

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 13 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450114

研究課題名(和文) 輸送系の改変による有用有機酸高生産のための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 modification of transport system

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* を宿主として活用し、バイオベース有機酸生産のためのセルファクトリ創製を検討した。ミトコンドリア膜局在型クエン酸輸送体遺伝子の機能解析、クエン酸資化性微生物の探索、新奇酵素を利用したクエン酸からの trans-アコニット生産への応用、について新規かつ重要な成果が得られた。さらに、クエン酸生産糸状菌の潜在能力と新奇な酵素の組み合わせによるセルファクトリ創製の可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：For generation of the cell factories for bio-based organic acid production, functional analyses of genes encoding putative mitochondrial citrate transport proteins in citric acid-producing *Aspergillus niger* were performed. Screening of microorganisms capable of assimilating citric acid as a sole carbon source was also performed, and a novel aconitate isomerase was obtained. trans-Aconitic acid was produced successfully from citric acid by utilization of recombinant *E. coli* cells heterologously expressing the novel aconitate isomerase gene as biocatalysts for the whole-cell reaction. There is some possibility that heterologous expression of genes encoding novel and specific enzymes related to citrate metabolism in citric acid-producing *A. niger* as a host and improvement of citrate transport system by genetic engineering will open the way for generation of the cell factories for bio-based organic acid production.

研究分野：農学

キーワード：応用微生物 セルファクトリ クエン酸輸送体 酵素 代謝工学 有機酸 クエン酸 trans-アコニット酸

1. 研究開始当初の背景

クエン酸に代表される有機酸は食品や医薬品、機能性樹脂の原料などとして各種の産業に利用されており、近年では資源循環型社会の実現を目標として、非石油系原料であるバイオマス由来の糖質等から生産されたバイオベース有機酸の需要が増大している。一例として、2004年に米国エネルギー省が掲げたバイオマスからの生産が望まれるトップ30の化合物の中にはイタコン酸やアコニット酸などの有機酸も含まれている (<http://energy.gov/eere/bioenergy/downloads/topvalue-added-chemicals-biomass-volume-i-results-screening-potential>.)。

これらを背景に、微生物細胞を宿主として有用化合物を生産する微生物工場、すなわちセルファクトリ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等の生産例がある(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 *Aspergillus niger* を供試菌として、有機酸の輸送系の改変を行い、既存の生産菌を凌駕する有用有機酸高生産のための糸状菌セルファクトリの創製を目的とした。本報告では(1)クエン酸高生産菌 *A. niger* WU-2223Lにおける有機酸輸送体遺伝子の機能解析、(2)クエン酸資化能を有する微生物の探索と有用有機酸生産への応用、(3)クエン酸生産糸状菌を利用したグルコースからの *trans*-アコニット生産、について述べる。

3. 研究の方法

ゲノム解析が終了している *A. niger* CBS 513.88 (H. J. Pel, et al., *Nat. Biotechnol.*, 25, 221-231 (2007)) や ATCC 1015 株 (<http://genome.jgi-psf.org/>) の遺伝子情報をもとにして、*A. niger* のゲノム上に存在する推定有機酸輸送体遺伝子群の存在と当該遺伝子群の培養条件による転写状況の確認を、クエン酸高生産株である *A. niger* WU-2223L (S. Usami, *Mem. Sch. Sci. Eng. Waseda Univ.*, 42, 17-26 (1978)) を供試菌として実施した。さらに、上記試験で絞り込まれた遺伝子群において、他の微生物由来の既知の有機酸輸送体と高い相同性を示す

遺伝子については当該遺伝子破壊株を作製し、クエン酸等の有機酸生産や増殖への影響など、当該遺伝子産物の機能検証し、有機酸高生産のための糸状菌セルファクトリへの応用の可能性を検討した。並行して、クエン酸を原料とした有用有機酸生産についても検討した。すなわち、自然界からクエン酸資化能を有する微生物の探索を行い、取得微生物が有する酵素や当該酵素遺伝子を利用したクエン酸からの有用有機酸生産を検討した。

4. 研究成果

(1)クエン酸高生産菌 *A. niger* WU-2223L における有機酸輸送体遺伝子の機能解析

糸状菌 *A. niger* における有機酸輸送体やその遺伝子に関する報告は皆無であり、糸状菌を宿主とした有機酸高生産のためのセルファクトリ構築には、当該微生物における有機酸輸送体遺伝子の同定や機能解析は必須である。そこで、ゲノム解析が終了している *A. niger* CBS 513.88 や ATCC 1015 株の遺伝子情報をもとに解析し、クエン酸高生産株である *A. niger* WU-2223L のゲノム上には13個のミトコンドリア膜局在型有機酸輸送体の候補遺伝子が存在することを明らかにした。当該遺伝子群のうち10個の遺伝子についてはクエン酸生産条件下での転写が確認された。さらに、それらの遺伝子群の中には酵母 *S. cerevisiae* 由来クエン酸輸送体と高い相同性を示す遺伝子が存在した。本研究ではこれらの既知のクエン酸輸送体と高い相同性を示す遺伝子群の破壊株を作製し、当該遺伝子群の機能解析を実施した。

リンゴ酸-クエン酸輸送体遺伝子 (*ctpA*) の機能解析

酵母 *S. cerevisiae* を含む真核微生物において、ミトコンドリアと細胞質間の共役輸送を

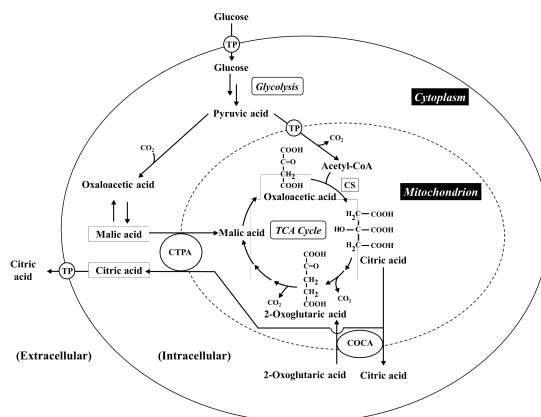


Fig. 1. Proposed metabolic pathway in relation to citric acid production in *A. niger*. COCA, citrate-oxoglutarate carrier; CS, citrate synthase; CTPA, citrate transport protein (malate-citrate shuttle); TCA cycle, tricarboxylic acid cycle; TP, transport protein. Mitochondrial membrane is indicated by the dotted lines. Transport of malic acid and citric acid by CTPA and that of citric acid and 2-oxoglutaric acid by COCA are putative pathways.

司るリンゴ酸-クエン酸シャトルの本体であるクエン酸輸送体タンパク質(CTP)(Fig. 1)ホモログをコードすると推定される遺伝子について、WU-2223L株におけるその機能やクエン酸生産との関係について検証した。

WU-2223L株よりクローニングしたCTPホモログ遺伝子(*ctpA*)は296個のアミノ酸残基から成る約32.5 kDaのタンパク質をコードしており、そのアミノ酸配列中にMitochondrial Carrier Family(MCF)に共通する特徴である6か所の膜貫通領域や、CTPとしての活性残基が高度に保存されていることを確認した。*ctpA*はゲノム上に1コピー存在し、クエン酸生産条件以外の検討した培養条件下においても常に転写されていた。また、WU-2223L株を宿主とした形質転換により*ctpA*破壊株DCTPA-1を作製した。DCTPA-1株では、WU-2223L株と比較して培養初期における発芽や増殖の遅延(Fig. 2)、クエン酸生産に相違が認められた(Fig. 3)(主な発表論文に報告)。しかし、培養12日目の最終的なクエン酸生産量はDCPA-1株とWU-2223L株で相違がなく、クエン酸の高生産に寄与する輸送体は他に存在すると推定される。



Fig. 2. Growth test on *A. niger* WU-2223L and DCTPA-1 Czapek-Dox agar plates (minimal medium) containing glucose as a carbon source for 3 days at 30°C.

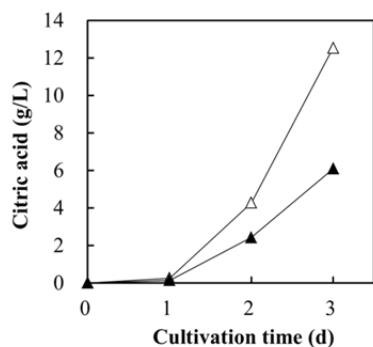


Fig. 3. Citric acid production by *A. niger* WU-2223L (hollow) and DCTPA-1 (solid). The conidia of both strains were inoculated in a citric acid production medium to a final concentration of  $5.0 \times 10^6$  conidia/mL, and were cultivated for 30 days at 30°C, 120 rpm.

## 2-オキソグルタル酸-クエン酸輸送体遺伝子(*cocA*)の機能解析

上述のCTPとは別に、酵母 *S. cerevisiae* はミトコンドリア膜局在型クエン酸輸送体として、クエン酸/2-オキソグルタル酸輸送体(Coc1p)を有している。WU-2223L株のゲノム上においても当該輸送体ホモログ遺伝

子(*cocA*)が存在し、クエン酸の輸送に関する輸送体と予想された(Fig. 1)。そこで、*cocA*についてもその機能解析を目的として、当該遺伝子のクローニングおよび破壊株の作製を行い、生育やクエン酸生産への影響について検討した。

WU-2223L株のゲノム上において、*cocA*はクエン酸シンターゼ遺伝子に隣接して存在し、クローニングした*cocA*は316個のアミノ酸残基から成る推定33.7 kDaのポリペプチドをコードしていた。作製した*cocA*破壊株DCOCA-1は、クエン酸を炭素源とした最少寒天培地上において顕著な生育遅延が確認された(論文投稿準備中のため詳細省略)。さらに、クエン酸生産条件下での12日間の培養では、WU-2223L株のクエン酸生産量(63 g/L)に比べ、DCOCA-1株のそれは35 g/Lであり、45%減少していることを確認した(Fig. 4)。以上より、*cocA*の機能が*A. niger*におけるクエン酸の高生産に参与していることを明らかにした。本成果は、クエン酸生産系状菌 *A. niger* のクエン酸の高生産に参与する有機酸輸送体遺伝子を明らかにした初の報告である。今後は、*cocA*の機能を活用したバイオベース有機酸の高生産を目的とした系状菌セルフファクトリの構築へ向けた育種が期待できる。

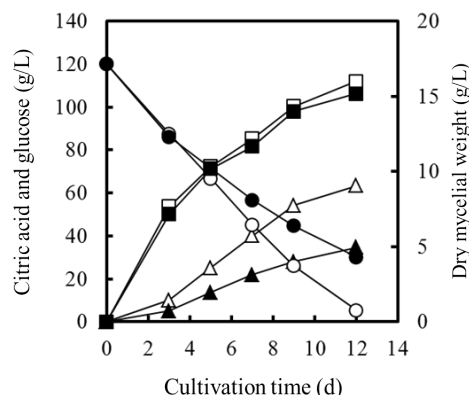


Fig. 4. Citric acid production (triangle) and glucose consumption (circle) by *A. niger* WU-2223L (solid), DKL-2P (hollow) and DCOCA-1 (shaded), and dry mycelial weight of each strain (square). The conidia of each strain were inoculated in a citric acid production medium to a final concentration of  $5.0 \times 10^6$  conidia/mL, and were cultivated for 30 days at 30°C, 120 rpm.

## (2)クエン酸資化能を有する微生物の探索と有用有機酸生産への応用

クエン酸生産系状菌を宿主とした有用有機酸の「高」生産のためのセルフファクトリを構築するにあたって、当該系状菌が有する高いクエン酸生産能やクエン酸を活用することは有効な手段である。そこで、クエン酸資化能を有する微生物を自然界から探索し、当該微生物が有する酵素やその遺伝子を利用した有用有機酸生産への応用を検討した。

クエン酸資化能を有する微生物の探索

クエン酸を唯一の炭素源とする培地を利用したスクリーニングを実施し、当該スクリーニング培地において旺盛な生育を示す約300株の微生物を土壌より取得した。さらに、取得した微生物群の中から、クエン酸を基質とした細胞反応において *trans*-アコニット酸を生産する細菌として *Pseudomonas* sp. WU-0701 (NBRC 110970 として寄託) を単離した。当該細菌の無細胞抽出液より4段階の工程によって、約25 kDaの単量体の酵素として aconitate isomerase (AI; EC 5.3.3.7) を精製した。精製AIの最適反応pHは6.0、最適反応温度は37であり、AIは *cis*-アコニット酸に対する高い親和性と異性化活性を示した。また、AIをコードする遺伝子 *ais* のクローニングを行った。*ais*は全長786 bp、262個のアミノ酸残基をコードしており、*ais* 遺伝子産物はN末端側(22アミノ酸)にペリプラズム移行シグナルを有していることを明らかにした。さらに、AIはモリブデン輸送タンパク質(ABCトランスポーター)と高い相同性を示すが、他のタンパク質との相同性は低く、極めて新規な酵素であることが判明した(主な発表論文に報告)。

*Pseudomonas* sp. WU-0701 由来 aconitate isomerase を利用したクエン酸からの *trans*-アコニット酸生産

*trans*-アコニット酸には機能性高分子原料としての用途があり、バイオプロセスによる生産が期待されている有機酸の1つである。そこで、糸状菌セルファクトリによる *trans*-アコニット酸生産の予備試験として、上述のAI遺伝子 *ais* を高発現させた組換え大腸菌の細胞反応を利用したクエン酸からの *trans*-アコニット酸生産を検討した(Fig. 5)。*ais* を大腸菌 *Escherichia coli* Rosetta 2(DE3) を宿主として異種発現させることで、組換えAIを活性のある可溶性タンパク質として取得した。取得した組換えAIは、*cis*-アコニット酸を基質とする *in vitro* 反応において、最適反応pHが6.0、最適反応温度が37であり、*Pseudomonas* sp. WU-0701 由来の精製AIと同一であることを確認した。また、*ais* を異種発現させた大腸菌 *E. coli* Rosetta 2(DE3)/pEmAI の細胞反応により、37°C、120分間の反応で100 mMのクエン酸から32.4 mM

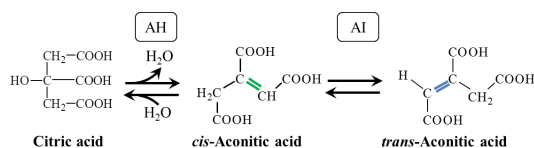


Fig. 5. Biocatalytic synthesis of *trans*-aconitic acid from citric acid by whole-cell reaction. The synthesis reaction was catalyzed by aconitate isomerase (AI; EC 5.3.3.7) derived from *Pseudomonas* sp. WU-0701 and aconitate hydratase (AH; EC 4.2.1.3) of *E. coli* W3110.

の *trans*-アコニット酸生産に成功した(Fig. 6A)。さらに、クエン酸から *cis*-アコニット酸への反応を促進するためアコニターゼ(AH; EC 4.2.1.3) 遺伝子 *acnB* を *E. coli* W3110 よりクローニングし、*E. coli* Rosetta 2(DE3) を宿主として *ais* と共発現させた大腸菌を作製した。作製した組換え大腸菌 *E. coli* Rosetta 2(DE3)/pEmAI plus pRACNB の細胞反応により、37、30分間の反応で100 mMのクエン酸を原料として34.8 mMの *trans*-アコニット酸の生産が可能になり、反応時間の短縮に成功した(Fig. 6B)(主な発表論文に報告)。本成果は、生体触媒を利用した *trans*-アコニット酸生産法についての世界初の報告である。

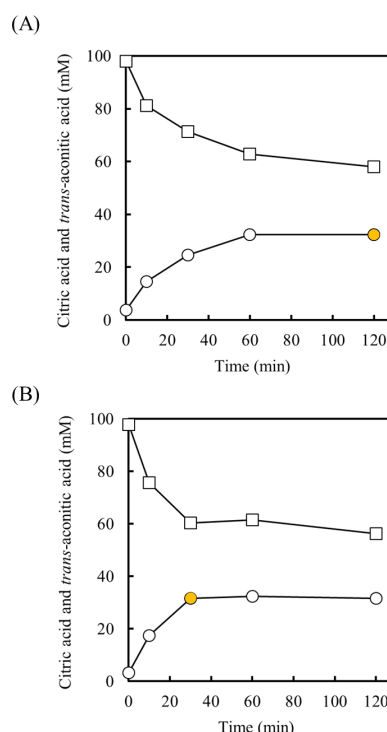


Fig. 6. Time courses of *trans*-aconitic acid production from citric acid by whole-cell reactions of (A) *E. coli* Rosetta 2(DE3)/pEmAI and (B) *E. coli* Rosetta 2(DE3)/pEmAI plus pRACNB. Symbols: circle, *trans*-aconitic acid; square, citric acid.

### (3) 糸状菌を利用したグルコースからの *trans*-アコニット酸生産

有用有機酸高生産のための糸状菌セルファクトリの創製として、上述(2)の *Pseudomonas* sp. WU-0701 由来 *ais* を *A. niger* WU-2223L に異種発現させ、再生可能な糖質原料としてのグルコースからの *trans*-アコニット酸生産を検討した。糸状菌用高発現プロモーターP-No8142 (K. Minetoki, et al., *J. Biol. Macromol.*, **3**, 89-96 (2003)) 下流に *ais* を連結したプラスミドを WU-2223L 株に導入した形質転換株を用いることで、グルコースからの *trans*-アコニット酸生産に成功した(論文未発表のため詳細省略)。現在、輸送系の改変と組み合わせることで、さ

らなる収量および収率の向上を目指し、検討を継続している。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

K. Kobayashi, J. Maruebi, K. Kirimura, Bioproduction of *trans*-Aconitic Acid from Citric Acid by Whole-Cell Reaction of *Escherichia coli* Heterologously Expressing the Aconitate Isomerase Gene from *Pseudomonas* sp. WU-0701, *Chemistry Select*, **1**, 1467-1471 (2016), 査読有.

K. Kirimura, K. Kobayashi, Y. Ueda, T. Hattori, Phenotypes of Gene Disruptants in Relation to a Putative Mitochondrial Malate-Citrate Shuttle Protein in Citric Acid-Producing *Aspergillus niger*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **80**, in press (2016), 査読有.

K. Yuhara, H. Yonehara, T. Hattori, K. Kobayashi, K. Kirimura, Enzymatic Characterization and Gene Identification of Aconitate Isomerase, an Enzyme Involved in Assimilation of *trans*-Aconitic Acid, from *Pseudomonas* sp. WU-0701, *FEBS Journal*, **282**, 4257-4267 (2015), 査読有.

〔学会発表〕(計23件)

小林慶一、上田由佳、桐村光太郎、クエン酸生産系状菌 *Aspergillus niger* におけるミトコンドリア膜局在型クエン酸輸送体遺伝子破壊株の作製、日本農芸化学会 2016 年度大会、講演番号 4F120、2016 年 3 月 30 日、札幌

丸海老純也、油原かほり、小林慶一、桐村光太郎、アコニット酸イソメラーゼ遺伝子を異種発現させた組換え大腸菌の細胞反応によるクエン酸からの *trans*-アコニット酸生産、日本農芸化学会 2016 年度大会、講演番号 4F182、2016 年 3 月 30 日、札幌

K. Kobayashi, K. Yuhara, H. Yonehara, J. Maruebi, T. Hattori, K. Kirimura, *trans*-Aconitic Acid from Citric Acid by Whole-Cell Reactions of *Escherichia coli* Heterologously Expressing Aconitate Isomerase Gene (*ais*), The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM) 2015, Poster no. 862, 18 December (2015), Honolulu (Hawaii, USA)

〔図書〕(計1件)

桐村光太郎、小林慶一、井出浩平、技術情報協会、『ゲルの安定化と機能性付与・次世代への応用開発』、低分子ゲル化剤としての機能を示す l-メントール配糖体の酵素的合成、2013 年、p. 127-131

#### 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・先進理工学部・教授

研究者番号：90195412