

## 短 報

組換え麹菌 *Aspergillus oryzae* によるイタコン酸生産山田智士<sup>1)</sup>, 倉地裕子<sup>2)</sup>, 金政 真<sup>2,3)</sup><sup>1)</sup>中部大学大学院応用生物学研究科, <sup>2)</sup>中部大学応用生物学部環境生物科学科, <sup>3)</sup>中部大学生物機能開発研究所

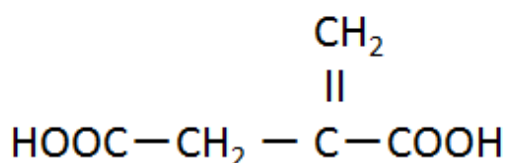
## 要 旨

イタコン酸は、合成樹脂など工業製品の原料として利用されている有機酸である。工業的には生産速度の観点から主に *Aspergillus terreus* が使用されている。本菌において、イタコン酸はブドウ糖を原料とし、解糖系を経てクエン酸回路にて生成するシス・アコニット酸から、シス・アコニット酸デカルボキシラーゼ(CAD)により合成される。本研究では、古くから醸造に用いられてきた麹菌 *A. oryzae* にて、*A. terreus* 由来 CAD をコードする *CAD1* 遺伝子を異種発現させることにより、安全なイタコン酸生産系の開発を試みた。糸状菌用の *CAD1* 遺伝子発現ベクターを本菌に導入して CAD の発現を確認した。麹菌の野生株はイタコン酸を生産しなかったのに対し、組換え菌は 0.18mg/mL のイタコン酸を生産した。本研究は、イタコン酸生産性麹菌の分子育種に初めて成功したものである。

## 1. はじめに

イタコン酸(メチレンコハク酸)は分子中に二つのカルボン酸を有し、合成樹脂や接着剤、コート紙、印刷インキなど工業製品の原料として幅広く利用されている重要な有機酸である(図 1)。数種の真菌類がイタコン酸を生産するが、工業的には生産速度の観点から主に糸状菌(カビ)の一種である *Aspergillus terreus* が使用されている(Kinoshita, 1932)。イタコン酸の生物学的意義はいくつか提唱されているものの未解明である。我々は、これまでに本菌のイタコン酸の生産や生合成経路とその制御について研究を行ってきた。本菌でイタコン酸は、ブドウ糖を出発物質とし、解糖系を経てクエン酸回路にて生成するシス・アコニット酸から、シス・アコニット酸デカルボキシラーゼ(CAD)により合成されることを CAD をコード

する *CAD1* 遺伝子を解析することで明らかにした(Dwiarthi *et al.*, 2002, Kanamasa, *et al.*, 2008)。本菌を用いたイタコン酸生産については 2011 年発行の本紀要にて解説したが、特にイタコン酸生合成経路における CAD の位置関係については代謝マップを参照頂きたい(金政, 2011, 図 3)。さらに、液体培養と固体培養のそれぞれ有する利点を取り入れた膜面液体培養法による効率的なイタコン酸生産にも成功し、2017 年発行の本紀要にて報告した(小田ら, 2017)。しかし、本菌には生育速度が比較的遅い、株によっては日和見感染症の原因になるといった弱点がある。一方、同じ *Aspergillus* 属糸状菌である麹菌 *A. oryzae* は生育速度が速く、古くから清酒などの醸造に使用されており極めて安全性が高いが、イタコン酸生産性を有さない。そこで本研究では、*CAD1* 遺伝子を *A. oryzae* に導入して過剰発現させることにより、イタコン酸の生産性 *A. oryzae* の分子育種を試みた。



分子量 130.1

図1. イタコン酸の構造

## 2. 材料と方法

## 2. 1. 菌株および培地

発現ベクターの構築には大腸菌 DH5  $\alpha$  を用いた。発現用宿主として、硝酸還元酵素遺伝子(*niaD*)の

機能を失った硝酸要求性株である *A. oryzae* niaD300 株を使用した。この株に *niaD* 遺伝子を選択マーカー遺伝子として有するベクターを導入することにより、硝酸塩を窒素源とする最少培地にて遺伝子組換え菌株を選択した。この株を培養するための最少培地の窒素源として、3 g/L の硝酸アンモニウムを用い、ベクター導入株の選択には 3 g/L の硝酸ナトリウムを用いた。炭素源は 20 g/L のグルコースを用いた。20 mL の培地を 100mL 坂口フラスコに入れた。微量塩類等、最少培地のその他の培地成分および菌の扱いは Kanamasa, *et al.*, 2001 に従った。培地は pH 5.0 に調整し、30°C で培養した。

## 2. 2. *CAD1* 遺伝子発現ベクターの構築と遺伝子導入

糸状菌用発現ベクターは、大関(株)により開発された pNENU2512 を用いた。本ベクターは、*A. oryzae* 由来  $\alpha$ -グルコシダーゼの遺伝子プロモーターに存在する転写促進に関わる 2 つのシス・エレメントの組み合わせである Region III 配列を 12 コピー繰り返した構築物をエノラーゼ遺伝子プロモーターに挿入した改良プロモーターである (Minetoki *et al.*, 1998, Tsuboi *et al.*, 2005)。また選択マーカーとして *niaD* 遺伝子が用いられている。PCR 法により、*A. terreus* IFO6365 株のゲノムを鋳型として *CAD1* 遺伝子を増幅した。フォワードプライマー：5'-AGCTTGTCGACTCGAGATGACCAAACAATCTGCGGACAGCAACGC-3' およびリバースプライマー：5'-CTAGAGCATGCTCGAGTTATACCAGTGGCGATTTCACGGGGC-3' を用いて、98°C 10 秒、60°C 15 秒、68°C 2 分を 30 サイクルの条件で反応を行った。得られた目的の反応産物をアガロースゲル電気泳動で分離し、精製した。pNENU2512 を制限酵素 *XhoI* で処理してクローニングサイトで切断し、この DNA 断片と PCR 法により増幅した *CAD1* 遺伝子を含む DNA 断片を In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ) により結合させて pNENU-CAD を得た。大腸菌の遺伝子組み換え実験は常法で行った。

本プラスミドをプロトプラスト-PEG 法 (Kanamasa, *et al.*, 2001) により *A. oryzae* niaD300 株に導入した。形質転換体のゲノムを鋳型として、フォワードプライマー：

5'-CTGGCCCCACGGATCGGCAAAGCAATC-3' およびリバースプライマー：5'-CAGCAGCTCCAGCAATGGGCTAATGTCGG-3' を用いて上記条件で PCR 法を行うことで遺伝子導入を確認した。また、CAD 活性を測定することで導入した *CAD1* 遺伝子の発現を確認した。得られた *CAD1* 遺伝子発現株を CAD 株とした。一方、pNENU2512 を niaD300 株に導入してコントロール株を作製した。

## 2. 3. イタコン酸定量と CAD 活性測定

採取した試料は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) でイタコン酸生産量を測定した (Okabe, *et al.*, 1993)。細胞からの粗酵素の抽出および CAD の活性測定は Bentley らの方法を基にして著者らが過去に行った方法 (Kanamasa *et al.*, 2008) に従った。タンパク質濃度はプロテインアッセイキット (ナカライテスク) を用いて測定した。

## 3. 結果と考察

### 3. 1. *CAD1* 遺伝子発現 *A. oryzae* (CAD 株) の構築

*CAD1* 遺伝子高発現ベクター pNENU-CAD を構築し、*A. oryzae* niaD300 株に導入して硝酸塩を単一窒素源として加えた培地にて形質転換体を選択した。得られた形質転換体の純化を行い、単コロニー化した。PCR 法により遺伝子導入を確認した (データは掲載せず)。液体培養した菌体を回収して細胞内の CAD 活性を測定したところ、CAD 株においては 446 U/mg タンパク質であったが、コントロール株においては検出限界値以下であった。このことから、導入した *CAD1* 遺伝子の発現が確認できた。これまでの我々の研究でコーン・スティープ・リカーを炭素源として培養した *A. oryzae* の培養液には極めて少量ながらイタコン酸が存在することを確認している (データは掲載せず)。しかし、今回用いた最少培地の培養条件では *A. oryzae* の内在性の CAD 活性は認められず、次に述べるようにイタコン酸生産についても認められなかった (図 2)。このことから、今回の培養条件は遺伝子組み換えが菌の表現型に与える影響を調べるために好都合であった。

### 3. 2. CAD 株によるイタコン酸生産

CAD 株を培養し、イタコン酸生産性を調べた。培地には、*CAD1* 遺伝子導入の影響を明確に評価するため、生産性に優れた天然物エキスをを用いた栄養培地ではなく最少液体培地を選んだ。*A. terreus* では詳細なメカニズムは未解明であるが、pH2 付近で培養することでイタコン酸生産が盛んになり、菌体の生育にも大きな支障がないことが知られている。この知見に基づき、本研究においても pH2.0 に調製した培地を用いてコントロール株および CAD 株を培養したが、生育が極めて遅かった（データは掲載せず）。そこで培養の初期 pH は *A. oryzae* の培養に実績のある pH5.0 とした。最少液体培地にコントロール株および CAD 株を植え、培養 3 日から 24 時間ごとにサンプリングし、18 日間培養した。その結果、コントロール株ではイタコン酸の生産が認められなかったが、CAD 株ではイタコン酸の生産が認められた（図 2）。これらの結果は、前述の CAD 活性の結果とも矛盾しない。培養液のイタコン酸の濃度は培養 16 日で最大の 0.18mg/ml に達した。

また、CAD 株の生育がコントロール株と比べて若干生育が遅いことが観察された（データは掲載せず）。これは CAD 株では *CAD1* 遺伝子が高発現したことにより、炭素代謝物の一部がイタコン酸の生産に利用され、エネルギー代謝や他の生体成分の生合成が減少したからであると考えられた。

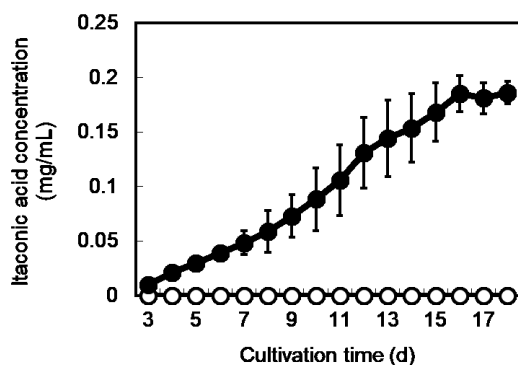


図2. 組換え菌によるイタコン酸生産の経時変化

○のシンボルはコントロール株，●のシンボルは CAD 株の培養液のイタコン酸濃度を示す。

この報文は、麹菌 *A. oryzae* に *A. terreus* 由来 *CAD1* 遺伝子を導入して異種発現させることにより、本来イタコン酸生産性の極めて低い *A. oryzae* にてイタコン酸を生産させたことを初めて報告したものである。本研究では栄養要求を選択マーカーとした遺伝子組換え実験であることから、イタコン酸生産性を評価するための培養にも最少培地を用いた。今後、培地組成を含む培養条件の検討を行うことで、CAD 株によるイタコン酸生産条件の最適化を行い、現状の 3 倍以上に生産性を向上させることで *A. terreus* 野生株の生産性に近づけ、工業的に検討可能な段階に達することを目指している。

### 引用文献

- Bentley, R., Thiessen, C.P. (1955) *Cis*-aconitic decarboxylase. *Science* 122, 330.
- Dwiarti, L., Yamane, K., Yamatani, H., Kahar, P., Okabe, M. (2002) Purification and characterization of *cis*-aconitic acid decarboxylase from *Aspergillus terreus* TN484-M1. *J. Biosci. Bioeng.* 94, 29–33.
- 小田美穂, 小栗萌, 金政真 (2017) 糸状菌の膜面液体培養法による高効率イタコン酸生産法の研究. 中部大学生物機能開発研究所紀要 17, 90–93.
- Kanamasa, S., Takada, G., Kawaguchi, T., Sumitani, J., Arai, M. (2001) Overexpression and purification of *Aspergillus aculeatus*  $\beta$ -mannosidase and analysis of the integrated gene in *Aspergillus oryzae*. *J. Biosci. Bioeng.* 92, 131–137.
- Kanamasa, S., Dwiarti, L., Okabe, M., Park, E.Y. (2008) Cloning and functional characterization of the *cis*-aconitic acid decarboxylase (CAD) gene from *Aspergillus terreus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 223–229.
- 金政 真 (2011) 糸状菌を用いたイタコン酸の生産. 中部大学生物機能開発研究所紀要 11, 38–42.

Kinoshita, K. (1932) Über die Produktion von Itaconsäure und Mannit durch einen neuen Schimmelpilz *Aspergillus itaconicus*. *Acta Phytochim.* 5, 271–287.

Minetoki, T., Kumagai, C., Gomi, K., Kitamoto, K., 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. Microbial. Biotechnol.* 50, 459–467.

Okabe, M., Ohta, N., Park, Y. (1993) Itaconic acid production in an air-lift bioreactor using a modified draft tube. *J. Ferment. Bioeng.* 76, 117–122.

Tsuboi, H., Koda, A., Toda, T., Minetoki, T., Hirosune, M., Machida, M. (2005) Improvement of the *Aspergillus oryzae* enolase promoter (P-*enoA*) by the introduction of *cis*-element repeats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 206–208.

**Title** : Production of itaconic acid by recombinant *Aspergillus oryzae*

**Author(s)** : Satoshi Yamada, Yuko Kurachi, Shin Kanamasa

**Address(es)** : Department of Environmental Biology, College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University

**Keywords** : *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae*, itaconic acid, *cis*-aconitic acid decarboxylase