

酸素をスイッチとした樹脂原料の二段階生産

柘植 陽太

金沢大学 新学術創成研究機構

研究成果

本研究では酸素をスイッチとして中央代謝経路を切り換えることで、樹脂原料のカダベリンとコハク酸をそれぞれ好気条件、嫌気条件下で同一の菌株から効率良く生産する菌株の作製に成功した。

研究の目的

化石燃料に依存した社会からの脱却を図るべく、近年バイオマス由来の高分子合成に注目が集まっている。アミノ酸生産菌であるコリネ型細菌は、樹脂原料として利用できるジアミンのカダベリンやジカルボン酸のコハク酸の生産宿主として利用されている^{1,2)}。本研究では、酸素をスイッチとして中央代謝経路を切り換えることで、これら二つの樹脂原料を効率的に生産する菌株の作製を目的とした。

方法

宿主としてコリネ型細菌 (*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032) を使用した。本菌はカダベリンを生合成できないが、カダベリンはリジンから一段階の脱炭酸反応で合成されるため、大腸菌由来のリジン脱炭酸酵素遺伝子を導入した。さらに前駆体のリジンを高生産させるため、アスパルトキナーゼ遺伝子に一塩基置換を導入し、リジンによるフィードバック阻害を解除した。一方、嫌気条件下において本菌は、増殖は停止するが代謝活性は維持され、コハク酸と乳酸、酢酸を生産する。従ってコハク酸生産の副生成物となる乳酸や酢酸の生合成遺伝子の欠損を行った。最後に、カダベリン・コハク酸共通の前駆体であるオキサロ酢酸を蓄積させるため、ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子の高発現とイソクエン酸脱水素酵素遺伝子への一塩基置換の導入によりカダベリン・コハク酸生産株 (親株) を作製した。カダベリン生産は好気条件下において最少培地 (BTMC) で培養することで行った。コハク酸生産は初めに好気条件下において生産株を培養し、定常期に入った細胞を回収後、最少培地に懸濁、6%の細胞懸濁を調製して行った。生成物は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。

結果

1分子のカダベリン合成には4分子の補酵素 NADPH が必要である。NADPH は主にペントースリン酸経路 (PPP) で合成されるため、好気条件下でカダベリンを高生

産させるためには全ての炭素が PPP を流れることが望ましい。一方、嫌気条件下では炭素が PPP に流れないため、コハク酸の高生産には炭素をエムデン-マイヤーホフ経路 (EMP) へ妨げることなく流す必要がある。そこで、酸素の有無により中央代謝経路を切り換えるスイッチとして、EMP と PPP の分岐点であるグルコース-6-リン酸を基質とするグルコース-6-リン酸イソメラーゼ遺伝子 (*pgi*) に注目した。嫌気条件下でのみ *pgi* 遺伝子の発現を誘導させるため、*pgi* 遺伝子のプロモーターを乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*ldhA*) のプロモーターに置換した ($P_{ldhA-pgi}$)。これにより、好気条件では *pgi* の発現が抑制され多くの炭素が PPP へ流れる一方、嫌気条件では *pgi* の発現が誘導されるため炭素が EMP へ流れる (図 1)。

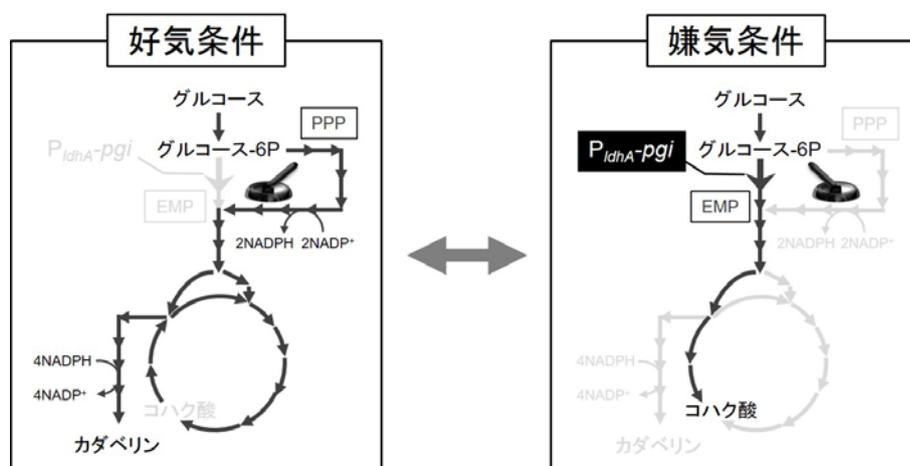


図 1. 酸素をスイッチとしたグルコース-6-リン酸イソメラーゼ遺伝子 (*pgi*) の発現の ON/OFF による代謝経路の切り換え

作製したプロモーター置換株は、好気条件下においてカダベリンの対糖収率が 4.1 倍、生産速度が 2.3 倍に増加した (図 2)。一方、コハク酸生産速度は 27% 減少した (図 3)。しかし、対糖収率は親株と同等であったため、プロモーター置換により PGI 活性が減少し、グルコース消費速度が低下したことが原因だと考えられた。

減少したグルコース消費速度を回復させるべく、 $P_{ldhA-pgi}$ 遺伝子をゲノム中にもう 1 コピー導入したセカンドコピー導入株を作製した。その結果、コハク酸の対糖収率は保ったまま、生産速度が親株と同等にまで回復した (図 3)。一方、カダベリンの対糖収率はセカンドコピーの導入により 27% 減少したが、増殖速度の向上に付随して生産速度は逆に 10% 増加した (図 2)。以上の結果から、酸素をスイッチとした中央代謝経路の切り換えによる効率的なカダベリン・コハク酸生産株の作製に成功した。

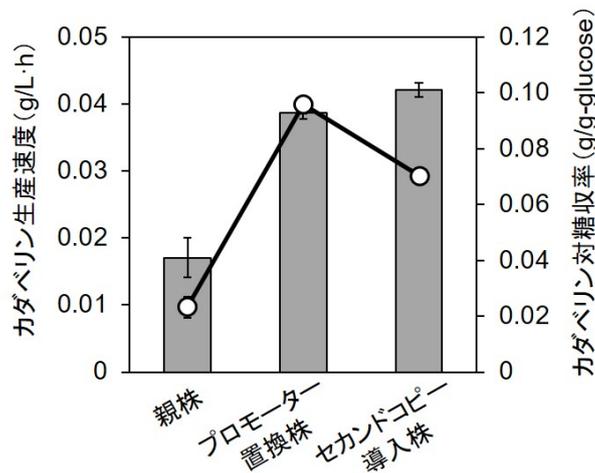


図 2. 好気条件下におけるカダベリンの生産速度 (■) と対糖収率 (○)

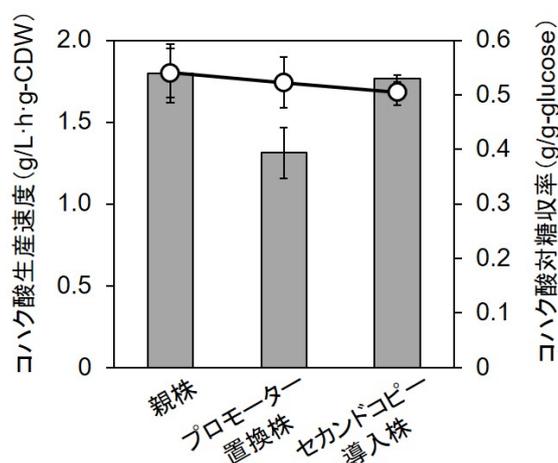


図 3. 嫌気条件下におけるコハク酸の生産速度 (■) と対糖収率 (○)

結論

酸素をスイッチとして中央代謝経路を効率的に切り換えた同一菌株による二種類の樹脂原料生産を行った。この手法は他の物質生産に幅広く応用可能であり、さらに凝集性を付与することで、単一のリアクター内において簡便に二つの化合物を生産するシステムの確立が可能となる。

文献

- 1) Kind S. *et al.* (2014) From zero to hero – Production of bio-based nylon from renewable resources using engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.* **25**: 113–123.
- 2) Okino S., Noburyu R., Suda M., Jojima T., Inui M., Yukawa H. (2008) An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**: 459–464.7