

令和元年6月14日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07655

研究課題名(和文) 大腸菌におけるマロニル-CoA生成経路の強化と脂肪酸生産菌の分子育種

研究課題名(英文) Enhancement of malonyl-CoA biosynthesis for fatty acid production in Escherichia coli

研究代表者

長南 茂 (CHOHNAN, Shigeru)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：70312775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではパントテン酸キナーゼ(CoaA)によって細胞内CoAレベルが上がった大腸菌を用いて、アセチル-CoAカルボキシラーゼ(Acc)でアセチル-CoAをマロニル-CoAに変換し、脂肪酸合成酵素(Fas)で脂肪酸を生産することにより、物質生産におけるCoAコファクターエンジニアリングの有用性を検討した。

CoaA、Acc、およびFasの共発現株では、マロニル-CoAが細胞内CoAプールの主要なCoA分子種となり、脂肪酸生産が5.6倍に上昇した。また、外来のFasに依存したオレイン酸が確認され、細胞内CoAプールを大きくすることにより、大腸菌では本来生成しない脂肪酸生産の可能性も見えてきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、コエンザイムA(CoA)およびアセチル-CoAに続いて、大腸菌の細胞内マロニル-CoAの増大にも成功した。このマロニル-CoAの増大は脂肪酸の増産につながり、物質生産においても有効な要素技術であることが併せて示された。CoAおよびアシル-CoAは様々な代謝経路に登場する炭素のキャリアなので、本技術は生物を利用した有用物質生産に広く利用されることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the effectiveness of CoA cofactor engineering in the production of fatty acids using fatty acid synthase (Fas) following the conversion of acetyl-CoA to malonyl-CoA using acetyl-CoA carboxylase (Acc) in recombinant Escherichia coli with the intracellular CoA pool enlarged by pantothenate kinase (CoaA).

In the E. coli cells possessing CoaA, Acc, and Fas genes in plasmids, malonyl-CoA was the major CoA molecular species in their CoA pools, and this transformant showed a 5.6-fold fatty acid production increase over the control strain. Furthermore, exogenous Fas-dependent oleic acid production was observed. It is thus suggested that E. coli cells with the intracellular CoA pool increased by CoaA and Acc make possible production of exogenous fatty acid molecular species.

研究分野：農学

キーワード：コエンザイムA マロニル-CoA 脂肪酸 パントテン酸キナーゼ アセチル-CoAカルボキシラーゼ 脂肪酸合成酵素 有用物質生産 大腸菌

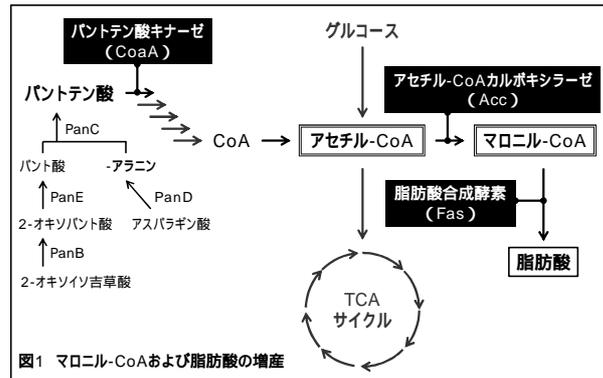
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

コエンザイム A (CoA) はアシル基のキャリアとして機能する補酵素で、生体内ではビタミン B₅ であるパントテン酸から生合成される。CoA 生合成経路は初発反応を触媒するパントテン酸キナーゼ (CoaA) が鍵酵素となっており、真正細菌ではアミノ酸配列を基に原核型、型、および型 CoaA に分類される。研究代表者は *Pseudomonas putida* 由来原核型 CoaA 遺伝子の大腸菌形質転換体で細胞内 CoA プールサイズ (アセチル-CoA、マロニル-CoA、および CoA の和) を大きくし、その CoA プール内の大部分をアセチル-CoA として溜めることに成功している。しかしながら、CoaA を用いた大腸菌の細胞内 CoA プールの増大には出発物質であるパントテン酸の培地への添加が必須であった。

2. 研究の目的

本研究課題では、炭素のキャリアである CoA の生合成経路を強化し、CoA 代謝を活性化することにより脂肪酸を効率よく生産する大腸菌の分子育種を計画した。これまでに、CoA 生合成経路の鍵酵素である CoaA を大腸菌で発現させることにより、細胞内 CoA 含量を 3 倍に増加させ、そのおよそ 90% をアセチル-CoA として蓄積することに成功している。今回はこの増産したアセチル-CoA のアセチル-CoA カルボキシラーゼ (Acc) によるマロニル-CoA への変換、そして生成したマロニル-CoA の脂肪酸合成酵素 (Fas) による脂肪酸生産に挑戦する (図 1)。また、CoA 増産には出発物質であるパントテン酸の供給も欠かせないので、CoaA 遺伝子およびパントテン酸供給系遺伝子 (Pan 遺伝子) を大腸菌のゲノム DNA に導入して目的を達成することを計画した。



3. 研究の方法

(1) CoaA、Acc、および Fas 発現プラスミドの構築

P. putida 由来の原核型 CoaA 遺伝子を PCR で増幅して、CoaA 発現プラスミドである pSTV-coaA および pSTV-dtsR1-accBCE-coaA を構築した。

Acc 発現プラスミドの構築には、*E. coli* 由来 Acc 遺伝子 (*accA*、*accBC*、および *accD*) と *Corynebacterium glutamicum* 由来 Acc 遺伝子 (*dtsR1*、*accBC*、および *accE*) を使用した。*E. coli* 由来 Acc の発現プラスミドは、JM109 株の各サブユニット遺伝子を PCR で増幅後、pUC118 にクローニングし、pUC-*accA*、pUC-*accBC*、pUC-*accD*、pUC-*accAD*、pUC-*accABC*、pUC-*accBCD*、および pUC-*accABCD* を得た。また、*C. glutamicum* 由来 Acc の発現プラスミドは、各サブユニット遺伝子を PCR で増幅後、pSTV28 にクローニングし、pSTV-dtsR1-accBCE および CoaA との共発現プラスミドである pSTV-dtsR1-accBCE-coaA を構築した。

Fas 発現プラスミドの構築には、*C. glutamicum* 由来 FasA および AcpS 遺伝子を用い、PCR で増幅後、pQE-60 の T5 プロモーターの下流に連結して pQE-fasA-acpS を構築した。

これらプラスミドを *E. coli* JM109 株、あるいは DH5 α 株に形質転換し、マロニル-CoA の増産および脂肪酸生産性試験に使用した。

(2) CoaA 遺伝子 (*coaA*) およびパントテン酸合成系遺伝子 (*panB*、*panC*、*panD*、および *panE*) の *E. coli* ゲノム DNA への導入

大腸菌ゲノム DNA への遺伝子の導入は、放線菌 R4 ファージの部位特異的組換え機構を用いて行った。本組換えは R4 ファージの組換え酵素 (Sre) が触媒し、ファージ DNA 上にある *attP* サイトと放線菌のゲノム DNA 上にある *attB* サイト間で起こる。トランスポゾンを使って *E. coli* JM109 のゲノム DNA 上に *attB* を持つ *E. coli* JB9 株を宿主として、2 つの *attP* サイト間に *coaA* を保持する環状 DNA をエレクトロポレーション法により Sre が発現している JB9 株の細胞内に導入し、*coaA* をゲノム DNA 上に持つ JB9-*coaA* 株を作製した。次いで、2 つの *attB* の間にパントテン酸生合成系遺伝子である *panD-panB-panE-panC* を持つ環状 DNA、および *panD* のみを持つ環状 DNA を調製し、JB9-*coaA-panDBEC* 株および JB9-*coaA-panD* 株の作製を検討した。

(3) 形質転換体の培養

(1)、(2) で得られた形質転換体は、LB 培地、M9 培地、あるいは脂肪酸増産用 M9 培地で培養した。CoA 増産を目的とする培養では、CoA の出発物質であるパントテン酸を終濃度が 5 mM になるように、また IPTG による誘導が必要な場合は 0.1 mM になるようにそれぞれ添加した。アンピシリンは終濃度が 100 μ g/ml に、クロラムフェニコールは終濃度が 25 μ g/ml になるように培地に添加した。脂肪酸増産用 M9 培地は、M9 培地に抗生物質、2% グルコース、5 mM パントテン酸の他、NaHCO₃ (1 mg/ml)、ピオチン (40 μ g/ml)、FeSO₄·7H₂O (800 μ g/ml)、AlK(SO₄)₂·12H₂O (200 μ g/ml)、ZnCl₂ (10 μ g/ml)、CuCl₂ (10 μ g/ml)、MnMoO₄·2H₂O (20 μ g/ml)

MnSO₄·5H₂O (100 μg/ml), CoCl₂ (40 μg/ml), および H₃BO₄ (5 μg/ml) が含まれている。

各形質転換体を LB 培地で 30°C で一晚培養し、本培養培地 (30 ml) に 1% 植菌し、30°C あるいは 37°C で振とう培養した。

(4) 脂肪酸メチルの調製と解析

形質転換体から Bligh-Dyer 法で脂質を抽出し、脂質を含むクロロホルム層を回収、乾固後、トルエンに溶解し、3M HCl-メタノールでメタノリシス処理をした。反応後、純水 1 ml、ヘキサン 2 ml を添加し、遠心分離でヘキサン層を回収した。回収した溶液を遠心エバポレーターで濃縮し、ヘキサンで 1 ml に調整後、脂肪酸メチルをガスクロマトグラフィーで分析した。

ガスクロマトグラフィーには GC-2014FID (SHIMADZU) を、カラムには Stabilwax-DA (全長 30 m、内径 0.32 mm) を使用した。

(5) 細胞内 CoA 濃度の解析

(3) で得られた形質転換体に 0.6 M 硫酸を添加し、細胞内 CoA、アセチル-CoA、およびマロニル-CoA を抽出した。中和後、研究代表者が開発したアシル-CoA サイクリング法で細胞内 CoA プール (CoA、アセチル-CoA、およびマロニル-CoA) を解析した。

(6) パントテン酸キナーゼ (CoaA) 活性

各形質転換体の細胞内 CoaA 活性は D-[¹⁴C]パントテン酸を用いて測定した。反応液の組成は、91 μM D-[¹⁴C]パントテン酸、2.5 mM ATP、10 mM MgCl₂、50 mM Tris-HCl (pH7.5)、および超音波破碎により得られた酵素溶液から構成され (全容 40 μl)、30°C で 1 時間の反応の後、4 μl の酢酸を添加することにより反応を停止した。反応液を Whatman DE81 フィルターディスクに吸着させ、1% 酢酸を含む 95% エタノールで洗浄後、フィルターディスクを 3 ml の Ecoscinti H が入ったシンチレーションチューブに移し、反応生成物である 4'-ホスホパントテン酸の放射活性をシンチレーションカウンターで測定した。

(7) グルコース、酢酸、およびエタノールの測定

形質転換体の培養液中のグルコースおよび酢酸の定量は、SUGAR SH1011 カラム (8.0 × 300 mm) を使って、示差屈折率検出器を装備した HPLC で行った。

(8) 透過型電子顕微鏡による脂肪酸生産菌の形態観察

透過型電子顕微鏡 (TEM) による脂肪酸生産菌の形態観察は、株式会社 東海電子顕微鏡解析に委託した。CoaA、Acc、および FasA 共発現株である JM109/pQE-fasA-acpS + pSTV-dtsR1-accBCE-coaA、および対照株である JM109/pQE-60 + pSTV28 を脂肪酸生産用 M9 培地で 48 時間培養した後、培養液 1 ml から菌体を回収し、急速凍結・凍結置換法で調製された試料から超薄切片 (70 nm) を作成し、TEM (JEM-1400Plus、JEOL) で形態観察した。

4. 研究成果

(1) 大腸菌由来アセチル-CoA カルボキシラーゼによる細胞内マロニル-CoA プールの増大

アセチル-CoA カルボキシラーゼ (Acc) は、アセチル-CoA に CO₂ を付加してマロニル-CoA を生成する酵素である。*E. coli* 由来の Acc は、カルボキシトランスフェラーゼ α-サブユニット (AccA)、ピオチンカルボキシルキャリアプロテイン (AccB)、ピオチン カルボキシラーゼ (AccC)、およびカルボキシトランスフェラーゼ β-サブユニット (AccD) から構成されており、AccC が AccB 上にあるピオチンに CO₂ を固定し、AccA と AccD が AccB の CO₂ をアセチル-CoA に転移することによってマロニル-CoA が生成する。そこで、細胞内のマロニル-CoA レベルを上げるために、*E. coli* からプロモーター領域を含む Acc のサブユニット遺伝子 (*accA*, *accBC*、および *accD*) を PCR で増幅し、単独あるいは複数の遺伝子を組み合わせる pUC118 を用いて Acc の発現プラスミドを構築した。そして、細胞内 CoA プールを増大させる *P. putida* 由来パントテン酸キナーゼ (CoaA) の発現プラスミドである pSTV-CoaA と共に、今回構築した各プラスミドを *E. coli* DH5α に形成転換し、得られた形質転換体を 5 mM パントテン酸、2% グルコース、および 0.5% Yeast extract を含む M9 培地で培養した。

表 1 に示したように、pSTV-coaA と共に、*accA*、*accBC*、*accABC*、あるいは *accBCD* を保持する形質転換体では、対照株の pSTV-coaA のみの保持菌と同等の生育が確認された。しかしながら、AccD であるカルボキシトランスフェラーゼ β-サブユニ

表 1 *P. putida* 由来 CoaA と *E. coli* 由来 Acc サブユニットの共発現が *E. coli* DH5α 形質転換体の細胞内 CoA プールに及ぼす影響

遺伝子	生育 (A660)	CoaA 比活性 (nmol/min/mg)	細胞内 CoA プール (pmol/mg of dry cell wt)			
			A-CoA	M-CoA	CoA	総 CoA
none	4.95	0.0784	nd ^a	7.35	6.51	12.9
<i>coaA</i>	6.26	0.316	24.3	18.9	70.0	113
<i>coaA</i> + <i>accA</i>	7.20	0.228	14.9	18.8	61.3	95.1
<i>coaA</i> + <i>accBC</i>	6.63	0.361	8.47	18.3	52.0	78.8
<i>coaA</i> + <i>accD</i>	2.99	0.753	55.8	58.2	398	512
<i>coaA</i> + <i>accABC</i>	6.85	0.128	18.3	23.5	109	151
<i>coaA</i> + <i>accBCD</i>	7.01	0.207	27.7	24.2	102	154

A-CoA, アセチル-CoA; M-CoA, マロニル-CoA; 総 CoA, アセチル-CoA + マロニル-CoA + CoA.

coaA, pSTV-coaA.

accA, pUC-*accA*; *accBC*, pUC-*accBC*; *accD*, pUC-*accD*; *accABC*, pUC-*accABC*; *accBCD*, pUC-*accBCD*.

^and, not detected.

ット遺伝子の形質転換体では、対照株より明らかに生育が悪かった。*accAD* 保持菌および *accABCD* 保持菌は培養 24 時間ではほとんど生育せず、培養を続けるとプラスミドを脱落した菌株が生育するという現象が観察されたので、表 1 には示していない。

生育が観察された形質転換体は、どれも pSTV-coaA に起因するパントテン酸キナーゼ (CoaA) 活性の上昇が見られたので、培養 24 時間の菌体から CoA およびアシル-CoA を抽出し、アシル-CoA サイクリング法で細胞内アセチル-CoA、マロニル-CoA、および CoA を解析した。対照株となる pSTV-coaA の形質転換体の細胞内 CoA プールサイズはおよそ 9 倍に上昇し、加えて *acc* との共発現株においても増大が観察され、CoaA 活性の解析結果を良く反映していた。マロニル-CoA に焦点を当てると、*accABC* 保持菌および *accBCD* 保持菌でおよそ 25% 程度の上昇は見られたが、*accA* 保持菌、および *accBC* 保持菌では対照菌とほとんど変わらず、アセチル-CoA カルボキシラーゼ サブユニット遺伝子による顕著なマロニル-CoA 増産は観察されなかった。唯一、*accD* 保持菌で CoA プールのサイズがおよそ 5 倍、マロニル-CoA レベルが 3 倍と大きな効果が観察されたが、前述の通り明らかに生育が悪いため、物質生産を検討するには適していないと判断された。また、宿主として利用した *E. coli* DH5 α の細胞内 CoA プールは 0.1 ~ 0.5 nmol/mg of dry cell wt と、他の株が示す CoA プールサイズよりも 1/10 程度と小さいことが分かり、今後のマロニル-CoA の物質生産への応用実験を進めるためには不都合であり、Acc の供給源と共に *E. coli* 宿主の選択も再考する必要が生じた。

(2) *Corynebacterium glutamicum* 由来アセチル-CoA カルボキシラーゼによる細胞内マロニル-CoA プールの増大と脂肪酸生産への応用

次いで、Acc を *Corynebacterium glutamicum* 由来に、宿主を JM109 株にそれぞれ変更し、マロニル-CoA の増産および脂肪酸生産を再検討した。また、脂肪酸合成酵素 (Fas) も強化するため、*C. glutamicum* 由来 FasA の発現プラスミドも構築し、併せて脂肪酸生産を検討した。

C. glutamicum の Acc は、*E. coli* 由来 Acc とは異なり、AccBC と DtsR1 の 2 つのサブユニットから構成される。これらの 2 つの遺伝子に加え AccE 遺伝子を PCR で増幅し、*coaA* と共に pSTV28 のマルチクローニングサイトに *dtsR1*、*accBC*、*accE*、*coaA* の順にクローニングし、発現プラスミド pSTV-dtsR1-accBCE-coaA を構築した。また、*C. glutamicum* 由来 FasA の発現プラスミドは、PCR で増幅した DNA 断片を pQE-60 の T5 プロモーターの下流に *fasA*、*acpS* の順に連結して構築した。構築した各プラスミドを組み合わせて *E. coli* JM109 株に形質転換し、以下の 8 つの形質転換体を得た。

- | | |
|---|--|
| 株 1, JM109 / pSTV28 + pQE-60 | 株 2, JM109 / pSTV28 + pQE-fasA-acpS |
| 株 3, JM109 / pSTV-coaA + pQE-60 | 株 4, JM109 / pSTV-coaA + pQE-fasA-acpS |
| 株 5, JM109 / pSTV-dtsR1-accBCE + pQE-60 | |
| 株 6, JM109 / pSTV-dtsR1-accBCE + pQE-fasA-acpS | |
| 株 7, JM109 / pSTV-dtsR1-accBCE-coaA + pQE-60 | |
| 株 8, JM109 / pSTV-dtsR1-accBCE-coaA + pQE-fasA-acpS | |

株 1 から株 8 について、3. 研究の方法 に記載した脂肪酸増産用 M9 培地に 0.1 mM IPTG を添加した条件で 37°C で 72 時間培養し、各形質転換体の脂肪酸生産量を測定した (図 2)。対照株である株 1、FasA 発現株である株 2、CoaA 発現株である株 3、および CoaA と FasA の共発現株である株 4 での脂肪酸生産量は 70 ~ 100 mg/L の範囲にあり、導入した遺伝子による脂肪酸増産は確認されなかった (図 2A)。しかしながら、Acc の単独発現株である株 5 では、対照株 1 と比較して 2.2 倍の 209 mg/L の脂肪酸を生産した。Acc と FasA 共発現株である株 6 では、対照株 1 の 3.6 倍、Acc 単独発現株 5 の 1.7 倍の脂肪酸生産量を、CoaA および Acc 共発現株である株 7 では、対照株 1 と比較して 3.1 倍、Acc 単独発現株 5 と比較して 1.4 倍高い脂肪酸生産量をそれぞれ示した。さらに、CoaA、Acc、および FasA 共発現株である株 8 では、対照株 1 と比較して 5.6 倍、Acc 単独発現株 5 と比較して 2.6 倍、Acc と FasA 共発現株 6 と比較して 1.5 倍、CoaA および Acc 共発現株 7 と比較して 1.8 倍の 541 mg/L の脂肪酸を生産した。

脂肪酸増産が確認された Acc の形質転換体である株 5 から株 8 が生産する脂肪酸の分子種を解析すると、パルミトレイン酸 (C16:1 Δ 9) の構成比が高くなっていることが分かった (図 2B)。また、最も多くの脂肪酸を生産する株 8 においては、*C. glutamicum* 由来 FasA に起因する C16:1 Δ 7 の *cis*-ヘキサデセン酸および C18:1 Δ 9 のオレイン酸の生産が確認された。これらの結果から、*P. putida* 由来原核 III

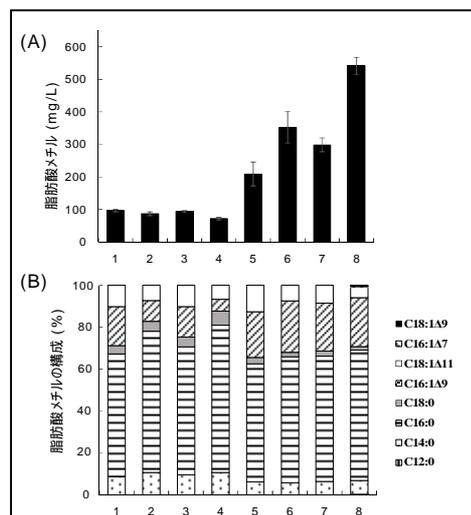


図2 CoaA、Acc、およびFasAが*E. coli* JM109形質転換体の脂肪酸生産量 (A) および脂肪酸組成 (B) に及ぼす影響
1, pSTV28 + pQE-60; 2, pSTV28 + pQE-fasA-acpS; 3, pSTV-coaA + pQE-60; 4, pSTV-coaA + pQE-fasA-acpS; 5, pSTV-dtsR1-accBCE + pQE-60; 6, pSTV-dtsR1-accBCE + pQE-fasA-acpS; 7, pSTV-dtsR1-accBCE-coaA + pQE-60; 8, pSTV-dtsR1-accBCE-coaA + pQE-fasA-acpS.

型 CoaA および *C. glutamicum* 由来 FasA については、それぞれ単独での発現、あるいは両者の共発現では脂肪酸の増産に対しての有効性は確認されなかったものの、*C. glutamicum* 由来 Acc の発現は大腸菌の脂肪酸増産に有効であることが示された。また、Acc の発現下では CoaA によるアセチル-CoA 供給系の強化および FasA による脂肪酸合成系の強化も効果があったので、脂肪酸生産においては Acc によるマロニル-CoA 供給系の強化が鍵となることが明らかとなった。さらに、*C. glutamicum* 由来 FasA を発現する株 8 においてはオレイン酸 (C18:1 Δ9) が検出されたことから、CoaA および Acc を異種細菌由来の脂肪酸合成酵素と組み合わせることで、大腸菌では本来生産しない脂肪酸を生成させることができる可能性が示唆された。

次いで、脂肪酸の増産が確認された株 8 について、IPTG 存在下での培養中における生育、脂肪酸生産量、および細胞内 CoA プールの経時変化を解析した。図 3A に示したように、CoaA、Acc、あるいは FasA 遺伝子を持っていない対照株 1 では速やかに生育し、培養 12 時間で定常期に達した。一方、前記 3 つの遺伝子を有する脂肪酸高生産株である株 8 は培養初期に明らかな生育の遅延が観察された。しかしながら、培養 24 時間では株 1 とほぼ同じになり、培養 48 時間以降では株 1 よりも高い値を示した。

細胞内 CoA プールサイズは、生育状態を良く反映していた (図 3B)。株 1 においては培養 12 時間で最大の 2.43 nmol/mg of dry cell wt を示し、アセチル-CoA が主要な CoA 分子種で、マロニル-CoA は 0.144 nmol/mg とマイナーな分子種であった。培養 24 時間後ではプールサイズは 1.40 nmol/mg、48 時間後では 0.130 nmol/mg、72 時間後では 0.065 nmol/mg と時間経過と共に小さくなった。株 1 の脂肪酸含量は培養 12 時間で最大値の 122 mg/L を示し、以降時間経過と共にわずかに減少していった (図 3C)。一方、脂肪酸を生産する株 8 は、生育阻害が観察される培養 12 時間では、株 1 と比較して、40% 程度の CoA プールサイズであるが、マロニル-CoA レベルが高く、CoA プールのおよそ 90% を占めていた。定常期初期の培養 24 時間で CoA プールサイズは最大 4.89 nmol/mg を示し、株 1 での最大値の約 2 倍となった。この結果は CoaA による効果を良く反映している。また、マロニル-CoA は 0.924 nmol/mg と高いレベルにあり、Acc の効果が依然として続いていることを示している。培養 48 時間、72 時間になると CoA プールのサイズは 0.3 nmol/mg 程度に小さくなるが、マロニル-CoA が半分以上占めており、主要な構成成分となっていた。この高いマロニル-CoA レベルは脂肪酸生産に反映しており、培養時間の経過と共に大きくなり、48 時間後に株 1 のおよそ 7 倍に相当する 670 mg/L に達した。

培養 72 時間後のグルコースの消費は、株 1 では 0.6% (w/v) 程度であったが、脂肪酸生産株 8 では 1.4% (w/v) と大きく、脂肪酸の増産につながったことを示していた。

CoaA、Acc、および FasA による脂肪酸生産株 8 について、細胞内における脂肪酸の蓄積場所を確認するため、透過型電子顕微鏡で細胞を観察した。図 4 に示したように、対照株 1 の細胞サイズはおよそ 2–3 μm であるのに対して、生産株 8 は 10 μm 以上のサイズとなるものも確認され、細胞が肥大化していることが分かった。また、株 8 の細胞膜周辺に着目すると、細胞膜の内側に白い層が観察された。

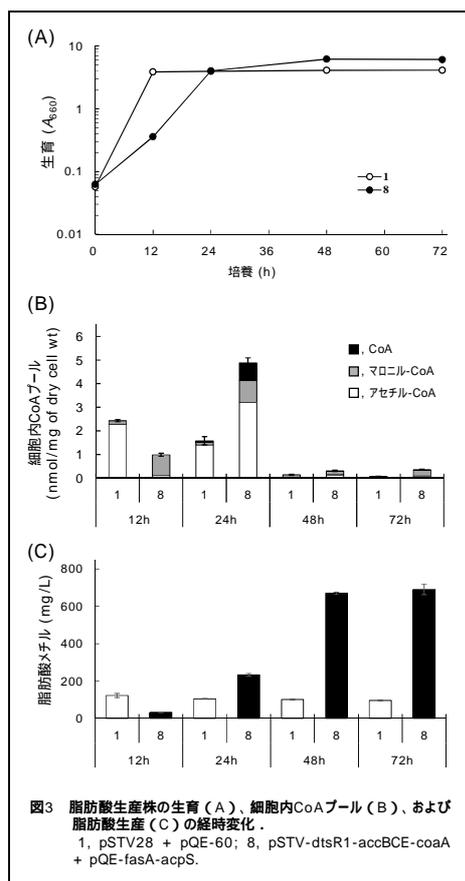


図3 脂肪酸生産株の生育 (A)、細胞内CoAプール (B)、および脂肪酸生産 (C) の経時変化。1, pSTV28 + pQE-60; 8, pSTV-dtsR1-accBCE-coaA + pQE-fasA-acpS.

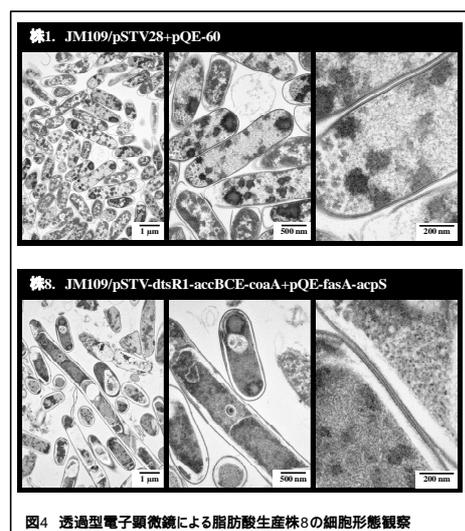


図4 透過型電子顕微鏡による脂肪酸生産株8の細胞形態観察

(3) CoaA 遺伝子およびパントテン酸合成酵素 (Pan) 遺伝子のゲノム DNA への導入

(1)および(2)で実施した研究ではプラスミドを使って CoaA を強化した。しかしながら、プラスミドには不和合性があるので、形質転換できる遺伝子の数は制限される。そこで、細胞内 CoA を増産するのに必要な *P. putida* 由来 *coaA*、およびパントテン酸供給に必要な *panB*、*panC*、*panD*、*panE* を *C. glutamicum* から調製し、*E. coli* JM109 株から作製した JB9 株のゲノム DNA への導入

を検討した(図5)。本実験は研究協力者である西澤智康 博士と共に実施した。

まず、プラスミドを使って、R4 フェージの組換え部位である 2 つの attP 間の T5 プロモーターの下流に coaA を連結した後、複製起点を除去した環状 DNA を作製した。pSre を保持する *E. coli* JB9(4) の細胞内に本環状 DNA をエレクトロポレーションで入れ、Sre による attB × attP 間の部位特異的組換えを行ったところ、図 5 に示した *E. coli* JB9-coaA 株を取得することに成功した。取得した菌株を 0.1 mM IPTG 存在下、あるいは非存在下で 2% グルコースおよび 5 mM パントテン酸を含む M9 培地で 30°C で 16 時間振とう培養し、CoaA 活性および細胞内 CoA プールを解析した。JB9-coaA 株の CoaA 活性は IPTG 非存在下で JB9 株のおよそ 13 倍、存在下で 120 倍に上昇した。これらの結果からゲノム DNA に導入された coaA は T5 プロモーター下で機能していることが確認された。また、IPTG による誘導がなくても、十分に CoaA 活性が上がっていることも明らかとなった。この時の細胞内 CoA プールは IPTG 非存在下で対照株のおよそ 6 倍、IPTG 存在下では 21 倍大きくなっており、CoaA による効果が反映されていた。

CoaA 導入による細胞内 CoA プールの増大に成功したので、次にパントテン酸の培地への添加なしに細胞内 CoA プールを大きくするため、JB9-coaA 株のゲノム DNA へのパントテン酸合成系遺伝子の導入を試みた。しかしながら、ゲノム DNA 上の attP と panD-panB-panE-panC 断片を含む環状 DNA 上の attB 間での組換えは起こらず、パントテン酸供給系強化株を取得することはできなかった。導入する断片のサイズが大きすぎるのが一つの要因と考えられたため、2 つの attB 間に panD だけを持つ環状 DNA を作製して、再度、部位特異的組換えを試みたが、目的の形質転換体を得ることはできなかった。

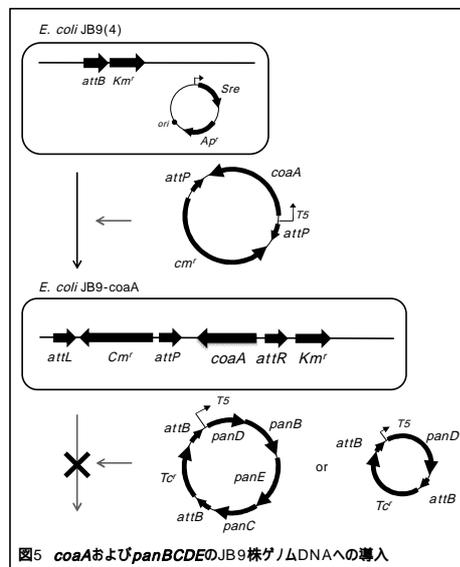


図5 coaAおよびpanBCDEのJB9株ゲノムDNAへの導入

(4) 総括

本申請課題の目的の一つであるマロニル-CoA 増産については、*C. glutamicum* のアセチル-CoA カルボキシラーゼ (Acc) を使用することによって達成された。さらに、本形質転換体は細胞内のマロニル-CoA レベルを上げるばかりでなく、脂肪酸も増産した。脂肪酸増産には、Accに加えて CoA 増産に効果があるパントテン酸キナーゼ (CoaA) および脂肪酸合成酵素 (Fas) の共発現も有効であった。また、CoaA および Acc を使って細胞内マロニル-CoA レベルを上げると、外来 Fas の特徴に依存した大腸菌では本来生成しない脂肪酸分子種の生産も可能であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3件)

佐藤 州朔、尾崎 美帆、朝山 宗彦、長南 茂、脂肪酸生産におけるマロニル-CoA 増産の有効性、第 13 回日本ゲノム微生物学会年会、2019、首都大学東京 南大沢キャンパス(東京都)
 根岸 剛志、西澤 智康、三浦 隆匡、長南 茂、外来パントテン酸キナーゼ遺伝子の*E. coli* JB9ゲノムへの導入によるコエンザイム A 合成経路の強化、環境微生物系合同大会 2017、2017、東北大学川内キャンパス(宮城県 仙台市)
 首藤 誉史、長南 茂、大腸菌由来アセチル-CoA カルボキシラーゼを用いたマロニル-CoA の増産、日本微生物生態学会第 31 回大会、2016、横須賀市文化会館(神奈川県 横須賀市)

〔その他〕

ホームページ等

<https://info.ibaraki.ac.jp/Profiles/5/0000444/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：西澤 智康

ローマ字氏名：(NISHIZAWA , tomoyasu)