

# NADPH産生に着目したペントースリン酸経路の代謝強化による 麴菌の脂質生産性の向上

玉野 孝一

国立研究開発法人産業技術総合研究所

## 研究の目的

地球上の化石燃料の需要の増加に伴い、植物成分を原料に生産されるバイオ燃料は、カーボンニュートラルの点で地球環境に及ぼす影響が低いことから、その必要性が高まっている。そこで、物質の分解と合成の能力に優れた麴菌を用いて、グルコースからバイオディーゼル燃料の原料となる脂肪酸などの脂質を大量生産する技術を、遺伝子組換えにより開発してきた<sup>1)</sup>。本研究では、脂質生合成に必要な NADPH が、麴菌の通常の代謝では脂質の大量生産に十分な量で産生されていないという実験データに基づき、NADPH を産生するペントースリン酸経路を代謝工学的手法で強化して、NADPH 量を増加させることにより、麴菌の脂質の生産性を高めることを目的とする。

## 方法

麴菌のペントースリン酸経路を構成する酵素遺伝子の各高発現株は、それらの遺伝子のプロモーターを構成的に発現量が高い *tef1* 遺伝子のプロモーター (*Ptef1*) に遺伝子組換えで置き換えることで構築した。この構築に当り、宿主には麴菌 *pyrG* 欠損型 *faaA* 破壊株 ( $\Delta faaA\_pyrG$ -) を用いた。また、プロモーター置換のための DNA 断片は、KOD-PLUS (東洋紡) を用いた fusion PCR により、1kb 長の対象遺伝子の 5'-UTR 断片・*pyrG* 選択マーカー・1,028 bp 長の *Ptef1*・1kb 長の対象遺伝子の開始コドンから始まる断片の順に連結した形で、作製した。 $\Delta faaA\_pyrG$ -株に当該 DNA 断片を導入後、生育した形質転換体を純化した。各高発現株の構築は PCR により確認した。各高発現株は 10% グルコースを含むツァペックドックス最少液体培地 50 ml で 30°C, 200 rpm, 120 時間培養し、生育菌体は回収後に 100 ml のミリ Q 水で 2 回洗浄した。凍結乾燥後、50 mg の乾燥菌体をビーズ破砕機 MS-100 (トミー精工) で破砕し、クロロホルムで菌体内遊離脂肪酸を抽出した。クロロホルムを揮発後、遊離脂肪酸の沈殿を 6% トリトン X-100/6% エタノール混合液に溶かし、そのうちの 5  $\mu$ l を用いて遊離脂肪酸ハーフマイクロテストキット (ロシユ) により菌体内遊離脂肪酸量を測定した。

## 結果

これまでの麴菌の代謝工学的手法による代謝改変の結果、アシル CoA 合成酵素遺伝子 *faaA* の破壊株 ( $\Delta faaA$ ) では遊離脂肪酸生産性が野生株の 9.2 倍に増大することを見出した<sup>2)</sup>。そこで、この  $\Delta faaA$  でさらに生産性を向上させるために、脂肪酸生合成に必

要な NADPH の産生系であるペントースリン酸経路に注目した。麴菌の一般的な代謝における全ゲノムトランスクリプトーム解析の結果、NADPH 合成量は脂質生産を最大化させる上で不十分であることが推察された。そこで、ペントースリン酸経路を強化するために、当経路の各酵素遺伝子を *faaA* 破壊株で高発現させることを考えた。

麴菌のペントースリン酸経路で働くと考えられる酵素遺伝子は、麴菌ゲノムスケール代謝モデルに関する論文<sup>3)</sup>、および酵母で同定された当経路の酵素遺伝子に対する BLASTP を用いた相同性検索結果を参照して選出した。選出した遺伝子を図 1 内のリストに記した。

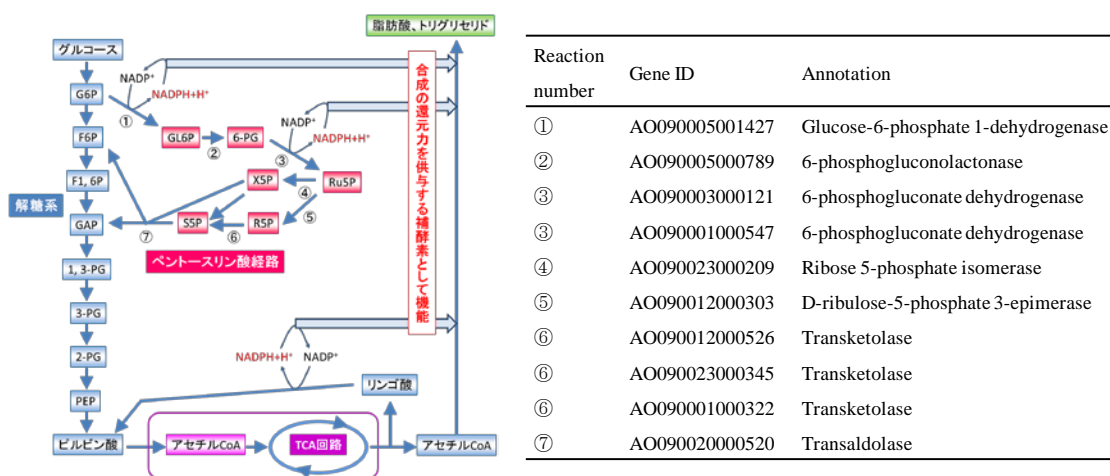


図 1 細胞質における NADPH 産生の代謝イラスト (左)、ペントースリン酸経路で働くと考えられた麴菌の酵素遺伝子リスト (右)

これらの選出酵素遺伝子の各高発現株を、 $\Delta faaA\_pyrG$ -を親株に用いて構築した。その結果、トランスケトラーゼをコードすると予測された AO090023000345 を高発現させると、遊離脂肪酸生産性が  $\Delta faaA$  の 1.4 倍に増大することが認められた (図 2A)。また、培養後の全菌体の乾燥菌体重量で菌体収量を比較した。その結果、この AO090023000345 高発現 *faaA* 破壊株 ( $\Delta faaA\_tktOE$ ) は、 $\Delta faaA$  に比べて菌体収量が 1.2 倍に増大していることが確認された。したがって、単位培養液量当たりの遊離脂肪酸の生産量は、両増大比の積算値に当たる 1.7 倍に増大した (図 2B)。

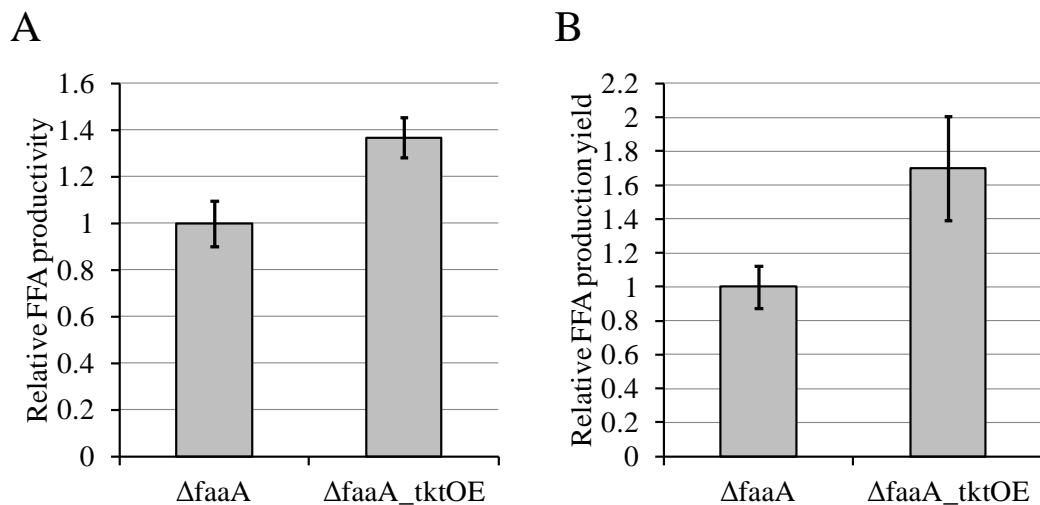


図2 AO090023000345 高発現化による遊離脂肪酸の生産性 (A)

および単位培養液量当りの生産量 (B) の変化

興味深いことに、 $\Delta faaA$  は液体培養で菌糸の凝集体を形成するのに対し、 $\Delta faaA\_tktOE$  は凝集体を形成せずに菌糸が分散した状態となった (図3)。



図3 麹菌 *faaA* 破壊株 (左) と AO090023000345 高発現 *faaA* 破壊株 (右) の液体培養菌体の写真

一方、ペントースリン酸経路の他の酵素をコードすると予測された遺伝子の高発現化は、いずれも遊離脂肪酸生産性を増大させなかった。加えて、AO090023000345 以外にも麹菌でトランスケトラーゼをコードすると予測された遺伝子は2個あったが、それらの高発現化も遊離脂肪酸生産性を増大させなかった。

ペントースリン酸経路と共に、TCA 回路から発生するリンゴ酸をピルビン酸に変換するリンゴ酸酵素反応も NADPH を生成する。このリンゴ酸酵素をコードすると考えられる2遺伝子 (AO090011000876, AO090038000621) の各高発現株を、 $\Delta faaA\_pyrG$ -を親株として構築した。しかし、遊離脂肪酸生産性は  $\Delta faaA$  から向上しなかった。

## 結論

麹菌 *faaA* 破壊株において、ペントースリン酸経路のトランスケトラーゼをコードす

ると予測された AO090023000345 の高発現化が、遊離脂肪酸生産性を 1.4 倍に増大させた。さらに、生産性だけでなく、菌体収量も 1.2 倍に増大した。その結果、単位培養液量当たりの遊離脂肪酸生産量は 1.7 倍に増大した。一方で、NADPH 産生に直接関与する、グルコース 6 リン酸脱水素酵素、6 ホスホグルコン酸脱水素酵素、およびリンゴ酸酵素の各予測遺伝子の高発現化は *faaA* 破壊株において遊離脂肪酸生産性の増大に寄与しなかった。

## 文献

- 1) Tamano, K. *et al.* (2013) Increased production of fatty acids and triglycerides in *Aspergillus oryzae* by enhancing expressions of fatty acid synthesis-related genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 269-281.
- 2) Tamano, K. *et al.* (2015) Increased production of free fatty acids in *Aspergillus oryzae* by disruption of a predicted acyl-CoA synthetase gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**: 3103-3113.
- 3) Vongsangnak, W., Olsen, P., Hansen, K., Krogsgaard, S., and Nielsen, J. (2008) Improved annotation through genome-scale metabolic modeling of *Aspergillus oryzae*. *BMC Genomics* **23**: 245.