

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450091

研究課題名(和文) パントテン酸キナーゼでコエンザイムA生合成経路を強化した大腸菌の分子育種

研究課題名(英文) Enhancement of coenzyme A biosynthetic pathway using pantothenate kinase 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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：炭素のキャリアとして機能するコエンザイムA (CoA) の細胞内濃度をパントテン酸キナーゼ (CoaA) を使って上昇させ、有用物質生産に応用できる大腸菌の分子育種を実施した。CoA生合成経路は原核型CoaAで最も効果的に強化することができ、増大したCoAプールの中で70%以上がアセチル-CoAとして蓄積した。CoAレベルを上昇させるためには、培地へのmMオーダーでのパントテン酸の添加が必須であったが、パントテン酸の前駆体物質である α -アラニンおよびパント酸の添加も効果があった。さらに、パントテン酸供給経路で機能する酵素を強化することにより、de novo合成でのCoA増産の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Intracellular coenzyme A (CoA), which functions as an acyl carrier in vivo, was increased using pantothenate kinase (CoaA) in *Escherichia coli*, with the ultimate aim of applying this cofactor engineering to the production of a useful compound. The *E. coli* CoA biosynthetic pathway was most efficiently enhanced by using a prokaryotic type III CoaA, and more than 70% of the formed CoA pool was accumulated as acetyl-CoA. The addition of pantothenate at millimolar concentrations to the culture medium was indispensable for enlarging the cellular CoA pool size. This effect was also observed when the pantothenate precursors, α -alanine and pantoate, were added. Furthermore, the coexpression of the enzymes functioning in the pantothenate biosynthetic pathway together with type III CoaA facilitated the enhancement of the de novo CoA biosynthesis in *E. coli* cells.

研究分野：農学

キーワード：コエンザイムA アセチル-CoA マロニル-CoA パントテン酸キナーゼ CoA生合成経路 パントテン酸供給経路 有用物質生産 大腸菌

1. 研究開始当初の背景

コエンザイム A (CoA) はパントテン酸から 5 段階の酵素反応で生合成される補酵素であり、生体内においては炭素のキャリアとして機能している(図 1)。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、アミノ酸配列を基に真正細菌では原核型 CoaA、原核型 CoaA、および原核型 CoaA の 3 種に分類されている。これら 3 種の酵素は最終生産物である CoA、あるいはアシル-CoA に対して異なる挙動を示す。すなわち、原核型 CoaA は最終生産物阻害を受けるが、原核型および型 CoaA は CoA およびその誘導体に対して感受性を示さない。これら CoA の性質を利用して、細胞内 CoA を増産させ、炭素代謝を活性化し、有用物質生産へ応用する着想に経った。本技術はコファクターエンジニアリングと呼ばれる技術の一つであるが、CoA をターゲットとした研究例はほんの数件に限られており、新しい研究領域と言える。

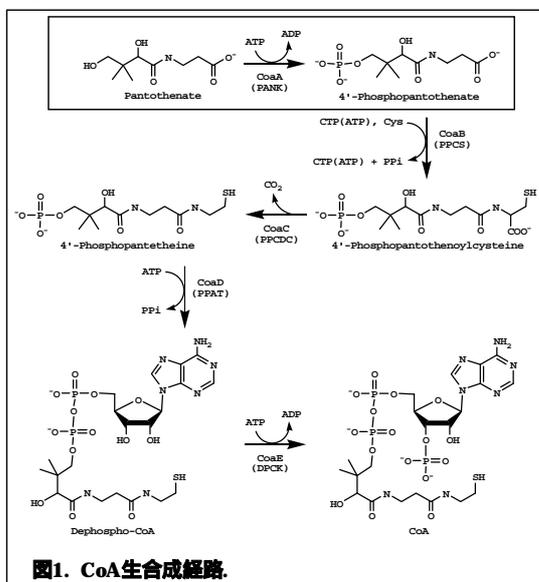


図1. CoA 生合成経路.

2. 研究の目的

本研究課題では、炭素のキャリアである CoA の細胞内濃度を上昇させ、炭素鎖供給源であるアセチル-CoA を増産させ、有用物質生産に応用できる大腸菌 (*Escherichia coli*) の分子育種を目標とした。

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) が鍵酵素となっているため、まず初めに、CoA 生合成経路を調節している CoaA に照準を合わせ、真正細菌に存在する 3 種の CoaA、すなわち *E. coli* 由来原核型 CoaA、*Staphylococcus aureus* 由来原核型 CoaA、*Pseudomonas putida* 由来原核型 CoaA を用いて、CoA 増産菌の分子育種を検討した。その結果、*P. putida* 由来原核型 CoaA が細胞内総 CoA プール (CoA + アセチル-CoA + マロニル-CoA) の増大には最も効果的で、CoA プー

ルサイズを 3~5 倍にすることを明らかにした。しかしながら、本成果を得るためには、CoA 生合成経路の出発物質であるパントテン酸の mM オーダーでの培地中への添加が必須であった。そこで、パントテン酸供給経路を強化するために、パントテン酸前駆体物質の添加が細胞内 CoA 含量に及ぼす影響について解析した。明確な前駆体添加効果が観察されたため、次いでパントテン酸合成に関与するアスパラギン酸- α -デカルボキシラーゼ (PanD) およびケトパント酸ヒドロキシメチルトランスフェラーゼ (PanB) を使って *de novo* 合成で自律的に CoA を増産できる *E. coli* の分子育種を実施した。

3. 研究の方法

CoaA 発現プラスミドの構築

原核型 CoaA の構築には *E. coli* W3110 由来 CoaA 遺伝子 (*Ec-coaA*)、原核型 CoaA には *S. aureus* MW2 由来 CoaA 遺伝子 (*Sa-coaA*)、原核型 CoaA には *P. putida* JCM 20089 由来 CoaA 遺伝子 (*Pp-coaA*) をそれぞれ用いた。前記 3 種の CoaA 遺伝子を PCR で増幅後、高コピー数プラスミドとして pUC118、低コピー数プラスミドとして pSTV28 を採用し、*lac* プロモーターの下流にクローニングした。構築したプラスミドを pUC-*Ec-coaA*、pSTV-*Ec-coaA*、pUC-*Sa-coaA*、pSTV-*Sa-coaA*、pUC-*Pp-coaA*、および pSTV-*Pp-coaA* と命名し、*E. coli* W3110 にエレクトロポレーションで形質転換した。

細胞内 CoA 濃度の解析

得られた形質転換体を抗生物質および 5% グルコースを含む LB 培地で 30°C で 16 時間、好氣的に培養し、遠心集菌後、0.6 M 硫酸を添加して細胞内 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 含量 (CoA、アセチル-CoA、およびマロニル-CoA) を解析した。

パントテン酸キナーゼ (CoaA) 活性

各形質転換体の細胞内 CoaA 活性は放射活性を持つパントテン酸を用いて測定した。反応液の組成は、91 μ M 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 μ l)、30°C で 1 時間の反応の後、4 μ l 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、ディスク上の反応生成物である 4'-ホスホパントテン酸の放射活性を 3 ml の Ecoscinti H 中で測定した。

グルコース、酢酸、およびエタノールの測

定

形質転換体の培養中に消費したグルコース、生成した酢酸およびエタノールの測定には、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 で解析した。

パントテン酸添加効果の解析

で作成した pSTV-Pp-coaA を保持する *E. coli* W3110 を、2% グルコースを含む M9 培地で 30°C で 24 時間振とう培養した。培地には終濃度が 1 mM から 10 mM になるようにパントテン酸を添加し、培養終了後、細胞内 CoA およびアシル-CoA を酸抽出し、アシル-CoA サイクリング法で細胞内 CoA 含量を解析した。

パントテン酸前駆体添加効果の解析

パントテン酸前駆体物質である L-アスパラギン酸、β-アラニン、あるいはパント酸を 5 mM の終濃度で含む M9 培地 (2% グルコース) を用いて、*E. coli*/pSTV-Pp-coaA を 30°C で 24 時間振とう培養した。培養終了後、菌体内の CoA、アセチル-CoA、およびマロニル-CoA を酸抽出し、アシル-CoA サイクリング法で解析した。

PanB および PanD 発現プラスミドの構築

Corynebacterium glutamicum 由来 PanBC 遺伝子および PanD 遺伝子を PCR で増幅し、pUC118 にクローニングした。panB は panC (パントテン酸シンターゼ) とオペロンを形成しているため、panBC として増幅し、発現プラスミドを構築した。構築した pUC-Cg-panBC、pUC-Cg-panD、そして両増幅断片を保持する pUC-Cg-panD-BC を *E. coli* W3110 に形質転換し、2% グルコースを含む M9 培地で 30°C で 24 時間振とう培養した。培養終了後、菌体内の CoA、アセチル-CoA、およびマロニル-CoA を酸抽出し、アシル-CoA サイクリング法で解析した。

4. 研究成果

(1) CoaA 分子種が細胞内 CoA 増産に及ぼす影響

高コピー数プラスミドで構築した pUC-Ec-coaA、pUC-Sa-coaA、pUC-Pp-coaA、あるいは低コピー数プラスミドで構築した pSTV-Ec-coaA、pSTV-Sa-coaA、pSTV-Pp-coaA を保持する *E. coli* W3110 形質転換体を 5% グルコースを含む LB 培地で 16 時間、好氣的に培養した。各形質転換体の生育は野生株とほぼ同じであった。CoaA 活性は、*Ec-coaA* 保持菌で顕著に大きくなり、pUC-Ec-coaA 形質転換体で最大値の 20.0 nmol/min/mg を示した (図 2A)。また、低コピー数プラスミドである pSTV-Ec-coaA では 4 nmol/min/mg 前後であり、CoaA 活性は遺

伝子量に依存していた。原核型 CoaA である *Pp-coaA* 形質転換体でも同様の現象、すなわち CoaA 活性の上昇が確認されたが、*Ec-coaA* 保持菌と比較すると 1/5 程度であった。

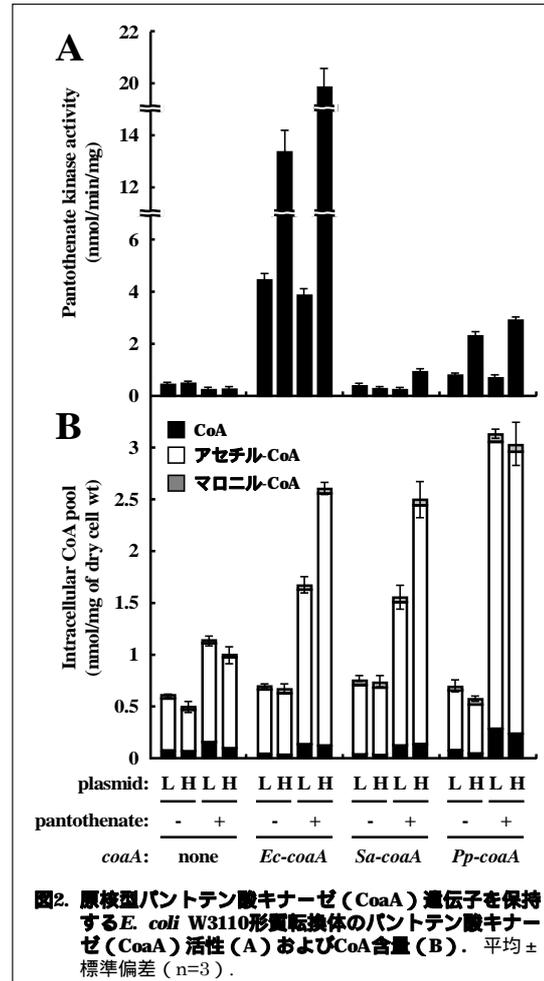


図2. 原核型パントテン酸キナーゼ (CoaA) 遺伝子を保持する *E. coli* W3110 形質転換体のパントテン酸キナーゼ (CoaA) 活性 (A) および CoA 含量 (B). 平均 ± 標準偏差 (n=3).

細胞内 CoaA 活性の上昇が確認されたので、次いで、細胞内総 CoA 濃度 (CoA + アセチル-CoA + マロニル-CoA) を解析したが、明確な上昇は観察されなかった (図 2B)。そこで、CoA 生合成経路の出発物質であるパントテン酸を終濃度が 10 mM になるように培地に添加して再度解析したところ、細胞内 CoA 濃度はいずれの形質転換体においても上昇した。特筆すべきことは、*Pp-coaA* 形質転換体において、CoaA 活性が *Ec-coaA* 形質転換体の 20% 以下であったにもかかわらず、細胞内総 CoA 濃度は上回り、かつ低コピー数プラスミドで構築した pSTV-Pp-coaA 保持菌で最大値の 3.14 nmol/mg of dry cell wt を示したことである。原核型 CoaA である *Sa-coaA* で構築した発現プラスミドの形質転換体では、明確な CoaA 活性の上昇は観察されなかったが、細胞内総 CoA 濃度は上昇し、*Ec-coaA* 形質転換体と同等の値を示した。

本解析結果から、CoA 生合成経路は初発反応を触媒する CoaA を補強することで強化されることが明らかとなり、最終生産物障害を受けない原核型 CoaA が最も効果的であることが示された。したがって、以後の実験に

は pSTV-Pp-coaA の形質転換体 (*E. coli*/pSTV-Pp-coaA) を用いることとし、また CoA 増産には上流のパントテン酸供給経路の強化も欠かすことができないという新たな問題点も顕在化した。

(2) パントテン酸添加が細胞内 CoA レベルに及ぼす影響

(1) で細胞内総 CoA 濃度を上げるには、パントテン酸の培地への添加が必須であることが示されたので、ここでは細胞内総 CoA 濃度を最大にするパントテン酸の添加量を解析した (図 3)。また、LB 培地にはパントテン酸が含まれているため、2% グルコースを含む M9 合成培地を採用した。

E. coli/pSTV-Pp-coaA の細胞内総 CoA レベルは、パントテン酸の培地への添加量に比例して上昇し、1 mM の添加で 3.5 倍に、2 mM で 4.0 倍、5 mM の添加では 4.2 倍、7 mM では 4.6 倍、そして 10 mM では 5 倍の 10.5 nmol/mg of dry cell wt を示した。本解析結果から、CoA の増産にはパントテン酸の供給が第 2 の焦点となることが改めて示された。

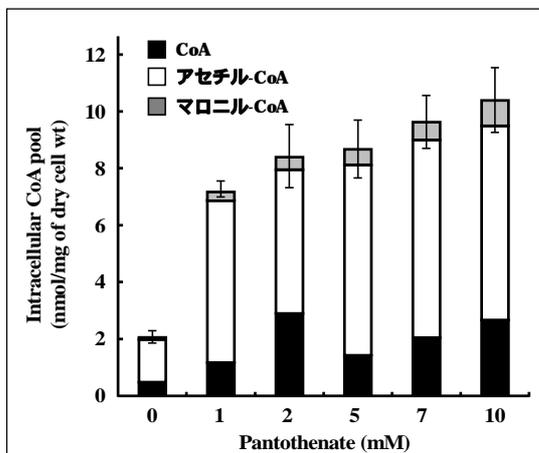


図3. パントテン酸添加が細胞内CoA濃度に及ぼす影響。平均 ± 標準偏差 (n=3)。

(3) パントテン酸前駆体添加が細胞内 CoA レベルに及ぼす影響

パントテン酸は図 4 に示したように、β-アラニンおよびパント酸がパントテン酸シンターゼ (PanC) によって縮合されることによって生合成される。β-アラニンはL-アスパラギン酸がアスパラギン酸-α-デカルボキシラーゼ (PanD) の触媒作用で脱炭酸されて供給され、もう一方の基質であるパント酸はα-ケトイソ吉草酸からケトパント酸ヒドロキシメチルトランスフェラーゼ (PanB)、ケトパント酸レダクターゼ (PanE) によって生合成される。そこで、直接の前駆体であるβ-アラニンおよびパント酸に加えて、L-アスパラギン酸の添加が *E. coli*/pSTV-Pp-coaA の細胞内 CoA に及ぼす影響を解析した。本実験

でも2% グルコースを含む M9 合成培地を採用し、前駆体は終濃度 5 mM で添加した。

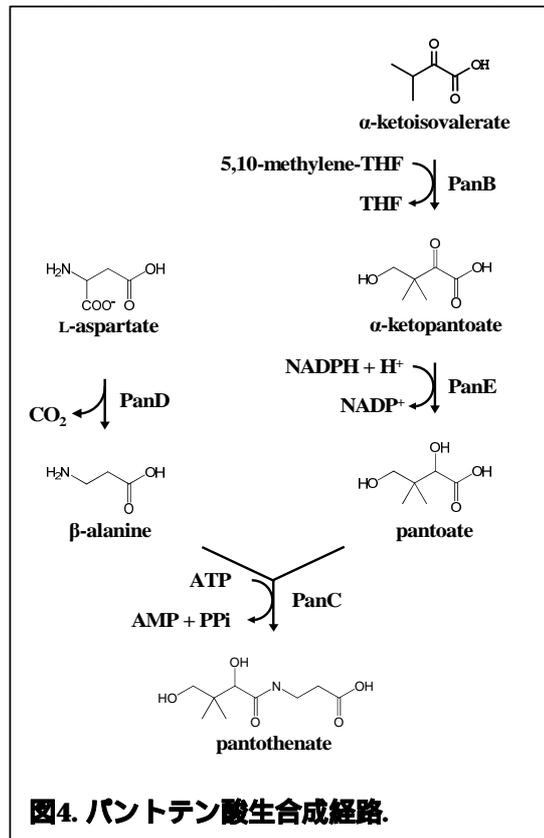


図4. パントテン酸生合成経路。

L-アスパラギン酸の添加は細胞内 CoA 濃度の上昇には寄与しなかったが、β-アラニンの添加では 5.71 nmol/mg of dry cell wt になり、パントテン酸添加時の 70% にまで細胞内総 CoA レベルが回復した (図 5)。この結果は、CoaA による CoA 増産においては、L-アスパラギン酸からβ-アラニンへの変換、すなわち PanD の補強が必要であることを示している。一方、パント酸の単独添加では効果が観察されなかったが、β-アラニン存在下での添加はパントテン酸添加時の 144% を示した。

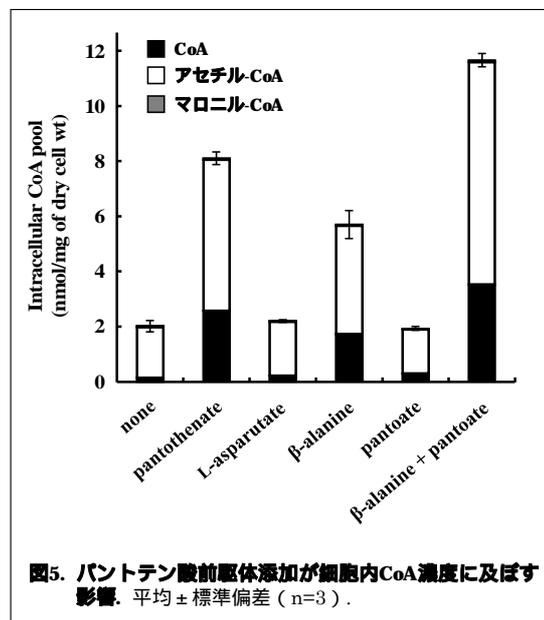


図5. パントテン酸前駆体添加が細胞内CoA濃度に及ぼす影響。平均 ± 標準偏差 (n=3)。

この結果は、β-アラニンが十分量存在する時

はパント酸が不足することを示している。

(4) パントテン酸合成経路の強化が細胞内 CoA レベルに及ぼす影響

(3)で β -アラニンだけでなく、パント酸の供給も細胞内総 CoA 濃度を上昇させるのに効果があることが明らかにされた。そこで、*C. glutamicum* 由来 *panBC*、*panD* を pUC118 にクローニングした pUC-Cg-*panBC*、pUC-Cg-*panD*、あるいは *panBCD* を持つ pUC-Cg-*panD*-BC を pSTV-Pp-*coaA* と共に *E. coli* W3110 に形質転換し、2%グルコースを含む M9 培地で 30°C で 24 時間振とう培養して、細胞内 CoA レベルに及ぼす影響について解析した。

pSTV-Pp-*coaA* と pUC-Cg-*panD* を同時に持つ形質転換体は生育が極端に悪く、他の形質転換体と直接比較することはできないが、細胞内総 CoA レベルを 3.5 倍に引き上げた (図 6)。*panBC* 形質転換体はわずかではあるが総 CoA 濃度を 23% 上昇させ、pUC-Cg-*panD*-BC 保持菌では 56% 増加させることができた。本実験では、2 種のプラスミドを持つ形質転換体を M9 合成培地を使って試験したため、生育にばらつきがでたが、*panBCD* を用いたパントテン酸供給経路の強化は *de novo* 合成での CoA 増産には効果があることが示唆された。今後は培地を変えて試験するだけでなく、PanE 発現プラスミドも加えて、再度パントテン酸供給系の強化について精査する必要がある。

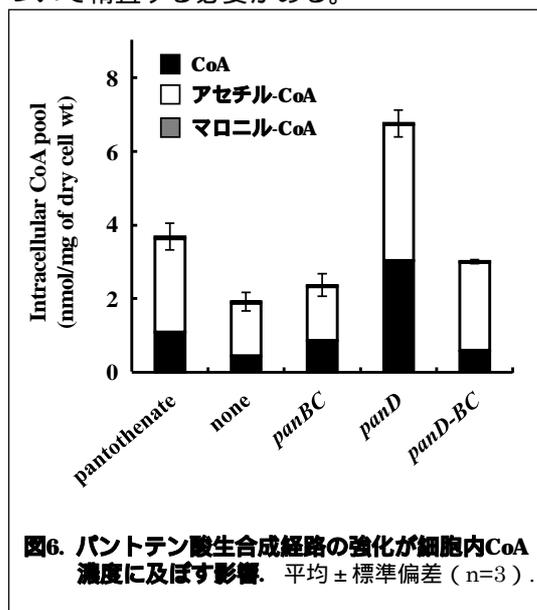


図6. パントテン酸合成経路の強化が細胞内CoA濃度に及ぼす影響。平均±標準偏差 (n=3)。

(5) 総括

本研究課題において、有用物質生産への応用に向けた細胞内 CoA の増産は、CoaA で CoA 生合成経路を強化することで達成することができた。さらに、増加した細胞内総 CoA プールの少なくとも 70% 以上はアセチル-

ル-CoA として存在しており、炭素鎖の供給源として良好な結果でもあった。目的達成には CoA の出発物質であるパントテン酸の供給が必須であるという新たな問題が現れたが、パントテン酸生合成経路を Pan 遺伝子で強化することで解決できる糸口が見えている。

CoA コファクターエンジニアリングの有用物質生産に対する有効性については、*E. coli* 由来 CoA 依存性アルコールデヒドロゲナーゼ (AdhE) を使ったエタノール生産を試験した。しかしながら、本酵素の酸素に対する脆弱性が原因で有意な効果が見られず、有効性の確認はまだ達成されていない。また、CoA 増産菌は消費したグルコースの 8 から 18% をアセチル-CoA から酢酸およびエタノールへ変換し、培地中へ排出する。したがって、対糖収率という観点からは、酢酸キナーゼや AdhE の遺伝子破壊株の使用も重要な検討課題となっている。

現在、CoA 増産に必要な遺伝子をゲノム DNA に導入した組換え菌、Pan 遺伝子を用いたパントテン酸供給経路の強化菌の育種を継続して進めている。並行して、アセチル-CoA カルボキシラーゼと脂肪酸合成酵素を組み合わせた脂肪酸生産菌の分子育種にも着手しており、近い将来、物質生産を目指した CoA コファクターエンジニアリングの有用性を確立したい。

< 引用文献 >

Yuta Ogata, Shigeru Chohnan, Prokaryotic type III pantothenate kinase enhances coenzyme A biosynthesis in *Escherichia coli*, Journal of General and Applied Microbiology, 61 巻, 2016, 266 - 269

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 1件)

Yuta Ogata, Shigeru Chohnan, 『Prokaryotic type III pantothenate kinase enhances coenzyme A biosynthesis in *Escherichia coli*』, Journal of General and Applied Microbiology, 61 巻, 266 - 269, 2016, 査読有

DOI: 10.2323/jgam.61.266

[学会発表](計 2件)

Yuta Ogata, Shigeru Chohnan, 『Effect of the addition of pantothenate and its precursors on coenzyme A content of *Escherichia coli* expressing exogenous pantothenate kinase』, 日本微生物生態学会第 30 回大会, 2015.10.19, 土浦市亀城

プラザ（茨城県・土浦市）

Yuta Ogata、Shigeru Chohnan、
『 Enhancement of coenzyme A
biosynthetic pathway using
pantothenate kinase 』、 114th General
Meeting, American Society for
Microbiology、 2014.5.18、 Boston
Convention & Exhibition Center、ボスト
ン（アメリカ合衆国）

〔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)研究代表者

長南 茂（CHOHNAN SHIGERU）

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：70312775

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し

(4)研究協力者

無し