Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2024-10-12

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

(Degree)
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。

（別紙様式 3）

論文内容の要旨

氏　　名　　藤原　良介

専　　攻　　応用化学専攻

論文題目（外国語の場合は，その和訳を併記すること。）

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

指導教員　　田中　勉

（注）2，000 字～4，000 字でまとめること。

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。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。

第一章では、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、様々な代謝経路で利用されるため、代謝の分岐点となっている。コリスミ酸が競合する代謝経路で利用されることで、目的化合物の生産量・収率低下を引き起こすが、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（図 I）。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。

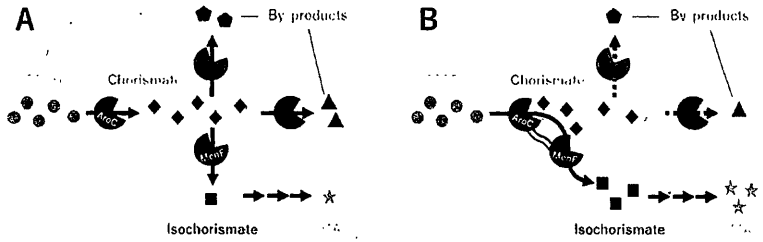

図 I 融合タンパク質による炭素フラックスの誘導

第二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、中でも PEP の利用可能性を向上させることが重要である。PEP はシキミ酸経路の出発物質とし

てだけでなく、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、完全に分離された二つの代謝経路を構築し、グルコース及びキシロースをそれぞれの経路の基質として利用すること（Parallel Metabolic Pathway Engineering, PMPE）で、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って、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必要な TCA サイクル中の代謝物の供給源として利用する、PMPE が可能となった。PMPE 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。

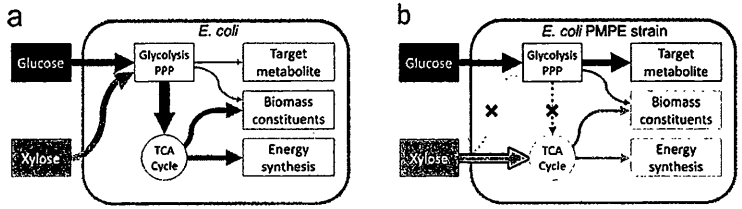

図 II Parallel Metabolic Pathway Engineering の概略図

第三章では、細胞表層の環境を最適化することでシキミ酸経路誘導体の生産量向上を試みた。細胞の代謝は、代謝経路の中間体以外の低分子化合物や、代謝調節因子として働く特定のタンパク質等の様々な要素によって調整されている。これらを最適化することは、微生物による物質生産において重要であるが、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。これまでの研究において、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 をペリプラズム中に局在化した株では解糖系の主要な代謝物のうちグルコース 6-リン酸（G6P）の量が有意に増加していることを確認した。更に BGL が G6P によって阻害を受けることから、BGL が G6P に対して親和性を持つことが示唆された。これらの結果から、$EIICB^{Glc}$ 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（図 III）。この仮説を検証するため、BGL 以外の 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。

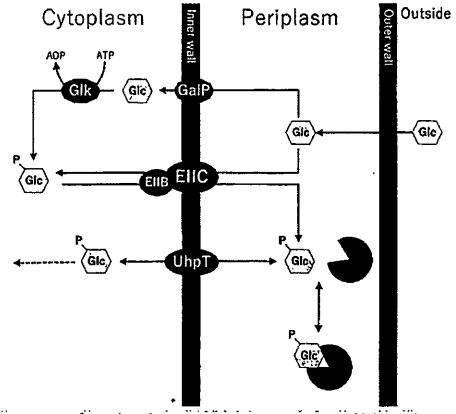

図 III ペリプラズム中の BGL による G6P の捕捉メカニズム

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。

（別紙１）　　論文審査の結果の要旨

氏名	藤原　良介		
論文題目	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		
審査委員	区　分	職　名	氏　　名
	主　査	准教授	田中　勉
	副　査	教授	山地　秀樹
	副　査	教授	西野　孝
	副　査	教授	近藤　昭彦
	副　査		印

要　　旨

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目指した。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。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。

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。以上の成果は ACS Synthetic Biology に掲載されている。

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。

氏名	藤原　良介

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 の生産量及び収率が向上した。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も向上した。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じた。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。以上の成果は Nature Communications に掲載されている。

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整機構が存在する。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。特許申請および論文発表のため詳細は割愛するが、本項目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に資するものであり、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。本成果は間も無く学術誌に投稿予定である。

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重要な知見を得たものとして価値ある集積である。提出された論文は工学研究科学位論文評価基準を満たしており、学位申請者の藤原　良介は、博士（工学）の学位を得る資格があると認める。