

還元的TCA回路を利用したLactobacillus plantarumによる有機酸生産

誌名	日本食品保蔵科学会誌
ISSN	13441213
著者名	佐藤,英一 梶川,揚申 Hols,P. 岡田,早苗 辻,聡
発行元	日本食品保蔵科学会
巻/号	40巻1号
掲載ページ	p. 9-13
発行年月	2014年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



還元的TCA回路を利用した*Lactobacillus plantarum*による有機酸生産

佐藤英一^{*1}・梶川揚申^{*1}・HOLS Pascal^{*2}
岡田早苗^{*1}・辻 聡^{*1§}

^{*1} 東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科

^{*2} ルヴァンカトリック大学生命科学研究科遺伝学部門

Metabolic Engineering of *Lactobacillus plantarum* for Fumaric Acid Production Through Activation of the Reductive Branch of the Tricarboxylic Acid Cycle

SATOH Eiichi^{*1}, KAJIKAWA Akinobu^{*1}, HOLS Pascal^{*2},
OKADA Sanae^{*1} and TSUJI Akira^{*1§}

^{*1} Department of Applied Biology and Chemistry, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502, Japan

^{*2} Institut des Sciences de la Vie, Université Catholique de Louvain, Place Croix du Sud, B-1348 Louvain-La-Neuve, Belgium

We report the metabolic engineering of *Lactobacillus plantarum*, a lactic acid bacterium, for biosynthesis of fumaric acid. A disruptant of the fumarate reductase gene was derived from an *L. plantarum* lactate dehydrogenase (LDH)-deficient mutant strain, VL103, which accumulated fumaric acid. However, increasing the flux of pyruvate to the TCA cycle did not enhance fumaric acid production; instead, it resulted in the production of lactate. We believe that the fumarate was converted to malate and finally to lactate via the malolactic fermentation pathway. We also observed a marked reduction in cell growth of this mutant strain. Therefore, due to the inefficiency of the fumaric acid transport system in strain VL103, lactic acid accumulation was observed in the cells. We concluded that blocking the malolactic fermentation system and enhancing transporter influx are necessary for application of *L. plantarum* VL103 in fumaric acid production.

(Received Jul. 22, 2013; Accepted Oct. 31, 2013)

Key words: *Lactobacillus plantarum*, C4-dicarboxylic acid, metabolic analysis, fumarate reductase, lactic acid bacteria,

ラクトバチルスプラントルム, C4-ジカルボン酸, 代謝解析, フマル酸還元酵素, 乳酸菌

これまでは発酵菌として認識されることの多かった乳酸菌であるが¹⁾, 筆者らは乳酸菌に代謝工学を駆使し, 物質生産菌としての応用を試みている^{2),3)}。乳酸菌を物質生産の宿主とする利点は, その耐酸性と通性嫌気性の特性である^{4)~6)}。乳酸菌を培養すると代謝産物として乳酸を生成し, 培養液のpHの低下に伴い一般的な細菌の生育は抑えられ, 最終的には耐酸性のある乳酸菌も生育が抑制されるようになる。しかし, 乳酸よりpKaの大きな酸を生成する場合には, 菌の生育抑制の影響は少ないと考えられる。

また, 通性嫌気性であることの利点についてはこれまでの検討で*Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 (以下, 野生株と略記) を利用したコハク酸生産について報告している⁷⁾。これは野生株が保持するオキサロ酢酸からリンゴ酸, フマル酸, コハク酸までの不完全なTCA回路関連遺伝子を利用し, 嫌気条件下での還元的な反応によりコハク酸生成を試みたものである。この報告では, 野生株の乳酸生成経路欠損株である*L. plantarum* VL103 (以下, VL103と略記) を利用して, 代謝改変により還元的なTCA回路へ代謝流量を増加させることにより,

^{*1} 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

[§] Corresponding author, E-mail: at202493@nodai.ac.jp

^{*2} Place Croix du Sud, B-1348 Louvain-La-Neuve, Belgium

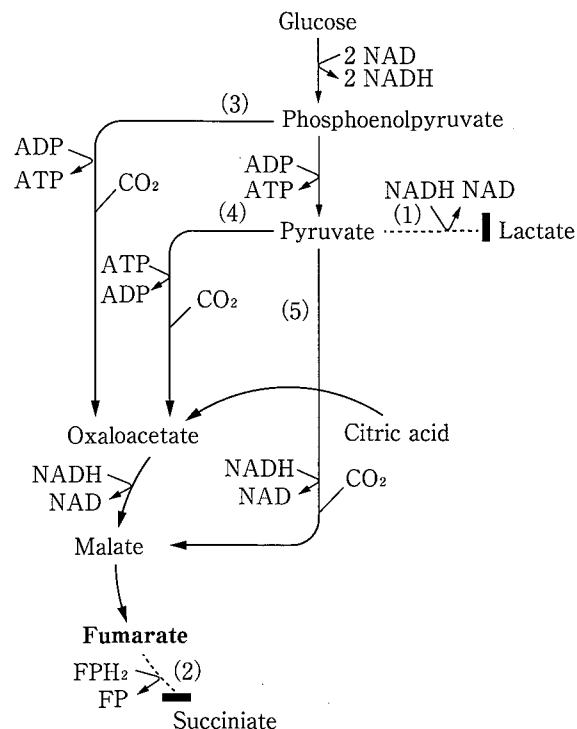


Fig. 1 Strategy for metabolically engineering fumarate production in *Lactobacillus plantarum* VL103

(1) lactate dehydrogenase ; (2) fumarate reductase ; (3) phosphoenolpyruvate carboxykinase ; (4) pyruvate carboxylase ; (5) malic enzyme.

コハク酸生成量を向上させている。この研究成果より、還元的TCA回路を利用することでVL103はコハク酸生成以外の有機酸も生成可能であると考えられた。

TCA回路の中間代謝産物であるフマル酸は食品添加物や不飽和ポリエステル樹脂、サイズ剤の合成原料に用いられている。微生物による発酵法では、*Rhizopus nigricans*や*R. oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*などの微生物種を利用して生産されている^{8)~10)}。これらの菌種において、培養工学や分子育種の手法を用いて改良が試みられている。しかし、いまだに化学合成による工業的な大量生産が主流であるため、筆者らは新たな発酵菌として乳酸菌の改良に着目した。

具体的にはVL103の保持するフマル酸からコハク酸への変換酵素Fumarate reductase (FRD) 遺伝子を破壊することでフマル酸を蓄積するようになると考えられる (Fig. 1)。そこで本稿では、乳酸生成経路欠損株VL103から二重破壊株を作出し、代謝改変により還元的TCA回路を利用したフマル酸生成を試みた。

実験方法

1. 供試菌株および培養

VL103はMRS液体培地 (Difco社製) を用い37℃で静置培養した。また、各形質転換体はMRS培地にエリスロマイシン (Em) を5 µg/mlになるように添加して使用

した。各培地10mlに14~16時間前培養したVL103または形質転換体を1%量接種し、37℃で24時間静置培養した。これらの培養液を用いて分光光度計 (SHIMADZU UV-2000) により660nmにおける吸光度を測定し生育を比較した。有機酸分析、残糖分析に際しては50mMの炭酸水素ナトリウムを添加したMRS培地を用いて生育測定試験と同様の条件で培養した。

2. *frd* 遺伝子破壊株の作出

遺伝子破壊用プラスミドとして温度感受性プラスミド pBTEを用いた。まず、野生株の染色体遺伝子を鋳型に*frd* 遺伝子の上流約300bpと下流約300bpをそれぞれPCR法にて取得した。そして、増幅した各DNA断片を用いてオーバーラップPCR法にて約600bpの Δfrd を作成した。このDNA断片を制限酵素 *Pst* Iと*Bam* HIを用いて消化し、同制限酵素により消化したpBTEにライゲーションし、*frd* 遺伝子破壊用プラスミド pBTE:: Δfrd を構築した。

これらのプラスミドをエレクトロポレーション法によりVL103に形質転換した¹¹⁾。pBTE:: Δfrd を用いて二重交叉相同組換え法によりVL103のFRDを欠損した Δfrd 株 (以下、破壊株と呼称) を作出した。

3. 炭酸固定酵素高発現株の作出

各酵素の高発現には、以前に構築した遺伝子発現用プラスミド pMH::*pycA*, pMH::*pckA*, pMH::*mae*を用いた⁷⁾。これらの各プラスミドをエレクトロポレーション法により破壊株に形質転換した¹¹⁾。得られた形質転換株をそれぞれ Δfrd (pMH::*pycA*), Δfrd (pMH::*pckA*), Δfrd (pMH::*mae*) とした。なお、各酵素の高発現はウエスタンブロット解析により確認した (データ示さず)。

4. 酵素活性測定

各供試菌株を24時間前培養したものを50mMの炭酸水素ナトリウムを添加したMRS液体培地5mlに1%量接種し、同様に培養した。得られた菌体を50mMリン酸緩衝液 (pH7.0) で洗浄し、回収した菌体を300µlの水冷却したリン酸緩衝液に懸濁し、ガラスビーズ0.1gを加えた後に冷却しながら10分間激しく振盪して菌体を破碎した。得られた破碎液を遠心分離 (13,000×g, 10min, 4℃) し、上清を酵素活性測定に用いた。各酵素の活性は文献を参考にピルビン酸もしくはホスホエノールピルビン酸を基質とし、目的物質の生成に伴い減少するNADHを340nmの吸光度の減少により測定した⁷⁾。

5. HPLCによる有機酸分析, 残糖分析

培養24時間後の培養液2mlを遠心分離し (13,000×g, 1min, 4℃), 上清中の有機酸をHPLC (Waters 2695 Separation Module, Waters 2996 Photodiode Array, カラム; Rspak KC-811, Rspak KGG, 移動相; 0.08% HClO₄) により分析した。また、上清中の残糖はHPLC (Waters 2695 Separation Module, Waters 2414 Refractive Index Detector, カラム; Shodex Asahipak NH2P-50 4E, 移動相; 75% CH₃CN) により分析した。

実験結果および考察

1. FRD欠損二重破壊株の作出と代謝解析

VL103と破壊株の代謝産物をTable 1に、生育をFig. 2に示した。破壊株ではコハク酸生成が消失しており、少量のフマル酸とリンゴ酸を生成していた。この結果より、FRDの欠損によりフマル酸を生成可能な菌株を取得した。

また、破壊株はVL103と比べて生育が著しく低下していた。これはフマル酸⇌コハク酸間の反応が停止したためにNADHの再酸化に支障をきたしているためだと考えられる。この反応は培地中に55mM程度含まれている酢酸が破壊株では消費されていることから裏づけられる。乳酸菌はNADHの再酸化の補完経路として酢酸をエタノールに変換する経路を保持している⁴⁾。VL103においてもエタノールの生成は確認できないが酢酸を消費して何らかの代謝産物に変換することで、NADHの再酸化を行っていると考えられている⁷⁾。そのため、破壊株も同様の代謝経路を利用していると判断した。

さらに、破壊株の代謝産物総量はVL103と比べて低い値を示している。しかし、両菌株ともに培地中のグルコースは全て消費していることから、破壊株では代謝の停滞または本実験で測定した代謝産物以外の代謝産物に多くの炭素源が利用されている可能性がある。

2. FRD欠損二重破壊株における酵素高発現と代謝解析

作出した破壊株はフマル酸を生成したものの、その生成量は微量であった。そこで、VL103のコハク酸生成量を向上させた代謝改変実績を基にTCA回路への炭素流量の向上を試みた。破壊株に各酵素を高発現した代謝改変株を作出した。各酵素高発現株の酵素活性を測定し、VL103と比較した (Table 2)。その結果、各酵素はVL103に対してPCでは1.5倍、PEPCKでは1.3倍、MEでは1.4倍程度高い酵素活性を示していた。これにより各酵素の活性上昇を確認した。

各酵素高発現株の代謝産物をTable 3に、生育をFig. 3に示した。各代謝改変株のフマル酸生成量は破壊株と同程度かそれよりも低い値を示した。また、リンゴ酸やコハク酸、酢酸は破壊株と同様の挙動を示していた。

Table 1 Fermentation product concentrations in modified MRS medium produced by *Lactobacillus plantarum* VL103 and Δfrd strain

<i>L. plantarum</i> strains	Fermentation product (mM)						
	Succinate	Malate	Fumarate	Acetate	Formate	Acetoin	Lactate
VL103	16.9±0.9	ND	ND	59.0±2.5	16.3±0.5	75.1±1.2	ND
VL103 Δfrd	ND	12.8±1.1	2.0±0.2	19.5±1.3	3.5±1.2	14.1±0.4	9.4±2.6

ND, not detected

Values represent the mean and standard error derived from three independent experiments, with each experiment performed in triplicate.

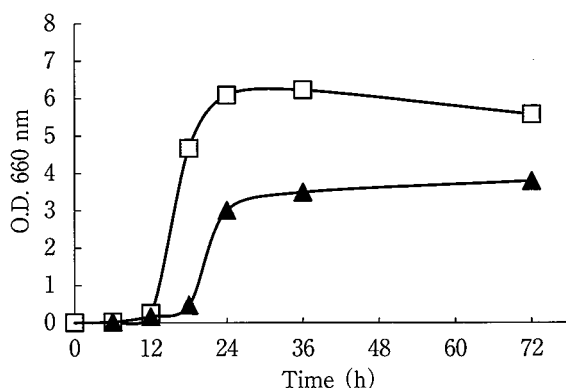


Fig. 2 Cell growth of *L. plantarum* VL103 and Δfrd strain in a modified MRS medium, ascertained by measuring the increase in optical density at 660nm

These data are mean of three independent experiments and those in parentheses are standard deviation.

Symbols: ▲, VL103 ; □, Δfrd strain.

Table 2 Enzymatic activities detected in cell extracts^a from the *Lactobacillus plantarum* VL103 Δfrd and derivatives

<i>L. plantarum</i> strains	Enzymatic activity ^b (U/mg of protein) of strain		
	PC	PEPCK	ME
pMH	0.29±0.06	0.38±0.04	0.36±0.01
pMH:: <i>pycA</i>	0.43±0.04	—	—
pMH:: <i>pckA</i>	—	0.50±0.01	—
pMH:: <i>mae</i>	—	—	0.51±0.06

^aCell extracts were prepared according to the method described in Materials and methods.

^bOne unit of activity corresponds to the conversion of 1 mmol substrate per minute.

Values represent the mean and standard error derived from three independent experiments, with each experiment performed in triplicate.

PC, pyruvate carboxylase ; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase ; ME, malic enzyme

Table 3 Fermentation product concentrations in modified MRS medium produced by *Lactobacillus plantarum* VL103 Δ frd derivatives

<i>L. plantarum</i> VL103 Δ frd strains	Fermentation product (mM)						
	Succinate	Malate	Fumarate	Acetate	Formate	Acetoin	Lactate
pMH:: <i>pycA</i>	ND	5.0±0.6	ND	20.1±1.0	10.5±1.0	13.5±0.1	44.8±4.1
pMH:: <i>pckA</i>	ND	10.3±1.5	1.7±0.1	29.6±0.7	10.1±0.7	12.9±0.7	13.1±0.2
pMH:: <i>mae</i>	ND	10.7±1.3	1.4±0.1	25.3±1.1	8.4±1.4	9.9±0.4	12.7±0.6

ND, not detected

Values represent the mean and standard error derived from three independent experiments, with each experiment performed in triplicate.

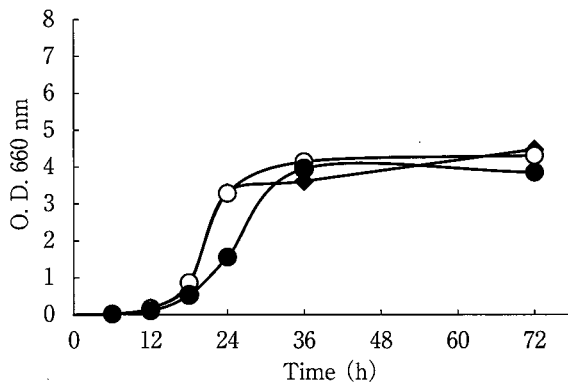


Fig. 3 Cell growth of *L. plantarum* Δ frd strain and derivatives in a modified MRS medium, ascertained by measuring the increase in optical density at 660nm

These data are mean of three independent experiments and those in parentheses are standard deviation.

Symbols: ●, Δ frd (pMH::*pycA*); ◆, Δ frd (pMH::*pckA*); ○, Δ frd (pMH::*mae*).

しかし、LDHの欠損により生成経路が遮断された乳酸が検出された。その中でもPC高発現株は44mM程度と高い乳酸生成量を示している。しかし、破壊株のLDH活性は復帰しておらず、同様の培養条件で野生株が生成する乳酸量(約170mM)よりも低い値である¹²⁾。そのため、乳酸が生成された原因としてマロラクティック発酵が考えられた。この発酵はリンゴ酸を乳酸に変換し、マロラクティックトランスポーターにより細胞外に放出することで、細胞内外のpHバランスを整える発酵である¹³⁾。

また、フマル酸の生成量が高発現株においても増加しなかったことから、VL103はフマル酸の排出能が低く、溶解度の低いフマル酸を菌体内で蓄積できずにリンゴ酸を生成していると考えられる。この生成物の蓄積による菌体内pHの低下が、生育の低下につながると推察した。そして、生成蓄積されたリンゴ酸による菌体負荷を軽減するために、マロラクティック発酵を行っているのではないかと考えた。これらの結果からVL103のコハク酸排出経路は、フマル酸などの他のC4-ジカルボン酸への基

質親和性が著しく低いことが示唆された。

また、破壊株への遺伝子高発現ではフマル酸生成の向上には至らなかった。そのため、VL103を利用したフマル酸生成菌の作出には、マロラクティック酵素の欠損やフマル酸排出経路の構築や強化などが必要であると考えられる。

要 約

本研究では、乳酸菌の嫌気条件下で多様な有機酸生成宿主としての可能性を追求するために、フマル酸生成経路の構築を試みた。宿主として供試した*L. plantarum* VL103では、代謝改変によりコハク酸発酵生成系の構築が試みられている。そのため、コハク酸と同様にTCA回路に存在する他の有機酸生成にも利用できると考えられた。そこで、VL103の保持するフマル酸からコハク酸への変換酵素Fumarate reductase破壊株を作出し、フマル酸生成能を測定した。

その結果、破壊株はVL103と比較して生育の減少がみられるものの、コハク酸を生成不能となりフマル酸を生成した。そのため、VL103を利用したフマル酸の発酵生成は可能であると考えられた。

次に、破壊株のフマル酸生成量を向上させるために、TCA回路への炭素流量の向上を試みた。しかし、フマル酸生成量は向上せず、乳酸が生成された。これは、菌体内で生成されたフマル酸がリンゴ酸に変換されたのちに、マロラクティック発酵により生成されていると判断した。これはVL103のフマル酸排出経路の機能が弱く、フマル酸が菌体内に蓄積するためであると考えられる。そのため、VL103をフマル酸生成菌として利用するためには、排出経路の強化やマロラクティック発酵系の遮断が必要であることが判明した。

文 献

- 1) LEROY, F. and VUYST, L. D. : Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry, *Trends in Food Science & Technology*, **15**, 67~78 (2004)
- 2) JOHN, R. P., NAMPOOTHIRI, K. M. and PANDEY, A.

- : Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **74**, 524~534 (2007)
- 3) CHONG, B. F., BLANK, L. M., MCLAUGHLIN, R. and NIELSEN, L. K. : Microbial hyaluronic acid production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **66**, 341~351 (2005)
- 4) KLEEREBEZEM, M., HOLS, P. and HUGENHOLTZ, J. : Lactic acid bacteria as a cell factory: rerouting of carbon metabolism in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering, *Enzyme Microb. Technol.*, **26**, 840~848 (2000)
- 5) PAPAGIANNI, M. : Recent advances in engineering the central carbon metabolism of industrially important bacteria, *Microb. Cell Fact.*, **11**, 50 (2012)
- 6) DE VOS, W. M. and HUGENHOLTZ, J. : Engineering metabolic highways in Lactococci and other lactic acid bacteria, *Trends Biotechnol.*, **22**, 72~79 (2004)
- 7) TSUJI, A., OKADA, S., HOLS, P. and SATOH, E. : Metabolic engineering of *Lactobacillus plantarum* for succinic acid production through activation of the reductive branch of the tricarboxylic acid cycle, *Enzyme Microb. Technol.*, **53**, 97~103 (2013)
- 8) RISCALDATI, E., MORESI, M., FEDERICI, F. and PETRUCCIOLI, M. : Direct ammonium fumarate production by *Rhizopus arrhizus* under phosphorous limitation, *Biotechnology Letters.*, **22**, 1043~1047 (2000)
- 9) ROA ENGEL, C. A., VAN GULIK, W. M., MARANG, L., VAN DER WIELEN, L. A. and STRAATHOF, A. J. : Development of a low pH fermentation strategy for fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*, *Enzyme Microb. Technol.*, **48**, 39~47 (2011)
- 10) XU, Q., LI, S., HUANG, H. and WEN, J. : Key technologies for the industrial production of fumaric acid by fermentation, *Biotechnol. Adv.*, **30**, 1685~1696 (2012)
- 11) AUKRUST, T. and BLOM, H. : Transformation of *Lactobacillus* strains used in meat and vegetable fermentations, *Food Res. Int.*, **25**, 253~261 (1992)
- 12) 辻 聡・梶川揚申・岡田早苗・HOLS, P.・佐藤英一：ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの発現強化による *Lactobacillus plantarum* のピルビン酸生成反応の迂回経路の構築, 日本乳酸菌学会誌, **24**, 88~92 (2013).
- 13) DU TOIT, M., ENGELBRECHT, L., LERM, E. and KRIEGER-WEBER, S. : *Lactobacillus* : the next generation of malolactic fermentation starter cultures - an overview, *Food and Bioprocess Technology*, **4**, 876~906 (2011)
- (平成25年7月22日受付, 平成25年10月31日受理)