

19 20-15

早稲田大学大学院理工学研究科

博 士 論 文 概 要

論 文 題 目

Cloning, Expression and Functional Analysis of
Genes Encoding Mitochondrial Enzymes from a
Citric Acid-Producing Fungus *Aspergillus niger*

クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* の
ミトコンドリア局在型酵素群をコードする
遺伝子のクローニング, 発現および機能解析

申 請 者

依 田 昌 史

MASASHI YODA

応用化学専攻応用生物化学研究

2000 年 10月
(西暦)

現在、世界的には年間約40万トンを超えるクエン酸が生産されており、酸味料、pH調整剤、キレート剤、洗剤のビルダー、あるいは可塑剤や塗料などの食品、医薬品、化成品の原料として広範に利用されている。クエン酸の工業的生産は、糖蜜やデンプン糖化液を原料として*Aspergillus niger*（クロコウジカビ）を使用した発酵法により実施されており、大規模容量での操業が可能で生産管理が容易な液内培養法が多く採用されている。

*A. niger*は高濃度の糖基質より高収率でクエン酸を蓄積する。これは、解糖系による大量のピルビン酸供給の持続に加え、クエン酸合成酵素（citrate synthase）と分解酵素（NADP⁺-isocitrate dehydrogenase）とのバランスに起因するオーバーフロー現象によって説明されている。しかし、クエン酸の生産性はその他多くの因子による影響も受けており、とくに液内培養法において著しい影響を与える通気条件に関しては、呼吸系を含め生理的かつ酵素的レベルからの解析は十分になされていない。そこで、エネルギー代謝に深く関わる呼吸系にも考慮してクエン酸蓄積機構を解明し、それを踏まえた効率的な代謝制御を行うことによって、安定な高生産性菌株の育種やクエン酸生産性の向上が実現できると考えられる。

以上を背景として、本論文では液内培養系で高いクエン酸生産性を示す *A. niger* WU-2223L を供試菌とし、クエン酸蓄積と密接に関係する3種類の酵素をコードする遺伝子をクローニングして機能解析を行った。さらに、シアン非感受性バイパス呼吸系酵素 alternative oxidase とクエン酸生産性との関連性に着目し、今回初めて遺伝子レベルでの検証を行い調節機構の解明を試みた。

第1章では *A. niger* によるクエン酸生産に関する諸条件、および代謝調節についての研究事例をまとめ、alternative oxidase についての知見を併せて示した。

第2章では、本研究に用いた基本的な実験方法について記述した。すなわち遺伝子工学的手法を中心に、培養方法、クエン酸など代謝産物の定量法、酵素活性の測定法、ならびに細胞小器官の分画法などを記述した。また、供試菌 *A. niger* WU-2223L の菌学的性質についても併せて記述した。

第3章では、供試菌から citrate synthase (CS) をコードする cDNA および染色体 DNA (*cit1*) をクローニングし、塩基配列を決定して機能を解析した。異種生物の CS の塩基配列保存領域を参考にしてプライマーを作成し、PCR法により対応する遺伝子断片を増幅した。この遺伝子断片をプローブとして cDNA ライブラリーより1種類の cDNA クローンを単離した。当該 cDNA は 1,425 bp の読み取り枠（ORF）を含み、475 残基のアミノ酸からなるポリペプチド鎖をコードしていた。推定されたアミノ酸配列は真核生物である酵母 *Saccharomyces cerevisiae* やブタ由来の CS とそれぞれ 68%、65% と有意かつ高い相同性を示した。当該酵素は N 末端領域にミトコンドリア移行シグナルが存在し、異種生物由来 CS タンパク質の N 末端配列の比較からミトコンドリア局在型であることが判明した。さらに、得られた cDNA を用いて *A. niger* 染色体 DNA ライブラリーより染色体 DNA (*cit1*) をクローニングした。*cit1* は

6 つのイントロンにより分断されており、サザンブロットより染色体上に1コピーのみ存在することを明らかにした。一方、単離した cDNA を CS 遺伝子欠損株である *Escherichia coli* MOB150 において発現させたところ、CS 活性が検出され、MOB150 株のグルタミン酸要求性を相補した。以上より、*cit1* 遺伝子をクローニングしたことがタンパク質レベルでも確認され、当該遺伝子がミトコンドリア移行型の CS をコードしていることを明らかにした。

第4章では、第3章と同様の方法によって、供試菌から NADP⁺-isocitrate dehydrogenase (NADP⁺-ICDH) をコードする cDNA と染色体 DNA (*icd1*) をクローニングし、塩基配列を決定して機能を解析した。1種類のプローブを用いて、cDNA ライブラリーから大きさの異なる2種類の cDNA クローン (cDNA-1, 2.0 kb; cDNA-2, 1.5 kb) を取得した。それぞれの制限酵素地図を比較したところ、cDNA-2 は cDNA-1 の 5'-末端約 500 bp を欠いたものであることが明らかになった。cDNA-1 は 1,494 bp の ORF を含み、498 残基のアミノ酸からなるポリペプチド鎖をコードしており、推定されたアミノ酸配列は、真核生物である *S. cerevisiae* やブタ由来の NADP⁺-ICDH とそれぞれ 72%、71% と高い相同性を示した。cDNA-1 の ORF では CS と同様、N 末端領域にミトコンドリア移行シグナルが存在し、ミトコンドリア局在型であることが判明した。一方、cDNA-2 の ORF はミトコンドリア移行シグナルを欠いているため、サイトプラズムに蓄積することが推定された。cDNA-1 と cDNA-2 を大腸菌の ICDH 欠損株 *E. coli* DEK2004 において発現させたところ、両者において ICDH 活性が検出され、また DEK2004 株のグルタミン酸栄養要求性も相補した。さらに、染色体 DNA ライブラリーより *icd1* をクローニングし、*icd1* は 49 bp から最長 241 bp になる7つのイントロンにより分断されていることを明らかにした。*icd1* は染色体上に1コピーしか存在しなかったが、*icd1* の ORF (cDNA-1) をプローブとして *A. niger* の全 RNA とのノーザンブロットを行ったところ、2.0 kb と 1.5 kb にシグナルを確認した。したがって、これら2種類の転写産物は1個の遺伝子 *icd1* から転写されたもので、NADP⁺-ICDH は転写レベルで細胞内での局在あるいは移行が調節されている可能性が示唆された。以上より、*A. niger* NADP⁺-ICDH をコードする遺伝子 *icd1* がクローニングされ、当該遺伝子はタンパク質レベルで機能する2種類の転写産物を与えることが明らかになった。これら転写産物は転写レベルですでに細胞内小器官への移行が調節されていることが示唆された。

第5章では新規呼吸系酵素である alternative oxidase (AOX) と当該酵素のクエン酸生産への関わりについて検討した。*A. niger* WU-2223L はシアン (CN) やアンチマイシン A に非感受性かつサリチルヒドロキシサラム酸 (SHAM) 感受性の呼吸経路を有している。グルコース 120 g/l を含む培地を使用して、呼吸に影響を与える数種類の薬剤を添加した培養条件下で細胞の分画を行い、各分画について酸素消費を測定した。ミトコンドリア分画に duroquinol oxidase として測定される CN 非感受性かつ SHAM 感受性の AOX 活性が局在した。クエン酸生産の促進剤であるメタ

ノールやチトクロム呼吸鎖の阻害剤であるアンチマイシンAを添加した培養では、無添加の場合と比較してAOX活性は約2倍上昇し、菌体量あたりのクエン酸生産性も約4倍に向上した。それに対しSHAMを添加した場合にはAOX活性の低下に伴い、CN非感受性かつSHAM感受性の呼吸活性も著しく低下した。この時、無添加の場合と比較して菌体量はほとんど変化しなかったが、クエン酸生産量および生産性ともに著しく減少した。以上より、ミトコンドリアに局在するAOX活性がクエン酸の大量生産に有意に関わっていることが明らかになった。

第6章では、前章で検討したCN非感受性呼吸系酵素AOXをコードするcDNAと染色体DNA (*aox1*)を第3章と同様の方法によってクローニングし、塩基配列を決定して機能を解析した。単離したcDNAクローンは1,257 bpのORFを含み、352残基からなるポリペプチド鎖をコードしていた。推定されたアミノ酸配列は、植物 *Sauromatum guttatum* および酵母 *Hansenula anomala* 由来のAOXとそれぞれ52%、50%と有意かつ高い相同性を示した。当該酵素N末端領域のミトコンドリア移行シグナルの存在および前章の結果より、当該酵素がミトコンドリア局在型であることが示された。またこのタンパク質は2個の膜貫通領域を有し、活性中心と考えられる2個の鉄結合ドメインを含んでいた。クローニングされた全長2,856 bpの染色体DNA (*aox1*)は2つのイントロンで分断されていた。また、染色体上には*aox1*は1コピーのみ存在した。当該遺伝子のcDNAを大腸菌 *E. coli* DH5αにおいて発現させたところ、形質転換体はCN非感受性かつSHAM感受性の呼吸を新たに獲得し、この呼吸は*aox1*の高発現化によって増大した。以上より、*aox1*が *A. niger* のAOXをコードする遺伝子であり、当該遺伝子の異種生物への導入によって *A. niger* で見い出されているCN非感受性呼吸を新たに付与できることを実証した。

第7章では前章でクローニングされた*aox1*の発現調節機構の解明を目的としてその転写活性を様々な条件下で検討した。経時的に抽出した *A. niger* WU-2223Lの全RNAに対し、*aox1*をプローブとし、*A. niger* actin遺伝子を内部標準としてノーザンブロットを行ったところ、転写活性は2日目で最大を示し、クエン酸蓄積初期である4日目で最小を示した後、6、8日目に一定の値となった。この挙動は、測定された全呼吸活性に対するAOXの比活性の値と一致した。また、アンチマイシンAを加えた5日間の培養で*aox1*転写活性は2倍の値を示したのに対し、メタノールを加えた培養では高いAOX活性にもかかわらず転写活性の上昇は見られなかった。SHAM添加条件下でも*aox1*の転写活性は変化しなかった。以上より、*aox1*の発現は転写レベルおよび転写後レベルの両方で調節されることが明らかになった。

第8章では本論文でクローニングしたミトコンドリア局在型酵素遺伝子について、遺伝子情報データベースを用いた非翻訳領域、翻訳領域とイントロン、予想されるアミノ酸配列の解析の方法について述べ、またそれらの遺伝子構造についての解析、考察を加えた。

第9章では、前章までの研究成果を総括した。