

微生物発酵生産への光誘導代謝スイッチの応用

戸谷 吉博

大阪大学大学院 情報科学研究科

研究の目的

微生物を利用した有用化合物の生産は、持続的社会的実現に向けた重要な課題である。酵素の欠失や過剰発現によって代謝経路のフラックス分布を変えることで目的化合物を生産する研究が行われてきたが、より生産性を向上させるため、フラックス分布を理想的な状態に微調節することが求められている。現在、代謝調節には薬剤誘導系が多く用いられているが、一度培地に薬剤を加えると直ぐには除けないため、フラックスの微調節が難しいという課題がある。また、多くの有用化合物の生産は細胞合成と競合しており、増殖を抑制した定常期に生産を行うことが多いが、生産性が徐々に低下するという課題がある。薬剤誘導により一度、代謝を切り替えると、再び元の状態に戻すことは困難である。この問題を克服するため、緑と赤色光に応答する CcaS/R を利用して代謝経路のフラックス分布を光照射によって調節する技術を開発した。光は培養器の外部から間接的に照射できるため、この技術はフラックスの微調節を可能にする可能性を持つ。また、この光誘導スイッチを用いて増殖と生産のモードを使い分けることで、高生産を実現できると考えた。

本研究では、光によるフラックス調節技術を大腸菌の 1,3-プロパンジオール (1,3-PDO) 生産株に応用し、緑色光によって増殖モード、赤色光によって 1,3-PDO 生産モードに代謝状態を切り替え可能な細胞を開発し (図 1)、光を利用したフラックス制御が 1,3-PDO 生産に及ぼす効果を調べることを目的とする。また、代謝経路には複数の分岐点が存在するため、大規模にフラックス分布を調節するには、異なる波長の光に応答する複数のスイッチが必要である。青色光応答転写因子を利用し、2 箇所の分岐点におけるフラックス比を同時に制御する技術の開発も目的とした。

方法

光誘導代謝スイッチを利用した 1,3-PDO 生産においては、トリオースリン酸イソメラーゼ (TPI) の発現量を CcaS/R によって制御した。TPI をコードする *tpiA* 遺伝子を欠失した大腸菌 MG1655(DE3)株を親株に用い、CcaS/R を働かせるために必要な遺伝子を導入し、*tpiA* を CcaS/R 制御下のプロモータで発現させた。また、*Klebsiella pneumoniae* 由来の *dhaB* と *gdrAB* を導入し、1,3-PDO の生合成経路を実装した。本培養は 20 mL のグリセロールを炭素源とする合成培地に OD₆₀₀ が 0.05 になるように植菌し、フラスコの底部から光を照射しながら培養 (150 rpm, 37°C) した。培養液の 1,3-PDO 濃度は高速液体クロマトグラフにより定量した。

マルチカラー光によるフラックス分布の制御では、Embden-Meyerhof-Parnas

(EMP), Pentose phosphate (PP), Entner-Doudoroff (ED) 経路を対象とした. EMP と PP 経路については, すでに緑・赤色光に応答する CcaS/R によるスイッチを開発しているため, PP と ED 経路のフラックス比を青色光で制御した. MG1655(DE3) $\Delta pgi \Delta gntR$ 株を親株に用い, *Erythrobacter litoralis* 由来の青色光応答転写因子 EL222 を発現させた. 標的遺伝子上流に存在する RNA ポリメラーゼ結合領域に EL222 の結合配列を挿入し, 青色光下で標的遺伝子の発現が誘導, 抑制されるようにした. また, CcaS/R を働かせるために必要な遺伝子を導入し, *pgi* を CcaR 制御下のプロモータで発現させた. 本培養には 24 ウェルプレートを用い, [1- ^{13}C]グルコースを含む M9 培地に OD₆₀₀ が 0.1 になるように植菌した. プレートは暗条件もしくは各波長の光照射下で浸透培養器を用いて培養 (500 rpm, 37°C) した. フラックス比はタンパク質由来アミノ酸の ^{13}C 濃縮度から計算した.

結果

1. 光誘導代謝スイッチを利用した 1,3-PDO 生産

光制御機能を持つ 1,3-PDO 生産株は, 緑色光下では TPI 発現が誘導されて増殖, 赤色光下では TPI 発現が抑制され 1,3-PDO 生産が促されると期待される (図 1B). 構築した株の制御機能が正しく働くことを確認するため, まずは常時緑色もしくは赤色光を照射した条件で培養を行った (図 1C). 狙い通り, 緑色光下では赤色光下と比べて細胞が早く増殖することが確認できた. また, 光条件による 1,3-PDO 生産量の違いはなかった.

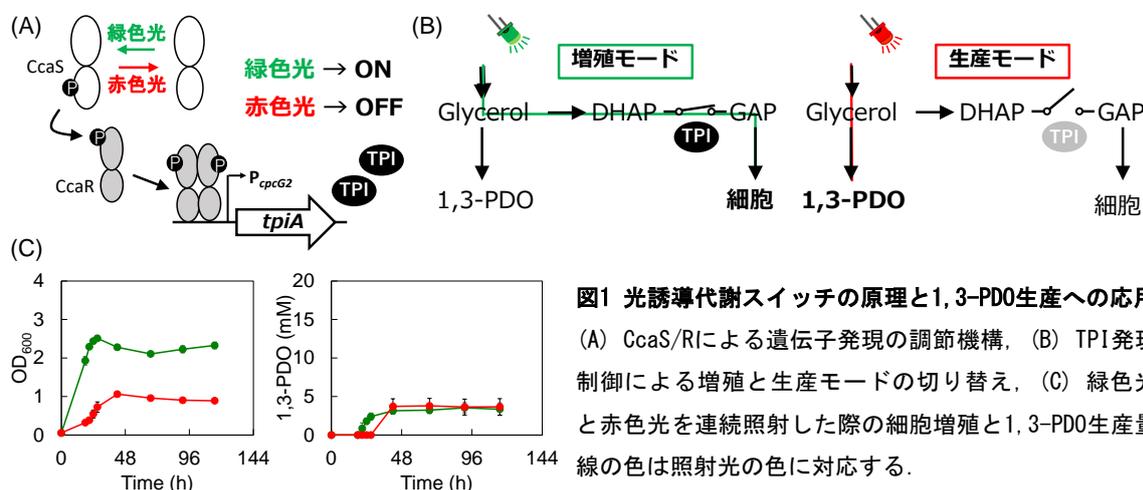


図1 光誘導代謝スイッチの原理と1,3-PDO生産への応用

(A) CcaS/Rによる遺伝子発現の調節機構, (B) TPI発現制御による増殖と生産モードの切り替え, (C) 緑色光と赤色光を連続照射した際の細胞増殖と1,3-PDO生産量. 線の色は照射光の色に対応する.

次に, 培養初期には緑色光を照射し, 細胞が増えた後に赤色光に切り替えることで増殖モードから生産モードに代謝を切り替えることを検討した (図 2). 緑色光を照射し続けた場合とほぼ同じ細胞濃度まで増殖しつつ, 1,3-PDO の生産量は約 1.6 倍に向上した. さらに, 生産期において 1 分間緑色光と 9 分間赤色光の照射を交互に繰り返す条件を検討した. 周期的に光を切り替えた条件では, 光を一度切り替えた条件に比べて 1,3-PDO 生産量が約 2.3 倍に増加することが確認できた (図 2). た

だし、1,3-PDO は主に培養初期に生産されており、狙った定常期の生産性低下を回復させる効果は見られなかった。緑色光を照射し続けた場合にも増殖が頭打ちになっており、増殖必須成分の枯渇が示唆されている。今後は培地成分を見直し、定常期の光照射条件を最適化することで、高効率なバイオプロセスを構築する。

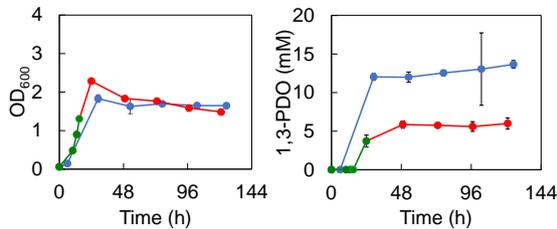


図2 定常期に照射光を変更した際の培養結果

緑色と赤色の線は培養初期は緑色光により増殖を促し、OD₆₀₀が1を超えた後に赤色光に切り替えることで生産モードに切り替えた。線の色は照射光の色に対応する。青色の線は同様に緑色光で増殖を促した後、緑と赤色光の照射を周期的に変更した(1分間緑, 9分間赤)。

2. マルチカラー光により複数分岐点のフラックス比制御

光照射により大規模にフラックス分布を操作するため、CcaS/Rとは異なる波長の光に応答する光遺伝学を利用してフラックス比を制御する技術を開発した。本研究では、緑と赤色光に応答するCcaS/Rと青色光に応答するEL222を利用して、解糖系の3経路のフラックス比を制御した(図3A)。まず、PPとED経路のフラックス比を青色光で制御するため、EMP経路を遮断した後、EL222によりED経路を触媒するEddの発現を誘導、PP経路を触媒するGndの発現を抑制するようにそれぞれのプロモータを改変した。その結果、PPとED経路のフラックス比は、暗所ではPP経路が大きく、青色光下ではED経路が大きくなり、狙い通りにスイッチが働いたことが示された(図3B)。続いて、CcaS/RによるEMPとPP経路のスイッチを実装したところ、3経路のフラックス比は緑色光下ではEMP経路が大きく、赤色光下ではPPとED経路の割合が増加し、赤色光と青色光を同時に照射するとPP経路の割合が減りED経路が増加することが確認できた(図3C)。

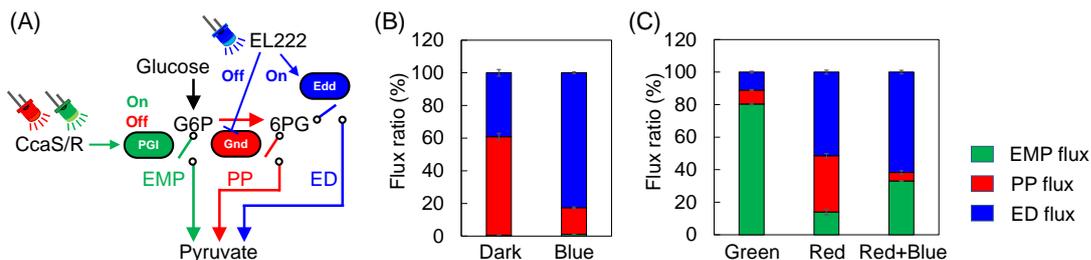


図3 CcaS/RとEL222を利用したマルチカラー光による解糖系のフラックス制御

(A) フラックス制御機構の概念図, (B) PGIを欠失した株においてPPとED経路のフラックス比を青色光で制御した際のフラックス比, (C) CcaS/RとEL222を組み合わせて3経路を制御した際のフラックス比。

結論

光誘導代謝スイッチを利用することで、1,3-PDO生産株の代謝状態を増殖モードと生産モードを切り替えることに成功した。また、緑・赤色光に応答するCcaS/Rと青色光に応答するEL222を同時に利用することで、代謝経路の2箇所分岐点のフラックス比を制御する技術を開発した。