

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05337

研究課題名（和文）コリネ型細菌のビオチン排出輸送体の同定と発酵への応用

研究課題名（英文）An attempt to isolate potential biotin excretion mutants in *Corynebacterium glutamicum*

研究代表者

池田 正人（Ikeda, Masato）

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：00377649

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：コリネ菌から分子育種したビオチン生産菌でビオチン取り込み系遺伝子（*bioY*）と糖代謝遺伝子（*ppc*）を破壊するとビオチン高濃度要求性となることを見出した。DD1株と命名したこの菌株ではビオチン分泌量は増加する一方、ビオチンの細胞内濃度は低下していた。DD1株から再びビオチン非要求性になったサプレッサー株を多数選抜した。代表2株のゲノムを解析した結果、いずれも原因変異はクエン酸回路を構成するアコニターゼ（*acn*）遺伝子内の異なるミスセンス変異であった。両株とも細胞内のビオチン濃度は低いままのにビオチン要求性を示さないことから、同変異は中央代謝をビオチン非依存にする新規有効変異と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、当初期待した未同定のビオチン排出輸送体“BioE”の欠損変異株を得ることはできなかったが、代わりに新規な糖代謝系変異株を見出した。同株の持つ*acn*変異は中央代謝をビオチン非依存にすると考えられる点で学術的意義を有するだけでなく、広く発酵生産への応用性を秘めている。例えば、リジン発酵など、コリネ菌を用いたアミノ酸生産の工業プロセスでは、その多くが高価なビオチンを多量に要している。これはビオチン酵素であるPYCを活性化するためであるが、コストアップ要因となっている。今回見出した*acn*変異はその解決を図る代替策として有用技術になる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We metabolically engineered naturally biotin-auxotrophic *Corynebacterium glutamicum* into a biotin prototroph. Interestingly, the strain exhibited a biotin-hyperauxotrophic phenotype when the biotin-uptake gene *bioY* and the phosphoenolpyruvate carboxylase gene *ppc* were disrupted. We spontaneously isolated biotin-prototrophic suppressor mutants from the *bioY* and *ppc* double disruptant. Genomic analysis of the two independently isolated mutants identified different missense mutations in the same aconitase gene. The *acn* mutations are considered to be novel useful mutations that allow central metabolism to be biotin-independent because both mutants exhibit the biotin-prototrophic phenotype although their intracellular biotin concentrations remain low.

研究分野：応用微生物学

キーワード：コリネバクテリウム グルタミカム ビオチン排出輸送体 ビオチン取り込み輸送体 アコニターゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) ビオチン(ビタミン B7)は全ての生物種で必須の栄養素である。生合成できるのは一部の微生物や植物だけでヒトや動物は生合成できない。ビオチンは炭酸転移反応に関わり、中央代謝や脂肪酸合成に重要な役割を担う。生体膜や皮膚の形成に欠かせず、不足すると脱毛や皮膚炎など、様々な疾患が起こる。このため、飼料添加物や医薬、食品、化粧品等、広い用途がある。

(2) ビオチンの工業的製法は、原料を石油に依存した多段階の工程から成る化学合成法である。有用な代謝産物でありながら発酵法は確立されていない。過去に大手の企業を中心として生産菌の育種が盛んに行われたが、育種は困難を極め、いずれも研究を中断している。

(3) ビオチンの生合成経路については、この 10 年で解明が進み、大腸菌や枯草菌等の細菌で少なくとも 2 種のルート(BioCH ルートと BioI ルート)が提案されている。取り込み輸送系についても、哺乳類や酵母、細菌等で BioY を含む数タイプが同定されている。

(4) 一方、ビオチンの排出輸送系はいかなる生物でも報告がない。特異的な排出輸送体が存在するののかも明らかでない。しかし、ビオチン要求性のコリネ菌でビオチンの取り込み系を欠損させるとビオチンを取り込めなくなることは、ビオチンの膜を介した取り込み輸送が単純拡散では起こらないことを示唆している。つまり、ビオチンの分泌には何らかの輸送体が関わっていると考えられる。

(5) 我々はコリネ菌が元来有するビオチン要求性を解除することに初めて成功し、ビオチンを発酵生産できるビオチン生産菌を育種している。このビオチン生産菌に不可解な現象を見出した。それは、ビオチン取り込み系遺伝子(*bioY*)と糖代謝遺伝子(*ppc*)を破壊するとビオチンを自ら合成できるにも関わらず生育に高濃度(通常の百倍以上)のビオチンを要求するという現象である。DD1 株と命名したこの菌株は細胞外にビオチンを排出してそれを再回収できないこと(*bioY*破壊効果)とビオチン依存性が高まったこと(*ppc*破壊効果)の相加効果で、高濃度のビオチンを添加しない限り生育に必要なビオチン濃度を細胞内に保てない状態にあると考えられる。

2. 研究の目的

(1) ビオチン排出輸送体という生物界で未だ報告のない新機能の特定を目指す。そのアプローチとして、ビオチン排出系欠損株のポジティブ選抜法を考案する。

(2) コリネ菌ビオチン生産菌(図 1A)はビオチン取り込み系遺伝子(*bioY*)と糖代謝遺伝子(*ppc*)を欠損すると(DD1 株: 図 1B) ビオチンを自ら合成できるにも関わらずビオチン高濃度要求性となる。この現象をもたらすメカニズムを解明し、ビオチン排出系欠損株のポジティブ選抜に応用する。

(3) 上記のビオチン高濃度要求株 DD1 (*bioY*, *ppc*)からビオチン要求性が回復したサプレッサー株を選択すれば、ビオチン排出系欠損株(図 1C)をポジティブ選抜できる可能性がある。他にも、ビオチン周りの有用な変異株、例えば、ビオチン合成系強化株(図 1D)等を取得できる可能性もある。その検証を試み、ビオチン代謝にまつわる新規変異を見出す。

3. 研究の方法

(1) DD1 株がビオチンを自ら合成できるにも関わらずビオチン高濃度要求性となるのは、生育に必要なビオチン濃度を細胞内に保てないためとする仮説は確かか? その検証は細胞内外のビオチン濃度を測定することにより行った。ビオチン濃度の測定にはバイオアッセイを用いた。

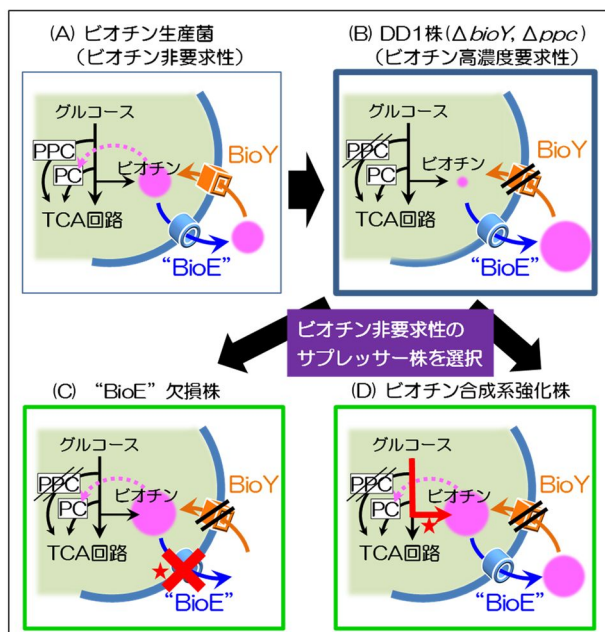


図1. サプレッサー株として選択される変異株の例 (C, D)
"BioE" は想定されるビオチン排出輸送体を、●の大きさは細胞内外のビオチン濃度(推定)を示す。

(2) **DD1** 株からのサプレッサー株の選択は、同菌をビオチンフリーの **MM** プレートに塗布し、自然変異により出現するコロニーを選択することにより行った。

(3) サプレッサー株の中には **図 1C&D** に示したような種々の変異株が含まれていると考えられる。その予備的分類は細胞内外のビオチン濃度を測定することにより行った。

(4) 選抜したサプレッサー株の持つ変異は全ゲノム解析により特定した。

4. 研究成果

(1) **DD1** 株がビオチン高濃度要求性を示す現象には **2** つの要因が関わる。一つは「**bioY** 破壊効果」、もう一つは「**ppc** 破壊効果」である。まず、「**bioY** 破壊効果」のメカニズムとして、細胞外に排出したビオチンを **BioY** で再回収できず、生育に必要なビオチン濃度を細胞内に保てないためとの仮説を立てた。この仮説を検証するため、ビオチン生産菌とその **bioY** 破壊株で細胞内外のビオチン濃度を比較した (**図 2**)。親株では細胞内に一定濃度のビオチンが確認された。細胞外にもビオチンが検出されたが、濃度は細胞内の方が有意に高かった。一方、**bioY** 破壊株では細胞内にはビオチンはほとんど検出されず、細胞外にビオチンが局在していた。この結果は予想通りであり、上記仮説の妥当性が検証された。

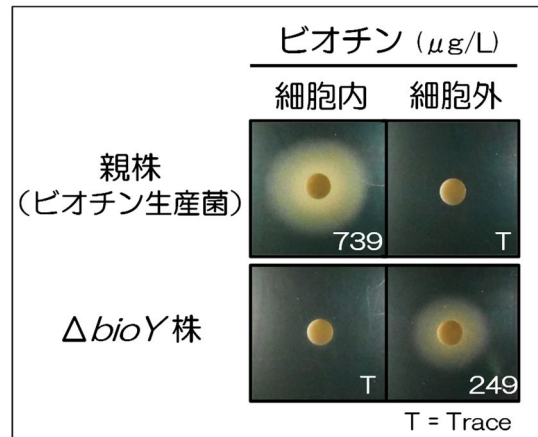


図2. 細胞内外のビオチン濃度 (ディスクアッセイ)

(2) もう一方の「**ppc** 破壊効果」については、アナプレロティック経路がビオチン酵素ピルビン酸カルボキシラーゼ (**PPC**) のみになることで (**図 3B**)、脂肪酸合成だけでなくアナプレロティック経路もビオチン依存性となって細胞のビオチン要求量が高まるためと説明できる。実際、**ppc** 破壊株は野生株よりビオチン要求量が **1** 桁程度高まっていることを確認した。以上から、**DD1** 株は、細胞外にビオチンを排出してそれを再回収できない「**bioY** 破壊効果」とビオチン依存性を高める「**ppc** 破壊効果」の相加効果で、高濃度のビオチンを添加しない限り、生育に必要なビオチン濃度を細胞内に保てない状態にあると結論した。

(3) ビオチンフリープレートに **DD1** 株を塗布すると自然変異によりコロニーが出現した。これらサプレッサー株は表現型解析で確かにビオチン要求性が解除されていた。その中から、代表株として親株 **DD1** よりもビオチン分泌量が低下した株を **2** 株 (**S1** 株、**S2** 株) 選抜した。

(4) 上記 **2** 菌株について親株 **DD1** を対照に細胞内ビオチン濃度を測定した結果、有意差は認められなかった。つまり、**S1** 株および **S2** 株では細胞内のビオチンレベルが高まっていないのにビオチン要求性が解除されたことになる。であれば、**S** 株はビオチン排出系欠損株 (**図 1C**) ではなく、中央代謝がビオチンに依存しない糖代謝系変異株である可能性がある。その変異は応用的価値があるので、両株の全ゲノム解析を行った。

(5) **S1** 株、**S2** 株ともにただ一つの変異が見出された。どちらもクエン酸回路を構成するアコニターゼ遺伝子 (**acn**) 内の異なるミスセンス変異 [**S1** 株: **acn150** (**Glu150Lys**)、**S2** 株: **acn517** (**Ser517Phe**)] であった (**図 3A**)。

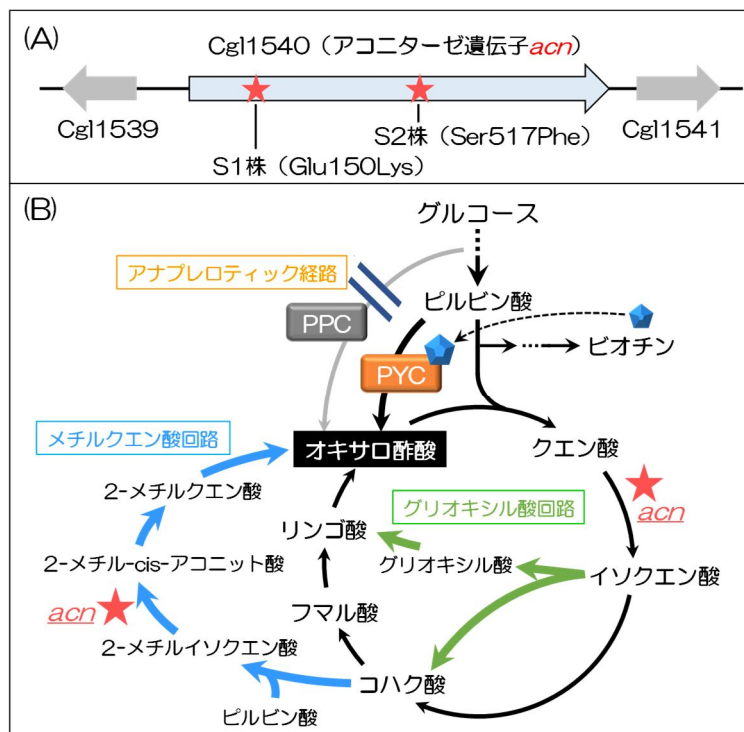


図3. S株に見出されたアコニターゼ変異 (A) と同変異がもたらす代謝モデル (B)

(6) 考察-1: *acn* 変異とピオチン要求性解除はどう結びつくのか? 親株 DD1 ではオキサロ酢酸の供給がピオチン酵素 *PYC* に依存しているために (図 3B) ピオチン要求量が高くなっている (前述)。ならば、もし *PYC* に依存することなくオキサロ酢酸を供給できれば、ピオチン要求量は通常レベルに低下してピオチン要求性解除に繋がるはずである。S 株に見出された *acn* 変異は、そのような代謝変換をもたらすと考えられる。グルコース培養条件では眠っているグリオキシル酸回路やメチルクエン酸回路の活性化はアナプレロティック経路非依存的にオキサロ酢酸の供給を可能にするとの報告があり、それら回路の活性化に *acn* 変異が一役買っている可能性がある (図 3B)。 *acn* 変異がどのような仕組みで同回路の活性化をもたらすのかは今後の課題である。

(7) 考察-2: 第一目標であった “*bioE*” 変異株が得られなかったのはなぜか? 本選抜法にて *acn* 変異株は得られている。従って、“*bioE*” 変異株が得られなかったのには何か理由があるはずである。単なる実験技量の問題とは考えにくい。むしろ選抜法に何らかの問題があると考えられる。例えば、目的の機能を持つ輸送体が複数存在してその変異株が確率的に得られない可能性、あるいは、目的変異株が何らかの理由で致死となって得られない可能性等が考えられる。ピオチンを排出する生理的意義は何か? 今後は、その考察と、それを踏まえた選抜法を再構築する必要がある。

(8) 考察-3: ピオチンの排出が輸送体非依存的な仕組みで起こっている可能性はないか? その可能性も完全には否定できず、検証が必要である。仮にその仕組みが漏出のような非特異的なものだとすると、ピオチン排出効率は細胞膜組成によって影響を受けると推察される。その意味で、我々が造成したコリネ菌のバルミトレイン酸 (POA) 生産菌 (Takeno et al. *Metab Eng* 78:148-158 2023) をピオチン生産宿主とした場合、ピオチン排出効率が影響を受けるのかどうかは興味深い。細胞膜組成がコリネ菌本来のものとは大きく異なっているためである (図 4)。この点も今後の課題である。

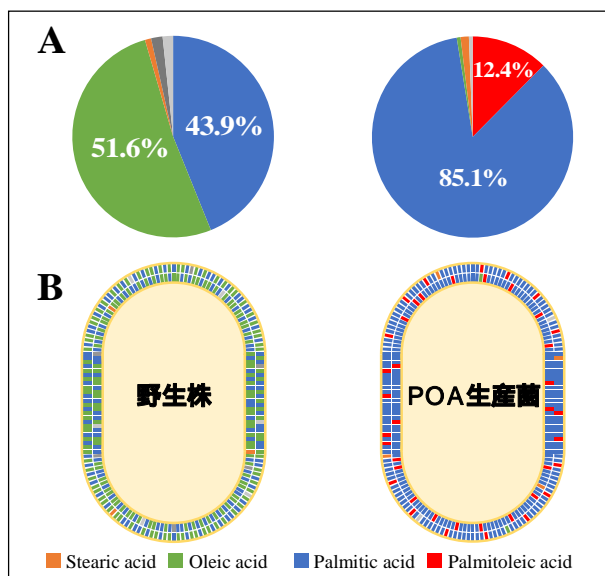


図4. コリネ野生株およびバルミトレイン酸 (POA) 生産菌の細胞膜 (A) 細胞膜の構成脂肪酸 (B) 各脂肪酸を色別に描いた細胞膜イメージ

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 1件）

1. 著者名 Takeno Seiki, Hirata Yosuke, Kitamura Kako, Ohtake Tatsunori, Aoki Kuniyoshi, Murata Noriko, Hayashi Mikiro, Ikeda Masato	4. 巻 78
2. 論文標題 Metabolic engineering to produce palmitic acid or palmitoleic acid in an oleic acid-producing <i>Corynebacterium glutamicum</i> strain	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Metabolic Engineering	6. 最初と最後の頁 148 ~ 158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ymben.2023.06.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平田陽祐、竹野誠記、池田正人
2. 発表標題 コリネ型細菌によるパルミトレイン酸の生産（第四報）
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水野聖夜、西原一毅、津久井裕太、原志門、竹野誠記、池田正人
2. 発表標題 コリネ型細菌のBirAが単機能型とする定説の再検証（第一報）
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤美奈子、村田紀子、村松哲広、竹野誠記、池田正人
2. 発表標題 コリネ型細菌における長鎖脂肪酸排出輸送体の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村田春樺, 内蔵 萌, 竹野誠記, 池田正人
2. 発表標題 コリネ型細菌による中鎖脂肪酸生産への代謝工学
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 津久井裕太, 竹野誠記, 池田正人
2. 発表標題 コリネ型細菌におけるリポ酸の炭素骨格C8供給経路の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮澤 萌, 小林央恒, 横山夏音, 岡本理瑚, 竹野誠記, 池田正人
2. 発表標題 コリネ型細菌における“ピオチン再回収説”とその検証
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究者総覧： https://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/search/detail.html?systemId=48913328&lang=ja&st=researcher</p> <p>Researchmap： https://researchmap.jp/read0131716</p>

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
研究 分 担 者	竹野 誠記 (Takeno Seiki) (30422702)	信州大学・学術研究院農学系・准教授 (13601)	

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