

博士論文概要

論文題目

Alterations of Organic Acids Production by
Metabolic Engineering in Citric Acid-Producing
Aspergillus niger

代謝工学を利用したクエン酸生産系状菌
Aspergillus niger における有機酸生産の改変

申請者

Keiichi	KOBAYASHI
小林	慶一

応用化学専攻 応用生物化学研究

2013年12月

クエン酸は食品や飲料の酸味料や酸化防止剤として利用されており、工業的には pH 調整剤やキレート剤などとしての用途がある。2011 年の世界的な年間生産量は 175 万トンに達し、その全てが糸状菌 *Aspergillus niger*（クロコウジカビ）を用いた発酵生産によるものである。*A. niger* はデンプン粕や糖蜜などの粗質原料からクエン酸を生産可能であることや、優れた耐酸性を示すなどの特性を有することから、工業的なクエン酸生産に利用されている。これまでに、*A. niger* におけるクエン酸の生産量や収率の向上を目的とした検討のほか、クエン酸生産に関わる有機酸の代謝を含めて生化学的観点からの解析など、クエン酸生産機構解明に向けた研究が進められてきた。クエン酸がトリカルボン酸（TCA）回路の中間体であることから、とくに解糖系や TCA 回路の関連諸酵素の活性の消長についても解析が行われてきたが、依然としてクエン酸生産機構の全容は明らかになっていない。

また、糸状菌の細胞内では非相同組換えが支配的であるため、従来は遺伝子工学を利用して特定の遺伝子を破壊し機能を解析することが困難であるなど、実験技術に関しても課題があった。さらに、ゲノム情報が明らかにされていない場合には、代謝工学を利用した有用化合物（代謝産物）の生産に関する研究も困難であった。しかし近年、*A. niger* における高効率相同組換え株の創製とその利用技術の開発など実験遂行上で大きな革新があり、さらに、2006 年と 2007 年に代表的な 2 種類の *A. niger* の全ゲノム情報が公開されたこともあり、遺伝子関連の技術も格段に充実した。申請者らもクエン酸生産糸状菌 *A. niger* について独自に高効率相同組換え株の創製に成功し、遺伝子破壊と遺伝子高発現の技術を確立した。これらの基盤技術を利用した遺伝子工学的手法による解析によって、クエン酸生産機構を理解する上で有用な知見が得られるはずである。また、公開されたゲノム情報を活用することで、クエン酸生産糸状菌の意図的な代謝改変も可能となり、当該糸状菌の高いクエン酸性を背景とした他の有機酸への効率的な発酵転換も可能になる。

本論文では、クエン酸生産糸状菌 *A. niger* における有機酸生産の改変を目的として、遺伝子工学を駆使した代謝工学の研究を実施した。とくに、クエン酸生産と関連する TCA 回路、メチルクエン酸回路、シュウ酸生産経路について解析を実施し、工業的価値ある有機酸の発酵生産菌への転換を検討した。具体的には、クエン酸生産糸状菌を宿主とした oxaloacetate hydrolase 遺伝子の高発現によるシュウ酸高生産菌の創製に成功した。

本論文は、8 章で構成されている。

第 1 章では、*A. niger* によるクエン酸生産について概説した。とくにクエン酸生産機構の解析や代謝経路に関する研究、クエン酸生産とシュウ酸生産の関連性についてまとめ、遺伝子工学的手法により検証すべき点と代謝工学的手法による *A. niger* における有機酸生産改変の可能性について考察した。これらを背景とし

て、本研究の意義と目的を明らかにした。

第2章では、本研究で用いた主な実験方法について概説した。具体的には、各種微生物の培養方法、*A. niger* などの糸状菌および大腸菌に関する遺伝子工学的的手法、遺伝子やタンパク質ならびに代謝産物の分析方法について記述した。

第3章では、TCA回路と一部を共有する有機酸代謝回路であるメチルクエン酸回路について、当該回路の初発酵素 methylcitrate synthase (MCS) の機能を解析し、その遺伝子 (*mcsA*) を利用してクエン酸生産との関連性を検証した。*A. niger* におけるクエン酸生産の鍵酵素の一つである citrate synthase (CS) のホモログ遺伝子をゲノム情報を基盤として探索する過程で、転写されているホモログ遺伝子として *mcsA* が見出された。そこで、*mcsA* を *A. niger* WU-2223L よりクローニングし、当該遺伝子の特性解析を実施した。*mcsA* は約 50 bp から成る 2 つのイントロンを含む全長 1,495 bp の遺伝子で、465 個のアミノ酸残基をコードしており、MCS は N 末端側に 28 個のアミノ酸残基から成るミトコンドリア移行シグナルペプチドを有していた。大腸菌において *mcsA* の相補 DNA (cDNA) を異種発現させ、組換えタンパク質として取得、精製した。当該組換え MCS は、27.6 U/mg の MCS 活性を示す一方で、同時に 26.8 U/mg の CS 活性を示す二機能酵素であることを明らかにした。また、WU-2223L 由来 *mcsA* 破壊株はグルコースを炭素源とした場合に非破壊株である WU-2223L と同等のクエン酸生産量を示した。以上から、*A. niger* WU-2223L にはメチルクエン酸回路が存在し、CS 活性を有する MCS が機能しているものの、MCS はクエン酸生産に寄与していないことを当該酵素遺伝子の破壊により明らかにした。

第4章では、*A. niger* WU-2223L を宿主として NADP⁺依存性 isocitrate dehydrogenase (NADP⁺-ICDH) 遺伝子 (*icdA*) 高発現株を作製し、クエン酸生産に対する NADP⁺-ICDH 活性の影響をクエン酸の代謝の観点から検討を行った。すなわち、人為的に NADP⁺-ICDH 活性を増大させ、*A. niger* におけるクエン酸生産の鍵酵素の一つと考えられている NADP⁺-ICDH とクエン酸生産との関係を代謝工学的に検証した。*icdA* 高発現のために *Aspergillus* 属用高発現プロモーター *P-No8142* の下流に *icdA* の cDNA を連結したプラスミド pPANICDH を構築し、当該組換えプラスミドを *A. niger* WU-2223L に導入し、OPI-1 株を作製した。クエン酸生産条件下で培養した OPI-1 株は WU-2223L に比べ *icdA* の転写量が 12.5 倍、NADP⁺-ICDH 活性が 4.78 倍に増加した。さらに 12 日間のクエン酸生産条件下での培養において、OPI-1 株のクエン酸生産量、グルコース消費量は *A. niger* WU-2223L に比べ、それぞれ 18.7%、10.5% といずれも減少した。以上より、NADP⁺-ICDH が TCA 回路における調節点の一つであり、NADP⁺-ICDH 活性が *A. niger* におけるクエン酸生産量を調節する 1 つの要因であることを、クエン酸高生産株において当該酵素遺伝子を高発現させることにより実証した。

第5章では、*A. niger* WU-2223L におけるシュウ酸生産経路の同定を目的に、

oxaloacetate hydrolase (OAH) をコードする遺伝子 (*oahA*) とその周辺領域のクローニングと塩基配列決定を行い、さらに当該遺伝子破壊株を作製することで、*oahA* のシュウ酸生産における役割の検証を行った。*oahA* は 2 つのイントロンを含む全長 1,263 bp の遺伝子領域から成り、341 個のアミノ酸残基をコードしていた。プロモーター領域には転写因子として pH 応答性制御因子などが見出され、*oahA* の転写が pH により制御されていることが示唆された。さらに、WU-2223L 由来 *oahA* 破壊株は *oahA* の転写と OAH 活性が完全に消失し、試験した種々の条件においてもシュウ酸を生産しなかった。以上より、*A. niger* WU-2223L におけるシュウ酸生産は全て、*oahA* がコードする OAH によるオキサロ酢酸の加水分解に由来していることを明らかにした。

第 6 章では、第 5 章での成果を踏まえ、クエン酸生産糸状菌 *A. niger* WU-2223L を宿主として *oahA* を高発現させることで、シュウ酸生産へ発酵転換した実用株が創製可能であると考えた。*oahA* 高発現のために *Aspergillus* 属用高発現プロモーター *P-No8142* の下流に *oahA* cDNA を連結したプラスミド pNANEOAH-1 を構築し、*A. niger* WU-2223L を宿主とした *niaD* 変異株 LND-1 に pNANEOAH-1 を導入し、EOAH-1 株を作製した。シュウ酸生産条件下で培養した EOAH-1 株は WU-2223L に比べ *oahA* の転写量が 3.04 倍、OAH 活性が 2.47 倍に増加したことを確認した。EOAH-1 株は予想通りシュウ酸発酵に転換し、炭素源として 30 g/L のグルコースを炭素源とするシュウ酸生産試験培地での 12 日間培養により、そのシュウ酸生産量は 28.9 g/L (WU-2223L のシュウ酸生産量の 1.85 倍に相当、対消費グルコース収率 96%) に達した。以上より、クエン酸生産糸状菌を宿主とした *oahA* 高発現により実用的なシュウ酸高生産菌の創製に成功した。

第 7 章では、クエン酸生産糸状菌 *A. niger* WU-2223L においてクエン酸生産に関連したグルコース代謝に寄与するシアン非感受性呼吸系酵素 alternative oxidase 遺伝子 (*aox1*) を高発現させることによって、クエン酸生産時と同様にグルコース消費速度を増大させ、シュウ酸生産量を増大させることを検討した。*A. niger* WU-2223L を宿主とした *aox1* 高発現株 EAOX-1 株は、30 g/L のグルコースを炭素源とするシュウ酸生産試験培地での 12 日間培養により、44.2 g/L のシュウ酸を生産した。以上から、呼吸系酵素遺伝子の転写量の制御による糖代謝の改変と代謝工学的手法の駆使によって、*A. niger* における有機酸生産を改変可能なことを明らかにした。

第 8 章では、本研究を総括した。本研究では、遺伝子工学とゲノム情報を駆使しながら、*A. niger* においてクエン酸生産との関連が推定された酵素や代謝経路の関連性を明らかにした。さらに、その過程で得た知見を基盤として代謝工学を利用することで有機酸生産の改変を実現したことは意義深い成果である。

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

氏名 小林 慶一 印

(2014年2月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
1. 論文 ○(報文)	1. Oxalic Acid Production by Citric Acid-Producing <i>Aspergillus niger</i> Overexpressing the Oxaloacetate Hydrolase Gene <i>oahA</i> Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, in press, 2014 <u>Keiichi KOBAYASHI</u> , Takasumi HATTORI, Yuki HONDA, and Kohtaro KIRIMURA
○(報文)	2. Gene Identification and Functional Analysis of Methylcitrate Synthase in Citric Acid-Producing <i>Aspergillus niger</i> WU-2223L Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, Vol. 77, No. 7, 1492-1498, July 2013. <u>Keiichi KOBAYASHI</u> , Takasumi HATTORI, Yuki HONDA, and Kohtaro KIRIMURA
(報文)	3. Increases in Gene-Targeting Frequencies Due to Disruption of <i>kueA</i> as a <i>ku80</i> Homolog in Citric Acid-Producing <i>Aspergillus niger</i> Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, Vol. 75, No. 8, 1594-1596, August 2011. Yuki HONDA, <u>Keiichi KOBAYASHI</u> , and Kohtaro KIRIMURA
2. 総説	なし
3. 講演	1. アコニット酸イソメラーゼ遺伝子を高発現させた組換え大腸菌による <i>trans</i> -アコニット酸生産 2013年度日本生物工学会大会 (広島), 講演要旨集 p. 28, 2013年9月. 油原かほり, <u>小林慶一</u> , 桐村光太郎
	2. クエン酸インジケータ蛍光タンパク質遺伝子を導入した大腸菌における細胞内クエン酸の検出 2013年度日本生物工学会大会 (広島), 講演要旨集 p. 121, 2013年9月. 真野敬道, 本田裕樹, <u>小林慶一</u> , 桐村光太郎
	3. クエン酸生産糸状菌 <i>Aspergillus niger</i> におけるシアン非感受性呼吸系酵素遺伝子の破 高発現 2013年度日本生物工学会大会 (広島), 講演要旨集 p. 133, 2013年9月. 田中珠, 服部貴澄, <u>小林慶一</u> , 桐村光太郎
	4. 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 <i>trans</i> -アコニット酸生 産 日本農芸化学会 2013年度大会 (仙台), 4B23a14, 2013年3月. 油原かほり, 濱地達也, <u>小林慶一</u> , 本田裕樹, 桐村光太郎

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
3. 講演	<p>5. <i>Pseudomonas</i> 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 日本化学会第 93 春季年会 (滋賀), 3D4-18, 2013 年 3 月. 油原かほり, 濱地達也, <u>小林慶一</u>, 本田裕樹, 桐村光太郎</p> <p>6. クエン酸生産糸状菌 <i>Aspergillus niger</i> におけるメチルクエン酸シンターゼの検出と機能解析 2012 年度日本生物工学会大会 (神戸), 講演要旨集 p. 37, 2012 年 10 月. <u>小林慶一</u>, 本田裕樹, 桐村光太郎</p> <p>7. <i>Pseudomonas</i> 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 2012 年度日本生物工学会大会 (神戸), 講演要旨集 p. 37, 2012 年 10 月. 油原かほり, 米原広海, <u>小林慶一</u>, 本田裕樹, 服部貴澄, 桐村光太郎</p> <p>8. 糸状菌 <i>Aspergillus niger</i> における oxaloacetate hydrolase 遺伝子の高発現による高収率シュウ酸生産 日本農芸化学会 2012 年度大会 (京都), 3C23a08, 2012 年 3 月. <u>小林慶一</u>, 本田裕樹, 服部貴澄, 桐村光太郎</p> <p>9. 糸状菌 <i>Aspergillus niger</i> NRRL 328 由来 III 型ポリケタイド合成酵素の機能解析 日本化学会第 93 春季年会 (神奈川), 3D3-14, 2012 年 3 月. 濱地達也, <u>小林慶一</u>, 本田裕樹, 桐村光太郎</p> <p>10. クエン酸生産糸状菌 <i>Aspergillus niger</i> における oxaloacetate hydrolase 遺伝子 (<i>oahA</i>) の破壊と高発現によるシュウ酸生産経路の検証 第 11 回糸状菌分子生物学コンファレンス (東京), 講演要旨集 p. 44, 2011 年 11 月. <u>小林慶一</u>, 本田裕樹, 服部貴澄, 桐村光太郎</p> <p>11. <i>Aspergillus niger</i> NRRL 328 由来 III 型ポリケタイド合成酵素によるピロン化合物の生成 第 11 回糸状菌分子生物学コンファレンス (東京), 講演要旨集 p. 73, 2011 年 11 月. 濱地達也, 宮井希実, <u>小林慶一</u>, 本田裕樹, 桐村光太郎</p> <p>12. クエン酸生産糸状菌 <i>Aspergillus niger</i> におけるメチルクエン酸シンターゼ遺伝子破壊株の作製 2011 年度日本生物工学会大会 (東京), 講演要旨集 p. 36, 2011 年 9 月. <u>小林慶一</u>, 本田裕樹, 桐村光太郎</p> <p>13. 糸状菌由来の新規な III 型ポリケタイド合成酵素の遺伝子異種発現と機能解析 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム (つくば), 講演要旨集 p. 56, 2011 年 9 月. <u>小林慶一</u>, 濱地達也, 宮井希実, 本田裕樹, 桐村光太郎</p>

早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
3. 講演	<p>14. Disruption of <i>kueA</i> as a <i>ku80</i> Homolog in Citric Acid-Producing <i>Aspergillus niger</i> for Improvement of Homologous Recombination Frequencies 4th Congress of European Microbiologists, FEMS 2011 (Geneva, Switzerland), Poster no. 125, June 2011. <u>Keiichi KOBAYASHI</u>, Yuki HONDA, and Kohtaro KIRIMURA</p> <p>15. クロウジカビ由来 III 型ポリケタイド合成酵素ホモログ遺伝子のクローニングと機能解析 日本化学会第 91 春季年会 (神奈川), 3B2-52, 2011 年 3 月. 宮井希実, <u>小林慶一</u>, 本田裕樹, 服部貴澄, 桐村光太郎</p> <p>16. クエン酸生産糸状菌由来 <i>ku80</i> 破壊株における相同組換え効率の向上 第 10 回糸状菌分子生物学コンファレンス (広島), 講演要旨集 p. 39, 2010 年 11 月. 本田裕樹, <u>小林慶一</u>, 桐村光太郎</p> <p>17. クエン酸生産糸状菌 <i>Aspergillus niger</i> 由来 <i>ku80</i> 破壊株の作製と相同組換え効率の向上 2010 年度日本生物工学会大会 (宮崎), 講演要旨集 p. 62, 2010 年 10 月. <u>小林慶一</u>, 本田裕樹, 桐村光太郎</p> <p>18. <i>ku80</i> 遺伝子破壊によるクエン酸生産糸状菌 <i>Aspergillus niger</i> における相同組換え効率の向上 日本農芸化学会 2010 年度大会 (東京), 講演要旨集 p. 213, 2010 年 3 月. 本田裕樹, <u>小林慶一</u>, 服部貴澄, 桐村光太郎</p> <p>19. クエン酸生産糸状菌 <i>Aspergillus niger</i> における NADP⁺依存性イソクエン酸脱水素酵素遺伝子の高発現による代謝への影響 日本農芸化学会 2009 年度大会 (福岡), 講演要旨集 p. 102, 2009 年 3 月. 服部貴澄, <u>小林慶一</u>, 林理恵, 本田裕樹, 桐村光太郎</p> <p style="text-align: right;">他 6 件 (合計 25 件)</p>
4. その他	<p>1. (著書, 分担執筆) 低分子ゲル化剤としての機能を示す <i>L</i>-メントール配糖体の酵素的合成 ゲルの安定化と機能性付与・次世代への応用開発, 技術情報協会, p. 127-131, 2013 年 12 月 桐村光太郎, <u>小林慶一</u>, 井出浩平</p> <p>2. (報文) <i>l</i>-Menthyl α-Maltoside as a Novel Low-molecular-weight Gelator Chemistry Letter, Vol. 42, No. 6, 657-659, June 2013. Kohei IDE, Toshiyuki SATO, Jun AOI, Hiroyuki DO, <u>Keiichi KOBAYASHI</u>, Yuki HONDA, Kohtaro KIRIMURA</p>