

# 博士論文審査報告書

## 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糸状菌  
*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

2014年2月

多様な用途を有するクエン酸の世界的な年間生産量は2011年には175万トンに達し、その全量がクエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* (クロコウジカビ) によって発酵生産されている。*A. niger* は粗質な糖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し、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をはじめ、クエン酸生産に関わる代謝経路を含めて生化学的観点からの解析が行われてきた。これらを通じてクエン酸生産機構については多くのことが解明されたが細部には不明な点を残しており、依然としてクエン酸生産機構の全容は明らかにされていない。

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、糸状菌の代謝研究では実験技術に関して課題があった。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* では相同組換えによる効率的な遺伝子破壊が可能になるなど実験遂行上で大きな革新があり、その全ゲノム情報が公開されるなど、遺伝子関連の技術や情報が格段に充実した。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合目的的な代謝改変も可能となり、当該糸状菌の高いクエン酸生産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と予想される。

本論文では、ゲノム情報と遺伝子工学を駆使し、クエン酸生産との関連が推定された酵素や代謝経路に関する検討がされている。さらに、得られた知見を応用した代謝工学的手法によるクエン酸生産糸状菌の有機酸生産の改変に関する成功例を提示している。

第1章では、*A. niger* によるクエン酸生産について概説している。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、シュウ酸生産と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指摘している。これらを背景とし、研究の意義と目的を明らかにしている。

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ている。

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 *A. niger* で初めて解析し、その遺伝子 (*mcsA*) 破壊を利用してクエン酸生産との関連性を検証している。*A. niger* WU-2223L には MCS が存在し、MCS 活性の他にクエン酸生産の鍵酵素の一つである citrate synthase (CS) と同様の活性を示すことを初めて明らかにしている。さらに、遺伝子破壊の実験により、MCS は CS 活性を示すもののグルコースを炭素源とするクエン酸生産に寄与していないことを明らかに

している。これらは *A. niger* におけるメチルクエン酸回路に関する初めての検証であり、クエン酸生産機構を考察する上で新規かつ重要な成果である。

第 4 章では、*A. niger* WU-2223L を宿主として NADP<sup>+</sup>依存性 isocitrate dehydrogenase (NADP<sup>+</sup>-ICDH) 遺伝子 (*icdA*) 高発現株を作製している。人工により NADP<sup>+</sup>-ICDH 活性を増大させることで、*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<sup>+</sup>-ICDH とクエン酸生産との関係を代謝工学的に検証している。クエン酸生産条件下で培養した *icdA* 高発現株は *A. niger* WU-2223L に比べ NADP<sup>+</sup>-ICDH 比活性が 4.78 倍に増加し、さらに、クエン酸生産量、グルコース消費量はそれぞれ 18.7%、10.5% 減少していることを確認している。以上の結果は、NADP<sup>+</sup>-ICDH が TCA 回路における調節点の 1 つであり、NADP<sup>+</sup>-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明らかにしている。クエン酸生産機構を代謝工学的に考察する上で重要な成果であり、*icdA* が *A. niger* のクエン酸生産を改変するための有効なツールであることを示す有意義な成果である。

第 5 章では、*A. niger* WU-2223L における 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、*A. niger* WU-2223L におけるシュウ酸生産経路を特定している。*A. niger* WU-2223L においては OAH ホモログ遺伝子が複数存在しているが、*oahA* 破壊株では *oahA* の転写と OAH 比活性が完全に消失していた。試験した種々の条件においても *oahA* 破壊株はシュウ酸を生産しなかったことから、*A. niger* WU-2223L におけるシュウ酸の生成は *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ている。*A. niger* によるクエン酸発酵では、シュウ酸は副生物であり生成を抑制する必要がある。第 5 章の研究において、クエン酸高生産株について、OAH ホモログ遺伝子を含めそのシュウ酸生産経路について特定したことは意義深く有用な成果と評価できる。

第 6 章では、第 5 章での成果を利用し、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によって、シュウ酸高生産株を作製している。*A. niger* WU-2223L を宿主とした *oahA* 高発現株 (EOAH-1 株) は *A. niger* WU-2223L に比べ、シュウ酸生産条件において *oahA* の転写量が 3.04 倍、OAH 比活性が 2.47 倍に増加しており、試験した種々の条件において *A. niger* WU-2223L に比べシュウ酸生産量が増加していることを明らかにしている。さらに EOAH-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、そのシュウ酸生産量は 28.9 g/L (対消費グルコース収率 96%) に達しており、シュウ酸高生産株の作製に成功している。以上より、単一の遺伝子 *oahA* の高発現により高収率かつ高収量でシュウ酸の生産を可能にし、このようなシュウ酸高生産株の創製に成功した本成果は、生物化学の観点からも独創的かつ有意義な内容と高く評価できる。

第7章では、クエン酸生産糸状菌 *A. niger* WU-2223L においてグルコース代謝の改変に基づくシュウ酸生産量の増大を目的とした、シアン非感受性呼吸系酵素 alternative oxidase 遺伝子 (*aox1*) の利用について検討している。*aox1* を高発現させることにより、グルコース代謝における物質代謝の割合を増大させ、シュウ酸生産量を増大させるとの独創的な発想に基づく計画である。まず、*A. niger* WU-2223L を宿主として *aox1* 高発現株 EAOX-1 株が作製された。EAOX-1 株の OAH 比活性は WU-2223L と同程度であるが、当該高発現株を利用することで 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 のシュウ酸生産に成功している。呼吸系酵素遺伝子を利用して糖代謝を改変し、*A. niger* におけるシュウ酸生産量を改変可能なことを示した例は皆無で、本研究が初の成功例である。また、本研究で達成したシュウ酸生産量 (44.2 g/L) と炭素基準の変換効率 (98%) は世界最高値である。*aox1* が *A. niger* においてシュウ酸等の有機酸の生産量の増大に有効なツールであることを明示した本章の成果は、生化学の基礎と応用の両面にわたる優れた内容であり、極めて高く評価できる。

第8章では、本研究を総括している。

以上のように、本論文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る酵素や代謝経路の機能や関連性を明らかにしている。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 *A. niger* における有機酸生産の改変、すなわち実用的なシュウ酸生産菌の創製などに成功しており、工業微生物である *A. niger* の育種に新規な途を拓いた本博士論文の成果は工学的に極めて意義深い。さらに、*oahA* や *aox1* などの単一の遺伝子の高発現により代謝改変が可能で、シュウ酸やクエン酸等の有機酸生産量が増減可能なことを実証したことは、応用化学の分野における基礎と応用の両面にわたる新規かつ創造的な成果として高く評価できる。よって本論文を博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。

2014 年 2 月

審査員

(主査) 早稲田大学教授	工学博士 (早稲田大学)	桐村	光太郎
早稲田大学教授	工学博士 (早稲田大学)	木野	邦器
早稲田大学教授	工学博士 (早稲田大学)	西出	宏之