

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05409

研究課題名(和文) コリネ型細菌による中鎖脂肪酸生産技術の開発

研究課題名(英文) Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of medium-chain fatty acids

研究代表者

池田 正人 (IKEDA, Masato)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：00377649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、コリネ菌による中鎖生産技術の開発を試み、以下の知見を得た。長鎖生産菌に、脂肪酸合成酵素FasAの鎖長伸長を担うケトアシルシンターゼ(KS)ドメイン内変異(Thr2563Ile)を導入すると、長鎖の生産が抑制され、微量ながら中鎖(C8～12)の生成が起こる。長鎖生産菌で、枯草菌のBiol酵素を発現させると、微量ながら中鎖飽和脂肪酸であるノナン酸(C9)が生成する。リポ酸の前駆体である中鎖(C8)のデノボ合成は、サブの脂肪酸合成酵素FasBが担うも、微弱なバイパス経路がある。メインの脂肪酸合成酵素であるFasAがその候補。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中鎖脂肪酸(C8～12)は、母乳に含まれ、近年、長鎖型とは異なる生理作用があることがわかってきた。最近では、アルツハイマー病など認知障害の改善効果が相次いで報告されている。加えて、工業用としても、洗剤や乳剤、殺菌剤等、中鎖型に特有の用途がある。しかし、これらの供給は、一部の植物や藻類のもつ油脂に依存しており、潜在需要の拡大に伴い、高い生産性と安定した量産化が課題となっている。この状況に鑑み、我々は、独自に開発したコリネ菌の長鎖脂肪酸生産菌を用いて、長鎖に向かう炭素を中鎖の段階で生成させるための諸検討を行った。その成果として、本研究は、中鎖生産の可能性を示す3つの戦略を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：We attempted to engineer long-chain fatty acid-producing *Corynebacterium glutamicum* to produce medium-chain fatty acids. Our findings include:

(1) Introduction of a specific mutation in the ketoacyl synthase domain of the *fasA* gene into the long-chain fatty acid producer resulted in generation of a significant amount of medium-chain fatty acids (C8～12) in exchange for reduced production of long-chain fatty acids. (2) Expression of the *biol* gene of *Bacillus subtilis* in the long-chain fatty acid producer resulted in generation of nonanoic acid (C9), albeit in a small amount. (3) The lipoic acid precursor octanoyl-CoA (C8) originates predominantly from the FasB route, but slightly from another bypass route, which is likely to be the FasA route.

研究分野：応用微生物学

キーワード：コリネバクテリウム グルタミカム 中鎖脂肪酸 脂肪酸合成酵素 Biol リポ酸合成経路

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 中鎖脂肪酸 (C8~12) は、母乳に含まれ、近年、長鎖型とは異なる生理作用があることがわかってきた [Pharmacol Res, **61**, 208 (2010)]。最近では、アルツハイマー病など認知障害の改善効果が相次いで報告されている [J Oleo Sci, **65**, 693 (2016) ; Neurochem Int, **105**, 64 (2017)]。加えて、工業用としても、洗剤や乳化剤、殺菌剤等、中鎖型に特有の用途がある [日本農芸化学会 2012 年度大会 (2C10a02)]。

(2) これらの供給は、現在、一部の植物や藻類のもつ油脂に依存しているが、需要拡大に伴い、高い生産性と安定した量産化が見込める細菌による発酵法の開発が望まれている。

(3) このような状況の中、我々は、コリネ菌がただ一つの遺伝子変異で糖から長鎖脂肪酸 (C16~18) を過剰合成し、かつそれを菌体外に分泌することを見出し、本菌種に長鎖脂肪酸生産菌としてのポテンシャルがあることを報告した (図 1 黒矢印) [Appl Environ Microbiol **79**:6776 (2013)]。

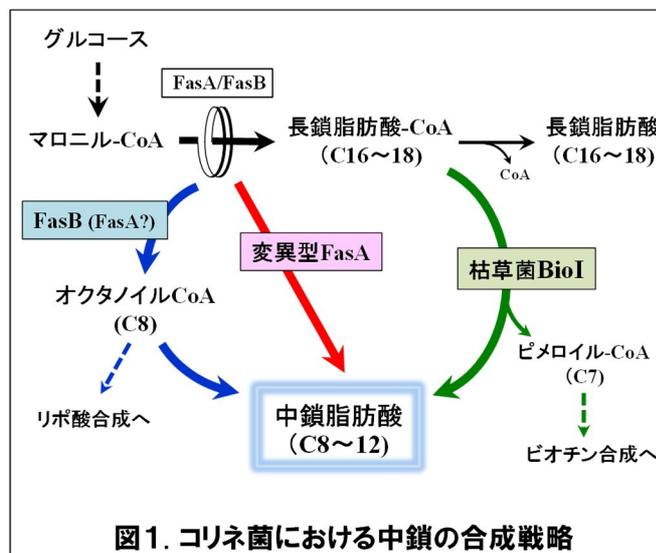
(4) 一方、一部の細菌は、長鎖 (CoA 体) を開裂してピオチン合成基質ピメロイル-CoA (C7) を供給する酵素 (BioI) を有する。コリネ菌にはない。我々は、枯草菌 *bioI* 遺伝子をコリネ菌で発現させると、ピメリン酸 (C7 のシカルボン酸) が分泌生成することを見出した (図 1 緑矢印) [Appl Environ Microbiol **83**, e01322-17 (2017)]。

(5) これに関連して、我々は、最近、リポ酸の前駆体である C8 の中鎖オクタノイル CoA が、コリネ菌では生物界の定説とは異なる I 型の脂肪酸合成酵素 (FasB) で合成されていることを見出した (図 1 青矢印) [Appl Environ Microbiol **83**, e01322-17 (2017)]。しかし、その破壊株がオクタン酸 (C8) の完全要求性にならないことから、C8 供給にバイパス経路が存在する可能性も掴んだ。

2. 研究の目的

(1) 我々が開発した長鎖脂肪酸生産菌において、長鎖に向かう炭素を中鎖の段階で止めることができれば中鎖生産の独自技術に成り得る。その技術開発を目指す (図 1 赤)。

(2) *bioI* 遺伝子は、コリネ菌にはないが、枯草菌遺伝子をコリネ菌で発現させると、長鎖 (CoA 体) を開裂して C7 のシカルボン酸であるピメリン酸を分泌生成する。その副産物として、ピメリン酸と等量の中鎖脂肪酸が蓄積している可能性がある (図 1 緑)。その分析を行い、BioI 酵素が中鎖生産に利用可能かどうかを検証する。



(3) コリネ菌はグルコースからリポ酸をデノボ合成できる。つまり、リポ酸の前駆体である中鎖 (C8) の合成経路を有していると考えられるが、その経路は明らかでない。我々は、その主経路が脂肪酸合成酵素の FasB であることを突き止めたが、同時に、別のバイパスが潜む可能性も掴んだ。そのバイパス経路を明らかにし、中鎖の新たな生産法に繋げる (図 1 青)。

3. 研究の方法

(1) 脂肪酸合成酵素 Fas の改変により長鎖生産菌を中鎖生産菌に転換できないかの検討には、Fas の阻害剤セルレニンを用いた。具体的には、その耐性株を誘導し、それらの中鎖生成能の有無を調べた。目的変異株を得たら、*fas* 遺伝子に着目してシーケンス解析により原因変異を特定した。

(2) 枯草菌酵素 (BioI) を発現するコリネ菌の発酵産物中における中鎖の定量は、GC-MS 分析法により行った。

(3) コリネ菌が本来合成できない不飽和のパルミトレオイル CoA (C16:1⁹) の合成経路の確

立は、遺伝子組換え手法により、目的に沿う活性 (acyl-CoA $\Delta 9$ -desaturase) を *Pseudomonas* 属細菌から導入することで行った。

(4) リポ酸の前駆体であるオクタノイル CoA (C8) の合成経路に潜むバイパス経路の解明は、オクタン酸リーキー性の FasB 破壊株からオクタン酸完全要求性を示すバイパス欠損株を誘導し、その原因変異を全ゲノム解析で特定することにより行った。

4. 研究成果

(1) 脂肪酸合成酵素 Fas の改変により長鎖生産菌を中鎖生産菌に転換できないかを検討。Fas の阻害剤セルレニン耐性株を誘導すると、その中に長鎖生産が抑制された変異株が出現。内 2 株が *fasA* 遺伝子の鎖長伸長を担う領域に同一変異(Thr2563Ile)を有すること判明。同 2 株 (#114 株と#138 株) は親株が生成しない中鎖をごく微量ながら生成 (図 2)。本結果は、FasA の特定の変異が、狙いとする代謝変換につながることを示唆。

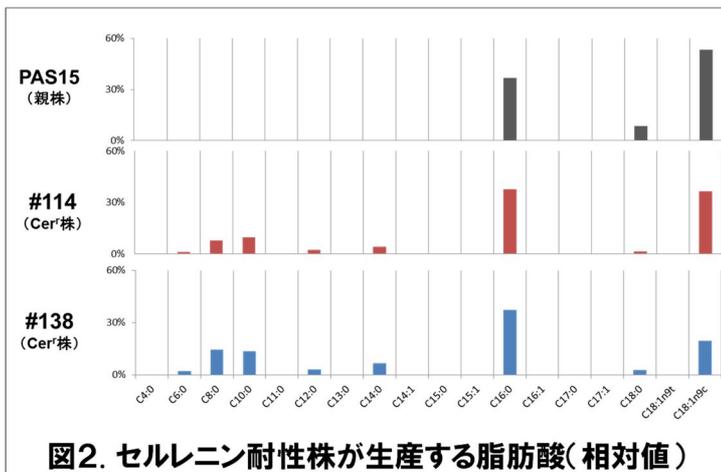


図2. セルレニン耐性株が生産する脂肪酸(相対値)

(2) 枯草菌 *BioI* 遺伝子をコリネ菌の長鎖生産菌で発現させ、中鎖生成が起こるかを検証。発酵液を分析した結果、ピメリン酸の生成に伴い、コリネ菌が本来生産しないノナン酸 (C9) の生成を認めた (図 3)。生成量はピメリン酸と等モル。本結果は、*BioI* が、コリネ菌の主要なオレオイル CoA (C18:1) を基質とせず、副次的なパルミトイル CoA (C16:0) のみを基質としていることを示す。一方、フィード実験で、本菌種が元来合成できないパルミトレオイル CoA (C16:1) (図 4) は *BioI* のより良好な基質になることを見出す。

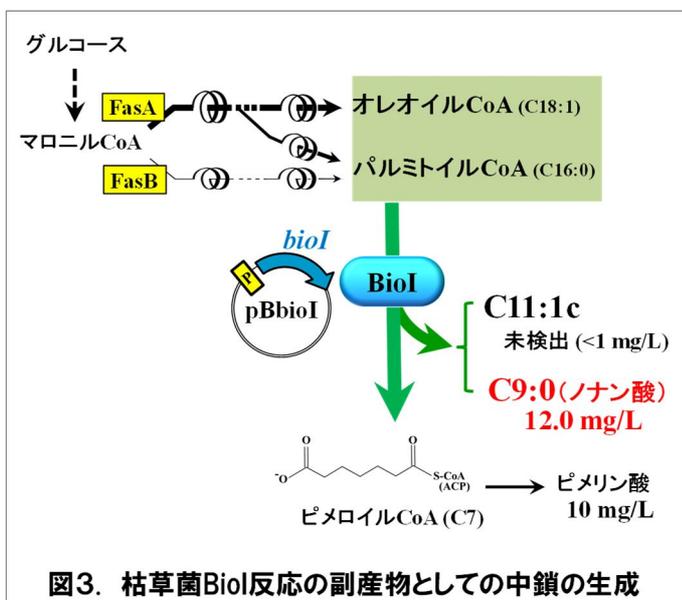


図3. 枯草菌BioI反応の副産物としての中鎖の生成

(3) そのパルミトレオイル CoA を自前合成できるコリネ菌を育種するため、狙いに沿う acyl-CoA $\Delta 9$ -desaturase 遺伝子(*desBC*) (図 4) を *Pseudomonas* 属細菌からクローン化して、パルミチン酸生産菌に導入。コリネ菌内で機能発現する条件を整えることで、目的株を得た。

(4) リポ酸前駆体オクタノイル CoA (C8) 合成の主経路は FasB であるが (図 1 青)、実体不明のバイパス経路が潜む。その経路を特定するため、オクタン酸リーキー性の FasB 破壊株からバイパス欠損株 (オクタン酸完全要求性) の誘導を試み、目的候補を 1 株取得。全ゲノム解析で、同株は *fasA* 内部にミスセンス変異を有していることがわかった。これが原因変異であれば、FasA が微弱ながらバイパスとなって C8 供給に関わっていると考えられる。

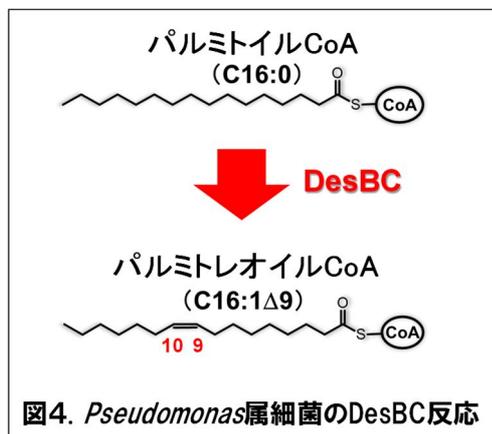


図4. *Pseudomonas*属細菌のDesBC反応

(5) 上述で得たオクタン酸完全要求株は、中鎖を特異的に検出できるバイオアッセイ系の指示菌としての応用性も持つことを確認。中鎖は細菌の細胞膜の構成成分ではないため、これまでに中鎖の特異的な要求株は知られておらず、本研究が最初である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ikeda Masato, Takahashi Keisuke, Ohtake Tatsunori, Imoto Ryosuke, Kawakami Haruka, Hayashi Mikiro, Takeno Seiki	4. 巻 87
2. 論文標題 A Futile Metabolic Cycle of Fatty Acyl Coenzyme A (Acyl-CoA) Hydrolysis and Resynthesis in <i>Corynebacterium glutamicum</i> and Its Disruption Leading to Fatty Acid Production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.02469-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeno S, Murata N, Kura M, Takasaki M, Hayashi M, Ikeda M	4. 巻 102
2. 論文標題 The accD3 gene for mycolic acid biosynthesis as a target for improving fatty acid production by fatty acid-producing <i>Corynebacterium glutamicum</i> strains.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Appl Microbiol Biotechnol	6. 最初と最後の頁 10603-10612
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-018-9395-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大竹辰徳、高橋敬祐、井元瞭介、竹野誠記、池田正人
2. 発表標題 コリネ型細菌の脂肪酸代謝に見出した基質回路 (Futile cycle) の検証と意義
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北村嘉子、竹野誠記、池田正人
2. 発表標題 コリネ型細菌によるパルミトレイン酸の生産 (第三報)
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原志門、竹野誠記、池田正人
2. 発表標題 コリネ型細菌によるデチオビオチンの生産
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北村嘉子、大竹辰徳、林 幹朗、竹野誠記、池田正人
2. 発表標題 コリネ型細菌によるパルミトレイン酸の生産（第一報）
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北村嘉子、大竹辰徳、林 幹朗、竹野誠記、池田正人
2. 発表標題 コリネ型細菌によるパルミトレイン酸の生産（第二報）
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹野誠記、中村絵梨、大竹辰徳、梅澤公二、林 幹朗、池田正人
2. 発表標題 コリネ型細菌内での枯草菌Biol 酵素の基質解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木邦祥、村田紀子、林 幹朗、竹野誠記、池田正人
2. 発表標題 コリネ型細菌によるパルミチン酸単独発酵
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋敬祐、大竹辰徳、井元瞭介、林 幹朗、竹野誠記、池田正人
2. 発表標題 コリネ型細菌における脂肪酸の新たな生成機構
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Ikeda Masato & Takeno Seiki	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 pp175-226
3. 書名 Microbiology monographs 23, Corynebacterium glutamicum	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究者総覧： http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.uhLNPUkh.html?lng=ja&id=uhLNPUkh</p> <p>Researchmap： https://researchmap.jp/read0131716</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	竹野 誠記 (Takeno Seiki) (30422702)	信州大学・学術研究院農学系・准教授 (13601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関