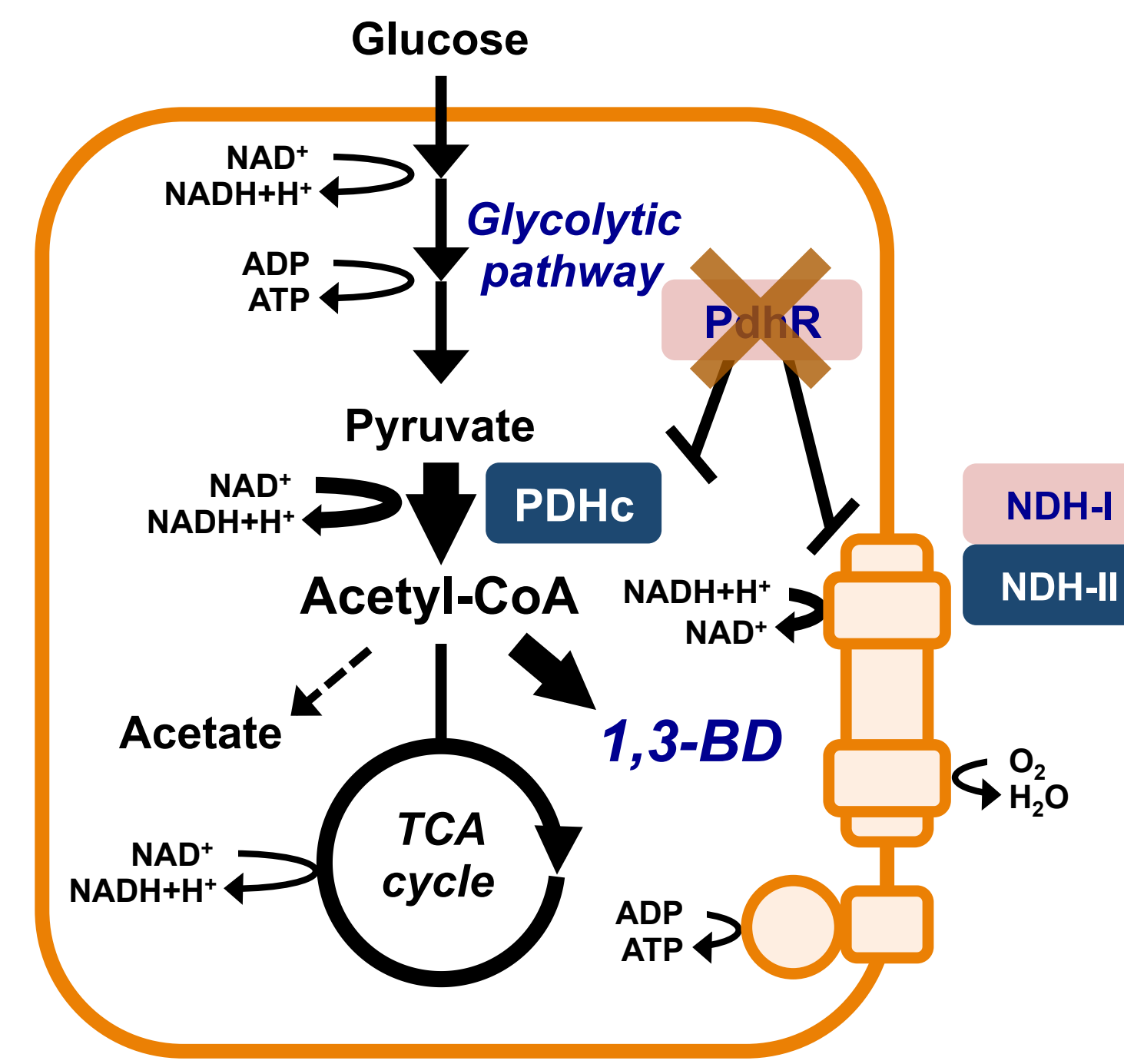


1. 要約

【背景・目的】大腸菌等の育種による、有機酸やアルコール、植物由来の炭化水素の微生物生産が報告されているが、その多くが、“天然化合物”を対象としていた。バイオプロダクションの実用可能性を広げるには、“非天然化合物”を生産する新たな技術の開発が求められるが、そこでは、新規代謝経路の設計とその機能的な構築が必要となる。我々は、“非天然化合物”1,3-ブタンジオールの大腸菌による生産を以前報告した (Kataoka et al., *J. Biosci. Bioeng.*, **115**: 475-480 (2013))。本発表では、1,3-ブタンジオール合成代謝経路の拡張による1,3-ジオール類の生産、代謝工学的アプローチによる1,3-ブタンジオール生産の向上、に成功したので報告する。

【方法・結果】1,3-ジオール類の微生物生産のため、1,3-ブタンジオール合成代謝経路を基盤に、(i) PhaAの幅広いアシルCoAへの活性が報告されている*R. eutropha*由来BktBへの変換、(ii) 有機酸のCoA誘導体への活性化を触媒する*M. elsdenii*由来Pctの付加、を施し、新規合成代謝経路を設計、大腸菌に付与した。得られた組換え大腸菌は、グルコース及びプロピオン酸、イソ酪酸又はグリコール酸混合物から1,3-ペンタンジオール、4-メチル-1,3-ペンタンジオール、1,2,4-ブタントリオールを生産した (Kataoka et al., *Bioresour. Technol.*, **245**(Pt B): 1538-1541 (2017))。1,3-ブタンジオール合成代謝経路は、アセチルCoAを前駆体に、*R. eutropha*由来PhaAB, *C. saccharoperbutylacetonicum*由来Bld及び内源性アルコール脱水素酵素で構成されていた。そのため、生産の効率化の戦略として、中枢代謝及び還元力供給の強化が有効であると考えられた。そこで、pdhオペロンの負の転写制御因子である*pdhR*の欠損株を作製し生産を評価した。その結果、収量が1.24倍に増加した。ついで、還元力供給の強化を検討した。 $\Delta pdhR$ での1,3-ブタンジオール生産時、溶存酸素濃度は飽和量の約5%を推移していたことから、混合酸発酵を営んでいると考えられた。そこで、ギ酸から還元力を取り出すべく、*C. boidinii*由来Fdh又はNADPHを生成する変異型Fdhを付与し生産を評価した。その結果、変異型Fdhの発現により収量がさらに1.2倍に増加した。



2. 材料・方法

◆ 使用菌株

- E. coli* BW25113 F' pNK8 (P_{A1lacO-1}::*bktB bld phaB pct*)
- E. coli* BW25113 F' (*lacI*^Q) pNK3 (P_{A1lacO-1}::*phaA bld phaB*)
- E. coli* BW25113 $\Delta pdhR$::Km F' pNK3
- E. coli* BW25113 $\Delta pdhR$::Km F' pNK3 pNKT3 (P_{A1lacO-1}::*fdh*)
- E. coli* BW25113 $\Delta pdhR$::Km F' pNK3 pNKT4 (P_{A1lacO-1}::*fdh*^{mut})

◆ 培養方法

グルコースを含む発酵培地中で回分培養した。
有機酸はIPTG誘導時に添加した。
(プロピオン酸、イソ酪酸: 20 mM, グリコール酸: 40 mM)

◆ 分析方法

菌体増殖は培養液のOD₆₀₀で測定した。
グルコース、有機酸、アルコールはHPLCにより定量した。

Fermentation medium

Glucose	222	mM*
Na ₂ HPO ₄	6.8	g/L
KH ₂ PO ₄	3	g/L
NaCl	0.5	g/L
NH ₄ Cl	2	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.493	g/L
CaCl ₂ · 2H ₂ O	14.7	mg/L
Yeast extract (nacalai tesque)	10	g/L
HEPES-KOH (pH 7.4) (1,3-Diols)	100	mM

*55.5 mM: 1,2,4-ブタントリオール
111 mM: 1,3-ペンタンジオール, 4-メチル-1,3-ペンタンジオール

Culture conditions (Jar fermentor: 1,3-BD)

Working volume	1 L
Agitation	500 rpm
Aeration	1.0 vvm
pH control	6.0 by 2N NaOH or 2N HCl
IPTG	10 μ M (OD ₆₀₀ : 0.7-1.0)
Temperature	37°C

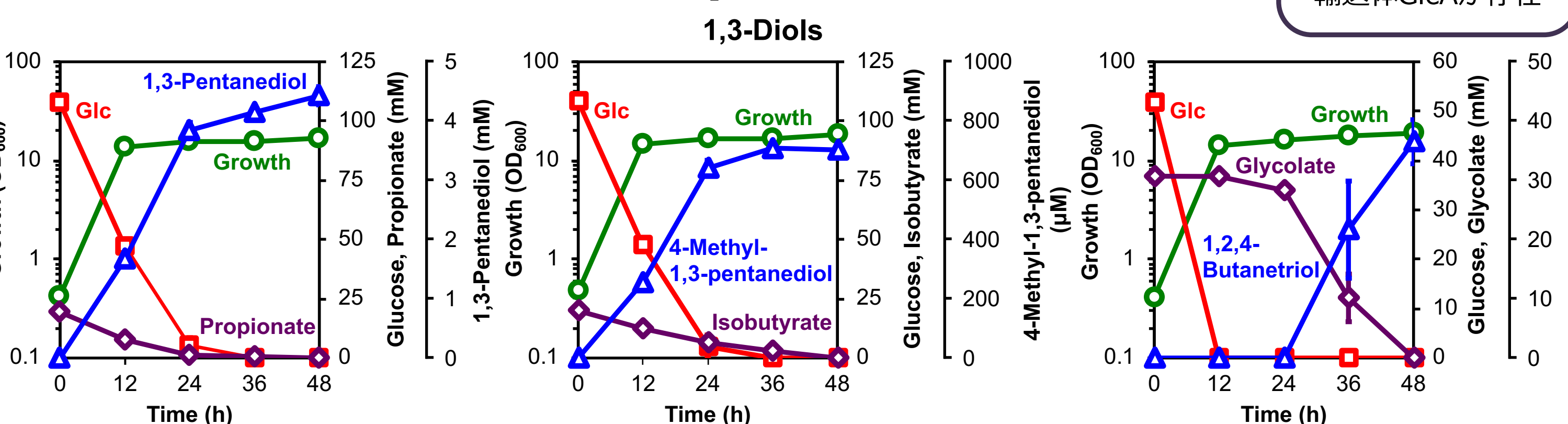
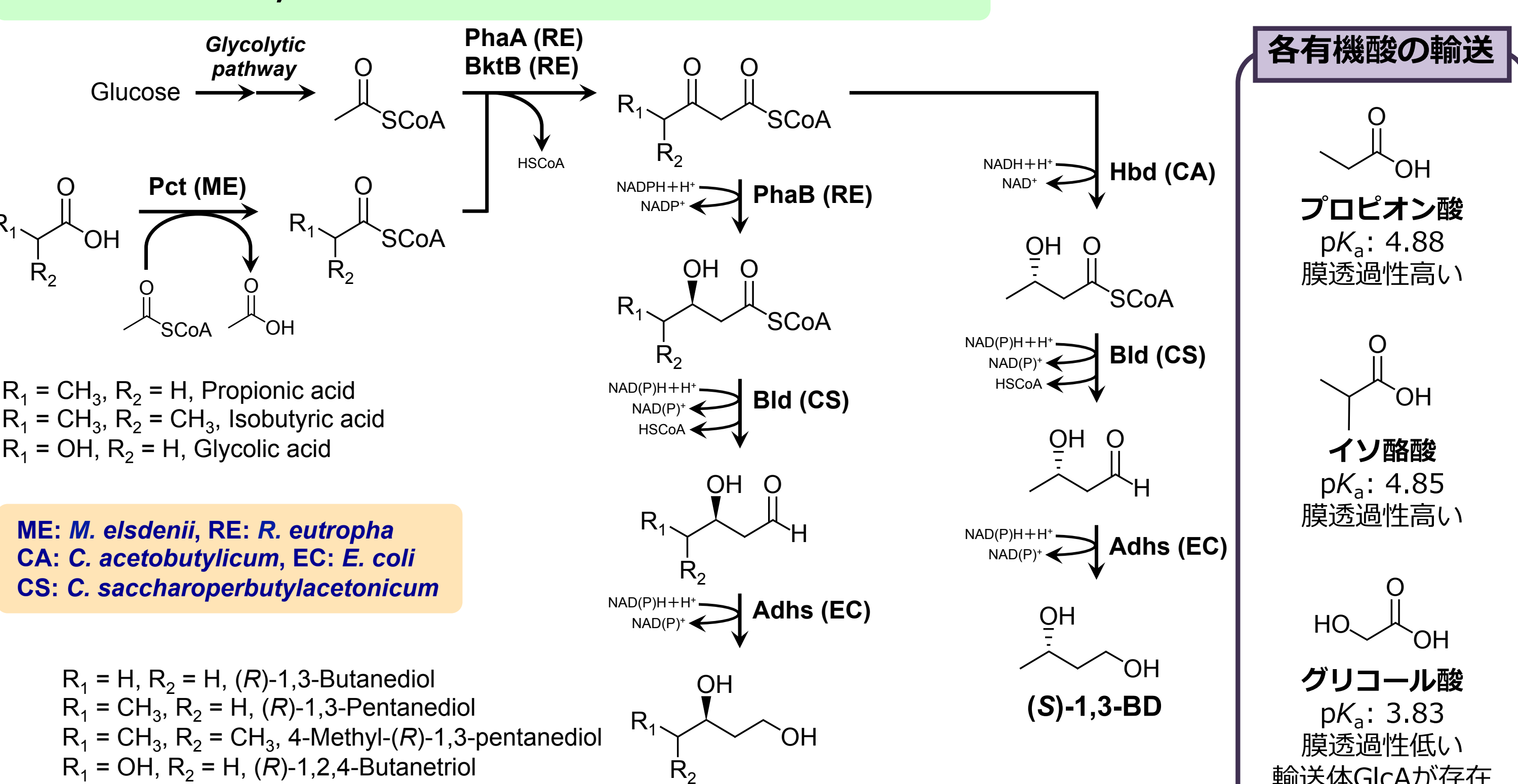
Culture conditions (Flask: 1,3-Diols)

Volume	40 mL/300 mL flask with baffles
Rotary speed	150 rpm
IPTG	1 μ M* (OD ₆₀₀ : 0.3-0.6)
Temperature	30°C

*10 μ M: 1,2,4-ブタントリオール

3. 結果・考察

I. “非天然型”1,3-ジオール類を標的とする合成代謝経路



End pH and end product data for *E. coli* BW25113 F' harboring pNK8 after 48 h of fermentation^a

Substrates	End pH (-)	Metabolites (mM)				
		Alcohols	3-Hydroxybutyrate (3-HB)	Acetate	α -Ketoglutarate (α -KG)	
Glucose, Propionate	6.7 \pm 0.1	5.84 \pm 0.38	-	20.9 \pm 7.5	16.0 \pm 5.5	11.1 \pm 0.9
Glucose, Isobutyrate	6.9 \pm 0.1	-	12.8 \pm 0.2	10.3 \pm 4.8	10.5 \pm 2.5	15.2 \pm 1.9
Glucose, Glycolate	7.4 \pm 0.1	-	-	0.556 \pm 0.144	0.186 \pm 0.057	14.9 \pm 0.8

^aData are expressed as means \pm SD from at least three independent experiments.

II. (S)-1,3-ブタンジオール合成代謝経路の構築

E. coli BW25113 F' pNK4 (P_{A1lacO-1}::*phaA bld hbd*)

Specific activity (U/mg Protein)	1,3-BD (mM)
PhaA	8.61 \pm 0.54
Hbd	30.5 \pm 1.7
	Not detected

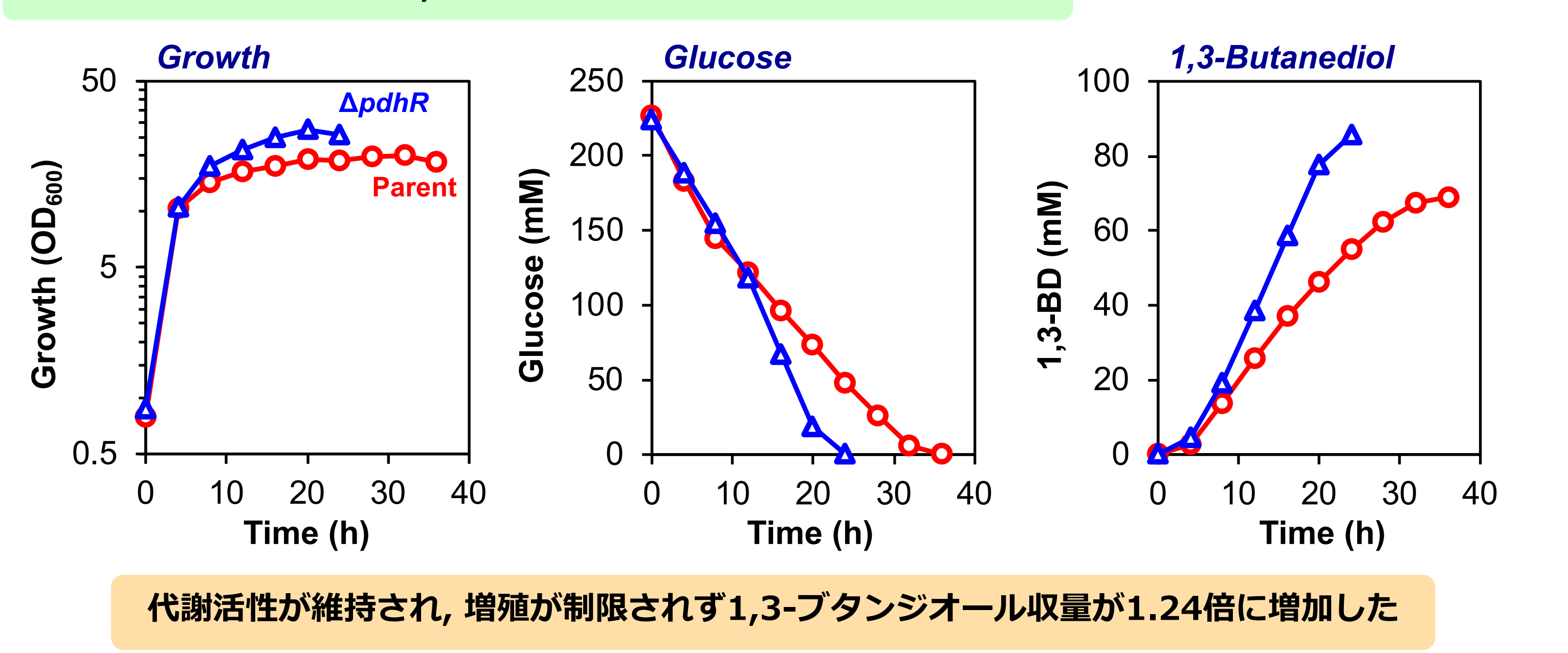
U: the amount of enzyme that converts 1 μ mol of the substrate to the product per min

増殖細胞での好氣的回分培養をIPTG誘導時に50 g/L CaCO₃を加えて24時間行ってみたところ...

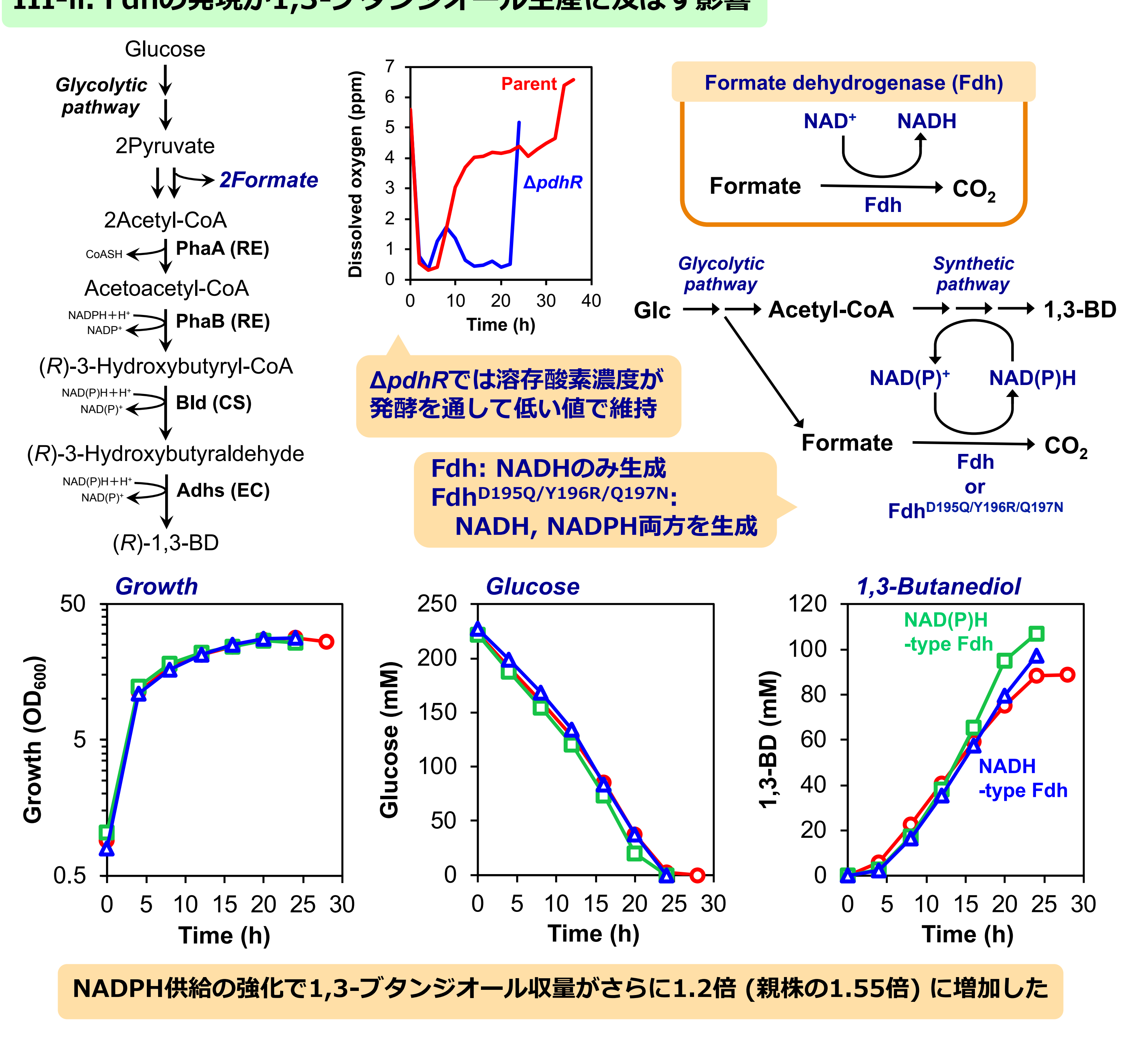
Growth (OD ₆₀₀)	End pH (-)	1,3-BD (mM)	3-HB (mM)	Acetate (mM)	EtOH (mM)	α -KG (mM)	Pyruvate (mM)
19.3	6.1	2.90	3.16	227	29.8	14.2	1.11

(S)-1,3-ブタンジオールを生産できる合成代謝経路を見出したか??

III-i. PdhRの欠損が1,3-ブタンジオール生産に及ぼす影響



III-ii. Fdhの発現が1,3-ブタンジオール生産に及ぼす影響



4. 結言

◆ 1,3-ジオール類を標的とする合成代謝経路の構築に成功した
構築した合成代謝経路により、4つの異なる化学構造を持つ“非天然型”1,3-ジオールを生産することに成功した。特に、1,3-ペンタンジオール及び4-メチル-1,3-ペンタンジオールの微生物生産は、本研究が初の報告である。現在、代謝工学・培養工学的なアプローチによる生産の向上に取り組んでいる。

◆ PdhR欠損による中枢代謝の活性化と変異型Fdhを活用したNADPH供給の強化は大腸菌による1,3-ブタンジオール生産を向上させた
最終的に構築した組換え大腸菌は、107 mMの1,3-ブタンジオールを収率0.482 mol/mol glucoseで生成した。NADPHの再生に関わる酸化還元反応経路は、さらなる生産向上の標的になると考えられる。(北大 横田先生, 和田先生との共同研究)