

バイオモノマー生産微生物パッケージキットの開発

神戸大学 大学院工学研究科応用化学専攻

田中 勉

1. はじめに

産業革命以降、石油・石炭・天然ガスなどの化石資源は、主要なエネルギー源として社会を支えてきた。また、化石資源はプラスチックをはじめとする多様な化学品の原料としても利用されており、現代の産業と生活に不可欠な基盤となっている。一方で、化石資源の利用は大量の二酸化炭素排出を伴い、さらに資源そのものが有限であるという課題を有している。化石資源の大量消費に伴う二酸化炭素排出は、大気中の二酸化炭素濃度の上昇を通じて、地球温暖化や近年の気候変動に深く関わっている。今後、産業のさらなる発展や人口増加により、世界のエネルギー消費量は2020年から2050年にかけて約50%増加すると予測されており¹⁾、化石資源に依存した生産体系の転換は重要な課題となっている。

持続可能な社会を実現するためには、化石資源が担ってきたエネルギー供給および化学品供給の役割を代替できる生産技術の構築が求められる。その中で、微生物を用いた発酵生産は、再生可能資源から有用化合物を生産できる技術として期待されている。しかし、現時点で工業化に至っている発酵生産プロセスは限られており、代替的な化学品供給手法として広く展開するためには、供給した原料を高効率に利用し、短時間で大量生産可能な菌株の育種と、スケールアップを含めた培養プロセスの開発が必要である。特に、非可食性原料などの安価な原料を効率的に利用すること、長期間にわたり安定した培養を維持すること、そして生産コストを低減することが、発酵生産の工業化における重要な課題である¹⁾。

微生物による物質生産では、高い生産収率を達成するために代謝経路を改変する手法が広く用いられている。目的物質の生産性を高めるためには、細胞増殖を維持しながら、炭素、エネルギー、補酵素、アミノ基供与体などの細胞内資源を適切に配分する必要がある。特に、細胞構成成分の合成やエネルギー産生に関わる経路と競合する生合成経路を導入した場合、細胞増殖と物質生産の間で資源配分の競合が生じる。また、多段階の代謝改変や異種遺伝子発現に伴う metabolic burden (代謝負荷) は、微生物の増殖や生産性を制限する要因となる。

この課題に対する戦略として、菌体内の代謝経路を機能ごとに切り分け、一つの細胞内で複数の代謝モジュールを並列に駆動させる平行代謝工学 (parallel metabolic pathway engineering; PMPE) がある^{3,4)}。PMPE では、解糖系およびペントースリン酸経路を、TCA 回路を中心とする増殖・エネルギー産生モジュールから機能的に分離することで、PEP を出発点の一つとするシキミ酸経路誘導体の生産性向上が示されている。この戦略では、グルコース由来炭素を主に目的物質生産へ振り向ける一方で、増殖やエネルギー産生に必要な炭素を別の形で供給することが重要となる。

この炭素供給には、主に二つの方法が検討されている。一つは、目的物質の生合成過程で副生するピルビン酸を TCA 回路へ供給する方法である。例えば、シキミ酸経路から派生するサリチル酸やマレイン酸の生合成では、1 分子または 2 分子のピルビン酸が放出される。放出されたピルビン酸は TCA 回路の駆動に利用され、増殖やエネルギー産生を支える炭素源として機能する。もう一つは、解糖系と競合しにくい補助炭素源を外部から供給する方法である。例えば、シキミ酸経路から生じる *cis, cis*- μ コン酸のように、生合成過程でピルビン酸を放出しない化合物では、増殖維持のための炭素供給が必要となる。この場合、*Caulobacter crescentus* 由来の Dahms 経路を導入し、キシロースをピルビン酸とグリオキシル酸へ変換することで、高収率な物質生産が達成されている。このように PMPE は、糖などによって供給された炭素を、目的物質生産と細胞増殖に効率的に分配するための有効な戦略である。一方で、目的物質の種類によっては、炭素フラックスだけでなく、アミノ基供与体や補酵素など、炭素以外の細胞内資源の供給も生産性を左右する。

本研究では、炭素源の利用に加えて細胞内資源の分配に着目し、代謝モジュールの制御を通じて物質生産性を向上させることを目的とした。特に、目的物質の合成にアミノ基転移反応を必要とし、アミノ酸合成と物質生産を両立させる必要がある 4-アミノフェニルアラニン

(4APhe) を対象とした。4APhe 生産をモデルとして、炭素フラックスとアミノ基供与体の利用性を同時に制御することで、細胞内資源配分に基づく生産性向上を検討した。

2. 方法

本研究では、グルコースとキシロースを同時に利用させることにより、4-アミノフェニルアラニン (4APhe) の生産性向上を試みた。4APhe の生合成経路は、*p*-aminobenzoic acid (pABA) の合成経路と 4-amino-4-deoxychorismate (4ADC) まで共通している。pABA 合成では 4ADC 以降の反応でピルビン酸が放出されるのに対し、4APhe 合成では 4ADC が 4-amino-4-deoxychorismate mutase (PapB) および 4-amino-4-deoxyprephenate dehydrogenase (PapC) により 4-アミノフェニルピルビン酸 (PAPP) へ変換され、その後、アミノ基転移反応により 4APhe が生成する^{5,6)}。そこで本研究では、*papB* および *papC* を、*pabA*、*pabB* 遺伝子および Weimberg 経路遺伝子群とともに過剰発現させた。(図 1)

試験管培養では、作製した株を 15 mL 試験管中の 4 mL M9Y 培地に接種し、37°C、220 rpm で一晩振とう培養した。物質生産培養では、この前培養液を 15 mL 試験管中の 5 mL M9Y 培地に初期 OD600 が 0.1 となるように接種し、37°C、220 rpm で振とう培養した。

バイオリクター培養では、作製した株を 200 mL フラスコ中の 50 mL M9Y 培地に接種し、20 g/L グルコースおよび 20 g/L キシロースを含む条件で、37°C、220 rpm にて一晩振とう培養した。この前培養液を、1 L バイオリクター中の 600 mL modified M9Y 培地に初期 OD600 が 0.1 となるように接種した。培養温度および pH は、それぞれ 30°C および 7.0 に維持した。pH は 28% (v/v) NH₃ および 1 N H₂SO₄ の自動添加により制御した。溶存

酸素 (DO) は攪拌速度の制御により 30%に維持した。4APhe 生産培養では、グルコース枯渇後に DO が 31.2%を超えた時点でフィード液が培養液に投入されるように制御した。

培養サンプル中のアミノ酸類は、DL-Amino Acid Labeling Kit (Nacalai Tesque) を用いて添付プロトコルに従って誘導体化し、HPLC により分析した。分析には MSII column (5 μ m, 4.6 mm I.D. \times 250 mm L; Nacalai Tesque) を用いた。移動相には 0.2%リン酸バッファー (A) およびメタノール (B) を用い、A = 50:50 の条件を 20 分間維持した。カラム温度は 40 $^{\circ}$ C、流速は 1.0 mL/min とし、340 nm の UV-VIS 検出器により検出した。

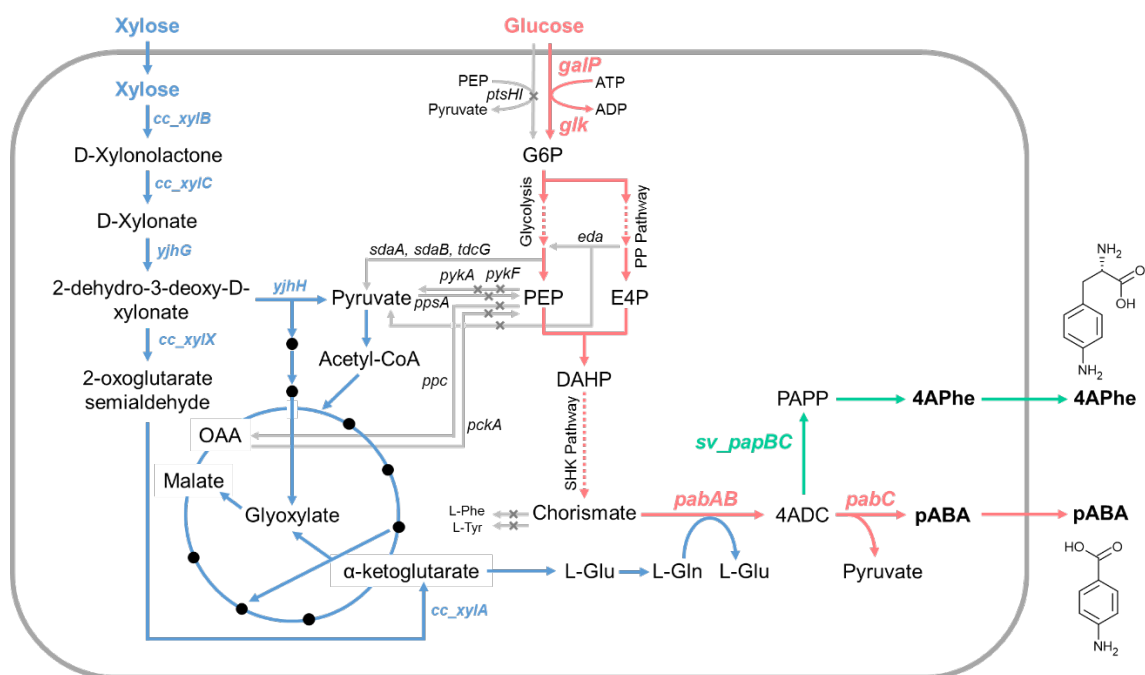


図 1. Metabolic engineering of the *Escherichia coli* strain for production of *p*-aminobenzoic acid.

Gray crosses indicate deletions of genes in the GX1 strain. Abbreviations: G6P, glucose 6-phosphate; E4P, erythrose 4-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; DAHP, 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate; 4ADC, 4-amino-4-deoxychorismate; pABA, *p*-Aminobenzoic acid; L-Glu, L-glutamate; PAPP, 4-aminophenylpyruvate; 4APhe, 4-amino-phenylalanine; L-Gln, L-glutamine; L-Phe, L-phenylalanine; L-Tyr, L-tyrosine; PP pathway, pentose phosphate pathway.

3. 結果および考察

4APhe は、pABA 生合成経路と共通する 4ADC を前駆体とするが、4ADC 以降の反応においてピルビン酸を放出しない経路により生産される。Streptomyces venezuelae 由来の PapB および PapC により 4ADC は PAPP へ変換され、続くアミノ基転移反応を経て 4APhe が生成する。本研究では、グルコースとキシロースの初期濃度を調節することにより、4APhe 生

産に必要な炭素フラックスとアミノ基供与体の利用性を制御し、4APhe 生産性の最適化を試みた。

まず、4APhe 生産株として pNE-Ptrc-EcpabAB-SvpapBC および pSAK-W プラスミドを導入した GX16AW 株を構築した。この株を、15 g/L グルコースおよび 5 g/L キシロース、または 10 g/L グルコースおよび 10 g/L キシロースを含む培地で培養した。その結果、グルコース比率の高い培地で 48 時間培養した場合、GX16AW 株は 2.48 ± 0.39 g/L の 4APhe を生産し、消費グルコースあたりの収率は 0.27 ± 0.05 g/g であった (図 2B)。この 4APhe 収

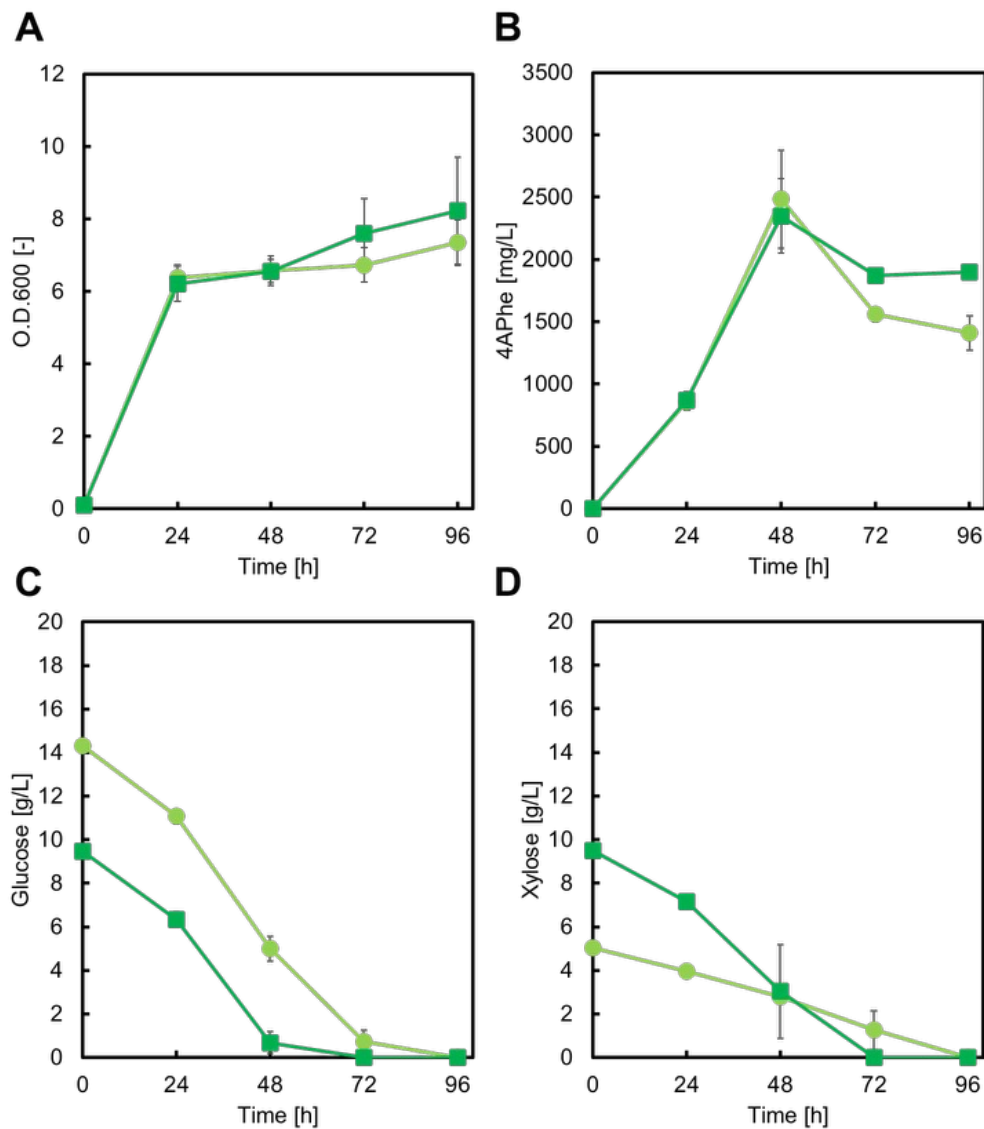


図 2. Culture profiles using the GX16AW in M9Y medium containing 15 g/L glucose and 5 g/L xylose (light green circles), 10 g/L each of glucose and xylose (green squares). Graphs illustrate (A) cell growth, (B) 4-amino-phenylalanine concentration, (C) glucose concentration, and (D) xylose concentration. Data are presented as means, error bars indicate standard deviation of three independent experiments.

率は pABA 生産時の収率と同程度であったが、同程度の糖消費量にもかかわらず、GX16AW 株の増殖はわずかに低下した (図 2A, 2C, 2D)。

この増殖低下は、4APhe 生産経路の代謝的特徴に起因する可能性がある。pABA 生産では 4ADC 以降の反応に伴ってピルビン酸が放出されるため、TCA 回路やエネルギー産生に炭素を供給し得る。一方、4APhe 生産ではピルビン酸が放出されないため、4ADC 以降に流入した炭素がエネルギー産生系へ戻りにくく、細胞増殖に利用可能な炭素フラックスが相対的に低下したと考えられる。また、培養開始後 48 時間以降では 4APhe 濃度が低下した。この時点では利用可能な糖がほぼ枯渇していたことから、糖枯渇後に 4APhe が再取り込みまたは分解された可能性が示唆された。

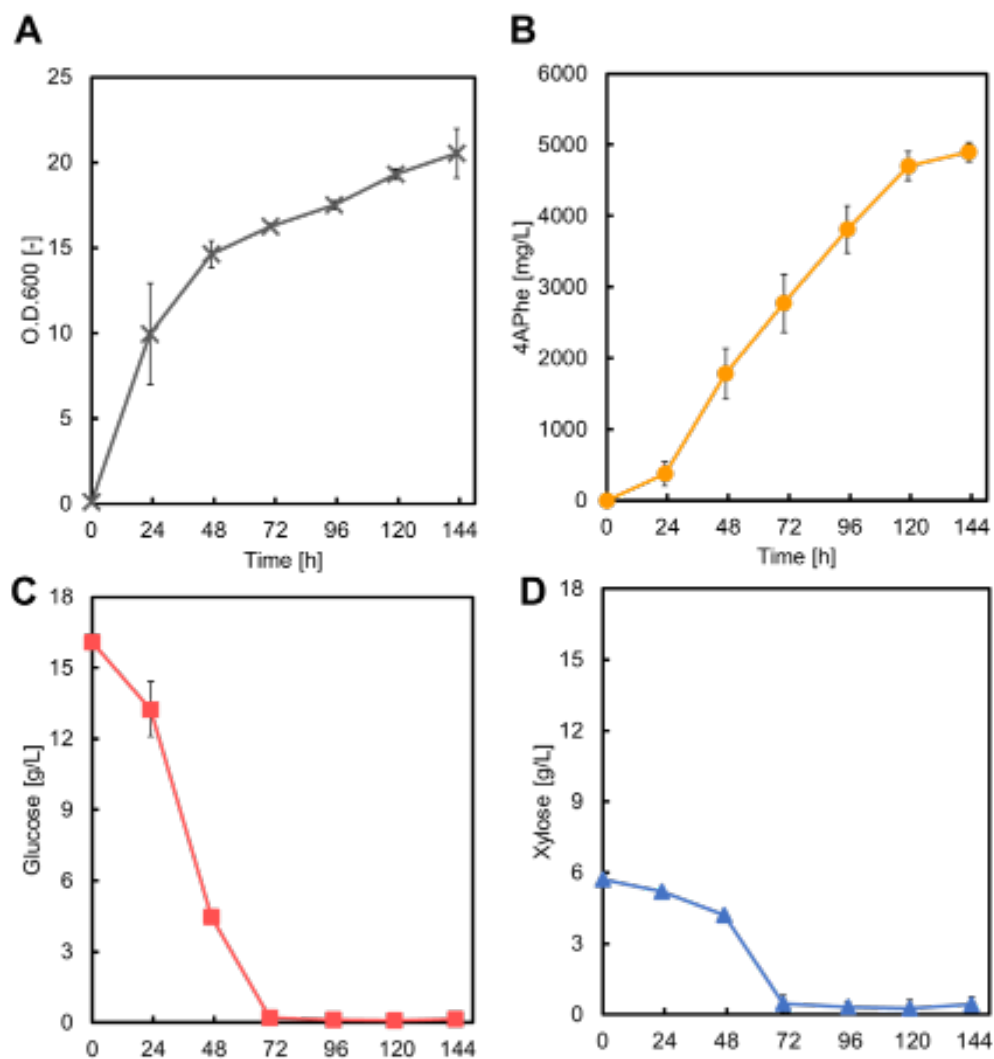


図 3. Results of fed-batch cultivation for 4-amino-phenylalanine production using GX16AW. Graphs illustrate (A) cell growth, (B) 4-amino-phenylalanine concentration, (C) glucose concentration, and (D) xylose concentration. Data are presented as means, error bars indicate standard deviation of three independent experiments.

次に、グルコースとキシロースを同時に利用するフェドバッチ培養を行った。その結果、4APhe 生産量は増加し、培養開始後 143 時間で 4.90 g/L の 4APhe を生産した (図 3)。この結果から、グルコースとキシロースを併用した培養制御により、4APhe 生産に必要な炭素供給とアミノ基供与体の利用性を一定期間維持できることが示された。

さらに 4APhe 生産量の向上を目指し、pABA 生産量の向上に有効であった MgSO₄ 高含有培地を用いて培養を行った。しかし、この条件では 4APhe 生産量の増加は認められなかった。pABA 生産では、4ADC 以降の反応に伴って放出されるピルビン酸がエネルギー産生に関わる代謝モジュールを補助し、菌体増殖や生産に寄与すると考えられる。一方、4APhe 生産ではピルビン酸放出を伴わないため、MgSO₄ 高含有培地による効果が pABA 生産時と同様には現れなかったと考えられる。

9. まとめ

4APhe 生産では、pABA 生産で有効であった培地組成の強化に加えて、4APhe 生合成経路そのものの改良が生産量向上に重要であることが示された。特に、4ADC から PAPP への変換効率、アミノ基転移反応におけるアミノ基供与体の供給、ならびに糖枯渇後の 4APhe 再取り込みまたは分解の抑制が、今後の生産性向上に向けた主要な検討課題である。

また、本研究では、グルコースとキシロースを使い分ける炭素供給設計、シキミ酸経路由来中間体からの 4APhe 生合成経路の構築、試験管培養からバイオリクター培養への展開、ならびにフェドバッチ制御による生産量向上を達成した。これらの成果は、芳香族アミノ酸型バイオモノマーを微生物内で生産するための宿主設計、経路導入、炭素源制御、培養制御を一体化した基盤技術を与えるものである。4APhe をモデル化合物とした実証により、パッケージキット化に向けた十分な基盤成果が得られたと考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人天野工業技術研究所から多大なご支援を頂きました。ここに記して謝意を示します。

参考文献

1. Adeleke, A. A., Ikubanni, P. P., Orhadahwe, T. A., Christopher, C. T., Akano, J. M., Agboola, O. O., Adegoke, S. O., Balogun, A. O., & Ibikunle, R. A. (2021). Sustainability of multifaceted usage of biomass: A review. *Heliyon*, 7(9), e08025.
2. Liu, X., Ding, W., & Jiang, H. (2017). Engineering microbial cell factories for the production of plant natural products: from design principles to industrial-scale production. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 125.

3. Fujiwara, R., Noda, S., Tanaka, T., & Kondo, A. (2020). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for shikimate pathway derivative production from glucose-xylose co-substrate. *Nature Communications*, 11(1), 279.
4. Noda, S., Mori, Y., Fujiwara, R., Shirai, T., Tanaka, T., & Kondo, A. (2021). Reprogramming *Escherichia coli* pyruvate-forming reaction towards chorismate derivatives production. *Metabolic Engineering*, 67, 1–10.
5. Masuo, S., Zhou, S., Kaneko, T., & Takaya, N. (2016). Bacterial fermentation platform for producing artificial aromatic amines. *Scientific Reports*, 6, 25764. <https://doi.org/10.1038/srep25764>
6. Mohammadi Nargesi, B., Trachtmann, N., Sprenger, G. A., & Youn, J.-W. (2018). Production of p-amino-L-phenylalanine (L-PAPA) from glycerol by metabolic grafting of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 149.