGAGGAG AAAGgtacc ATGAGCAGCGCCATTTATCCGAGCC
	pZ-xdh Rv	TCGAGGGGGGGCCCGtcatta ACGCCAACCTGCATCAATCCAATAT
	pZ-xylC Fw	CGGTATCGATAAGCTcattaaagaggagaaaggATGACCGCACAGGTTACCTGCGTTT
	pZ-xylC Rv	CTGCAGGAATTCGATATCtcatta AACCAGACGAACTTCATGCTGCGGC
pzei2-x	pZ-xdh-xylC Inv. Rv	cctttctcctctttaatgAACCAGACGAACTTCATGCTGCGG
	pZ-xdh-xylC Inv. Fw	tgataaAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGG
	yjhH Fw	taaagaggagaaaggATGAAAAAATTCAGCGGCATTATTCCACC
	yjhG Rv	ATCAAGCTTttatcaGTTTTTATTCATAAAATCGCGCAAAGCC
pSAK-ZYc	pSAK vector Fw	GAGGAGAAAGGTACCatgAAATATAGCCTGTGCAC
	pSAK vector Rv	GGGCTGCAGGAATTCctattaACCTTCTTGCAGTG
	ZYc insert Fw	GAATTCCTGCAGCCCGGGG
	ZYc insert Rv	GGTACCTTTCTCCTCTTTA
pSAK-tyrA ^{fbr}	pSAK inv. Fw	CCTAGGGTACGGGTTTTGCT
	pSAK inv. Rv	GTGAAGACGAAAGGGCCTCG

	P _{trc} Fw	ccctttcgtcttcactgttgacaattaatcatccg
	P _{trc} Rv	aacccgtaccctaggaaggcccagtctttcgactg
	pSAK-P _{trc} inv. Fw	GATCCGAGCTCGAGATCTGC
	pSAK-P _{trc} inv. Rv	GGTTTATTCCTCCTTATTTA
	<i>tyrA</i> ^{fbr} insert Fw	AAGGAGGAATAAACCatgGTTGCTGAATTGACCGC
	<i>tyrA</i> ^{fbr} insert Rv	TCTCGAGCTCGGATCttaCTGGCGATTGTCATTCG
	Bs_mgsA fw	TTAAAGAGGAGAAAGGTACCATGAAAATTGCACTG
	gldA Fw	CGAATGTTcattaaagaggagaaaggATGGACCGCATTATTCAATCACCGG
pSAK-PD	gldA Rv	gttagccatcctttctcctctttaatgTTATTCCCACTCTTGCAGGAAACGCTG
	fucO Fw	gggaataacattaaagaggagaaaggATGGCTAACAGAATGATTCTGAACGAAACGG
	fucO Rv	ATTCGATATCAAGCctaTTACCAGGCGGTATGGTAAAGCTCTACAATATCCT
	sgRNA ptsG Rv	GATTGCAGAACCAATCGGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGC
	sgRNA ptsG Fw	GATTGGTTCTGCAATCCAGCTAGCATTATACCTAGGACTGAGCTAGCT
pT∆ptsG	HomSeqUp ptsG Fw	TGCTTTTTTGAATTCGCTTAGATGCCCTGTACACGGCGAG
	HomSeq Up ptsG Rv	CTGTCTGGTGGCTTCCACCGGAGATAATCCCTCCGAGTACGC
	HomSeq Dw ptsG Fw	GAGGGATTATCTCCGGTGGAAGCCACCAGACAGTTTACCCGCAGTC

	HomSeq Dw ptsG Rv	GCTTCTGCAGGTCGACCTGATCCACTTTAGACACATCAGCAACGC
pT∆pheA	sgRNA pheA Rv	CCATTGTTTGTTGGTCTCgttttagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtccg
	sgRNA pheA Fw	ACCAACAACAATGGTC actCgt attatacct agg act gag ct ag ct gt caagg at cc ag gat cc ag g
	HomSeqUp pheA Fw	tgctttttttgaattcTACCGTTTTTTCTTCGCATTCTTTTTTACCT
	HomSeq Up pheA Rv	TCAGACACGTTactagtGCCTGCTGAGTTAATACGGAATCTTCAA
	HomSeq Dw pheA Fw	ACTCAGCAGGCactagtAACGTGTCTGATCAGGTTCCGGC
	HomSeq Dw pheA Rv	aatagatctaagcttaTACGCACAGCGTTTTCAGAGTGAA
pT∆eda	sgRNA eda Rv	CAGTACGGGTACTGTACTAAAGTCACTTAAGGAAACAAAC
	sgRNA eda Fw	GCTGGAGCAGGGCGATAAGCAGG
	HomSeq Up eda Fw	tgctttttttgaattcAATGCCAGAATTACATAAACTCATGCCGC
	HomSeq Up eda Rv	AGCTTTCAGactagtCAGAGTTTTCTCTCGCCTGATTACAAATTTGTC
	HomSeq Dw eda Fw	CGAGAGAAAACTCTGactagt CTGAAAGCTGCTACCGAAGGGACTATTCC
	HomSeq Dw eda Rv	taatagatctaagcttGGGTTAAACCCGGCAAAAAAACGCTAC
рТ∆ррс	sgRNA ppc Rv	CTCCATTGCCGCCTAactCgtattatacctaggactgagct
	sgRNA ppc Fw	TAGGCGGCAATGGAGCCTTGgttttagagctagaaatagc
	HomSeqUp ppc Fw	attetetagagtegae TCCACGGAATGGCGCGTAGTGACTC

	HomSeq Up ppc Rv	CTGCGCCGCGTGAAAATTGGTCGCGGCGGCGCGCACCTGCTC
	HomSeq Dw ppc Fw	TTTCACGCGGCGCAGGGTGTCGAGC
	HomSeq Dw ppc Rv	acagggtaataagcttCGACCGCGACGGCAACCCGAACGTC
	sgRNA pck Rv	CTCGAGTTCTTGCGGactCgtattatacctaggactgagct
	sgRNA pck Fw	CCGCAAGAACTCGAGGCTTAgttttagagctagaaatagc
nTAnak	HomSeqUp pck Fw	attetetagagtegae AGCAAACCAGACCCTGAAGT
ртдрек	HomSeq Up pck Rv	ccgttcataacgataactagtTGTTAACCGCGACAAGGCTC
	HomSeq Dw pck Fw	tatcgttatgaacggcgcga
	HomSeq Dw pck Rv	taatagatetaagettgattteaggtteegettett
рТ∆ррsА	sgRNA ppsA Rv	GGAGGCATTTTTGCCCCCactCgtattatacctaggactgagctagctgtcaaggatcc
	sgRNA ppsA Fw	GGCAAAAATGCCTCCCTgttttagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtccg
	HomSeqUp ppsA Fw	tgetttttttgaattcACCTCCGCAGTTATTGCCGTACCATCAG
	HomSeq Up ppsA Rv	actagtCATCGAACAATCCTTTTGTGATAAATGAACGG
	HomSeq Dw ppsA Fw	TGTTCGATGactagt TGCCGGACGCTTCTTTTGCCG
	HomSeq Dw ppsA Rv	taatagatctaagcttACCATGCGGATTTTTTCGACCCCATG
pT∆xylAB	sgRNA xylAB Rv	ggtgccaagatctatcccattatacctaggactgagct

	sgRNA xylAB Fw	atagatcttggcacctcgttttagagctagaaatagc
	HomSeq Up xylAB Fw	gctttttttgaattcCGTTGGTAAGCAGGAGTGAGGTGC
	HomSeq Up xylAB Rv	GGCAGGGGATAACGTATTGAACTCCATAATCAGGTAATGC
	HomSeq Dw xylAB Fw	ACGTTATCCCCTGCCTGACCGGGTG
	HomSeq Dw xylAB Rv	cagggtaatagatctGTTTAAAACACCGATAAACAAGAG
	sdaA N20 inv. Fw	TATTCGACATGTTTAAGGgttttagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtccg
pT∆sdaA	sdaA N20 inv. Rv	actCgtattatacctaggactgagctagctgtcaaggatccag
	sdaA Hom. Seq. Up Fw	tgetttttttgaatteCATCAGCTATCGCCGCCGCG
	sdaA Hom. Seq. Up Rv	CGTCAGCGACactagtGATGATTGTCTCAAGTAGTGTTTTGTAGATGTAAA
	sdaA Hom. Seq. Dw Fw	GACAATCATCactagtGTCGCTGACGGGTAAAGGCC
	sdaA Hom. Seq. Dw Rv	aatagatctaagcttaAGCGAATAGCCGGTTTCATTACAGTACG

第三章:細胞表層工学によるシキミ酸経路の強化

3-1 緒言

これまでの第一章、第二章ではタンパク質工学ならびに代謝工学的手法を用いてシキミ酸 経路誘導体の生産量の向上に成功した。本章では、細胞表層(ペリプラズム)に特定のタンパク質 を局在化させた際に菌体内に PEP が蓄積されシキミ酸経路が活性化される現象を発見し、その現 象に関連した因子の同定により、シキミ酸経路誘導体の生産量を増加させる新規技術を示す。

大腸菌などのグラム陰性細菌の内膜と外膜に挟まれた親水的な空間をペリプラズムという。 細胞外膜にはポーリンと呼ばれる大きな孔をもつ膜貫通タンパク質が存在しており、糖やアミノ 酸、イオンなどの極性を持つ低分子化合物が受動的拡散によりペリプラズムへと通過することが 出来る。一方、細胞内膜では、基質特異的な膜輸送タンパク質による、ATP やプロトン勾配を駆 動力とした能動的な輸送が行われるため、ペリプラズムと細胞質を行き来する分子は厳密に制御 されている。バイオプロダクションの分野において、ペリプラズムは、異種タンパク質を生産する 際の局在化先として利用されている。また、β-グルコシダーゼ (BGL) 等の多糖・オリゴ糖分解酵 素をペリプラズムに局在化させることで、もともと大腸菌が資化できない多糖やオリゴ糖を、物質 生産の基質として用いることが出来る。このように、ペリプラズム中にタンパク質を発現させる技 術は広く利用されているが、それによって細胞に与える影響、特に代謝に与える影響については未 だ未解明な部分が多い。

本章ではまず、ATCC31882 のペリプラズムに BGL を局在化させることで、グルコースから の Phe 生産が増加することを見出した。また、BGL をペリプラズム中に局在化させた株は、コン トロール株と比較し、グルコースからの Phe 生産だけでなく、PEP の細胞内濃度も上昇している ことが分かった。次に、従来の代謝工学的手法によりシキミ酸経路を強化した株でも同様の効果 が表れるのかを確認した。グルコース取り込みの際に用いられる PTS システムは、EI (*ptsH*)及 び HPr (*ptsl*)、EIIA (*crr*)、EIICB^{Gle} (*ptsG*) によって構成されており、PTS システムの破壊は、 シキミ酸経路強化のための一般的な手法である。EI 及び HPr を欠損した株においても、BGL をペ リプラズムに局在させることにより Phe 生産及び PEP 蓄積量が増加した。更に、PTS システム構 成要素の様々な破壊株を構築し検討を行ったところ、EIICB^{Gle} 破壊株において BGL をペリプラズ ムに局在化した際の効果が表れないことが確認された。

EIICB^{Glc}は細胞内膜を貫通する膜貫通タンパク質である。BGL を細胞外膜に固定化してペリ プラズム中に局在化させる方法でも、Phe 生産の増加が確認されていることから、BGL が EIICB^{Glc} に対して直接的かつ物理的に影響を及ぼすことは想像しがたい。そこで BGL と EIICB^{Glc}を媒介す る因子が存在すると考え、その同定を試みた。まず、BGL 局在化による代謝物の蓄積量の変化を 調べた。その結果、BGL 局在化により細胞中(細胞質とペリプラズムを合わせた領域)における G6P の量が顕著に増大していることが確認された。次に、異化経路において G6P を中間体としな

87

い糖であるフルクトース及びキシロースを基質として発酵試験を行ったところ、これらの糖を基 質とした場合に BGL 局在化の効果は表れなかった。更に G6P 存在下では BGL の活性が阻害され ることが確認され、BGL が G6P を捕捉する能力があることが示唆された。

G6P が BGL 局在化による Phe 生産量向上に関連していると仮定し、BGL 以外の G6P を基 質とする酵素を用いてその実証を試みた。G6P を基質とする酵素(Pgi、Zwf)をペリプラズム中 に局在化させた株で発酵試験を行ったところ、これらの株では Phe の生産量は増加しなかったが、 それぞれの不活性化体を BGL に局在化させると Phe 生産量が増加した。これらの結果から、G6P を補足し、かつ酵素活性を持たない(別の化合物に変換しない)タンパク質(G6P 補足タンパク 質)をペリプラズム中に発現させた場合に、Phe の生産量が増大することが示唆された。

G6P 補足タンパク質のペリプラズム局在化による効果は、Phe 生産だけでなく Tyr の生産 でも確認された。本章で得られた知見は、ペリプラズム空間の制御によって代謝を最適化するとい った、細胞表層工学の新たな分野の開拓に寄与すると考えられる。

3-2 実験結果及び考察

3-2-1 BGL のペリプラズム局在化による Phe 生産量向上

本研究では、大腸菌での異種タンパク質発現において BGL 活性の実績がある酵素である、 *Thermobifida fusca* YX(Tfu0937、UniProt Q47RE2)に由来する BGL を使用した。Tfu0937 を ペリプラズムに局在化させるために、細胞外膜に固定して Tfu0937 を局在化させる方法(細胞表 層提示)と、ペリプラズム中に Tfu0937 を遊離状態で局在化させる方法(Pel 輸送)の 2 つの方 法を採用した。細胞表層提示は、タンパク質を細胞外膜に固定する技術である。Blc アンカータン パク質(UniProt P0A901)と呼ばれる、細胞外膜に局在しペリプラズム側に露出するリポタンパ ク質の C 末端を、目的のタンパク質の N 末端に融合することにより、融合タンパク質をペリプラ ズムに局在化させる。Pel 輸送では、PelB シグナルペプチドを使用して目的のタンパク質をペリプ ラズムに輸送する。PelB シグナルペプチド配列は、*Erwinia carotovora* のペクチン酸リアーゼ B の 1 番目から 22 番目までのアミノ酸配列である(UniProt P0C1C1)。目的のタンパク質の N 末 端に PelB シグナルペプチド配列を付加することにより、発現した酵素はペリプラズムに輸送され る。

まず、Phe 高生産株である ATCC31882 株を Phe 生産の親株として使用した。ATCC31882 から 4 つの大腸菌株、BD1、BP1、BC1、及び BD0 を構築した。BD1 は、Blc を融合した Tfu0937 (Blc-Tfu0937)を発現する株である。BP1 株は、PelB シグナルペプチドを融合した Tfu0937(PelB-Tfu0937)を発現する株である。BC1 株はいかなるアミノ酸配列も付加していない Tfu0937 を細 胞質内に発現する株である。BD0 は、空のベクターを保持するコントロール株である。BD1、BP1、 BC1、及び BD0 を、グルコースを炭素源とする M9YP 培地で培養した。図 1A に、これらの株の 培養 48 時間後における Phe 生産量を示す。BD1 及び BP1 は、それぞれ 1.46 ± 0.05 及び 2.19 ± 0.10 g/L の Phe を生成した。BD1 及び BP1 は、それぞれ BD0 (0.98 ± 0.03 g/L) の 1.49 倍及 び 2.23 倍 Phe を生産したが、細胞増殖及びグルコース消費に大きな違いは見られなかった。一 方、BC1 は BD0 とほぼ同じ 1.04 ± 0.21 g/L の Phe を生成した。

図 1B に、各株の細胞密度あたりの BGL の比活性を示す。BD1、BP1、及び BC1 の BGL の 活性は、それぞれ 27.04 ± 0.98、25.72 ± 1.45 及び 29.23 ± 1.20 μ M/OD₆₀₀/min であり、3 つの 株に有意な差は無かった。図 1C に、ウエスタンブロッティング分析の結果を示す。BD1 では、分 子量約 53kDa の位置にわずかであるが Blc-Tfu0937 が検出され、58kDa 付近で非特異的消化によ る Tfu0937 が観察された(レーン BD1)。BP1 及び BC1 では 57 kDa 付近に PelB-Tfu0937 及び Tfu0937 のバンドが検出され、それらの発現レベルは BD1 よりも高かった。BP1 と BC1 の BGL の発現レベルは同程度であったが、BP1 の Phe 生産量は BC1 よりも高かった。BD1 及び BP1 は ペリプラズム中に BGL を発現し、BD0 よりも高い Phe 生産を達成した。これらの結果は、BGL のペリプラズムへの局在化が、BGL の発現方法に関係なく、Phe 生産に正の影響を与えることを 示唆している。

3-2-2 BGL 発現量の変化が Phe 生産に与える影響

3-2-1 では高コピーのプラスミドを用いて Blc-Tfu0937 を発現させた。 Phe 生産に対する BGL 発現レベルの影響を調査するため、Blc-Tfu0937 を発現する低コピー及び中コピーのプラス ミドを構築し、これらのプラスミドををれぞれ ATCC31882 に導入した。得られた株を、BD1L(低 コピープラスミドを保持)及び BD1M(中コピープラスミドを保持)とした。BD1L、BD1M、及 び BD1(高コピープラスミドを保持)を、グルコースを炭素源とする M9YP 培地で培養した。図 2A に、細胞密度あたりの BGL の比活性を示す。BD1L、BD1M、及び BD1 の BGL の活性は、そ れぞれ 1.04 ± 0.07、3.93 ± 0.07、27.04 ± 0.98 μM/OD₆₀₀/min であった。図 2B に、それぞれ の株のウエスタンブロッティングの結果を示す。BD1L 及び BD1M における Blc-Tfu0937 の発現 は、目視で確認できなかった。これらの結果は、Blc-Tfu0937 の活性及び発現レベルがプラスミド のコピー数増加とともに増加することを示唆している。図 2C は、異なるコピー数のプラスミドを 使用した場合の Phe の相対的な生産量の変化の結果を示している。BD1L 及び BD1M のコントロ ールとして、それぞれ低コピー及び中コピーの空のプラスミドを有する BDOL 及び BDOM を用い た。Blc-Tfu0937 を発現する全ての株は、それぞれのコントロール株よりも Phe 生産量が増加し た。各コントロール株に対する Phe 生産量の増加率は、 BD1L、BD1M、及び BD1 でそれぞれ 1.21、1.39、及び 1.48 倍であった。これらの結果から、Blc-Tfu0937 の発現レベルとフェニルア ラニン産生の増加の効果との間に正の相関があることが示唆された。

3-2-3 不活性化 BGL が Phe 生産に与える影響

BGL 活性と Phe 産生の因果関係を明らかにするために、不活化 BGL (Tfu0937^{E388A}) に Blc を付加したタンパク質 (Blc-Tfu0937^{E388A}) を発現する株 (BD2) を構築した。Tfu0937^{E388A} は、 Tfu0937 の 388 番目のグルタミン酸がアラニンに置換された変異体である。BGL 活性測定により、 BD2 に BGL 活性がないことを確認した。BD2 を、グルコースを炭素源とする M9YP 培地で培養 した結果、この株は 1.86 ± 0.07 g/L の Phe を生産し、その生産量は BD0 の 1.90 倍であった。 この結果は、BGL のペリプラズム局在化による Phe 生産量の向上には、BGL 活性が必要ではない ことを示唆している。

3-2-4 PTS 破壊株における BGL のペリプラズム局在化の影響

本研究の第一章、第二章でも述べたように、大腸菌の代謝において、PEP は TCA サイク ルまたはシキミ酸経路に分岐する重要な代謝産物の1つである。PEP を蓄積するような代謝改変 は、シキミ酸経路誘導体の生産を増加させる最も一般的な戦略の1つである。特に、CFT5 のよう に、グルコース取り込み機構を PTS から GalP / Glk システムに変更すると、生産量及び収量が大 幅に増加する。このような従来の戦略によって代謝設計された株においても、ペリプラズムに BGL を局在化させることで Phe の生産量が増加するかを検討した。ATCC31882 から 2 つの PTS 関連 遺伝子 (*ptsl*、*ptsH*)を破壊し、GalP/Glk システムに置き換えた株、CFT1 を構築した。さらに CFT1 をもとに、BD Δ HI1 (Blc-Tfu0937 を発現する CFT1)、BP Δ HI1 (PelB-Tfu0937 を発現す る CFT1)、及び BD Δ HI0 (コントロール株、空のベクターを含む CFT1)の 3 つの株を構築した。 これらの株を、グルコースを炭素源とする M9YP 培地で培養した。図 3A に、Phe の生産量を示 す。BD Δ HI1 及び BP Δ HI1 は 3.51 ± 0.10 及び 3.44 ± 0.12 g/L の Phe を生産した。これは BD Δ HI0 が生産した Phe (2.70±0.24 g/L)よりも 1.30 倍及び 1.27 倍高い値であった。

BGL をペリプラズムに局在化した菌株の Phe 生産の増加は、PEP の蓄積が原因であると推察 した。本仮説を確認するため、BPΔHI1 と BDΔHI0 間での細胞内における PEP 蓄積量及びピルビン 酸蓄積量を比較した。BPΔHI1 では、細胞内 PEP は BDΔHI0 より 2.6 倍増加し、 一方ピルビン酸は BDΔHI0 の 0.57 倍に減少した(図 3B)。これらの結果は、ペリプラズムへの BGL の局在化により、 細胞内環境がシキミ酸経路を強化するのに好ましい状態に変化したことを示唆している。

3-2-5 BGL のペリプラズム局在化に関与する PTS 関連遺伝子の同定

大腸菌において、グルコース取り込みに関与する PTS システムは 4 つのタンパク質によ って構成されている (図 4A)。EI が PEP からリン酸基を受け取った後、HPr、EIIA、EIICB^{GIc}の EIIB ドメインへとリン酸基がリレーされ、最終的にグルコースがリン酸化状態の EIIB ドメインか らリン酸基を受け取り G6P となる。CFT1 では、EI 及び HPr をコードしている ptsH 及び ptsl が 破壊され、GalP/Glk システムに置き換えられた。PTS システムは基質であるグルコースを細胞質 内に取り込む機構として、細胞質とペリプラズムを物質的につなぐ役割を有しているため、BGL の ペリプラズム局在化によって引き起こされる本現象に何らかの形で関与しているのではないかと 考えた。3-2-4の結果より、EI 及び HPr (*ptsH、ptsl*)を破壊した場合でも、本現象が確認された ことから、これらのタンパク質は本現象に関与していないことが示唆された。他の PTS 構成要素 である EIIA 及び EIICB^{GIC}と本現象の関連を調査するため、CFT1 から EIIA 及び EIICB^{GIC}をそれぞ れコードする crr 及び ptsGを破壊した株を構築し、CFT1Δ crr 及び CFT1Δ ptsG と命名した(図 4A)。さらに、それらの株をもとに BD △ HIC1 (Blc-Tfu0937 を発現する CFT1 △ crr)、BD △ HIC0 (空のベクターを保持する CFT1Δ*crr*)、BDΔHIG1 (Blc-Tfu0937 を発現する CFT1Δ*ptsG*)、及 び BDΔHIGO (空のベクターを保持する CFT1Δ*ptsG*)を構築した。グルコースを炭素源としてこ れら4つの株を培養した。図4BにPhe 生産量を示す。BD∆HIC1は2.83 ± 0.07g/LのPhe を 生産し、これは BD Δ HIC0 の生産量(1.95±0.12 g/L)と比較して 1.45 倍であった。一方、BD Δ HIG1 による Phe 生産は 2.39 ± 0.10 g/L であり、BD Δ HIGO の生産量(2.39 ± 0.25 g/L) と有意な差 は無かった。これらの結果は、CFT1 由来株において ptsG を破壊すると、BGL のペリプラズム局 在化が Phe 生産に与える効果が消滅することを示唆している。図 4C に、BD Δ HIC0 及び BD Δ HIG1 における相対的な PEP 蓄積量及びピルビン酸蓄積量を示す。ペリプラズムに BGL を局在化させ る BDΔHIG1 では、細胞内 PEP が BDΔHIG0 よりも有意に減少し、3-2-4 と逆の結果となった (図 3B)。細胞内ピルビン酸濃度は BDΔHI0 と BDΔHI1 の間で有意差はなく、ピルビン酸にお いても 3-2-4 と異なる結果となった。これらの結果から、CFT1ΔptsG 由来の株では BGL をペリ プラズムに局在させても PEP が蓄積されず、シキミ酸経路が強化されないことが示唆された。

これまでの結果より、EIICB^{Gic} (*ptsG*) が本現象において何らかの役割を果たしていると 考えられる。*ptsG*破壊による影響を明確に確認するために、ATCC31882 から *ptsG*をを破壊した 株を構築し、ATCC31882 Δ*ptsG* と命名した(図 4A)。さらに、ATCC31882 Δ*ptsG* をもとに、 BD ΔG1(Blc-Tfu0937 を発現する ATCC31882 Δ*ptsG*) 及び BD ΔG0(空のベクターを含む ATCC31882 Δ*ptsG*) の 2 つの株を構築した。グルコースを炭素源としてこれら 2 つの株を培養し た。図 4D に Phe 生産量を示す。BD ΔG0 及び BD ΔG1 は、それぞれ 1.67 ± 0.06 g/L 及び 1.57 ± 0.15 g/L の Phe を生産し、これらの株の間で有意な差は無かった。さらに、ATCC31882 の内 因性 EIICB^{Gic}を不活性化した株を構築し、C421S と命名した。C421S は、*ptsG*遺伝子座に単一の ミスセンス変異を導入し、EIIB ドメインのリン酸化部位である 421 番目の位置のシステインをセ リンに置き換えることで構築した。C421S をもとに、C421S1(Blc-Tfu0937 を発現する C421S) 及び C421S0(空のベクターを含む C421S)を構築した。グルコースを炭素源としてこれら 2 つの 株を培養した。図 4D に Phe 生産量を示す。C421S1 は 2.22 ± 0.02 g/L の Phe を生産し、C421S0 の生産量(1.49±0.27 g/L)と比較して 1.49 倍でであった。これらの結果から、EIICB^{Gic} は BGL のペリプラズム局在化による Phe 産生の改善に必要であるが、その活性は必ずしも必要ではない ことを示唆された。

3-2-6 BGL のペリプラズム局在化に関与する代謝物の探索

3-2-5 の結果より、*ptsG*がコードする EIICB^{Gle}がこの現象の重要な因子の1つであるこ とが示唆された。しかしながら、EIICB^{Gle}は細胞内膜を貫通する膜タンパク質であるため、細胞外 膜に固定されている BIc-Tfu0937 と EIICB^{Gle}は直接相互作用することはないと推察される。そこ で、EIICB^{Gle}は、BIc-Tfu0937 と相互作用する別の因子をペリプラズムへと輸送する輸送体として 作用しているのではないかと仮説を立てた(図 5A)。輸送される因子は、EIICB^{Gle}が輸送可能であ り、かつ細胞内の代謝に影響を及ぼしうるものであると仮定し、解糖系内の代謝物に注目した。因 子となる代謝物を特定するために、BD Δ HI0 及び BP Δ HI1 における、解糖系の中間代謝物である G6P、フルクトース-6-リン酸(F6P)、フルクトース-1,6-ビスリン酸(F16BP)、及び PPP の中間 代謝物である 6 ホスホグルコン酸(6PG)の細胞内濃度を測定した。図 5B に各代謝物(G6P、 F6P、F16BP、及び 6PG)の相対蓄積量を示す。F6P 及び F16BP の量は BP Δ HI1 と BD Δ HI0 の 間で有意差はなく、BP Δ HI1 の細胞内 6PG は BD Δ HI0 よりわずかに減少した。興味深いことに、 BP Δ HI1 の G6P は BD Δ HI0 の 2.25 倍に増加した。さらに、CFT1 Δ ptsG に由来する BD Δ HIG0 と BP Δ HIG1 との間で、G6P の濃度に有意な差が無かったことから、G6P がこの現象の重要な代 謝産物であると仮定した。 G6P が本現象に関連しているならば、G6P を生成しにくい炭素源を用いることで本現象 に何らかの影響が表れると推察される。大腸菌の異化経路では、グルコースはグルコース特異的 PTS または GalP/Glk システムによって細胞質内に輸送され、G6P に変換されて解糖系に入るた め、取り込まれたグルコースは全て G6P へと変換される(図 5C)。キシロースは、キシロース特 異的 ATP 結合カセット輸送体またはキシロース-プロトン共輸送体によって細胞質内に輸送され、 キシルロースに変換される。キシルロースはキシルロース-5-リン酸に変換され、PPP に入る(図 5C)。フルクトースはフルクトース特異的 PTS によって細胞質内に輸送され、フルクトース-1-リ ン酸(F1P) に変換される。その後、F1P は F16BP に変換され、解糖系に入る(図 5C)。キシロ ースまたはフルクトースを炭素源として培養した場合、G6P は PPP を介して供給されるが、グル コースを炭素源とした場合と比較して、その炭素フラックスは減少する。

キシロースまたはフルクトースを基質として使用した場合の、BGL のペリプラズム局在 化による Phe 生産への影響を調査した。BD0 及び BD1 を、炭素源としてキシロースまたはフル クトースを用いて培養した。図 5D に、各株及び各培地条件における Phe 生産量を示す。キシロ ースまたはフルクトースを使用する場合、BD1 はそれぞれ 0.90 ± 0.09 g/L 及び 0.76 ± 0.00 g/L の Phe を生産し、これらは BD0 の Phe 生産量(0.79±0.07 g/L 及び 0.78±0.07 g) と同じレベ ルでであった。これらの結果から、BGL のペリプラズム局在化による Phe 生産への影響は、基質 となる糖の種類に依存することが示唆された。すべての糖(グルコース、キシロース、及びフルク トース) は解糖系及び PPP を介して異化されるが、それぞれの異化経路における炭素フラックス のパターンは異なり、解糖系及び PPP の中間代謝物の細胞内濃度も基質ごとに異なると考えられ る。キシロース及びフルクトースは、どちらも異化経路において G6P を経ずに代謝される。これ らを基質とした場合に、BGL のペリプラズム局在化による Phe 生産の効果が表れないことから、 G6P が本現象における鍵代謝物であることが示唆された。

大腸菌では、細胞外部に存在する G6P は UhpT 糖リン酸トランスポーター (Uhp システ ム)によって輸送され、Uhp システムの活性化は細胞外 G6P の存在に依存することが知られてい る。Uhp システムによりペリプラズム中の G6P が脱リン酸化せずに細胞質に再輸送された場合、 細胞質内の G6P の濃度が増加すると考えられる。ペリプラズムと細胞質の間の G6P の存在比の 調査は、本現象のメカニズムの更なる解明に大いに寄与すると思われるが、現段階においてペリプ ラズム中と細胞質中の小分子をそれぞれ正確に定量することは困難であるため、今後の課題であ る。細胞質中の G6P の蓄積は *ptsG* mRNA の RNase E 依存性不安定化を引き起こすことが知られ ている ^{68,69}。EIICB^{Glc}の発現量が低下するとリン酸化された EIIA (EIIA~P)が蓄積する。EIIA~P は アデニルシクラーゼの発現を誘導し、アデニルシクラーゼにより 環状 AMP (cAMP)が生成される ⁷⁰。cAMP は cAMP レセプタータンパク質と複合体を形成し、クエン酸シンターゼやコハク酸デ ヒドロゲナーゼ、フマル酸ヒドラターゼ、及びリンゴ酸デヒドロゲナーゼ等の TCA サイクル酵素 をコードした遺伝子群の転写を活性化する ⁷¹。しかしながら、EIIA を発現しない CFT1Δ crr に由

93

来する株 (BDΔHIC0、BDΔHIC1) においても代謝の変化が起こっていることから、EIIA を介した代謝調節以外のメカニズムが働いていると推察される。

3-2-7 G6P による BGL の活性阻害

3-2-6 の結果より、G6P が本現象に関わる因子である可能性が示唆された。G6P と BGL の 相互作用を調べるため、G6P またはグルコースの存在下で Tfu0937 の BGL 活性を測定した。図 6 に、Tfu0937 の相対活性の結果を示す。G6P の存在下では、酵素活性の割合はグルコース添加状 態よりも低下した。G6P 及びグルコースの見かけの阻害定数は Morrison の式(式1)により求め た⁷²。グルコースと G6P の見かけの阻害定数は、それぞれ 595 mM と 295 mM であった。この結 果は、Tfu0937 は G6P を基質とする反応を触媒しないが、グルコースよりも G6P に対して高い親 和性を持っていることを示唆している。

$$\frac{v_i}{v_0} = 1 - \frac{([E] + [I] + K_{i-app}) - \sqrt{([E] + [I] + K_{i-app})^2 - 4[E][I]}}{2[E]} \cdot \cdot \cdot \vec{x} 1$$

[E]:酵素濃度、[I]:阻害剤濃度、K_{i-app}:見かけの阻害定数、v₀:阻害剤がない時の反応速度、v_i:反応速度

3-2-8 G6P 補足タンパク質のペリプラズム局在化による Phe 生産量の向上

これまでの結果より、BGL のペリプラズムへの局在化、EIICB^{GIc}、G6P が本現象の鍵である ことが示唆された。これらの要素を踏まえると、EIICB^{Glc}によってペリプラズムへと放出された G6P が、ペリプラズム中に局在化された BGL により補足され、代謝に何らかの影響を及ぼしてい る、という仮説が考えられる。この仮説では、G6Pをペリプラズム中に発現するタンパク質はG6P を補足し、かつ G6P に対して酵素活性がないタンパク質(G6P 補足タンパク質)であれば、BGL 以外のタンパク質でも同様の現象が起きると考えられる。この仮説を確認するため、G6P 補足タ ンパク質の候補として *pgi*によってコードされるグルコース-6-リン酸イソメラーゼ (Pgi)、*zw*f に よってコードされるグルコース-6-リン酸 1-デヒドロゲナーゼ (Zwf)、及び phoA よってコードさ れるアルカリホスファターゼ(PhoA)の3つの酵素及びこれらの不活性変異体を選択した。Pgi、 Zwf 及び PhoA の野生型酵素は、G6P と結合できる3次元構造を持ち、かつ G6P を基質として消 費する。これらの酵素の不活性化体である Pgi^{H386A}、Zwf^{H239A}、及び PhoA^{S124A}は、それぞれ Pgi の 386 番目の位置のヒスチジンをアラニンに、Zwf の 239 番目の位置のヒスチジンをアラニンに、 PhoA の 124 番目の位置のセリンをアラニンに置き換えることにより構築した。これらの不活性 化体は G6P と結合できる 3 次元構造を持ち、G6P を基質として消費する酵素活性は持たない。 Pgi、Zwf 及びそれらの不活化変異体をペリプラズムに局在化させるために、それぞれのタンパク 質と PelB シグナルペプチドを融合し、それぞれ PelB-Pgi、PelB-Zwf、PelB-Pgi^{H386A}、及び PelB-Zwf^{H239A}とした。PhoA は元来ペリプラズム酵素であるため、PhoA 及び PhoA^{S124A}は非融合状態で

発現させた⁷³。

ATCC31882 をもとに、PP1 (PelB-Pgi を発現)、ZP1 (PelB-Zwf を発現)、AP1 (PhoA を 発現)、PP2 (PelB-Pgi^{H386A}を発現)、ZP2 (PelB-Zwf^{H239A}を発現))、及び AP2 (PhoA^{S124A}を発 現)の6つの株を構築した。さらに、コントロール株として、ペリプラズム空間に非酵素タンパク 質を発現する株、GP1 (緑色蛍光タンパク質、GFP を発現)を構築した。これらの株を、グルコー スを炭素源とする M9YP 培地で培養した。図7 に、Phe の生産量を示す。非酵素タンパク質のコ ントロール株である GP1 は、0.74 ± 0.03 g/L の Phe を産生した。PP1、ZP1、及び AP1 は、そ れぞれ 0.62 ± 0.01、0.99 ± 0.14、及び 1.16 ± 0.19 g/L の Phe を生産した。PP1 は BD0 よりも 少ない Phe を生産し、ZP1 と BD0 の間、及び AP1 と BD0 の間では Phe 生産量に有意な差は無 かった。これらの結果は、G6P に対して活性を持つ酵素のペリプラズム局在化は、Phe 生産に寄 与しないことを示唆している。一方、PP2、ZP2、及び AP2 は、それぞれ 1.69 ± 0.09、1.43 ± 0.09、及び 1.64 ± 0.09 g/L の Phe を生産し、BD0 と比較し生産量が大幅に向上した。この結果 は前述した仮説を支持する結果である。すなわち、酵素活性を持たず G6P に親和性を有するタン パク質のみが、ペリプラズムに局在化した場合の Phe 産生量の増加に寄与することが示唆された。

3-2-9 BGL のペリプラズム局在化による Tyr 生産量の向上

シキミ酸経路誘導体の産生を促進する新たな戦略としての汎用性を実証するため、本現象を 持ちいて Tyr 生産量の向上を試みた。CFT1 のコリスミン酸ムターゼ/プレフェン酸デヒドラター ゼをコードする pheA を破壊した後、コリスミン酸ムターゼ/プレフェン酸デヒドロゲナーゼのフ ィードバック阻害を解除した変異体をコードする tyrA^{fbr}を trpE 遺伝子座に挿入することにより、 チロシン産生株 TYR を構築した。TYR をもとに、Blc-Tfu0937 を発現する株 TYR1 と、空のベク ターを保持する TYR0 を構築した。TYR1 および TYR0 を、グルコースを炭素源として使用して培 養した。TYR1 および TYR0 は、それぞれ 2.73 ± 0.05 および 2.20 ± 0.03 g/L の Tyr を生産し、 TYR1 の Tyr 生産量は TYR0 の 1.24 倍であった(図 8)。これらの結果は、ペリプラズムで BGL を 発現させると、Phe だけでなく、他のシキミ酸経路誘導体の生産量向上に寄与することを示唆し ている。

3-3 結言

本章では、ペリプラズムで BGL または G6P 補足タンパク質を発現すると、Phe 及び Tyr の 生産が増加することを実証し、この現象に関わる 2 つの重要な因子を発見した。PTS 関連遺伝子を 破壊した株の結果により EIICB^{Gle} が重要な要因として特定された。また、メタボローム解析や様々な 糖を用いた発酵試験から、もう1つの重要な因子として G6P が特定された。いくつかの酵素および それらの不活性化変異をペリプラズムに局在化させた株の発酵試験の結果、ペリプラズム中に局在 化させるタンパク質は BGL と同様の性質、すなわち G6P を補足するが消費しない、といった性質 が必要であることが示唆された。本章で述べた方法、すなわち、適切なタンパク質を発現させるこ とによるペリプラズム環境の改変は、バイオプロダクションにおいて目的の代謝産物の収量を増加 させる新しいアプローチである。しかし、本研究の成果をより広い範囲の代謝工学、微生物生産に適 用するには、本現象の詳細なメカニズムの解明が求められる。本研究で得られた知見にあわせ、今後 そのメカニズムを解明していくことで、ペリプラズム環境の改変により代謝を操作するといった新た な技術が確立され、有用化合物の微生物生産の発展に貢献すると期待される。

3-4 実験方法

培地

LB 培地にはグルコース 20 g/L、トリプトン 10 g/L、乾燥酵母エキス 5 g/L、NaCl 5 g/L を 含む。M9 最小培地には、1L あたりグルコース 20 g、NaCl 0.5 g、Na₂HPO₄ · 12H₂O 17.1 g、 KH₂PO₄ 3 g、NH₄Cl 1g、MgSO₄ · 7H₂O 246 mg、CaCl₂ · 2H₂O 14.7 mg、FeSO₄ · 7H₂O 2.78 mg、 チアミン塩酸塩 10 mg を含む。試験管培養での Phe 生産には、M9YP 培地を用いた。M9YP 培 地は M9 最少培地に 5 g/L の酵母エキス、Tyr 40 mg、Trp 40 mg、(ATCC31882 はこれらのアミ ノ酸に対して栄養要求性であるため)及び 10 mM ピルビン酸ナトリウムを添加して作製した。試 験管培養による Tyr 生産では、Tyr を除き Phe 100mg を添加した M9YP 培地を用いた。すべての 培地において、必要に応じて、アンピシリン 100 mg/L を添加した。炭素源はグルコース、キシロ ース及びフルクトースのいずれかを 20 g/L 添加した。

培養条件

15 mL 試験管、浸透速度 220 rpm、37℃で1日間、4 mL LB 培地で前培養した。本培養は、 15 mL 試験管、培養体積 5 mL に対して前培養液を初期 OD₆₀₀ = 0.1 となるように植菌し、 37℃、 浸透速度 220 rpm にて行った。

プラスミド構築

本章で用いたプラスミドを表1に、プライマーを表2に示す。pHLA-blc-tfu0937^{E38A}は次の手順で作製した。pHLA-blc-tfu0937をテンプレートとし、ブライマーE388A_for及びE388A_reを用いてインバース PCR により増幅した。増幅した断片を In-Fusion HD Cloning Kit (Takara)を用いて環状化し、得られたプラスミドを pHLA-blc-tfu0937E388A とした。

pHLA-pelB-tfu0937 は次の手順で作製した。pHLA-blc-tfu0937 をテンプレートとし、ブラ イマーpelB_Tfu0937_f1 及び Bgl2_pelB_for を用いて PCR により増幅した。増幅した断片をテン プレートとし、ブライマーBgl2_pelB_for 及び Xhol_Tfu0937_re を用いて PCR により増幅した。 得られた断片を pHLA の BgllI 部位と Xhol 部位の間にクローニングし、得られたプラスミドを pHLA-pelB-tfu0937 とした。

pHLA-Tfu0937 は次の手順で作製した。pHLA-blc-tfu0937 をテンプレートとし、ブライマ -n.s._tfu0937_f 及び n.s._tfu0937_r を用いて PCR により増幅した。増幅した断片を pHLA の BgIII 部位と Xhol 部位の間にクローニングし、得られたプラスミドを pHLA-Tfu0937 とした。

pHLA-phoA は次の手順で作製した。*E. coli* MG1655 ゲノム DNA をテンプレートとし、ブ ライマーphoA_f 及び phoA_r を用いて PCR により増幅した。増幅した断片を pHLA の BgIII 部位 と Xhol 部位の間にクローニングし、得られたプラスミドを pHLA-phoA とした。

97

pHLA-phoA^{S124A} は次の手順で作製した。pHLA-phoA をテンプレートとし、ブライマー phoA_S124A_r 及び phoA_S124A_f を用いてインバース PCR により増幅した。増幅した断片を In-Fusion HD Cloning Kit を用いて環状化し、得られたプラスミドを pHLA-phoA^{S124A}とした。

pHLA-pelB-pgi は次の手順で作製した。*E. coli* MG1655 ゲノム DNA をテンプレートとし、 ブライマーpelB_pgi_f1 及び Xhol_pgi_re を用いて PCR により増幅した。増幅した断片を pHLA の BgIII 部位と Xhol 部位の間にクローニングし、得られたプラスミドを pHLA-pelB-pgi とした。

pHLA-pelB-pgi^{H386A}は次の手順で作製した。pHLA-pelB-pgiをテンプレートとし、ブライマ ーpgi_H386A_smal_for 及び pgi_H386A_smal_re を用いてインバース PCR により増幅した。増 幅した断片を In-Fusion HD Cloning Kit を用いて環状化し、得られたプラスミドを pHLA-pelBpgi^{H386A}とした。

pHLA-pelB-zwf は次の手順で作製した。*E. coli* MG1655 ゲノム DNA をテンプレートとし、 ブライマーpelB_zwf_f1 及び Xhol_zwf_re を用いて PCR により増幅した。増幅した断片を pHLA の BgIII 部位と Xhol 部位の間にクローニングし、得られたプラスミドを pHLA-pelB-zwf とした。

pHLA-pelB-zwf^{H239A} は次の手順で作製した。pHLA-pelB-zwf をテンプレートとし、ブライ マーzwf_H239A_pstl_for 及び zwf_H239A_pstl_re を用いてインバース PCR により増幅した。増 幅した断片を In-Fusion HD Cloning Kit を用いて環状化し、得られたプラスミドを pHLA-pelBzwf^{H239A} とした。

pHLA-pelB-gfp は次の手順で作製した。pEGFP をテンプレートとし、ブライマーgfp_f1 及 び gfp_f2 を用いて PCR により増幅した。増幅した断片をテンプレートとし、ブライマーgfp_f2 及 び gfp_r を用いて PCR により増幅した。得られた断片を pHLA の BgIII 部位と Xhol 部位の間にク ローニングし、得られたプラスミドを pHLA-pelB-gfp とした。

pSAK-blc-tfu0937 は次の手順で作製した。pHLA-blc-tfu0937 をテンプレートとし、ブライマーc.n._tfu0937_f 及び c.n._tfu0937_r を用いて PCR により増幅した。増幅した断片を pSAK の Xhol 部位と HindIII 部位の間にクローニングし得られたプラスミドを pSAK-blc-tfu0937 とした。

pZA23-blc-tfu0937 は次の手順で作製した。pHLA-blc-tfu0937 をテンプレートとし、ブラ イマーc.n._tfu0937_f 及び c.n._tfu0937_r を用いて PCR により増幅した。増幅した断片を pZA23 の Xhol 部位と HindIII 部位の間にクローニングし、得られたプラスミドを pZA23-blc-tfu0937 と した。

pT∆ptsG は、プライマー sgRNA ptsG Rv、sgRNA ptsG Fw、HomSeq Up ptsG Fw、 HomSeq Up ptsG Rv、HomSeq Dw ptsG Fw、及び HomSeq Dw ptsG Rv を用いて、第二章 2-4 の pT∆eda と同様の方法で作製した。

pT∆crr は、プライマー sgRNA crr Rv、sgRNA crr Fw、HomSeq Up crr Fw、HomSeq Up crr Rv、HomSeq Dw crr Fw、及び HomSeq Dw crr Rv を用いて、第二章 2-4 の pT∆eda と同様 の方法で作製した。

pTtrpE::tyrA^{fbr} は次の手順で作製した。pTargetF をテンプレートとし、プライマーsgRNA trpE Rv 及び sgRNA trpE Fw を用いてインバース PCR により増幅した。得られた断片を In-Fusion HD Cloning Kit により環状化し、得られたプラスミドを pT Δ trpEF とした。*E. coli* MG1655 ゲノ ム DNA をテンプレートとし、プライマーHomSeq Up trpE Fw 及び HomSeq Up trpE Rv を用い て PCR により増幅し、H.S. trpE Up 断片を得た。*E. coli* MG1655 ゲノム DNA をテンプレートと し、プライマーHomSeq Dw trpE Fw 及び HomSeq Dw trpE Rv を用いて PCR により増幅し、H.S. trpE Dw 断片を得た。H.S. trpE Up 断片及び H.S. trpE Dw 断片をテンプレートとし、プライマー HomSeq Up trpE Fw 及び HomSeq Dw trpE Rv を用いてオーバーラップエクステンション PCR により増幅し、H.S. trpE 断片を得た。H.S. trpE 断片を pT Δ trpEF の EcoRI 部位及び Sall 部位に クローニングし、得られたプラスミドを pT Δ trpE とした。pSAK-*tyrA*^{fbr} をテンプレートとし、プ ライマーtyr_ins Fw 及び tyr_ins Rv を用いて PCR により増幅し tyrA^{fbr} 断片を得た。tyrA^{fbr} 断片を

遺伝子破壊及びゲノム組み込みによる遺伝子挿入

Jiang 氏らの報告の手法に従い、CRISPR-Cas two-plasmid system を用いて遺伝子破壊を 行った⁶³。各遺伝子破壊株は、適切なプライマーを用いてコロニーダイレクト PCR により標的遺 伝子を増幅し、*E. coli* MG1655 野生株と比較して遺伝子鎖長短くなっていることを確認した。*ptsG*、 *crr、*及び *pheA* の破壊には、それぞれ pT Δ ptsG、pT Δ crr、及びを用いた。*trpE* 遺伝子座への *tyr*^{fbr} には pTtrpE::tyrA^{fbr} を用いた。

形質転換

各大腸菌株の形質転換は Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を用い てエレクトロポレーション法により行った(1350 kV、 600 Ω 、10 μ F、0.1 cm キュベットを使 用)。各大腸菌株が保持しているプラスミド等の詳細を表 1 に示す。

分析方法

細胞増殖及びグルコースは 1-4 に示した方法で測定した。キシロース、Phe 及び Tyr は 2-4 と同様の条件で測定した。フルクトースはグルコース及びキシロースと同様の条件で測定した。

BGL 活性測定

BGL 活性測定の基質には *p*-ニトロフェニル-β-D グルコピラノシド (pNPG、ナカライテス ク)を使用した。各菌株を、5 ml の LB 培地で 37 °C、24 時間培養した。サンプリングした培地 を 12000 rpm, 5 min 遠心分離し、菌体を回収した。回収した菌体を PBS(-)バッファーにより洗 浄した。洗浄した菌体に 10 mM pNPG 50µL、1M 酢酸ナトリウム 25 µL を加えた後、総量が 500 µL となるよう精製水にてメスアップした。混合液を 37 °C、30 min 反応させた後、1M 炭酸二ナトリウム 500µL を加え反応を停止させた。反応停止液の上清を Synergy H1 マイクロプレートリーダー (BioTek Japan) により 400 nm で測定し、生成された p-ニトロフェノールの相対量を測定した。なお、 β -グルコシダーゼ活性の 1 単位は、37°C、pH 5.0 で 1 min あたり 1 µ mol の p-ニトロフェノールを生成する酵素の量として定義した。

代謝解析

グルコースを含む M9YP 培地を用いて、それぞれの株を培養し、対数増殖期においてサン プリングを行った(ATCC31882x, 5.5 h; CFT5x, 14 h; GX1x, 14 h)。サンプル 2 mL を迅速にフィ ルター濾過し、菌体を回収した。Shirai 氏らの報告の手法に従い、抽出混合液(CHCl3:CH3OH:H2O, 2:2:1, v/v/v)を用いて代謝物の抽出を行った⁶⁵。15,000 × g、4 °C、15 min 遠心分離後、上清 400 μ L を回収した。抽出液を LCMS-8040 triple quadrupole LC/MS/MS spectrometer(Shimadzu, Kyoto, Japan)を用いた液体クロマトグラフィー-質量分析法を用いて代謝物の定量を行った。

ウエスタンブロッティング

1-4 と同様の条件で分析を行った。



Figure 1. BGL localization in the periplasm by anchoring to the cell outer membrane or by using the transport signal and localization in the periplasm. (A) Phenylalanine production after 48 h cultivation. Light green and Dark green bars indicates the production of phenylalanine by control strain (BD0) and the strains expressing BGL (BD1, BP1, and BC1), respectively. (B) Whole cell activity of BGL in BD0, BD1, BP1, and BC1. (C) Western blotting analysis of BD0, BD1, BP1, and BC1. Left side lane: protein marker. An anti-Tfu0937 antibody (Sigma-Aldrich) and an Anti-Rabbit IgG (Fc) AP Conjugate (Promega Corp.) were used to detect Tfu0937. The data are presented as the average of three independent experiments, and error bars indicate standard errors. P values were computed using the two-tailed Student's *t*-test (NS, P > 0.05; *, P < 0.05; **, P < 0.01).



Marker BD0 BD1L BD1M BD1

Figure 2. Effect of copy number of the plasmids expressing BGL in the periplasm. (A) Whole cell activity of BGL in BD0, BD1L, BD1M, and BD1. (B) Western blotting analysis of BD0, BD1L, BD1M, and BD1. Left side lane: protein marker. An anti-Tfu0937 antibody (Sigma-Aldrich) and an Anti-Rabbit IgG (Fc) AP Conjugate (Promega Corp.) were used to detect Tfu0937. (C) Phenylalanine production after 48 h cultivation. Orange, blue, and green bars indicate the relative production of phenylalanine in the strains derived from BD1L, BD1M, and BD1, respectively. Light color and Dark color bars indicate the relative production of phenylalanine in control strains harboring empty vectors and in indicate BGL expressing strains, respectively. The data are presented as the average of three independent experiments, and error bars indicate standard errors. P values were computed using the two-tailed Student's *t*-test (NS, P > 0.05; *, P < 0.05; **, P < 0.01).



Figure 3 Culture profile of CFT1-derived strains (A) Phenylalanine production after 48 h cultivation. Light green and dark green bars indicate the production titer in the control strain (BD Δ HI0) and BGL expressing strains (BD Δ HI1 and BP Δ HI1), respectively. (B) Relative intracellular concentrations of PEP and pyruvate relative to control strain BD Δ HI0. The data are presented as the average of three independent experiments, and error bars indicate standard errors. P values were computed using the two-tailed Student's *t*-test (*, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01).



Figure 4. Disruption of genes related to PTS. (A) Diagrams of glucose transportation by PTS and GalP/Glk system. Red "P" indicates phosphoryl group. The table in the diagram subscribes disrupted, edited, and overexpressed genes in each strain. " Δ " and "+" indicate gene disruption and overexpression, respectively. (B) Phenylalanine production after 48 h cultivation. Blue, orange, and green bars indicate the production titer in the CFT1-derived strains (BD Δ HI0 and BD Δ HI1), CFT1 Δ *crr*-derived strains (BD Δ HIC0 and BD Δ HIC1) and CFT1 Δ *ptsG*-derived strains (BD Δ HIG0 and BD Δ HIG1), respectively. (C) Relative intracellular concentrations of PEP and pyruvate relative to control strain BD Δ HIG0. (D) Phenylalanine production after 48 h cultivation. Yellow and purple bars indicate the production titer in the CFT1-derived strains (BD Δ HIC0 and BD Δ HIC1) and CFT1 Δ *ptsG*-derived strains (BD Δ HIC0 and BD Δ HIC1) and CFT1 Δ *ptsG*-derived strains (BD Δ HIC0 and BD Δ HIG1), respectively. (C) Relative intracellular concentrations of PEP and pyruvate relative to control strain BD Δ HIG0. (D) Phenylalanine production after 48 h cultivation. Yellow and purple bars indicate the production titer in the CFT1-derived strains (BD Δ HI0 and BD Δ HI1), CFT1 Δ *crr*-derived strains (BD Δ HIC0 and BD Δ HIC1) and CFT1 Δ *ptsG*-derived strains (BD Δ HIG0 and BD Δ HIC1), respectively. Glc, glucose; PEP, phosphoenolpyruvate; G6P, glucose-6-phosphate. The data are presented as the average of three independent experiments, and error bars indicate standard errors. P values were computed using the two-tailed Student's *t*-test (NS, P > 0.05; *, P < 0.05; **, P < 0.01).



Figure 5. (A) Diagram of the hypothesized mechanism of this phenomenon. Red "P" indicates phosphoryl group. (B) Relative intracellular concentrations of G6P, F6P and F16BP relative to control strain BD Δ HI0. (C) Catabolic pathway of glucose, xylose, and fructose. (D) Phenylalanine production after 48 h cultivation. Blue, green, and yellow bars indicate the production titer using glucose, xylose, and fructose, respectively. Glc, glucose; PEP, phosphoenolpyruvate; PPP, pentose phosphate pathway; G6P, glucose-6-phosphate; 6PG, 6-phospho-gluconate; F6P, fructose-6-phosphate; F1P, fructose-1-phosphate; F16BP, fructose-1,6-biphosphate; GAP, glyceraldehyde 3-phosphate; E4P, erythrose 4-phosphate. The data are presented as the average of three independent experiments, and error bars indicate standard errors. P values were computed using the two-tailed Student's *t*-test (NS, P > 0.05; *, P < 0.05; **, P < 0.01).



Figure 6. *In vitro* examination of the inhibition of BGL-activity by glucose and G6P. Blue and red symbols indicate fractional enzymatic activity in the conditions adding glucose or G6P, respectively. G6P, glucose-6-phosphate.


Figure 7. Phenylalanine production after 48 h cultivation. Light green and dark green bars indicate the production titer in the control strain (BD0) and proteins expressing strains (GP1, PP1, PP2, ZP1, ZP2, AP1, and ZP2), respectively. GFP, green fluorescent protein. The data are presented as the average of three independent experiments, and error bars indicate standard errors. P values were computed using the two-tailed Student's *t*-test (NS, P > 0.05; **, P < 0.01).



Figure 8. Tyrosine production after 48 h cultivation. The data are presented as the average of three independent experiments, and error bars indicate standard errors. P values were computed using the two-tailed Student's *t*-test (NS, P > 0.05; **, P < 0.01).

Strains	Geneture	Source or
Strains	Genotype	reference
Nova Blue	endA1 hsdR17(rK12-mK12 ⁺) supE44 thi-I gyrA96 relA1 lac recA1/F' [proAB ⁺ lacIq Z Δ M15::Tn10(Tet r)]; used for gene cloning	Novagen
ATCC31882	L-Phenylalanine-overproducing strain	ATCC
ATCC31882 $\Delta ptsG$	ATCC31882 $\Delta ptsG$	This study
CFT1	ATCC31882 ptsHI:: P AllacO-1 -glk-galP	Noda et al. ²³
CFT1∆ <i>crr</i>	ATCC31882 ptsHI:: $P_{AllacO-1}$ -glk-galP Δcrr	This study
$CFT1\Delta ptsG$	ATCC31882 $ptsHI::P_{AllacO-1}$ -glk-galP $\Delta ptsG$	This study
C421S	ATCC31882 $ptsG$:: $ptsG$ ^{C421S}	This study
TYR	CFT1 <i>trpE::tyrA^{fbr} ΔpheA</i>	This study
BD0	ATCC31882 harboring pHLA	This study
BD1	ATCC31882 harboring pHLA-blc-tfu0937	This study
BD0L	ATCC31882 harboring pSAK	This study
BD1L	ATCC31882 harboring pSAK-blc-tfu0937	This study
BD0M	ATCC31882 harboring pZA23MCS	This study
BD1M	ATCC31882 harboring pZA23-blc-tfu0937	This study
BD2	ATCC31882 harboring pHLA-blc-tfu0937 ^{E388A}	This study
BP1	ATCC31882 harboring pHLA-pelB-tfu0937	This study
BC1	ATCC31882 harboring pHLA-Tfu0937	This study
BDAHI0	CFT1 harboring pHLA	This study
BDAHI1	CFT1 harboring pHLA-blc-tfu0937	This study
BPAHI1	CFT1 harboring pHLA-pelB-tfu0937	This study
BDAHIC0	CFT1∆ <i>crr</i> harboring pHLA	This study
BDAHIC1	CFT1∆crr harboring pHLA-blc-tfu0937	This study
BDAHIG0	$CFT1\Delta ptsG$ harboring pHLA	This study
BDAHIG1	CFT1∆ptsG harboring pHLA-blc-tfu0937	This study
BD∆G0	ATCC31882 $\Delta ptsG$ harboring pHLA	This study
BD∆G1	ATCC31882ΔptsG harboring pHLA-blc-tfu0937	This study
C421S0	C421S harboring pHLA	This study
C421S1	C421S harboring pHLA-blc-tfu0937	This study
AP1	ATCC31882 harboring pHLA-phoA	This study
AP2	ATCC31882 harboring pHLA-phoA ^{S124A}	This study
PP1	ATCC31882 harboring pHLA-pelB-pgi	This study
PP2	ATCC31882 harboring pHLA-pelB-pgi ^{H386A}	This study
ZP1	ATCC31882 harboring pHLA-pelB-zwf	This study
ZP2	ATCC31882 harboring pHLA-pelB-zwf ^{H239A}	This study

rable 1. Strams and prasmus asea in this study	Table 1.	Strains	and	plasmids	used	in	this	study
--	----------	---------	-----	----------	------	----	------	-------

GP1	ATCC31882 harboring pHLA-pelB-gfp	This study
TYR0	TYR harboring pHLA	This study
TYR1	TYR harboring pHLA-blc-tfu0937	This study
Plasmids		
pEGFP	Express GFP in bacterial systems	Takara
pHLA	P_{HCE} , ColE1 ori, Amp ^{r}	Tanaka et al. ⁷⁴
pHLA-blc-tfu0937	pHLA expressing Blc-Tfu0937	Tanaka et al. ⁷⁴
pHLA-blc-tfu0937E388A	pHLA expressing Blc-Tfu0937 ^{E388A}	This study
pHLA-pelB-tfu0937	pHLA expressing PelB-Tfu0937	This study
pHLA-Tfu0937	pHLA expressing Tfu0937	This study
pHLA-phoA	pHLA expressing PhoA	This study
pHLA-phoA ^{S124A}	pHLA expressing PhoA ^{S124A}	This study
pHLA-pelB-pgi	pHLA expressing PelB-Pgi	This study
pHLA-pelB-pgi ^{H386A}	pHLA expressing PelB-Pgi ^{H386A}	This study
pHLA-pelB-zwf	pHLA expressing PelB-Zwf	This study
pHLA-pelB-zwf ^{H239A}	pHLA expressing PelB-Zwf ^{H239A}	This study
pHLA-pelB-gfp	pHLA expressing PelB-GFP	This study
pSAK	P_{AlacOI} , SC101 ori, and Cm^r	Noda et al. ⁶⁷
pSAK-blc-tfu0937	pSAK expressing Blc-Tfu0937	This study
pSAK-P _{trc}	P_{trc} , SC101 ori, and Cm^r	This study
pSAK-tyrA ^{fbr}	pSAK-P _{trc} containing <i>tyrA</i> ^{fbr} and feedback-inhibition-resistant (fbr) derivatives of <i>tyrA</i>	This study
pZA23MCS	P _{AllacO-1} , p15A ori, Km ^r	Expressys
pZA23-blc-tfu0937	pZA23MCS expressing Blc-Tfu0937	This study
pTargetF	Constitutive expression of sgRNA	Addgene
pCas	Constitutive expression of cas9 and inducible expression of λ RED and sgR	Addgene
pT∆ptsG	Constitutive expression of sgRNA with donor editing template DNA for <i>ptsG</i> disruption	This study
pT∆crr	Constitutive expression of sgRNA with donor editing template DNA for <i>pheA</i> disruption	This study
pTtrpE::tyrA ^{fbr}	Constitutive expression of sgRNA with donor editing template DNA for <i>tyr</i> ^{fbr} insertion into <i>trpE</i> gene loci.	This study

Table 1. Primers used in this study

Plasmids	Primers	Sequences
pHLA-blc-tfu0937 ^{E388A}	E388A_for	CTACCCGGGCCTGCCGCTGTACATCACCGCGAACGGCGCCGCCTTCGAGGAC
	E388A_re	GTCCTCGAAGGCGGCGCCGTTCGCGGTGATGTACAGCGGCAGGCCCGGGTAG
	pelB_Tfu0937_f1	ccgctgctgctgctgctgctcctcgctgcccagccggcgatggccATGACCTCGCAATCGACGACTCC
pHLA-pelB-tfu0937	XhoI_Tfu0937_re	gccaagcttctcgagCTATTCCTGTCCGAAGATTCCCCCG
	Bgl2_pelB_for	tggaaaaaggagatctgatgaaatacctgctgccgaCCGCTGCTGCTGGTCTGCTGC
pHLA-Tfu0937	n.stfu0937_f	TGGAAAAAGGAGATCTGATGACCTCGCAATCGACGACTCC
	n.stfu0937_r	GCCAAGCTTCTCGAGCTATTCCTGTCCGAAGATTCCCCCG
pHLA-phoA	phoA_f	TGGAAAAAGGAGATCTGATGAAAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCG
	phoA_r	AGCCAAGCTTCTCGAGTTATTTCAGCCCCAGAGCGGCTTTC
pHLA-phoA ^{S124A}	phoA_S124A_r	CGTCACCGACGCGGCCGCATCAGCAACCGCCTGGTCAACCG
	phoA_S124A_f	GTTGCTGATGCGGCCGCGTCGGTGACGTAGTCCGGTTTGCCG
pHLA-pelB-pgi	pelB_pgi_f1	ccgctgctgctgctgctgctcctcgctgcccagccggcgatggccATGAAAAACATCAATCCAACGCAGACCG
	XhoI_pgi_re	gccaagcttctcgagTTAACCGCGCCACGCTTTATAGCGG
pHLA-pelB-pgi ^{H386A}	pgi_H386A_smal_for	cagactggcccgattatctggggtgaaccCggGactaacggtcagGccgcgttctaccagctgatccaccagggaacccgggaacccggttctaccagctgatccaccagggaacccgggaacccggttctaccagctgatccaccagggaacccgggaacccggttctaccagctgatccaccagggaacccgggaaccggttctaccagctgatccaccagggaaccggaaccggaaccggttctaccagctgatccaccagggaaccggaaccggaaccggaaccggaaccggaaccggaaccggaaccggaaccggaacggaaccggaacggaaccggaacggaacggaaccggaacgaacggaacgaacggaacgaacggaacggaacgaacggaacgaacggaacgaacgaacggaaccgaacgaacgaacgaacgaac
	pgi_H386A_smaI_re	GTTCCCTGGTGGATCAGCTGGTAGAACGCGGCCTGACCGTTAGTCCCGGGTTCACC CCAGATAATCGGGCCAGTCTG
pHLA-pelB-zwf	pelB_zwf_f1	ccgctgctgctgctgctgctcctcgctgcccagccggcgatggccATGGCGGTAACGCAAACAGCCCAG
	XhoI_zwf_re	gccaagcttctcgagTTACTCAAACTCATTCCAGGAACGACCATC
pHLA-pelB-zwf ^{H239A}	zwf_H239A_pstI_for	cggtcagatgcgcgacatgatccagaacGCCctgctgcaGattctttgcatgattgcgatgtctccgcc
	zwf_H239A_pstI_re	GGCGGAGACATCGCAATCATGCAAAGAATCTGCAGCAGGGCGTTCTGGATCATGTC GCGCATCTGACCG
pHLA-pelB-pgi	gfp_f1	CCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCGCTGCCCAGCCGGCGATGGCCATGGTGAGCA AGGGCGAGGAGCTG
	gfp_f2	TGGAAAAAGGAGATCTGATGAAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGC

	gfp_r	GCCAAGCTTCTCGAGCTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATC
pSAK-blc-tfu0937	c.ntfu0937_f	TCGTCTTCACCTCGAGGCTCCAGATCGCTAGCTTGATCTCTCC
pZA23-blc-tfu0937	c.ntfu0937_r	ATTCGATATCAAGCTTCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATAC
	sgRNA ptsG Rv	GATTGCAGAACCAATCGGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGC
	sgRNA ptsG Fw	GATTGGTTCTGCAATCCAGCTAGCATTATACCTAGGACTGAGCTAGCT
aT A ataC	HomSeqUp ptsG Fw	TGCTTTTTTGAATTCGCTTAGATGCCCTGTACACGGCGAG
pΤΔptsG	HomSeq Up ptsG Rv	CTGTCTGGTGGCTTCCACCGGAGATAATCCCTCCGAGTACGC
	HomSeq Dw ptsG Fw	GAGGGATTATCTCCGGTGGAAGCCACCAGACAGTTTACCCGCAGTC
	HomSeq Dw ptsG Rv	GCTTCTGCAGGTCGACCTGATCCACTTTAGACACATCAGCAACGC
pT∆crr	sgRNA crr Rv	GGCTTTCTCTTCCAGCAGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGC
	sgRNA crr Fw	GCTGGAAGAGAAAGCCAAGCTAGCATTATACCTAGGACTGAGCTAGCT
	HomSeqUp crr Fw	TGCTTTTTTGAATTCTTGCTGGCGATGAACGTGCTACACTTC
	HomSeq Up crr Rv	GATAACCGGGGTTTCACCCGGCACGTCTTCGATATTGACGATCTC
	HomSeq Dw crr Fw	GAAGACGTGCCGGGTGAAACCCCCGGTTATCCGCATCAAGAAGT
	HomSeq Dw crr Rv	GCTTCTGCAGGTCGACGATCTCGACAGTGCCATTGCTGCCG
pTtrpE∷tyrA ^{fbr}	sgRNA trpE Rv	GGAAACCACTGGCAGCGGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGC
	sgRNA trpE Fw	GCTGCCAGTGGTTTCCGTGCTAGCATTATACCTAGGACTGAGCTAGCT
	HomSeqUp trpE Fw	TGCTTTTTTGAATTCGCAATCAGATACCCAGCCCGCCTAATGAG
	HomSeq Up trpE Rv	GGGTGAAATCGCGGCCGCCACAAGGTCATAAGAGAACAGGCCGCCG
	HomSeq Dw trpE Fw	GACCTTGTGGCGGCCGCGATTTCACCCTATTTGGCGCGTCGC
	HomSeq Dw trpE Rv	GCTTCTGCAGGTCGACGTGGCGATACCGTTTTCCACCAGC
	tyr_ins Fw	GGGTGAAATCGCGGCCGCCCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTCG
	tyr_ins Rv	GACCTTGTGGCGGCCGCATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC

総括

本研究では、酵素工学的手法及び代謝工学的手法に加え、新たな微生物改変技術である細胞 表層工学を用いた代謝制御により、シキミ酸経路誘導体の生産量及び収率の向上を目指し、研究 を進めた。

第一章では、酵素工学的な手法(融合タンパク質技術)を用いてシキミ酸経路誘導体である MAの収率向上を試みた。代謝の分岐点であるコリスミ酸の前後の酵素を融合タンパク質として発 現させることで、シキミ酸経路からの炭素フラックスを MA 合成経路へと導くことに成功した。 最終的な生産量は 4.45 g/L であり、コントロール株である CFT51a と比較して生産量は 4.44 倍 向上した。この結果は、融合タンパク質を使用した代謝チャネリングが、目的の経路に炭素フラッ クスを誘導する強力なツールであることを示唆している。

第二章では、新たな代謝工学的戦略である"Parallel Metabolic Pathway Engineering"によ る目的化合物の生産量向上を目指した。PMPE 株では、Dahms 経路を介してキシロースから増殖 に必須な代謝物が供給されたのに対し、グルコースは TCA サイクルに流入することなく MA 生産 に利用されたため、高収量で MA を生産することに成功した。最終的に生産量 4.09 ± 0.14 g/L、 収率 0.31 ± 0.003 g/g を達成し、どちらも大幅に改善された。また、PMPE が好気期条件だけで なく微好気条件でも有効であることや、シキミ酸経路以外の経路(1,2-プロパンジオール生産経路) でも有効であることも実証した。これらの結果から、PMPE は様々な種類の化合物生産における 収率向上に大きく貢献することが期待される。

第三章では、全く新しいアプローチである細胞表層工学によるシキミ酸経路の強化及びそ のメカニズムの解明を試みた。BGL 及び G6P 補足タンパク質をペリプラズム中に局在化させるこ とで、PEP が蓄積しシキミ酸経路が強化されることを発見した。これまで、ペリプラズム空間に おけるタンパク質発現が代謝に与える影響に関する報告はほとんどなく、また代謝物の生産量向 上を目的としてペリプラズムの環境を改変したのは本研究が初めてである。更に、この現象には、 PTS システムを構成する膜貫通タンパク質である EIICB^{Glc} 及び解糖系中間代謝物である G6P が関 与していることを明らかにした。より詳細なメカニズムの解明は今後の課題であるが、細胞表層の 環境が代謝へ影響を及ぼすという本研究で得られた知見は、新たな細胞工学技術の発展に寄与す ると期待される。

以上のように、本研究では各章において異なる戦略を用いてシキミ酸経路誘導体の生産量 向上に成功した。微生物を用いた化合物生産では、特定の戦略のみを用いて十分に生産量や収率 を向上させることは困難であるため、様々な戦略を組み合わせることが重要である。本研究の戦 略、特に第二章及び第三章で用いた戦略は、これまでにないコンセプトで行われたアプローチであ り、その有用性を実証したことは、微生物による化合物生産技術の発展に大きく寄与するであろ う。今後、本研究で実証した戦略の組み合わせや、既存の戦略等との組み合わせによって、シキミ 酸経路誘導体を始めとした、様々な化合物生産の更なる改善が期待される。

参考文献

- 1. 産業技術総合研究所 独立行政法人 & テクノリサーチ研究所. 平成 21 年度 バイオマス資源の活用 とバイオマスマテリアルの 開発状況に関する実態調査. (2010).
- 2. Saha, B. C. Hemicellulose bioconversion. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30, 279–291 (2003).
- 3. 森浩禎. 大腸菌研究の歴史. 生物工学 **90**, 643-648 (2012).
- 4. 経済産業省 製造産業局素材産業課.世界の石油化学製品の今後の需給動向.(2017).
- 5. 田島 慶三. 石油化学技術の系統化調査 (国立科学博物館技術の系統化調査報告). (2016).
- Wendisch, V. F., Bott, M. & Eikmanns, B. J. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids. *Current Opinion in Microbiology* 9, 268–274 (2006).
- 7. Rodriguez, A. *et al.* Engineering *Escherichia coli* to overproduce aromatic amino acids and derived compounds. *Microbial Cell Factories* **13**, (2014).
- Liu, Y. *et al.* Genetic engineering of Escherichia coli to improve L-phenylalanine production. *BMC Biotechnol.* 18, 5 (2018).
- Fujiwara, R., Noda, S., Tanaka, T. & Kondo, A. Styrene production from a biomass-derived carbon source using a coculture system of phenylalanine ammonia lyase and phenylacrylic acid decarboxylaseexpressing Streptomyces lividans transformants. *J. Biosci. Bioeng.* 122, 730–735 (2016).
- 10. Ikeda, M. Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology* **69**, 615–626 (2006).
- Sugimoto, S. *et al.* Hyperproduction of phenylalanine by *Escherichia coli*: application of a temperaturecontrollable expression vector carrying the repressor-promoter system of bacteriophage lambda. *J. Biotechnol.* 5, 237–253 (1987).
- Takagi, M., Nishio, Y., Oh, G. & Yoshida, T. Control of L-phenylalanine production by dual feeding of glucose and L-tyrosine. *Biotechnol. Bioeng.* 52, 653–660 (1996).
- IHS Markit. Adipic Acid Chemical Economics Handbook (CEH). (2017). Available at: https://www.ihs.com/products/adipic-acid-chemical-economics-handbook.html. (Accessed: 16th November 2017)
- 14. Global Industry Analysts Inc. Stable Demand from End-Use Sectors to Sustain Growth in the Global Adipic Acid Market. (2016). Available at: http://www.strategyr.com/MarketResearch/Adipic_Acid_Market_Trends.asp. (Accessed: 16th November 2017)
- 15. Yu, J. Le, Xia, X. X., Zhong, J. J. & Qian, Z. G. Direct biosynthesis of adipic acid from a synthetic pathway in recombinant *Escherichia coli. Biotechnol. Bioeng.* **111**, 2580–2586 (2014).
- Cheong, S., Clomburg, J. M. & Gonzalez, R. Energy- and carbon-efficient synthesis of functionalized small molecules in bacteria using non-decarboxylative Claisen condensation reactions. *Nat. Biotechnol.* 34, 556–561 (2016).

- Niu, W., Draths, K. M. & Frost, J. W. Benzene-free synthesis of adipic acid. *Biotechnol. Prog.* 18, 201–211 (2002).
- Barton, N. *et al.* Enabling the valorization of guaiacol-based lignin: Integrated chemical and biochemical production of *cis, cis*-muconic acid using metabolically engineered Amycolatopsis sp ATCC 39116. (2018). doi:10.1016/j.ymben.2017.12.001
- Shen, L., Worrell, E. & Patel, M. Present and future development in plastics from biomass. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 4, 25–40 (2010).
- 20. Lin, Y., Sun, X., Yuan, Q. & Yan, Y. Extending shikimate pathway for the production of muconic acid and its precursor salicylic acid in *Escherichia coli. Metab. Eng.* **23**, 62–69 (2014).
- 21. Zhang, H., Li, Z., Pereira, B. & Stephanopoulos, G. Engineering *E. coli–E. coli* cocultures for production of muconic acid from glycerol. *Microb. Cell Fact.* **14**, 134 (2015).
- Sengupta, S., Jonnalagadda, S., Goonewardena, L. & Juturu, V. Metabolic engineering of a novel muconic acid biosynthesis pathway via 4-hydroxybenzoic acid in *Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol.* 81, 8037–8043 (2015).
- 23. Noda, S., Shirai, T., Oyama, S. & Kondo, A. Metabolic design of a platform *Escherichia coli* strain producing various chorismate derivatives. *Metab. Eng.* **33**, 119–129 (2016).
- 24. Noda, S. & Kondo, A. Recent Advances in Microbial Production of Aromatic Chemicals and Derivatives. *Trends Biotechnol.* **35**, 785–796 (2017).
- 25. Matsumoto, T., Furuta, K., Tanaka, T. & Kondo, A. Sortase A-Mediated Metabolic Enzyme Ligation in *Escherichia coli*. doi:10.1021/acssynbio.6b00194
- Wang, C. *et al.* Metabolic engineering of *Escherichia coli* for a-farnesene production. *Metab. Eng.* 13, 648–655 (2011).
- 27. Lütke-Eversloh, T. & Stephanopoulos, G. L-Tyrosine production by deregulated strains of *Escherichia coli. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**, 103–110 (2007).
- 28. Duncan, K., Chaudhuri, S., Campbell, M. S. & Coggins, J. R. The overexpression and complete amino acid sequence of *Escherichia coli* 3-dehydroquinase. *Biochem. J* **238**, 475–483 (1986).
- 29. Small, P., Blankenhorn, D., Welty, D., Zinser, E. & Slonczewski, J. L. Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *rpoS* and growth pH. *J. Bacteriol.* **176**, 1729–37 (1994).
- Mugikura, S., Nishikawa, M., Igarashi, K. & Kobayashi, H. Maintenance of a Neutral Cytoplasmic pH Is Not Obligatory for Growth of *Escherichia coli* and *Streptococcus faecalis* at an Alkaline pH. *J. Biochem.* 108, 86–91 (1990).
- Thompson, B., Pugh, S., Machas, M. & Nielsen, D. R. Muconic Acid Production via Alternative Pathways and a Synthetic 'Metabolic Funnel'. *ACS Synth. Biol.* 7, 565–575 (2018).
- Takkellapati, S., Li, T. & Gonzalez, M. A. An overview of biorefinery-derived platform chemicals from a cellulose and hemicellulose biorefinery. *Clean Technol. Environ. Policy* 20, 1615–1630 (2018).
- Ishola, M. M., Brandberg, T. & Taherzadeh, M. J. Simultaneous glucose and xylose utilization for improved ethanol production from lignocellulosic biomass through SSFF with encapsulated yeast. *Biomass and Bioenergy* 77, 192–199 (2015).

- 34. Liu, R. *et al.* Efficient succinic acid production from lignocellulosic biomass by simultaneous utilization of glucose and xylose in engineered *Escherichia coli. Bioresour. Technol.* **149**, 84–91 (2013).
- 35. Kim, S. R., Park, Y.-C., Jin, Y.-S. & Seo, J.-H. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism. *Biotechnol. Adv.* **31**, 851–861 (2013).
- Kremling, A., Geiselmann, J., Ropers, D. & de Jong, H. Understanding carbon catabolite repression in Escherichia coli using quantitative models. Trends Microbiol. 23, 99–109 (2015).
- 37. Brückner, R. & Titgemeyer, F. Carbon catabolite repression in bacteria: Choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiology Letters* **209**, 141–148 (2002).
- Gonzalez, J. E. & Antoniewicz, M. R. Tracing metabolism from lignocellulosic biomass and gaseous substrates to products with stable-isotopes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 43, 86–95 (2017).
- Kim, S. M. *et al.* Simultaneous utilization of glucose and xylose via novel mechanisms in engineered *Escherichia coli. Metab. Eng.* 30, 141–148 (2015).
- 40. Wang, X., Goh, E.-B. & Beller, H. R. Engineering *E. coli* for simultaneous glucose-xylose utilization during methyl ketone production. *Microb. Cell Fact.* **17**, 12 (2018).
- Matsumoto, T., Tanaka, T. & Kondo, A. Engineering metabolic pathways in *Escherichia coli* for constructing a "microbial chassis" for biochemical production. *Bioresource Technology* 245, 1362–1368 (2017).
- 42. Soma, Y., Tsuruno, K., Wada, M., Yokota, A. & Hanai, T. Metabolic flux redirection from a central metabolic pathway toward a synthetic pathway using a metabolic toggle switch. *Metab. Eng.* **23**, 175–184 (2014).
- 43. Stephens, C. *et al.* Genetic analysis of a novel pathway for D-xylose metabolism in *Caulobacter crescentus. J. Bacteriol.* **189**, 2181–2185 (2007).
- Peng, L., Arauzo-Bravo, M. J. & Shimizu, K. Metabolic flux analysis for a *ppc* mutant *Escherichia coli* based on ¹³C-labelling experiments together with enzyme activity assays and intracellular metabolite measurements. *FEMS Microbiol. Lett.* 235, 17–23 (2004).
- 45. Al Zaid Siddiquee, K., Arauzo-Bravo, M. J. & Shimizu, K. Metabolic flux analysis of *pykF* gene knockout *Escherichia coli* based on ¹³C-labeling experiments together with measurements of enzyme activities and intracellular metabolite concentrations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 407–417 (2004).
- Morikawa, M., Izui, K., Taguchi, M. & Katsuki, H. Regulation of *Escherichia coli* Phosphoenolpyruvate Carboxylase by Multiple Effectors *In Vivo*: I. Estimation of the Activities in the Cells Grown on Various Compounds. *J. Biochem.* 87, 441–9 (1980).
- Yang, C., Hua, Q., Baba, T., Mori, H. & Shimizu, K. Analysis of *Escherichia coli* anaplerotic metabolism and its regulation mechanisms from the metabolic responses to altered dilution rates and phosphoenolpyruvate carboxykinase knockout. *Biotechnol. Bioeng.* 84, 129–144 (2003).
- 48. Kotlarz, D. & Buc, H. [11] Phosphofructokinases from *Escherichia coli. Methods Enzymol.* **90**, 60–70 (1982).
- Hines, J. K., Fromm, H. J. & Honzatko, R. B. Novel allosteric activation site in *Escherichia coli* fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 281, 18386–93 (2006).

- 50. Meza, E., Becker, J., Bolivar, F., Gosset, G. & Wittmann, C. Consequences of phosphoenolpyruvate:sugar phosphotranferase system and pyruvate kinase isozymes inactivation in central carbon metabolism flux distribution in *Escherichia coli. Microb. Cell Fact.* **11**, 127 (2012).
- 51. Zhang, H., Pereira, B., Li, Z. & Stephanopoulos, G. Engineering *Escherichia coli* coculture systems for the production of biochemical products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 8266–8271 (2015).
- 52. Zhang, X., Xu, G., Shi, J., Koffas, M. A. G. & Xu, Z. Microbial Production of I-Serine from Renewable Feedstocks. *Trends Biotechnol.* **36**, 700–712 (2018).
- Campos-Bermudez, V. A., Bologna, F. P., Andreo, C. S. & Drincovich, M. F. Functional dissection of *Escherichia coli* phosphotransacetylase structural domains and analysis of key compounds involved in activity regulation. *FEBS J.* 277, 1957–1966 (2010).
- Mat-Jan, F., Alam, K. Y. & Clark, D. P. Mutants of Escherichia coli deficient in the fermentative lactate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* 171, 342–348 (1989).
- 55. Cabulong, R. B. *et al.* Enhanced yield of ethylene glycol production from D-xylose by pathway optimization in *Escherichia coli. Enzyme Microb. Technol.* **97**, 11–20 (2017).
- Cao, Y., Niu, W., Guo, J., Xian, M. & Liu, H. Biotechnological production of 1,2,4-butanetriol: An efficient process to synthesize energetic material precursor from renewable biomass. *Sci. Rep.* 5, (2015).
- 57. Cabulong, R. B. *et al.* Engineering *Escherichia coli* for glycolic acid production from D-xylose through the Dahms pathway and glyoxylate bypass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 2179–2189 (2018).
- 58. Zhang, N., Wang, J., Zhang, Y. & Gao, H. Metabolic pathway optimization for biosynthesis of 1,2,4butanetriol from xylose by engineered *Escherichia coli. Enzyme Microb. Technol.* **93–94**, 51–58 (2016).
- Varma, A., Boesch, B. W. & Palsson, B. O. Biochemical Production Capabilities of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 42, 59–73 (1993).
- Juminaga, D. *et al.* Modular engineering of L-tyrosine production in *Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol.* 78, 89–98 (2012).
- Cameron, D. C., Altaras, N. E., Hoffman, M. L. & Shaw, A. J. Metabolic Engineering of Propanediol Pathways. *Biotechnol. Prog.* 14, 116–125 (1998).
- 62. Jain, R., Huang, J., Yuan, Q. & Yan, Y. Engineering microaerobic metabolism of *E. coli* for 1,2-propanediol production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 1049–1055 (2015).
- Jiang, Y. *et al.* Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2506–2514 (2015).
- 64. Chihara, K., Kishikawa, N., Ohyama, K., Nakashima, K. & Kuroda, N. Determination of glyoxylic acid in urine by liquid chromatography with fluorescence detection, using a novel derivatization procedure based on the Petasis reaction. *Anal. Bioanal. Chem.* **403**, 2765–2770 (2012).
- Shirai, T., Matsuda, F., Okamoto, M. & Kondo, A. Evaluation of control mechanisms for Saccharomyces cerevisiae central metabolic reactions using metabolome data of eight single-gene deletion mutants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 3569–3577 (2013).
- 66. Fujiwara, R., Noda, S., Tanaka, T. & Kondo, A. Muconic Acid Production Using Gene-Level Fusion

Proteins in Escherichia coli. ACS Synth. Biol. 7, 2698–2705 (2018).

- 67. Noda, S., Shirai, T., Mori, Y., Oyama, S. & Kondo, A. Engineering a synthetic pathway for maleate in *Escherichia coli. Nat. Commun.* **8**, 1153 (2017).
- Morita, T., El-Kazzaz, W., Tanaka, Y., Inada, T. & Aiba, H. Accumulation of glucose 6-phosphate or fructose 6-phosphate is responsible for destabilization of glucose transporter mRNA in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 278, 15608–14 (2003).
- Vanderpool, C. K. & Gottesman, S. Involvement of a novel transcriptional activator and small RNA in post-transcriptional regulation of the glucose phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. *Mol. Microbiol.* 54, 1076–1089 (2004).
- Bettenbrock, K. *et al.* Correlation between Growth Rates, EIIACrr Phosphorylation, and Intracellular Cyclic AMP Levels in Escherichia coli K-12. *J. Bacteriol.* 189, 6891–6900 (2007).
- 71. Kim, D. *et al.* Systems assessment of transcriptional regulation on central carbon metabolism by Cra and CRP. *Nucleic Acids Res.* **46**, 2901–2917 (2018).
- 72. Morrison, J. F. Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta Enzymol.* **185**, 269–286 (1969).
- 73. Chung Nan Chang, Wun-Jing, K. & Chen, E. Y. Nucleotide sequence of the alkaline phosphatase gene of *Escherichia coli. Gene* **44**, 121–125 (1986).
- 74. Tanaka, T., Kawabata, H., Ogino, C. & Kondo, A. Creation of a cellooligosaccharide-assimilating Escherichia coli strain by displaying active beta-glucosidase on the cell surface via a novel anchor protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 6265–70 (2011).

論文目録

第1章は次の論文からなる。

FUJIWARA Ryosuke, NODA Shuhei, TANAKA Tsutomu, KONDO Akihiko: Muconic Acid Production Using Gene-Level Fusion Proteins in *Escherichia coli*. ACS Synthetic Biology, 7 (11), 2698–2705, 2018.

第2章は次の論文からなる。

FUJIWARA Ryosuke, NODA Shuhei, TANAKA Tsutomu, KONDO Akihiko: Metabolic engineering of *Escherichia coli* for shikimate pathway derivative production from glucose – xylose co-substrate. Nature communications, 11, 279, 2020.

第3章の内容は学術雑誌に投稿予定である。

謝辞

本研究を遂行し論文としてまとめることが出来ましたのは、多数の方々の御指導と御援助の 賜物であり、この場を借りて感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、日々のディスカッションや論文指導等、多大なる御指導と御助 言を賜りました、神戸大学大学院工学研究科 田中勉准教授に心より御礼申し上げます。

同様に、研究に関する議論や論文指導等において、様々な御指導と御助言を賜りました理化 学研究所 野田修平氏に心より御礼申し上げます。

本論文の審査にあたり御尽力いただきました神戸大学大学院工学研究科 西野孝教授、山 地秀樹教授、多くの適切なる御助言を賜りました神戸大学大学院イノベーション研究科 近藤昭 彦教授に深く感謝いたします。

実験を行うにあたり数々の御協力をいただきました神戸大学大学院工学研究科バイオ生産 工学研究室 松本拓也特命助教(現 大阪府立大学助教)、里和大地氏、高橋達哉氏、内尾匠吾氏、 寒河江康介氏、野中大輔氏、大友智佐子氏、岸田真裕美氏、中野麻理子氏、平田有希氏、山岡純子 氏、小西理絵氏、理化学研究所 白井智量氏に深く感謝いたします。

研究生活において数多くの御助言を賜りました神戸大学大学院工学研究科バイオ生産工学 研究室の皆様に感謝いたします。

最後に、博士後期課程への進学及び研究生活を許し支え、温かく支援してくれた祖母、姉そ して両親 藤原義喜代、藤原晴代に感謝いたします。