

P-041

大腸菌由来アセチル-CoA カルボキシラーゼを用いたマロニル-CoA の増産

○首藤 誉史¹, 長南 茂²

¹茨城大・院農, ²茨城大・農

E-mail: 15am207t@vc.ibaraki.ac.jp

【目的】 コエンザイム A (CoA) はアシル基のキャリアとして機能する補酵素で、パントテン酸から 5 段階の酵素反応で生合成される。初発反応を触媒するパントテン酸キナーゼ (CoaA) は鍵酵素となっており、*Pseudomonas putida* 由来 CoaA (*PpCoaA*) で *Escherichia coli* の CoA 生合成経路が効率よく強化されることが、当研究室のこれまでの研究から明らかにされている。今回は CoA 生合成経路を強化した *E. coli* の細胞内アセチル-CoA をアセチル-CoA カルボキシラーゼ (Acc) を用いて脂肪酸合成やポリケチド合成の基質となるマロニル-CoA へ変換することを試みた。

【方法】 *E. coli* からプロモーター領域を含む Acc の 4 つのサブユニット遺伝子 (*accABCD*) を PCR で増幅し、単独あるいは複数組み合わせで pUC118 を用いて Acc の発現プラスミドを構築した。得られた各プラスミドを *PpCoaA* 発現プラスミドと共に *E. coli* DH5 α に形質転換し、5mM パントテン酸および 2% グルコースを含む M9Y 培地で 30℃、24 時間振とう培養した。形質転換体の細胞内アセチル-CoA、マロニル-CoA、および CoA はアシル-CoA サイクリング法で定量した。

【結果および考察】 pUC118 に *accA*、*accBC*、*accABC*、あるいは *accBCD* を持つ形質転換体の生育は Acc 遺伝子を保持しない対照菌とほぼ同じであったが、*accD* の形質転換体では生育が悪く、カルボキシルトランスフェラーゼ サブユニットである *accAD* および全サブユニットである *accABCD* の保持菌にいたっては全く生育しなかった。これらの現象は細胞内の Acc 活性とアセチル-CoA レベルが関係していると考えられた。生育した形質転換体の細胞内 CoA レベルを解析した結果、Acc サブユニットの発現によるアセチル-CoA からマロニル-CoA の変換が観察された。マロニル-CoA/アセチル-CoA を比較すると、対照菌では 0.776 であったのに対し、*accA* では 1.27、*accBC* では 2.16、*accD* で 1.04、*accABC* では 1.29、*accBCD* では 0.873 となった。本研究から、*PpCoaA* によって増大した細胞内アセチル-CoA をマロニル-CoA へ変換するには Acc サブユニットの共発現は有効であることが示された。