

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580110

研究課題名(和文) アクリル酸生産関連遺伝子の分子機能解析とアクリル酸生産バイオプロセスへの展開

研究課題名(英文) Molecular characterization of acrylic acid production related genes and its application for bioprocess of acrylic acid production

研究代表者

麻生 祐司 (Aso, Yuji)

京都工芸繊維大学・工学科学研究科・准教授

研究者番号：70380590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：Megasphaera elsdenii JCM1772株由来アクリル酸生産関連遺伝子pctおよびlcdCABをEscherichia coli BW25113 (DE3, pflA)にて発現させた。得られた形質転換体をM9培地にて嫌気培養したところ、培養18h後に0.17 mMのアクリル酸を生産した。同様の実験をLactococcus lactis NZ9000 (L-ldh::D-ldh)にて行ったが、アクリル酸生産は確認できなかった。その理由として、NZ9000におけるPctおよびLcdCABの発現量が十分でないことが考えられた。

研究成果の概要(英文)：The pct and lcdCAB genes from Megasphaera elsdenii JCM1772 were expressed in Escherichia coli BW25113 (DE3, pflA). The transformant was cultivated in M9 medium, resulting in 0.17 mM acrylic acid production after 18 h cultivation. A similar experiment was done using Lactococcus lactis NZ9000 (L-ldh::D-ldh). However, no production of acrylic acid was confirmed in the engineered strain. As a reason for that, the expression levels of Pct and LcdCAB were low.

研究分野：応用微生物学

キーワード：アクリル酸 代謝工学 発酵工学 バイオベースマテリアル

## 1. 研究開始当初の背景

D-乳酸からアクリル酸を生産するアクリル酸生産野生株 *Megasphaera elsdenii* JCM1772 のアクリル酸生産経路について、その概要が明らかとなっている。まず、乳酸はプロピオン酸-CoA 転移酵素 Pct によりラクチル-CoA へと変換され、さらにラクチル-CoA 脱水酵素 LcdCAB によりアクリリル-CoA へと変換される。アクリリル-CoA はアクリル酸-CoA 転移酵素(未同定)により一部がアクリル酸へと変換された後、アクリル酸トランスポーター(未同定)により菌体外へと輸送される。一方、アクリリル-CoA の大部分はアクリリル-CoA 還元酵素によりプロピオン酸へと変換される。アクリリル-CoA 還元酵素 Acr の存在により、本株のアクリル酸生産性は 1 mM 程度と極めて低い。これまでに、Pct および LcdCAB の精製が行われているが、アクリル酸-CoA 転移酵素とアクリル酸トランスポーターは同定されておらず、アクリル酸生産機構の全容は不明である。未だ不明なアクリル酸生産関連遺伝子の機能の詳細を明らかにするとともに、アクリル酸生産関連遺伝子をバイオマス資化性の乳酸生産菌へ導入し発現させることで、アクリル酸生産野生株では為し得ない、バイオマスからの効率的なアクリル酸生産が可能になると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、*M. elsdenii* JCM1772 の *pct* および *lcdCAB* の分子機能解析を行い、アクリル酸生産機構の全容を分子レベルで解明するとともに、本株のアクリル酸生産経路を乳酸生産菌に付与することで新たなアクリル酸生産菌を創製し、バイオマスから効率的にアクリル酸を生産するためのバイオプロセス法を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) *M. elsdenii* JCM1772 (理研) のゲノム DNA を鋳型として PCR により *pct* および *lcdCAB* をそれぞれ増幅した。これらを pET system 用発現ベクター-pETDuet-1 の T7 プロモーター下にそれぞれクローニングした。次に、*Escherichia coli* JW0885 (NBRP) のゲノムから  $\lambda$ -Red 相同組み換えの手法を用いて Km マーカーを取り除き DE3 溶原化させた *E. coli* JW0885 (DE3, *pfIA*) を作製した。これに先に作製した pETDuet-pct-lcdCAB およびマイナーコドン相補用プラスミド pLysSRARE2 (Merck) を導入した。

*E. coli* JW0885 (*pfIA*) を 0.4% グルコース添加 M9 培地にて好気条件下で 37°C、48 h 培養した。キット(F-キット D-乳酸/L-乳酸、JKI)を用いて培養液上清中の DL-乳酸量および培養液濁度 OD<sub>600</sub> を経時的に測定した。

(2) *E. coli* JW0885 (DE3, *pfIA*, pETDuet-pct-lcdCAB, pLysSRARE2) を 1 mM IPTG 添加 LB 培地にて好気条件下で 37°C、3 h

培養した。集菌後、SDS-PAGE に供し Pct および LcdCAB の発現を確認した。

(3) *E. coli* JW0885 (DE3, *pfIA*, pETDuet-pct-lcdCAB, pLysSRARE2) を 10 mM IPTG、1.5% グルコース、10 mM パントテン酸添加 LB 培地にて嫌気条件下で 30°C、18 h 培養した。このとき、OD<sub>600</sub> = 2.6 程度に菌体を濃縮したものを用いた。HPLC を用いて培養液上清中のアクリル酸量、乳酸量、グルコース量および OD<sub>600</sub> を経時的に測定した。また、培養液上清を GC-MS 解析し、得られるマスフラグメントパターンよりアクリル酸の生産を確認した。

(4) 大腸菌細胞表面ディスプレイ用ベクター-pVUB3 (NBRP) の *lacIQ'* から *rrnBT1T2* までの領域と、クローニングベクター-pGBM1 の *ori* から Sp マーカーまでの領域を融合させて新たな細胞表面ディスプレイ用ベクター-pGV3 を作製した。この *trc* プロモーター下に *Streptococcus bovis* NRIC1535 (東農大) 由来  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子をクローニングし pGV3-SBA を作製した。本プラスミドの機能を調べるために、イタコン酸生産大腸菌 *E. coli* BW25113 (*icd*, *cad*) に導入し  $\alpha$ -アミラーゼを発現させた後、1% デンプン含有 M9 培地にて好気条件下で 28、69 h 培養した。 $\alpha$ -アミラーゼ活性をキット( $\alpha$ -アミラーゼ測定キット、キッコマン)を用いて測定した。HPLC を用いて培養液中のイタコン酸量、デンプン量、OD<sub>600</sub> を経時的に測定した。

(5) *pct* および *lcdCAB* を NICE system 用発現ベクター-pNZ8048 (NIZO) の *nisA* プロモーター下にクローニングした。このとき、*pct* および *lcdC* のそれぞれ上流に *nisA* プロモーターを配した。次に、*Lactococcus lactis* NZ9000 (NIZO) の *L-lidh* に相同組み換えを用いて *Lactobacillus delbrueckii* JCM1107 (理研) 由来 *D-lidh* を挿入し *L. lactis* NZ9000 (*L-lidh::D-lidh*) を作製した。これに先に作製した pNZ8048-pct-lcdCAB を導入した。

*L. lactis* NZ9000 (pNZ8048-pct-lcdCAB) および *L. lactis* NZ9000 (*L-lidh::D-lidh*, pNZ8048-pct-lcdCAB) を 5 ng/mL nisin A 添加 GM17 培地にて嫌気条件下で 30°C、18 h 培養した。集菌後、SDS-PAGE に供し Pct および LcdCAB の発現を確認した。また、HPLC を用いて培養液上清中のアクリル酸量を経時的に測定した。

## 4. 研究成果

(1) *E. coli* JW0885 (*pfIA*) の DL-乳酸生産量を測定した結果、48 h 培養後に 2.08 g/L の D-乳酸を生産した(図 1)。よって、*pfIA* の破壊および好気もしくは嫌気培養によりグルコースから D-乳酸を生産可能であることが示された。

(2) *E. coli* JW0885 (DE3, *pfIA*, pETDuet-pct-lcdCAB, pLysSRARE2)におけるPctおよびLcdCABの発現をSDS-PAGEにより分析した結果、明瞭な各タンパク質のバンドが確認できた(図2)。よって、本組み換え体にてPctおよびLcdCBAが共発現可能であることが示された。

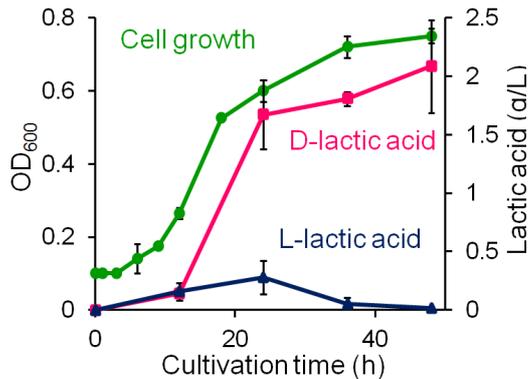


図1 *E. coli* JW0885 (*pfIA*)の乳酸生産性

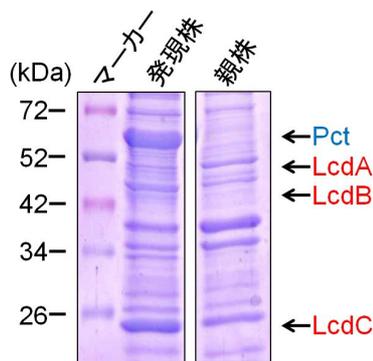


図2 Pct、LcdCAB発現のSDS-PAGE分析

(3) *E. coli* JW0885 (DE3, *pfIA*, pETDuet-pct-lcdCAB, pLysSRARE2)のアクリル酸量、乳酸量、グルコース量およびOD<sub>600</sub>を測定した結果を図3に示す。18h培養後に12.2 mg/L (0.17 mM)のアクリル酸生産を確認した。このとき、OD<sub>600</sub>ほぼ変化しなかったことから、休止菌体としてアクリル酸生産が行われたことが示唆された。また、18h培養後では3.5 g/Lの乳酸生産と4 g/Lのグルコース消費を確認できたことから、消費したグルコースの多くは乳酸へと変換されているが、生産した乳酸の大部分はアクリル酸に変換されていないことが明らかとなった。

また、GC-MS解析の結果、アクリル酸と同様のマスフラグメントパターンと保持時間を示すピークが確認できたことから、本組み換え体はアクリル酸を生産することを確認した。非組み換え体である親株においても極微量のアクリル酸生産が確認されたが、その理由については不明である。

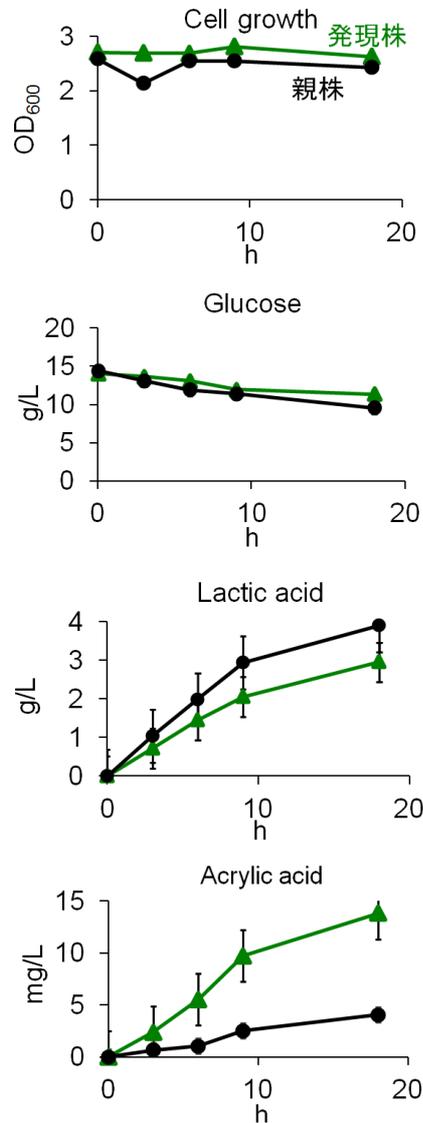


図3 *E. coli* JW0885 (DE3, *pfIA*, pETDuet-pct-lcdCAB, pLysSRARE2)のOD<sub>600</sub>、グルコース量、乳酸量、アクリル酸量測定結果

(4) -アミラーゼを*E. coli* BW25113 (*icd*, *cad*)にて発現させた結果、 $4.42 \pm 1.43$  U/mg-proteinのアミラーゼ活性を確認した。1%デンプン存在下で培養した結果、69h培養後にデンプンが消費され、0.15 g/Lのイタコン酸生産を確認した。1%グルコースを基質として用いた場合の菌体の比増殖速度およびイタコン酸生産性とほぼ同等の値を示したことから、-アミラーゼを細胞表面ディスプレイさせることでデンプンからの直接発酵生産が可能であることが示された。本技術は*E. coli* JW0885 (*pfIA*)においても適用可能であることを別途確認している(データ未掲載)。よって、デンプンからのアクリル酸の直接発酵生産が可能であることが示唆された。

(5) *L. lactis* NZ9000 (pNZ8048-pct-lcdCAB) における Pct および LcdCAB の発現を SDS-PAGE により分析した結果、Pct および LcdB のバンドが確認できた(図4)。しかし、その発現量は大腸菌のそれと比べて少なく、さらに、LcdCA においては明瞭な発現が確認できなかった。また、*L. lactis* NZ9000 (*L-ldh::D-ldh*, pNZ8048-pct-lcdCAB) においてアクリル酸生産は確認できなかった。従って、Pct および LcdCAB の発現量が低く、本組み換え体ではアクリル酸生産が行われていないことが示唆された。

今後はコドン使用頻度を最適化するなどして *L. lactis* NZ9000 における Pct および LcdCAB の発現量を高めることでアクリル酸生産に繋げることができると考えられる。

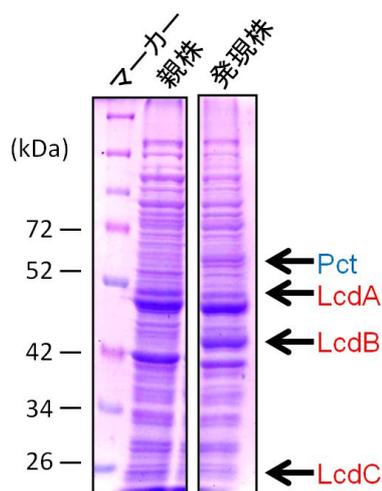


図4 Pct、LcdCAB発現のSDS-PAGE分析

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計7件)

S. Okamoto, T. Chin, K. Nagata, T. Takahashi, H. Ohara, Y. Aso. Production of itaconic acid in *Escherichia coli* expressing recombinant  $\alpha$ -amylase using starch as substrate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(5) 548-553 (2015)、査読有

麻生祐司, 微生物によるビニルモノマー生産, *化学工学* 79(4):307-309 (2015)、査読無

M. Sano, T. Chin, T. Takahashi, H. Ohara, Y. Aso. A simple TLC - densitometric method for the quantification of acrylic acid in aqueous solutions, *Journal of Planar Chromatography*, 28(1) 12-16 (2015)、査読有

T. Chin, M. Sano, T. Takahashi, H. Ohara, Y. Aso. Photosynthetic production of itaconic acid in *Synechocystis* sp.

PCC6803. *Journal of Biotechnology*, 195, 43-45 (2015)、査読有

S. Okamoto, T. Chin, K. Hiratsuka, Y. Aso, Y. Tanaka, T. Takahashi, H. Ohara. Production of itaconic acid using metabolically engineered *Escherichia coli*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 60(5) 191-197 (2014)、査読有

麻生祐司, 機能性乳酸菌の探索と高付加価値食品への応用, *食品加工技術誌*, 34(4):171-177 (2014)、査読無

麻生祐司, 細菌のアクリル酸代謝, *生物工学会誌* 92(3):115 (2014)、査読無

### 〔学会発表〕(計6件)

佐野芽生, 陳泰駿, 麻生祐司, 小原仁実, TLC を用いた環境水中アクリル酸の簡便定量法の開発, 日本農芸化学会大会, 2015年3月28日, 岡山大学(岡山市)

永田圭介, 麻生祐司, 小原仁実, 代謝改変大腸菌を用いたイコタン酸高発酵生産法の開発, 日本農芸化学会大会, 2015年3月27日, 岡山大学(岡山市)

橋本彩加, 麻生祐司, 小原仁実, 大腸菌を用いたアクリル酸発酵生産法の開発, 日本農芸化学会大会, 2015年3月27日, 岡山大学(岡山市)

麻生祐司, 陳泰駿, 平塚賢, 小原仁実, 代謝工学に基づいた大腸菌によるイタコン酸生産, 日本生物工学会大会, 2014年9月9日, 札幌コンベンションセンター(札幌市)

陳泰駿, 佐野芽生, 麻生祐司, 小原仁実, シアノバクテリアを用いた二酸化炭素からのイタコン酸生産, 日本生物工学会大会, 2014年9月9日, 札幌コンベンションセンター(札幌市)

平塚賢, 陳泰駿, 麻生祐司, 小原仁実, 固定化大腸菌を用いたイタコン酸生産システムの開発, 日本生物工学会, 2014年9月9日, 札幌コンベンションセンター(札幌市)

### 〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

### 〔その他〕

ホームページ等

<http://bio.eng.kit.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

麻生 祐司 (ASO, Yuji)

京都工芸繊維大学・大学院工芸科学研究科・  
准教授

研究者番号：70380590