

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糸状菌によるシュウ酸生産への呼吸経路の影響の解析

糸状菌 *Aspergillus niger* (クロコウジカビ) は、クエン酸やシュウ酸などの有機酸の高生産微生物である。*A. niger* は、チトクロム経路に加えて、alternative oxidase (EC 1.10.3.11; AOX) から成るシアン化物 (CN) 非感受性の呼吸経路を有している。当研究室では、CN 非感受性の呼吸経路は、*A. niger* による高濃度の炭水化物からの高クエン酸生産の基礎となるメカニズムに重要な役割を果たすことを明らかにしている (K. Kirimura, *et al.*, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1299-1202 (1987))。継続的な解糖系の進行には NAD^+ が必要であるため、著量の炭水化物代謝から生成される大量の NADH を継続的に再酸化することが不可欠である。しかし、種々の真核生物における NADH の酸化および ATP の生成の主要なシステムであるチトクロム経路 (CN 感受性呼吸経路) は、酸化リン酸化によって ATP を生成する。細胞内で過剰な濃度の ATP は解糖系を阻害する。一方、CN 非感受性呼吸経路は、ATP を生成せずに NADH を再酸化するため、*A. niger* の解糖系の継続的な進行に寄与している。当研究室では、CN 非感受性呼吸の阻害がクエン酸の生産性を著しく低下させる一方で、より高い AOX 活性となる培養条件が *A. niger* のグルコース消費とクエン酸生産を増加させることを報告している (K. Kirimura, *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 2034-2039 (2000))。すなわち、グルコース代謝の観点からは、AOX をコードする遺伝子 *aoxA* の発現が *A. niger* による効率的なクエン酸生産に寄与することを示している。換言すれば、AOX とその遺伝子 *aoxA* は、炭水化物基質からクエン酸および種々の有機酸を生産するための代謝工学における重要なツールとなることが期待される。

本研究では、クエン酸回路 (TCA 回路) の中間体を経由して生産されるシュウ酸生産をモデルとして *aoxA* の過剰発現の影響を検討し、*A. niger* の呼吸経路の改変によるさらなる有機酸生産の高効率化を検討した。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)」における呼吸経路の利用に関わる知見を得ることも目的とした (図 1 参照)。本研究では、*aoxA* 遺伝子を利用して効率的なシュウ酸生産株、すなわちシュウ酸生産セルファクトリの創製に成功した。

aoxA 遺伝子高発現カセットの染色体 DNA への組み込みにより、*aoxA* 過剰発現株 EAOX-1 を作製した。*aoxA* と *oahA* の両方を共発現する形質転換体 EAOXOAH-1 株は、EAOX-1 株に *oahA* を保持するプラスミド pPANEAOH-1 を導入することにより作製した。また、*oahA* のみを高発現する形質転換体 EAOH-1 株は、原株 WU-2223L に pNANOAH-1 を導入することにより作製した。

無細胞抽出液の OAH 活性を測定することにより、EAOXOAH-1 株の *oahA* 過剰発現を確認した。EAOXOAH-1 株における OAH の比活性 (6.14×10^2 U/mg タンパク質) は、WU-2223L の比活性よりも 4.12 倍 (1.49×10^2 U/mg タンパク質) に高かった。以上の成果は、EAOXOAH-1 株における *oahA* の過剰発現を明確に示している。*A. niger* WU-2223L および組換え体の各 CN 非感受性呼吸活性 (すなわち、AOX による呼吸活性) は、クラーク電極を用いてチトクロム経路の阻害剤である $10 \mu\text{M}$ アンチマイシン A 添加条件下で測定した。WU-2223L 株、EAOX-1 株、および EAOXOAH-1 株の CN 非感受性呼吸活性は、それぞれ 0.92、2.35、2.14 nmol O_2 /min/mg-乾燥菌糸であった。したがって、EAOX-1 株および EAOXOAH-1 株における *aoxA* の過剰発現も確認した。

つぎに、*A. niger* WU-2223L および組換え体のシュウ酸生産について検討した。EAOH-1 株は 9 日で 28 g/L のシュウ酸を生産したが、EAOXOAH-1 株は 7 日で 28 g/L を生産した。EAOX-1 株は 20 g/L のシュウ酸しか生産しなかったが、7 日間で 30 g/L のグルコースを完全に消費した。一方、EAOH-1 株は 9 日間で同量のグルコースを完全に消費した。さらに、WU-2223L 株は、12 日間で 30 g/L のグルコースを消費し、EAOX-1 株とほぼ同じ量の 21 g/L のシュウ酸を生産した。これらの結果は、シュウ酸の生産期間が *aoxA* の過剰発現により、9 日間 (EAOH-1) から 7 日間 (EAOXOAH-1) に大幅に短縮されたことを明確に示している。

以上より、AOX 遺伝子である *aoxA* の過剰発現によるグルコース代謝能力の改変により、短期間でシュウ酸生産を可能にする効率的なシュウ酸高生産 *A. niger* 株の創製に成功した。本成果は、糖質を利用した効率的な有機酸生産のための代謝工学における強力なツールとしての AOX 遺伝子の潜在的な価値に関する重要な知見を提供するものと考えている。

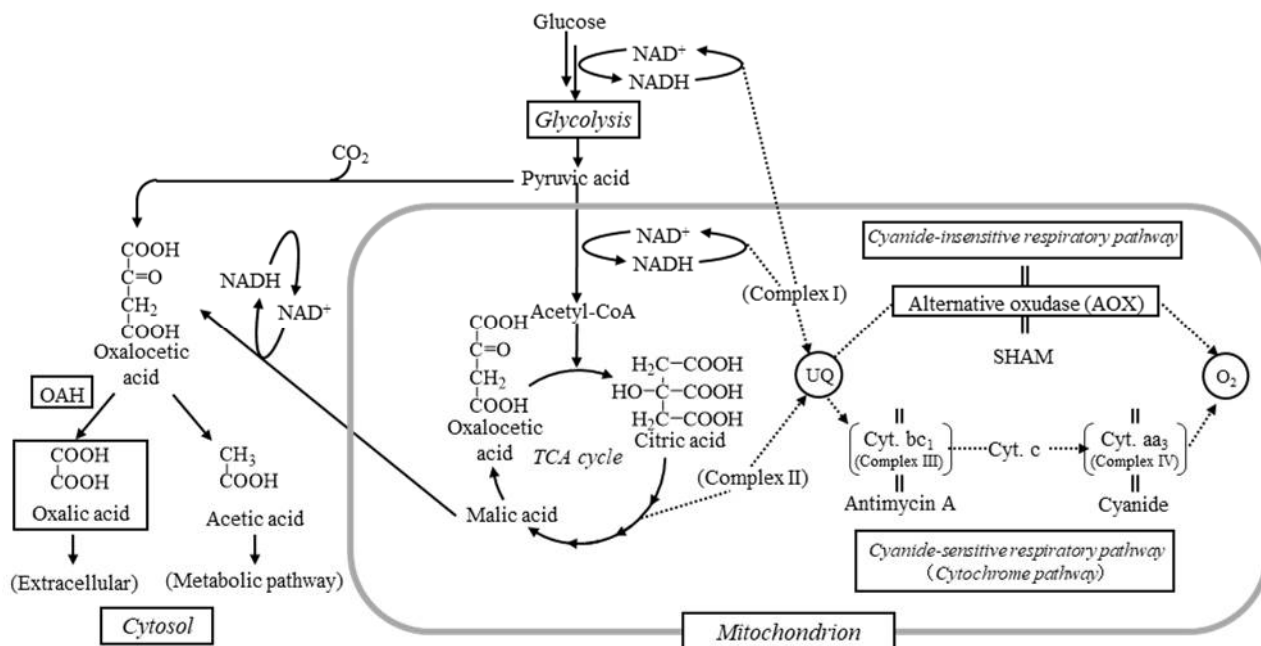


図1 *A. niger* のシュウ酸生産に関する代謝経路と呼吸経路

(2) 「スーパー生体触媒」の開発に向けた糖転移酵素の結晶構造解析

Xanthomonas campestris WU-9701 由来グルコース転移酵素 XgtA (EC 3.2.1.20) は、マルトースを糖供与体の基質とし、アルコール性、フェノール性のヒドロキシ基をもつ糖受容体の基質に対して選択的に α -グルコシル化を行い、配糖体合成を可能とする (図2参照)。また、普遍的な α -glucosidase と異なり、XgtA は糖類に対するグルコース転移反応を触媒せず、オリゴ糖を副生しない特長がある。この特長を利用し、これまでに XgtA を用いて 1-menthol や hydroquinone の α -D-glucopyranoside を選択的に合成することに成功している (H. Nakagawa, *et al.*, J. Biosci. Bioeng., **89**, 138-144 (2000)、他)。本研究では、XgtA の稀有な特長と更なる機能改変による「スーパー生体触媒」の開発を目的として、XgtA の結晶構造解析を行った。

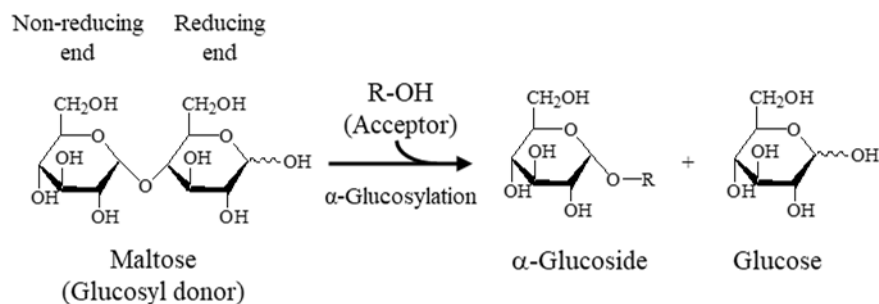


図2 XgtA による糖転移反応

大腸菌を用いて調製した組換え XgtA について、蒸気拡散法のひとつであるハンギングドロップ法で結晶化を行い、ソーキング法による基質との複合体結晶を取得した。基質としてマルトースとヒドロキノンを含有したソーキング溶液に浸漬させた XgtA 結晶を用いて得られた回折像を基に結晶構造解析を行った。XgtA の結晶構造を、 1.72\AA の高解像度で決定することに成功した。XgtA の空間群は $P 22_1 2_1$ であり、結晶結合長さは、 $a=73.07\text{\AA}$, $b=83.48\text{\AA}$, $c=180.79\text{\AA}$ で、結合角度は、 90° , 90° , 90° と推測した。XgtA は、GH13 ファミリータンパク質のドメイン構成を保存し、メインの触媒ドメイン A、ループリッチドメイン B、および 2 つの逆平行 β シートによって形成される高度に保存されたドメイン C で構成されていた (図3 (a)参照)。既に構造の決定している GH13 ファミリーに属する α -グルコシダーゼである GSJ (PDB entry 2ze0) や HaG (PDB entry 3wy1) に比べて、 $\beta \rightarrow \alpha$ loop 4 と呼ばれるアミノ酸残基 201-246 に位置するループの構造に大きな相違点を見出した (図3 (b)参照)。さらに、このループ構造の B-factor は、周辺の領域に比べて高く、フレキシブルな構造を有していると考えられる。

XgtA の *Fo-Fc* 電子密度マップにおいて、活性中心と考えられている Asp201、Glu270 および Asp331 の近傍に大きな電子密度が存在した。GH13 ファミリーに属する α -グルコシダーゼ HaG やスクロースイソメラーゼ MutB の酵素基質複合体の結晶構造と比較し、この電子密度と HaG の基質であるマルトースの非還元末端側のグルコース部位および MutB の基質であるスクロースのグルコース部位の位置は一致した。以上より、この電子密度は XgtA の基質であるマルトースの非還元末端のものと考えられる (図4 (a)参照)。また、上述の $\beta \rightarrow \alpha$ loop 4 は、本電子密度と基質流入口の間に存在し、基質流入口には水分子が存在する。XgtA は疎水性の糖受容体を基質として取り込むが、水分子との置換が困難な疎水性基質を活性中心へ導くための十分な空間は存在しない (図4 (b)参照)。したがって、疎水性基質の取り込みには、 $\beta \rightarrow \alpha$ loop 4 の可動性が重要と考えられる。

既知の GH13 ファミリーに属する α -グルコシダーゼと比較して、XgtA は基質特異性や糖転移活性

に関する特長を有しているが、その構造の違いは主に $\beta \rightarrow \alpha$ loop 4 と近傍のアミノ酸配列と考えることができる。前述のように、 $\beta \rightarrow \alpha$ loop 4 は、基質流入口を制限している構造を有しているが、一方でフレキシブルな構造を有すると考えられる。以上を通して、XgtA の糖受容体を規定する基質特異性や糖転移活性に関わる特長には、主に $\beta \rightarrow \alpha$ loop 4 が大きく関与していることが示唆された。

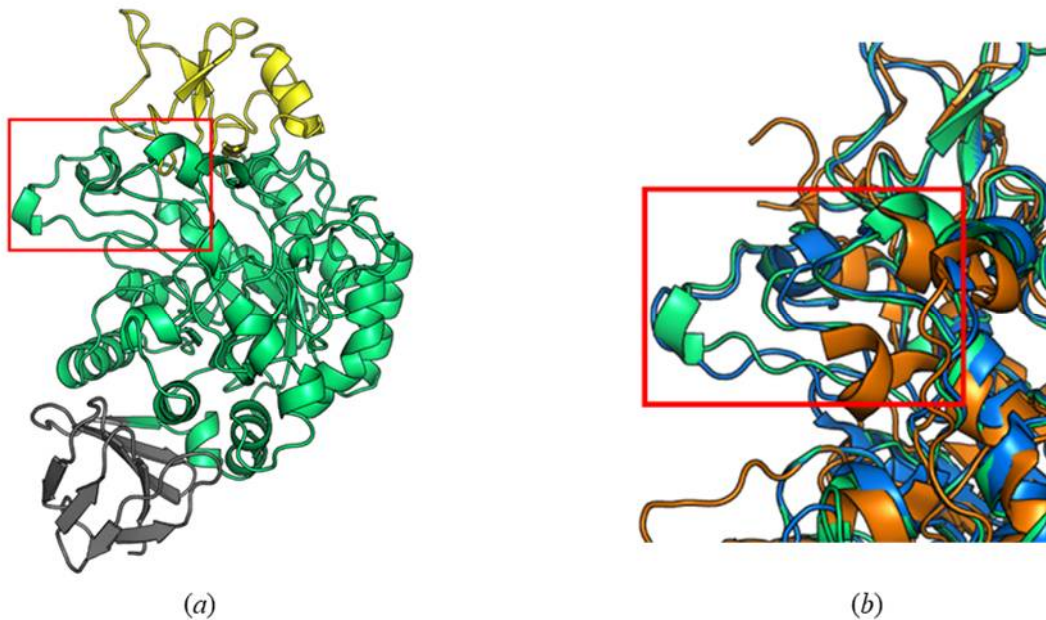


図3 XgtA の全体構造 (a) と GH13 ファミリーに属する酵素との比較 (b)
 (a), 緑;ドメインA, 黄;ドメインB, 黒;ドメインC, (b), 緑;XgtA, 青;HaG, 橙;GSJ

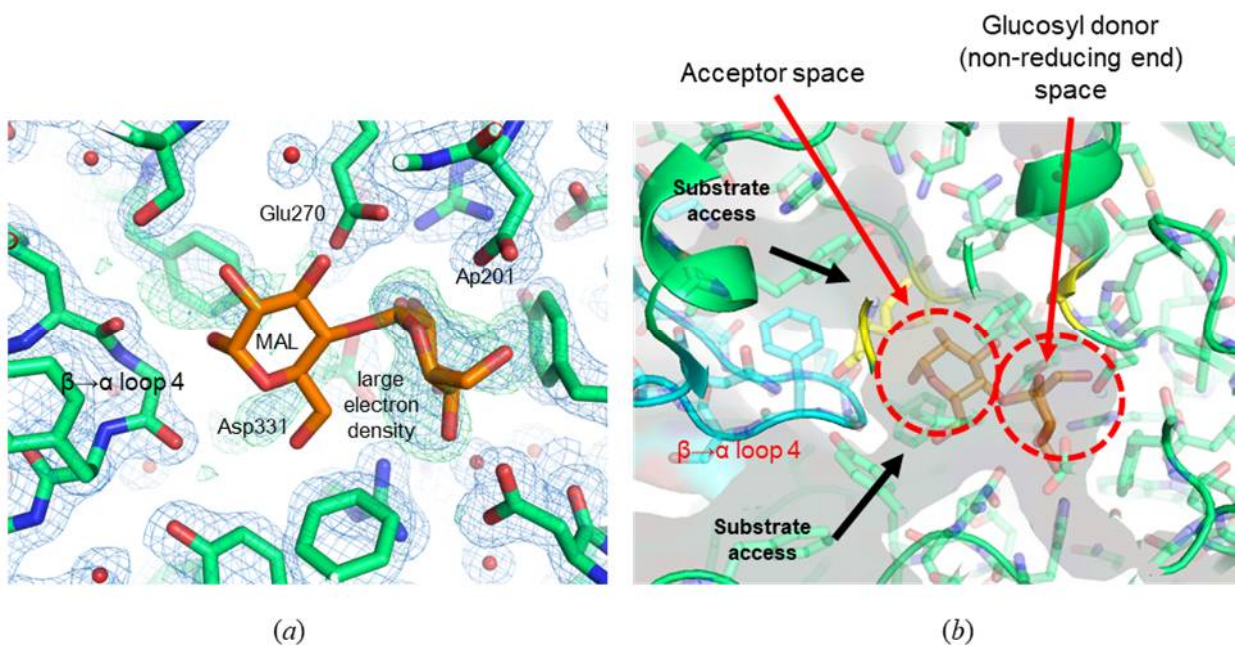


図4 活性中心付近の構造と基質
 (a) *Fo-Fc* 電子密度マップ、(b) 基質流入口と活性中心近傍の構造
 橙;マルトース分子、HaG-マルトース酵素基質複合体のマルトース分子をインポーズ

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) Crystal structure of α -glucosyl transfer enzyme XgtA from *Xanthomonas campestris* WU-9701, R. Watanabe, Y. Arimura, Y. Ishii, K. Kirimura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press (2020); doi: 10.1016/j.bbrc.2020.03.109.
- (2) Overexpression of the gene encoding alternative oxidase for enhanced glucose consumption in oxalic acid producing *Aspergillus niger* expressing oxaloacetate hydrolase gene, I. Yoshioka, K. Kobayashi, K. Kirimura, *J. Biosci. Bioeng.*, **129**(2), 172-176 (2020)
- (3) 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.*, **83**(8), 1538-1546 (2019).

4.2 総説・著書

なし

4.3 招待講演

なし

4.4 受賞・表彰

なし

4.5 学会および社会的活動

- (1) クエン酸生産系状菌 *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*) WU-2223L を宿主とした CRISPR/Cas9 システムによる高効率かつ迅速な遺伝子置換, 吉岡育哲, 桐村光太郎, 日本農芸化学会 2020 年度大会 (福岡) 講演要旨集 3A08a09, 2020 年 3 月
- (2) タンパク質データベースを利用した *in silico* 解析による新規アコニット酸イソメラーゼの探索と活性の検出, 小田祐之亮, 滝口有沙, 吉岡育哲, 桐村光太郎, 日本農芸化学会 2020 年度大会 (福岡) 講演要旨集 4A11a15, 2020 年 3 月
- (3) *Xanthomonas campestris* WU-9701 由来グルコース転移酵素 XgtA の結晶構造解析, 渡邊理沙, 有村泰宏, 曹偉, 石井義孝, 桐村光太郎, 日本農芸化学会 2020 年度大会 (福岡) 講演要旨集 3C03p02, 2020 年 3 月
- (4) *Aspergillus niger* NRRL328 由来 III 型 PKS An-CsyA を利用した新規ポリケチドの合成, 飯塚恭平, 佐伯詩歩, 石井義孝, 桐村光太郎, 日本化学会第 100 回春季大会 (千葉) 講演要旨集 2PC-158, 2020 年 3 月
- (5) 代謝産物解析と遺伝子解析によるクエン酸生産系状菌のカビ毒非生産性の検証, 大越佳乃, 吉岡育哲, 中川博之, 桐村光太郎, 第 71 回日本生物工学会大会 (岡山) 講演要旨集 1Gp15p, 2019

年 8 月

- (6) クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*)WU-2223L における CRISPR/Cas9 システムを用いたハイスループット遺伝子ノックアウト法の構築, 吉岡育哲, 脇本紗梨, 桐村光太郎, 第 71 回日本生物工学会大会 (岡山) 講演要旨集 1Gp16p, 2019 年 08 月
- (7) アコニット酸イソメラーゼ遺伝子とクエン酸輸送体遺伝子を共発現させた大腸菌生細胞によるクエン酸からの *trans*-アコニット酸の生産, 小田祐之亮, 吉岡育哲, 滝口有沙, 桐村光太郎, 第 71 回日本生物工学会大会 (岡山) 講演要旨集 2Ca08p, 2019 年 8 月
- (8) *Ochrobactrum* sp. WU-1502 を利用したレブリン酸からの 2-オキシグルタル酸の生成, 大浦智之, 斎藤慎太郎, 吉岡育哲, 羽部浩, 桐村光太郎, 第 71 回日本生物工学会大会 (岡山) 講演要旨集 2Ca09p, 2019 年 8 月
- (9) α -1, 3-glucanase を含む溶菌酵素溶液を利用した *Aspergillus tubingensis* (*A. niger*)からのプロトプラスト形成, 石原真奈, 楊俐聡, 吉岡育哲, 桐村光太郎, 第 71 回日本生物工学会大会 (岡山) 講演要旨集 2Bp02p, 2019 年 8 月

5. 研究活動の課題と展望

本研究では、クエン酸生産糸状菌におけるシアン化物非感受性の呼吸経路であるオルタナティブオキシダーゼの過剰発現を行い、シュウ酸の生産性向上を達成し、クエン酸以外の有機酸にも呼吸経路の機能改変が有効であることを明らかにした。また、これまでの3年間の研究において、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。今後の展望として、これらの成果を有効活用するとともに、さらなる呼吸経路ならびに輸送体の解析を継続することで、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)」の開発を行う。

一方、「スーパー生体触媒」の開発を目指し、今年度は稀有な特長を有するグルコース転移酵素 XgtA の結晶構造解析を行い、類縁の GH13 ファミリーに属する α -グルコシダーゼとの比較から XgtA に特徴的な構造を解析した。また、これまでの3年間の研究において、可逆的脱炭酸酵素 Sdc の立体構造モデリングを駆使して、基質流入口の改変による基質特異性の拡張という機能向上を達成している。今後は、これら酵素の結晶構造解析を基にした活性中心や基質流入口付近の有効な変異箇所を選定し、多重変異導入した「スーパー生体触媒」の開発を行う。