

# 酵素工学および代謝工学に基づいた好気性イソブタノール生産大腸菌株の構築

和田 圭介

産業技術総合研究所 機能化学研究部門

## 研究の目的

近年の化学材料のバイオベース化の潮流を受けて、ポリエチレンテレフタラートの原料であるイソブタノール (IB) の微生物生産が注目されている。中でもモデル生物である大腸菌を宿主とした報告例は多く、還元力の確保および増殖との競合回避の観点から、ほとんどが嫌気かつ増殖停止期を対象条件としていた。これらの対象条件下では、IB 生産収率を高められる反面、嫌気条件に由来する菌体量の少なさおよび増殖停止期に由来する基質取込速度の低さが、IB 生産速度を律速する原因として挙げられる。一方、好気かつ増殖期を対象条件とした場合、菌体量の多さおよび基質取込速度を担保できる反面、増殖に伴う基質の完全酸化で生じる CO<sub>2</sub> 量の増大に由来する IB 生産収率の低下が懸念される (図 1)。そこで本研究では、炭素フローの分岐点であるピルビン酸に着目し、増殖側へのフラックスを制限することで、相対的に IB 側へのフラックスを向上させることを目的とした。具体的には、酵素の触媒効率 ( $k_{cat}/K_m$ ) 値を指標とし、AceE の弱化および AlsS の強化を通してピルビン酸の分配効率を IB 側へ傾けることで、菌体量を確保しつつ高速度で IB 生産できる系の構築を目指した。

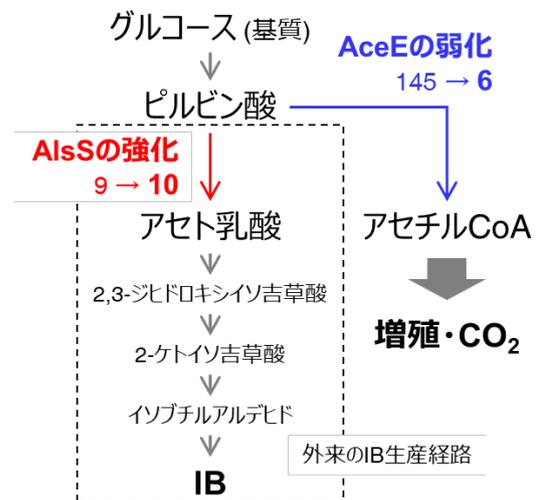


図 1; ピルビン酸の分配に関わる酵素の触媒効率 ( $k_{cat}/K_m$ ) に着目した改変戦略。数字は  $k_{cat}/K_m$  値を示す。

## 方法

大腸菌 MG1655 株の DE3 化には市販のキットを用いた。変異型 *aceE* (*aceE*<sup>K403A</sup>)<sup>1)</sup> の構築には One Step PCR 法<sup>2)</sup>を用いた。IB 生産用プラスミドは、大腸菌用にコドン最適化された IB 生合成経路の 5 遺伝子<sup>3)</sup>を、T7 プロモーターをもつプラスミドに連結することで構築した。変異型 *alsS* (*alsS*<sup>Q487S</sup>)<sup>2)</sup> の構築には PCR による部位特異的変異導入法を用いた。IB 生産用プラスミドを導入した大腸菌株は、グルコースを単一炭素源とした改変 M9 最小培地で好氣的に培養し、培養液上清に含まれるグルコース、IB、および有機酸の濃度を HPLC で定量した。菌体内ピルビン酸濃度は市

販キットを用いて定量した。

## 結果

### 1) 変異型 *aceE* を用いた IB 生産

先行研究において報告された変異型 AceE (AceE<sup>K403A</sup>) について、 $k_{cat}/K_m$  値は AceE の 4% 程度だった<sup>1)</sup>。この酵素の活性が低下することは、菌体内の主要なエネルギー生産経路である TCA 回路へのフラックス量の減少につながるため、増殖速度の低下を生じると考えられる。そこで、ゲノム上の *aceE* に変異を導入した *aceE*<sup>K403A</sup> 株を構築して培養したところ、比増殖速度は野生型株の 17% 程度にまで低下した。この結果は、狙い通り AceE の  $k_{cat}/K_m$  の弱化によって、増殖側へのピルビン酸の分配が抑制できたことを示している。しかし、この株に *alsS* を含む IB 生産用プラスミドを導入した株では、増殖速度だけでなく、IB 生産量およびグルコース消費量も低下した (図 2)。この原因は現在のところ不明だが、グルコース取込量に対して菌体量が多いこと、および酢酸生産量が向上していることから、何らかの酵素が AceE の代わりにピルビン酸からアセチル CoA へのフラックスを補完し、その過程あるいは結果として酢酸生産量が向上したと考えられる。従って、IB 側へピルビン酸の分配効率を増強するには、酢酸への流出経路の同定および増殖側へのピルビン酸の分配の更なる抑制が必要であることが分かった。

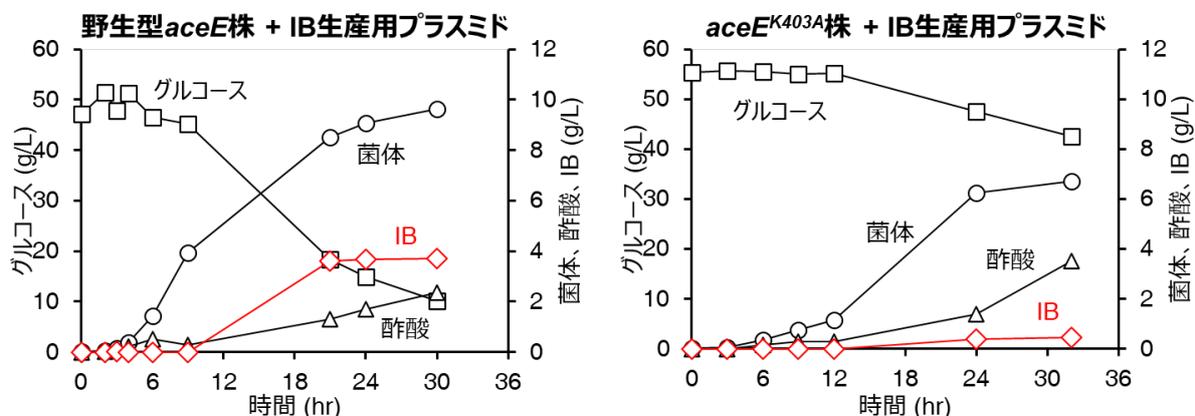


図 2 ; *aceE* への変異導入が IB 生産能力に与える影響

### 2) 変異型 *alsS* を用いた IB 生産

IB 生産経路の初発反応を触媒する AlsS は、TCA 回路への初発反応を触媒する AceE と同様に、ピルビン酸を基質とするため、菌体内ピルビン酸濃度を定量した。本研究で構築した *alsS* を含む IB 生産用プラスミドを導入した *alsS* 株の、好気および嫌気条件下における菌体内ピルビン酸濃度は、それぞれ 1.2 mM および 3.1 mM だった。これに対し、先行研究では、AlsS の  $K_m$  値および  $k_{cat}$  値は 13.6 mM および 121 1/s であるのに対し、変異型 AlsS (AlsS<sup>Q487S</sup>) は 1.1 mM および 10 1/s であり、 $k_{cat}/K_m$  値は AlsS<sup>Q487S</sup> の方が 1.1 倍高いことが示された<sup>4)</sup>。両者を統合すると、現在の菌体内ピル

ピルビン酸濃度は AlsS<sup>Q487S</sup> の K<sub>m</sub> 値である 1.1 mM に近く、かつ AlsS の K<sub>m</sub> 値よりも小さいため、好気条件下の方が AlsS<sup>Q487S</sup> の高い k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub> を活かせると考えられる。実際に、*alsS*<sup>Q487S</sup> を含む IB 生産用プラスミドを導入した *alsS*<sup>Q487S</sup> 株は、*alsS* 株よりも菌体量は少ないものの、高い IB 生産能力を示した (表 1 ; 菌体量 : 0.9 倍、IB 生産量 : 1.2 倍、比 IB 生産速度 : 1.5 倍)。この結果は、例え僅かであっても AlsS の k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub> を強化することは、IB 側へのピルビン酸の分配の増強に寄与することを示している。しかし、現状では増殖期における IB 生産量は培養全期の 13% 程度であり、この値は *alsS* 株と同程度であった。この結果は、AlsS および AlsS<sup>Q487S</sup> の k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub> 値が AceE に比べて極めて低い事実との整合性がとれているため、好気かつ増殖期中の IB 生産は AceE の弱化との統合が不可欠であることが分かった。

株	菌体量 (g/L)	IB生産量 (g/L)	比IB生産速度 (mg/gDCW/h)
<i>alsS</i>	8.07 ± 0.07	4.69 ± 0.46	43 ± 4
<i>alsS</i> <sup>Q487S</sup>	6.97 ± 0.08	5.49 ± 0.46	63 ± 6

表 1 ; *alsS* への変異導入が IB 生産能力に与える影響

## 結論

本研究において構築した *aceE*<sup>K403A</sup> 株は、予想通り増殖速度が低下することを確認できた。また大腸菌野生株に *alsS*<sup>Q487S</sup> を導入した株は、野生型 *alsS* を導入した株と比べて 1.5 倍の比 IB 生産速度を示し、最終 IB 生産量の 13% を増殖期中に生産することを突き止めた。今後は、まず *aceE*<sup>K403A</sup> 株に *alsS* を導入した IB 生産株で見られた、グルコース取込量および IB 生産量が低下した現象について、遺伝子組換え技術を利用した詳細なメカニズムの解析を通して解決方法を模索する。さらに、その新規株と *alsS*<sup>Q487S</sup> 遺伝子を組み合わせることで、好気かつ増殖期中における IB 生産量の向上を目指す。

## 文献

- 1) Kale S, Arjunan P, Furey W, Jordan F. 2007. A dynamic loop at the active center of the *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase complex E1 component modulates substrate utilization and chemical communication with the E2 component. *J Biol Chem* **282**(38):28106–28116.
- 2) Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(12):6640–6645.
- 3) Atsumi S, Hanai T, Liao JC. 2008. Non-fermentative pathway for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature* **451**(7174):86–89.
- 4) Atsumi S, Hanai T, Liao JC. 2008. Acetolactate synthase from *Bacillus subtilis* serves as

a 2-ketoisovalerate decarboxylase for isobutanol biosynthesis in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **75**(19):6306–6311.