

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05788

研究課題名(和文) パルミトレイン酸生産菌の開発

研究課題名(英文) Development of palmitoleic acid-producing *Corynebacterium glutamicum* strains

研究代表者

竹野 誠記 (TAKENO, Seiki)

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号：30422702

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)：パルミトレイン酸(Pol, C16:1-9)の生産菌の育種に取り組んだ。成果は以下の通りである。(1)パルミチン酸(Pal, C16:0)だけを高生産するコリネ菌を宿主に、他菌種の脂肪酸不飽和化酵素(DesBC)を用いて、PalをPolに変換する代謝系を成立させた菌株 M-1を取得した。(2)この代謝系の成立に寄与する遺伝学的要因を明らかにした。(3)得られた知見に基づいて培地条件を検討し、M-1株によるPol生産の向上を図った。その結果、全脂肪酸に占めるPolの割合が極めて高い脂肪酸生産を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パルミトレイン酸(Pol)は様々な機能性を有する脂肪酸である。現在の供給源はごく一部の植物に依存しているが、拡大するPolの需要を満たせるものではない。もともとPolを生産する微生物を用いた生産研究が試みられているが、実用レベルには至っていない。本研究課題では、(1)80%もの割合でPolを含む脂肪酸を生産できる菌を育種した。このような高い割合でPolを生産した例はこれまでにない。また、(2)Polを生産しない菌株からその生産菌を構築するための育種戦略を提案した。いずれもPolの発酵生産の実現に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：We attempted to develop a palmitoleic acid-producing *Corynebacterium glutamicum* strain. Our achievements include: (1) The conversion of palmitic to palmitoleic acid was established in a strain that was beforehand engineered to exclusively produce palmitic acid, using a heterologous acyl-CoA 9-desaturase (DesBC). (2) The genetic background responsible for the establishment was identified. (3) The investigation of medium conditions resulted in fatty acid production of which palmitoleic acid accounts for considerably high proportion.

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 パルミトレイン酸 パルミチン酸 脂肪酸生合成 脂肪酸不飽和化酵素 鉄 応用微生物学 代謝工学

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

パルミトレイン酸 (Pol; C16:1Δ9) は、インスリン感受性の増強効果、抗炎症作用、心血管系の保護効果、発癌の抑制効果をはじめ、様々な機能性を有する脂肪酸である<sup>1)</sup>。機能が次々と明らかにされるにつれ、その需要は拡大している。Pol の供給は、現在、ごく一部の植物に依存しているが、拡大しつつある Pol の需要を満たせるものではない。発酵法は安定供給が可能で、環境面・コスト面でも利点を持つ。そのため、微生物を用いた Pol の生産研究が試みられているが、実用レベルには至っていない。

産業微生物である *Corynebacterium glutamicum* (コリネ菌) は、様々な有用物質の生産宿主としての実績がある微生物である<sup>2)</sup>。脂肪酸代謝について言えば、コリネ菌は脂肪酸を合成する酵素を2つ持つ。FasA と FasB である<sup>3)</sup>。両酵素はアセチル-CoA を同一の起点として、FasA はオレイン酸 (Ole) を合成し、FasB はパルミチン酸 (Pal; C16:0) を合成する。最終産物はいずれも脂肪酸-CoA である。

我々は、コリネ菌では初めてとなる脂肪酸高生産菌を育種してきた [Takeno et al. Appl Environ Microbiol 79:6776-6783 (2013); Takeno et al. Appl Microbiol Biotechnol 102:10603-10612 (2018)]。この生産菌は、有用脂肪酸の有効な生産宿主としてのポテンシャルを有するもの、商品価値に乏しい Ole と Pal しか生産しない。これらを付加価値の高い脂肪酸に転換することが課題だった。

生産菌の FasA を欠損して FasB だけを残すと、Pal だけを高生産する菌株が得られることを報告した (Pal 単独生産菌) [日本農芸化学会 2019 年度大会、1C7a09 (2019)]。また、FasA の欠損は Ole の要求性を伴ったが、この要求性は Ole に限らず Pol でも満たせることを明らかにした [日本農芸化学会 2020 年度大会、3A11p16 (2020)]。このことは、Pal 単独生産菌で Pol の合成が起これば、そのような菌株は脂肪酸非要求性になるから、ポジティブに選抜できることを意味する。一方、他菌種に目を向けると、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) は、DesBC と呼ばれる脂肪酸不飽和化酵素を持つ。Pal-CoA を不飽和化して Pol-CoA を生成する酵素である<sup>4)</sup>。これらを組み合わせれば、Pal 単独生産菌が FasB で合成する Pal-CoA を直接の基質とする Pol 生産菌の育種が可能である。このように考え、本研究課題「パルミトレイン酸生産菌の開発」を構想するに至った。育種戦略の概要を図1に示す。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、Pol 生産菌を育種することである。そのために、Pal 単独生産菌を宿主に、Pal-CoA を Pol-CoA に変換する代謝系を成立させる。

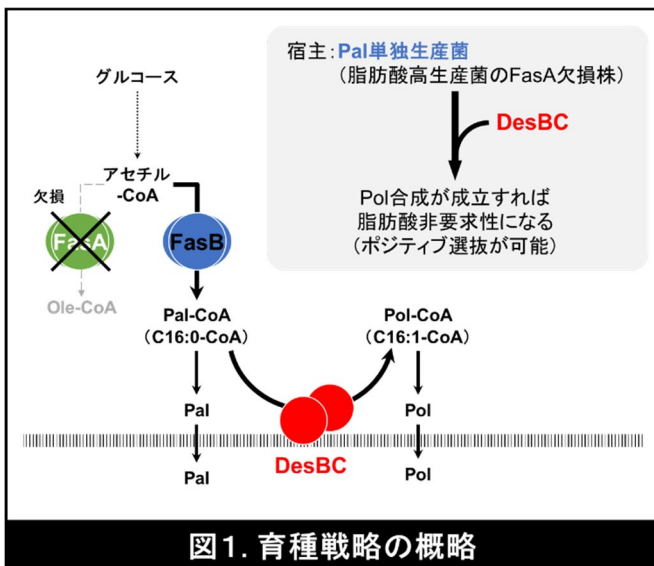
(2) 上記の代謝系の成立に寄与する遺伝学的要因を明らかにするとともに、Pol 生産性の向上を導く培地条件を見出すことも課題とした。

## 3. 研究の方法

*desBC* 遺伝子の選定は、広範なホモロジー解析にて行った。選定した *desBC* 遺伝子はプラスミドで恒常発現させた。変異の同定は次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析で行った。脂肪酸分析にはガスクロマトグラフィーを用い、Pol の同定は標品との重ね打ちで行った。

## 4. 研究成果

Pal-CoA を Pol-CoA に変換する酵素を調査した結果、緑膿菌が DesBC を持つという知見に行き着いた。しかし、緑膿菌は日和見性感染症の原因菌であり、DesB はその感染に関与することが示唆されている<sup>5)</sup>。その使用は、先々の実用菌の育種を考えると社会的な抵抗感を伴うことが懸念された。そこで、緑膿菌の DesB のアミノ酸配列を基に広範なホモロジー解析を行い、菌株が入手可能であること、病原菌でないこと、*desC* ホモログ遺伝子とオペロンを形成していることの3点を条件に、DesB と同じ働きを持つ酵素遺伝子を検索した。その結果、*Pseudomonas* 属の一種が、これらの条件を満たす *desB* ホモログ遺伝子を持つことが判明した。この菌種の *desBC* オペロンの発現プラスミドを構築し、Pal 単独生産菌に導入して、生育挙動を



解析した。

期待に反して、この導入だけでは宿主の脂肪酸要求性は消失しなかった。しかし、導入株から要求性が消失した変異株が自然変異で得られることを見出した。そのようにして得られた代表株 M-1 を通常の最少培地（糖源として 10 g/L のグルコースを含み、鉄源として 10 mg/L の  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  を含む）で培養したところ、ごく微量ながら Pol を生産していることが判明した [日本農芸化学会 2020 年度大会, 3A11p16 (2020)]。また、プラスミドを脱落させると脂肪酸要求性に戻ったことから、M-1 株の脂肪酸非要求性の生育はプラスミドに依存していることが判明した。

M-1 株は DesBC を働かせる何らかの変異を有すると考えられた。これを同定し、特徴づけを行うことは、本研究の育種に重要な視点を与えるものと期待された。全ゲノム解析を実施したところ、M-1 株は、細胞内での鉄の利用性の向上に寄与すると考えられる変異を有していた。親株である Pal 単独生産菌での再構築実験により、この変異が原因変異であることを確認した。注目すべきは DesBC が鉄酵素であるという点である。同変異は細胞内の鉄の利用性を高めることで、DesBC の機能発現を導いていると考えられた。

本研究の育種には鉄が重要な意味をもつ。M-1 株の Pol の生産性を向上させる目的で、鉄の利用性の観点から培地条件を検討した。通常の最少培地に、コリネ菌が利用可能な別種の鉄源を追加したところ（図 2、条件 ①）Pol の生産量は 7 倍に増加し（17 mg/L → 119 mg/L）Pal/Pol の変換率 [  $\text{Pol} / (\text{Pal} + \text{Pol})$  ] が大幅に改善された（9% → 58%）。この条件に、さらに、鉄の利用性を高める条件を付与すると（図 2、条件 ②）Pol の生産量は元の 9 倍以上に増加し（17 mg/L → 160 mg/L）、変換率は 80% を超えた。全脂肪酸量はいずれの条件でも 200 mg/L 前後で変わらず、Pol 以外の脂肪酸は Pal のみと言える脂肪酸組成だった（図 2）。すなわち、生産された全脂肪酸に占める Pol の割合を 80% まで高めることができた。80% もの Pol から構成される脂肪酸生産はこれが初めての例である<sup>1, 6-12</sup>。

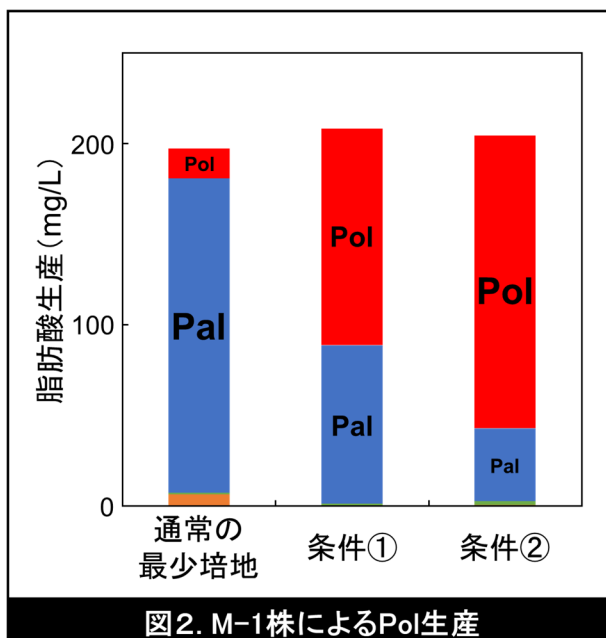


図 2. M-1 株による Pol 生産

#### < 引用文献 >

1. Zhou et al. 2017. Heterotrophy of filamentous oleaginous microalgae *Tribonema minus* for potential production of lipid and palmitoleic acid. *Bioresour Technol* 239:250-257
2. Becker J, Wittmann C. 2012. Bio-based production of chemicals, materials and fuels – *Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory. *Curr Opin Biotechnol* 23:631-640
3. Radmacher et al. 2005. Two functional FAS-I type fatty acid synthases in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* 151:2421-2427
4. Zhu et al. 2006. Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 60:260-273
5. Schweizer HP, Choi KH. 2011. *Pseudomonas aeruginosa* aerobic fatty acid desaturase DesB is important for virulence factor production. *Arch Microbiol* 193:227-234
6. Kamisaka et al. 2015. Addition of methionine and low cultivation temperatures increase palmitoleic acid production by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:201-210
7. Kolouchová et al. 2015. New yeast-based approaches in production of palmitoleic acid. *Bioresour Technol* 192:726-734
8. Wang et al. 2018. Evaluation of oleaginous eustigmatophycean microalgae as potential biorefinery feedstock for the production of palmitoleic acid and biodiesel. *Bioresour Technol* 270:30-37
9. Wang et al. 2016. Growth and palmitoleic acid accumulation of filamentous oleaginous microalgae *Tribonema minus* at varying temperatures and light regimes. *Bioprocess Biosyst Eng* 39:1589-1595
10. Zhang et al. 2022. Harnessing transcription factor Mga2 and fatty acid elongases to overproduce palmitoleic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Eng J* 181:108402
11. Zhou et al. 2019. Comparison of lipid and palmitoleic acid induction of *Tribonema minus* under heterotrophic and phototrophic regimes by using high-density fermented seeds. *Int J Mol Sci* 20:4356
12. Zhou et al. 2021. Evaluating the effect of cultivation conditions on palmitoleic acid-rich lipid production by *Scheffersomyces segobiensis* DSM 27193. *Biofuels Bioprod Bioref* 15:1859-1870

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ikeda M, Takahashi K, Ohtake T, Imoto R, Kawakami H, Hayashi M, Takeno S	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 Appl Environ Microbiol	6. 最初と最後の頁 e02469-20
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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 ○佐藤 美奈子, 村田 紀子, 村松 哲広, 竹野 誠記, 池田 正人
2. 発表標題 コリネ型細菌における長鎖脂肪酸排出輸送体の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会（京都），3B02-03，2022年3月17日
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ○村田 春樺, 内藏 萌, 竹野 誠記, 池田 正人
2. 発表標題 コリネ型細菌による中鎖脂肪酸生産への代謝工学
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会（京都），3B02-04，2022年3月17日
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ○津久井 裕太, 竹野 誠記, 池田 正人
2. 発表標題 コリネ型細菌におけるリポ酸の炭素骨格 C8 供給経路の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会（京都），3B02-05，2022年3月17日
4. 発表年 2022年

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 (仙台), 3A01-11, 2021年3月20日
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 (仙台), 3A01-12, 2021年3月20日
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 (福岡), 3A11p15, 2020年3月27日
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 (福岡), 3A11p16, 2020年3月27日
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	池田 正人  (IKEDA Masato)  (00377649)	信州大学・学術研究院農学系・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
---------	---------