

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 27日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580093

研究課題名（和文） バイオベース有機酸生産のための代謝工学的機能改変による糸状菌セルファクトリの創製

研究課題名（英文） Generation of the cell factories for bio-based organic acid production through improvement of filamentous fungi by metabolic engineering

研究代表者

桐村 光太郎（KIRIMURA KOHTARO）

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：90195412

研究成果の概要（和文）：クエン酸生産糸状菌を宿主として活用し、バイオベース有用有機酸生産のためのセルファクトリ構築を目的とした研究を行った。高効率遺伝子相同組換え株の作製、新規Ⅲ型ポリケチド合成酵素遺伝子の解析と高発現株の作製、代謝工学的改変によるシュウ酸高効率生産株の作製、クエン酸関連代謝経路の探索とセルファクトリ構築への応用、について成果があった。さらに、クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* の潜在能力と特異的な酵素の組合せによるセルファクトリ作製の可能性について検討した。

研究成果の概要（英文）：For generation of cell factories for bio-based organic acid production, generation of strains showing high gene-targeting frequencies was performed in citric acid-producing *Aspergillus niger*. Novel type III polyketide synthase and some key enzymes, such as methylcitrate synthase and aconitate isomerase, in relation to the tricarboxylic acid cycle were examined through gene cloning and enzymatic characterization. There is some possibility that heterologous expression of genes encoding novel and specific enzymes in the citric acid-producing strains as hosts and improvement by metabolic engineering will open the way for generation of the cell factories for bio-based organic acid production.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：応用微生物、酵素、セルファクトリ、代謝工学、有機酸、クエン酸、シュウ酸

## 1. 研究開始当初の背景

有機酸は食品や医薬品、プラスチックの製造をはじめ各種の産業に利用されるため需要も大きい。近年、資源循環型社会の実現を目標として、各種産業の素材となる有機酸についても非石油系原料である糖質等から生

産されたバイオベース有機酸が強く求められるようになってきている。例として、糸状菌 *Aspergillus niger*（クロコウジカビ）を利用してクエン酸は世界的には年間150万トンが発酵生産されており（2009年；175万トン、2012年）、発酵生産物としてはエタノールに

次ぐ巨大な需要がある。また、2004年に米国エネルギー省DOEは、化成品原料として重要視される12個の化合物についてバイオマスからの生産を図ることを目標に掲げたが(www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/35523.pdf)、その1つが医薬品や機能性プラスチックの原料となるイタコン酸である。現状では、キレート剤やプラスチックの原料として使用されているシュウ酸やテレフタル酸、セバシン酸等は依然として石油系原料からの生産により供給されており、環境負荷低減を指向したバイオ生産に期待が寄せられている。米国のデュポン社が開発した植物油を原料としたバイオベースナイロン(商品名:ザイテル)が自動車部品に採用されたこともあり、次世代原料として有望なバイオベース有機酸の効率的生産法の開発が加速することも予想されている。

微生物細胞を宿主として有用物質を生産する微生物工場、すなわちセルファクトリ(別名バイオリアクター)を構築する試みが国内外で行われており、バイオエタノールや乳酸、1,3-プロパンジオール等に生産例がある(湯川, バイオサイエンスとインダストリー, 70, 380-389 (2012); 他)。糸状菌を宿主としたセルファクトリの研究は欧米で先行しており、産業用酵素の生産等を目的として *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *Hypocrea jecorina* (旧名 *Trichoderma reesei*) 等をタンパク質生産のセルファクトリとして利用するための研究開発が進んでいる(V. Meyer, et al., *Biotech. Lett.*, 33, 469-476 (2011); 他)。しかし、有機酸生産に関与する代謝工学や輸送系に関する研究例は少なく、バイオベース有機酸の高生産を目的とした糸状菌セルファクトリの構築に関する研究は皆無である。

## 2. 研究の目的

本研究では、クエン酸生産糸状菌を宿主として活用し、バイオベース有用有機酸生産のためのセルファクトリ構築を目的とした。本報告では(1)高効率遺伝子相同組換え株の作製、(2)新規Ⅲ型ポリケタイド合成酵素遺伝子の解析と高発現株の作製、(3)代謝工学的改変によるシュウ酸高効率生産株の作製、(4)クエン酸関連代謝経路の探索とセルファクトリ構築への応用、について述べる。

## 3. 研究の方法

### (1)クエン酸生産糸状菌の培養条件

供試菌株としては、*A. niger* WU-2223Lを宿主として使用した。培地については、WU-2223Lの培養に用いられるもののうち、富栄養培地としてYES培地、クエン酸生産用培地としてSLZ培地、最少培地としてCD培地

を用いた。培養には坂口フラスコを用い、各培地60 mLに分生子を接種し、30°Cにて3日間、120 rpmで往復振盪培養した。

### (2)ポリケタイド様生成物の抽出と分析

遠心分離により回収した培養上清5 mLに塩酸を添加して酸性にし、等量の酢酸エチルを添加して激しく混合することによりポリケタイド様化合物を抽出し、遠心分離後の上層として酢酸エチル層を回収した。この酢酸エチル画分をロータリーエバポレーターで濃縮し、残渣をメタノールに懸濁した。TALの極大吸収波長に相当する286 nmの吸光度を指標に、高速液体クロマトグラフィー(HPLC; PDA検出器SPD-M20A 島津製作所製, カラムTSKgel ODS-100V 東ソー製)を用いてメタノール溶液を分析した。

### (3)組換え*E. coli*株の培養条件

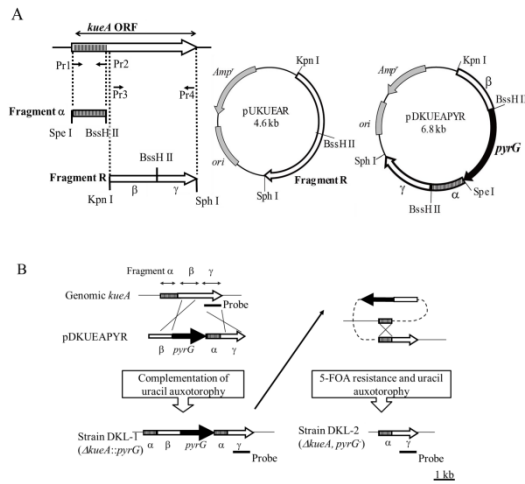
pET-21a(+)をベクターとしてAn-CsyAがHisタグ融合タンパク質として生産されるように作製した高発現プラスミドpEANCSYAを保持する*E. coli* BL21(DE3)を以下の条件で培養した。培養には500 mL容バツフル付きエルレンマイヤーフラスコを用い、50 mLのLB培地に植菌し、30°Cにて3時間、120 rpmで回転振盪培養して菌体を増殖させた。また、培養途中で終濃度1 mMとなるようにIPTGを添加し、導入した遺伝子の発現を誘導した。その後、1 mM IPTGおよび炭素源として10 g/Lのグルコースを含む最少培地であるM9培地に菌体を移植し、30°Cにて回転振盪培養した。遠心分離により培養上清を回収し、HPLC等により分析した。他の組換え大腸菌についても、LB培地等に植菌し、培養液や抽出物をHPLCで分析した。

## 4. 研究成果

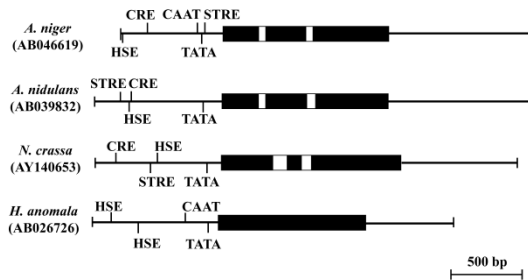
### (1)高効率遺伝子相同組換え株の作製

クエン酸生産糸状菌*A. niger*を宿主として活用することを目的とした場合、導入した遺伝子に関して相同組換え効率が低いことが課題となっていた。そこで、非相同組換えに関与する*ku80*破壊株を作製し、相同組換え効率に関して検討した。*A. oryzae*や*Neurospora crassa*等の糸状菌における*ku80*の塩基配列を参考にして、*A. niger* WU-2223Lの*ku80*遺伝子(約2.6 kb)をクローニングした。さらに、マーカー遺伝子*pyrG*を使用して、Fig. 1に示すような方法で破壊用カセットを作製し、*ku80*破壊株を作製した。*ku80*破壊株を宿主とした際の相同組換え効率は約10%であるのに対して、破壊株を宿主とした際の効率は約70%に向上した。一方、クエン酸生産や増殖に関する影響は見られず、当該*ku80*破壊株は遺伝子破壊を基盤としたクエン酸生産機構の解析に利用可能なことを明らかにした(主な発表論文④に報告)。さらに、従来から検討してきた

alternative oxidase 遺伝子のプロモーター機能の解明を目的として、EGFP を利用した視覚的なストレス応答解析に成功した。Fig. 2 に示すように、遺伝子上流の調節領域のはたらきを検証することに成功している（主な発表論文③に報告）。



**Fig. 1. Disruption of *kueA* as a *ku80* Homolog in *A. niger* Strains.**



**Fig. 2. Gene Structures of AOX.**

(2) 新規Ⅲ型ポリケチド合成酵素遺伝子の解析と高発現株の作製

ポリケチドは、植物により産生されるポリフェノールやフラボノイドを代表例とする二次代謝産物の総称であり、ポリケチド合成酵素 (PKS) により脂肪酸アシルコエンザイム A (CoA) の縮合反応によって合成される。PKS は、構造上の相違から I~Ⅲ型の 3 種類に分類されており、Ⅲ型 PKS は I 型や II 型 PKS と比較して小さな分子で、広範な基質特異性を示す特徴がある。また、ピロン骨格やレゾルシノール骨格を有するポリケチドを合成することが知られている。

近年のゲノム解析により糸状菌由来のⅢ型 PKS が見出され、糸状菌 *A. niger* においてもホモログが 1 つ存在することが推定された。そこで、申請者らは、ゲノム解析株 *A.*

*niger* NRRL 328 由来のⅢ型 PKS の遺伝子をクローニングし、An-CsyA と命名した。An-csyA をコードする cDNA を大腸菌 *Escherichia coli* を宿主として発現させ、An-CsyA を His タグの融合した組換え酵素として取得した。精製した組換え An-CsyA、開始基質、malonyl-CoA を用いて試験管内で反応を行った。An-CsyA による反応では、炭素数 2~12 の acyl-CoA が基質として利用され、2~5 回の伸長反応により合成された計 22 種類のピロン型化合物が検出された。従来報告されているものとは基質特異性が異なる新規なⅢ型 PKS であることを明らかにした（論文投稿中）。

一方、生成量についてはトリ酢酸ラクトン (TAL) を指標に検討した。An-CsyA 遺伝子を高発現させた組換え大腸菌を LB 培地で 2 日間培養することによって、最大 6.29 mg/L の TAL の生産を確認した。しかし、この生産量は申請者らが期待していた数 g/L のオーダーには至らず、Ⅲ型 PKS 遺伝子を高発現させた組換え大腸菌により芳香族カルボン酸の生産を行うことは困難と判断した。そこで、An-CsyA 遺伝子を *A. niger* で高発現させることを試みたが、組換え *A. niger* については明瞭な An-CsyA 活性が検出されなかったため、検討を継続している（未発表）。

(3) 代謝工学的改変によるシュウ酸高効率生産株の作製

クエン酸生産糸状菌 *A. niger* では、oxaloacetate hydrolase (EC 3.7.1.1; OAH) によりサイトソルでオキサロ酢酸が加水分解されてシュウ酸が生成する。そこで、OAH をコードする遺伝子を破壊した株と高発現株を作製し、組換え *A. niger* におけるシュウ酸生産について検討した。供試菌の OAH は 2 つのイントロンで分断されている全長 1,232 bp の遺伝子領域から成り、341 個のアミノ酸残基から成るタンパク質をコードしていた。まず、OAH 遺伝子破壊株を作製し、シュウ酸を生産しないことを明らかにした。一方、高発現用プロモーターの下流に OAH 遺伝子を配置した遺伝子を導入し、OAH 遺伝子高発現株を作製した。転写量の増大に伴い、OAH 比活性は供試菌（原株）に比較して最大 35 倍に増大し、30 g/L のグルコースを含む培地で 12 日間培養することで、シュウ酸生産量が 28.9 g/L に達した。以上より、Fig. 3 に示すように、OAH 遺伝子高発現株の作製により高収率シュウ酸生産糸状菌の作製が可能であることを明らかにした（論文投稿中）。すなわち、従来は石油資源からシュウ酸は生産されてきたが、バイオマス由来の糖質からのシュウ酸生産が可能になった。バイオベース有機酸の高生産を目的とした糸状菌セルフアクトリの可能性を示唆する成果と考えられる。

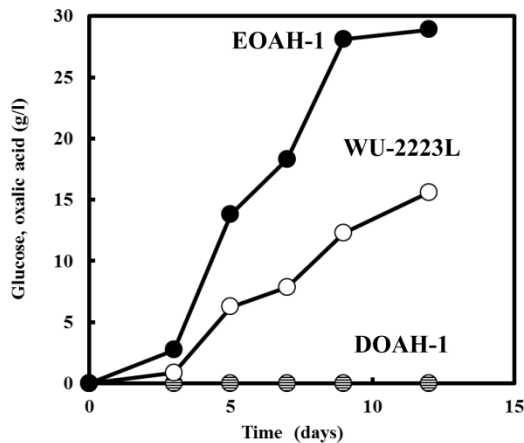


Fig. 3. Time Courses of Oxalic Acid Production. *A. niger* WU-2223L (empty), EOAH-1 (closed), and DOAH-1 (shaded).

#### (4) クエン酸関連代謝経路の探索とセルフファクトリ構築への応用

クエン酸やトランスアコニット酸を唯一の炭素源として利用可能な細菌を自然界より探索し、*Pseudomonas* sp. の1菌株を選択した。当該細菌より、aconitate isomerase (EC 5.3.3.7) を精製し、酵素的諸性質を明らかにした。また、遺伝子クローニングと大腸菌における高発現に成功した (論文未発表)。また、catechol oxygenase 遺伝子を高発現する組換え大腸菌を作製し、カテコールからの効率的な *cis, cis*- $\mu$ コン酸の生産に成功した (主な発表論文⑤に報告)。これらの酵素をコードする遺伝子はバイオベース有機酸生産のためのセルフファクトリ構築に利用可能と考えられる。また、Salicylate decarboxylase (Sdc) の利用については大きな進展があり、部位特異的変異の導入による2個のアミノ酸残基を改変した Y64T-F195Y-Sdc について、アミノフェノールから *p*-アミノサリチル酸への比活性向上が認められた。さらに、当該酵素遺伝子を高発現する大腸菌を作製し、細胞反応に利用することによって反応9時間で140 mMのPAS (モル変換効率70%、22 g/l) を選択的に生産することに成功した (主な発表論文①, ⑥に報告)。

一方、クエン酸関連代謝経路を供試菌で検討する過程で、Fig. 4に示すようなメチルクエン酸回路の初発酵素である methylcitrate synthase をコードする遺伝子を citrate synthase (CS) 遺伝子のホモログとしてクローニングした。興味深いことに、*A. niger* の MCS は CS 活性を示した。そこで、MCS 遺伝子破壊株を作製し、クエン酸生産について検討した。しかし、グルコースを炭素源とした培養では遺伝子破壊株と原株でクエン酸生産

量に相違がないことから、MCS およびその遺伝子はクエン酸生産に関与していないことが示唆された (主な発表論文②に報告)。

以上のように、従来は不明であったクエン酸関連代謝経路についても遺伝子レベルでの解明が進み、代謝経路を効率的に利用するバイオベース有機酸生産セルフファクトリ構築のための基盤が構築されたものと考えられる。

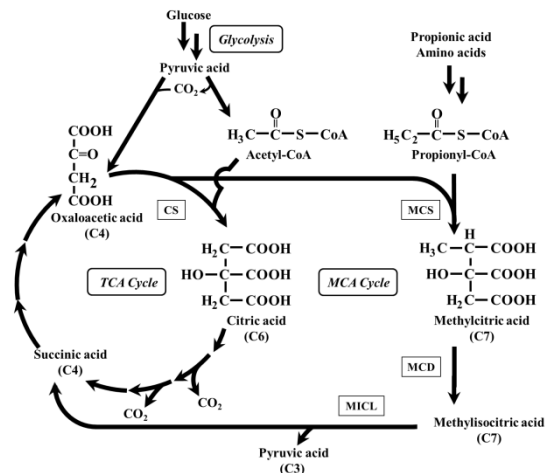


Fig. 4. The Methylcitric Acid (MCA) Cycle and the Tricarboxylic Acid (TCA) Cycle; Metabolic Pathway for Production of Citric Acid and Methylcitric Acid in *A. niger*.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計11件)

①Ienaga, S., Kosaka, S., Honda, Y., Ishii, Y., Kirimura, K., *p*-Aminosalicylic Acid Production by Enzymatic KolbeSchmitt Reaction Using Salicylic Acid Decarboxylases Improved through Site-Directed Mutagenesis. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 86, 628-634 (2013), 査読有

②Kobayashi, K., Hattori, T., Honda, Y., Kirimura, K., Gene Identification and Functional Analysis of Methylcitrate Synthase in Citric Acid-Producing *Aspergillus niger* WU-2223L *Biosci. Biotech. Biochem.*, *In press* (2013), 査読有

③Honda, Y., Hattori, T., Kirimura, K., Visual Expression Analysis of the Responses of the Alternative Oxidase Gene (*aox1*) to Heat Shock, Oxidative, and Osmotic Stresses in Conidia of Citric Acid-Producing *Aspergillus niger*. *J.*

*Biosci. Bioeng.*, **113**, 338-342 (2012), 査読有

④Honda, Y., Kobayashi, K., Kirimura, K., Increases in Gene-Targeting Frequencies Due to Disruption of *ku6A* as a *ku80* Homolog in Citric Acid-Producing *Aspergillus niger*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **75**, 1594-1596 (2011), 査読有

⑤Kaneko, A., Ishii, Y., Kirimura, K., High-yield Production of *cis, cis*-Muconic Acid from Catechol in Aqueous Solution by Biocatalyst. *Chem. Lett.*, **40**, 381-383 (2011), 査読有

⑥Kirimura, K., Yanaso, S., Kosaka, S., Koyama, K., Hattori, T., Ishii, I., Production of *p*-Aminosalicylic Acid through Enzymatic Kolbe-Schmitt Reaction Catalyzed by Reversible Salicylic Acid Decarboxylase. *Chem. Lett.*, **40**, 206-208 (2011), 査読有

[学会発表] (計38件)

①本田裕樹、桐村光太郎，クエン酸の特異的検出を可能とするインジケータ蛍光タンパク質の創製，日本農芸化学会 2013 年度大会，講演番号 3C31a14，2013 年 3 月 26 日，仙台

②油原かほり、濱地達也、小林慶一、本田裕樹、桐村光太郎，アコニット酸イソメラーゼ遺伝子を高発現させた大腸菌による *trans*-アコニット酸生産，日本農芸化学会 2013 年度大会，講演番号 3C31a14，2013 年 3 月 27 日，仙台

③小林慶一、本田裕樹、桐村光太郎，クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* におけるメチルクエン酸シンターゼの検出と機能解析，第 64 回日本生物工学会大会，講演番号 2Ca13，2012 年 10 月 24 日，神戸

④油原かほり、米原広海、小林慶一、本田裕樹、服部貴澄、桐村光太郎，*Pseudomonas* sp. WU-0701 由来アコニット酸イソメラーゼをコードする遺伝子の大腸菌における異種発現，第 64 回日本生物工学会大会，講演番号 2Ca14，2012 年 10 月 24 日，神戸

⑤家永里織、伊藤優斗、本田裕樹、石井義孝、桐村光太郎，部位特異的変異の導入による可逆的サリチル酸脱炭酸酵素の改変と *p*-アミノサリチル酸の生産への応用，第 64 回日本生物工学会大会，講演番号 3Cp19，2012 年 10 月 25 日，神戸

[図書] (計2件)

①Kirimura, K., Honda, Y., Hattori, T. Bio-based chemicals, Citric acid. In: Murray MY (ed) Comprehensive Biotechnology, 2nd edn. vol. 3. Elsevier, London, pp135-142 (2011).

②Kirimura, K., Honda, Y., Hattori, T.

Bio-based chemicals, Gluconic and Itaconic Acids. In: Murray MY (ed) Comprehensive Biotechnology, 2nd edn. vol. 3. Elsevier, London, pp143-147 (2011).

[産業財産権]

本研究に関してはなし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

桐村 光太郎 (KIRIMURA KOHTARO)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：90195412

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし