

# バイオプロダクション

研究代表者 桐村 光太郎  
(先進理工学部 応用化学科 教授)

## 1. 研究課題

バイオテクノロジーは 21 世紀の基盤技術であり、とくに環境負荷低減型のプロセスにより選択的に有用物質生産を行うために必要不可欠な要素技術として認識されている。本プロジェクトは、資源循環型社会の構築に資する新規なバイオテクノロジーによるものづくりを基礎と応用の両面からの研究展開により構築することを目的としている。より具体的には、有用物質生産を支える技術として、圧倒的に高い生産効率を示す「スーパー生体触媒」さらにはマイクロ生産工場といえる「細胞型反応装置（セルファクトリ）」の開発を軸に、再生可能資源である植物系バイオマスからの有用物質生産技術体系の構築を図る。

## 2. 主な研究成果

- (1) 「細胞型反応装置（セルファクトリ）」の構築を目的としたクエン酸生産系状菌のミトコンドリア局在型クエン酸輸送体遺伝子の機能解析

クエン酸は柑橘類の主要な酸味成分であり、食品や飲料の添加物等、幅広く利用される有用な化合物である。世界的なクエン酸の年間の需要は 210 万トンに達し（2017 年）、その工業的生産は糸状菌 *Aspergillus niger*（クロコウジカビ）を利用した発酵生産によって行われている。*A. niger* のクエン酸生産機構については多くの研究が進められてきたが、未だ不明な部分が残されている。とくに、*A. niger* の細胞内部で合成されたクエン酸が細胞外へ排出されるまでの過程に関わるクエン酸の輸送系については、詳細な検討がなされていない。クエン酸の輸送経路を解明することで、*A. niger* の有機酸輸送体に関する新たな知見を提供し、かつ有機酸輸送体の改変によりさらなるクエン酸生産の高効率化が期待される。また、マイクロ生産工場といえる「細胞型反応装置（セルファクトリ）」における輸送体利用に関わる知見を得ることも期待できる。そこで、本研究では、クエン酸生産系状菌 *A. niger* におけるクエン酸輸送体遺伝子の機能解明を目的として、クエン酸輸送体遺伝子破壊株の表現型の解析を行った。

ゲノム解析株である *A. niger* CBS 513.88 において、ミトコンドリア局在型のカルボン酸輸送体として 13 種類の輸送体遺伝子の存在が確認されている。高クエン酸生産系状菌 *A. niger* WU-2223L において、クエン酸生産条件下で転写が確認された輸送体ホモログ遺伝子は 8 種類であり、クエン酸を基質として輸送する輸送体遺伝子は *ctpA*、*cocA* の 2 種であった。これら 2 種の輸送体遺伝子について、クエン酸生産条件下における転写量の経時変化を測定した。2 種類のクエン酸輸送体遺伝子のうち、*ctpA* の転写量は培養 3 日目から 7 日目までは大きな変化はなく、培養 9 日目以降に約 50% 減少することを確認した。一方で、*cocA* の転写量は、培養 12 日間を通してほぼ一定の値を維持していた。

クエン酸輸送体遺伝子 *ctpA* 破壊株 DCTPA-1 と *cocA* 破壊株 DCOCA-1 について、クエン酸生産条件下の生育を乾燥菌体重量で評価した。DCTPA-1 株は培養初期に宿主と比較して乾燥菌体重量の減少が確認されたが、培養後期には DCTPA-1 の乾燥菌体重量は宿主とほぼ同値となった。一方、DCOCA-1 株では、培養全期間を通して、乾燥菌体重量は宿主とほぼ同様の挙動を示した。以上より、*ctpA* がコードする輸送体 CTPA は培養初期の生育に強く寄与する可能性が示唆される。これは、*ctpA* が培養初期の方が転写されていた事実とも一致する内容である。一方で、DCOCA-1 株は宿主と比較して生育には大きな変化が見られなかったことから、クエン酸を基質とする輸送体であっても細胞内で CTPA と COCA では果たす役割の相違が示唆された。

DCTPA-1 と DCOCA-1 株をクエン酸生産条件下で培養し、グルコース消費量とクエン酸生産量の評価を行った。DCTPA-1 株では、培養 3 日目までにクエン酸生産量が最大 38.9%減少したが、培養 12 日目のクエン酸生産量は宿主である WU-2223L 株とほぼ同値であった。一方、DCOCA-1 株では、培養 12 日目のクエン酸生産量は宿主である WU-2223L 株が 63.4 g/L であるのに対し、DCOCA-1 株は 34.7 g/L となり、宿主と比較して 46.7%減少した。

以上より、*ctpA* がコードする輸送体 CTPA は培養初期の細胞内クエン酸輸送に強く寄与し、一方で *cocA* がコードする輸送体 COCA は、培養後期に行われるクエン酸の大量生産に強く寄与する輸送体と考えられる。本報告は、*cocA* とその遺伝子産物（タンパク質）が *A. niger* による実質的なクエン酸生産に寄与していることを明快に示す最初の成果である。本成果は、有機酸発酵すなわち微生物による有機酸生産に重要な知見を提供するものとする。

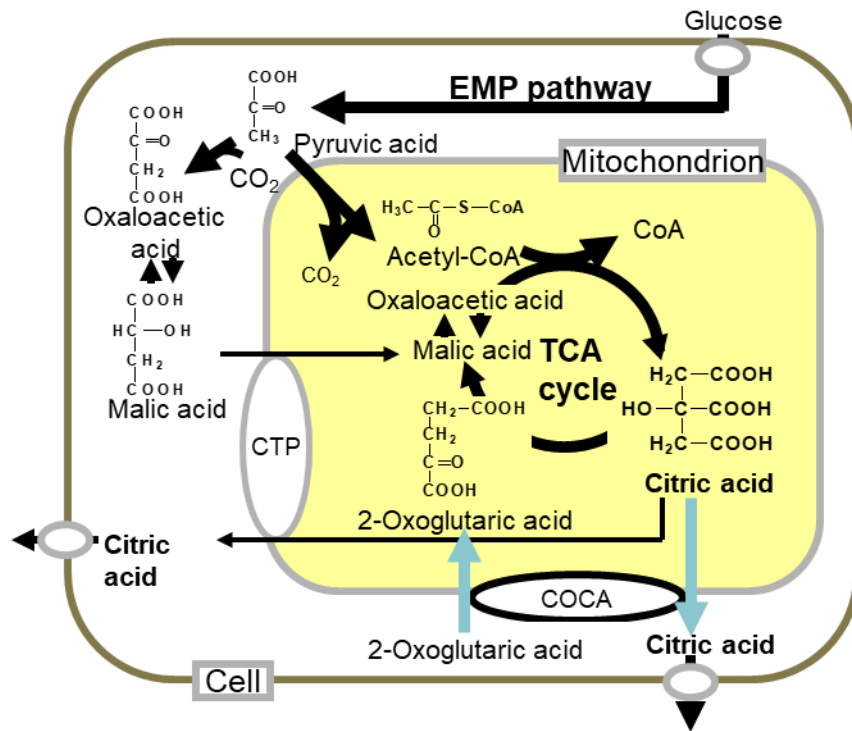


図1 *A. niger* の代謝経路

## (2) 可逆的脱炭酸酵素の機能改変による「スーパー生体触媒」の開発

現行のサリチル酸類生産の工業的製法では、金属を触媒として高温高压条件下でフェノール類に二酸化炭素を反応させる Kolbe-Schmitt 反応が利用されている。しかし、副生成物を伴うなど環境負荷低減のために改善すべき点も多く、代替法が求められている。我々は、新規な可逆的脱炭酸酵素として salicylate decarboxylase (EC 4.1.1.91、以下 Sdc と略) を世界で初めて発見し、Sdc によるフェノールからサリチル酸への「酵素的 Kolbe-Schmitt 反応」が可能であることを示した。さらに、これまでに改変型 Sdc を作製し酵素的諸性質の検討を行った。本研究では、「スーパー生体触媒」の開発を目的として、酵素活性中心近傍以外の場所への変異導入による改変型酵素での基質特異性の拡大に関して検討した。

Sdc は 40 kDa の単一サブユニット 4 量体から成る酵素で、すでに数種の基質を使用して酵素的諸性質や速度論的パラメータ ( $k_{cat}$  や  $K_m$  値等) を決定している。また、1050 bp から成る遺伝子を同定し、大腸菌を宿主とした高発現にも成功している。さらに、データベースに登録された情報を基盤として Sdc のモデリング (SWISS-MODEL 等による推定立体構造) を構築し、活性中心近傍や基質入り口付近のアミノ酸に対して部位特異的変異導入を行うことで、酵素活性の向上や基質特異性の拡大などを達成した。そこで、本研究では、より有用な改変型 Sdc の作製を目的として、部位特異的変異により基質および生成物の流入口を拡大した種々の改変型 Sdc を作製し、医薬中間体や機能性高分子モノマーとしての用途がある 3-メチルサリチル酸の合成について検討した (図 2 参照)。

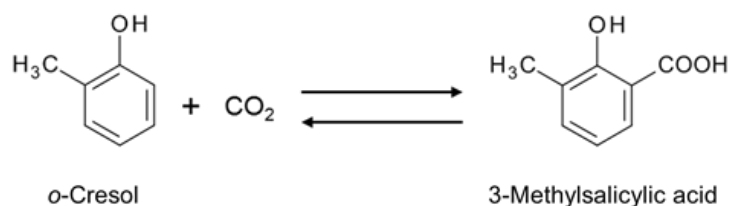


図 2 o-クレゾールから 3-メチルサリチル酸の合成

Sdc の基質が活性中心へ到達する前の段階で通る流入口に位置すると考えられた 23 番目のリジン残基に部位特異的変異を導入することとした。部位特異的変異導入の妥当性を評価するため、23 番目のリジン残基について、側鎖の小さいアミノ酸としてグリシンおよびアラニンに置換した K23G-Sdc および K23A-Sdc、嵩高いアミノ酸としてトリプトファンに置換した K23W-Sdc の構造について SWISS-MODEL を用いて推定した。予想した設計通り、Sdc と比較すると基質の入口と考えられる構造が K23G-Sdc および K23A-Sdc において拡張されており、一方 K23W-Sdc では基質入口が狭くなっていることを確認した (図 3 参照)。本来の基質であるサリチル酸に対する脱炭酸化性の比活性を評価すると、K23G-Sdc、K23A-Sdc および K23W-Sdc ではそれぞれ野生型 Sdc の 0.6 倍、1.6 倍および 0.05 倍であった。さらに、野生型 Sdc、K23G-Sdc および K23A-Sdc について、3-メチルサリチル酸に対する脱炭酸活性および o-クレゾールに対する炭酸固定活性を評価した。改変型酵素 K23G-Sdc および K23A-Sdc の脱炭酸活性は、それぞれ野生型 Sdc の 8.6 倍および 5.8 倍であった。一方、野生型 Sdc では o-クレゾールに対する 3-メチルサリチル酸の合成活性は検出されなかったが、改変型酵素 K23G-Sdc および K23A-Sdc においては o-クレゾールに対する 3-メチルサリチル酸の合成活性が検出された。以上より、従来の活性中心近傍への部位特異的変異導入ではなく、全く発想が異なる「基質の流入口の拡張による Sdc の機能改変」に成功した。また、本研究を通じて、

Sdc に関する基質特異性の拡大について成功例を提示しえたものと考えている。

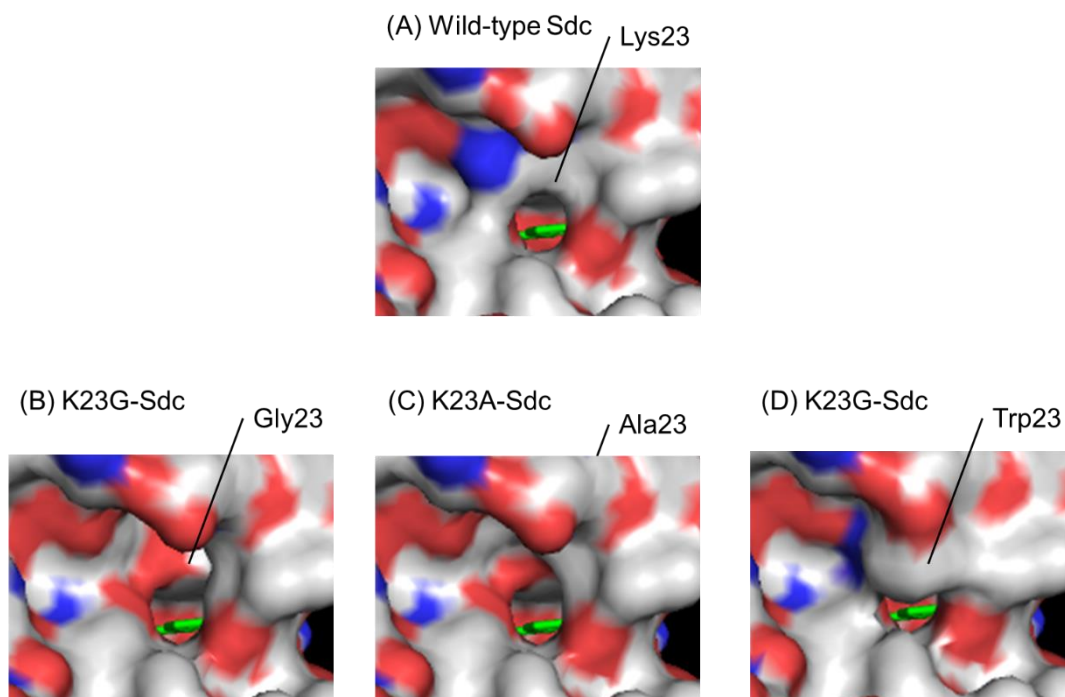


図3 Sdc および改変酵素の基質入り口付近の立体構造

### 3. 共同研究者

木野 邦器 (先進理工学部・応用化学科・教授)

石井 義孝 (理工学研究所・バイオプロダクション研究プロジェクト・招聘研究員)

### 4. 研究業績

#### 4.1 学術論文

- (1) Decrease of citric acid produced by *Aspergillus niger* through disruption of the gene encoding a putative mitochondrial citrate-oxoglutarate shuttle protein, K. Kirimura, K. Kobayashi, I. Yoshioka, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press (2019).
- (2) Expanding Substrate Specificity of Salicylate Decarboxylase by Site-directed Mutagenesis for Expansion of the Entrance Region Connecting to the Substrate Access Tunnel, K. Kirimura, M. Araki, M. Ishihara, Y. Ishii, *Chem. Lett.*, 48(1), 58 - 61 (2019).

#### 4.2 総説・著書

- (1) Citric acid, bio-based chemicals, chapter 11, In: Murray MY, ed., *Comprehensive Biotechnology* (3<sup>rd</sup> ed.), K. Kirimura, and I. Yoshioka, in press, Elsevier, London (2019).
- (2) Gluconic and itaconic acids, bio-based chemicals, chapter 12, In: Murray MY, ed., *Comprehensive Biotechnology* (3<sup>rd</sup> ed.), K. Kirimura, and I. Yoshioka, in press, Elsevier, London (2019).

### 4.3 招待講演

### 4.4 受賞・表彰

### 4.5 学会および社会的活動

- (1) 基質流入口の拡大によるサリチル酸脱炭酸酵素の基質特異性の拡張, 飯塚恭平, 石原真奈, 荒木優大, 石井義孝, 桐村光太郎, 日本農芸化学会 2019 年度大会(東京)講演要旨集 1D7p09, 2019 年 3 月
- (2) 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生菌体による *Aspergillus niger* クエン酸発酵液からの *trans*-アコニット酸生産, 吉岡育哲, 小田祐之亮, 滝口有沙, 桐村光太郎, 日本農芸化学会 2019 年度大会 (東京) 講演要旨集 1D7p08, 2019 年 3 月
- (3) *Aspergillus niger* 菌糸を利用したシアン非感受性呼吸系阻害剤の探索, 松浦貴大, 吉岡育哲, 桐村光太郎, 日本農芸化学会 2019 年度大会 (東京) 講演要旨集 1C1a11, 2019 年 3 月
- (4) *Pseudomonas citronellolis* LA18T 株由来レブリン CoA 合成酵素の解析, 羽部 浩, 佐藤由也, 小池英明, 飯村洋介, 堀 知行, 菅野 学, 木村信忠, 桐村光太郎, 日本農芸化学会 2019 年度大会 (東京) 講演要旨集 1D7a10, 2019 年 3 月
- (5) *Xanthomonas campestris* WU-9701 由来のグルコース転移酵素を利用した alkyl  $\alpha$ -glucosides の選択的生産, 渡邊 理沙, 恩田 裕, 中里 美穂, 石井 義孝, 桐村 光太郎, 第 70 回日本生物工学会大会 (大阪) 講演要旨集 2Mp10, 2018 年 9 月
- (6) *Pseudomonas* 属細菌におけるアコニット酸イソメラーゼの構成的生産, 滝口 有沙, 小田 祐之亮, 吉岡 育哲, 桐村 光太郎, 第 70 回日本生物工学会大会 (大阪) 講演要旨集 2Mp09, 2018 年 9 月
- (7) 部位特異的変異導入により改変したサリチル酸脱炭酸酵素によるメチルサリチル酸の生成, 石原 真奈, 荒木 優大, 石井 義孝, 桐村 光太郎, 第 70 回日本生物工学会大会 (大阪) 講演要旨集 2Lp01, 2018 年 9 月

## 5. 研究活動の課題と展望

本研究では、クエン酸生産系状菌における輸送体遺伝子の機能解析を行い、クエン酸大量生産時期において重要となる輸送体を特定した。今後はクエン酸生産の向上に向けた当該輸送体の利用や、他の有機酸生産関わる輸送体についても解析を行う。

可逆的脱炭酸酵素の機能改変による「スーパー生体触媒」の開発については、立体構造モデリングを駆使して活性向上に有効な変異箇所をさらに選定し、多重変異導入した「超」優良型の改変型 Sdc を作製する。