

# 芳香族化合物の発酵生産を目的としたクエン酸生産糸状菌の代謝工学

服部 貴澄

(早稲田大学 産学官研究推進センター)

## 研究の目的

クエン酸生産糸状菌として知られる *Aspergillus niger* は、糖蜜やデンプン糖化液などの糖質原料を利用してクエン酸を高収率で生産するため、工業的な発酵生産に広く使用されている。クエン酸の世界的生産量は 2010 年では年間 160 万トンに達し、工業的な発酵生産の中では最大級のものとなっている (1)。一方、医薬品、化成品原料等の広範な用途を有する芳香族化合物の工業生産には石油系原料が使用されているが、低炭素社会の構築の観点から再生可能な資源からの生産が望まれている。そこで、本研究では、クエン酸生産糸状菌の生理学的機能を活用し、芳香族化合物の発酵生産プロセス構築に向けて検討を行った。

## 方法

III 型 polyketide synthase (PKS) およびそのホモログとして *Aspergillus oryzae* RIB40 および *A. niger* NRRL328 よりそれぞれ AB206758 (*csyA*) (2) および XM\_001390843 (*An-csyA*) の cDNA 断片を RT-PCR 法にてクローニングした。組換え PKS の生産は、宿主として大腸菌 BL21 (DE3) を、ベクターとして pET-21a(+)(メルク製)を使用し、得られた形質転換株を 16°C で 16 時間培養することによって行った。*A. niger* の組換えには、クエン酸高生産株 *A. niger* WU-2223L 由来の *pyrG* 変異株を宿主として、ベクター pNAN8142 (3) および *pyrG* 遺伝子断片をマーカーとして使用し、プロトプラスト-PEG 法にて形質転換を行った。クエン酸生産糸状菌の培養は、既報の方法に従った (4)。

PKS の反応は、50 mM  $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$  緩衝液 (pH7.0) 中に精製 PKS 125 mg/l、0.3 mM 開始基質、0.7 mM マロニル CoA を溶解し、30°C にて 16 時間行った。

代謝産物および反応生成物は、上清の塩酸酸性酢酸エチル抽出液を乾燥固化し、メタノールに再溶解後、HPLC にて分析した。カラムには、ODS-100V (東ソー製)、検出は PDA (SPD-M20A, 島津製作所製) および ESI-IT-MS (LCQ-Deca, サーマフィッシャー製) を使用した。

菌体内代謝産物のメタボローム解析は、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社に委託した。

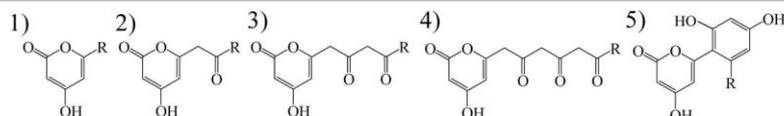
## 結果

本研究では、芳香族化合物合成に関連する鍵酵素として PKS を利用した (Fig. 1)。とくに、クエン酸生産糸状菌での発現を想定し、ゲノム解析にて見出された III 型 PKS 遺伝子の cDNA をクローニングした。*An-CsyA* のアミノ酸配列は、III 型 PKS の活性中心および構造を保存していた (Fig. 2)。大腸菌において生産した組換え *An-CsyA* に対し、開始基質として炭素数 2~20 の脂肪酸アシル CoA、伸長基質としてマロニル CoA を用



Table 1. Polyketides synthesized by reactions with An-CsyA

Starter substrate	Side chain	Triketide pyrone <sup>1)</sup>	Tetraketide pyrone <sup>2)</sup>	Pentaketide pyrone <sup>3)</sup>	Hexaketide pyrone
Acetyl-CoA	R=CH <sub>3</sub>	+	+	-	-
Acetoacetyl-CoA	R=CH <sub>3</sub>	+	+	-	-
Malonyl-CoA	R=CH <sub>3</sub>	+	+	-	-
Methylmalonyl-CoA	R=CH(CH <sub>3</sub> )COOH	+	-	-	-
Isobutyryl-CoA	R=CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	+	+	-	-
Benzoyl-CoA	R=C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	+	+	-	-
Butyryl-CoA	R=(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	+	-	-	-
Hexanoyl-CoA	R=(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	+	+	-	-
Octanoyl-CoA	R=(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	+	+	-	-
Decanoyl-CoA	R=(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> CH <sub>3</sub>	+	+	+	+ <sup>4)</sup>
Lauroyl-CoA	R=(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> CH <sub>3</sub>	+	+	+	+ <sup>4),5)</sup>
Myristoyl-CoA	R=(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> CH <sub>3</sub>	-	-	-	-



クエン酸生産条件下で7日間培養した *A. niger* WU-2223L についてメタボローム解析を行ったところ、前駆体の一つであるアセチル CoA は約 0.3 nmol/(g-wet cell) 検出された。しかし、マロニル CoA は検出されなかった。以上の結果より、マロニル CoA の供給不足により、ポリケタイドの蓄積に至らないことが考えられる。

## 結論

本研究により、クエン酸生産系状菌 *A. niger* より見出された III 型 PKS は、アセチル CoA (C2) からラウロイル CoA (C12) を開始基質として、2回から5回の縮合反応を繰り返すことにより、ピロン型ポリケタイドを生産することを明らかにした。クエン酸生産系状菌における当該酵素遺伝子の単純な高発現株においては、培養上清への顕著なポリケタイドの蓄積は見られなかった。

ピロン型のポリケタイドは、芳香族化合物の前駆体となることから有用と考えられる。そこで、現在、代謝工学的な改変によるポリケタイド生産に向けて、宿主となるクエン酸生産系状菌におけるアシル CoA の供給量を増大させることを検討している。

## 文献

1. Kirimura, K., Honda, Y., and Hattori, T. (2011) Citric Acid, p. 135-142. In Moo-Young, M., Butler, M., Webb, C., Moreira, A., Grodzinski, B., Cui, Z. F., and Agathos, S. (eds.), Comprehensive Biotechnology, 2nd ed. Elsevier
2. Seshime, Y., Juvvadi, P. R., Kitamoto, K., Ebizuka, Y., Nonaka, T., and Fujii, I. (2010) *Aspergillus oryzae* type III polyketide synthase CsyA is involved in the biosynthesis of 3,5-dihydroxybenzoic acid. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**: 4785-4788
3. Minetoki, T., Kumagai, C., Gomi, K., Kitamoto, K., and Takahashi, K. (1998) Improvement of promoter activity by the introduction of multiple copies of the conserved region III sequence, involved in the efficient expression of *Aspergillus oryzae* amylase-encoding genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**: 459-467
4. Hattori, T., Kino, K., and Kirimura, K. (2009) Regulation of alternative oxidase at the

transcription stage in *Aspergillus niger* under the conditions of citric acid production. *Curr. Microbiol.* **58**: 321-325

5. Hansen, C. A., and Frost, J. W. (2002) Deoxygenation of polyhydroxybenzenes: an alternative strategy for the benzene-free synthesis of aromatic chemicals. *J. Am. Chem. Soc.* **124**: 5926-5927