

平成30年6月11日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07356

研究課題名(和文) コリネ菌による脂質およびビオチン生産基盤の開発

研究課題名(英文) Development of platform technologies to produce fatty acids and biotin by coryneform bacteria

研究代表者

池田 正人 (IKEDA, Masato)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：00377649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ビオチン要求性微生物であるコリネ型細菌に異種細菌のbioFとbioIを導入することでビオチン要求性を解除でき、ビオチンを微量分泌するようになることを見出している。このビオチン生産菌を宿主とする脂肪酸経路の代謝工学で、ビオチンのデノボ合成に脂肪酸代謝が重要な役割を果たしていることを示した。この菌株でビオチンの前駆体ピメロイル-CoA直下の反応を遮断すると、糖からピメリン酸の分泌が起こること、さらに、脂肪酸代謝の増進がピメリン酸増産にも反映することを示した。以上の結果は、ビオチンの源流が脂肪酸合成経路であり、同経路からビオチン経路への炭素流束を、ピメリン酸を指標に評価できることを示す。

研究成果の概要(英文)：We engineered naturally biotin-auxotrophic *Corynebacterium glutamicum* into a biotin prototroph through the heterologous expression of the *Escherichia coli* bioF gene and the *Bacillus subtilis* bioI gene. We used the engineered strain to show that carbon flow down the fatty acid-biosynthetic pathway was crucial for biotin biosynthesis. Furthermore, we demonstrated that augmented fatty acid biosynthesis was also reflected on pimelic acid production when carbon flow was blocked at the BioF reaction. These results indicate that the biotin precursor pimeloyl-CoA originates from the fatty acid-biosynthetic pathway in vivo in the engineered biotin-prototrophic *C. glutamicum* strain.

研究分野：応用微生物学

キーワード：コリネバクテリウム グルタミカム ビオチン ピメリン酸 脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

(1) ビオチン(ビタミン B7)は現在、原料を石油に依存し、10 を超える多段の工程から成る化学合成法により製造されている。過去にビオチン発酵が検討された経緯があるが、育種は困難を極め、結局、高生産菌の取得には至らなかった。

(2) 最近、大腸菌でビオチン合成の前駆体であるピメリン酸チオエステル(ピメロイル-CoA/-ACP)が脂肪酸合成経路を利用して合成されるというモデル(図1の BioCH ルート)が提唱された。枯草菌でも、同前駆体は長鎖アシル-ACP から BioI (P450 酵素)による酸化開裂と BioW による CoA 化によって生成することが明らかになりつつある(図1の BioIW ルート)。つまり、これまでビオチンの前駆体がどうやって生合成されるかの詳細はわかっていなかったが、脂肪酸合成経路に依存していることが確かなものになってきた。

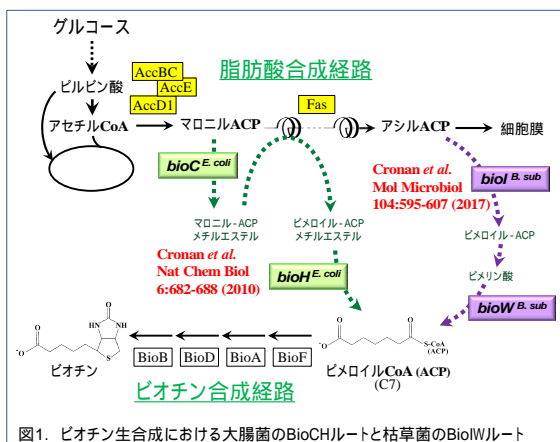


図1. ビオチン生合成における大腸菌のBioCHルートと枯草菌のBioIWルート

(3) 一方、我々は、コリネ型細菌が *fasR* の破壊のみで糖から長鎖脂肪酸を過剰合成し、かつそれを菌体外に分泌することを見出し、本菌種に長鎖脂肪酸生産菌としてのポテンシャルがあることを報告した [Appl Environ Microbiol **79**:6776 (2013)]。さらに、コリネ型細菌に異種細菌の *bioF* と *bioI* を導入することで、ビオチン要求性を解除することも見出した (図2) [Appl Environ Microbiol **79**:4586 (2013)]。これを機に、我々は、新たな試みとして、コリネ型細菌を用いたビオチン生産菌の育種に着手した。

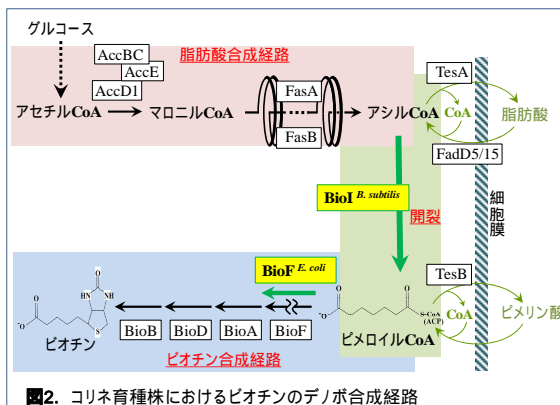


図2. コリネ育種株におけるビオチンのデノボ合成経路

2. 研究の目的

(1) コリネ型細菌は、元来、ビオチン要求性であるが故に本菌種を用いたビオチン直接発酵の報告はこれまでにない。また、脂肪酸合成系は、従来のビオチン生産菌育種では目を向けられてこなかった新しい視点である。従って、我々が独自に開発した本菌種の脂肪酸代謝工学技術を、下流の有用物質であるビオチンや、その前駆体ピメリン酸(バイオポリマーとして有用な中鎖ジカルボン酸)の生産技術に応用できれば、先行技術と差別化できる新技術になる。その技術開発を目指す。

(2) 具体的には、脂肪酸経路の代謝は本当にビオチン経路に繋がっているのか、脂肪酸経路の代謝をいかにしてビオチン経路に引き込むのか、糖からピメリン酸の分泌生産が可能か、微量のピメリン酸をどうやって検出するのか、等の検討を行う。

3. 研究の方法

(1) *bioI* の高発現化は、以下の3つの方法、すなわち、アミノ酸コドンの最適化(枯草菌型からコリネ菌型へ)、強力プロモーターへの置換、そしてプラスミド増幅、により行った。

(2) ピメリン酸の定量は、独自に開発したバイオアッセイ系(指示菌:感度を高めたピメリン酸要求株)と LC/MS/MS 分析により行った。オレイン酸等、遊離脂肪酸は、GC 分析により定量した。

(3) ビオチンおよびビオチンバイタマーの定量は、コリネ型細菌からビオチン合成経路の各ステップの変異株を造成し、これらを指示菌とするバイオアッセイ系により行った。

4. 研究成果

(1) 我々は、コリネ型細菌で *fasR* の破壊(*fasR*)が脂肪酸合成系を脱抑制して脂肪酸を過剰合成させることを見出していたので、これをビオチン生産菌に導入すれば力価は高まるであろうと予想した。確かに脂肪酸の分泌生成は起こるものの、力価は逆に低下するという、意に反する結果となった(図3)。しかし、脂肪酸合成系遺伝子を個別に増幅した場合は、脂肪酸の分泌は起こらず、力価に反映することがわかった(図3)。脂肪酸合成系遺伝子 *fasA* および *fasB* を同時破壊するとビオチンバイタマー生成は消失し(図3)、ビオチンのカーボンが脂肪酸経路に由来することが *in vivo* で検証された。

(2) 遊離脂肪酸の分泌生成がビオチン力価を低下させる仕組みを解析。その結果、アシル CoA を基質とする BioI 反応を遊離脂肪酸が競合阻害している可能性が浮上。対策として、*bioI* を強力プロモーター下で高発現化すると、力価は向上(ビオチンバイタマーと

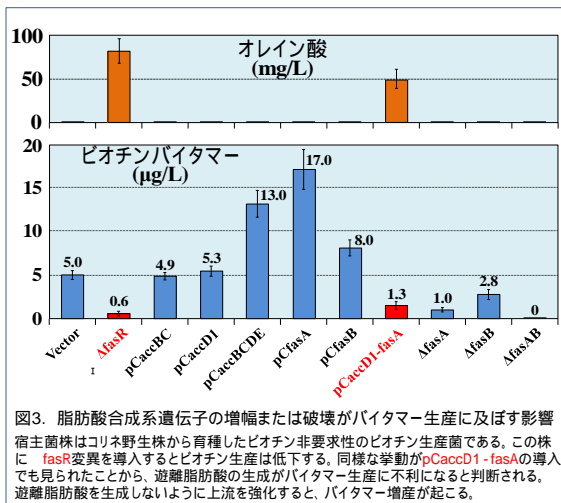


図3. 脂肪酸合成系遺伝子の増幅または破壊がバイタマー生産に及ぼす影響。宿主菌株はコリネ生株から育種したピオチン非要求性のピオチン生産菌である。この株に *fasR* 変異を導入するとピオチン生産は低下する。同様な挙動が pCaccD1-*fasA* の導入でも見られたことから、遊離脂肪酸の生成がバイタマー生産に不利になると判断される。遊離脂肪酸を生成しないように上流を強化すると、バイタマー増産が起こる。

して、数 µg/L 数百 µg/L)

(3) 上記の発酵上清には、ピオチンバイタマーに加えてピメリン酸が蓄積（数百 µg/L）していることが判明。これは、脂肪酸経路を経てピオチンに向かう代謝が中間体ピメロイル-CoA の段階で滞留し、ピメリン酸として副生していることを示す（図 2）。本知見に基づき、育種方針を変更。脂肪酸経路からピオチン経路へのカーボン流束を、ピメリン酸を指標に評価する系の構築に着手。

(4) ピメロイル-CoA 直下の *bioF* を遮断すると（図 2）、期待通り、ピオチンバイタマーの生成は消失し、その分の上乗せがピメリン酸力価に起こった（約 1 mg/L）。このピメリン酸生産菌で、脂肪酸合成の鍵酵素遺伝子である *fasA* を高発現させると（図 2）、力価は 2 倍強に向上した（約 1 2~3 mg/L）。

(5) コリネ型細菌は脱 CoA 化に関わるチオエステラーゼ (*Tes*) 様遺伝子を数種持つが、遺伝学的解析により、長鎖アシル-CoA およびピメロイル-CoA の脱 CoA 化に関わる *tes* 遺伝子を特定。各々、*tesA*、*tesB* と命名（図 2）。

(6) *Tes* の逆反応を担うアシル-CoA シンターゼ (*FadD*) 様遺伝子も本菌種ゲノムには少なくとも 5 種存在。その内、*FadD5* および *FadD15* が長鎖脂肪酸の CoA 化に関わることを遺伝学的解析により検証（図 2）。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 3 件）

Ikeda M, Nagashima T, Nakamura E, Kato R, Ohshita M, Hayashi M, Takeo S: *In vivo* roles of fatty acid-biosynthetic enzymes in biosynthesis of biotin and -lipoic acid in *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Environ. Microbiol., 83(19):e01322-17, 2017. 査読有。

[DOI: 10.1128/AEM.01322-17](https://doi.org/10.1128/AEM.01322-17)

Takeo S, Hori K, Ohtani S, Mimura A, Mitsuhashi S, Ikeda M: L-Lysine production independent of the oxidative pentose phosphate pathway by *Corynebacterium glutamicum* with the *Streptococcus mutans gapN* gene. Metab. Eng., 37:1-10, 2016. 査読有。
[DOI: 10.1016/j.ymben.2016.03.007](https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.03.007)

池田正人: <今日の話題> コリネ型細菌による脂肪酸生産 アミノ酸生産菌で脂肪酸やピオチンをつくれるか? 化学と生物, 53(10):659-662, 2015. 査読無

〔学会発表〕（計 10 件）

池田正人: ピオチン要求性細菌における脂肪酸からピオチンへの代謝変換、日本農芸化学会 2018 年度大会シンポジウム、2018 年

井元瞭介、川上春佳、加藤峻介、林 幹朗、竹野誠記、池田正人: コリネ型細菌における長鎖脂肪酸アシル CoA の脱 CoA 化酵素の特定、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年

高橋敬祐、井元瞭介、川上春佳、加藤峻介、林 幹朗、竹野誠記、池田正人: コリネ型細菌における長鎖脂肪酸 CoA 化酵素の特定、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年

東 佳菜子、中村絵梨、村田紀子、堀 一将、林 幹朗、竹野誠記、池田正人: コリネ型細菌における第二の潜在的なデチオピオチン輸送体の探索、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年

村田紀子、内藏 萌、林 幹朗、竹野誠記、池田正人: コリネ型細菌における新規脂肪酸増産変異、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年

川上春佳、加藤峻介、林 幹朗、竹野誠記、池田正人: ピメリン酸バイオアッセイ用に開発した指示菌 BioF-4 株の特性解析、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年

中村絵梨、長島 堯、林 幹朗、竹野誠記、池田正人: コリネ型細菌の持つ 2 種の I 型脂肪酸合成酵素のリポ酸合成への関与、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年

長島 堯、大下政一、三橋 敏、竹野誠記、池田正人: 脂肪酸合成経路に着目したピオチン生産菌の分子育種、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年

川上春佳、加藤峻介、三橋 敏、竹野誠記、池田正人: ピメリン酸バイオアッセイ系の開発、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年

加藤峻介、川上春佳、三橋 敏、竹野誠記、池田正人: コリネ菌におけるピメリン酸分泌株の取得、日本農芸化学会 2016

年度大会、2016年

〔図書〕(計1件)

Yokota A & Ikeda M (Editors): Amino Acid Fermentation. Springer Japan, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., Vol. 159, 2017, ISBN 978-4-431-56518-5, 査読有.
<https://www.springer.com/jp/book/9784431565185>

〔その他〕

研究者総覧:

<http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.uhLNPUkh.html?lng=ja&id=uhLNPUkh>

ホームページ:

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/agriculture/lab/ferment/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 正人 (IKEDA Masato)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号: 00377649

(2) 研究分担者

竹野 誠記 (TAKENO Seiki)

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号: 30422702