

Pantoea ananatis を宿主とした

テルペノイド発酵生産基盤技術の開発

2022 年 1 月

新田 暢久

Pantoea ananatis を宿主とした

テルペノイド発酵生産基盤技術の開発

筑波大学大学院

理工情報生命学術院

生命地球科学研究群

生命農学学位プログラム

博士(生命農学)学位論文

新田 暢久

目次

1 章 序論.....	1
1-1. 緒言.....	1
1-2. 研究の背景.....	3
1-2-1. テルペノイドの構造と機能.....	3
1-2-2. テルペノイドの生合成.....	5
1-2-3. テルペノイド化合物の現行製法が抱える課題.....	9
1-2-4. 組換え微生物によるテルペノイド発酵生産に関するこれまでの知見.....	11
1-2-5. テルペノイド生産能を向上させる為の代謝工学的アプローチに関するこれまでの知見.....	13
1-2-6. テルペノイド発酵生産プロセスに関するこれまでの知見.....	17
1-2-7. <i>Pantoea ananatis</i> に関するこれまでの知見.....	19
1-3. 研究の意義と目的.....	20
2 章 <i>P. ananatis</i> 内在性の無機リン酸欠乏誘導性プロモーターの探索と選定.....	22
2-1. 緒言.....	22
2-2. 実験材料と方法.....	25
2-2-1. 検討に用いた培地と培養条件.....	25
2-2-2. 遺伝子操作.....	25
2-2-3. 使用した菌株、プラスミド、プライマー.....	25
2-2-4. 遺伝子配列の解析.....	25
2-2-5. <i>Enterococcus faecalis</i> 由来 <i>mvaE</i> 、 <i>mvaS</i> 遺伝子の発現プラスミドの構築.....	26
2-2-6. <i>P. ananatis</i> へのプラスミド導入.....	26
2-2-7. CRIM (Conditional -Replication, Integration, Excision) プラスミド pAH162- <i>P_{phoC}-mvaES</i> の構築.....	27

2-2-8. SC17(0) $\Delta L\text{-}ldh::\phi 80attB$ 株の構築.....	28
2-2-9. SC17(0) $\Delta ampH::\phi 80attB$ 株の構築.....	29
2-2-10. SC17 (0) $\Delta L\text{-}ldh::\phi 80attB$ 株と SC17(0) $\Delta ampH::\phi 80attB$ 株の染色体への pAH162- $P_{phoC}\text{-}mvaES$ の導入.....	29
2-2-11. PMVA-1 株の染色体上の薬剤マーカー遺伝子除去.....	30
2-2-12. 断片化ゲノム DNA の調製.....	30
2-2-13. <i>P. ananatis</i> の断片化ゲノム DNA を用いた形質転換.....	31
2-2-14. 試験管を用いた MVA 発酵.....	31
2-2-15. PMVA-1 株、PMVA-2 株の試験管を用いた MVA 発酵.....	32
2-2-16. 各種分析.....	32
2-3. 結果と考察.....	35
2-3-1. <i>P. ananatis</i> 内在性の P_i 欠乏誘導性プロモーターの探索.....	35
2-3-2. MVA 発酵による P_i 欠乏誘導性プロモーターの選抜.....	37
2-3-3. MVA 経路上流遺伝子の染色体への固定と MVA 発酵.....	39
2-4. 結言.....	41
3 章 イソプレン生産による P_i 依存的 dual-phase テルペノイド発酵プロセスの実証実験.....	42
3-1. 緒言.....	42
3-2. 実験材料と方法.....	44
3-2-1. 検討に用いた培地と培養条件.....	44
3-2-2. 遺伝子操作.....	44
3-2-3. 使用した菌株、プラスミド、プライマー.....	44
3-2-4. <i>P. ananatis</i> へのプラスミド導入.....	44
3-2-5. CRIM プラスミド pAH162-Km- $P_{tac}\text{-}KDyI$ の構築.....	44
3-2-6. CRIM プラスミド pAH162- $P_{tac}\text{-}mvyk$ の構築.....	45

3-2-7. CRIM プラスミド pAH162- P_{pstS} - <i>mvaES</i> の構築.....	45
3-2-8. SWITCH-PphoC 株と SWITCH-PpstS 株の構築.....	46
3-2-9. <i>M. pruriens</i> 由来 IspSM 発現用プラスミドの構築.....	47
3-2-10. 密閉バイアル瓶を用いたイソプレレン発酵生産.....	47
3-2-11. 1L 容ジャーフェーマンター (jar)を用いた Glc 流加培養.....	48
3-2-12. 可溶性画分タンパク質の抽出方法.....	48
3-2-13. SDS-PAGE.....	48
3-2-14. 振盪試験管培養における溶存イソプレレン濃度の減少速度の把握.....	49
3-2-15. 各種分析.....	49
3-3. 結果と考察.....	53
3-3-1. イソプレレン生産菌株 SWITCH-PphoC/pIspSM 株及び SWITCH-PpstS/pIspSM 株の構築...	53
3-3-2. 密閉容器を用いたイソプレレン生産菌株の培養評価.....	55
3-3-3. 細胞外 P_i に依存した dual-phase イソプレレン発酵の成立可否判断.....	58
3-3-4. SDS-PAGE による MvaE の発現解析.....	61
3-4. 結言.....	62
4 章 100%鏡像選択的な(S)-リナロールの発酵生産.....	63
4-1. 緒言.....	63
4-2. 実験材料と方法.....	64
4-2-1. 検討に用いた培地と培養条件.....	64
4-2-2. 遺伝子操作.....	64
4-2-3. 使用した菌株、プラスミド、プライマー.....	64
4-2-4. <i>P. ananatis</i> へのプラスミド導入.....	64
4-2-5. AaLINS と GPP 合成酵素の共発現プラスミドの構築.....	64
4-2-6. SWITCH-PphoC 株の染色体上の薬剤マーカー遺伝子除去.....	65

4-2-7. SWITCH-PphoC Δ gcd 株の構築.....	65
4-2-8. SC17 株のリナロール耐性能評価.....	66
4-2-9. 溶存リナロールの気相への移行速度の把握.....	66
4-2-10. 試験管を用いた(S)-リナロール発酵.....	67
4-2-11. SDS-PAGE による AaLINS の発現解析.....	67
4-2-12. Glc、MVA、(S)-リナロールの定量分析.....	68
4-3. 結果と考察.....	71
4-3-1. <i>P. ananatis</i> のリナロール耐性能評価.....	71
4-3-2. エアストリップングによる液相からの気相へのリナロール移行速度の把握.....	72
4-3-3. (S)-リナロール生産菌株の構築とその生産能の評価.....	74
4-3-4. Glc 脱水素酵素の欠損が(S)-リナロール生産に与える影響.....	76
4-3-5. <i>AaLINS</i> 遺伝子及び <i>GPPS</i> 遺伝子配列の同義置換による(S)-リナロール生産量向上.....	77
4-3-6. SDS-PAGE による AaLINS の細胞内発現解析.....	79
4-4. 結言.....	81
5 章 (S)-リナロール発酵生産性の向上.....	82
5-1. 緒言.....	82
5-2. 実験材料と方法.....	83
5-2-1. 検討に用いた培地と培養条件.....	83
5-2-2. 遺伝子操作.....	83
5-2-3. 使用した菌株、プラスミド、プライマー.....	83
5-2-4. <i>P. ananatis</i> へのプラスミド導入.....	83
5-2-5. CRIM プラスミド pAH162- <i>P_{tac}-myk</i> の構築.....	83
5-2-6. Dual-In/Out 法による IP03 株と IP04 株の構築.....	84
5-2-7. 可溶化タグ融合 AaLIN 発現用プラスミドの構築.....	84

5-2-8. SDS-PAGE.....	85
5-2-9. 菌体破砕液中の AaLINS 酵素活性測定.....	85
5-2-10. 試験管を用いた(S)-リナロール発酵.....	86
5-2-11. 1L 容 jar を用いた Glc 流加培養.....	86
5-2-12. Glc 濃度、MVA、(S)-リナロールの分析.....	87
5-3. 結果と考察.....	91
5-3-1. AaLINS の N 末端への可溶化タグ融合による AaLINS の可溶性向上検討.....	91
5-3-2. 6×His-BLA 融合が AaLINS の活性及び反応特異性に与える影響の確認.....	93
5-3-3. 6×His-BLA 融合 AaLINS 使用と MVA 経路の強化による(S)-リナロール生産量向上検討.....	95
5-3-4. IP04/pBLAAaLINS-ispA*株の Glc 流加培養評価.....	99
5-4. 結言.....	101
6 章 総括.....	102
参考文献.....	105
謝辞.....	111
発表論文.....	111

1 章 序論

1-1. 緒言

我々人類は、古くから植物が生産する化合物を医薬品や食品、化成品として日々の生活に活用してきた。その多くは植物の二次代謝物と定義される化合物群で、抗腫瘍活性を持つアルカロイド類、抗酸化活性を示すフラボノイド類のほか、芳香性を持つテルペノイド類が代表例として挙げられる。なかでもテルペノイド化合物の用途は香料、着色料、健康補助食品、医薬品原料、農薬、工業原料など多岐にわたり、我々の日々の生活に欠かせないものとなっている。

テルペノイド化合物の多くは現在主に植物組織からの抽出により供給されているが、植物中に含まれる量が微量であることや、植物の生長自体が天候や病原菌による影響を受けやすいことから、資源保護や安定供給の観点で課題がある¹。化学合成により生産されるテルペノイドも存在するが、昨今はヨーロッパを中心に消費者の食品へのナチュラル志向が高まっており、フレーバー用途に用いられる場合は"Natural"表示可能な植物からの抽出物が好まれる傾向にある²。また、2015年に国連総会で採択された「持続可能な開発目標(SDGs)」達成への貢献に対して社会の関心が高まる中、地球環境保全、省エネルギー、省資源を意識した製法の確立が、テルペノイドに限らず各企業に求められている。

こうした背景下で、再生可能な植物バイオマスから微生物を用いた発酵法で目的のテルペノイドを生産する方法が昨今注目を集めている。この20年、代謝工学や合成生物学の発展によりバクテリアや酵母を宿主としたテルペノイド化合物の発酵生産技術は飛躍的に向上した。実際、バイオテクノロジーベースの柑橘系フレーバー(ヌートカトン、バレンセン)に代表されるテルペノイド化合物が市場に登場している²。米国およびEU圏では、天然原料から微生物による発酵により変換した生成物には"Natural"表示が許可されており、こうした発酵由来の製品は化学合成品よりも高値で取引される傾向にある。しかしながら一部の化合物を除き、依然テルペノイドの発酵生産性は低い。本研究では、本課題を解決するための有望な手段として耐酸性通性嫌気性細菌 *Pantoea ananatis* をプラットフォーム菌に用いた高生産性のテルペノイド発酵製法を提案した。また、本研究では化学合成では困難とされる100%鏡像選択的なテルペノイド生産の実例を示し、発酵法(酵

素反応)の利点を実証した。

本章(序章)ではテルペノイドの多様性と有用性を踏まえた上で、自然界におけるテルペノイド生合成経路に関する知見、従来のテルペノイド製法の課題を整理し、本研究に着手するに至った社会的背景と動機に関して述べる。続いて、これまで検討されてきた組換え微生物によるテルペノイド発酵の現状を整理すると共に、テルペノイド発酵に求められる代謝工学的手法と発酵プロセスに関する基礎的な知見を纏めることで、高生産性のテルペノイド発酵生産技術を構築するうえで必要な要素技術を抽出した。最後に、生産宿主として用いる *P. ananatis* に関する知見を整理した。以上を纏めたうえで、最終的に本研究の目的と意義を示した。

1-2. 研究の背景

1-2-1. テルペノイドの構造と機能

テルペンは五炭素化合物であるイソプレンを構成単位とする炭化水素であり、テルペン類のうちカルボニル基やヒドロキシ基などの官能基を持つ誘導体はテルペノイドと呼ばれる。また、イソプレノイドという呼称も使われる。しかしながらテルペンとテルペノイドは明確に区別されずに同じ意味で使用されることも多いため、本論文中では炭化水素であるテルペンもテルペノイドに含む形でテルペノイドに統一して使用する。メチル化、アシル化、配糖化など様々な修飾反応の組み合わせから、テルペノイドは自然界で最も構造多様性に富み、現在までに 50,000 を超える化合物が報告されている²。レオポルト・ルジチカが提唱したイソプレン則では、テルペノイドはイソプレンユニットの数、即ち炭素原子の数に応じて分類される。イソプレンユニットの数により、ヘミ(C5)、モノ(C10)、セスキ(C15)、ジ(C20)、セスタ(C25)、トリ(C30)、テトラテルペノイド(C40)と分類される。テルペノイドの一部は生活環(細胞成長、発生、生殖など)に必須とされる一次代謝産物として機能し、代表例としては呼吸鎖で働くユビキノン(コエンザイム Q10)やメナキノン(ビタミン K2)、生体膜の構成成分であるコレステロールやエルゴステロールが挙げられる^{3 4}。テルペノイドは全ての生物に存在するものの、とりわけ植物界において多様かつ豊富に存在することが報告されており、植物の生存戦略上有利に働く二次代謝物として非常に重要な役割を担っている²。例えば、揮発性のテルペノイドは病原体などの外敵からの防御物質、粉媒介昆虫の誘因物質、近隣植物への他感物質として機能していることが知られており、生物間のコミュニケーションに重要な役割を担う。また上述の通り、一部のテルペノイドは産業的、経済的価値を有する。タイヘイウイチイ(*Taxus brevifolia*)の樹皮に含まれるパクリタキセル(抗悪性腫瘍剤)や、クソニンジン(*Artemisia annua*)に含まれるアルテミシニン(抗マラリア剤)はその代表例である(Fig. 1.1)。

ヘミテルペノイド(C5)とモノテルペノイド(C10)

ヘミテルペノイドは 5 個の炭素原子単位で構成される最小のテルペノイドである。なかでも最もよく知られる化合物は揮発性炭化水素、イソプレンである(Fig. 1.1)。イソプレンは合成化学業界における貴重なポリマー

ビルディングブロックであり、そのほとんどが合成ゴムである *cis*-1,4 ポリイソプレンの製造に使用されている⁵。ポプラや葛などの植物は前駆体であるジメチルアリルニリン酸 (DMAPP) をイソプレンへと変換する酵素 (イソプレンシンターゼ) を有しており、大気中にイソプレンを放出していることが報告されている⁶。

モノテルペノイドは非環式、単環式、あるいは二環式の C₁₀ 化合物であり、各種モノテルペン合成酵素によってゲラニルニリン酸 (GPP) から骨格物質が合成され、さらに水酸化や糖化などの修飾を受けることもある。モノテルペノイドは植物から抽出された精油の主要香気成分であり、フレーバー & フレグランス用途として化粧品、食品業界で広く用いられている⁷。代表例としてはバラ様の香りを持つゲラニオール、柑橘類の果皮に多く含まれるリモネン、ラベンダーの芳香主成分であるリナロールが挙げられる (Fig. 1.1)。

1-2-2. テルペノイドの生合成

全てのテルペノイドは、共通の前駆体であるイソペンテニル二リン酸(IPP)とその異性体である DMAPP に由来する⁸。IPP と DMAPP はメバロン酸(MVA)経路と 2C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP)経路と呼ばれる異なる 2 つの経路から生成され(Fig. 1.2)、MVA 経路は真核生物、古細菌、および一部のバクテリアに存在し、MEP 経路は主にバクテリア、藻類、および植物の葉緑体に存在する⁹。

MVA 経路は 7 段階の酵素反応からなり、アセチル-CoA の連続した縮合反応からスタートし、3 分子のアセチル-CoA から最終的に 1 分子の IPP あるいは DMAPP を生成する。アセチル-CoA C-アセチルトランスフェラーゼによりアセチル-CoA からアセトアセチル-CoA が生成されるのに続いて、3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) 合成酵素により、アセチル-CoA とアセトアセチル-CoA から HMG-CoA が生成される。その後、HMG-CoA 還元酵素の働きにより 1 分子の HMG-CoA から 1 分子の MVA が生成され、その際には 2 分子の NADH が NAD⁺へと酸化される。MVA は MVA キナーゼと 5-ホスホメバロン酸キナーゼによる連続したリン酸化反応により 5-ホスホメバロン酸、5-ジホスホメバロン酸へと変換され、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼによる脱炭酸反応を経て IPP に変換される。この後段の反応では、反応ごとに 1 分子の ATP が消費される(Fig. 1.2)。生成された IPP は IPP イソメラーゼにより DMAPP へと異性化される。HMG-CoA 還元酵素の補酵素は NADH 型のタイプも存在し、古細菌では一部のルートが異なる変形型の MVA 経路が複数存在することが報告されている。

1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP)経路、あるいは非 MVA 経路とも呼ばれる MEP 経路は、DXP 合成酵素により触媒されるピルビン酸およびグリセアルデヒド-3 リン酸(G3P)の縮合反応による DXP 生成から開始する。DXP は DXP レダクトイソメラーゼによって MEP に変換される。続いて MEP は MEP シチジルトランスフェラーゼにより 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol (CDP-ME)へと変換され、CDP-ME キナーゼにより CDP-ME は 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphate (CDP-MEP)へとリン酸化される。CDP-MEP は 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate (MEcPP)シンターゼにより MEcPP へと変換される。MEcPP は(E)-4-ヒドロキシ-3-メチル-2-ブテニル二リン酸シンターゼにより 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate (HMBPP)へと変換され、HMBPP は HMB-PP レダクターゼによって IPP もしくは

DMAPP へと変換される。

イソプレンのようなヘミテルペノイド (C5) は DMAPP に直接由来する一方で、モノテルペノイド (C10) 以降の化合物の直接的な前駆体は、IPP と DMAPP からプレニル基転移酵素により触媒される head-to-tail 型の縮合反応により生成される。DMAPP と IPP の縮合反応により GPP (C10) が、同様の縮合反応を経て GPP と IPP からファルネシル二リン酸 (FPP; C15) が、FPP と IPP からゲラニルゲラニル二リン酸 (GGPP; C20) が生成され、これらのプレニル二リン酸がそれぞれモノ、セスキ、ジテルペノイドの前駆体となる (Fig. 1.1)。各種テルペノイド合成酵素の働きにより GPP、FPP、GGPP といったプレニル二リン酸から二リン酸の脱離が生じ、環化・転移・修飾反応などを受けることで各種テルペノイドが生成される。テルペノイド合成酵素によって生成されたテルペノイドは、シトクロム P450 による水酸化やグリコシルトランスフェラーゼによる糖化など様々な修飾を受ける。

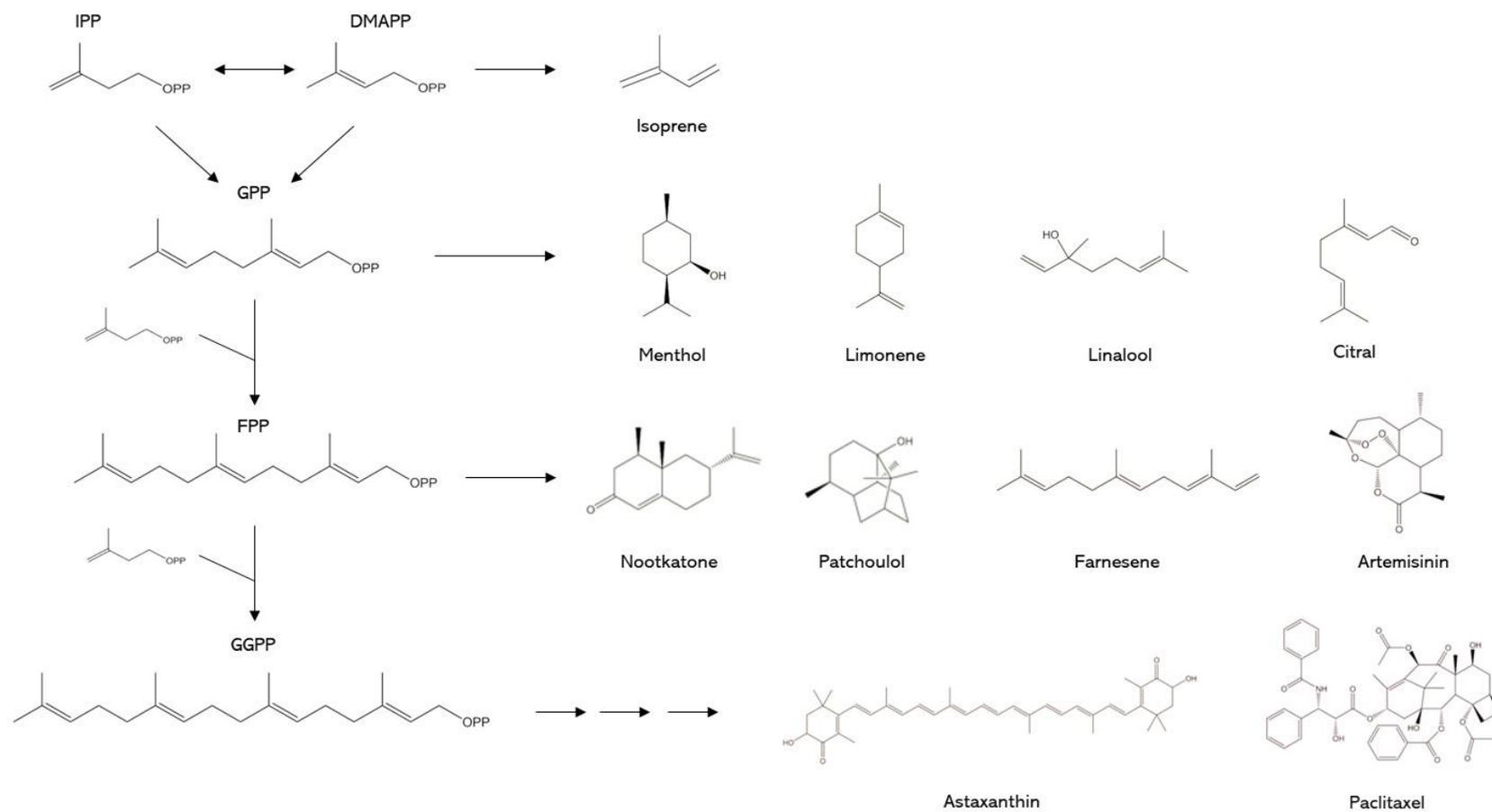


Figure 1.1 Generation of structural terpenoid diversity. Dimethylallyl diphosphate (DMAPP) and isopentenyl diphosphate (IPP) are successively condensed to form phosphorylated terpenoid backbones. The backbones are modified to generate the diversity of terpenoids, which are classified according to the number of isoprene unit. GPP: geranyl diphosphate, FPP: farnesyl diphosphate, GGPP: geranylgeranyl diphosphate.

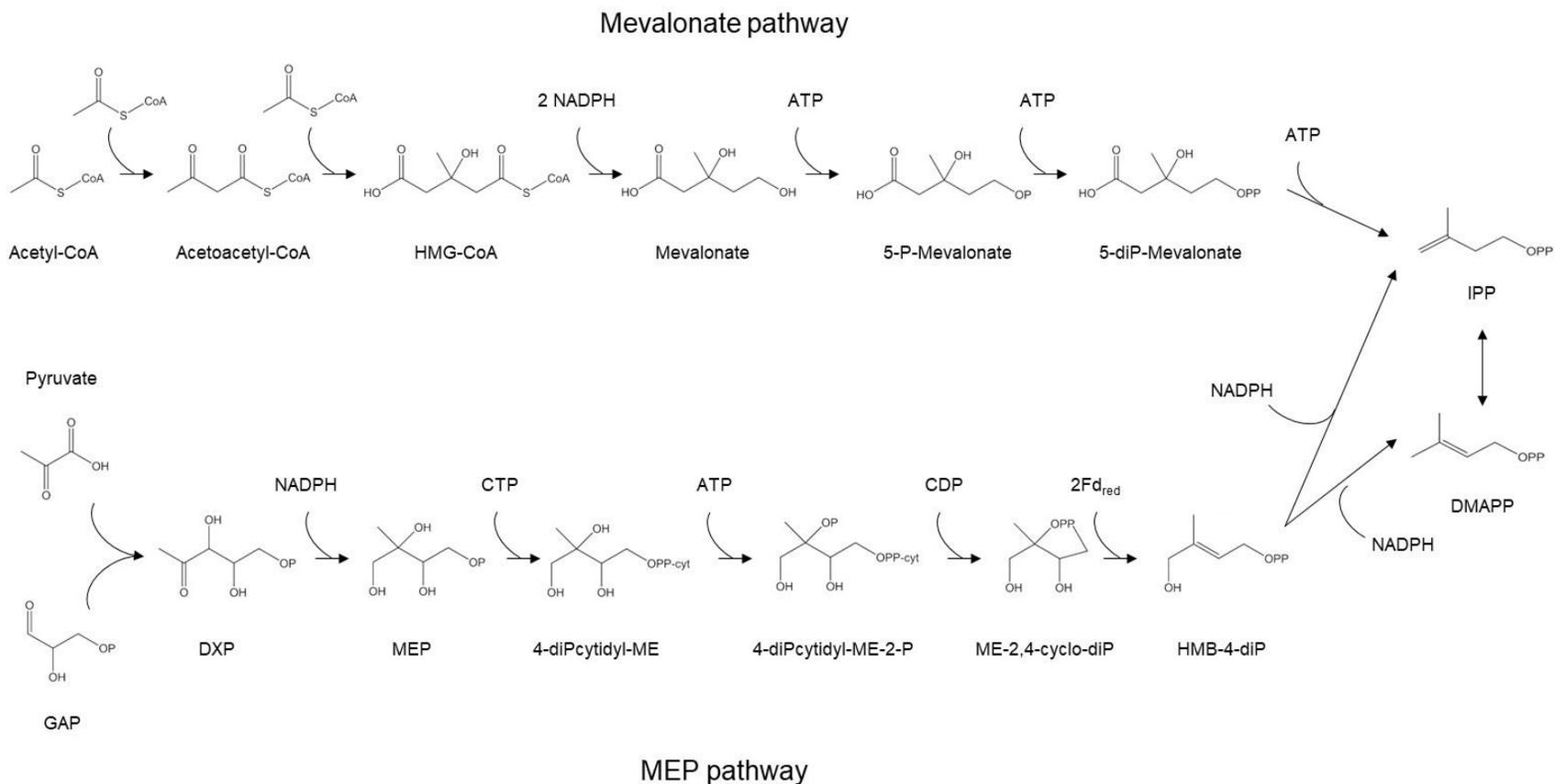


Figure 1.2 Biosynthesis of terpenoid precursors. The mevalonate pathway and the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) pathway form both isopentenyl diphosphate (IPP) and dimethylallyl diphosphate (DMAPP). DXP: 1-deoxyxylulose-5-phosphate, HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A, 4-diP-cytidyl-ME: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol, 4-diP-cytidyl-ME-2-P: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol-2-phosphate, ME-2,4-cyclo-diP: 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate, HMB-4-diP: 1-hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-diphosphate, NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, CDP: cytidine diphosphate, CTP: cytidine triphosphate, ATP: adenosine triphosphate, Fd: ferredoxin.

1-2-3. テルペノイド化合物の現行製法が抱える課題

現在商業的に利用されている精油や単一のテルペノイド化合物は、植物組織の水蒸気蒸留、あるいは溶媒抽出によって製造される。このアプローチは、植物の生長がはやく十分な量が植物中に蓄積される L-メントールのような場合には非常に有効な手段である。しかしながら、例えばタイヘイヨウイチイは希少かつ成長が遅いことから、その乾燥重量の約 0.015%にしか満たないパクリタキセルの供給量は限られてしまう。このように、二次代謝物であるテルペノイドの多くは植物中に含まれる量が僅かなため、抽出法の生産効率は低く、資源の乱獲や絶滅を引き起こす恐れがある。実際、タイヘイヨウイチイは絶滅危惧種の IUCN レッドリストに登録されており、生物多様性保護の観点からもより持続的な供給方法の確立が望まれる¹⁰。このような例は他にも挙げられる。心材のチップを水蒸気蒸留することで得られる精油の主成分が(R)-リナロールであるローズウッド (*Aniba rosaeodora*) はワシントン条約の規制の対象となる植物(附属書II)のリストに記載されている¹¹。また、サンダルウッド (*Santalum album*) から蒸留して取られる精油は香水に使用される貴重な成分(サンタロール; C15)であるが¹²、現在インド政府は保護のためその伐採や輸出に規制をかけている。また、同じ種であっても生息地域の地理的要因や天候により含有するテルペノイドの組成は影響を受ける。そのため栽培が特定の地域に偏り、天候不順などに起因する収量の不安定性が価格の変動に繋がってしまう。加えて、病原体の蔓延も安定供給のリスクである¹。

化学合成法もテルペノイド化合物の供給量、品質の安定性を確保できる有効な製造手段である。しかしながら、幾つかのテルペノイドは構造的に複雑すぎるため収率が低い。例えば 11 の光学中心を持つパクリタキセルの化学合成は全体の収量が約 0.4%に留まり、製造コストが高すぎると述べられている¹⁰。また、L-メントールなど光学異性体の選択的な製造に成功している例はあるものの、化学合成では位置、立体選択的な製法が確立されていないものも多い。化学合成の抱える別の課題は、石油資源への高依存と有毒な副産物や廃棄物に伴う高環境負荷である¹³。気候変動リスクが顕在化してきている昨今、省エネルギー、省資源を意識した製法が求められているのに加えて、ヨーロッパを中心に"Natural"表示された天然物由来の製品が好まれる傾向が高まってきており、化学合成品への抵抗感が増している¹。

こうした背景から、昨今技術開発が進む発酵法や酵素法は、"Natural"表示可能な市場価値の高いテルペ

ノイド化合物(ナチュラルフレーバー)の大規模かつ環境負荷の低い新たな代替供給手段として期待されている。発酵法や酵素法は、季節や天候、気候、栽培リスクからも独立しており、安定供給の観点でも優れているに加え、酵素反応であることから位置、立体選択的に目的のテルペノイドを生産することも期待できる。

1-2-4. 組換え微生物によるテルペノイド発酵生産に関するこれまでの知見

発酵法によるテルペノイド生産の実現には、微生物の培養条件に加えて、発酵液からのテルペノイドの回収といったダウンストリームを含む「生産プロセス」の最適化が必要である。しかしながら、第一に「目的のテルペノイドを効率的に生合成出来る菌株」の構築が、工業生産を実現する為の最低条件である。工業的な発酵生産の場面で製造コストという概念は非常に重要であり、製造コストを低減するには原料(主に糖源)から速やかに高収率で高濃度の目的物質を生産することが求められる。すなわち、ここで言う「効率的」とは生産性 (g-product/L/hr) と収率 ($\% \cdot \text{w/w}$) を如何に最大化出来るかを意味する。テルペノイドを効率的に生合成する菌株の構築には、宿主微生物に内在するテルペノイド生合成遺伝子群の発現強化、もしくはテルペノイド生合成に関わる異種遺伝子の宿主微生物への導入が必要である。よって、宿主として使用する微生物の遺伝子組換え技術の成熟度は、テルペノイド生産宿主選定における重要な選択基準の一つである。また、商業スケールでの発酵に用いられた実績があり、発酵プロセスのスケールアップに関するノウハウが豊富であると、なお望ましい。

昨今の代謝工学、合成生物学、ゲノム編集技術の発展に伴い、*Escherichia coli*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pseudomonas putida*、*Methylobacterium extorquens*、*Yarrowia lipolytica* など様々な遺伝子組換え微生物によるテルペノイド生産事例が報告されている^{3 13 14 15 16}。モデル微生物である *E. coli* や *S. cerevisiae* ではテルペノイド生産能が向上した遺伝子改変株が多数報告されており、最も成功している宿主と言える。Table 1.1 に比較的 low molecular weight のテルペノイド (C5~C15) に限定して、既報の代表的なテルペノイド発酵成績を纏めた。特筆すべき例としては、Genencor 社(現在 DuPont 社が所有する Danisco USA 社の一部門)と Goodyear Tire & Rubber Company が提携して実施した遺伝子組換え *E. coli* による Bioisoprene™ の生産や⁵、大手製薬会社 Sanofi 社の遺伝子組換え酵母によるアルテミシン酸(アルテミシニンの前駆体)の生産が挙げられる¹⁷。また、香料分野でもバイオテクノロジーの活躍が著しい。スイスの大手香料会社 Firmenich によるパチョロールを主成分とする Clearwood® やサンタロールを主成分とする Dreamwood™、ドイツの総合化学メーカー BASF 社傘下 Isobionics 社によるバレンセン、ヌートカトンなど、バイオテクノロジーベースのテルペノイド化合物が次々と市場に投入されている。しかしながら、テルペノイドの種類は膨大であるにも関わらず、上

記したような一部のヘミテルペノイドやセスキテルペノイドを除いて発酵生産効率に大きな飛躍は認められていない。特にモノテルペノイドに限定すると、その蓄積が 10 g/L を超える事例は報告されていない¹⁸。

Table 1.1 Summary of representative terpenoid production using microbe

Product	Category	Host organism	Titer	Reference
Isoprene	Hemiterpenoid	<i>E. coli</i>	60 g/L	5
Linalool	Monoterpenoid	<i>E. coli</i>	1.5 g/L	19
Geraniol	Monoterpenoid	<i>S. cerevisiae</i>	1.7 g/L	20
(-)- α -bisabolol	Sesquiterpenoid	<i>E. coli</i>	9.1 g/L	4
β -farnesene	Sesquiterpenoid	<i>S. cerevisiae</i>	>130 g/L	15
Amorpha-4,11-diene	Sesquiterpenoid	<i>S. cerevisiae</i>	25 g/L	21
Viridifloro	Sesquiterpenoid	<i>E. coli</i>	30 g/L	14

1-2-5. テルペノイド生産能を向上させる為の代謝工学的アプローチに関するこれまでの知見

目的のテルペノイドを歩留まり良く生産するには、原料物質から目的物質への代謝流束を宿主細胞内で最大化することが求められる。これまでに報告された遺伝子組換え菌株のテルペノイド生産能向上に関する知見を整理すると、テルペノイド生産能向上のための代謝工学的アプローチは主に 2 つの基本戦略に基づいている。それは、①テルペノイドの共通ビルディングブロックである IPP/DMAPP への代謝流束増強と②テルペノイド生合成の律速反応となりやすいテルペノイド合成酵素の細胞内活性向上である。

テルペノイドの共通前駆体である IPP/DMAPP の供給経路には、MEP 経路と MVA 経路の 2 つの選択肢がある (Fig. 1.2)。 *E. coli* のようなバクテリアを宿主にして内在性の MEP 経路を利用すると、理論重量収率 (グルコース [Glc] を C 源とした場合) の観点では、MVA 経路を利用するよりも $\Delta 5\%$ 高い (Table 1.2)。つまり、MEP 経路はエネルギー収支のバランスを適切にとることが出来た場合、MVA 経路よりも高い収率を見込める。しかしながら、内在性の MEP 経路をそのまま利用するだけではその酵素活性の低さが問題となり、IPP/DMAPP 供給が効率的でない。バクテリアを宿主とする場合、IPP/DMAPP 供給能を向上させる手段として①MEP 経路のボトルネック酵素の増強、②異種 MVA 経路の導入、いずれか (いずれも) を採用する必要があるが、比較的生産性の高い先行事例では②の手法を採用していることが殆どである。これは MEP 経路の発見が MVA 経路の発見よりも半世紀ほど遅く、代謝の制御機構に関して詳細が十分に理解されていないことも要因の一つと推察できる。

また、MEP 経路は G3P とピルビン酸から DXP を生成する事で始まる為 (Fig. 1.2)、発酵原料に糖以外の炭素源を利用するには糖新生を働かす必要がある。そのため、基本的に発酵原料は糖類やグリセロールなど解糖系を通過する基質に限定される。一方、MVA 経路は出発物質がアセチル-CoA であるため、エタノールや脂肪酸といった基質も発酵原料として活用できる。発酵法で作られたテルペイド化合物は市場価値が高いものの、化学合成品と競合するには、主原料を糖源に依存した発酵プロセスだけでは採算性の面で困難なことが予想される。よって、未利用バイオマスからテルペノイド化合物を生産する戦略は重要であり、将来的な未利用バイオマスの活用も視野に入れた場合、テルペノイド生合成経路には MVA 経路を採用することが望ましいと考えられる。

宿主細胞内に異種 MVA 経路を導入することでアセチル-CoA から IPP/DMAPP への代謝流束を増大させるには、複数の遺伝子の導入、改変が求められる。また、HMG-CoA や IPP など一部の間代謝物は細胞毒性を示すため、これらが細胞内に蓄積しないように各遺伝子(酵素)の発現バランスを注意深くチューニングすることも要求される³。こうした複数の遺伝子の発現度合いをチューニングし、代謝バランスを調整するために広く用いられているのが、複数の遺伝子をグループ化して異なるモジュールに搭載し、モジュール内・モジュール間で協調しながら各遺伝子(酵素)の発現レベルを調節する方法である。モジュール内の発現バランスの調整はリボソーム結合配列(RBS)の変更、モジュール間の調整はプロモーターの変更により比較的容易に行うことが出来、代謝のアンバランスを調整しやすい。かつては各モジュールを異なるプラスミドに搭載して発現させることも多かったが、遺伝形質の不安定性や余計な細胞への負荷(ATP や NAD(P)H の過剰消費)を回避するため、各モジュールを染色体上に固定する方が望ましい²²。

一方、理論最大収率で Glc から目的のテルペノイドを生産出来ると仮定した場合、アセチル-CoA が TCA 回路へと流入しないため、細胞増殖に必要なエネルギー(ATP)や細胞構成成分の生成に必要なアセチル-CoA 由来の物質を得る事が出来ない。つまり、恒常的に高い収率でテルペノイドを生産する菌株は、細胞増殖速度が低くなる事がエネルギー論的にも説明がつく²³。仮にそのような菌株を取得出来たとしても、培養を通しての菌体量は低く、結果的に生産性の低さが課題となる。また、培養初期から MVA 経路での代謝のアンバランスが生じると、毒性のある中間代謝物が培養の早い段階で蓄積し、増殖が抑制されてしまう。そのため、物質生産に必要な触媒量、すなわち菌体量が十分得られないことが想定される。本課題に対する有効なアプローチの一つが、菌体増殖期と物質生成期を分ける“dual-phase”の培養プロセスである(Fig. 1.3)。ラボスケールではイソプロピル-β-チオガラクトピラノシド(IPTG)などの誘導剤を培養途中に添加することで強制的に目的の遺伝子発現を誘導し、培養フェイズを切り分ける手法が一般的である。しかしながら、こうした誘導剤は高価なため培養コストを引き上げる要因となる。よって、商業生産を見据えた場合、誘導剤の添加は望ましい方法とは言えない。

IPP/DMAPP への代謝流束増強の後に取り組むべきなのが、テルペノイド合成酵素の細胞内活性向上である。テルペノイド生産菌株を構築する際、高性能なテルペノイド合成酵素変異体の取得、発現方法の最適

化、新規酵素のスクリーニングといった、テルペノイド合成酵素の活性向上を目的としたアプローチが取られることが多い。田代らが述べるように²⁴、IPP/DMAPP までの生合成経路はすべて共通でありながら作るテルペノイドの種類によって生産性が大きく異なる以上 (Table 1.1)、テルペノイド合成酵素の細胞内活性がボトルネックとなり易いと考えるのが自然である。同じテルペノイドの生産でも、使用するテルペノイド合成酵素の違いによって生産性が大きく変わる例としては以下のようなものがある。*E. coli* を用いたビサボレン (セスキテルペノイド) 発酵生産に関する研究では、*Abies grandis* 由来のビサボレン合成酵素を使った場合、同じ宿主、発現系を用いて *Pseudotsuga menziesii* 由来のビサボレン合成酵素を使った場合より 20 倍も生産性が向上している²⁵。こうした例は、酵母を用いたネロリドール (C15) 発酵生産でも報告されている²⁶。このようにテルペノイド合成酵素の活性がボトルネックになるという問題は、もはやテルペノイド発酵生産における共通課題であると言える。

Table 1.2 Theoretical IPP (isoprene) yield from glucose via the MEP or the MVA pathway⁵

Pathway	Stoichiometric equation	Theoretical mass yield from glucose
MEP pathway	$1.25 \text{ Glucose} + 0.5\text{O}_2 \rightarrow 1\text{IPP} + 2.5\text{CO}_2 + 3.5\text{H}_2\text{O}$	30.2%
MVA pathway	$1.5 \text{ Glucose} + 2\text{O}_2 \rightarrow 1\text{IPP} + 4\text{CO}_2 + 5\text{H}_2\text{O}$	25.2%

IPP: isopentenyl diphosphate, MEP: 2C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MVA: mevalonate.

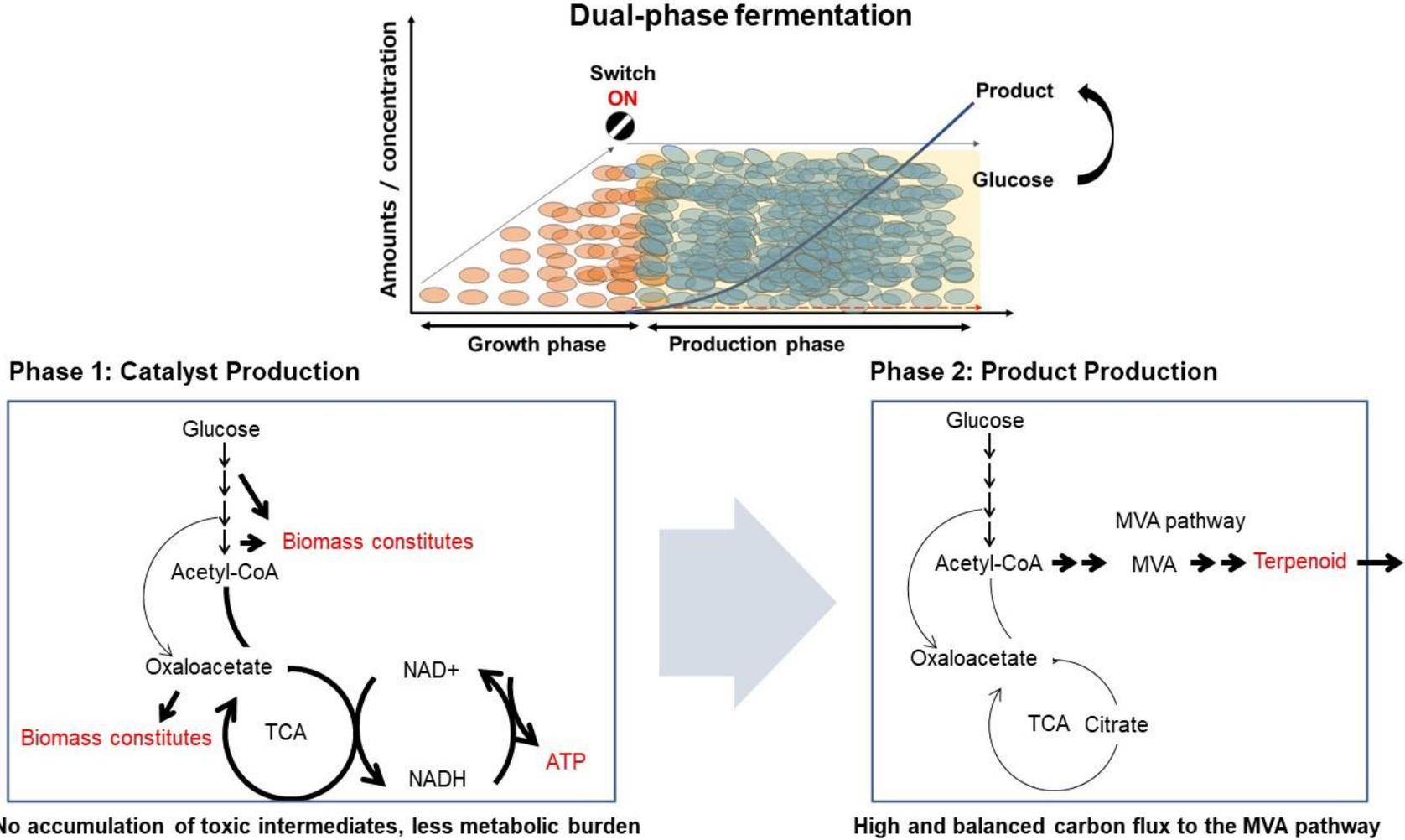


Figure 1.3 Dual-phase fermentation process using metabolic “ON” switch. Biocatalyst is obtained with standard biomass growth rate at the initial phase, cells are triggered to switch into a catalytically active non-growing state enabling conversion of sugar to the target product at the subsequent phase. MVA: mevalonate, TCA: tricarboxylic acid.

1-2-6. テルペノイド発酵生産プロセスに関するこれまでの知見

ここではテルペノイド発酵生産を行うための培養プロセスに関する課題と対策を整理する。テルペノイドの生化学的、物理化学的な特性を考慮すると、テルペノイド生産の効率性は代謝工学的なアプローチのみならず、培養プロセスにも大きく依存する。テルペノイド発酵を行う上でまず考慮すべき特性は、テルペノイドの示す細胞毒性である。物質の疎水性を示す指標である水-オクタノール分配係数($\log P_{ow}$)が 1.5~4 付近の化合物は、微生物の脂質二重膜へと結合することで呼吸活性を阻害することが知られている²⁷。官能基や炭素数により違いはあるものの、モノテルペノイド、セスキテルペノイドは $\log P_{ow}$ が 3~6 付近のものが多いため、培地中に蓄積することで微生物の増殖、代謝に悪影響を及ぼしテルペノイド生産を阻害する。Shah らは *E. coli* を用いてこの点に関して詳しく検証しており、同じモノテルペノイドでもアルコールであるゲラニオール ($\log P_{ow}$: 2.7) はアルケンであるミルセン (P_{ow} : 4.6) よりも毒性が高いこと、同じアルコールでもセスキテルペノイドであるファルネソール (P_{ow} : 4.6) よりもゲラニオール ($\log P_{ow}$: 2.7) の方が、毒性が高いことを報告している²⁸。

次に考慮すべきテルペノイドの特性は、その揮発性である。化学物質の揮発性を把握する指標としてヘンリー定数があるが、一般的にヘンリー定数の値が大きいほど大気中に揮発しやすい。香料として使用されることから解る通り、ヘミ、モノ、セスキテルペノイドは比較的揮発しやすい性質を持つ。例えばモノテルペノイドであるリモネンの 30°Cでのヘンリー定数は約 3,800 Pa·m³/mole であり、容易に培地から気相へと移行することが伺える²⁹。また、沸点が 34°Cのイソプレンに限ると、発酵に適した温度帯では生成後速やかにガス化して気相へと失われてしまうため、生成物の回収方法に工夫が求められる。

こうしたテルペノイドの物性に起因する課題を回避するための手段として挙げられるのが、In situ Product Removal (ISPR) とよばれる、生成物を速やかに培養液から除去、回収する手法である¹⁸。揮発性、水への溶解性(疎水性)、サイズ、電荷といった特定の要素に基づいた様々な分離原理が ISPR には使用されている。テルペノイド発酵プロセスに良く採用されている技術としては、テルペノイドの疎水性(低水溶性)を利用した液-液の二相培養と呼ばれる手法がある³⁰。n-ドデカンやミスチン酸イソプロピルといった疎水性が高く、細胞毒性の低い有機溶媒を発酵培地に添加することで、培養中に生成するテルペノイドをその場で有機溶媒相にトラップし、揮発による系外へのロスや微生物宿主への阻害、毒性を緩和、回避する(Fig. 1.4)。イソプレン

のような高い揮発性を持つ物質では、積極的にガス化して系外で生成物を回収する方法も用いられる。具体的には発酵ガス中に含まれるイソプレンを多孔質吸着剤などの固相抽出剤に吸着させ、連続的に回収する方法である⁵。このように、テルペノイド発酵プロセスを構築する際には、目的とするテルペノイド化合物の特性を理解し、適切な ISPR 技術を選択することが重要である。

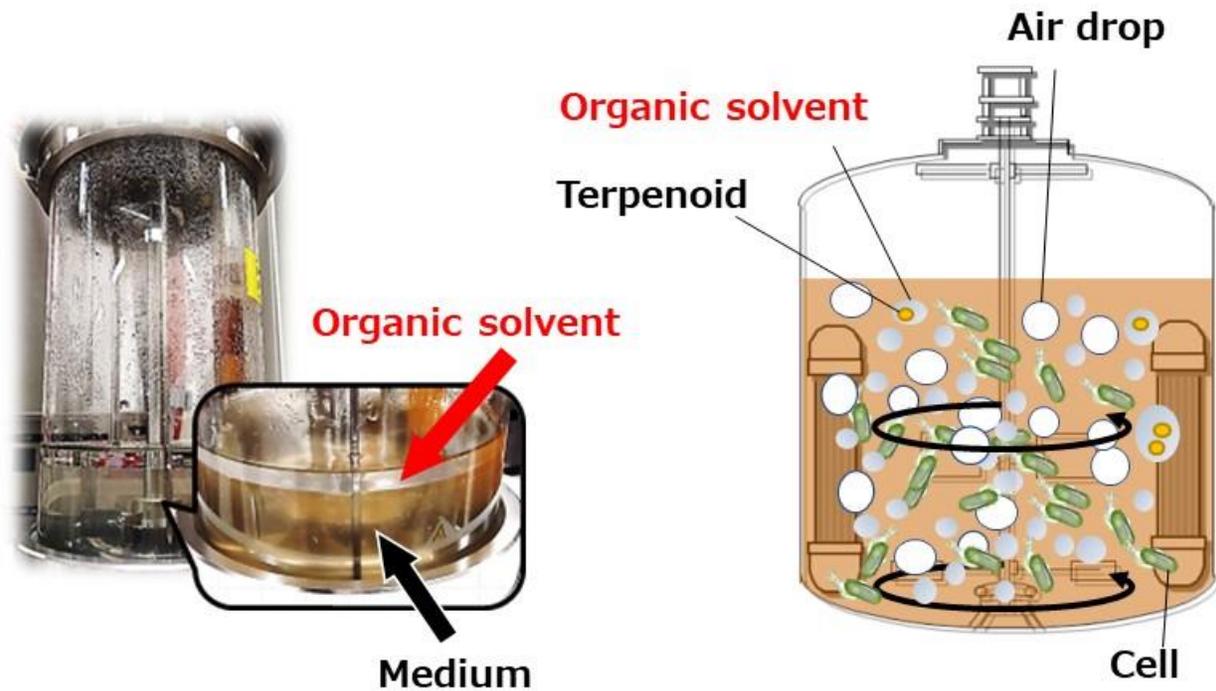


Figure 1.4 Liquid-Liquid phase partitioning cultivation or two-phase fermentation. Left) Photo of the bioreactor containing medium and organic solvent. Right) Image of the two-phase fermentation in which most of produced terpenoid are trapped in the organic solvent.

1-2-7. *Pantoea ananatis* に関するこれまでの知見

グラム陰性細菌 *P. ananatis* は 1928 年にフィリピンでパイナップル花樟病の病原菌として初めて報告され、その後も水や土、動物からも分離されるなど、自然界に広く存在していることが報告されている³¹。1990 年台半ばに味の素㈱の研究者らは、酸性条件下でのグルタミン酸 (L-Glu) 晶析発酵技術を実現すべく、酸性環境下でも生育可能、且つ高い L-Glu 耐性を示す菌を探索する過程で、静岡県のカキから耐酸性、高 L-Glu 耐性を示す菌株を単離した。本菌株は 16S rRNA 系統解析の結果 *P. ananatis* と同定され、後に AJ13355 株と名付けられた。AJ13355 株は非病原性であり、菌株の工業利用に必要なすべての試験に合格しており、バイオセーフティレベル 1 の菌株として認証されている³²。原らによって AJ13355 株の全ゲノム配列が決定されたことで代謝経路の全体像が推定出来るようになったことに加えて³²、 λ -red recombination system を利用した相同組み換えによる遺伝子破壊方法³³、Dual-In/Out 法による長鎖外来遺伝子の導入方法が確立されたこと³⁴、AJ13355 株は L-システイン、イタコン酸やコハク酸に代表される様々な有用物質の発酵生産宿主として利用可能となった^{35 36}。また、*E. coli* で汎用的に使用されている発現プラスミド (pMW 系、pSTV 系、pHSG 系) も利用可能である。このように、*E. coli* で確立された遺伝子改変技術とツールが活用でき、テルペノイド生産に必要な遺伝子群を導入、改変する為の技術基盤が整備されている。また、味の素㈱ではラージスケールでの *P. ananatis* を用いたアミノ酸発酵にも成功していることから、商業生産を行うための技術ノウハウも豊富である。よって *P. ananatis* AJ13355 株は、前項 1-2-4 で述べたテルペノイド生産宿主選定における選択基準、遺伝子組換え技術の成熟度と培養スケールアップに関する豊富な知見、その両方を満たしている。

1-3. 研究の意義と目的

現状、テルペノイド化合物の主な生産供給は植物組織からの抽出あるいは化学合成法により行われているが、天然植物資源から得られる供給量には限界がある。また、化学合成法で製造された製品は欧米の消費者を中心とした“Natural”志向、持続可能な資源循環型社会の実現といったトレンド、社会要請にマッチしないという課題が存在する。一方、様々なバイオ技術の発展に伴い、こうした課題を解決できる有望な代替製法として発酵法によるテルペノイド生産が台頭してきたものの、一部の化合物を除いて生産性の低さが商業化の課題となっていることを本章で述べた。なかでもモノテルペノイドの発酵生産性は、市場にローンチされる製品が出てきたセスキテルペノイドや、ヘミテルペノイドと比べて低く、蓄積が 10 g/L を超える例は現在まで報告されていない。そこで本研究では、味の素(株)において様々な有用物質の生産宿主として利用されてきた実績を持つ耐酸性通性嫌気性細菌 *P. ananatis* を宿主とし、代謝工学的アプローチと発酵プロセスの至適化により、高生産性のテルペノイド発酵生産を実現するためのプラットフォーム技術の構築を目指した。テルペノイドの種類は膨大であり、そのすべてを効率的に生産できる技術の確立が究極の目標ではあるが、本研究では産業価値の高いイソプレン及び(S)-リナロールを目的生産物質として選定し、発酵生産プラットフォーム技術を構築し、本技術の有用性を実証した。以下に本研究の構成を纏めた。

1 章(本章)では本研究に着手するに至った背景をまとめた上で、論文全体の目的と意義について述べた。また、関連する先行知見に関しても整理し、高生産性のテルペノイド発酵生産技術を構築するために必要な要素技術を整理した。

2 章では *P. ananatis* 内在性の無機リン酸 (P_i) 欠乏(枯渇)誘導性プロモーターの探索と選抜を行った。高生産性のテルペノイド発酵プロセスを構築するにあたり、細胞外 P_i 濃度に依存して菌体増殖期と物質生産期を切り分ける発酵プロセス(dual-phase 発酵プロセス)の利用を着想し、 P_i 欠乏誘導性プロモーターを MVA 合成遺伝子の発現に利用する方法を提案した。最終的に、 P_i 充足条件下では低い基底発現活性を示し、 P_i 枯渇条件下で高い誘導性を示すプロモーターとして、*pstS* と *phoC* プロモーターを見出した。

3 章ではイソプレンを目的物質として P_i 依存的に菌体増殖期から物質生成期を切替わる dual-phase テル

ペノイド発酵プロセスの実証実験を行った。イソプレンを含む全てのテルペノイドは IPP/DMAPP までの代謝経路は共通であるため、イソプレンで dual-phase 発酵プロセスの成立を確認出来れば、他のテルペノイド化合物の生産にも応用可能と想定される。2 章で抽出した P_i 欠乏誘導性プロモーターを導入した P_i 枯渇応答代謝スイッチを有するテルペノイド生産プラットフォーム菌株を構築すると同時に、構築したイソプレン生産菌株を Glc 流加培養することで、 P_i 依存的 dual-phase テルペノイド発酵プロセスの実現可能性を検証した。

4 章では前章までに構築した技術を鏡像選択的な(S)-リナロール生産に応用することで、構築した技術の拡張性、汎用性を示した。(S)-リナロール生産菌株の培養に適する条件を選定すると同時に、代謝工学的手法による(S)-リナロール生産能の向上を試みることで 3.4 g/L の(S)-リナロール蓄積を達成している。

5 章では更なる(S)-リナロール発酵生産量の向上を目的に、AaLINS の可溶化と MVA 経路の強化による GPP 供給量の向上を行った。構築した IP04/pBLAAaLINS-ispA*株は 1 L 容発酵槽を用いた Glc 流加培養にて、既報の実績を大幅に上回る 10.9 g/L の(S)-リナロールを蓄積し、モノテルペノイドの発酵生産事例として過去最高値を達成するに至った。

第 6 章では、研究成果を総括した上で、本研究の今後の展望を述べた。

2 章 *P. ananatis* 内在性の無機リン酸欠乏誘導性プロモーターの探索と選定

2-1. 緒言

アセチル-CoA を出発物質とする異種 MVA 経路を介したテルペノイド生合成は、微生物の増殖に重要な代謝産物やエネルギー源、すなわちアセチル-CoA、NADH や ATP の使用に関して細胞増殖と直接競合する。すなわち、テルペノイド生産に最適な代謝状態は、細胞増殖とトレードオフの関係にあると言える。更に、テルペノイド生合成に関わる酵素の過剰発現、あるいは有毒な代謝中間物の過剰生産は、宿主微生物の増殖遅滞を引起することが報告されている³。発酵法における目的物質の生産量は、菌体あたりの比生産量と菌体量の積である。そのため、生産性の高いテルペノイド発酵プロセスを構築するためには、菌体あたりの比生産量を向上させるだけでなく、発酵槽内に十分な菌体量を確保することが求められる³⁷。

前項 1-2-6 で述べた通り、生産性の高いテルペノイド発酵プロセスを実現するための手段として、乳酸発酵やコハク酸発酵などで認められる、菌体増殖期と物質生成期を切り分ける **dual-phase** 発酵プロセスがある。例えばコハク酸発酵の場合は嫌気条件、つまり酸素濃度依存的な応答機構を利用し、菌体増殖期からコハク酸生産期へと培養フェイズを移行させる。これは、コハク酸発酵時は嫌気条件下でも還元力の収支バランスが取れる為成立する。一方、MVA 経路を介したテルペノイド発酵では嫌気時に還元力過多となる為⁵、生成過程で NAD(P)H を消費する乳酸やアルコール類とのヘテロ発酵となり、対糖収率の低下が想定される。このように培養フェイズの切替えを溶存酸素濃度や培養 pH などのプロセスパラメーターに直接リンクさせるのが困難、不適な場合には、IPTG に代表される誘導剤の添加によって目的遺伝子の発現を誘導し、強制的に培養フェイズを切り替えることが一般的である。しかしながら商業生産を見据えた際、誘導剤の使用は製造コスト高の要因となるため適切とは言えない。本課題の解決策として、培養環境の変化や代謝産物の濃度変化に応答するプロモーターを目的遺伝子の発現制御に利用する方法がある³⁸⁻³⁹。バクテリアの持つ代表的な環境変化に応答する遺伝子発現制御系としては、細胞外の無機リン酸 (P_i) 濃度を感知し、そのシグナルを細胞質中で伝達することでリン酸レギュロンと呼ばれる一連の遺伝子群の発現調節を行う機構が挙げられ

、多くの微生物種で古くから研究されている⁴⁰。リン酸レギュロンは、より効率的にリンを細胞内に取込むための輸送系やリンの代謝に関与するタンパク質をコードしており、 P_i 欠乏時にその発現が強く活性化される。

本研究では、細胞外 P_i 濃度に依存して菌体増殖期と物質生産期を切り分ける dual-phase 発酵プロセスを高生産性のテルペノイド発酵プロセスの構築に利用することを着想している。本章ではその具現化に必要な遺伝子ツール、すなわちテルペノイド生産プラットフォーム菌として用いる *P. ananatis* 内在性の P_i 欠乏誘導性プロモーターの探索、選抜を行った。 P_i 充足時の基底発現レベルが低く、且つ P_i 欠乏条時に高い転写活性を示すプロモーターを取得し、本プロモーター支配下で MVA 経路関連遺伝子の発現を制御する仕組みを *P. ananatis* 内に構築することで、細胞外 P_i 濃度依存的な dual-phase 発酵プロセスを実現出来る (Fig. 2.1)。

MVA は MVA 経路の代謝中間物における唯一の有機酸であり、酢酸や乳酸などと同様、細胞内の濃度がある基準に達すると、有機酸の排出単体を介して培地中に分泌されることが期待される。よって、培地中の MVA 蓄積量の比較により、 P_i 枯渇に応じたアセチル-CoA の MVA 経路への流入量を簡易的に評価できると考えられた。そこで、MVA 発酵における MVA 蓄積を指標に、 P_i 欠乏誘導性プロモーターの選定を行った。

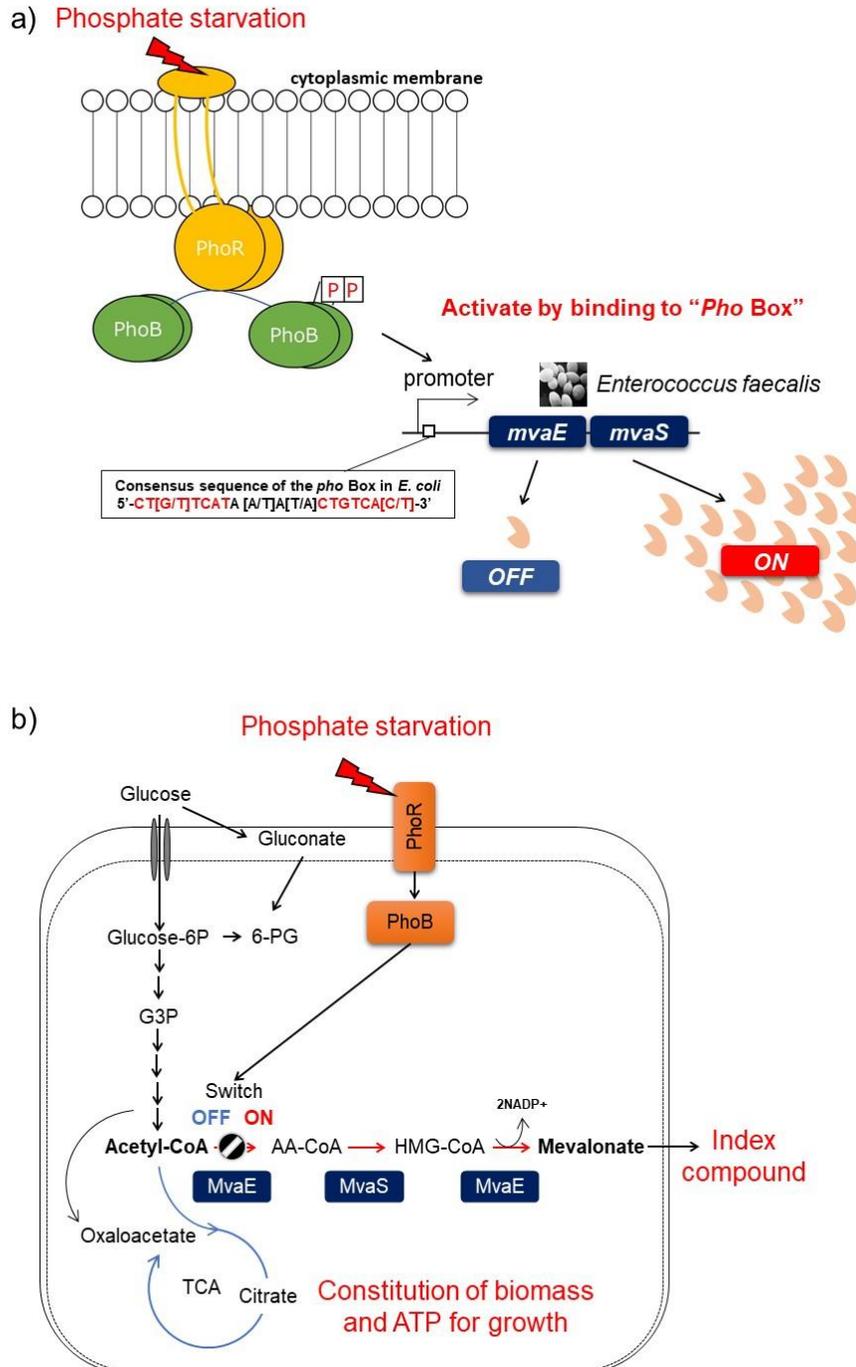


Figure 2.1 The concept of the external Pi-dependent dual-phase fermentation. **a)** The use of PhoR-PhoB two-component system to activate the expression of *mvaES* operon in response to inorganic phosphate starvation and **b)** Engineered mevalonate biosynthetic pathway in *Pantoea ananatis*. AA-CoA, acetoacetyl coenzyme A; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A; G3P, glyceraldehyde-3-phosphate; 6-PG, 6-phosphogluconate; PhoB, phosphate regulon transcriptional regulatory protein; PhoR, phosphate regulon sensor protein; MvaE, acetoacetyl-CoA thiolase and HMG-CoA reductase; MvaS, HMG-CoA synthase.

2-2. 実験材料と方法

2-2-1. 検討に用いた培地と培養条件

P. ananatis と *E. coli* の培養は汎用的に Luria-Bertani (LB) 培地 (Difco 社) を用い、特に本文中に記載が無い場合、*P. ananatis* は 34°C、*E. coli* は 37°C で好氣的に培養した。必要に応じて寒天 (Difco 社) 20 g/L、抗生物質としてアンピシリン (Amp)、カナマイシン (Km)、クロラムフェニコール (Cm)、テトラサイクリン (Tet) をそれぞれ 100, 50, 60, 30 µg/mL (終濃度) となるよう添加して使用した。

2-2-2. 遺伝子操作

PCR には PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara bio 社) を用いた。プラスミドを鋳型にして PCR を行った場合は、PCR 反応後の液に *DpnI* を加えて 37°C で 1 時間反応させ、鋳型プラスミドを切断した。アガロースゲルからの DNA 断片の回収には Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega 社) を用いた。*E. coli* JM109 株 (Takara bio 社) への形質転換にはヒートショック法を用い、プラスミドの調製には Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega 社) を用いた。*P. ananatis* の形質転換はエレクトロポレーション法で実施した³³。エレクトロポレーションには 1 mm キュベット (BIO-RAD 社)、GenePulser Xcell™ (BIO-RAD 社) を用いた (電場強度 18 kv/cm、コンデンサー容量 25 µF、抵抗値 200Ω)。

2-2-3. 使用した菌株、プラスミド、プライマー

本章で使用した菌株とプラスミドを Table 2.1 に纏めた。各菌株にプラスミドを導入した株を、本文ではそれぞれ菌株名/プラスミド名と記載した。例えば、SC17(0)株³³ にプラスミド pRSFredTER³³ を導入した株は SC17(0)/pRSFredTER 株と記載した。また、本章で使用したプライマーとその塩基配列を Table 2.2 に纏めた。

2-2-4. 遺伝子配列の解析

得られた塩基配列は GENETYX ソフトウェア (ゼネティクス社) で解析した。KEGG (Kyoto Encyclopedia

of Genes and Genomes)に登録された *P. ananatis* AJ13355 株と *E. coli* K-12 MG1655 株それぞれの DNA 配列を用いて、GENETYX ソフトウェアにて塩基配列のホモロジー検索を実施した。

2-2-5. *Enterococcus faecalis* 由来 *mvaE*、*mvaS* 遺伝子の発現プラスミドの構築

pMW-P_{ara}-*mvaES*-T_{irp} (GenBank No. LP790601) のアラビノース誘導性プロモーター領域を P_i 欠乏誘導性プロモーターに置換することで、*E. faecalis* 由来の *mvaE*、*mvaS* 遺伝子を P_i 欠乏誘導性プロモーター支配下で発現させるプラスミドを構築した。AJ13355 株³² のゲノム DNA を鋳型とし、プライマー 0278F と 0278R、0425F と 0425R、1561F と 1561R、3196F と 3196R、2939F と 2939R の組合せを用いた PCR で、*phoB* (locus tag: PAJ_0278)、*phoC* (locus tag: PAJ_0425)、*phoH* (locus tag: PAJ_1561)、*pstS* (locus tag: PAJ_3196)、*ugpB* (locus tag: PAJ_2939) それぞれの ORF 上流領域を含む DNA 断片を取得した。In-Fusion HD cloning kit (Clontech 社) を用いて各精製 PCR 産物を、pMW-P_{ara}-*mvaES*-T_{irp} を鋳型にプライマー pMW-*mvaES*F、pMW-*mvaES*R で増幅した DNA 断片と連結した。次に、これらの反応溶液を用いて JM109 株を形質転換し、Km 含有 LB 寒天培地上に塗布して一晚培養した。その後、LB 寒天培地上に出現したコロニーを Km 含有 LB 液体培地に植菌し、振とう培養を行った。こうして得られた形質転換株の培養菌体からプラスミド DNA を抽出し、pPhoB-*mvaES*、pPhoC-*mvaES*、pPhoH-*mvaES*、pPstS-*mvaES*、pUgpB-*mvaES* を得た。

2-2-6. *P. ananatis* へのプラスミド導入

LB 寒天培地上で生育させた菌体を 1/4 プレート程度、1 mL の 10% グリセロールが入った 1.5 mL 容マイクロチューブに回収し、16,200 × g で 10 分間遠心して集菌した (4°C)。上清を捨て、氷冷した 1 mL の 10% グリセロールを添加して懸濁後、再度同様の条件で遠心して集菌した。同様の集菌操作を再度行うことで得られた洗浄菌体に 200 μL の氷冷 10% グリセロールを添加し、穏やかにピペッティングして懸濁した (コンピテントセル液)。次に、コンピテントセル液 80 μL とプラスミド DNA 100~200 μg (液量 1.0~2.0 μL) を混和し、エレクトロポレーションした。1 mL の SOC 培地 (Thermo Fisher Scientific 社) を添加し 2 時間回復培養を行い (120 round per minute [rpm])、培養液適量を各種抗生物質含有 LB 寒天培地に撒布し、一晚培養すること

で生えてきたコロニーを目的の形質転換体として取得した。

2-2-7. CRIM (Conditional -Replication, Integration, Excision) プラスミド pAH162- P_{phoC} -*mvaES* の構築

pMW- P_{ara} -*mvaES*- T_{irp} を *Ecl136II* と *SaII* で、pAH162- $\lambda attL$ - Tc^R - $\lambda attR^{41}$ を *SphI* と *SaII* で消化した。消化した DNA 断片をそれぞれ Klenow fragment (Thermo Fisher Scientific 社) により平滑化し、T4 DNA ligase (New England Biolabs 社) により連結することで pAH162-*mvaES* を構築した。次に、*I-SceI*、*XhoI*、*PstI*、*SphI* 認識配列を含む二本鎖 DNA 断片を、プライマー Linker-F と Linker-R のアニーリングにより調整し、T4 polynucleotide kinase により 5'末端をリン酸化した。本 DNA 断片を、*HindIII* で消化した pAH162-*mvaES* に T4 DNA ligase を用いて連結し、マルチクローニングサイトが挿入された pAH162-MCS-*mvaES* を得た。*phoC* プロモーター (P_{phoC}) を含む DNA 断片を、AJ13355 株のゲノム DNA を鋳型に、プライマー *phoC5* と *phoC3* を用いた PCR により取得し、これを *XhoI* と *PstI* で消化した。得られた DNA 断片を、pAH162-MCS-*mvaES* の *XhoI/PstI* サイトに T4 DNA ligase を用いて挿入し、*E. coli* PIR2 株 (Invitrogen 社) 内で増幅させることで pAH162- P_{phoC} -*mvaES* を構築した (Fig. 2.2)。

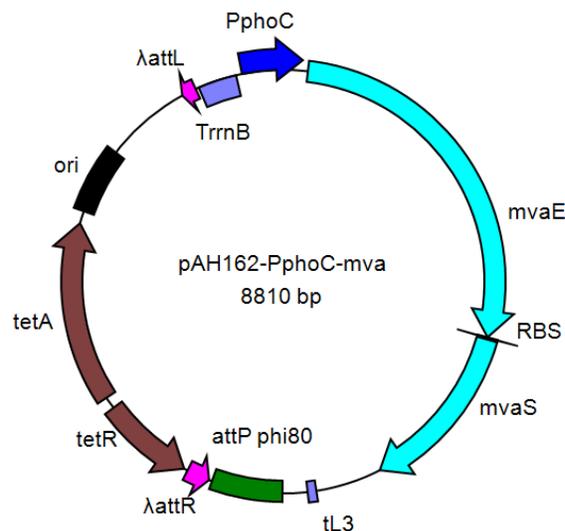


Figure 2.2 Map of pAH162- P_{phoC} -*mvaES*. This plasmid is used for molecular cloning of the genes of interest via $\phi 80$ -Int-dependent integration in bacterial chromosome, which is followed by λ -Int/Xis-dependent excision of the selective marker-carrier vector part. ori; conditionally replicative origin, tetA: Tn10-encoded tetracycline resistance gene, tetR: tetracycline repressor gene, RBS: ribosome binding site.

2-2-8. SC17(0) $\Delta L\text{-}ldh::\phi 80attB$ 株の構築

pMWattphi⁴¹ を鋳型にして、プライマーLdh-F と Ldh-R を用いた PCR により、Km 耐性遺伝子 (*kan*) の両末端に $\phi 80$ ファージ由来の *attL* 及び *attR* 配列が付与され、更にその両外側に *L-ldh* 遺伝子 (locus tag PAJ_p0276) の相同領域の配列が付加した DNA 断片を取得した。次に、SC17(0)/pRSFRedTER 株のコンピテントセルを以下の手順で作成した。Cm 含有 LB 寒天培地上で生育させた菌体を回収し、Cm 含有 LB 液体培地を含む試験管で一晩前培養した。坂口フラスコに Cm 含有 LB 液体培地 50 mL を張込み、前培養液を 1 mL 接種し 1 時間培養した。次に、IPTG 溶液を最終濃度 1 mM になるように添加し、OD₆₆₀ 値が 0.5~0.7 に達するまで培養を行った。この培養液を 4°C で 5 分間遠心分離 (6,400 × g) して菌体を回収し、氷冷した滅菌水 15 mL で同様の遠心集菌操作を繰り返して菌体を洗浄した。次に、氷冷 10% グリセロール 15 mL を用いて、同様の遠心集菌操作による菌体洗浄を 2 回実施した。得られた洗浄菌体を 200 μ L の 10% グリセロールに再懸濁し、エレクトロコンピテントセルとした。

コンピテントセル液 80 μ L に、前記で調製した PCR 産物約 600 ng を混和し、エレクトロポレーションした。形質転換後の菌体に 1 mL の SOC 培地を添加し、2 時間培養した培養液全量を Km 含有 LB 寒天培地に撒布して 1 晩培養し、コロニー-PCR で目的遺伝子座にフラグメントが導入されたコロニーを選抜した。次に、pRSFRedTER を脱落させる為、得られた菌株を 10% スクローズと 1 mM IPTG を含む LB 寒天培地で一晩培養し、幾つかのシングルコロニーを Cm 含有 LB 寒天培地、Km 含有 LB 寒天培地両方に接種し、Cm 感受性で Km 耐性を示した株を SC17(0) $\Delta L\text{-}ldh::\phi 80attL\text{-}kan\text{-}\phi 80attR$ 株とした。

SC17(0) $\Delta L\text{-}ldh::\phi 80attL\text{-}kan\text{-}\phi 80attR$ 株からの *kan* 遺伝子の除去は以下の様に実施した。Km 含有 LB 寒天培地上で一晩培養した菌体を回収し、2-2-6 記載の方法でコンピテントセル液を調製した。コンピテントセル液 80 μ L と、 $\phi 80int$ 及び $\phi 80xis$ 遺伝子を発現するためのプラスミド pAH129-cat³⁴ 200 ng を混和し、エレクトロポレーションした。菌体懸濁液に SOC 培地 1 mL を加え、37°C で 2 時間振盪培養を行い、42°C で更に 1 時間培養を行った。培養液適量を Cm 含有 LB 寒天培地に塗布し、30°C で一晩静置して出現した Cm 耐性かつ Km 感受性コロニーを SC17(0) $\Delta L\text{-}ldh::\phi 80attB/pAH129\text{-}cat$ 株とした。続いてプレート上の菌株を回収し、1 mL の LB 培地を含む試験管で 3 時間培養し、温度感受性発現プラスミド pAH129-cat を除去する

ため、42°Cで更に1時間培養した。その一部をLB寒天培地に播種し、1晩静置培養して出現したコロニーのCm耐性をCm含有LBプレートで確認し、Cm感受性株をSC17(0) $\Delta L\text{-}ldh::\phi 80attB$ 株として選抜した。

2-2-9. SC17(0) $\Delta ampH::\phi 80attB$ 株の構築

kan 遺伝子の両末端に $\phi 80$ ファージ由来の *attL* 及び *attR* 配列が付与され、更にその両外側に *ampH* 遺伝子 (locus tag: PAJ_2071) の相同領域の配列 40 bp を付加した遺伝子断片を、pMWattphi を鋳型にしてプライマー ampHattLphi80 と ampHattRphi80 を用いた PCR により取得した。その後は、2-2-8 と同様の手順で SC17(0) $\Delta ampH::\phi 80attB$ 株を取得した。

2-2-10. SC17 (0) $\Delta L\text{-}ldh::\phi 80attB$ 株と SC17(0) $\Delta ampH::\phi 80attB$ 株の染色体への pAH162- $P_{phoC}\text{-}mvaES$ の導入

2-2-6 記載の方法で SC17(0) $\Delta L\text{-}ldh::\phi 80attB$ 株と SC17(0) $\Delta ampH::\phi 80attB$ 株に pAH123-cat ($\phi 80int$ 遺伝子発現プラスミド)³⁴ を導入した。得られた pAH123-cat 保有株のコンピテントセル液を 2-2-8 記載の方法で調整し、それぞれのコンピテントセル液 80 μL に CRIM プラスミド pAH162- $P_{phoC}\text{-}mvaES$ 100~200 μg (液量 1~2 μl) を混和し、エレクトロポレーションした。ここに 1 mL の SOC 培地を添加し、37°C で 2 時間、更に 42°C で 1 時間回復培養を行った後、培養液の一部を Tet と Cm を含む LB 寒天培地に塗布し、37°C で 1 晩培養した。出現したコロニーのコロニー PCR を行い、 $\phi 80attB$ サイトに pAH162- $P_{phoC}\text{-}mvaES$ が導入された株を選抜した。LB 寒天培地上に生育した SC17(0) $\Delta L\text{-}ldh::pAH162\text{-}P_{phoC}\text{-}mvaES/pAH123\text{-}cat$ 株、SC17(0) $\Delta ampH::pAH162\text{-}P_{phoC}\text{-}mvaES/pAH123\text{-}cat$ 株の菌体をそれぞれ 1 mL の LB 培地を含む試験管で 3 時間培養した後、温度感受性発現プラスミドである pAH123-cat を除去するため 42°C で 1 時間更に培養した。培養液の一部を LB 寒天培地に撒布し、得られた Cm 感受性コロニーを SC17(0) $\Delta L\text{-}ldh::pAH162\text{-}P_{phoC}\text{-}mvaES$ 株、SC17(0) $\Delta ampH::pAH162\text{-}P_{phoC}\text{-}mvaES$ 株 (PMVA-1 株) として取得した。

2-2-11. PMVA-1 株の染色体上の薬剤マーカー遺伝子除去

PMVA-1 株の染色体上から pAH162 由来の薬剤マーカーとベクター由来の配列除くため、2-2-6 記載の方法で λ int/ λ xis 遺伝子発現プラスミド pRSF-P_{ara}-IX⁴² を PMVA-1 株に導入した。Cm 含有 LB 寒天培地で生えてきた数コロニーを、Cm と 0.2 M アラビノースを含む LB 寒天培地に接種し、一晩培養することでシングルコロニーアイソレーション (SI) を行った。SI した株を Tet 含有 LB 寒天培地と Cm 含有 LB 寒天培地上にそれぞれ撒布して一晩培養し、Cm 耐性且つ Tet 感受性の株を選抜した。次に pRSF-P_{ara}-IX を除くため、10% スクロースと 1 mM IPTG を含む LB 寒天培地で一晩培養し、再度シングルコロニーを取得した。純化されたシングルコロニーを LB 寒天培地、Tet 含有 LB 寒天培地、Cm 含有 LB 寒天培地計 3 枚に接種して一晩培養し、Cm、Tet 感受性株を示したコロニーを選抜し、SC17(0) Δ ampH::P_{phoC}-mvaES 株とした。

2-2-12. 断片化ゲノム DNA の調製

SC17(0) Δ L-ldh::pAH162-P_{phoC}-mvaES 株のゲノム断片を以下のように調製した。本菌株を Tet 含有 LB 寒天培地上に塗布し、一晩培養した。1/5 エーゼ (Nunc、ループ容積 10 μ L) 分の菌体を寒天培地より掻き取り、Bacterial Genomic DNA Purification Kit (EdgeBioSystem 社) 付属の Spheroplast Buffer 0.4 mL に懸濁し、RNase A (QIAGEN 社) を 8 μ L を添加して vortex 処理にてよく混合した後、37°C にて 10 分間保温した。続いて、上記キット付属の Lysis Buffer 1 100 μ L を添加し、3 回転倒混和した。続いて Lysis Buffer 2 100 μ L を添加し、同様に転倒混和した後、65°C で 5 分間保温した。ここに上記キット付属の Extraction Buffer 0.1 mL を添加し、vortex にて 10 秒間混合した。これを 21,600 \times g で 3 分間遠心して得られた上清に Advamax 2 Beads 0.1 mL を加え、vortex にて激しく 1 分間混和した。これを 21,600 \times g で 3 分間遠心して得られた上清液と Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System (Promega 社) の Wizard[®] Minipreps DNA Purification Resin 1 mL を混和した。Wizard[®] Minicolumns とシリンジを接続し、システム専用のバキュームマニフォールドにセットした後、上清とレジン混合液をシリンジに添加して真空ポンプで吸引した。続いて付属の Column Wash Solution 2 mL にて 2 回洗浄した。Wizard[®] Minicolumns をシリンジより外し、1.5 mL 容マイクロチューブに入れて 16,200 \times g で 2 分間遠心した。新しいチューブに Wizard[®] Minicolumns をセットし、65°C にて保温した滅

菌水 30 μL をカラムに滴下し、1 分間室温にて静置した。続いて 16,200 $\times g$ で 2 分間遠心し、ゲノム容液を回収した。

2-2-13. *P. ananatis* の断片化ゲノム DNA を用いた形質転換

既報³³ 記載のプロトコールを参照して実施した。SC17(0) $\Delta amp^H::P_{phoC}\text{-}mvaES$ 株を LB 寒天培地全面に塗布し、一晚培養した。寒天培地に生育した菌体を全て掻き取り、氷冷した滅菌水 20 mL に懸濁して洗浄した。6,400 $\times g$ で 5 分間遠心して菌体を回収し、氷冷した 10% グリセロール 10 mL に懸濁して洗浄した。6,400 $\times g$ で 5 分間遠心して菌体を回収し、再度氷冷した 10% グリセロール 5 mL に懸濁して洗浄し、1.5 mL 容マイクロチューブ 4 本に分注後、16,200 $\times g$ で 3 分間遠心した。回収した菌体は氷冷した 10% グリセロール 1 mL に懸濁して再洗浄し、16,200 $\times g$ で 3 分間遠心して菌体を回収した。これを氷冷した 10% グリセロール 0.2 mL に懸濁し、コンピテントセル液とした。コンピテントセル液 80 μL と、SC17(0) $\Delta L\text{-}ldh::pAH162\text{-}P_{phoC}\text{-}mvaES$ 株ゲノム断片 600 ng を 1 mm キュベットに入れて混和し、エレクトロポレーションした。これに SOC 培地 1 mL を添加し、2 時間回復培養を行った。回復培養液を適量 Tet 含有 LB 寒天培地上に塗布して 1 日培養し、SC17(0) $\Delta amp^H::P_{phoC}\text{-}mvaES \Delta L\text{-}ldh::pAH162\text{-}P_{phoC}\text{-}mvaES$ 株 (PMVA-2 株) を取得した。

2-2-14. 試験管を用いた MVA 発酵

SC17(0)/PhoB-*mvaES* 株、SC17(0)/pPhoC-*mvaES* 株、SC17(0)/pPhoH-*mvaES* 株、SC17(0)/pPstS-*mvaES*、SC17(0)/pUgpB-*mvaES* 株をそれぞれ Km 含有 LB 寒天培地上で 16 時間培養した。あらかじめ乾熱滅菌した 0.1 g の CaCO_3 と 5 mL の MS-KP 培地 (45 g/L glucose, 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g/L Bacto yeast extract [BD Biosciences 社], 0.3 or 5.0 g/L KH_2PO_4 , 20 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 50 mg/L Km) を含む試験管 (Diameter, 25 mm; Length, 200 mm; Thickness, 1.2 mm) に、寒天培地上のシングルコロニーをエーゼ (Nunc、ループ容積 1 μL) で植菌し、30°C で 24 時間往復振盪培養を行った (120 rpm)。Glc は $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ と共にオートクレーブ殺菌し (121°C、20 分)、その他の培地成分は水酸化カリウム (KOH) で pH を 7.0 に調整後 115°C、10 分の条件でオートクレーブ殺菌した。

2-2-15. PMVA-1 株、PMVA-2 株の試験管を用いた MVA 発酵

各菌株を Tet 含有 LB プレートに均一に塗布し、16 時間培養した。寒天培地から1~2 白金耳分の菌体を、あらかじめ乾熱滅菌した 0.1 g の CaCO₃と 4 mL の MS-KP_0.1 培地(40 g/L glucose, 1 g/L MgSO₄·7H₂O, 2 g/L Bacto yeast extract, 0.1 g/L KH₂PO₄, 20 g/L (NH₄)₂SO₄, 10 mg/L MnSO₄·5H₂O, 10 mg/L FeSO₄·7H₂O and 10 mg/L Tet)を含む試験管 (Diameter, 25 mm; Length, 200 mm; Thickness, 1.2 mm)に植菌し、30°Cで 24 時間往復振盪培養を行った(120 rpm)。培地の殺菌は前項 2-2-14 記載の方法に従った。

2-2-16. 各種分析

培地中の Glc 濃度はバイオセンサーBF-5(王子計測機器社)を用いて測定した。試験管培養液中の CaCO₃を除去するため 0.1 M HCl により適宜希釈し、その OD₆₀₀ 値を U-2900 spectrometer(日立ハイテクサイエンス社)にて分析した。試験管培養液を遠心(21,600 × g, 5 分, 4°C)して得られた培養液上清を超純水で希釈後、Mini-Uniprep™(GE Healthcare 社)に移し、液体クロマトグラフ質量分析計 LC-MS-2020 (Shimadzu 社)を用いて MVA 濃度を測定した。MVA 標準試料(10、40、80 mg/L)はメバロノラクトン(ADEKA 社)から、既報記載の方法⁴³で調製した。標準試料の濃度とピーク面積を用いて検量線を作成し、分析試料の MVA 濃度を求めた。詳細な分析条件を以下に示す。

<LC 分析条件>

カラム: phenomenex Synergi 4μ Hydro-RP 80A 150x2.00 mm、ガードカラム: phenomenex

LC 終了時間: 10 分、移動相: 0.1% ギ酸水、流量: 0.2 mL/分、カラム温度: 40°C、Injection volume: 10 μL

<MS 分析条件>イオン化モード: ESI(ポジティブモード)、ESI(ネガティブモード)

測定時間: 10 分、ネプライザーガス(N₂)流量: 1.5 L/min.、ドライイングガス(N₂)流量: 10 L/min.

インターフェイス電圧: チューニングファイル、DL 電圧: 0 V(固定)、DL 温度: 250°C

ブロックヒーター温度: 200°C、Q-array DC: 固定(0V)、Q-array RF: チューニングファイル

分析モード: SIM モニターイオン 147/149 m/z、129/131 m/z

Table 1.1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Description	Antibiotic resistance*	Source or reference
Strain			
<i>E. coli</i> JM109	Competent cells for plasmid cloning	-	Takara Bio
<i>E. coli</i> PIR2	F-, $\Delta lac169$, <i>rpoS</i> (am), <i>robA1</i> , <i>creC510</i> , <i>hsdR514</i> , <i>endA</i> , <i>recA1</i> , <i>uidA</i> ($\Delta Mlu I$): <i>pir</i>	-	Invitrogen
<i>P. ananatis</i> SC17(0)	λ Red resistant strain	-	³³
SC17(0) $\Delta ampH::\phi 80attB$	SC17(0) $\Delta ampH::\phi 80attB$	-	This study
SC17(0) $\Delta L-ldh::\phi 80attB$	SC17(0) $\Delta L-ldh::\phi 80attB$	-	This study
PMVA-1	SC17(0) $\Delta ampH::pAH162-P_{phoC-mvaES}$	Tet	This study
SC17(0) $\Delta L-ldh::pAH162-P_{phoC-mvaES}$	SC17(0) $\Delta L-ldh::pAH162-P_{phoC-mvaES}$	Tet	This study
SC17(0) $\Delta ampH::P_{phoC-mvaES}$	SC17(0) $\Delta ampH::P_{phoC-mvaES}$	-	This study
PMVA-2	SC17(0) $\Delta ampH::P_{phoC-mvaES} \Delta L-ldh::pAH162-P_{phoC-mvaES}$	Tet	This study
Plasmid			
pMW- $P_{ara-mvaES-T_{trp}}$	<i>mvaES</i> (<i>E. faecalis</i>) expression plasmid	Km	GenBank No. LP790601
pPhoB- <i>mvaES</i>	Plasmid expressing <i>mvaES</i> under the control of the <i>phoB</i> promoter	Km	This study
pPhoC- <i>mvaES</i>	Plasmid expressing <i>mvaES</i> under the control of the <i>phoC</i> promoter	Km	This study
pPhoH- <i>mvaES</i>	Plasmid expressing <i>mvaES</i> under the control of the <i>phoH</i> promoter	Km	This study
pPstS- <i>mvaES</i>	Plasmid expressing <i>mvaES</i> under the control of the <i>pstS</i> promoter	Km	This study
pUgpB- <i>mvaES</i>	Plasmid expressing <i>mvaES</i> under the control of the <i>ugpB</i> promoter	Km	This study
pAH162- $\lambda attL$ -Tc ^R - $\lambda attR$	CRIM plasmid [†]	Tet	⁴¹
pAH162- <i>mvaES</i>	<i>mvaES</i> cloned into pAH162- $\lambda attL$ -Tc ^R - $\lambda attR$	Tet	This study
pAH162-MCS- <i>mvaES</i>	pAH162- <i>mvaES</i> derivative containing engineered multiple cloning site	Tet	This study
pAH162- $P_{phoC-mvaES}$	<i>mvaES</i> under the control of the <i>phoC</i> promoter in pAH162-MCS- <i>mvaES</i>	Tet	This study

pMWattphi	ϕ 80attL-Km ^R - ϕ 80attR cassette donor	Amp, Km	41
pRSFredTER	λ Red expressing plasmid	Cm	33
pAH129-cat	ϕ 80Int/Xis expression plasmid [‡]	Cm	34
pAH123-cat	ϕ 80Int expression plasmid	Cm	34
pRSF-P _{ara} -IX	λ Xis/Int expression plasmid	Cm	42

*Amp, ampicillin; Cm, chloramphenicol; Km, kanamycin; Tet, tetracycline.

[†]CRIM plasmid, conditional replication, integration, and modular plasmid.

[‡]Int, gene encoding integrase; Xis, gene encoding excisionase.

Table 1.2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5' to 3')
0278F	AAAACGACGGCCAGTGCCAAATCGATTTGCCCGGCAATTATA
0278R	AACCACGGTTTTTCATTATGCGTCAGTTTTGTGACACTTTTTATGA
0425F	AAAACGACGGCCAGTTGGATAACCTCATGTAAACATCCCTT
0425R	AACCACGGTTTTTCATTATTATTCCTTTGATGTCTGATTATCTCTG
1561F	AAAACGACGGCCAGTTTAAATTTTAATCACGGCATTCTGTGCCTG
1561R	AACCACGGTTTTTCATAGTGGCACCTTACAGTTGGTTTCATTTCCTCCGCTCA
3196F	AAAACGACGGCCAGTAGCCTCTCACGCGTGAATCCCACCAG
3196R	AACCACGGTTTTTCATGTTCCCTCCAGGGGAGAAAAGTCAGGC
2939F	AAAACGACGGCCAGTCTTTCTGGCCTGACGTTCTGCCAGGCCAG
2939R	AACCACGGTTTTTCATAGAATTTTCCTGTTACGGTAGGTACGCGCGT
pMW-mvaESF	ATGAAAACCGTGGTTATTATCGATGCGCTG
pMW-mvaESR	ACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTG
Linker-F	AGCTTTAGGGATAACAGGGTAATCTCGAGCTGCAGGCATGCA
Linker-R	AGCTTGCATGCCTGCAGCTCGAGATTACCCTGTTATCCCTAA
phoC5	TTTTTAAGCTTTAGGGATAACAGGGTAATCTCGAGTGGATAACCTCATGTAAAC
phoC3	TTTTTAAGCTTGCATGCCTGCAGTTGATGTCTGATTATCTCTGA
ampHattLphi80	ATGCGCACTCCTTACGTACTGGCTCTACTGGTTTCTTTGCGAAAGGTCATTTTTCTGAATATGCTCACA
ampHattRphi80	TTAAGGAATCGCCTGGACCATCATCGGCGAGCCGTTCTGACGTTTGTGACAGCTGGTCCAATG
Ldh-F	TTCTGTATTAGACCGTCTACCTGATTCTATTAATAAGGAAAAGATAAAAGAAAGGTCATTTTTCTGAATAT GCTCACA
Ldh-R	ACAGCGCCACCTCGCCCGTTATCAGCCTGAAGAGAGTACAGCTCAAAAAGGTCGTTTGTGACAGCTGGTCC AATG

2-3. 結果と考察

2-3-1. *P. ananatis* 内在性の P_i 欠乏誘導性プロモーターの探索

多くのバクテリアでは、膜結合型のセンサーキナーゼと遺伝子発現制御を行うレギュレータータンパク質から成る菌体外の P_i 感知システムを有している。その代表例として知られるのが、*E. coli* など古くから研究されている PhoR-PhoB 二成分制御系である⁴⁰。培地中の P_i 枯渇を感知すると、センサーキナーゼ PhoR によってリン酸化(活性化)された PhoB は、リン酸レギュロンのプロモーター領域に結合し、これらの遺伝子発現を活性化する。ここではまず、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) による相同性検索により、AJ13355 株が PhoR-PhoB 二成分制御系を有しているか確認した。AJ13355 株のゲノム(GenBank No. AP012032)に存在する PhoR (locus tag: PAJ_0279) および PhoB は、*E. coli* K-12 MG1655 株のオーソログに対してそれぞれ 73、90%のアミノ酸相同性を示したことから、*E. coli* と同様に *P. ananatis* が細胞外の P_i 濃度を感知するシステムとして PhoB-PhoR 二成分制御系を有していることが示された。*E. coli* のリン酸レギュロンのプロモーター領域には、リン酸化された PhoB が結合する *pho* ボックス(5'-CT[G/T]TCATA[A/T]A[T/A]CTGTCA[C/T]-3')と呼ばれる領域が共通して存在している⁴⁴。*E. coli* の *eda*, *phnCDEFGHIJKLMNOP*, *phoA*, *phoBR*, *phoE*, *phoH*, *psiE* *pstSCAB-phoU*, *ugpBAECQ* といった遺伝子・オペロンは、プロモーター領域に *pho* ボックスが存在し、PhoR-PhoB により直接制御される⁴⁰。そこで、AJ13355 株のゲノム情報から、PhoB により直接発現調節される遺伝子を探索するため、上記した 9 つの候補遺伝子のオーソログが存在するかを確認し、それらのプロモーター領域に *pho* ボックスが存在するかを確認した。その結果、*phoB*、*phoH*、*pstS* および *ugpB* 遺伝子の ORF 上流領域が、それぞれ対応する *E. coli* のオーソログの ORF 上流領域に対して相同性を示し、且つ *pho* ボックス様配列を含むことが確認された (Table 2.3)。また、*E. coli* にはオーソログが存在しない酸性ホスファターゼ (major phosphate-irrepressible acid phosphatase precursor) をコードする *phoC* 遺伝子のプロモーター領域にも *pho* ボックス様配列が存在した (Table 2.3)。これらの結果から、 P_{phoB} 、 P_{phoC} 、 P_{phoH} 、 P_{pstS} 及び P_{ugpB} を P_i 欠乏誘導性プロモーターの候補として抽出した。

Table 2.3 Comparison of *Pho* boxes in *E. coli* MG1655 and *P. ananatis* AJ13355

Gene symbol	<i>E. coli</i> MG1655		Reference	<i>P. ananatis</i> AJ13355	
	Locus tag	<i>Pho</i> boxes		Locus tag	Putative <i>Pho</i> boxes
<i>phoB</i>	b0399	5'-TTTTTCATAAATCTGTCAT-3'	44	PAJ_0278	5'-TTTTTCATAAAAAGTGTCAC-3'
<i>phoC</i>	–		–	PAJ_0425	5'-CTGAAATAAAAATGTCAT-3'
<i>phoH</i>	b1020	5'-CTGTCATCACTCTGTCAT-3'	45	PAJ_1561	5'-CTGTAATACTTGC GTAAT-3'
<i>pstS</i>	b3728	5'-CTGTCATAAAACTGTCAT-3'	44	PAJ_3196	5'-CTGTCATATAACTGTAAT-3'
		5'-CTTACATATAACTGTCACC-3'			5'-ACTACATTTTTCTGTCAC-3'
<i>ugpB</i>	b3453	5'-TTGTCATCTTTCTGACAC-3'	46	PAJ_2939	5'-CTGTCATC-TTCTGACAT-3'
		5'-CTATCTTACAAATGTAAC-3'			5'-AAGTTATTTTTCTGTAAT-3'

2-3-2. MVA 発酵による P_i 欠乏誘導性プロモーターの選抜

MVA 経路の中間代謝物はリン酸化合物が主であり、唯一有機酸である MVA のみ排出単体を介して細胞外に排出されることが期待される。よって、MVA 発酵による MVA 蓄積量の評価を行うことで、従来 TCA 回路へと流れていたアセチル-CoA が、 P_i 枯渇に応答してどの程度 MVA 経路へと分配されたか評価できると考えられた。*E. faecalis* 由来の MvaE (GenBank No. AAG02439) と MvaS (GenBank No. AAG02438) は、アセチル-CoA からアセトアセチル-CoA、HMG-CoA を経て MVA に至る 3 つの反応を触媒する酵素であり、それぞれの酵素特性が明らかとなっている^{47, 48}。そこで、前項 2-3-1 で抽出した各種プロモーター支配下で *mvaES* オペロンを発現する菌株を構築し、 P_i が充足した条件、培養途中から枯渇する条件それぞれでの MVA 生産量を評価することで各種プロモーターの発現強度を評価した。

前項 2-2-5 記載の方法で、*mvaES* オペロンを各種プロモーター支配下で発現させるためのプラスミド (pPhoB-*mvaES*, pPhoC-*mvaES*, pPhoH-*mvaES*, pPstS-*mvaES*, pUgpB-*mvaES*) を構築し、*P. ananatis* SC17(0) 株に導入することで MVA 生産菌株を取得した。これらを P_i が培養途中から枯渇する条件 (初発 KH_2PO_4 : 0.3 g/L) 及び P_i 充足条件 (初発 KH_2PO_4 : 5.0 g/L) で 1 日往復振盪培養した結果を Table 2.4 に示す。いずれの菌株も培養 24 時間以内に培地中の Glc 45 g/L を全て消費し、培養液中の菌体濃度の指標となる OD_{600} 値は約 21 と、ほぼ同等であった。MVA 蓄積は SC17(0)/pPhoB-*mvaES* 株を除いて、評価したいずれの菌株においても P_i 枯渇条件で P_i 充足条件よりも高い結果となった。 P_i 枯渇条件で SC17(0)/pPstS-*mvaES* 株、SC17(0)/pPhoH-*mvaES* 株、SC17(0)/pUgpB-*mvaES* 株、SC17(0)/pPhoC-*mvaES* 株はそれぞれ 12.0 ± 1.0 g/L、 10.0 ± 1.1 g/L、 10.0 ± 0.9 g/L、 8.6 ± 0.2 g/L の MVA を蓄積し、消費した Glc からの重量収率はそれぞれ $28\% \pm 2.3\%$ 、 $23\% \pm 2.6\%$ 、 $23\% \pm 2.2\%$ 、 $19\% \pm 0.6\%$ に相当した。この結果から、 P_{phoC} 、 P_{phoH} 、 P_{pstS} 、 P_{ugpB} が P_i 欠乏条件下で *mvaES* オペロンの発現を誘導していることが示された。評価した菌株のなかでも特に SC17(0)/pPhoC-*mvaES* 株、SC17(0)/pPstS-*mvaES* 株は、 P_i 充足条件で MVA 生産量が低く (<0.1 g/L)、 P_{phoC} と P_{pstS} は P_i 充足条件下で *mvaES* オペロンを強く抑制していると推察された。本特性は、菌体増殖期と物質生産期を切り分ける上で望ましく、 P_{phoC} と P_{pstS} をテルペノイド生産菌株構築に用いる P_i 欠乏誘導性プロモーターとして選択した。

Table 2.4 Test-tube MVA fermentation profiles

Strain/plasmid	KH ₂ PO ₄ concentration in medium (g/L)	Glucose consumption (g/L)	MVA titer (g/L)	MVA yield ^a (% [w/w])	Cell density (OD ₆₀₀)
SC17(0)/pMW219	5.0	45 ± 0.0 ^b	ND ^c	—	21 ± 0.3
SC17(0)/pMW219	0.3	44 ± 0.0	ND	—	22 ± 1.1
SC17(0)/pPhoB- <i>mvaES</i>	5.0	45 ± 0.0	ND	—	21 ± 0.4
SC17(0)/pPhoB- <i>mvaES</i>	0.3	44 ± 0.0	ND	—	20 ± 0.2
SC17(0)/pPhoC- <i>mvaES</i>	5.0	45 ± 0.0	(8.6 ± 0.8) × 10 ⁻¹	1.9 ± 0.2	22 ± 0.1
SC17(0)/pPhoC- <i>mvaES</i>	0.3	44 ± 0.0	8.6 ± 0.2	19 ± 0.6	21 ± 0.9
SC17(0)/pPhoH- <i>mvaES</i>	5.0	45 ± 0.0	1.6 ± 0.1	3.5 ± 0.3	22 ± 0.3
SC17(0)/pPhoH- <i>mvaES</i>	0.3	44 ± 0.0	10 ± 1.1	23 ± 2.6	21 ± 0.5
SC17(0)/pPstS- <i>mvaES</i>	5.0	45 ± 0.0	(3.1 ± 4.3) × 10 ⁻²	(0.7 ± 1.0) × 10 ⁻¹	22 ± 0.2
SC17(0)/pPstS- <i>mvaES</i>	0.3	44 ± 0.0	12 ± 1.0	28 ± 2.3	22 ± 1.2
SC17(0)/pUgpB- <i>mvaES</i>	5.0	45 ± 0.0	2.4 ± 0.3	5.4 ± 0.8	22 ± 0.3
SC17(0)/pUgpB- <i>mvaES</i>	0.3	44 ± 0.0	10 ± 0.9	23 ± 2.2	19 ± 0.2

^aYield was calculated as gram of product per gram of consumed glucose and is expressed as a percentage.

^bData are expressed as mean ± SD of three independent experiments.

^cND, not detected.

2-3-3. MVA 経路上流遺伝子の染色体への固定と MVA 発酵

SC17(0)/pPhoC-*mvaES* 株、SC17(0)/pPstS-*mvaES* 株の MVA 重量収率は理論収率 (54.8%^{w/w})⁴⁹ の 35~51%に達した。しかしながら、プラスミドベースの菌株を商業スケールでの発酵で使用すると、プラスミド保持のための薬剤添加に伴う原料コスト増加以外にも様々な課題が生じる。プラスミドに搭載する目的の遺伝子や薬剤耐性遺伝子の複製と過剰発現は細胞に余分な負荷をもたらし、栄養素やエネルギーの無駄な消費に繋がる。また、複数遺伝子を搭載することによるプラスミドサイズの増大は、プラスミドからの遺伝子の脱落を引き起こしやすい。そのため、目的の遺伝子が宿主微生物の染色体上に導入された、より遺伝的安定性の高い菌株を使用することが望ましい。そこで、 P_{phoC} 支配下で *mvaES* オペロンを発現させる遺伝子カセット (P_{phoC} -*mvaES*) を Dual-In/Out 法⁴¹により SC17(0)株の染色体上に 1 コピー、もしくは 2 コピー導入したプラスミドレスの MVA 生産菌株、PMVA-1 株、PMVA-2 株を構築した。Minaeva らにより考案された Dual-In/Out 法は、ゲノム上の任意のローカスにまず $\phi 80$ ファージの attachment site ($\phi 80attB$) を構築し、CRIM プラスミドにクローニングした遺伝子を導入する手法である。本手法では目的の遺伝子カセットをプラスミドで導入するため、PCR 産物やゲノムを導入するより形質転換効率も良く、オペロンのようなサイズの大きな DNA カセットの導入に優れている⁴¹。

培地中の Glc、 KH_2PO_4 濃度をそれぞれ 40、0.1 g/L とした P_i 枯渇条件で両菌株を試験管培養した結果を Table 2.5 に示す。*mvaES* オペロン発現カセットを 1 コピー染色体上に導入した PMVA-1 株は、培養 24 時間で全ての Glc を消費し、 5.8 ± 0.1 g/L の MVA を生産した。発現カセットを 2 コピー導入した PMVA-2 株は 7.6 ± 0.0 g/L の MVA を蓄積し、PMVA-1 株と比べて MVA 生産量が 1.3 倍に増加した。この時の Glc からの重量収率は 19%^{w/w} に相当した。培養条件は異なるものの、本収率は、SC17(0)/pPhoC-*mvaES* 株が前項 2-3-2 で示した値と同程度であった。テルペノイド生産菌株を今後構築していく上で、MVA 経路上流遺伝子と共に MVA 路下流の遺伝子群、並びにテルペノイド合成酵素を発現させる必要がある。これら複数の遺伝子を複数のプラスミドに分けて発現させると、プラスミド保持 (遺伝的安定性) の問題や、同じ複製起点を有するプラスミドの不和合性に起因する使用可能なプラスミドの制限といった課題に直面する。しかしながら、PMVA-2 株が SC17(0)/pPhoC-*mvaES* 株と同程度の MVA 生産能を持つことが示されたため、基本的には MVA 経路

関連遺伝子の発現にはプラスミドを用いず、遺伝子カセットを染色体に組み込むこととした。

Table 2.5 Result of Test-tube MVA fermentation

Strain	OD ₆₀₀	MVA (g/L)	Yield (% ^{-w/w})
PMVA-1	13.9 ± 0.4	5.8 ± 0.1	14.5
PMVA-2	14.2 ± 0.3	7.6 ± 0.0	19

The values represent means obtained from duplicates.

2-4. 結言

高価な誘導剤の添加や煩雑なオペレーションを必要とせずに、培地中の P_i 依存的に菌体増殖期と物質生産期を分ける dual-phase 発酵プロセスを本研究では採用することとした。本章ではその為に必要な DNA パーツ、*P. ananatis* 内在性の P_i 飢餓誘導性プロモーターの探索と選抜を行った。その結果、 P_i 充足条件下では低い基底発現活性を示し、且つ P_i 欠乏条件下で高い誘導性を示すプロモーターとして、 P_{phoC} 、 P_{pstS} を抽出した。異種タンパク質の過剰発現や MVA 経路の代謝中間物の過剰蓄積は宿主細胞にストレスを与える可能性があることから、基底発現が低いと予想される P_{phoC} 、 P_{pstS} の特性は、菌体増殖期と物質生産期をより明確に分離する上で望ましい。また、 P_{phoC} 支配下で *mvaES* オペロンを発現する DNA コンストラクトを染色体上に固定した PMVA-2 株の培養結果を踏まえ、MVA 経路関連遺伝子の発現にはプラスミドを使用せず、基本的には目的遺伝子を染色体上に固定することでテルペノイド生産菌株を構築することとした。

3 章 イソプレン生産による P_i 依存的 dual-phase テルペノイド発酵プロセスの実証実験

3-1. 緒言

ヘミテルペンであるイソプレン(2-メチル-1,3-ブタジエン)は、細胞代謝産物としては 1957 年に初めて Guivi A. Sanadze らによって発見された。イソプレンは、MVA 経路あるいは MEP 経路から供給される DMAPP がイソプレンシンターゼにより脱リン酸化されることで生成され、テルペノイド化合物の中でも最も単純な構造を示す。現在、イソプレンは主に原油のクラッキングにより生じる C5 留分からの抽出法、あるいは化学合成法により生産されており、主にタイヤや塗料用合成ゴムの原料として工業利用されている⁵。全世界のイソプレン生産量はおよそ 70 万トン、cis-1,4-ポリイソプレンからなる天然ゴムの消費量はおよそ 1,000 万トンである。熱帯雨林の森林資源保護の観点から、ゴム農園を新たに作り上げることによる天然ゴムの増産は難しいとされているのに加え、資源価格の変動や需要の増加に対応する為、各タイヤメーカーは持続可能なタイヤ原料の確保に本腰を入れて取り組んでいる。その中で、2008 年に Goodyear 社と Genencor 社により開始された BioisopreneTM 開発⁵に代表される、発酵法によるイソプレン生産が注目を集めた。また、他のテルペノイド発酵に関連する報告も既に多数存在し、MVA キナーゼ、テルペノイド合成酵素(イソプレンシンターゼ)が MVA 経路を介したテルペノイド生合成の律速要因となり易いことが報告されている³⁹⁻⁴³。こうした知見を基に、味の素(株)は味の素-ジェネチカ・リサーチ・インスティテュート社と共に、MVA 経路代謝中間物質からのフィードバック阻害への耐性が高い、*Methanocella paludicola* 由来の MVA キナーゼ(MVK)⁴³を、株式会社ブリヂストンとイソプレンモノマー生産能に優れた *Mucuna pruriens* 由来のイソプレンシンターゼ(IspSM)を同定している⁵⁰。

イソプレンの沸点は 34°C であるため³⁹、微生物により生成されたイソプレンは培地中から速やかに気相へと移行する。そのためイソプレン発酵では生産物の過剰蓄積による宿主細胞への毒性や阻害を考慮しなくてよい。加えて、発酵槽の気相(排ガス)中のイソプレン濃度を *in situ* 測定することで即座にイソプレン生成速度を把握出来ることから、イソプレン発酵は P_i 枯渇応答代謝スイッチの評価、即ち培地中の P_i 枯渇開始と同時に細胞増殖期からテルペノイド生成期へと切り替わる dual-phase 発酵プロセスの成立可否判断を行うのに適し

ている。

そこで本章では、イソプレンを目的物質として P_i 依存的に菌体増殖期から物質生成期を切替わる dual-phase テルペノイド発酵プロセスの実証実験を行った。イソプレンを含む全てのテルペノイドは IPP/DMAPP までの代謝経路は共通であるため、イソプレンで dual-phase 発酵プロセスの成立を確認出来れば、他のテルペノイド化合物の生産にも応用可能と想定される。2 章で抽出した P_i 欠乏誘導性プロモーターを導入した P_i 枯渇応答代謝スイッチを有するテルペノイド生産プラットフォーム菌株を構築すると同時に、構築したイソプレン生産菌株を Glc 流加培養することで、 P_i 依存的 dual-phase テルペノイド発酵プロセスの実現可能性を検証した。

3-2. 実験材料と方法

3-2-1. 検討に用いた培地と培養条件

本文に特に記載のない限り、前項 2-2-1 と同様の材料を用いて実施した。

3-2-2. 遺伝子操作

本文に特に記載のない限り、前項 2-2-2 と同様の材料を用いて実施した。

3-2-3. 使用した菌株、プラスミド、プライマー

本章で使用したプライマーとその塩基配列を Table 3.1 に、本章で使用した菌株とプラスミドを Table 3.2 に纏めた。各菌株にプラスミドを導入した株を、本文ではそれぞれ菌株名/プラスミド名と記載した。

3-2-4. *P. ananatis* へのプラスミド導入

前項 2-2-6 と同様の手法で実施した。

3-2-5. CRIM プラスミド pAH162-Km-P_{tac}-KDyI の構築

pSTV28-P_{tac}-T_{trp} (GenBank No. LQ681407) を鋳型にプライマー tac-Fw と tac-Rv を用いて P_{tac} を含む DNA 断片を PCR で増幅した後、*Hind*III と *Sph*I で消化した。T4 DNA ligase を用いて、この DNA 断片を *Hind*III と *Sph*I で消化した pAH162- λ attL-Tc^R- λ attR に連結し、*E. coli* PIR2 株内で増幅させることで pAH162-P_{tac} を得た。続いて *S. cerevisiae* 由来の 5-ホスホメバロン酸キナーゼ (PMK; NCBI reference sequence: NP_013947)、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ (MVD; NCBI reference sequence: NP_014441) と IPP イソメラーゼ (IDI; NCBI reference sequence: NP_015208) をコードする 3 つの遺伝子を含む人工オペロン (KDyI オペロン; GenBank No. LP928413) を化学合成し、pUC57 にクローニングすることで pUC57-KDyI を得た (ATG Service Gene 社)。pUC57-KDyI を鋳型にプライマー KDyI-Fw と KDyI-Rv で PCR を行い、KDyI オペロンを含む

DNA 断片を取得した。これを *SphI* と *KpnI* で消化した後、*SphI* と *KpnI* で消化した pAH162-*P_{tac}* に連結し、PIR2 株内で増幅させることで pAH162-*P_{tac}*-KDyI を取得した。次に、pAH162-*P_{tac}*-KDyI の薬剤マーカー遺伝子を *kan* 遺伝子に変更するため、*NotI* と *KpnI* で消化した pAH162-*P_{tac}*-KDyI と、pAH162-*Km^{R34}* を *NotI* と *KpnI* で消化することで得た *kan* 遺伝子を含む DNA 断片を連結し、PIR2 株内で増幅させることで pAH162-*Km-P_{tac}*-KDyI を得た。

3-2-6. CRIM プラスミド pAH162-*P_{tac}*-*mvk* の構築

M. paludicola SANAЕ 株の MVA キナーゼ (MVK; GenBank No. BAI61711)⁴³ をコードする遺伝子の塩基配列を化学合成し、pUC57 にクローニングした (pUC57-*mvk*, GenScript 社)。pUC57-*mvk* を鋳型に、プライマー-*mvk*-Fw と *mvk*-Rv を用いて *mvk* 遺伝子を PCR で増幅し、得られた DNA 断片を *PstI* と *KpnI* で消化した。これを *PstI* と *KpnI* で消化した pAH162-*P_{tac}* に連結し、PIR2 株内で増幅させることで pAH162-*P_{tac}*-*mvk* を取得した (Fig. 3.1)。

3-2-7. CRIM プラスミド pAH162-*P_{pstS}*-*mvaES* の構築

AJ13355 株のゲノム DNA を鋳型に、プライマー-*pstS5* と *pstS3* を用いた PCR で *P_{pstS}* を含む DNA 断片を取得した。この DNA 断片を *XhoI* と *PstI* で消化し、*XhoI* と *PstI* で消化した pAH162-MCS-*mvaES* に T4 DNA ligase を用いて連結し、PIR2 株内で増幅させることで pAH162-*P_{pstS}*-*mvaES* を取得した。

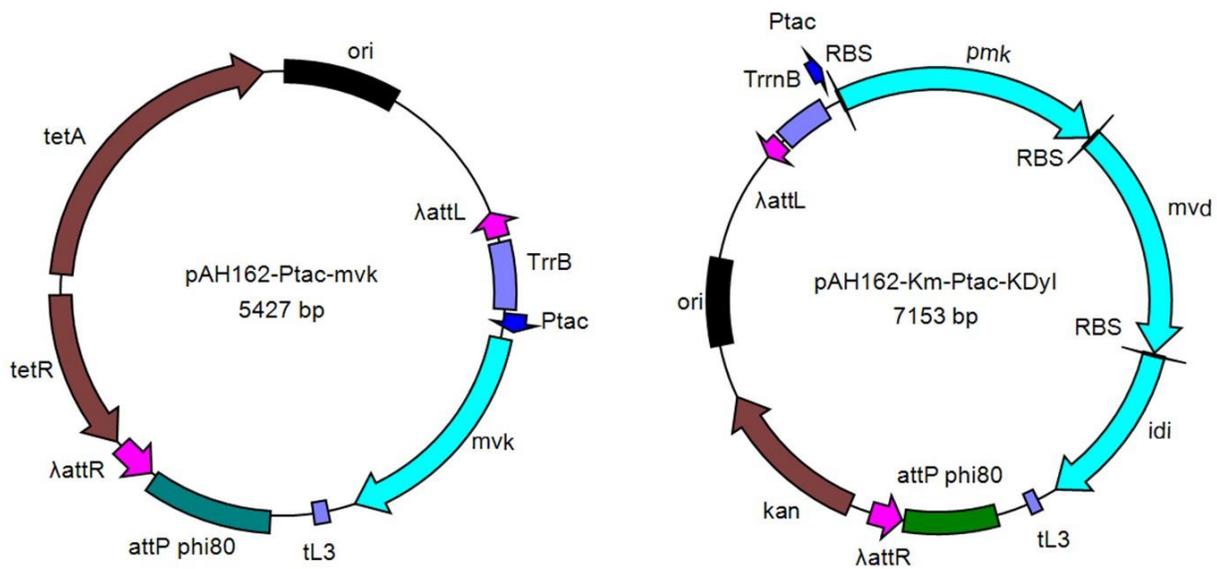


Fig. 3.1 Map of pAH162-*P_{tac}-mvk* and pAH162-Km-*P_{tac}-KDyl*. These plasmids are used for molecular cloning of the genes of interest via ϕ 80-Int-dependent integration in bacterial chromosome, which is followed by λ -Int/Xis-dependent excision of the selective marker-carrier vector part.

3-2-8. SWITCH-PphoC 株と SWITCH-PpstS 株の構築

kan 遺伝子の両末端に ϕ 80 フェージ由来の *attL* 及び *attR* 配列が付与され、更にその両外側に *crtEXYIB-crtZ* オペロン (locus tag: PAJ_p0121~PAJ_p0126) の相同領域の配列を付加した遺伝子断片を、pMWattphi を鋳型にして、プライマー *crtZattLphi80* と *crtEattRphi80* を用いた PCR により取得した。その後は、前項 2-2-8 と同様の操作で SC17(0) Δ *crt::\phi*80*attB* 株を取得した。続いて、前項 2-2-10 と同様の操作で SC17(0) Δ *crt::\phi*80*attB* 株に pAH162-*P_{tac}-mvk* を導入し、SC17(0) Δ *crt::pAH162-P_{tac}-mvk* 株を構築した。並行して、*ampC* 遺伝子座に ϕ 80*attB* を有する SC17(0)- ϕ 80*attB* 株³⁴の *ampH* 遺伝子座に ϕ 80*attB* サイトを構築するため、前項 2-2-9 と同様の操作で SC17(0)- ϕ 80*attB* Δ *ampH::\phi*80*attB* 株を取得した。前項 2-2-12 と同様の操作で SC17(0) Δ *crt::pAH162-P_{tac}-mvk* 株のゲノム DNA を取得し、前項 2-2-13 と同様の操作で Δ *crt::pAH162-P_{tac}-mvk* 領域を SC17(0)- ϕ 80*attB* Δ *ampH::\phi*80*attB* 株のゲノムに導入し、SC17(0)- ϕ 80*attB* Δ *ampH::\phi*80*attB* Δ *crt::pAH162-P_{tac}-mvk* 株を構築した。SC17(0)- ϕ 80*attB* Δ *ampH::\phi*80*attB* Δ *crt::pAH162-P_{tac}-mvk* 株の染色体上から、前項 2-2-11 記載の方法で pAH162 由来の薬剤マーカーとベクター由来の配列とプラスミドを除去し、

SC17(0)- ϕ 80attB Δ ampH:: ϕ 80attB Δ crt:: P_{tac} -mvk 株を取得した。

続いて、前項 2-2-10 と同様の操作で pAH162-Km- P_{tac} -KDyI を導入し、ampH-t1/ampH-t2、ampC-t1/ampC-t2 で示すプライマーの組み合わせでそれぞれコロニー PCR を行い、ampC 遺伝子座に pAH162-Km- P_{tac} -KDyI が導入された株を SC17(0) Δ ampC::P_{tac}-KDyI Δ ampH:: ϕ 80attB Δ crt::P_{tac}-mvk 株とした。更に前項 2-2-10 と同様の操作で pAH162- P_{phoC} -mvaES もしくは pAH162- P_{pstS} -mvaES を導入し、SC17(0) Δ ampC::P_{tac}-KDyI Δ ampH::P_{phoC}-mvaES Δ crtEXYIB-crtZ:: P_{tac} -mvk 株 (SWITCH-PphoC 株) と SC17(0) Δ ampC::P_{tac}-KDyI Δ ampH::P_{pstS}-mvaES Δ crtEXYIB-crtZ:: P_{tac} -mvk 株 (SWITCH-PpstS 株) を取得した。

3-2-9. *M. pruriens* 由来 IspSM 発現用プラスミドの構築

pUC57 に化学合成した *ispSM* 遺伝子 (GenBank No. JE994717) をクローニングしたプラスミド pUC57-*ispSM* (GenScript 社) を鋳型にして、プライマー-*ispSM*-F と *ispSM*-R を用いて PCR を行い、*ispSM* 遺伝子を含む DNA 断片を取得した。並行して pSTV28- P_{tac} - T_{trp} を鋳型にプライマー-pSTV28-F と pSTV28-R を用いて PCR を行った。その後、それぞれの PCR 産物を In-Fusion HD Cloning Kit を用いて連結し、得られた *ispSM* 遺伝子発現用プラスミドを pSTV28- P_{tac} - ϕ 10-*ispSM* (pIspSM) とした。

3-2-10. 密閉バイアル瓶を用いたイソブレン発酵生産

培養する菌株を Cm 含有 LB 寒天培地上に塗布し、16 時間培養した。寒天培地に生育した菌体を、22 mL Crimp Top vial (Perkin Elmer 社) に張り込んだ 1 mL MS-MES 培地 (4 g/L glucose, 1 g/L MgSO₄·7H₂O, 50 mg/L Bacto yeast extract, 10 g/L (NH₄)₂SO₄, 5 mg/L MnSO₄·5H₂O, 5 mg/L FeSO₄·7H₂O, 20 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid [MES] and 60 mg/L Cm) にエーゼ (ループ容積 1 μ L) を用いて接種し、セブタム付クリンプキャップ (Perkin Elmer 社、#B0104240) で密栓後、48 時間往復振とう培養した (30°C、120 rpm)。培養を停止するため、バイアルを 70°C で 30 分間加温した後、バイアルのヘッドスペース中のイソブレン濃度をガスクロマトグラフィーにより測定した。P₁ 充足条件では、KH₂PO₄ を終濃度 0.2 g/L とするよう追加した。

3-2-11. 1L 容ジャーファーメンター (jar) を用いた Glc 流加培養

培養する菌株を Cm 含有 LB 寒天培地上に塗布し、34°C で 16 時間培養した。寒天培地上に生育した菌体全量をエーゼ (ループ容積 10 μ L) で直接 1 L 容 jar (Able & Biott 社) に張り込んだ 300 mL Glc 培地 (40 g/L glucose, 1 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g/L trisodium citrate, 2 g/L Bacto yeast extract, 1 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 10 mg/L $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, 10 mg/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 mL/L GD-113K antifoam reagent [NOF Corporation] and 60 mg/L Cm) に接種し、33°C、通気量 1 vvm (volume/volume/minute) にて 48 時間培養した。培養 pH はアンモニアガスを用いて 7.0 ± 0.2 に維持し、培地中の溶存酸素濃度 (DO_2) はガルバニ式 DO_2 電極 (Able & Biott 社) で計測し、攪拌強度の変更により 25% 以上 (飽和溶存酸素を 100% とする) を維持した。培養開始 6 時間目から 500 g/L Glc フィード溶液 (0.1 mL GD-113K 含む) を連続的に供給し、培地中の Glc 濃度を 5 g/L 以上に維持した。Glc は $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ と共にオートクレーブ殺菌し、その他の培地成分は pH 無調整のままオートクレーブ殺菌した (121°C、20 分)。

3-2-12. 可溶性画分タンパク質の抽出方法

Jar で培養した培養液を 1.5 mL 容マイクロチューブに回収し、 $21,600 \times g$ で 5 分間遠心分離することで菌体を回収した (4°C)。回収した菌体を Washing buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.5 mM EDTA) で 2 回洗浄し、Sample buffer 300 μ L (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.5 mM EDTA, 5% glycerol) に懸濁した。細胞懸濁液を超音波破碎装置 (コスモ・バイオ、Bioruptor UCD-300TM) を用いて破碎し、遠心分離 ($21,600 \times g$ 、20 分、4°C) にて未破碎細胞を除去した。得られた上清を超遠心分離 ($103,000 \times g$ 、30 分、4°C) にて膜画分と可溶性画分に分離した。超遠心後の上清を可溶性画分とし、Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) に使用した。

3-2-13. SDS-PAGE

前項 3-2-12 で得られた可溶性画分中のタンパク質濃度を Pierce 660 nm Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific 社) でそれぞれ定量した。その後、5 μ g のタンパク質を含む可溶性画分を用いて泳動用のサンプル

を調製した。泳動用サンプルを 70°C で 10 分間変性処理し、NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel、MES buffer (Invitrogen 社)を用いて 45 分間、定電圧 200V で電気泳動した。Novex Sharp Prestained Protein Standard (Thermo Fisher Scientific 社)を分子量マーカーに用いた。泳動後のゲルをタッパーに移し、Coomassie Brilliant Blue (CBB)にて染色した後、水で脱色した。

泳動用サンプルの組成

可溶性画分	○ μL (Protein 5 μg 含む)
NuPAGE LDS Sample buffer ($\times 4$)	2.5 μL
NuPAGE Reducing Agetnet ($\times 10$)	1.0 μL
Deionized Water	Total 10 μL に調製

3-2-14. 振盪試験管培養における溶存イソプレン濃度の減少速度の把握

氷上にて飽和イソプレン(比重 0.681、東京化成工業社)溶液を作成し、試験管に 3 mL 分注した後、シリコ栓 (SILICOSEN® T-52)にて栓をした。試験管をそれぞれ 25°C、30°C、37°Cで振盪し(120 rpm)、振盪開始後 0 分、30 分、1 時間、3 時間、5 時間、8 時間における水溶液中の残存イソプレン濃度を測定した。

3-2-15. 各種分析

Glc 濃度はバイオセンサーBF-5 を用いて測定した。各種培養液を適宜希釈し、その OD₆₀₀ 値を U-2900 spectrometer にて分析した。2957 cm⁻¹ 近傍に特徴的な赤外吸収スペクトルを有するイソプレンの特徴を利用し、光音響ガスモニターF10(Gasera 社)を用いて jar 培養の排ガス中のイソプレン濃度を 1 時間おきに測定した。生成したイソプレン量は理想気体の状態方程式を用いて算出し(温度: 25°C)、培養終了時の液量で割り返すことで蓄積値として示した。培地中の無機リン濃度は、培養液を遠心(21,600 \times g、5 分、4°C)して得られた培養液上清中を適宜希釈し、ホスファ C-テストワコー(富士フィルム和光純薬社)を用いて添付のプロトコールに従い測定した。ガスクロマトグラフィーによるバイアルのヘッドスペース中のイソプレン定量分析は、Headspace Sampler Turbo Matrix 40(Perkin Elmer 社)、ガスクロマトグラフィーGC-2010 Plus AF(Shimadzu 社)、Rxi®-1ms カラム(ジーエルサイエンス社)を用いて既報記載の方法⁵¹で実施した。

Table 3.1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5' to 3')
pSTV28-F	GTGTGAAATTGTTATCCGCTCACGATTCCA
pSTV28-R	GAATTCACCTGGCCGTCGTTTTACAACG
ispSM-F	GATAACAATTTACACACAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAATGTCCGCCGTTTCAAGCCAGTTCT CTCA
ispSM-R	ACGGCCAGTGAATTCTTAGACATACATCAGCTGGTTAATCGG
pstS5	TTTTTAAGCTTTAGGGATAACAGGGTAATCTCGAGAGCCTCTCACGCGTGAATC
pstS3	TTTTTAAGCTTGCATGCCTGCAGAGGGGAGAAAAGTCAGGCTAA
tac-Fw	AAGCTTCCCTGTTGACAATTAATCATCGG
tac-Rv	GCATGCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCAC
KDyI-Fw	ACAGCATGCAGGAGGTATGAATGTCAGAGT
KDyI-Rv	CTCGGTACCTTAGAGCATACGATGAATTTGAC
mvk-Fw	TGCCTGCAGTCTAGAAGGAGGATATACCATGACGATGTGTT
mvk-Rv	CTCGGTACCTCATTGGATGAATATTCCCTCC
ampHattLphi80	ATGCGCACTCCTTACGTACTGGCTCTACTGGTTTCTTTGCGAAAGGTCATTTTCCTGAATATGCTCACA
ampHattRphi80	TTAAGGAATCGCCTGGACCATCATCGCGAGCCGTTCTGACGTTTGTGACAGCTGGTCCAATG
crtZattLphi80	ATGTTGTGGATTTGGAATGCCCTGATCGTTTTTCGTTACCGGAAAGGTCATTTTCCTGAATATGCTCA
crtEattRphi80	ATGACGGTCTGCGCAAAAAACACGTTTCATCTCACTCGCGGTTTGTGACAGCTGGTCCAATG
ampC-t1	GATTCCCCTTACCGAGCCG
ampC-t2	GGCAGGTATGGTGCTCTGAC
ampH-t1	GCGAAGCCCTCTCCGTTG
ampH-t2	AGCCAGTCAGCCTCATCAGCG

Table 3.2 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Description	Antibiotic resistance*	Source or reference
Strain			
<i>E. coli</i> JM109	Competent cells for plasmid cloning	-	Takara Bio
<i>E. coli</i> PIR2	F-, $\Delta lac169$, <i>rpoS</i> (am), <i>robA1</i> , <i>creC510</i> , <i>hsdR514</i> , <i>endA</i> , <i>recA1</i> , <i>uidA</i> ($\Delta Mlu I$):: <i>pir</i>	-	Invitrogen
SC17(0) $\Delta crt::\phi 80attB$	SC17(0) $\Delta crtEXYIB-crtZ::\phi 80attB$	-	This study
SC17(0) $\Delta crt::pAH162-P_{tac}-mvk$	SC17(0) $\Delta crtEXYIB-crtZ::pAH162-P_{tac}-mvk$	Tet	This study
SC17(0)- $\phi 80attB$	SC17(0) $\Delta ampC::\phi 80attB$	-	34
SC17(0)- $\phi 80attB \Delta ampH::\phi 80attB$	SC17(0) $\Delta ampC::\phi 80attB \Delta ampH::\phi 80attB$	-	This study
SC17(0)- $\phi 80attB \Delta ampH::\phi 80attB$	SC17(0) $\Delta ampC::\phi 80attB \Delta ampH::\phi 80attB$	Tet	This study
$\Delta crt::pAH162-P_{tac}-mvk$	$\Delta crtEXYIB-crtZ::pAH162-P_{tac}-mvk$		
SC17(0)- $\phi 80attB \Delta ampH::\phi 80attB$	SC17(0) $\Delta ampC::\phi 80attB \Delta ampH::\phi 80attB$	-	This study
$\Delta crt::P_{tac}-mvk$	$\Delta crtEXYIB-crtZ::P_{tac}-mvk$		
SC17(0) $\Delta ampC::pAH162-Km-P_{tac}-KDyI$	SC17(0) $\Delta ampC::pAH162-Km-P_{tac}-KDyI$	Km	This study
$\Delta ampH::\phi 80attB \Delta crt::P_{tac}-mvk$	$\Delta ampH::\phi 80attB \Delta crtEXYIB-crtZ::P_{tac}-mvk$		
SWITCH-PpstS	SC17(0) $\Delta ampC::pAH162-Km-P_{tac}-KDyI$ $\Delta ampH::pAH162-P_{pstS}-mvaES \Delta crtEXYIB-$ $crtZ::P_{tac}-mvk$	Km, Tet	This study
SWITCH-PphoC	SC17(0) $\Delta ampC::pAH162-Km-P_{tac}-KDyI$ $\Delta ampH::pAH162-P_{phoC}-mvaES \Delta crtEXYIB-$ $crtZ::P_{tac}-mvk$	Km, Tet	This study
Plasmid			
pUC57-KDyI	<i>pmk</i> , <i>mvd</i> , and <i>idi</i> from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cloned into pUC57	Amp	This study
pUC57-mvk	<i>mvk</i> from <i>Methanocella paludicola</i> cloned into pUC57	Amp	This study
pUC57-ispSM	<i>ispS</i> from <i>Mucuna pururiens</i> cloned into pUC57	Amp	This study
pSTV28	Plasmid vector with the replication origin of pACYC184	Cm	Takara Bio
pSTV28- $P_{tac}-T_{trp}$	<i>tac</i> promoter cloned into pSTV28 with <i>trp</i> operon terminator	Cm	GenBank No. LQ681407
pIspSM	<i>ispS</i> from <i>M. pururiens</i> expression plasmid	Cm	This study

pAH162- λ attL-Tc ^R - λ attR	CRIM plasmid [†]	Tet	41
pAH162-MCS- <i>mvaES</i>	pAH162- <i>mvaES</i> derivative containing engineered multiple cloning site	Tet	This study
pAH162-P _{<i>phoC</i>} - <i>mvaES</i>	<i>mvaES</i> under the control of the <i>phoC</i> promoter in pAH162-MCS- <i>mvaES</i>	Tet	This study
pAH162-P _{<i>pstS</i>} - <i>mvaES</i>	<i>mvaES</i> under the control of the <i>pstS</i> promoter in pAH162-MCS- <i>mvaES</i>	Tet	This study
pAH162-P _{<i>tac</i>}	<i>tac</i> promoter cloned into pAH162- λ attL-Tc ^R - λ attR	Tet	This study
pAH162-P _{<i>tac</i>} -KDyI	<i>pmk</i> , <i>mvd</i> , and <i>idi</i> cloned into pAH162-P _{<i>tac</i>}	Tet	This study
pAH162-Km ^R	CRIM plasmid; pAH162- λ attL-Km ^R - λ attR	Km	34
pAH162-Km-P _{<i>tac</i>} -KDyI	<i>pmk</i> , <i>mvd</i> , and <i>idi</i> under the control of the <i>tac</i> promoter in pAH162-Km ^R	Km	This study
pAH162-P _{<i>tac</i>} -mvk	<i>mvk</i> cloned into pAH162-P _{<i>tac</i>}	Tet	This study
pRSFredTER	λ Red expressing plasmid	Cm	33
pAH129-cat	ϕ 80Int/Xis expression plasmid [‡]	Cm	34
pAH123-cat	ϕ 80Int expression plasmid	Cm	34
pRSF-P _{<i>ara</i>} -IX	λ Xis/Int expression plasmid	Cm	42

^{*}Amp, ampicillin; Cm, chloramphenicol; Km, kanamycin; Tet, tetracycline.

[†]CRIM plasmid, conditional replication, integration, and modular plasmid.

[‡]Int, gene encoding integrase; Xis, gene encoding excisionase.

3-3. 結果と考察

3-3-1. イソプレレン生産菌株 SWITCH-PphoC/pIspSM 株及び SWITCH-PpstS/pIspSM 株の構築

2章で抽出した P_{pstS} 並びに P_{phoC} を用いて、 P_i 枯渇に応答してアセチル-CoA が MVA 経路へと流入するようデザインされたイソプレレン生産菌株を構築するため、宿主である SC17(0)株のゲノム上に Dual-In/Out 法で MVA 経路関連遺伝子群を導入した。菌株構築の手順としては、MVA 経路下流の反応に関与する遺伝子群を先に染色体上に固定した。*M. paludicola* 由来の MVK をコードする *mvk* 遺伝子、*S. cerevisiae* 由来の PMK をコードする *erg8* 遺伝子、MVD をコードする *erg19* 遺伝子、IDI をコードする *idi1* 遺伝子を、MVA 経路下流の遺伝子源として選択した。構成的プロモーター (P_{tac}) 支配下で発現するよう設計された *mvk* 遺伝子発現用の遺伝子カセットは、SC17(0)株の持つメガプラスミド pEA320 (GenBank No. AP012033) の *crtEXYIB-crtZ* オペロン上に導入した。カロテノイド生合成経路をコードする *crtEXYIB-crtZ* オペロンの欠失は、IspSM の直接基質である DMAPP/IPP の無駄な消費を抑制出来る。続いて *erg8*, *erg19*, *idi1* 遺伝子からなる人工オペロンを *ampC* 遺伝子座に導入し、最後に pAH162- P_{phoC} -*mvaES* もしくは pAH162- P_{pstS} -*mvaES* を *ampH* 遺伝子座に導入することで、 P_i 枯渇条件下で Glc から DMAPP/IPP を供給する菌株を構築し、それぞれ SWITCH-PphoC 株と SWITCH-PpstS 株と命名した。

イソプレレンシンターゼは一般的に K_{cat} が低く DMAPP に対する K_m 値は高いことから、イソプレレン生合成における潜在的な律速酵素と考えられている⁹。よって、IspSM の発現にはプラスミドを用い、 P_{tac} 支配下で *ispSM* 遺伝子を発現するプラスミド pIspSM を構築し、SWITCH-PphoC 株と SWITCH-PpstS 株に導入することで SWITCH-PphoC/pIspSM 株、SWITCH-PpstS/pIspSM 株を取得した。また、空ベクター (pSTV28) を導入した SWITCH-PpstS/pSTV28 株、SWITCH-PphoC/pSTV28 株も対照菌株として取得した (Fig. 3.1)。

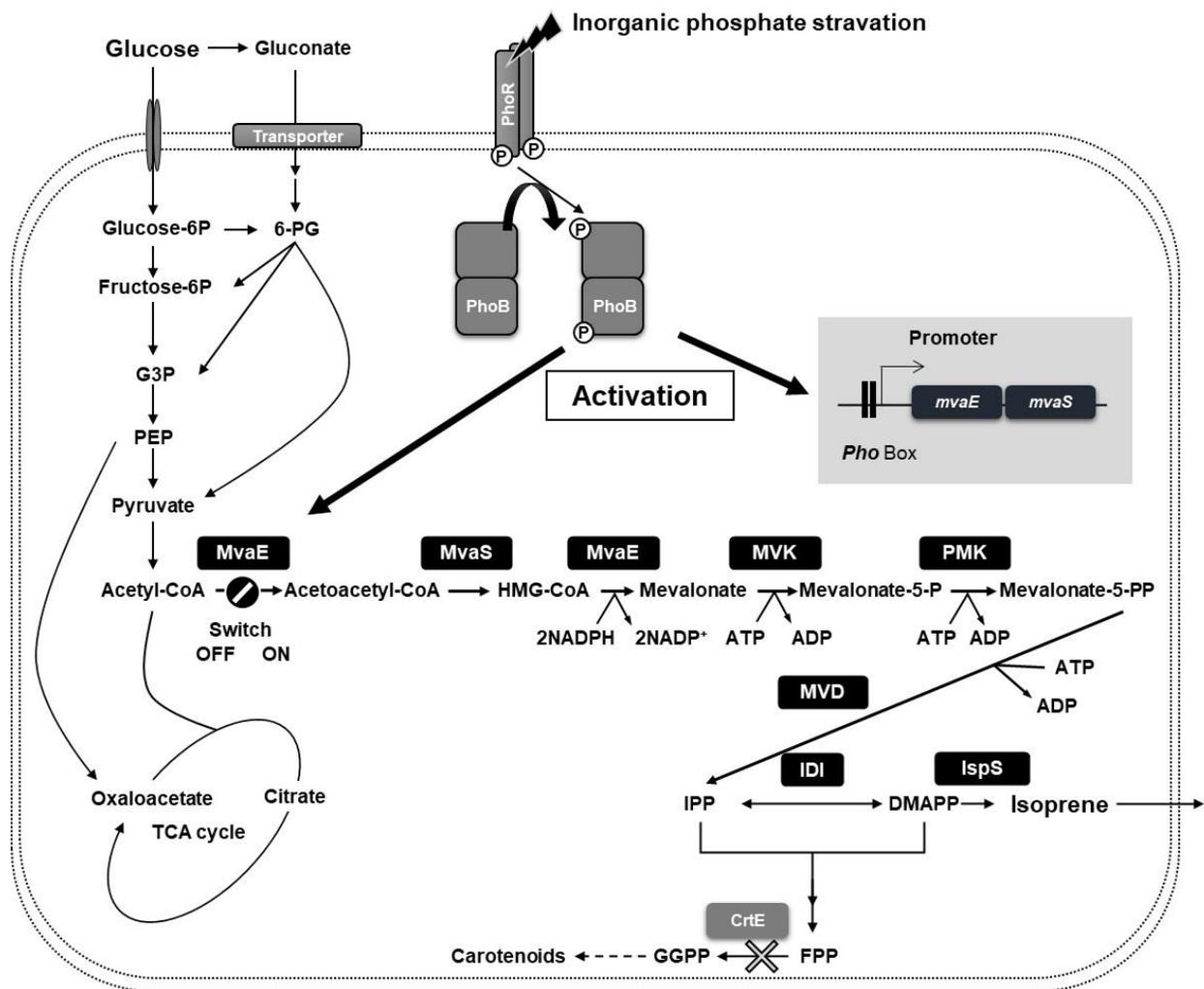


Figure 3.1 Engineered isoprene biosynthetic pathway in *Pantoea ananatis*. Intermediates: DMAPP, dimethylallyl pyrophosphate; FPP, farnesyl pyrophosphate; GGPP, geranylgeranyl pyrophosphate; G3P, glyceraldehyde-3-phosphate; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A; IPP, isopentenyl pyrophosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; 6-PG, 6-phosphogluconate. Genes and enzymes: CrtE, geranylgeranyl pyrophosphate synthase; IDI, IPP isomerase; IspS, isoprene synthase; MvaE, acetoacetyl-CoA thiolase and HMG-CoA reductase; MvaS, HMG-CoA synthase; MVD, mevalonate pyrophosphate decarboxylase; MVK, mevalonate kinase; PMK, phosphomevalonate kinase; PhoB, phosphate regulon transcriptional regulatory protein; PhoR, phosphate regulon sensor protein.

3-3-2. 密閉容器を用いたイソプレン生産菌株の培養評価

SC17(0)株に導入した MVA 経路関連酵素及びプラスミド上に搭載した IspSM が機能発現しているかを確認するため、SWITCH-PphoC/pIspSM 株と SWITCH-PpstS/pIspSM 株を P_i 非含有培地で培養し、そのイソプレン生産能を評価した。イソプレンは化学構造に親水基を有さない為、水に対する溶解度が低い。また、沸点が 34°C と比較的低い事からイソプレンは短時間で気化される。そのため、2 章で MVA 発酵に使用した試験管培養系では、生成したイソプレンが即座に培地から気相へ移動し、系外へ失われることが懸念された。そこでまず、汎用的に実施されている試験管培養評価を想定した場合、飽和イソプレン溶液中のイソプレンがどの程度の時間保持されるかについて温度依存的な検討を行った。その結果、試験管振とう開始後 30 分における溶存イソプレン濃度は約 60 mg/L と、振とう開始直後の濃度の $1/10$ まで減少し、振とう開始 3 時間後には 25°C 、 30°C 、 37°C のいずれの温度条件においても溶存イソプレンは検出出来なかった (Fig. 3.2)。また、本検討における溶存イソプレン濃度の減少速度については、全ての温度条件で有意な差は認められなかった。以上の結果から、イソプレン生産菌株の培養条件には気相循環を伴わない密閉系が望ましいと考え、密閉性が高いガスクロマトグラフィー用のヘッドスペース用バイアル瓶とブチルゴムキャップを用いた密閉系で培養を実施することとした。

SWITCH-PphoC/pIspSM 株と SWITCH-PpstS/pIspSM 株を 30°C で 48 時間培養した結果、生成イソプレンが全て培地中に溶解したと仮定して換算すると、それぞれ 51 ± 12 及び $117 \pm 30\text{ mg/L}$ に相当するイソプレンを生産した。一方、IspSM を欠く SWITCH-PpstS/pSTV28 株、SWITCH-PphoC/pSTV28 株はイソプレンを生産しなかった (Fig. 3.3)。加えて、SWITCH-PpstS/pIspSM を P_i 含有培地 (初発 KH_2PO_4 濃度: 0.2 g/L) で評価した際は、そのイソプレン生産量は $5.8 \pm 0.17\text{ mg/L}$ 相当に留まった (Fig. 3.3)。以上のことから、細胞外の P_i 濃度がイソプレン生産量を決める主要因子として働いていること、導入した異種 MVA 経路関連酵素及び IspSM が機能発現していることが確認出来た。

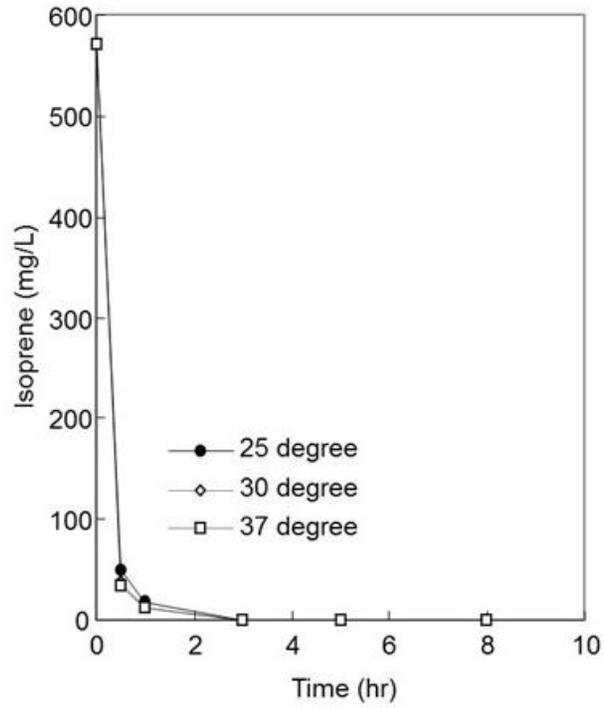


Figure 3.2 Typical residual isoprene concentration profiles in the water.

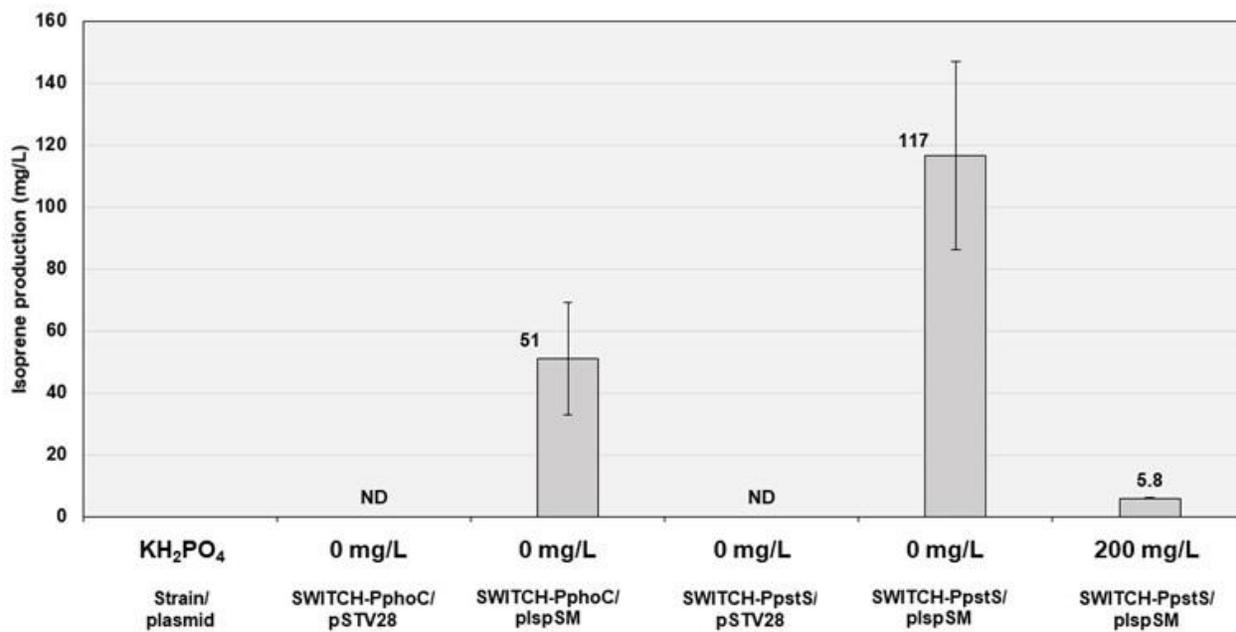


Figure 3.3 Amount of isoprene produced in the vial assay. Data are expressed as mean \pm SD of three independent experiments. ND: not detected.

3-3-3. 細胞外 P_i に依存した dual-phase イソプレン発酵の成立可否判断

前項 3-3-2 で実施した密閉バイアル瓶での培養は、プレート上のシングルコロニーを直接 P_i 非含有培地に植菌することで実施した。そのため、イソプレン生産期のみからなる菌体増殖期を省略した評価系であり、依然 dual-phase のイソプレン発酵プロセスの成立は確認出来ていない。そこで、細胞外 P_i に依存した dual-phase 発酵プロセスの成立可否判断を行うため、商業スケールで利用されている発酵タンクをスケールダウンした 1L 容 jar を使用し、Glc 流加培養を実施した。Jar では一定量の無菌空気を連続的に供給することが可能なため、排ガス量も一定に制御することが出来る。よって発酵排ガス中のイソプレン濃度を in situ 測定することで、イソプレン生成速度をオンタイムで算出出来る。開放系でのイソプレン発酵では気相からのイソプレン回収方法に工夫が求められるものの、ここでは生成したイソプレンの回収ではなく、dual-phase 発酵プロセス成立可否判断が実験の目的であり、ここで開放系の評価系を用いることに問題はない。

培養開始時に培地中に存在した 247 mg/L の無機リンは培養開始後徐々に消費され、培養開始後 9 時間目の時点で 20 mg/L 以下にまで低下し、培養終了時まで一定量で推移した (Fig. 3.4)。培養 9 時間目までは菌株間で増殖プロファイルに差はなく、共に良好な増殖を示し、 OD_{600} 値は約 30 に達した。この間の排ガス中のイソプレン濃度は基底量 (約 20 ppm) であり、イソプレン生成速度にして約 1.1 mg/hr であった。この微量のイソプレン生産は内在性の MEP 経路のみならず *mvaES* オペロンの発現の漏れ出し (leaky expression) に起因する異種 MVA 経路を介したものと推察された。しかしながら、 P_i 充足区間で良好な菌体増殖が認められたことから、この基底レベルのイソプレン生成が菌体増殖にあたる影響は無視できるレベルと判断した。両菌株の培養排ガス中のイソプレン濃度は培養開始後 9 時間目から上昇し、12 時間目には約 450 ppm の最大量に到達した。このように、両菌株共に培養 12 時間目までの培養プロファイルはほぼ一致し、イソプレン生産の開始と培地中の P_i 枯渇のタイミングが一致することも確認できた。

一方で、培養 12 時間目以降は排ガス中のイソプレン濃度、菌体密度共に菌株間でプロファイルが異なり、特に培養 24 時間目以降その違いが顕著であった (Fig. 3.4)。SWITCH-PphoC/pIspSM 株の排ガス中のイソプレン濃度は、培養を通じて SWITCH-PpstS/pIspSM 株のそれよりも高い値で推移した。SWITCH-PphoC/pIspSM 株の排ガス中のイソプレン濃度は約 300 ppm でほぼ一定に推移したのに対して、SWITCH-

PpstS/pIspSM 株の排ガス中のイソプレン濃度は培養終了時には 142 ppm 程度と、最大値の約 1/3 にまで低下した (Fig. 3.4)。なお、生成したイソプレンガスが全て培地中に蓄積したと仮定して換算すると、SWITCH-PphoC/pIspSM 株と SWITCH-PpstS/pIspSM 株はそれぞれ 2.5 g/L、2.0 g/L 相当のイソプレンを生産した。OD₆₀₀ 値に関しては、SWITCH-PphoC/pIspSM 株の培養終了時の値は約 36 なのに対し、SWITCH-PpstS/pIspSM 株の値は最終的に 40 に達した (Fig. 3.4)。当初、菌体密度は初発培地中の P_i 量により規定され、イソプレン生成区間 (P_i 枯渇区間) では菌体量の増加は生じないと予想していたが、両菌株共に P_i 枯渇区間にも菌体の増殖が認められた。本理由は定かでないものの、本事象を説明する理由の一つとして、rRNA、ポリリン酸やリン脂質といった細胞内に蓄積されたリン酸源を加水分解して利用した可能性が考えられる。例えば、*P. ananatis* はエキソポリホスファターゼ (locus tag PAJ_2120) を有しており、本酵素の働きにより細胞内に蓄えられたポリリン酸を加水分解し、菌体生成に利用したのではないかと推察した。いずれにせよ本培養結果から、P_i 枯渇応答代謝スイッチが導入されたテルペノイド生産プラットフォーム菌株 SWITCH-PphoC 株、SWITCH-PpstS 株を用いることで、細胞外 P_i 濃度に依存して細胞増殖期からテルペノイド生成期へと切り替わる dual-phase 発酵プロセスが実現可能なことが明らかとなった。

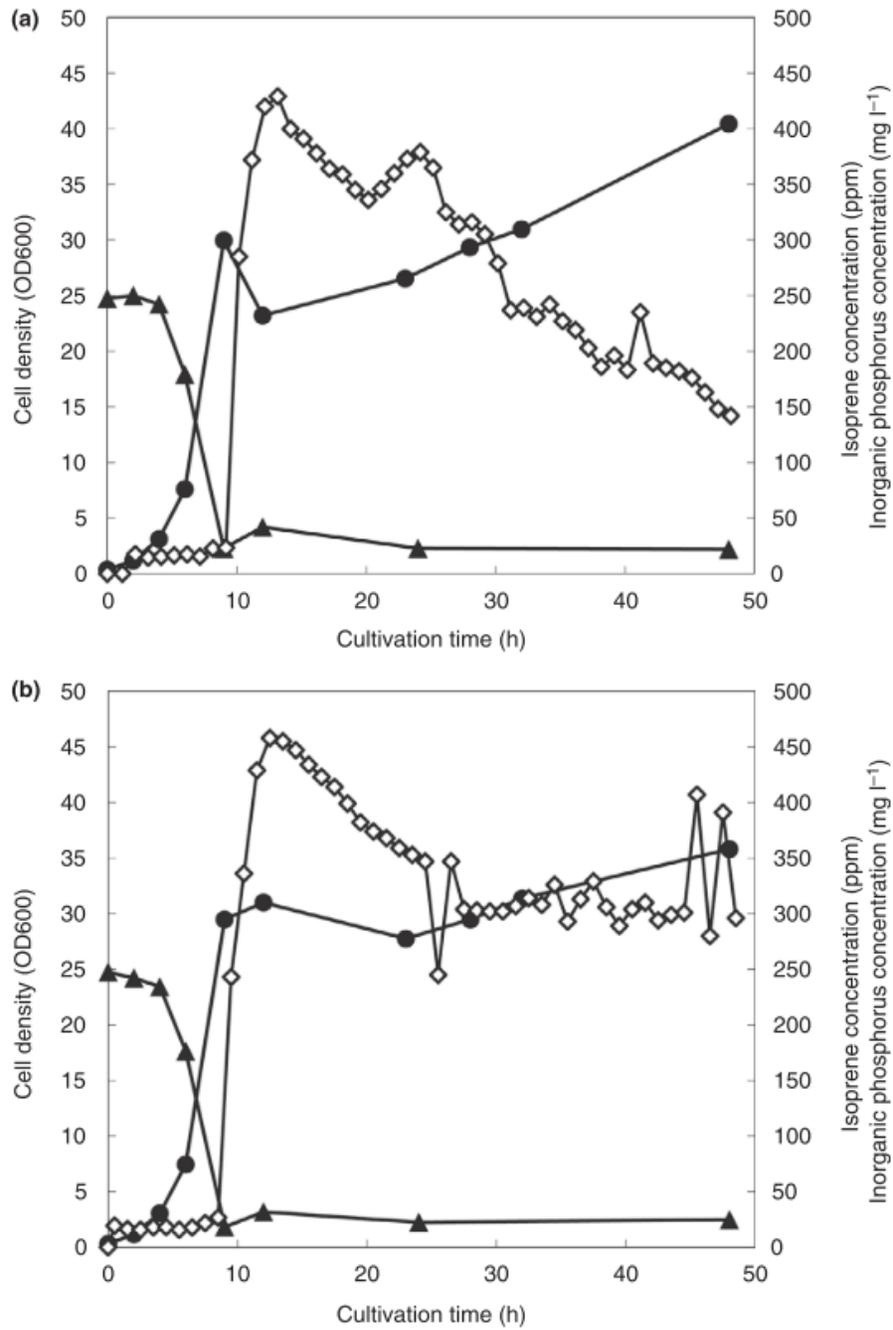


Figure 3.4 Typical isoprene concentration profiles in the off-gas. (open diamonds), inorganic phosphorus concentrations in culture supernatant (closed triangles), and cell densities (OD_{600}) (closed circles) in fed-batch fermentation of strains **(a)** SWITCH-PpstS/pIspSM and **(b)** SWITCH-PphoC/pIspSM.

3-3-4. SDS-PAGE による MvaE の発現解析

SWITCH-PpstS/pIspSM 株、SWITCH-PphoC/pIspSM 株それぞれの Glc 流加培養中の MvaE (acetyl-CoA C-acetyltransferase/HMG-CoA reductase) の発現量を確認する目的で、両菌株の破碎液の可溶性画分を用いて SDS-PAGE を実施した。CBB 染色後のゲルの写真を Fig. 3.5 に示す。P_i 枯渇区間 (培養時間: 12、24、48 時間目) のサンプルでは MvaE の推定分子量付近 (86.5 kDa) にバンドを確認できたのに対し、P_i 充足区間 (培養時間: 6 時間目) のサンプルではバンドは目視では検出できなかった。これにより P_i 欠乏応答性の代謝スイッチが、酵素発現 (遺伝子発現) レベルで調節されていることが両菌株で確認出来た。

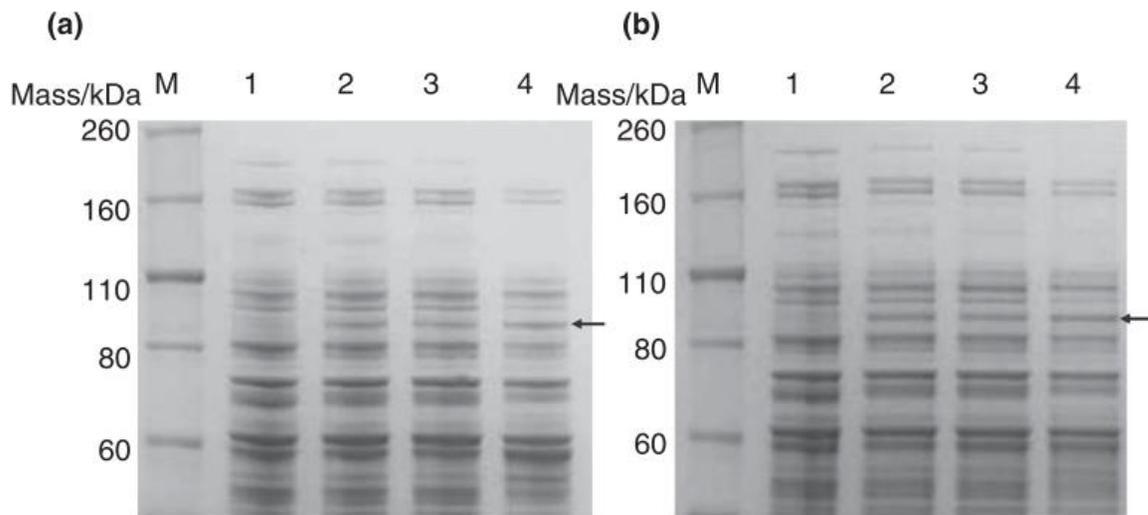


Figure 3.5 Detection of *E. faecalis* MvaE by SDS-PAGE. Soluble fractions were prepared from strains **(a)** SWITCH-PpstS/pIspSM and **(b)** SWITCH-PphoC/pIspSM cultured in fed-batch fermentation. Lanes: M, protein standard; 1, 6-h culture; 2, 12-h culture; 3, 24-h culture; 4, 48-h culture. Arrows indicate MvaE (86.5 kDa). A total of 5 μ g of protein was loaded per lane.

3-4. 結言

本章ではイソプレンを目的生産物質に用いて、 P_i 充足条件下で菌体を生成し、その後の P_i 欠乏条件下で物質生産を行う dual-phase テルペノイド発酵プロセスの実証実験を行った。2 章で抽出した P_{pstS} 、 P_{phoC} それぞれの支配下で *mvaES* オペロンを発現するようデザインした遺伝子カセットに加えて、MVA から IPP/DMAPP を供給するために必要な酵素群を恒常的に発現させる遺伝子カセットを SC17(0)株の染色体上に導入し、IspSM を発現させるためのプラスミド (pIspSM) を導入することでイソプレン生産菌株 SWITCH-PphoC/pIspSM 株と SWITCH-PpstS/pIspSM 株を構築した。これらを、培養開始後 9 時間目から P_i が枯渇する条件で Glc 流加培養した結果、共に P_i 充足区間はイソプレンをほぼ生成せずに良好な菌体増殖プロファイルを示し、培地中の P_i 枯渇と同時にイソプレン生産を開始することが確認出来た。また、 P_i 欠乏応答性の遺伝子発現スイッチが想定通り作動していることが、酵素発現レベルでも確認出来た。特に、SWITCH-PphoC/pIspSM 株の排ガス中のイソプレン濃度は培養終了まで 300 ppm 以上を維持し、培養 48 時間で 2.5 g/L の蓄積に相当するイソプレン量を生産したことから、 P_i 依存的な dual-Phase 発酵プロセスが高生産性のテルペノイド発酵プロセスを実現する上で有効であると証明された。なお、以降の研究では今回イソプレン生成能が高かった SWITCH-PphoC 株を用いることとした。

4 章 100%鏡像選択的な(S)-リナロールの発酵生産

4-1. 緒言

芳香物質として知られるリナロールはラベンダーやコリアンダーをはじめ、様々な植物の精油中に含まれるモノテルペンアルコールであり、香水、化粧品、石鹸などに利用されている他、食品や飲料へのフレーバー付加のための添加物としても使用されている。リナロールには(S)-リナロールと(R)-リナロール、2つのエナンチオマーが存在し、それぞれが異なる香りを呈する⁵²。リナロールは、MVA経路もしくは非MVA経路から供給されるGPP(C10)からリナロールシンターゼの触媒反応により生成される。様々な生物種から既に多くのリナロールシンターゼが同定され、*Actinidia arguta*由来のリナロールシンターゼ(AaLINS; GenBank No. ADD81294)はS体を100%選択的に⁵³、グラム陽性細菌 *Streptomyces clavuligerus* 由来のリナロールシンターゼはR体を100%選択的に生成することが報告されている⁵⁴。こうした酵素を宿主微生物に導入して発現させることで、100%選択的にS体、R体を作り分けることが可能であり、*S. cerevisiae* や *Y. lipolytica* を宿主にした100%鏡像選択的な(S)-リナロールの発酵生産例も報告されている^{16 55}。また、味の素(株)でもシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 株に AaLINS を発現させることで、100%選択的な(S)-リナロールの発酵生産に成功している⁵⁶。こうした光学異性体の選択的な作りわけが可能な点は化学合成法に対する発酵法のメリットの一つであるものの、これらの報告における(S)-リナロール蓄積は 240 µg/L から 11.6 mg/L に留まっており、商業生産を目指すうえで生産性の向上は必須である。また、ゲラニオールやリモネンといった他のモノテルペノイドの発酵生産事例に対象を広げてもその蓄積が 10 g/L を超える例は報告されておらず、ヘミテルペノイドやセスキテルペノイドと比べ、モノテルペノイド全般的にその発酵成績は低いのが現状である⁵⁷。

そこで本章では、SWITCH-PphoC 株をベースに、(S)-リナロール生産菌株の構築並びにその生産能の向上を試みることで、(S)-リナロールの鏡像選択かつ効率的な発酵製法の確立を目指した。リナロールは抗菌活性を示すため、まずは *P. ananatis* のリナロール耐性能を評価した。次に、培地中の溶存リナロールが気相へと移行する速度を評価し、(S)-リナロール生産菌株の培養に適する条件を選定した。これらの結果を踏まえた上で、主要副生物の生成経路の遮断など、代謝工学的手法による(S)-リナロール生産能の向上を試みた。

4-2. 実験材料と方法

4-2-1. 検討に用いた培地と培養条件

本文に特に記載のない限り、前項 2-2-1 と同様の材料を用いて実施した。

4-2-2. 遺伝子操作

本文に特に記載のない限り、前項 2-2-2 と同様の材料を用いて実施した。

4-2-3. 使用した菌株、プラスミド、プライマー

本章で使用したプライマーとその塩基配列を Table 4.1 に纏めた。また、本章で使用した菌株とプラスミドを Table 4.2 に纏めた。各菌株にプラスミドを導入した株を、本文ではそれぞれ菌株名/プラスミド名と記載した。

4-2-4. *P. ananatis* へのプラスミド導入

前項 2-2-6 と同様の手法で実施した。

4-2-5. AaLINS と GPP 合成酵素の共発現プラスミドの構築

葉緑体移行シグナルと推定される配列を除いた AaLINS をコードする遺伝子の塩基配列 (*AaLINS*) を、*P. ananatis* のコドン使用頻度に合わせて最適化し、本配列の上流に *tac* プロモーター (P_{tac}) と RBS (5'-CCCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATCGTGAGCGGATAACAATTTTCACACAAGGAGACTGCC-3') を付加した DNA を化学合成し、pUC57 にクローニングした (pUC57-AaLINS、GenScript 社)。また、*E. coli* の IspA (GenBank No. AYG20450) の変異体 (IspA(S80F)) をコードする遺伝子 (*ispA**) の塩基配列を *P. ananatis* のコドン使用頻度に合わせて最適化し、pUC57-Kan にクローニングした (pUC57-GPPS、GenScript 社)。pUC57-AaLINS を鋳型にプライマー Ls1 と P16 を用いて PCR し、 P_{tac} から *AaLINS* 遺伝子を含む DNA 断片を得た。また、pUC57-GPPS を鋳型にプライマー P17/P18 を用いて PCR し、

*ispA**遺伝子を含む DNA 断片を得た。これら 2 つの DNA 断片を *Pst*I と *Sca*I で消化した pACYC177 (Nippon Gene 社) に In-Fusion HD cloning kit を用いて連結し、pAaLINS-GPPS を得た。

AaLINS 遺伝子の塩基配列

```
ATGAGCACGGCGTTCCAGCATGCCACCACCAGAAATGGAGCATCACGGAGGACCTGGCGTTCATCAGCAATCCCAGCAAACAGCATAACCACCAGACCGG
CTACCCGATTTTAGCGATGAATTTACCTGAAACATGAAAACAACTGAAAGATGTGCGTCGCGCCCTGCGCGAAGTGGAAGAAACCCCGTGGAAGGCCTGG
TGATGATCGATACCCTGCGACGCGCTGGGCATTGATTACCACTTTACGGGCGAAATCGGCGCGCTGCTGCAGAAACAGCAGCGCATTAGCACCTGCGATTATCCG
GAACATGACCTGTTTGAAGTGAGCAGCGTTTTTCGTCTGCTGCGTCAGGAAGGCCACAATGTGCCGCGCATGTGTTTAAACAACCTTCGCGATAAAGAGGCCG
CTTAAAAGCGAACTGAGCCGCGATATCCGCGGCTGATGAGCCTGTACGAAGCCAGCCAGCTGAGCATCCAGGGCGAAGATATTTGGATCAGGCCGCGGATT
TTAGCAGCCAGCTGCTGAGCGGTTGGGCCACCAACCTGGATCATCATCAGGCCGCTGTTGGTGCCTAATGCCCTGACCCATCCGTACCACAAAAGCCTGGCCACC
TTATGGCGCGCAACTTTAACTATGATTGCAAAGGCCAGAACGGCTGGGTGAACAACCTGCAGAACTGGCCAAAATGGATCTGACCATGGTGCAGAGCATGCA
TCAGAAAGAAGTGCTGACGGTCTCAGTGGTGAAAGGTCGCGGCTGGCGAACGAACCTGAACTGGCCAAAATGGATCTGACCATGGTGCAGAGCATGCA
TGGCGGCCCTGACGGATCCGCGCTTAGCGAAGAAGCGGTGGAACCTGACCAAAACGATCAGCTTACATCATCGATGATATCTTCGATGTGTACGGCAC
CTGGAAGAAGTACCCCTGTTTACCAGTCCGCTGAAACCGTGGAACTGACCCGCGTGAACAGCTGACCCGATTACATGAAAATTTGCTTTAAAGCCCTGTACGA
TATCACCACGAAATCGCGTACAAAATCTACAAAAACAGCGCCGCAACCCGATCGATAGCTGCGTTCGACCTGGGCCAGCCTGTGCAACGCTTTCTGGAAG
AAGCCAAATGGTTTGCAGCGCAACCTGCCGAAAGCCGAAGAATACCTGAAAACCGCATTATCAGCAGCGCATGCATGTGGTGACCGTGCACATGTTTTC
CTGCTGGCGGCTGCTTTACGAAGAAGCGTGAACCTGGTGGATGAACATGCCGCGATTACCAGCAGCATTGCGACCATCTGCGCCTGAGCGATGATCTGGG
CAGCGCGAAGATGAAGATCAGGATGGCTATGATGGCAGCTACCTGGAATGCTATCTGAAAGATCACAAGGCAGCAGCGTGGAACCGCCCGCAAGAAGTGA
TTCGATGATCAGCGATGCGTGAAACGCTGAACGAAGAATGCCGTTTCCGAACCCGTTAGCGCCACCTTTCGCAAAAGCAGCCTGAACATCGCGCGCATG
GTGCCGCTGATGATAGCTACGATGATAACCACAACCTGCCATTCTGGAGAACACATGAAAACGATGCTGTATGATAGCAGCAGCTAA
```

*ispA**遺伝子の塩基配列

```
ATGGACTTCCCCAGCAGCTGGAGGCGTGCCTCAAACAGGCCAATCAGGCCCTGAGCCGTTTCATCGCGCCCTGCCCTTTCAGAATACCCCGTGGTGAAAC
CATGCGATATGGTGCCCTGCTGGGCGGCAACGCTGCGTCCGTTTCTGGTGTACGCGACCGGCCATATGTTTGGCGTGAGCAGCAATACCCCTGGATGCCCGG
CGGCCCGGTGGAATGCATTATGCCTATTTCTGATCCACGATGATCTGCCGCGATGGATGATGATGATCTGCGCGCGGCGCTGCCACCTGCCATGTGAAA
TTTGGCGAAGCGAACGCCATTTGCGCGGTGATGCCCTGCAGACCTGGCCTTAGCATCTGAGCGATGCCGATATGCCGGAAGTGAGCGATCGCGATCGCAT
TAGCATGATCAGCGAACTGGCCAGCGCCAGCGGTATTGCGGGCATGTGTGGTGGCCAGGCCCTGGATCTGGATGCCGAAGGCAACATGTGCCGCTGGATGCCC
TGGAACGCATTATCGCCACAAAACGGGTGCCCTGATCCGTGCCGCGTGCCTGTTGGCGCGCTGAGCGCGCGGATAAAGCCGTCGCGCCCTGCCGCTGCTG
GATAAATATGCGGAAAGCATTGGCCTGGCCTTTAGGTGCAGGATGATATCCTGGATGTGGTGGCGGATACGGCCACGCTGGGTAACGTCAGGGTGGGATCA
GCAGCTGGGCAAAAGCAGTATCCGCGCTGCTGGGTGTTGGAACAGGCCGCAAGAAAGCCCGATGATCGATGATGCGCGCCAGAGCCTGAAAACAGCTGG
CCGAACAGAGCCTGGACAGGCGCCCTGGAAGCCCTGGCCGACTACATCATCAGCGTAACAAATAA
```

4-2-6. SWITCH-PphoC 株の染色体上の薬剤マーカー遺伝子除去

SWITCH-PphoC 株の染色体上から pAH162 由来の薬剤マーカーとベクター由来の配列、プラスミドを除くため、前項 2-2-11 記載の方法で Km、Cm、Tet 感受性株を示したコロニーを取得し、SWITCH-PphoC(-)株とした。

4-2-7. SWITCH-PphoC Δ *gcd* 株の構築

pMW-*attL*_λ-Km^R-*attR*_λ を鋳型としてプライマー Gcd-fw と Gcd-rv を用いて PCR を行い、*kan* 遺伝子の両末

端に *attL_λ* 及び *attR_λ* 配列が付与され、更にその両外側に *gcd* 遺伝子 (locus_tag PAJ_3473) の相同領域 (50 bp) の配列が付加された *gcd* 遺伝子破壊用カセットを取得した。前項 2-2-8 記載の方法で作成した SC17(0)/pRSFRedTER 株のコンピテントセル 80 μL に、前記で調製した PCR 産物約 600 ng を混和し、エレクトロポレーションした。形質転換後の菌体に 1 mL の SOC 培地を添加し 2 時間培養した後、培養液全量を Km 含有 LB 寒天培地に撒布して 1 晩培養した。プライマー Gcd1 と Gcd2 を用いたコロニー PCR で *gcd* 遺伝子が破壊されたことを確認し、SC17(0) Δ*gcd::kan*/pRSFRedTER 株を取得した。前項 2-2-12 記載の方法で本菌株のゲノム DNA 断片を取得し、前項 2-2-13 記載の方法で *gcd* 欠損形質を SWITCH-PphoC 株に導入し、プライマー Gcd1 と Gcd2 を用いたコロニー PCR で *gcd* 遺伝子が破壊されたことを確認し、SWITCH-PphoCΔ*gcd::kan* 株を取得した。SWITCH-PphoC Δ*gcd::kan* 株からの *kan* 遺伝子の除去は前項 2-2-11 記載の方法で実施し、Cm、Km 感受性株を示したコロニーを SWITCH-PphoC Δ*gcd* 株として取得した。

4-2-8. SC17 株のリナロール耐性能評価

SC17 株を LB 寒天培地上に塗布し、18 時間静置培養した。寒天培地上の菌体を回収し、4 mL の M9-Glc 培地 (12.8 g/L Na₂HPO₄·7H₂O, 3 g/L KH₂PO₄, 0.5 g/L NaCl, 2 g/L NH₄Cl, 0.5 g/L MgSO₄·7H₂O, 10 mg/L CaCl₂, and 4 g/L glucose) を張り込んだ小型 L 型培養管 (型式: TV100030、アドバンテック東洋) に開始 OD₆₆₀ が 0.01~0.02 となるように植菌し、培養管に培養栓をした。培養温度を 34°C、振盪速度を 70 rpm とし、小型振盪培養装置 TVS062CA (アドバンテック東洋) を用いて培養し、15 分毎に 5 秒振盪を停止して OD₆₆₀ 値を自動計測した。培養開始後、OD₆₆₀ 値が 0.8~1.0 に達した時点で、それぞれ培地中の試薬リナロール濃度が 1.2、0.8、0.6、0.4、0 g/L となるようリナロール溶液を培養管に添加した。リナロール溶液は試薬リナロール (和光純薬工業株式会社) を 15、10、7.5、5.0、0%^{v/v} となるようエタノール (和光純薬) で希釈し、各培養管に 40 μL 添加した。培地中のリナロール濃度は試薬リナロールの比重 0.86 (引用: 和光純薬 実績値) から算出した。

4-2-9. 溶存リナロールの気相への移行速度の把握

1 L 容 jar (ABLE 社、BMJ-01NP) 中に Glc-KP 培地 300 mL (40 g/L glucose, 1 g/L MgSO₄·7H₂O, 1 g/L

trisodium citrate, 2 g/L Bacto yeast extract, 2 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 mL/L GD-113K)を張り込み、アンモニアガスを用いて培地 pH を 6.8、培地温度を 30°Cに調整した後、培地に試薬リナロールを 500 μL 添加した。温度、pH は一定に維持し、通気量 1 vvm (300 mL/minute)、攪拌強度 1,000 rpm 一定で管理した。適宜サンプリングし、溶存リナロール濃度を測定した。

1 L 容 jar (ABLE 社) 中に Glc-KP 培地 270 mL (40 g/L glucose, 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L trisodium citrate, 2 g/L Bacto yeast extract, 2 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 mL/L GD-113K)を張り込み、アンモニアガスを用いて培地 pH を 6.8、培地温度を 30°Cに調整した後、ミスチン酸イソプロピル (IPM、東京化成工業) を 30 mL 添加した。そこに試薬リナロールを 4.5 mL 添加した。温度、pH は一定に維持し、通気量 1 vvm (300 mL/minute)、攪拌強度 1,000 rpm 一定で管理した。随時攪拌を停止し、IPM 相と水相それぞれをサンプリングし、それぞれの溶存リナロール濃度を測定した。リナロールの分析方法は 4-2-12 項に記載した。

4-2-10. 試験管を用いた(S)-リナロール発酵

評価する菌株をそれぞれ Km 含有 LB 寒天培地上で培養した。寒天培地上から 1/4 ループ程度の菌体をエーゼ(ループ容積 10 μL)で掻きとり、あらかじめ乾熱滅菌した 0.1 g の CaCO_3 と 5 mL の MS-KP2 培地 (60 g/L glucose, 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g/L Bacto yeast extract, 0.5 g/L KH_2PO_4 , 20 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 50 mg/L Km)を含む試験管 (diameter, 25 mm; length, 200 mm; thickness, 1.2 mm)に植菌した。試験管に IPM を 1 mL 添加した後、30°Cで 24 時間もしくは 48 時間往復振盪培養を行った (120 rpm)。培地の殺菌は前項 2-2-14 記載の方法に従った。

4-2-11. SDS-PAGE による AaLINS の発現解析

使用する菌株をそれぞれ Km 含有 LB 寒天培地上で前培養した。寒天培地上のシングルコロニーをエーゼ(ループ容積 1 μL)で 3 mL の Km 含有 LB 培地を張り込んだ試験管に植菌し、30°C での振盪培養を開始した (120 rpm)。培養開始 3 時間後に、終濃度 1 mM となるよう IPTG を添加し、培養開始後 21 時間目の

菌体を 1.5 mL 容マイクロチューブに回収し、遠心操作により回収した菌体を Extraction buffer (50 mM MOPS [pH 7.0], 10 mM MgSO₄·5H₂O, 10%^{v/v} glycerol, 1 mM dithiothreitol) で 2 回洗浄後、400 μL の Extraction buffer に懸濁した。細胞懸濁液を Bioruptor UCD-300TM で破碎し(4°C)、菌体破碎液を得た。200 μL の菌体破碎液を遠心分離し(21 600 × g、20 分、4°C)、未破碎細胞を除去した上清を可溶性画分とした。遠心後のペレットを Extraction buffer で 2 回洗浄後、終濃度 0.2 g/L となるよう SDS を添加した Extraction buffer 200 μL に懸濁し、未破碎細胞ならびに凝集した不溶性タンパク質を溶解したサンプルを不溶性画分とした。得られた可溶性画分中のタンパク質濃度を Pierce 660 nm Protein Assay Kit でそれぞれ定量した。その後、10 μg のタンパク質を含む可溶性画分を用いて、前項 3-2-13 記載の方法で SDS-PAGE を行った。菌体破碎液と不溶性画分サンプルに関しては、対応する可溶性画分サンプルと同液量をゲルにアプライして泳動した。分子量マーカーにはプレジジョン Plus プロテイン 2 色スタンダード (BIO-RAD 社) を用いた。

4-2-12. Glc、MVA、(S)-リナロールの定量分析

二相発酵培養液からの(S)-リナロール測定用サンプルは以下の様に調整した。培養液を 1.5 mL 容の Safe lock tube に採取した。これを激しく vortex し、全体が均一のうちに 100 μL (50 μL) 採取し、900 μL (950 μL) の 99.5%エタノールを含む 1.5 ml 容 Safe lock tube に添加し、十分に混合させた。この希釈液を遠心分離後 (21,600 × g、4 °C、5 分間)、上清を GC バイアル瓶に採取し GC-FID 分析に使用した。調整した分析サンプル中のリナロール濃度は、ガスクロマトグラフィー GC-2025AF (Shimadzu 社)、DB-5 capillary column (diameter, 0.25 mm; length, 30 m; thickness, 0.25 μm, Agilent Technologie 社) を用いて既報記載の条件⁵⁸ で測定した。リナロール標準液は試薬リナロール (富士フィルム和光純薬社、カタログコード:126-00993) を用いて調製した。59%^{v/v} エタノールで調整した 10、50、100、500 mg/L のリナロールを用いて外部標準法にて検量線を作成し、(S)-リナロール濃度を求めた。その後、得られたリナロール濃度とトータルの液量(水相と有機相)から、総(S)-リナロール生産量を算出し、生成(S)-リナロールが全て水相に溶解していると仮定した値に換算して蓄積濃度を示した。

Glc、MVA 及びグルコン酸の定量分析は以下の通り実施した。1.5 mL 容の Safe lock tube に採取した培養

液遠心分離し(21,600 × g、4°C、5 分)、IPM 相、培地(水)相及び菌体(+CaCO₃)を分離した。水相を採取し、超純水で希釈した後、培地(水)相中の Glc 濃度をバイオセンサーBF-5 で測定した。水相を MilliQ 水で 10 倍希釈し、0.45 μm フィルターでろ過した後、Prominence 有機酸分析システム(Shimadzu 社)を用いて、既報記載の方法⁵⁹で分析した。

MVA 分析の際は、希釈した水相サンプルを Mini-Uniprep™ に移し、LC-MS-2020(Shimadzu 社)を用いて前項 2-2-16 記載の方法で測定した。グルコン酸濃度は HPLC(High Performance Liquid Chromatography)により既報記載の方法⁵⁹で分析した。グルコン酸標準液はグルコン酸 Na(富士フイルム和光純薬)を溶解して用い、外部標準法にて検量線を作成し、サンプル中の濃度を求めた。

Table 4.1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5' to 3')
P16	TGTGAAATTAGCTGCTGCTATCATACAGCA
P17	GCAGCTAATTCACACAGGAGACTGCCATGGACTTCCCCAGCAG
P18	ATGACTTGGTTGAGTTTATTTGTTACGCTGAATGATGT
Ls1	ACGTTGTTGCCATTGCCCTGTTGACAATTAATCATCG
Gcd-fw	CTATCTGATTGTTTCCTGAGTTTTCTGGCAACGAAATGAGGTCAACATTGAAGCCTGCTTTTTTATACTA AGTTGGCA
Gcd-rv	AGCAGGCATAAAAAAAGGCGGACCGGAGTCCGCCTCTGTTTCAGGTGTTAACGCTCAAGTTAGTATAAAA AAGCTGAACGA
Gcd1	GATATGGATCATCACGCTTCA
Gcd2	CATGCTCGGCTATTCGAC

Table 4.2 Bacterial strains and plasmids used for strain construction

Strain or plasmid	Description	Antibiotic resistance ^a	Source or reference
Strain			
<i>Escherichia coli</i>			
JM109	Competent cells for plasmid cloning	–	Takara Bio
PIR2	Competent cells for plasmid cloning	–	Invitrogen
<i>Pantoea ananatis</i>			
SC17	A low-mucus-producing mutant derived from wild-type AJ13355	–	NITE ^b
SC17(0)	λ Red resistant strain	–	33
SWITCH-PphoC	SC17(0) $\Delta ampC::pAH162$ -Km- P_{tac} -KDyI $\Delta ampH::pAH162$ - P_{phoC} - <i>mvaES</i> $\Delta crtEXYIB$ - <i>crtZ::P_{tac}-mvk</i>	Km, Tet	This study
SWITCH-PphoC Δgcd	SC17(0) $\Delta ampC::P_{tac}$ -KDyI $\Delta ampH::P_{phoC}$ - <i>mvaES</i> $\Delta crtEXYIB$ - <i>crtZ::P_{tac}-mvk</i> Δgcd	–	This study
SWITCH-PphoC(-)	SC17(0) $\Delta ampC::P_{tac}$ -KDyI $\Delta ampH::P_{phoC}$ - <i>mvaES</i> $\Delta crtEXYIB$ - <i>crtZ::P_{tac}-mvk</i>	–	This study
SWITCH-PphoC $\Delta gcd::kan$	SC17(0) $\Delta ampC::P_{tac}$ -KDyI $\Delta ampH::P_{phoC}$ - <i>mvaES</i> $\Delta crtEXYIB$ - <i>crtZ::P_{tac}-mvk</i> $\Delta gcd::attL$ -Km ^R - $\rightarrow attR$	Km	This study
Plasmid			
pACYC177	Plasmid vector with a replication origin of p15A	Amp, Km	Nippon Gene
pAaLINS_GPPS	pACYC177 derivative for expression of <i>AaLINS</i> and <i>GPPS</i> under the control of <i>tac</i> promoter	Km	This study
pACYC177- P_{tac} - <i>AaLINS</i> - <i>ispA</i> * (pAaLINS- <i>ispA</i> *)	pACYC177 derivative for expression of <i>AaLINS</i> and <i>GPPS</i> whose sequences are optimized for the codon-usage of <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 under the control of <i>tac</i> promoter	Km	56
pMW-attL _{λ} -Km ^R -attR _{λ}	Donor attL _{λ} -Km ^R -attR _{λ} cassette	Amp, Km	33
pRSFredTER	λ Red proteins expression plasmid	Cm	33
pRSF- P_{ara} -IX	λ Xis/Int expression plasmid ^c	Cm	42
pUC57	Plasmid vector with a replication origin of pMB1	Amp	GenScript
pUC57-Kan	Plasmid vector with a replication origin of pMB1	Km	GenScript
pUC57- <i>AaLINS</i>	pUC57 derivative containing the sequence of <i>AaLINS</i>	Amp	This study
pUC57-GPPS	pUC57-Kan derivative containing the sequence of <i>ispA</i> (S80F)	Km	This study

^aAmp, ampicillin; Cm, chloramphenicol; Km, kanamycin; Tet, tetracycline.

^bNational Institute of Technology and Education.

^cInt, gene encoding integrase; Xis, gene encoding excisionase.

4-3. 結果と考察

4-3-1. *P. ananatis* のリナロール耐性能評価

リナロールは細菌に対して細胞毒性を示す。実際 Soković らはリナロールが *E. coli* など様々な細菌に対して抗菌作用を示すことを報告している⁶⁰。故に、(S)-リナロールの高蓄積化を目指すうえで、宿主のリナロール耐性能を把握することは重要である。そこで *P. ananatis* のリナロール耐性能を評価するため、野生株である *P. ananatis* SC17 株³⁵ の各リナロール濃度下での生育プロファイルの評価した。その結果、リナロール濃度が 1.2 g/L の条件では SC17 株の著しい生育阻害が認められ (Fig. 4.1)、溶菌している様子が観察された。このことから、*P. ananatis* は *Pseudomonas putida* のような高モノテルペノイド耐性¹³ は持たないことが明らかとなった。よって *P. ananatis* を宿主に (S)-リナロール発酵生産を行うには、(S)-リナロール毒性を回避するアプローチを取る必要がある。

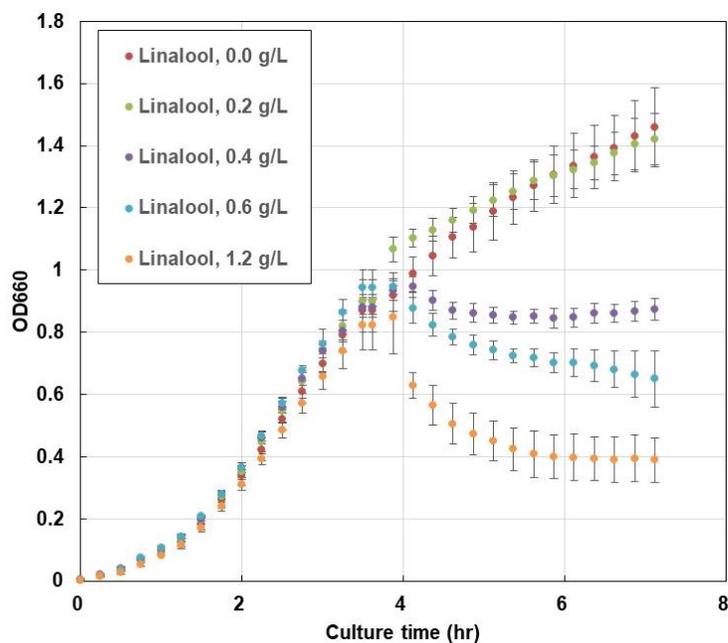


Figure 4.1 Growth inhibition of *P. ananatis* SC17 strain by exogenous linalool. An error bar shows a standard deviation deduced from three independent experiments.

4-3-2. エアストリッピングによる液相からの気相へのリナロール移行速度の把握

通気、攪拌操作が伴う jar での好気培養では空気と水(培地)との接触が促進されるため、エアストリッピングと呼ばれる現象により、液中に存在する揮発性化合物の気相への移行が促される。そこで、jar 培養条件を模した条件下で(4-2-9 参照)、培地中の溶存リナロールがどの程度の時間保持されるか確認した。培地にリナロールを添加し、オペレーション開始後 0, 1.5, 3, 5, 7.5, 10 時間目の培地中のリナロール濃度を測定した結果、10 時間目の濃度は 0.6 g/L と、開始直後(1.5 g/L)の 4 割まで濃度が減少し、培地中の溶存リナロールの半減期は約 7 時間と算出された(Fig. 4.2)。

一方、Liu らは有機溶媒のなかでも IPM を利用することで、リナロール同様モノテルペンアルコールであるゲラニオール及びその誘導体の気相への移行が抑制できることを確認している⁶¹。そこで、IPM を培養液に添加した場合の溶存リナロール濃度の半減期を確認した。培地 270 mL に加えて IPM を 30 mL を張り込んだ jar にリナロールを添加し、オペレーション開始後 0, 9, 23, 33, 48, 57 時間目における残存リナロール濃度を測定した結果、48 時間目においても水相、IPM の溶存リナロール濃度は開始直後(それぞれ 124 g/L, 0.3 g/L)の 86%を維持しており(それぞれ 108 g/L, 0.26 g/L)、リナロールの半減期は約 175 時間にまで伸長した(Fig. 4.2)。本結果から、IPM を用いた液-液の二相培養系³⁰を用いることで、発酵生産されるリナロールの気相への移行を大幅に抑制出来ることが示された。また、二相培養では培養中に生成したリナロールが有機溶媒へ *in situ* 抽出されるため、培地(水相)中の宿主微生物との接触機会が減る。よって、気相への移行だけでなく、前項 4-3-1 で認められたリナロールによる宿主への毒性や阻害の軽減、回避にも寄与する。また、IPM ($\log P_{ow}$: >7.0) は疎水性が高くバクテリアへの細胞毒性が低いいため、菌体増殖、代謝に影響を殆ど及ぼさない。以上の結果と知見を踏まえ、テルペノイド発酵での使用実績豊富な IPM を用いた液-液の二相培養を、(S)-リナロール発酵条件に採用した。

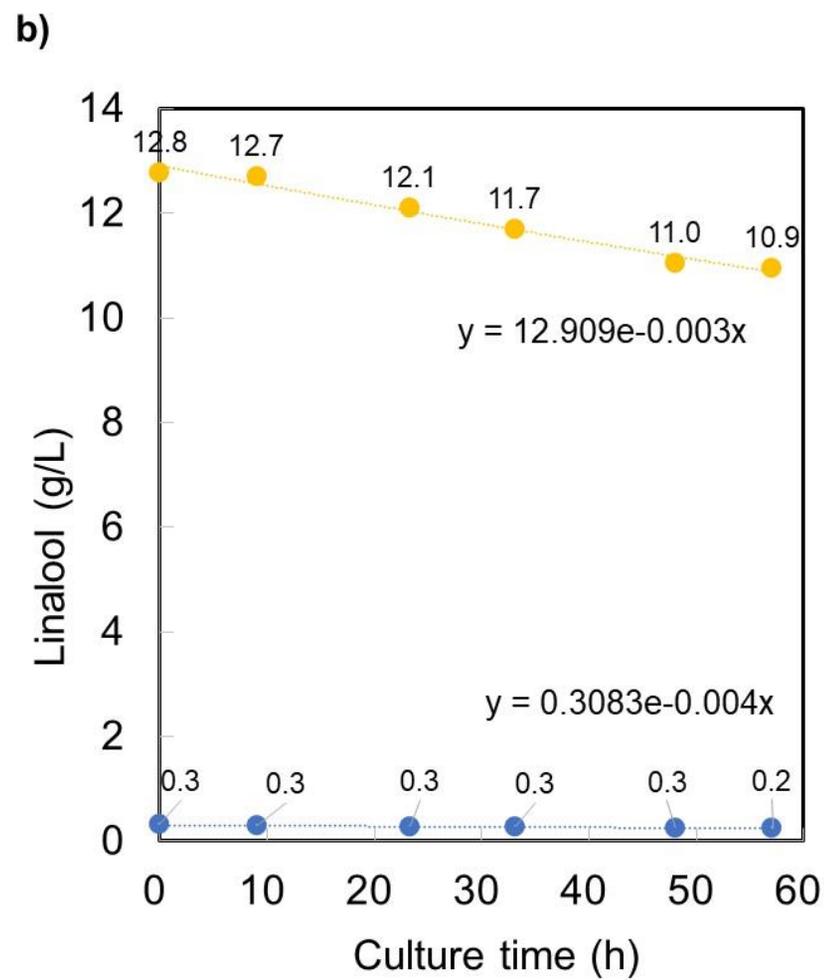
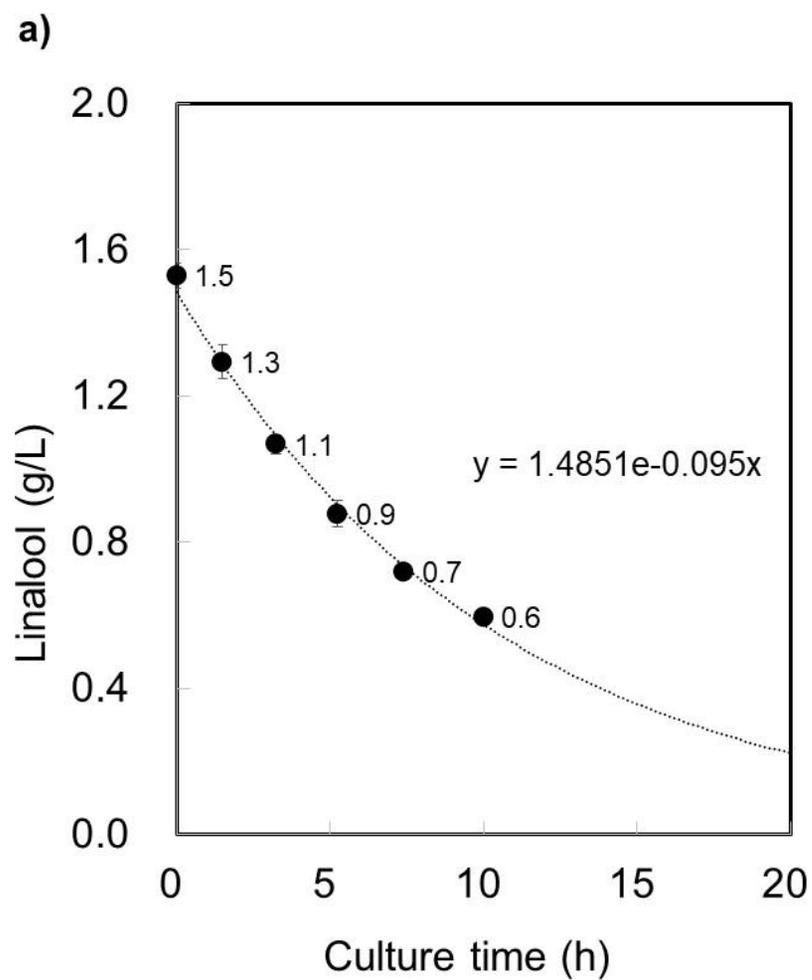


Figure 4.2 Residual linalool concentration profiles. **a)** Gradual linalool decreases in the aqueous medium over a period of time. Data are expressed as the average of two independent experiments. **b)** Typical linalool concentration profile in the isopropyl myristate phase (yellow), and aqueous medium (blue) in the two-phase fermentation system. Numerical formulas of functions indicate the approximate curved lines.

4-3-3. (S)-リナロール生産菌株の構築とその生産能の評価

2章で構築した SWITCH-PphoC 株は、テルペノイドの共通前駆体である DMAPP/IPP を供給するための異種 MVA 経路関連遺伝子を染色体上に搭載している。よって、DMAPP と IPP から GPP を経て (S)-リナロールへを生成するために必要な GPP 合成酵素 (GPPS) と AaLINS を、SWITCH-PphoC 株に共発現させることで (S)-リナロール生産菌株の構築が可能である (Fig. 4.3)。そこで、SWITCH-PphoC 株から薬剤マーカー遺伝子を除去した SWITCH-PphoC(-) 株を構築し、SWITCH-PphoC(-) 株に *P. ananatis* のコドン使用頻度に合わせて塩基配列を最適化した GPPS 遺伝子と AaLINS 遺伝子を構成発現させるためのプラスミド pAaLINS-GPPS を導入した。SWITCH-PphoC(-)/pAaLINS-GPPS 株の (S)-リナロール生産能を、試験管を用いた二相培養系で評価した結果、SWITCH-PphoC(-)/pAaLINS-GPPS 株は培養 24 時間で初発 Glc 60 g/L を全て消費したものの、その (S)-リナロール蓄積、Glc からの重量収率はそれぞれ 18 ± 2.5 mg/L、 $0.031 \pm 0.004\%$ に留まった (Table 4.3)。この時、主要副生物として 2.7 ± 0.6 g/L のグルコン酸が培地中に検出されたことから (Table 4.3)、グルコン酸生成量を低減することで、蓄積の向上が見込めると考えられた。

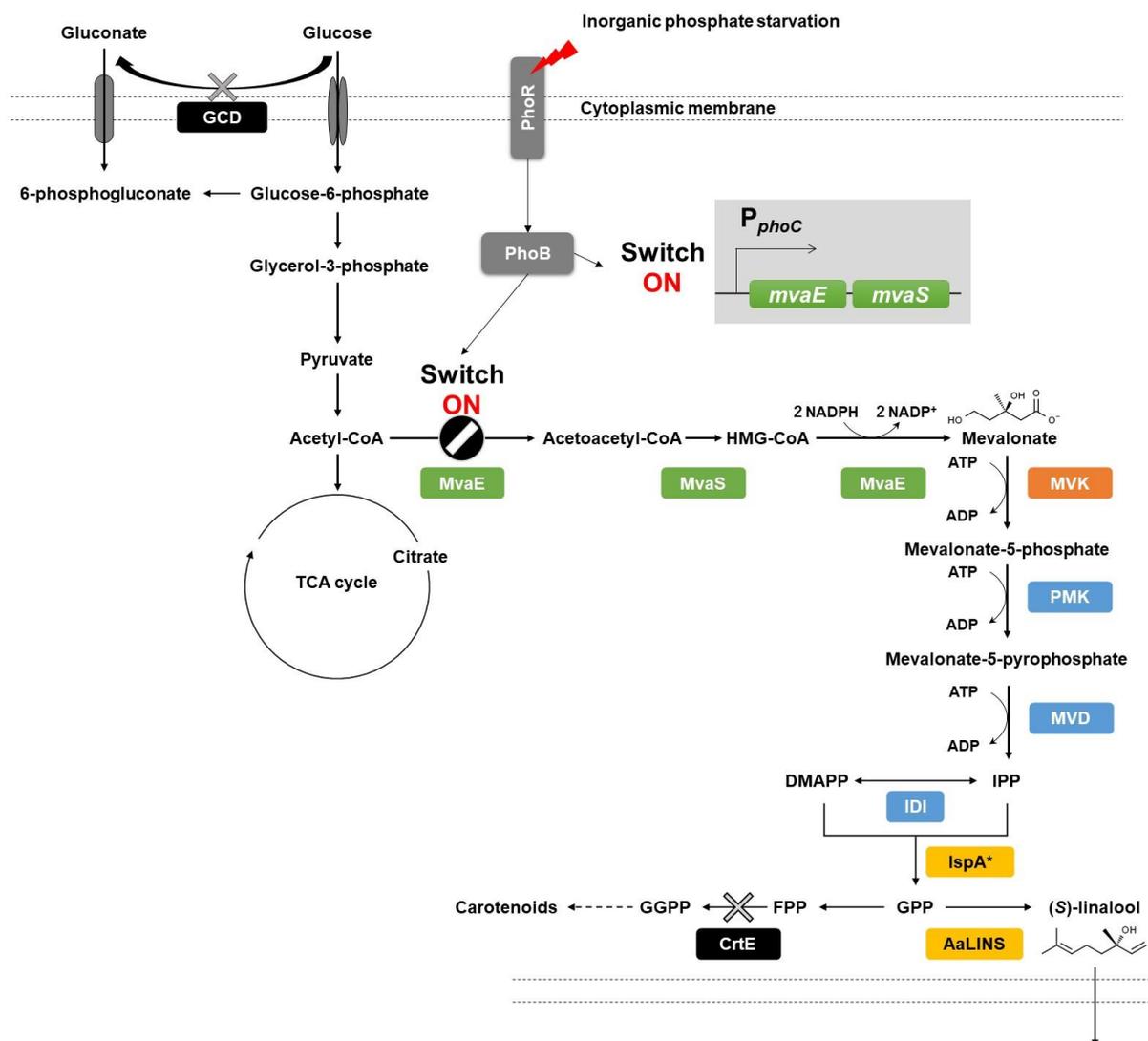


Figure 4.3 Engineered (*S*)-linalool biosynthetic pathway in *P. ananatis*. Intermediates: DMAPP, dimethylallyl pyrophosphate; FPP, farnesyl pyrophosphate; GGPP, geranylgeranyl pyrophosphate; GPP, geranyl pyrophosphate; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A; IPP, isopentenyl pyrophosphate. Genes and enzymes: AaLINS, (*S*)-linalool synthase; CrtE, GGPP synthase; IDI, IPP isomerase; IspA*, GPP synthase; GCD, membrane-bound glucose dehydrogenase; MvaE, acetoacetyl-CoA thiolase and HMG-CoA reductase; MvaS, HMG-CoA synthase; MVD, mevalonate pyrophosphate decarboxylase; MVK, mevalonate kinase; PhoB, phosphate regulon transcriptional regulatory protein; *phoC*, major phosphate-irrepressible acid phosphatase precursor; PhoR, phosphate regulon sensor protein; PMK, phosphomevalonate kinase.

4-3-4. Glc 脱水素酵素の欠損が(S)-リナロール生産に与える影響

P. ananatis SC17(0)株を Glc 含有培地で好気培養すると、膜結合型 Glc 脱水素酵素 (mGDH) の働きによってグルコン酸が Glc から生成することが報告されている³⁴。生成したグルコン酸は、グルコン酸脱水素酵素により 2-ケト-D-グルコン酸へと変換されるか、グルコン酸トランスポーターにより細胞内に取込まれエントナードドドロフ経路あるいはペントースリン酸経路へと合流する³²。そこで、グルコン酸副生量低減により(S)-リナロール生産量が向上することを期待して、mGlcDH をコードする *gcd* 遺伝子を欠損した SWITCH-PphoC Δgcd 株を構築し、これに pAaLINS-GPPS を導入した SWITCH-PphoC Δgcd /pAaLINS-GPPS 株の試験管培養評価を実施した。

その結果、SWITCH-PphoC Δgcd /pAaLINS-GPPS 株によるグルコン酸生成は認められなかったものの、(S)-リナロールの生成量は 13 ± 1.0 mg/L と、SWITCH-PphoC(-)/pAaLINS-GPPS 株の蓄積と同程度に留まった (Table 4.3)。その一方で、MVA が新たな主要副生物として検出されたため (1.9 ± 0.0 g/L)、*gcd* 欠損により Glc から MVA までの代謝流束は増大したと考えられた。また、SWITCH-PphoC Δgcd /pAaLINS-GPPS 株は SWITCH-PphoC(-)/pAaLINS-GPPS 株と異なり、培養時間を 48 時間に伸ばしても初発の Glc 60 g/L を全て消費出来なかった (40 ± 0.6 g/L)。この要因としては主に 2 つの可能性が考えられ、1 つはグルコン酸取込み系の欠如である。Glc の取込み系には、ホスホエノールピルビン酸に依存したホストランスフェラーゼシステム (PTS) と、Glc をグルコン酸、2-ケト-D-グルコン酸に酸化してから取込む 2 つの系が存在する (Fig. 4.3)。*gcd* 欠損により Glc の取込みが PTS のみに依存することになった結果、Glc 消費速度が低下した可能性が考えられた。もう一つの可能性は、*gcd* 欠損により MVA 経路への代謝流束が増大した結果、IPP など細胞毒性の高い MVA 経路中間代謝物の過剰蓄積が生じ、糖消費活性を含む菌の代謝機能が阻害された可能性である^{3 62}。*gcd* 欠損により(S)-リナロールではなく MVA の生成量が増加した点を加味すると、SWITCH-PphoC Δgcd /pAaLINS-GPPS 株の Glc 消費速度低下原因は、後者である可能性が高い。このことから、SWITCH-PphoC Δgcd /pAaLINS-GPPS 株における(S)-リナロール生合成の律速段階は MVA 生成以降の反応に在ると推察された。

4-3-5. *AaLINS* 遺伝子及び *GPPS* 遺伝子配列の同義置換による(S)-リナロール生産量向上

味の素(株)の松平らは、シアノバクテリアを用いた(S)-リナロール発酵生産の試みの中で、*AaLINS* 及び *GPPS* 遺伝子の塩基配列を *Synechocystis* sp. PCC 6803 株のコードン使用頻度に合わせて最適化し、それらを発現させるプラスミド pACYC177-*P_{tac}*-*AaLINS*-*ispA** (p*AaLINS*-*ispA**)を構築している⁵⁶。そこで、SWITCH-PphoC Δ *gcd* 株に p*AaLINS*-*ispA**を導入した SWITCH-PphoC Δ *gcd*/p*AaLINS*-*ispA**株を取得し、試験管培養によりその(S)-リナロール生産能を評価した(Table 4.3)。その結果、*P. ananatis* のコードン使用頻度に合わせて *AaLINS* 及び *GPPS* 遺伝子の塩基配列を最適化していた従来のプラスミド p*AaLINS*-*GPPS* を使用した場合に比べて、(S)-リナロール蓄積が約 260 倍に向上した(蓄積: 3.4 ± 0.2 g/L)。本蓄積向上は意図したものでなく偶発的に得られた結果であるものの、この同義置換が(S)-リナロール蓄積の向上に大きく寄与した。また、SWITCH-PphoC Δ *gcd*/p*AaLINS*-*ispA**株は SWITCH-PphoC Δ *gcd*/p*AaLINS*-*GPPS* 株と異なり、培養 48 時間の間に初発の Glc 60 g/L を全て消費した。本結果から、SWITCH-PphoC Δ *gcd*/p*AaLINS*-*GPPS* 株における(S)-リナロール生合成の律速酵素は *GPPS* あるいは *AaLINS* のいずれかであったと考えられ、p*AaLINS*-*GPPS* を p*AaLINS*-*ispA**に置換したことで、この律速が解除されたと考えられた。

Table 4.3 Test tube (*S*)-linalool fermentation profiles

Strain/plasmid	Culture time (h)	(<i>S</i>)-linalool ^a (g/L)	Consumed glucose ^a (g/L)	Yield ^b (% ^{-w/w})	Mevalonate ^a (g/L)	Gluconate ^a (g/L)
SC17(0)/pACYC177	24	ND	60 ± 0.1	-	ND	ND
SC17(0)/pAaLINS-GPPS	24	ND	60 ± 0.0	-	ND	ND
SWITCH-PphoC(-)/pACYC177	24	ND	60 ± 0.1	-	ND	4.6 ± 0.6
SWITCH-PphoC(-)/pAaLINS-GPPS	24	(18 ± 2.5) × 10 ^{-3c}	60 ± 0.0	(3.1 ± 0.4) × 10 ⁻²	ND	2.7 ± 0.6
SWITCH-PphoC <i>Δgcd</i> /pAaLINS-GPPS	48	(13 ± 1.0) × 10 ⁻³	40 ± 0.6	(3.2 ± 0.2) × 10 ⁻²	1.9 ± 0.0	ND
SWITCH-PphoC <i>Δgcd</i> /pAaLINS-ispA*	48	3.4 ± 0.2	60 ± 0.0	5.6 ± 0.3	NA	NA

All strains were cultivated for 48 h under biphasic fermentation using isopropyl myristate. Data are expressed as the mean ± SD of at least three biological replicates

^a Glucose, mevalonate, gluconate and (*S*)-linalool concentrations are represented by dividing the total amounts by the volume of aqueous culture.

^b Yield was calculated as grams of product per grams of consumed glucose and is expressed as a percentage. Carbon sources contained in 2 g/L of Bacto yeast extract was not considered in this calculation.

^c Data are expressed as mean ± SD of three independent experiments.

ND, not detected, ^eNA, not analyzed.

4-3-6. SDS-PAGE による AaLINS の細胞内発現解析

AaLINS 遺伝子並びに *GPPS* 遺伝子の塩基配列を置換したことで、(S)-リナロール生産量の顕著な増加が認められた。そこで細胞内の *AaLINS* 発現量を確認するため、SWITCH-PphoC Δ *gcd*/p*AaLINS-ispA**株と SWITCH-PphoC Δ *gcd*/p*AaLINS-GPPS* 株の細胞内発現タンパク質を用いて SDS-PAGE を実施した。CBB 染色後のゲルの写真を Fig. 4.4 に示す。SWITCH-PphoC Δ *gcd*/p*AaLINS-ispA**株の菌体破砕液(可溶性および不溶性タンパク質を含む)では *AaLINS* と思われるバンド(推定分子量: 63 kDa)が確認できたのに対し、SWITCH-PphoC Δ *gcd*/p*AaLINS-GPPS* 株の菌体破砕液では確認出来なかった。この結果から、*P. ananatis* よりも *Synechocystis sp.* PCC 6803 株のコドン使用頻度に合わせて塩基配列を最適化した方が、*P. ananatis* 細胞内の *AaLINS* 総発現量が高いことが示された。一方、SWITCH-PphoC Δ *gcd*/p*AaLINS-ispA**株で発現していた *AaLINS* の大部分は不溶性画分に認められ、*AaLINS* の大部分が不活性型の凝集体として存在していることが示唆された。このことから、*AaLINS* の可溶化が(S)-リナロール生産菌株の更なる生産能向上に繋がると期待された。

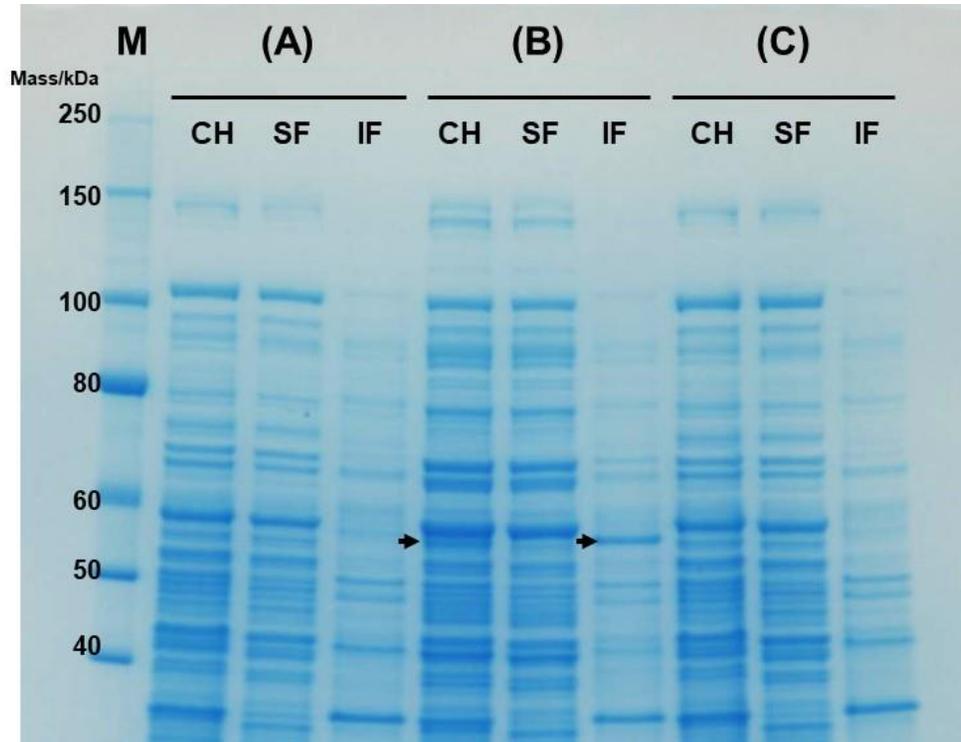


Figure 4.4 SDS-PAGE gel illustrating total, soluble, and insoluble expression of AaLINS. Samples were prepared from SWITCH-PphoC Δgcd strain harboring pACYC177 (**A**), pAaLINS-ispA* (**B**), and pAaLINS-GPPS (**C**). CH, SF, IF, and M denote crude homogenate, soluble fraction, insoluble fraction, and protein standard, respectively. Arrows indicate AaLINS (63 kDa).

4-4. 結言

本章では *P. ananatis* のリナロール耐性能と、溶存リナロールの気相への移行速度を把握し、IPM を用いた二相培養系を用いることが(S)-リナロール発酵生産に望ましいことを示した。その上で、*S* 体を 100% 選択的に生成することが知られる AaLINS と GPPS を共発現するプラスミドを構築し、SWITCH-PphoC 株に導入することで(S)-リナロール生産菌株を構築した。 P_i が培養途中から枯渇する様濃度設定した培地を用いて、二相培養系で試験管培養を行ったが、本菌株の(S)-リナロール蓄積は 18 ± 2.5 mg/L に留まった。その後、SWITCH-PphoC 株の *gcd* 遺伝子を欠損することに加えて、AaLINS 遺伝子と GPPS 遺伝子の塩基配列を *Synechocystis* sp. PCC 6803 株のコドン使用頻度に合わせて最適化することで、(S)-リナロール蓄積が 3.4 ± 0.2 g/L にまで向上した。このことから、前章までに構築してきた技術を応用することで鏡像選択的かつ高生産性の(S)-リナロール発酵生産が可能であることが示され、本技術の拡張性、汎用性を示すことが出来た。

5 章 (S)-リナロール発酵生産性の向上

5-1. 緒言

4 章で構築した SWITCH-PphoC Δ gcd/pAaLINS-ispA*株は、二相発酵系の試験管培養にて 3.4 g/L の(S)-リナロールを蓄積した。この値は、過去報告された組換え微生物によるリナロール発酵生産量を大きく上回る。その一方で、*P. ananatis* 内で発現している AaLINS の大部分が不活性型の凝集体として発現していることが明らかとなり、AaLINS の発現方法を見直すことで更なる蓄積向上が見込まれた。そこで本章では、更なる(S)-リナロール生産量の向上を目的に、まずは AaLINS の可溶化を試みた。幾つかのテルペノイド合成酵素において、N 末端に可溶性タグを融合させることでその可溶性が向上することが報告されていることから^{63,64}、AaLINS に適した可溶化タグのスクリーニングを試みた。続いて、AaLINS の直接基質である GPP 供給量向上を目的に異種 MVA 経路を強化し、Glc 流加培養によって構築した菌株の最終的な力価を確認した。

5-2. 実験材料と方法

5-2-1. 検討に用いた培地と培養条件

本文に特に記載のない限り、前項 2-2-1 と同様の材料を用いて実施した。

5-2-2. 遺伝子操作

本文に特に記載のない限り、前項 2-2-2 と同様の材料を用いて実施した。

5-2-3. 使用した菌株、プラスミド、プライマー

本章で使用した菌株とプラスミドを Table 5.1 に纏めた。各菌株にプラスミドを導入した株を、本文ではそれぞれ菌株名/プラスミド名と記載した。また、本章で使用したプライマーとその塩基配列を Table 5.2 に纏めた。

5-2-4. *P. ananatis* へのプラスミド導入

前項 2-2-6 と同様の手法で実施した。

5-2-5. CRIM プラスミド pAH162- P_{tac} -*mvk* の構築

pAH162- P_{tac} -*mvk* を鋳型にプライマーP1 と P2 の組合せで PCR を実施し、*mvk* 遺伝子を含む PCR 産物を取得した。また、pIspSM を鋳型にプライマーP3 と P4 の組合せで PCR を実施し、 P_{tac} を含むベクター側の PCR 産物を取得した。これらの PCR 産物を In-Fusion HD Cloning kit で連結することで pSTV28- P_{tac} - ϕ 10-*mvk* を構築した。次に pSTV28- P_{tac} - ϕ 10-*mvk* を鋳型とし、プライマーP5 と P6 の組合せで P_{tac} - ϕ 10-*mvk* を含む PCR 産物を取得した。これを pAH162- λ attL-Tc^R- λ attR を *Hind*III と *Pst*I で消化した DNA 断片に In-Fusion HD Cloning kit を用いて連結し、PIR2 株へ形質転換することで pAH162- P_{tac} - ϕ 10-*mvk* を得た。

5-2-6. Dual-In/Out 法による IP03 株と IP04 株の構築

前項 2-2-12 で取得した SC17(0) $\Delta L\text{-}ldh::pAH162\text{-}P_{phoC}\text{-}mvaES$ 株のゲノム DNA 断片を用いて、前項 2-2-13 と同様の操作で $\Delta L\text{-}ldh::pAH162\text{-}P_{phoC}\text{-}mvaES$ 領域を SWITCH- P_{phoC} Δgcd 株のゲノムに導入し、前項 2-2-11 記載の方法で pAH162 由来の薬剤マーカーとベクター由来の配列とプラスミドを除去することで IP03 株を構築した。次に、*kan* 遺伝子の両末端に $\phi 80$ ファージ由来の *attL* 及び *attR* 配列が付与され、更にその両外側に *adhE* 遺伝子 (locus tag: PAJ_1411) の相同領域の配列を付加した遺伝子断片を、pMWattphi を鋳型にしてプライマー *adhE*-F と *adhE*-R の組合せによる PCR を行うことで取得した。その後は、前項 2-2-8 と同様の操作、手順で SC17(0) $\Delta adhE::\phi 80 attB$ 株を取得した。

続いて、前項 2-2-10 と同様の操作で SC17(0) $\Delta adhE::\phi 80 attB$ 株に CRIM プラスミド pAH162- $P_{tac}\text{-}\phi 10\text{-}mvk$ を導入し、SC17(0) $\Delta adhE::pAH162\text{-}P_{tac}\text{-}\phi 10\text{-}mvk$ 株を構築した。この菌株のゲノム DNA 断片を前項 2-2-12 記載の方法で取得し、前項 2-2-13 と同様の操作で $\Delta adhE::pAH162\text{-}P_{tac}\text{-}\phi 10\text{-}mvk$ 領域を IP03 株のゲノムに導入し、前項 2-2-11 記載の方法に従い pAH162 由来の薬剤マーカーとベクター由来の配列とプラスミドを除去することで IP04 株を構築した。

5-2-7. 可溶化タグ融合 AaLINS 発現用プラスミドの構築

Lucigen 社から市販されている An Espresso Solubility and Expression Screening System⁶⁵ を用いて、N 末端にそれぞれの可溶化タグが付加された AaLINS を発現するためのプラスミドを付属のプロトコールに従って構築した。pAaLINS-*ispA** を鋳型にして、プライマー *Lin*-fw と *Lin*-rv を用いた PCR を行う事で *AaLINS* 遺伝子を含む DNA 断片を取得し、キット付属の線状化されたそれぞれの pSol ベクター⁶⁵ に連結した。得られた各プラスミドは Table 5.2 に纏めた。pAaLINS-*ispA** を鋳型にして、プライマー P19 と *Lin*-rv を用いた PCR を行う事で *AaLINS* 遺伝子を含む DNA 断片を取得した。この DNA 断片を、pSol-BLAAaLINS を鋳型にプライマー pSOL-fw と pSOL-rv を用いた PCR にて増幅した DNA 断片に In-Fusion HD cloning kit を用いて連結し、pSol-AaLINS を構築した。

Chromohalobacter sp. 560 株由来の β -lactamase タグ (BLA) が N 末に融合した AaLINS をコードする遺伝

子配列を含む DNA 断片を、pSol-BLAAaLINS 鋳型にプライマーHis-fw/LIS-rv を用いた PCR にて増幅し、pAaLINS-ispA*を鋳型にプライマーP-fw/P-rv を用いた PCR にて増幅した DNA 断片に In-Fusion HD cloning kit を用いて連結し、pBLAAaLINS-ispA*を構築した。なお、*Synechocystis* sp. PCC 6803 株のコドン使用頻度に合わせて最適化した *AaLINS* 遺伝子と *GPPS(ispA*)* 遺伝子の塩基配列情報は GenBank からアクセス可能である (Accession No. LX078595.1 and LX078599.1)。

5-2-8. SDS-PAGE

pSol ベクターから構築した各種プラスミドを導入した SC17(0)株を Km 含有 LB 寒天培地上に塗布し、16 時間培養した。寒天培地上のシングルコロニーを 3 mL の Km 含有 LB 液体培地 (0.4 g/L Glc、4 g/L ラムノース含む) を張り込んだ試験管に植菌し、30°C で 21 時間振盪培養した (120 rpm)。得られた培養液から前項 4-2-11 記載の方法で菌体破砕液、可溶性画分、不溶性画分を得た。得られた可溶性画分中のタンパク質濃度を Pierce 660 nm Protein Assay Kit でそれぞれ定量した。その後、10 µg のタンパク質を含む可溶性画分サンプルを用いて、泳動時間を 90 分に変更した以外は前項 4-2-11 記載の方法に従い、SDS-PAGE を行った。菌体破砕液と不溶性画分サンプルに関しては、対応する可溶性画分サンプルと同液量をゲルにアプライして泳動した。分子量マーカーには An XL-Ladder Broad (intégrale 社) を用いた。泳動後のゲルをタッパーに移し、InVision His-Tag In-Gel Stain (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて付属のプロトコールに従い、ポリヒスチジンタグが付加したタンパク質を抗ポリヒスチジンラベル (nickel-nitrilotriacetic acid) にて直接ラベルし、Amersham™ Imager 600 (GE ヘルスケア社) を用いて 520 nm の蛍光を検出した。その後、ゲルを再度タッパーに移し、CBB 染色を行った。

5-2-9. 菌体破砕液中の AaLINS 酵素活性測定

前項 5-2-8 で取得した可溶性画分サンプルをタンパク質濃度 300 mg/L となるよう Extraction buffer (50 mM MOPS [pH 7.0], 10 mM MgSO₄·5H₂O, 10%^{v/v} glycerol, 1 mM dithiothreitol) で希釈し、終濃度 15 µM となるように GPP lithium salt (Sigma-Aldrich 社) を添加した 1 mL の反応液を調整した。菌体破砕液を反応に用い

る場合は、対応する可溶性画分サンプルと同液量を反応液中に添加し、1 mL の反応液を調整した。これらをそれぞれ 22-mL Crimp Top vial (Perkin Elmer 社) に移し、20 mm Crimp Top Aluminum Silver Cap with PTFE/Butyl Septa (Perkin Elmer 社) で密閉した後、30°C で 26 時間往復振盪した (120 rpm)。反応終了時に注射器を用いてバイアルに 0.2 mL の IPM を添加し、激しくバイアルを vortex することで IPM 相に (S)-リナロールを抽出した。バイアルを開封し IPM 相を一部回収してエタノールで 5 倍希釈したものを (S)-リナロールの定量分析に用いた。

5-2-10. 試験管を用いた (S)-リナロール発酵

前項 4-2-10 記載の方法に従った。培養時間は 48 時間とした。

5-2-11. 1L 容 jar を用いた Glc 流加培養

培養する菌株は Km 含有 LB 寒天培地上に塗布し、16 時間培養した。寒天培地上に生育した菌体全量をエーゼ (ループ容積 10 μ L) で直接 1 L 容 jar (ABLE 社: BMJ-01NP) 中の Glc-KP 培地 300 mL (44 g/L glucose, 1.1 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.1 g/L trisodium citrate, 2.2 g/L Bacto yeast extract, 1.8 g/L KH_2PO_4 , 1.1 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 11 mg/L $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, 11 mg/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 mL/L GD-113K and 50 mg/L Km) に接種し、培養開始と同時に IPM を 30 mL 添加した。培養 pH はアンモニアガスを用いて 6.8 ± 0.2 に維持し、培地中の DO_2 はガルバニ式 DO_2 電極で計測し、攪拌強度の変更により 25% 以上 (飽和溶存酸素を 100% とする) を維持した。培養温度は培養開始後 15 時間目までは 34°C で管理し、以降は 30°C に維持した。通気量は 1 vvm とし、72 もしくは 81 時間培養を行った。培養排ガス中の O_2 及び CO_2 濃度は Exhaust oxygen carbon dioxide meter Model EX-1562-1 (Able & Biott 社) を用いて分析した。培養開始 9 時間目からは 700 g/L Glc フィード溶液 (0.7 mL GD-113K 含む) を連続的に供給した。培地中の Glc 濃度を 5 g/L 以上に維持するため、IP04/pBLAAaLINS-ispA* 株ではフィードレートを 1.5 mL/h、SWITCH-PphoC Δgcd /pAaLINS-ispA* 株ではフィードレートを約 2.0 mL/h 一定とした。培地の殺菌は前項 3-2-11 記載の方法に従った。

5-2-12. Glc 濃度、MVA、(S)-リナロールの分析

基本は前項 4-2-10 記載の方法に従った。リナロールのキラリティ分析は以下の通り実施した。1.5 mL 容の Safe lock tube に採取した培養液遠心分離(21,600 × g、4°C、5 分)して取得した IPM 相を GC-MS (Agilent 7890A GC and 5975C MSD, Agilent Technologies 社)を用いて以下の条件で分析した。カラムには chiral GC capillary column Rt-bDEXsm (RESTEK Corporation 社、diameter, 0.25 mm; length, 30 m; thickness, 0.25 μm)、キャリアガスにはヘリウムガスを用いた。注入口温度は 230°Cとし、カラム温度は 115°Cで 10 分保持した後、225°Cまで 1 分毎に 10°C昇温し、225°Cで 9 分間保温した。(R)、(S)-リナロールを含む試薬リナロール(富士フイルム和光純薬社、カタログコード:126-00993)と(R)-リナロール試薬(Sigma-Aldrich 社、カタログコード: 62139-25ML)を用いて、R 体、S 体それぞれの保持時間を特定した。

Table 5.1 Bacterial strains and plasmids used for strain construction

Strain or plasmid	Description	Antibiotic resistance ^a	Source or reference
Strain			
<i>Escherichia coli</i>			
JM109	Competent cells for plasmid cloning	–	Takara Bio
PIR2	Competent cells for plasmid cloning	–	Invitrogen
E. cloni [®] 10G	<i>F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) endA1 recA1</i> <i>φ80dlacZΔM15 Δlac×74 araD139 Δ(ara,leu)7697 galU</i> <i>galK rpsL nupGλ⁻ tonA</i>	–	Lucigen 65
<i>Pantoea ananatis</i>			
SC17(0)	λ Red resistant strain	–	33
SWITCH-PphoC Δgcd	SC17(0) ΔampC::P _{tac} -KDyI ΔampH::P _{phoC} -mvaES ΔcrtEXYIB-crtZ::P _{tac} -mvk Δgcd	–	This study
IP03	SWITCH-PphoC Δgcd ΔL-ldh::P _{phoC} -mvaES	–	This study
IP04	IP03 ΔadhE::P _{tac} -φ10-mvk	–	This study
SC17(0) ΔL-ldh::φ80attB	SC17(0) ΔL-ldh::φ80attB	–	This study
SC17(0) ΔadhE::φ80attB	SC17(0) ΔadhE::φ80attB	–	This study
SC17(0) ΔL-ldh::pAH162-P _{phoC} -mvaES	SC17(0) ΔL-ldh::pAH162-P _{phoC} -mvaES	Tet	This study
SC17(0) ΔadhE::pAH162-P _{tac} -φ10-mvk	SC17(0) ΔadhE::pAH162-P _{tac} -φ10-mvk	Tet	This study
Plasmid			
pACYC177-P _{tac} -AaLINS-ispA* (pAaLINS-ispA*)	pACYC177 derivative for expression of AaLINS and GPPS whose sequences are optimized for the codon-usage of <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 under the control of <i>tac</i> promoter	Km	56
pBLAAaLINS-ispA*	pAaLINS-ispA* derivative for expression of the gene of AaLINS fused with β-lactamase from <i>Chromohalobacter</i> sp. 560 joined to hexahistidine and <i>ispA</i> *	Km	This study
pSol-AaLINS	pSol plasmid for expression of AaLINS under the control of a rhamnose-inducible promoter	Km	This study
pSol-HisAaLINS	pSol plasmid for expression of hexahistidine-tagged AaLINS	Km	This study
pSol-BLAAaLINS	pSol plasmid for expression of AaLINS fused with β- lactamase from <i>Chromohalobacter</i> sp. 560 joined to hexahistidine	Km	This study
pSol-AFVAaLINS	pSol AFV derivative for expression of AaLINS fused with	Km	This study

	the AFV1–99 protein from <i>Acidianus filamentous virus 1</i> and a rhamnose-inducible promoter		
pSol-MBPAAaLINS	pSol MBP derivative for expression of AaLINS fused with the Maltose-Binding Protein and a rhamnose-inducible promoter	Km	This study
pSol-SlyDAaLINS	pSol SlyD derivative for expression of AaLINS fused with the FKBP-type peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> isomerase-tag and a rhamnose-inducible promoter	Km	This study
pSol-SUMOAAaLINS	pSol SUMO derivative for expression of AaLINS fused with the Small Ubiquitin-like Modifier and a rhamnose-inducible promoter	Km	This study
pSol-TsfAAaLINS	pSol Tsf derivative for expression of AaLINS fused with the <i>E. coli</i> elongation factor and a rhamnose-inducible promoter	Km	This study
pAH162- <i>P_{phoC}-mvaES</i>	CRIM plasmid ^b	Tet	This study
pAH162- <i>P_{tac}-φ10-mvk</i>	Derivative of pAH162- <i>P_{tac}-mvk</i>	Tet	This study
pAH129-cat	φ80Int/Xis expression plasmid ^d	Cm	34
pAH123-cat	φ80Int expression plasmid	Cm	34
pAH162- <i>λattL</i> - <i>Te^R-λattR</i>	CRIM plasmid	Tet	41
pMWattphi	φ80 <i>attL</i> -Km ^R -φ80 <i>attR</i> cassette donor	Amp, Km	41
pRSFredTER	λ Red proteins expression plasmid	Cm	33
pRSF- <i>P_{ara}</i> -IX	λ Xis/Int expression plasmid ^e	Cm	42
pACYC177	Plasmid vector with a replication origin of p15A	Amp, Km	Nippon Gene

^aAmp, ampicillin; Cm, chloramphenicol; Km, kanamycin; Tet, tetracycline.

^bCRIM plasmid, conditional replication, integration, and modular plasmid.

^dInt, gene encoding integrase; Xis, gene encoding excisionase.

Table 5.2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5' to 3')
P-fw	GATTCCAGTAGCTAATTTACACAGGAGACTGCCATGGATTTTCCCCAGCAGCTGGAAGCCTGCGTG AAACAGGCCAA
P-rv	GTGGTGATGATGCATGGCAGTCTCCTTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACGATTCCACACATTATACG AGCCGATGATTAATT
Lin-fw	AATCTGTA CTCCAGGGTTCCACCGCCGTGCCCTCTATGCCCA
Lin-rv	GTGGCGGCCGCTCTATTAGCTACTGGAATCATAACAACATGGTTTT
His-fw	ATGCATCATCACCACCATCAC
LIS-rv	TTAGCTACTGGAATCATAACAACATGGT
adhE-F	GGATTCAGGCTTGTTTACTAAAAAAGTTAACTTCCTCAGGAGAGCACAGAAAGGTCATTTTCTGA ATATGCTACA
adhE-R	ACGGGCCAGACAAGGGGTTTCGGCAGCCCGTTCATCGGGCGCGGAGCGGATCGTTTGTGACAGCTGG TCCAATG
P1	GAAGGAGATATAATGACGATGTGTTTCAGCCCCGGTAAGG
P2	GCCAGTGAATTCTTATTGGATGAATATCCCTCCGCCGTT
P3	CATTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAA
P4	TAAGAATTC ACTGGCCGTCGTTTTACAACG
P5	GGCCAGTGCCAAGCTTCTCGGTACCAGATCTCCCTGTTGA
P6	CCTCTAGAGTCGACCTGCAGTGTA AACGACGGCCAGTGAATTC
P19	GGAGATATACATATGTCCACCGCCGTGCCCTCTATGCCCA
pSOL-fw	CATATGTATATCTCCTTCTTATAGTTAAAC
pSOL-rv	TAATAGAGCGGCCGCCACCGCTGAGCAATA

5-3. 結果と考察

5-3-1. AaLINS の N 末端への可溶化タグ融合による AaLINS の可溶性向上検討

AaLINS に限らず、バクテリアの菌体内で真核生物由来の異種タンパク質を発現させる際、正しいフォールディングが出来ずに凝集体を形成し、活性を示さないことがある⁶⁵。本課題の解決策の一つが、溶解性が高いペプチドやタンパク質を目的タンパク質の N 末端に付加し、発現タンパク質の可溶性を向上させる方法である⁶⁵。テルペノイド合成酵素に関しても、*Chrysopogon zizanioides* 由来の(+)-ジザエンシンターゼの N 末端に SUMO タンパク質を融合させること、*Callitropsis nootkatensis* 由来のバレンセンシンターゼの N 末端にマルトース結合タンパク質 (MBP) を融合させることで、可溶性が向上する例が報告されている^{63 64}。そこで、AaLINS に適切な可溶化タグを探索、選定するため、キット化された pSOL ベクター⁶⁵ を用いて、既知の可溶性タグ AFV1-99 protein from *Acidianus filamentous virus 1*、*Chromohalobacter* sp. 560 株由来 β -lactamase (BLA)、MBP、FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase、SUMO タンパク質、*E. coli* elongation factor に関して、これらの融合発現が AaLINS の可溶性を向上させるか評価した。ラムノースを含む培地で培養することで、それぞれの可溶化タグが付加した AaLINS の誘導発現が可能であり、それぞれのタグの N 末にはポリヒスチジンタグ (6×His) が付加されている⁶⁵。対照として、タグを付加していない AaLINS 並びに 6×His のみ付加された AaLINS (6×His-AaLINS) を発現するプラスミドも構築し、SC17(0)株に導入した (SC17(0)/pSol-AaLINS 株、SC17(0)/pSol-HisAaLINS 株)。それぞれの可溶化タグが付加された AaLINS を発現する菌株の細胞破碎液を用いて SDS-PAGE を実施した結果、AaLINS 並びに 6×His-AsLINS のバンドは可溶性画分には認められなかったのに対し、6×His-BLA を付加した AaLINS (推定分子量: 105 kDa) に関しては、CBB 染色、6×His 検出用の蛍光染色両方で可溶性画分にバンドが確認できた (Fig. 5.1)。また、6×His を含む評価した 7 種類のタグ融合 AaLINS は、いずれも AaLINS に対して細胞内の総発現量が向上していた (Fig. 5.1)。この結果から、N 末端への 6×His 単独付加でも AaLINS の発現量が向上することが示されたのと同時に、6×His-BLA の付加が AaLINS の細胞内の総発現量、可溶性向上の両方に有効であることが示された。なお、その他の 5 つの可溶化タグの付加による可溶性向上は認められなかった (Fig. 5.1)。

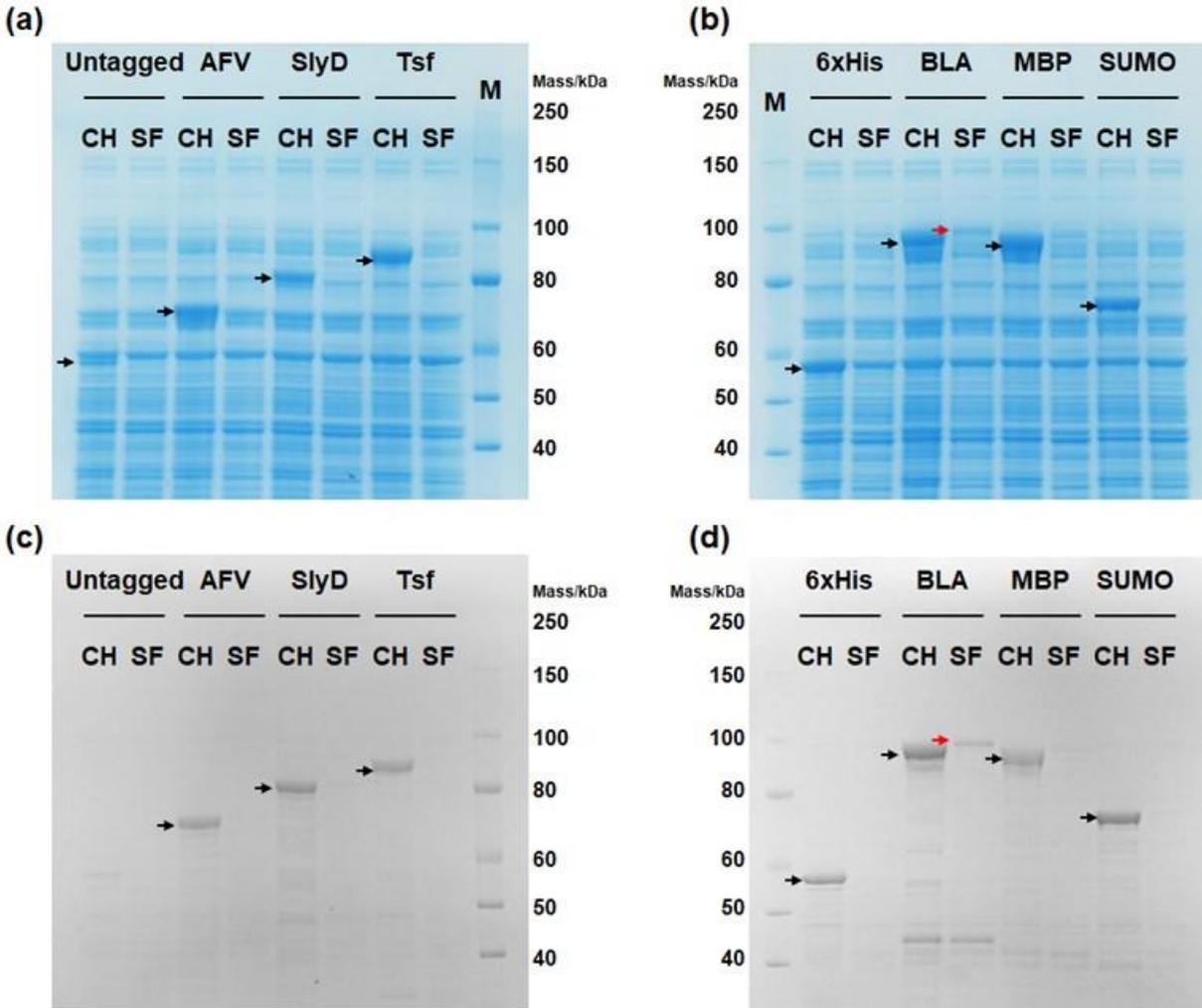


Figure 5.1 SDS-PAGE gels illustrating total and soluble expression levels of solubility-tag fused AaLINS variants. **(a), (b)** Gels stained with Coomassie Brilliant Blue; **(c), (d)** Gels stained with an anti-polyhistidine label (a fluorescent dye conjugated to nickel-nitrilotriacetic acid complex). CH, SF, and M denote crude homogenate, soluble fraction, and protein standard, respectively. Samples were prepared from SC17(0) harboring each pSol plasmid grown in LB medium containing rhamnose. Each applied sample contained 10 μ g of soluble proteins. Arrow shows each AaLINS variant. AFV, AFV1–99 protein from *Acidianus filamentous virus 1*; BLA, halophilic β -lactamase from *Chromohalobacter* sp. 560; 6xHis, hexahistidine; MBP, maltose binding protein; SlyD, FKBP-type peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase; SUMO, small ubiquitin-like modifier; Tsf, *E. coli* elongation factor.

5-3-2. 6×His-BLA 融合が AaLINS の活性及び反応特異性に与える影響の確認

6×His-BLA 付加により AaLINS の可溶性は向上したものの、6×His-BLA が N 末端に付加した状態で AaLINS が酵素活性を維持している保証はない。よって、6×His-BLA 融合 AaLINS が酵素活性を保持しているか、6×His-BLA 付加による可溶性向上が細胞内 AaLINS 活性の向上に繋がっているかを確認するため、in vitro アッセイを実施した。具体的には、SC17(0)/pSol-AaLINS 株、SC17(0)/pSol-HisAaLINS 株、SC17(0)/pSol-BLAAaLINS 株の細胞破碎液(可溶性画分と不溶性画分を含む)、もしくはその可溶性画分を、基質である GPP と補因子 (Mg^{2+}) を含む反応液に添加し、26 時間 30°C で反応させた後、生成した(S)-リナロール量を測定した。その結果、反応に可溶性画分を用いた場合、SC17(0)/pSol-AaLINS 株、SC17(0)/pSol-HisAaLINS 株、SC17(0)/pSol-BLAAaLINS 株のサンプルそれぞれで 273 ± 23 、 241 ± 3 、 550 ± 45 $\mu\text{g/L}$ の(S)-リナロールが検出され (Fig. 5.2)、細胞破碎液を用いたアッセイではそれぞれ 339 ± 15 、 514 ± 26 、 669 ± 80 $\mu\text{g/L}$ の(S)-リナロールが検出された (Fig. 5.2)。このことから、6×His 付加が AaLINS の総発現量の向上に寄与していることが改めて示され、前項 5-3-1 で実施した SDS-PAGE の結果を支持した。また、不溶性画分中に存在する AaLINS の一部は機能を失っておらず、活性を有していることも示唆された。更に、SC17(0)/pSol-BLAAaLINS 株の細胞破碎液を用いた場合、SC17(0)/pSol-AaLINS 株の細胞破碎液を用いた場合と比べて(S)-リナロール生成量が約 2 倍に向上したことから、6×His-BLA 付加が細胞内の AaLINS 活性向上に繋がることが明らかとなった。

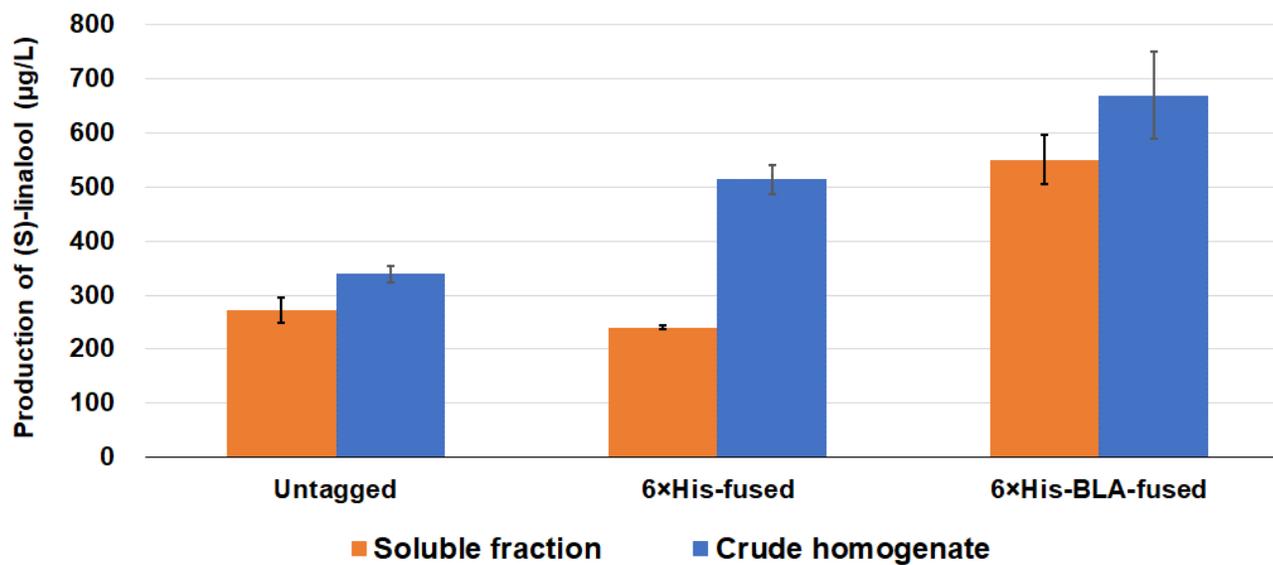


Figure 5.2 In vitro biotransformation assay with samples prepared from SC17(0)/pSol-AaLINS, SC17(0)/pSol-HisAaLINS, and SC17(0)/pSol-BLAAaLINS. The strains were grown in LB medium containing rhamnose. Each reaction mixture contained 300 mg/L of soluble proteins. Data represent the average of three biological replicates, and error bars represent the standard deviation.

5-3-3. 6×His-BLA 融合 AaLINS 使用と MVA 経路の強化による(S)-リナロール生産量向上検討

6×His-BLA 融合 AaLINS 使用による(S)-リナロール生産能への影響を検証するため、6×His-BLA 融合 AaLINS と GPPS を発現するプラスミド pBLAAaLINS-ispA*を構築し、SWITCH-PphoC Δ gcd に導入した (SWITCH-PphoC Δ gcd/pBLAAaLINS-ispA*株)。試験管培養により本菌株の力価評価を実施したが、(S)-リナロール生産量は 3.0 ± 0.0 g/L と、SWITCH-PphoC Δ gcd/pAaLINS-ispA*株の生産量 (3.4 ± 0.2 g/L)と同程度に留まった (Table 5.3)。このことから、6×His-BLA 融合により細胞内 AaLINS 活性が向上した結果、(S)-リナロール生合成における律速が AaLINS の細胞内活性から AaLINS の直接基質である GPP 供給に移ったと考え、IPP/DMAPP (GPP) 供給量を向上させる目的で MVA 経路関連酵素の発現量向上を試みた。SWITCH-PphoC Δ gcd 株の染色体上に *mvaES* オペロン発現用の遺伝子カセットを更に 1 コピー導入した IP03 株、IP03 株の染色体上に *mvk* 発現用の遺伝子カセットを更に 1 コピー導入した IP04 株を構築した。続いてこれらの菌株に pBLAAaLINS-ispA*を導入し、試験管培養によってその(S)-リナロール生産能を評価した。その結果、IP03/pBLAAaLINS-ispA*株、IP04/pBLAAaLINS-ispA*株は共に初発の Glc 60 g/L を培養 48 時間で全て消費し、それぞれ 4.0 ± 0.2 g/L、 4.7 ± 0.3 g/L の(S)-リナロールを生産した。また、この時の Glc からの重量収率はそれぞれ $6.6 \pm 0.4\%$ 、 $7.9 \pm 0.2\%$ であった (Table 5.3)。IP04/pBLAAaLINS-ispA*株の(S)-リナロール生産量は SWITCH-PphoC Δ gcd/pAaLINS-ispA*株のそれと比べて約 1.4 倍に向上したことから、SWITCH-PphoC Δ gcd/pBLAAaLINS-ispA*株における(S)-リナロール生産の律速は GPP 供給であったという仮説が支持された。

同時に、IP03/pAaLINS-ispA*株、IP04/pAaLINS-ispA*株も試験管培養することでより詳細な解析を行った。その結果、SWITCH-PphoC Δ gcd/pAaLINS-ispA*株、IP03/pBLAAaLINS-ispA*株及び IP04/pBLAAaLINS-ispA*株とは異なり、IP03/pAaLINS-ispA*株と IP04/pAaLINS-ispA*株は培養 48 時間以内に初発 Glc 60 g/L を完全に消費しきれず、それぞれの糖消費量は 43 ± 0.6 g/L、 36 ± 0.6 g/L に留まった。また、それぞれの菌株の(S)-リナロール生産量は 0.8 ± 0.0 g/L、 1.0 ± 0.0 g/L であった (Table 5.3)。この結果から、SWITCH-PphoC Δ gcd/pBLAAaLINS-ispA*株とは異なり、IP04/pAaLINS-ispA*株の(S)-リナロール生合成における律速は AaLINS 活性であったと考えられた。また、IP03/pAaLINS-ispA*株、IP04/pAaLINS-ispA*株の Glc 消費速度

の低下は、AaLINS の細胞内活性が十分でないことに伴い、細胞毒性の高い中間代謝物(IPP、DMAPP など)が細胞内に過剰に蓄積したことが原因と考えられた。AaLINS を有さない、空ベクターを発現させた SWITCH-PphoC $\Delta gcd/pACYC177$ 株、IP04/pACYC177 株も培養 48 時間以内に初発 Glc 60 g/L を完全に消費しきれなかったことから(43 ± 3.3 g/L、38 ± 1.7 g/L、Table 5.3)、本推察は尤もらしいと言える。以上を纏めると、6×His-BLA 融合による AaLINS 細胞内活性の向上、MVA 経路強化による GPP 供給能向上、それぞれ単独のアプローチのみでは達成できなかった(S)-リナロール生産量向上が、2 つのアプローチを組み合わせることではじめて達成出来た。

6×His-BLA 融合 AaLINS の生成物が 100% S 体であるか確認するため、SWITCH-PphoC $\Delta gcd/pBLAAaLINS-ispA$ *株の試験管培養液の IPM 相を、キラルカラムを用いたガスクロマトグラフィー質量分析した。その結果、培養液中からは(S)-リナロールのピークのみが認められ、(R)-リナロールのピークは認められなかった(Fig. 5.3)。また、本ピークのマススペクトル測定により、生成物がリナロールであることも確認出来(Fig. 5.3)、6×His-BLA が付加した状態でも AaLINS は 100%選択的に S 体のリナロールを生成することが明らかとなった。

Table 5.3 (*S*)-Linalool production in test-tube cultivation

Host strain	Plasmid	(<i>S</i>)-linalool (g/L) ^a	Consumed glucose (g/L) ^a	Yield (%) ^b
SWITCH-PphoC Δgcd	pACYC177	ND ^c	43 \pm 3.3	-
SWITCH-PphoC Δgcd	pAaLINS-ispA*	3.4 \pm 0.2	60 \pm 0.0	5.6 \pm 0.3
SWITCH-PphoC Δgcd	pBLAAaLINS-ispA*	3.0 \pm 0.0	60 \pm 0.0	5.0 \pm 0.0
IP03	pAaLINS-ispA*	0.8 \pm 0.0	43 \pm 0.6	1.9 \pm 0.0
IP03	pBLAAaLINS-ispA*	4.0 \pm 0.2	60 \pm 0.0	6.6 \pm 0.4
IP04	pACYC177	ND	38 \pm 1.7	-
IP04	pAaLINS-ispA*	1.0 \pm 0.0	36 \pm 0.6	2.8 \pm 0.1
IP04	pBLAAaLINS-ispA*	4.7 \pm 0.3	60 \pm 0.0	7.9 \pm 0.2

All strains were cultivated for 48 h under two-phase fermentation using isopropyl myristate. Data are expressed as the mean \pm SD of at least three biological replicates.

^aGlucose and (*S*)-linalool concentrations are represented by dividing the total amounts by the volume of aqueous culture.

^bYield was calculated as grams of product per grams of consumed glucose and is expressed as a percentage. Carbon sources contained in 2 g/L of Bacto yeast extract was not considered in this calculation.

^cND, Not detected.

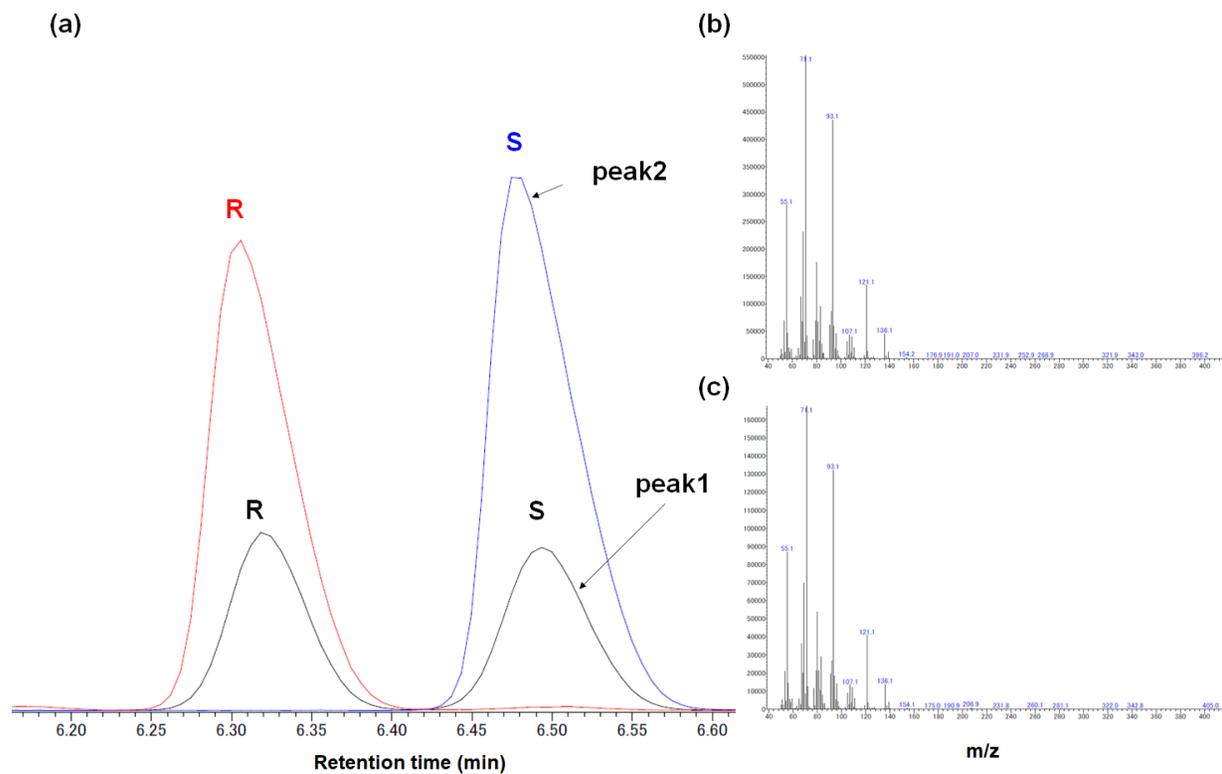


Figure 5.3 Identification of the absolute configuration of linalool. **(a)** GC–MS profiles with a chiral column. Black line, standard of racemic linalool; Red line, standard of (*R*)-linalool; Blue line, linalool produced by SWITCH-PphoC Δ *gcd*/pBLAAaLINS-ispA*. **(b)** Mass spectrum of the peak of (*S*)-linalool in the racemic linalool reagent, which is indicated with black arrow (peak 1). **(c)** Mass spectrum of the peak of linalool produced by strain SWITCH-PphoC Δ *gcd*/pBLAAaLINS-ispA*, indicated with blue arrow (peak 2).

5-3-4. IP04/pBLAAaLINS-ispA*株の Glc 流加培養評価

6×His-BLA 付加による細胞内 AaLINS 活性向上と MVA 経路上流遺伝子の発現強化による GPP 供給量向上、この2つのアプローチを組み合わせ構築した IP04/pBLAAaLINS-ispA*株は、試験管培養で 4.7 g/L の(S)-リナロールを蓄積した。そこで、実際の商業規模での発酵生産に広く利用されている Glc 流加培養にて、IP04/pBLAAaLINS-ispA*株の力価を改めて評価した。1L 容 jar を用いて、3 章でイソプレン発酵に利用した細胞外 P_i に依存した dual-phase 発酵プロセスに二相発酵系を当てはめ、SWITCH-PphoC $\Delta gcd/pAaLINS-ispA^*$ 株(対照菌株)と共に培養した。その培養結果を Fig. 5.4 に示す。二相発酵系では培養液中に生じる oil-in-water emulsion⁶⁶ の存在により、OD₆₀₀ 値を菌体密度の指標として用いることができない。そこで、ここでは発酵排ガス中の CO₂ 濃度(ExCO₂)を培養液中の菌体活性(槽内菌体量 × 菌体あたりの酸素比消費速度)の指標として用いた。培養開始後 13 時間目までは ExCO₂ の経時プロファイルは SWITCH-PphoC $\Delta gcd/pAaLINS-ispA^*$ 株と IP04/pBLAAaLINS-ispA*株で違いはなく(Fig. 5.4a)、遺伝子型の違いによって菌体増殖速度に差はないことが示された。

両菌株の ExCO₂は培養開始後 13 時間目から低下したことから(Fig. 5.4a)、このタイミングで培地中の P_i が枯渇したと考えられた。 P_i 枯渇区間では IP04/pBLAAaLINS-ispA*株の ExCO₂ は SWITCH-PphoC $\Delta gcd/pAaLINS-ispA^*$ 株の ExCO₂ よりも常に低く推移した(Fig. 5.4a)。この結果から、SWITCH-PphoC $\Delta gcd/pAaLINS-ispA^*$ 株に比べて IP04/pBLAAaLINS-ispA*株は、従来 TCA 回路(主要な CO₂ 生成経路)へと流入していたアセチル-CoA を、より MVA 経路へと引き込んでいたと考えられた。

SWITCH-PphoC $\Delta gcd/pAaLINS-ispA^*$ 株は、培養 60 時間目まで IP04/pBLAAaLINS-ispA*株よりも(S)-リナロールを多く生産したものの、培養 72 時間目にはその関係は逆転した(Fig. 5.4b)。SWITCH-PphoC $\Delta gcd/pAaLINS-ispA^*$ 株よりも IP04/pBLAAaLINS-ispA*株の糖消費量は少ないにも関わらず(81.4 g と 63.5 g、Fig. 5.4c)、IP04/pBLAAaLINS-ispA*株は 9.3 g/L の(S)-リナロールを蓄積した。それに対し、SWITCH-PphoC $\Delta gcd/pAaLINS-ispA^*$ 株の(S)-リナロール蓄積は 7.7 g/L に留まった。SWITCH-PphoC $\Delta gcd/pAaLINS-ispA^*$ 株と異なり、IP04/pBLAAaLINS-ispA*株の(S)-リナロール蓄積は培養 72 時間目においても直線的に増加していたため(Fig. 5.4b)、その培養時間を 81 時間まで延長した結果、最終的に IP04/pBLAAaLINS-ispA*

株は 10.9 g/L の(S)-リナロールを蓄積した。また、培養終了時に 7.2 g/L の MVA が培地中(水相)に検出されたことから、IP04/pBLAAaLINS-ispA*株における(S)-リナロール生合成の律速段階は依然 MVA 生成移行の反応にあると考えられ、更なる収率、蓄積の向上には AaLINS を含む MVA 酸経路下流の改変が必要と考えられた。

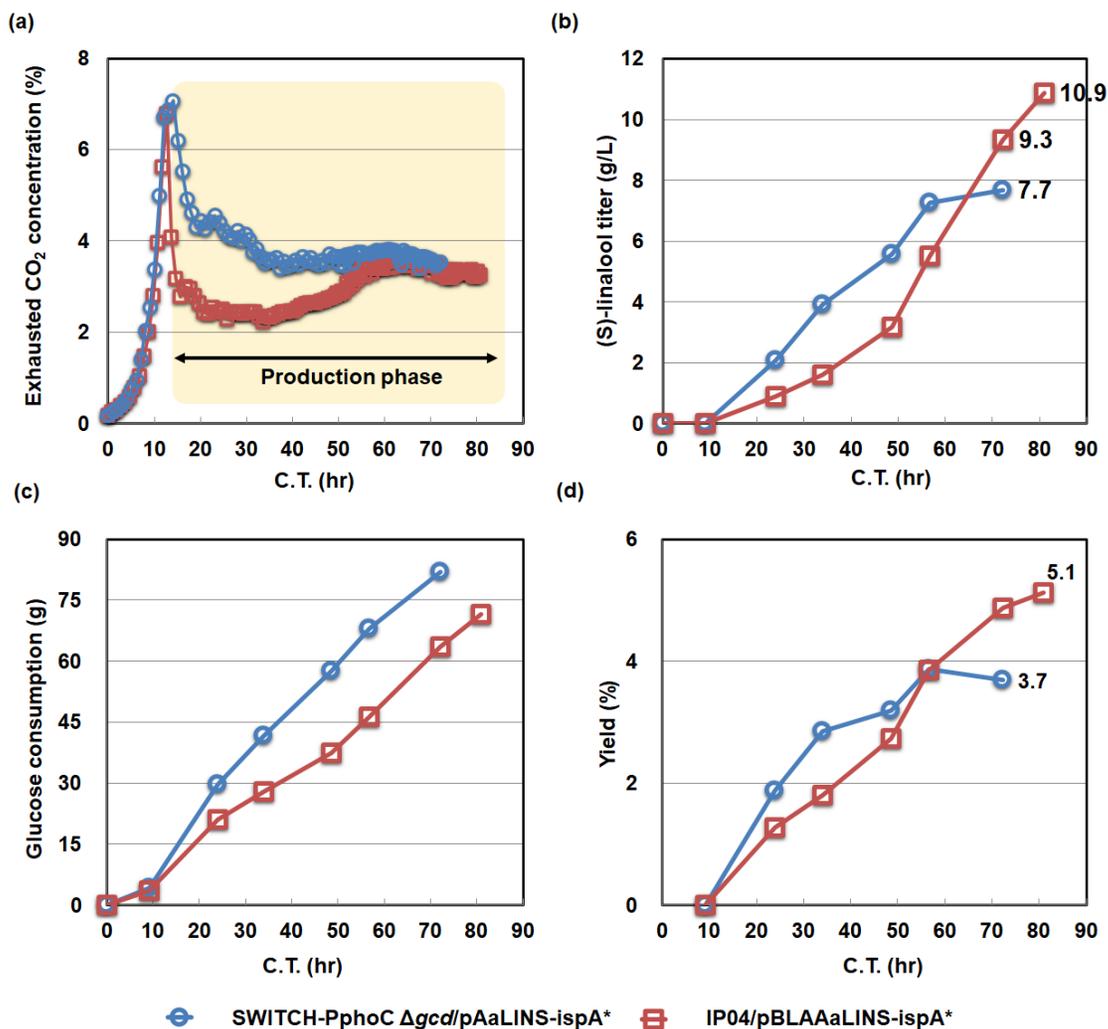


Figure 5.4 Typical time-course profiles of fed-batch fermentation of SWITCH-PphoC $\Delta gcd/pAaLINS-ispA^*$ and IP04/pBLAAaLINS-ispA*. (a) CO₂ concentration (%) in the exhausted gas; (b) (S)-linalool titer (g/L); (c) Consumed glucose amount (g); (d) Yield from glucose (%-w/w).

5-4. 結言

本章では、①細胞内 AaLINS 活性の向上、②MVA 経路を介した GPP 供給量の向上、③P_i 依存的 dual-phase 発酵プロセス、3 つのアプローチを組み合わせることで(S)-リナロール蓄積の更なる向上を目指した。本章では AaLINS の N 末端に 6×His-BLA を付加することで、その可溶性が向上することを明らかとし、細胞内 AaLINS 活性の向上に有効であることを示した。また、N 末端に 6×His-BLA が付加していても AaLINS の鏡像選択性は失われないことも確認した。AaLINS の直接基質である GPP 供給量の増加を期待して、SWITCH-PphoC Δ gcd 株に *mvaES* オペロン発現用と *mvk* 遺伝子発現用の遺伝子カセットを更に 1 コピーずつ染色体に導入した IP04 株に 6×His-BLA 融合 AaLINS と GPPS 共発現プラスミドを導入した結果 (IP04/pBLAAaLINS-ispA*株)、試験管培養にて SWITCH-PphoC Δ gcd/pAaLINS-ispA*株の 1.4 倍の(S)-リナロール蓄積を示した。更に、Glc 流加培養では IP04/pBLAAaLINS-ispA*株の(S)-リナロール蓄積は 10.9 g/L に達し、リナロールを含むモノテルペノイドの発酵生産事例として過去最高の蓄積を達成した。

6 章 総括

本章では、研究成果を総括すると同時に本技術の今後の展望に関して記載する。微生物は味噌や醤油などの発酵食品に限らず、アミノ酸や抗生物質など様々な有用物質の生産に利用されてきた。近年は、代謝工学や合成生物学の興隆に加え、次世代シーケンサーやオミックス解析に代表される新たな技術の登場により、自然由来の希少性の高い成分を発酵法や酵素法で生産し、早期に製品化することが可能となってきた。また、その経済価値も高く、例えば微生物による酵素変換で作られたバニリン(バニラの香りの主成分)は“Natural”表示可能なため、化学合成品よりも 10 倍以上も高い値段で取引されている²。また、これまでは植物からの抽出、化学合成が主な製法であったテルペノイド化合物に関しても、実際に市場にローンチされる発酵由来の製品が登場している²。しかしながら、発酵法が経済的な競争力を持つ製法として成立していくには、引き続き発酵生産性、技術汎用性を高めていくことが求められる。本論文では、耐酸性通性嫌気性細菌 *P. ananatis* を宿主に、細胞外の P_i 濃度に依存して菌体増殖期と物質生産期を切り分ける“dual-phase”テルペノイド発酵生産プロセスを新たに提案した。特に(*S*)-リナロール発酵では蓄積が 10 g/L を超え、モノテルペノイドの発酵生産事例としては過去最高の蓄積を達成した⁵⁷。また、鏡像異性体の選択的な作りわけが可能という発酵法の利点を改めて示し、生産性以外の観点からも本アプローチの有効性を示した。自然界では *R* 体が量的優位に存在することから、リナロールに関する研究には(*R*)-リナロールもしくはラセミ体がいられることがほとんどであり、(*S*)-リナロールと(*R*)-リナロールの各種生理活性の違いまで調べられていない⁵²。よって、本技術を用いて鏡像体過剰率 100%^{ee} の(*S*)-リナロールを供給できれば、今後その生理活性やその他の特性に関する理解が更に深まることが期待できる。

本研究では異種 MVA 経路をテルペノイド生合成経路として採用したが、1 章で述べた通りその理論最大収率は内在性の MEP 経路に及ばない (Table 1.2)。しかしながら、Meadows らが酵母で実践している通り phosphate acetyltransferase と phosphoketolase を活用することで CO_2 生成量を低減出来、MVA 経路を介したテルペノイドの理論収率を高めることが可能である¹⁵。味の素(株)では Meadows らの報告よりも約 10 年も前に同様の技術をグルタミン酸発酵に利用した実績があり⁶⁷、テルペノイド発酵にも同時技術を活用できる素地がある。

本研究では商業規模での実生産を見据え、高価な誘導剤の添加や煩雑なオペレーションを代謝の切替に必要としない、菌体が自ら細胞外の P_i 濃度を感知して自律的に菌体増殖期と物質生産期を切り分ける発酵プロセスを構築した。2 章では、 P_i 依存的な dual-phase 発酵プロセスを具現化するためのツールとして *P. ananatis* 内在性の P_{phoC} 、 P_{pstS} を抽出したが、これらの転写制御に関する仕組みは十分には解明されていない。大腸菌の *pstS* の転写が嫌気性条件下で FNR によって間接的にアップレギュレートされることが報告されていることもあり⁶⁸、構築したプロセスの堅牢性を向上させるため、pH、温度、溶存酸素レベルなどの発酵パラメーターに焦点を当てて、 P_{phoC} の調節機構をより詳細に解析することが望ましい。今回は P_i 欠乏時に MVA 経路への代謝を"ON"にする方法のみを採用したが、今後代謝の"OFF"制御にも P_i 欠乏誘導性プロモーターを活用出来れば、より厳密に菌体増殖期と物質生産期を切り分けることが期待できる。テルペノイド生産期(P_i 枯渇区間)に理論最大収率を目指すには、 P_i 枯渇区間はアセチル-CoA が TCA 回路へ流入しないよう、クエン酸シンターゼの活性を抑制することが望ましい。しかしながら P_i 充足区間中に既に発現してしまっているクエン酸シンターゼの半減期は長いことが予想され、代謝の"OFF"制御には単に遺伝子発現を抑制するだけでは不十分であり、分解タグなどを利用した post-translational な制御システム⁶⁹を採用することも求められる。このような、より洗練されたダイナミックな代謝制御システムの構築も、より高い生産性を目指していくうえで求められてくるであろう⁷⁰。

(S)-リナロール蓄積 10 g/L を達成し、モノテルペノイドの発酵生産事例としては過去最高値を達成したが、更なる(S)-リナロール収率と蓄積の向上が製造コスト削減のために今後も必要となる。しかしながら、(S)-リナロール蓄積の上限値は二相発酵に用いる有機溶媒 (IPM) の特性及び使用量と密接に関連してくる。(S)-リナロール蓄積が上がるにつれて、水相中の(S)-リナロール濃度も IPM-水 分配係数に従い上昇してくる。前項 4-3-1 に示す通り、培地に蓄積する(S)-リナロール濃度が 1 g/L を超えてくると *P. ananatis* の代謝活性が阻害され、(S)-リナロール生産能が有意に低下する。これを回避するために IPM を二相発酵に用いてきたが、コストの観点では IPM は実商業生産に適している溶媒とは言えない。従って、菌株の(S)-リナロール生産能を高めるだけでなく、IPM 使用量削減を目的に *P. ananatis* のモノテルペン耐性能を向上させることも必要となる。また、Han GH らが行っているように⁴、安価な植物油を有機溶媒として使用することも検討していく余地がある。

また、AaLINS 活性が(S)-リナロール生合成における強力なボトルネックであることが本研究で明らかとなった。AaLINS 活性向上策として今回は可溶化タグの融合というアプローチを採要したが、その効果は限定的であった(Fig. 5.1)。異種タンパク質の溶解度を改善することが知られているシャペロンの共発現や培養の低温化、より高活性な AaLINS 変異体の取得^{71 72}なども引き続き検討していく必要がある。

上述の通り、全てのテルペノイドは IPP/DMAPP までの代謝経路は共通であるため、本研究で開発した技術はイソプレンと(S)-リナロール以外の生産にも応用可能である。今後、様々な有用テルペノイド化合物の発酵生産に本技術、本知見が活用されることを期待する。

参考文献

1. van Beilen, J. B. & Poirier, Y. Establishment of new crops for the production of natural rubber. *Trends Biotechnol.* 25, 522–529 (2007).
2. Schempp, F. M., Drummond, L., Buchhaupt, M. & Schrader, J. Microbial Cell Factories for the Production of Terpenoid Flavor and Fragrance Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 66, 2247–2258 (2018).
3. Sonntag, F. et al. Engineering *Methylobacterium extorquens* for de novo synthesis of the sesquiterpenoid α -humulene from methanol. *Metab. Eng.* 32, 82–94 (2015).
4. Han, G. H. et al. Fermentative production and direct extraction of (–)- α -bisabolol in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* 15, (2016).
5. Whited, G. M. et al. Development of a gas-phase bioprocess for isoprene-monomer production using metabolic pathway engineering. *Ind. Biotechnol.* 6, 152–163 (2010).
6. Sharkey TD, Yeh S, Wiberley AE, Falbel TG, Gong D, F. D. Evolution of the Isoprene Biosynthetic Pathway in Kudzu. *Plant Physiol.* 137, 700–712 (2005).
7. Zebec, Z. et al. Towards synthesis of monoterpenes and derivatives using synthetic biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 34, 37–43 (2016).
8. Lange, B. M., Rujan, T., Martin, W. & Croteau, R. Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 13172–13177 (2000).
9. Ye, L., Lv, X. & Yu, H. Engineering microbes for isoprene production. *Metab. Eng.* 38, 125–138 (2016).
10. Ajikumar, P. K. et al. Isoprenoid Pathway Optimization for Taxol Precursor Overproduction in *Escherichia coli*. *Science* 330, 70–74 (2011).
11. May, P. H. & Barata, L. A. E. S. Rosewood exploitation in the Brazilian Amazon: Options for sustainable production. *Econ. Bot.* 58, 257–265 (2004).
12. Celedon, J. M. et al. Heartwood-specific transcriptome and metabolite signatures of tropical sandalwood (*Santalum album*) reveal the final step of (Z)-santalol fragrance biosynthesis. *Plant J.* 86, 289–299 (2016).
13. Mirata, M. A., Heerd, D. & Schrader, J. Integrated bioprocess for the oxidation of limonene to perillic acid with *Pseudomonas putida* DSM 12264. *Process Biochem.* 44, 764–771 (2009).

14. Shukal, S., Chen, X. & Zhang, C. Systematic engineering for high-yield production of viridiflorol and amorphadiene in auxotrophic *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 55, 170–178 (2019).
15. Meadows, A. L. et al. Rewriting yeast central carbon metabolism for industrial isoprenoid production. *Nature* 537, 694–697 (2016).
16. Cao, X., Wei, L. J., Lin, J. Y. & Hua, Q. Enhancing linalool production by engineering oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour. Technol.* 245, 1641–1644 (2017).
17. Peplow, M. Synthetic malaria drug meets market resistance. *Nature* 530, 389–390 (2016).
18. Navale, G. R., Dharme, M. S. & Shinde, S. S. Metabolic engineering and synthetic biology for isoprenoid production in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105, 457–475 (2021).
19. Mendez-perez, D. et al. Production of Jet Fuel Precursor Monoterpenoids From Engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 114, 1703–1712 (2017).
20. Zhao, J. et al. Dynamic control of ERG20 expression combined with minimized endogenous downstream metabolism contributes to the improvement of geraniol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* 16, 17 (2017).
21. Tsuruta, H. et al. High-level production of amorpha-4, 11-diene, a precursor of the antimalarial agent artemisinin, in *Escherichia coli*. *PLoS One* 4(2): e4489 (2009).
22. Li, Meijie, Feifei Hou, Tong Wu, Xinglin Jiang, Fuli Li, Haobao Liu, Mo Xian, H. Z. Recent advances of metabolic engineering strategies in natural isoprenoid production using cell factories. *Nat. Prod. Rep.* 37, 80–99 (2020).
23. Kim, H. U., Kim, B., Seung, D. Y. & Lee, S. Y. Effects of Introducing Heterologous Pathways on Microbial Metabolism with Respect to Metabolic Optimality. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 19, 660–667 (2014).
24. 田代美希, 梅野太輔. テルペノイド合成酵素の機能進化デザイン. *化学と生物* 54, 562–567 (2016).
25. Peralta-Yahya, P. P. et al. Identification and microbial production of a terpene-based advanced biofuel. *Nat. Commun.* 2, 483 (2011).
26. Li, W. et al. Characterization of *trans*-Nerolidol Synthase from *Celastrus angulatus* Maxim and

- Production of *trans*-Nerolidol in Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. (2021). *J. Agric. Food Chem.* 69, 2236–2244 (2021).
27. Ramos, J. L. et al. Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 743–768 (2002).
28. Shah, A. A. et al. Enhancement of geraniol resistance of *Escherichia coli* by MarA overexpression. *J. Biosci. Bioeng.* 115, 253–258 (2013).
29. Copolovici, L. & Niinemets, Ü. Salting-in and salting-out effects of ionic and neutral osmotica on limonene and linalool Henry's law constants and octanol/water partition coefficients. *Chemosphere* 69, 621–629 (2007).
30. Brennan, T. C. R., Turner, C. D., Krömer, J. O. & Nielsen, L. K. Alleviating monoterpene toxicity using a two-phase extractive fermentation for the bioproduction of jet fuel mixtures in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 2513–2522 (2012).
31. Hofmeister, D. L., Thoden, J. B. & Holden, H. M. Investigation of a sugar N-formyltransferase from the plant pathogen *Pantoea ananatis*. *Protein Sci.* 28, 707–716 (2019).
32. Hara, Y. et al. The complete genome sequence of *Pantoea ananatis* AJ13355, an organism with great biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 331–341 (2012).
33. Katashkina, J. I. et al. Use of the λ Red-recombineering method for genetic engineering of *Pantoea ananatis*. *BMC Mol. Biol.* 10, 34 (2009).
34. Andreeva, I. G. et al. Identification of *Pantoea ananatis* gene encoding membrane pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent glucose dehydrogenase and *pqqABCDEF* operon essential for PQQ biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 318, 55–60 (2011).
35. Takumi, K., Ziyatdinov, M. K., Samsonov, V. & Nonaka, G. Fermentative production of cysteine by *Pantoea ananatis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e02502-16 (2017).
36. Hara, Y. et al. Method for producing dicarboxylic acid. Patent US 20170298397 B2, (2017).
37. Burg, J. M. et al. Large-scale bioprocess competitiveness: the potential of dynamic metabolic control in two-stage fermentations. *Curr. Opin. Chem. Eng.* 14, 121–136 (2016).
38. Dahl, R. H. et al. Engineering dynamic pathway regulation using stress-response promoters. *Nat.*

Biotechnol. 31, 1039–1046 (2013).

39. Wang, F. et al. Combining Gal4p-mediated expression enhancement and directed evolution of isoprene synthase to improve isoprene production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* 39, 257–266 (2017).

40. Hsieh, Y. & Wanner, B. Global regulation by the seven-component P_i signaling system. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 198–203 (2010).

41. Minaeva, N. I. et al. Dual-In/Out strategy for genes integration into bacterial chromosome: A novel approach to step-by-step construction of plasmid-less marker-less recombinant *E. coli* strains with predesigned genome structure. *BMC Biotechnol.* 8, 1–11 (2008).

42. Tajima, Y. et al. Effects of eliminating pyruvate node pathways and of coexpression of heterogeneous carboxylation enzymes on succinate production by *Enterobacter aerogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 929–937 (2015).

43. Kazieva, E. et al. Characterization of feedback-resistant mevalonate kinases from the methanogenic archaeons *Methanosaeta concilii* and *Methanocella paludicola*. *Microbiology* 163, 1283–1291 (2017).

44. Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M. & Nakata, A. Nucleotide Sequence of the *phoB* Gene, the Positive Regulatory Gene for the Phosphate Regulon of *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* 190, 37–44 (1986).

45. Kim, S. K., Makino, K., Amemura, M., Shinagawa, H. & Nakata, A. Molecular Analysis of the *phoH* Gene, Belonging to the Phosphate Regulon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175, 1316–1324 (1993).

46. Kasahara, M., Makino, K., Amemura, M., Nakata, A. & Shinagawa, H. Dual regulation of the *ugp* Operon by Phosphate and Carbon Starvation at Two Interspaced Promoters. *J. Bacteriol.* 173, 549–558 (1991).

47. Hedl, M. et al. *Enterococcus faecalis* Acetoacetyl-Coenzyme A Thiolase/3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase, a Dual-Function Protein of Isopentenyl Diphosphate Biosynthesis. *J. Bacteriol.* 184, 2116–2122 (2002).

48. Sutherland, A. et al. *Enterococcus faecalis* 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Synthase, an Enzyme of Isopentenyl Diphosphate Biosynthesis. *J. Bacteriol.* 184, 4065–4070 (2002).

49. Wang, J. et al. Engineering of a Highly Efficient *Escherichia coli* Strain for Mevalonate Fermentation through Chromosomal Integration. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 7176–7184 (2016).

50. Yasuyuki, H., Minako, H. et al. Isoprene synthase and gene encoding the same, and method for

producing isoprene monomer. Patent US 2014/0113344 A1, (2014).

51. Tajima, Y., Rachi, H., Nishio, Y., Katashkina, Z. I. & Oleg, V. B. Method for producing isoprenoid compound. European patent 3225691 A1, (2017).

52. Aprotosoai, A. C., Hăncianu, M., Costache, I. I. & Miron, A. Linalool: A review on a key odorant molecule with valuable biological properties. *Flavour Fragr. J.* 29, 193–219 (2014).

53. Chen, X. et al. Characterisation of an (*S*)-linalool synthase from kiwifruit (*Actinidia arguta*) that catalyses the first committed step in the production of floral lilac compounds. *Funct. Plant Biol.* 37, 232–243 (2010).

54. Nakano, C., Kim, H. K. & Ohnishi, Y. Identification and Characterization of the linalool/nerolidol Synthase from *Streptomyces clavuligerus*. *ChemBioChem* 12, 2403–2407 (2011).

55. Deng, Y., Sun, M., Xu, S. & Zhou, J. Enhanced (*S*)-linalool production by fusion expression of farnesyl diphosphate synthase and linalool synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* 121, 187–195 (2016).

56. Matsudaira, A. et al. Production of glutamate and stereospecific flavors, (*S*)-linalool and (+)-valencene, by *Synechocystis* sp. PCC6803. *J. Biosci. Bioeng.* 130, 464–70 (2020).

57. Lei, D., Qiu, Z., Qiao, J. & Zhao, G. R. Biotechnology for Biofuels Plasticity engineering of plant monoterpene synthases and application for microbial production of monoterpenoids. *Biotechnol. Biofuels* 1–16 (2021).

58. Hoshino, Y. et al. Stereospecific linalool production utilizing two-phase cultivation system in *Pantoea ananatis*. *J. Biotechnol.* 324, 21–27 (2020).

59. Fukui, K. et al. Identification of succinate exporter in *Corynebacterium glutamicum* and its physiological roles under anaerobic conditions. *J. Biotechnol.* 154, 25–34 (2011).

60. Marina Soković, Jasmina Glamočlija, Petar D. Marin, Dejan Brkić, L. J. L. D. van G. Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an In Vitro Model. *Molecules* 15, 7532–7546 (2010).

61. Liu, W. et al. Engineering *Escherichia coli* for high-yield geraniol production with biotransformation of geranyl acetate to geraniol under fed-batch culture. *Biotechnol. Biofuels* 9, 58 (2016).

62. Martin, V. J. J., Pitera, D. J., Withers, S. T., Newman, J. D. & Keasling, J. D. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat. Biotechnol.* 21, 796–802 (2003).
63. Hartwig, S. et al. SUMO-fusion, purification, and characterization of a (+)-zizaene synthase from *Chrysopogon zizanioides*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458, 883–889 (2015).
64. Beekwilder, J., Houwelingen, V., Cankar, K. & Dijk, A. D. J. Van. Valencene synthase from the heartwood of *Nootka cypress* (*Callitropsis nootkatensis*) for biotechnological production of valencene. *Plant Biotechnol. J.* 12, 174–182 (2014).
65. Steinmetz, E. & Auldridge, M. Screening Fusion Tags for Improved Recombinant Protein Expression in *E. coli* with the Espresso® Solubility and Expression Screening System. *Curr Protoc Protein Sci.* 90, 5.27.1-5.27.20 (2017).
66. Heeres, A. S., Picone, C. S. F., van der Wielen, L. A. M., Cunha, R. L. & Cuellar, M. C. Microbial advanced biofuels production: Overcoming emulsification challenges for large-scale operation. *Trends Biotechnol.* 32, 221–229 (2014).
67. Chinen, A., Kozlov, Y. I. & Hara, Y. Innovative Metabolic Pathway Design for Efficient L-Glutamate Production by Suppressing CO₂ Emission. *J. Biosci. Bioeng.* 103, 262–269 (2007).
68. Salmon, K. et al. Global Gene Expression Profiling in *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* 278, 29837–29855 (2003).
69. McGinness, K. E., Baker, T. A. & Sauer, R. T. Engineering Controllable Protein Degradation. *Mol. Cell* 22, 701–707 (2006).
70. Lynch, M. D. Into new territory: Improved microbial synthesis through engineering of the essential metabolic network. *Curr. Opin. Biotechnol.* 38, 106–111 (2016).
71. Yoshikuni, Y., Dietrich, J. A., Nowroozi, F. F., Babbitt, P. C. & Keasling, J. D. Redesigning Enzymes Based on Adaptive Evolution for Optimal Function in Synthetic Metabolic Pathways. *Chem. Biol.* 15, 607–618 (2008).
72. Tashiro, M. et al. Bacterial Production of Pinene by a Laboratory-Evolved Pinene-Synthase. *ACS Synth. Biol.* 5, 1011–1020 (2016).

謝辞

本学位論文を纏めるに当たり、多くの御支援と御指導を賜りました指導教員である筑波大学大学院理工情報生命学術院 生命地球科学研究群 生命農学学位プログラム 高谷直樹教授に深く御礼申し上げます。

研究全般にわたって多大な御支援、御指導を賜りました味の素株式会社 臼田 佳弘氏、西尾 陽介氏、田島 義教氏、山本 陽子氏、守屋 美加氏、星野 康氏、松平 晶子氏、味の素-ジェネチカ・リサーチ・インスティテュート社 Joanna I Katashkina 氏、Ekaterina Kazieva 氏、元味の素株式会社 イノベーション研究所 研究員 大貫 朗子氏、良知 博昭氏にこの場を借りて御礼申し上げます。

最後に、これまでに様々な学習機会を提供してもらったこと、心から支えてくれたことに対して両親、祖父母、妻に心から感謝致します。

新田 暢久

発表論文

1. Nitta N, Tajima Y, Katashkina JI, Yamamoto Y, Onuki A, Rachi H, Kazieva E, Nishio Y (2020) Application of inorganic phosphate limitation to efficient isoprene production in *Pantoea ananatis*. *Journal of Applied Microbiology*. 128:763–774.

上記内容は2, 3章に該当。

2. Nitta N, Tajima Y, Yamamoto Y, Moriya M, Matsudaira A, Hoshino Y, Nishio Y, Usuda Y (2021) Fermentative production of enantiopure (*S*)-linalool using a metabolically engineered *Pantoea ananatis*. *Microbial Cell Factories*. 20:54.

上記内容は4, 5章に該当。