

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：84307

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05425

研究課題名（和文）コリネ型細菌による転写後制御によるアミノ酸生産への影響

研究課題名（英文）Regulation of amino acid production by post-transcriptional regulation in *Corynebacterium glutamicum*

研究代表者

田中 裕也（Tanaka, Yuya）

公益財団法人地球環境産業技術研究機構・その他部局等・主任研究員

研究者番号：40754247

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：本課題では、コリネ型細菌のRNase発現制御、リジン生合成経路の転写後発現制御および転写後発現制御がリジン生産に及ぼす影響について研究を行った。RNaseの発現制御解析から、主要RNaseと考えられるRNase J、RNase E/GがmRNA分解段階で自己制御されており、また相互にmRNA分解制御を行っていることを示した。

リジン生合成経路の発現は、主にRNase JによりmRNA分解制御を受けており、RNase E/Gの関与は小さかった。リジン生産への影響を調べたところ、RNase J破壊株で生産向上が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、有用工業微生物であるコリネ型細菌の遺伝子発現制御については転写開始制御の研究は幅広く進められてきたものの、転写後制御の知見は少なかった。本研究の結果から、転写後制御の重要因子であるリボヌクレアーゼの発現について様々な知見が得られた。具体的にはRNase J、E/Gは主に自己発現制御機構によって制御されていること、さらにそれぞれのmRNA分解段階で相互制御されていることである。またRNase J破壊株でリジン生産が向上したことから、転写後制御による物質生産能向上という新たなアプローチの可能性を示すことが出来た。

研究成果の概要（英文）：We investigated the regulation of RNase expression, the post-transcriptional regulation of lysine biosynthetic pathway, and the effects of post-transcriptional regulation on lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. We found that both RNase J and RNase E/G are self-regulated at the stage of mRNA degradation. They also mutually regulate gene expression at mRNA degradation. The lysine biosynthetic pathway was mainly regulated by RNase J, and RNase E/G was less involved. As expected from the gene regulation, the RNase J-gene deletion resulted in the improved lysine production.

研究分野：microbiology

キーワード：コリネ型細菌 RNA分解 リジン生合成 Ribonuclease

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

有用工業微生物であるコリネ型細菌はグルタミン酸、リジン等のアミノ酸生産等に広く利用されている菌である。物質生産制御には代謝遺酵素遺伝子の発現コントロールが重要であるが、コリネ型細菌の遺伝子発現制御については転写開始制御の研究は進められていたものの、転写後制御の知見は少い状態であった。また転写後発現制御を物質生産へ応用した例の報告も無い状況であった。そこで転写後制御で重要な役割を果たすリボヌクレアーゼ (RNase) についてコリネ型細菌での遺伝子発現制御機構を明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

転写後制御で重要な RNase の中でも、他の細菌で mRNA 分解に主要な役割をしていることが報告されている RNase J と RNase E/G について遺伝子発現制御機構の解明を目指した。また、RNase J 遺伝子の近傍にはリジン生合成遺伝子が存在しているので、この発現制御について調査。さらに RNase の改変によりリジン生産にどのような影響が出るかを検討。以上の3点を当初の目的とした。

3. 研究の方法

コリネ型細菌の RNase J、RNase E/G の遺伝子改変（遺伝子欠損、酵素活性変異）株を構築し、RNase J、RNase E/G あるいはリジン生合成遺伝子の発現への影響を調べた。遺伝子発現は mRNA については qRT-PCR、またはノーザンブロット法で解析した。タンパク発現は特異的な抗体を作製し、ウエスタンブロッティング法により解析した。mRNA の 5' 末端の位置については 5'-RACE 法により決定した。またリジン生産量については HPLC により分析を行った。

4. 研究成果

リボヌクレアーゼ (RNase) の発現は、転写産物の分解段階で制御される例が大腸菌や枯草菌等で知られている。そこでコリネ型細菌の RNase J、RNase E/G の酵素活性部位に変異を導入し機能欠損株を作製し、それぞれの RNase 発現への影響を調べた。アミノ酸変異株は RNase 遺伝子欠損株と同様の挙動（RNase の標的遺伝子発現パターン変化）を示したことから、機能欠損株が得られたと判断し今後の解析に用いた。RNase J をコードする *rnj* mRNA の発現について RNase 機能欠損の影響を qRT-PCR により検討したところ、野生株と比べ約 10 倍の mRNA 発現が見られた。また RNase E/G 破壊株では約 2 倍の発現上昇が観察された。抗 RNase J 抗体を用いたタンパク発現解析でもそれぞれの RNase 破壊により発現上昇が観察された。

ノーザンブロッティングにより *rnj* mRNA を解析したところ、野生株では 2 本のバンドが得られ、*rnj* 遺伝子を単独で含むものと上流の *dapA* も含む *dapA-rnj* の転写産物であることが判明した。*dapA* はリジン生合成遺伝子であることから、リジン生産と RNase の発現が同時に制御されていることが示唆された。遺伝子破壊の影響を調べると、RNase J 破壊では 2 つの転写産物のどちらも発現増加していた。これに対し、RNase E/G 破壊では *dapA-rnj* 産物は増加したが、*rnj* 単独産物は検出されなくなった。リファンピシンを加えることで新たな転写開始を停止し、残存 mRNA を定量することで mRNA の安定性を検討できる。mRNA 安定性について検討したところ、RNase 破壊株で野生株よりも半減期が増加しており、mRNA 分解が阻害されることで *rnj* mRNA 発現が増加したことが示された。さらに転写産物の 5' 末端を決定する目的で 5' -RACE 解析を行った。その結果、野生株では主な 5' 末端が 2 つ見いだされた。そのうち一つは *dapA* の翻訳開始コドンと一致している (図 1、+1)。もう一つは *dapA* 遺伝子内部 (図 1、+689) であり、*rnj* のみが翻訳される。*rnj* 変異株では野生株で検出された 5' 末端に加えさらに複数の末端が検出された。これらの転写産物末端は RNase J のエキソヌクレアーゼ活性により分解された mRNA 産物と考えられる。*rneG* 破壊株では +1 産物は検出されたが、+689 の末端は検出されなかった。この結果から +689 末端は RNase E/G による切断活性に依存して生成されると考えられる。図 1 に *rnj* 転写産物についてまとめる。以上の結果から、RNase J が自己制御および RNase E/G による mRNA 分解制御を受けていることが判明した。

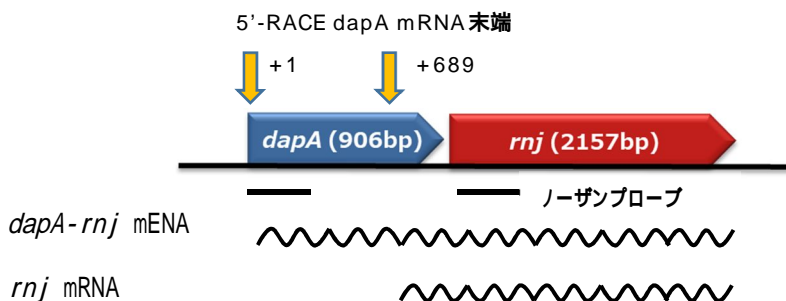


図 1、*rnj* 転写産物

次に様々な培養条件で *rnj* 破壊の影響を検討したところ、低温培養時に *rnj* 破壊株の生育阻害が観察された。そこでコールドショック時の *rnj* mRNA 発現を調べたところ野生株ではコールド

ショック 1 時間後に *rnj* mRNA の発現は約 4 倍上昇し、4 時間後には元の発現レベルに戻るといった一過的な発現上昇が観察された。コールドショック時には *rnj* mRNA の安定性が上昇していたことから、mRNA 安定化により発現が上昇したものと考えられる。*rnj* 変異株では一過的な発現上昇は観察されなかったことから、コールドショックによる制御に RNase J の自己制御が関与することが示唆された。以上の結果から低温ストレスに対応した RNase J の制御機構の存在を明らかにすることが出来た。

RNase E/G についても RNase J と同様に様 RNase 破壊株で解析したところ、RNase E/G も自己制御によって主に制御されていることが判明した。さらに RNase J による制御も確認でき、RNase J と RNase E/G は相互制御を行っていることが判明した。さらに RNase III についても発現制御解析を行ったところ、RNase J、RNase E/G と異なり、自己制御されていないことが判明した。RNase III は RNase J、RNase E/G により分解制御されているが、RNase III はこれらの RNase の発現制御を行っていない。今回の研究結果からコリネ型細菌の RNase は大腸菌や枯草菌とは異なる制御システムにより発現コントロールされていることを示すことが出来た。

リジン生合成遺伝子における RNase J、RNase E/G の影響について、*rnj* とオペロンを形成する *dapA* が RNase J によって転写後制御を受けることを示した。そこで *dapA* 以外のリジン生合成遺伝子群について RNA 分解段階の制御解析を行った。RNase の遺伝子破壊株として *rnj*、*rneG* に加え *rnc*、*rnr*、*rnZ*、*pnp*、*ybeY* を用意し、野生株と比較したところ *rnj*、*rneG* 破壊株でリジン生合成遺伝子群は 2 倍以上の発現上昇が観察された。特に *dapA*、*dapD*、*dapG*、*lysA* の発現は *rnj* 破壊株で 4 倍以上上昇しており、これらは RNase J の標的であると考えられる。*rnj* 破壊がリジン生合成遺伝子群の発現に最も影響を及ぼしたので、*rnj* 破壊がリジン生産に及ぼす影響を調べた。その結果、*rnj* 遺伝子の破壊によりリジン生産が約 1.5 倍に向上した(図 2)。以上の結果から転写後制御を行うことで物質生産向上につながることを示すことが出来た。

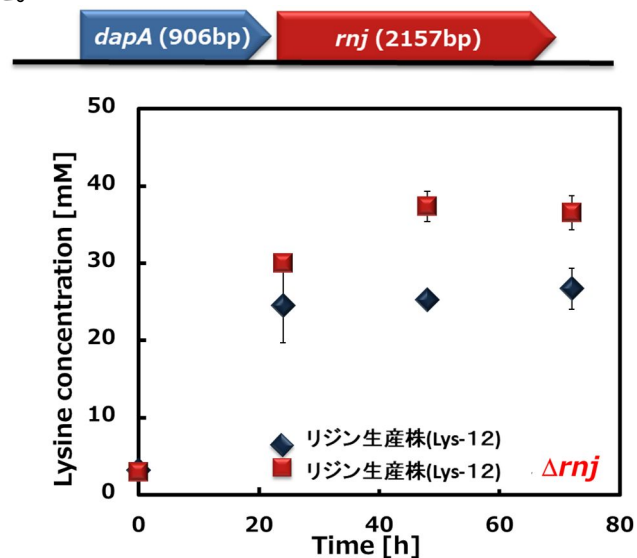


図 2、リジン生産への *rnj* 遺伝子破壊の影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Tanaka Y, Hamamoto N, Sawa M and Inui M. Regulation of Ribonuclease J Expression in *Corynebacterium glutamicum*. J Bacteriol., 査読有、2022 Apr; 204(4): e00053-22.

〔学会発表〕(計 5 件)

岡林寿咲、田中裕也、乾 将行、細菌における RNA 分解酵素コリネ型素によるリジン生合成経路遺伝子の発現制御解析、日本農芸化学会、2022

澤 誠人、田中 裕也、乾 将行、コリネ型細菌における RNase III の発現制御解析、日本農芸化学会、2021

田中裕也、濱本 渚、澤 誠人、乾 将行、コリネ型細菌における RNase J の発現制御

解析、日本農芸化学会、2021

田中裕也、濱本 渚、澤 誠人、乾 将行、低温培養下におけるコリネ型細菌 RNase J の発現制御解析、日本農芸化学会、2020

澤 誠人、田中 裕也、乾 将行、コリネ型細菌における RNase III の発現制御解析、日本農芸化学会、2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanaka Yuya, Nagisa Hamamoto, Masato Sawa, Inui Masayuki	4. 巻 204
2. 論文標題 Regulation of Ribonuclease J Expression in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 :e0005322
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/jb.00053-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡林寿咲、田中裕也、乾 将行
2. 発表標題 コリネ型細菌におけるRNA分解酵素によるリジン生合成経路遺伝子の発現制御解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中裕也、濱本 渚、澤 誠人、乾 将行
2. 発表標題 コリネ型細菌におけるRNase Jの発現制御解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澤 誠人、田中裕也、乾 将行
2. 発表標題 コリネ型細菌におけるRNase IIIの発現制御解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 裕也, 濱本 渚, 澤 誠人, 乾 将行
2. 発表標題 低温培養下におけるコリネ型細菌RNase Jの発現制御解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中裕也, 前田智也, 乾 将行
2. 発表標題 コリネ型細菌におけるトキシン/アンチトキシン系の解析
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------