

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 12 月 13 日現在

機関番号：32657

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24880028

研究課題名(和文) アミノ酸過剰生産誘導性ストレスに対する応答遺伝子の機能解析と応用に向けた基盤構築

研究課題名(英文) Analysis of genes responding to stresses that induce amino-acid overproduction

研究代表者

夏目 亮 (Ryo, Natsume)

東京電機大学・工学部・准教授

研究者番号：60637651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：コリネ型細菌のグルタミン酸過剰生産を誘導するストレスに応答して転写量が増大する遺伝子計6種類について、各遺伝子の破壊株および増幅株を用いて機能解析を行った。増幅株では対照株との顕著な違いが観察されなかった。一方、2種類の遺伝子破壊株では、それぞれビオチン制限条件下あるいはTween40添加条件下で対照株に比べ生育ならびにグルタミン酸生産性の上昇傾向が認められ、別の1種類の遺伝子破壊株ではペニシリン添加条件下で低下傾向が認められた。また、GFPおよびRFPをレポーターとするプロモータアッセイ系を構築し、機能未知遺伝子上流領域にストレス応答性プロモータが存在するかどうか、解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the function of 6 genes responding to stresses that induce glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*, genetic analyses were conducted. It was found that the disruption of two genes could enhance the growth and the glutamate production under biotin-limiting condition or Tween40-adding condition, respectively, while the disruption of another one gene could reduce the growth and the glutamate production under penicillinG-adding condition. In order to judge whether a stress-responsive promoter is located in the upstream region of the 6 genes or not, promoter assay systems using GFP or RFP as a reporter were constructed. With these systems, we are making efforts to determine the promoter sequence responding to stresses that induce glutamate overproduction.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：応用生物化学

キーワード：コリネ型細菌 ストレス応答 グルタミン酸 転写制御

## 様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アミノ酸などの有用物質の工業生産に使用されるコリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* は、ピオチン制限培養、脂肪酸系界面活性剤 Tween40 添加培養、ペニシリン添加培養などの特定のストレス下においてグルタミン酸を大量に生産する生理学的特徴を有している。上記のストレス下における遺伝子発現の応答性を調べる目的で Kawasaki らによって網羅的転写解析が行われ、その結果、本菌がグルタミン酸を過剰生産する代表的条件、すなわち、ピオチン制限培養、脂肪酸系界面活性剤 Tween40 添加培養、ペニシリン添加培養の3条件のいずれかにおいて大きく転写量が増大する遺伝子、及びこれら3条件いずれにおいても転写量が増大する遺伝子が計7種類見出されていた (Kataoka *et al. Lett. Appl. Microbiol.* 42, 471-476(2006))。ストレスにตอบสนองするこれら7種類の遺伝子の共通点は、50~90 アミノ酸残基程度の小さいタンパク質をコードすること、コリネバクテリウム属細菌にのみ相同性の高い遺伝子が見出される新奇な遺伝子であること、相同遺伝子の機能が明らかに示された例がなく機能未知であること、の三点である。これらのストレス応答性遺伝子はコリネ型細菌におけるグルタミン酸過剰生産の仕組みに密接に関わっているのではないかと、また、ストレス応答性のプロモータが本菌に(しかも上記機能未知遺伝子の近傍に)存在するのではないかと、ということが示唆された。

### 2. 研究の目的

グルタミン酸過剰生産を誘導するストレスにตอบสนองして転写量が増大する *C. glutamicum* の機能未知遺伝子の破壊株・増幅株を用いた遺伝学的解析で、これらの遺伝子が、ストレスからグルタミン酸生産にいたるまでのシグナルカスケードの内部で機能しているのかそれとも外部で機能しているのかを明らかにする。また新たに構築したプロモータアッセイ系を利用して、当該遺伝子の転写制御機構を解析する。微生物の新たなストレス応答機構を理解し、その産業応用を目指している。

### 3. 研究の方法

(1) 機能未知遺伝子の破壊株を用いた遺伝学的解析

*C. glutamicum* 13869 株を親株として用い、7種類の機能未知遺伝子のうち、*NCgl0226*, *NCgl0917*, *NCgl2841* についてはその単独破壊株を2回組換えを用いてインフレームで構築した。*NCgl2944*, *NCgl2945*, *NCgl2946* については3つの遺伝子の相同性が高かつ隣接していることから三重破壊株を同様にインフレームで構築した。*NCgl2975* については破壊株の構築に成功しなかったため、今回の研究では解析対象としなかった。ピ

オチン制限条件下、ペニシリン添加条件下、Tween40 添加条件下でのグルタミン酸生産能について、構築した各遺伝子破壊株および野生株の比較を行った。

(2) 機能未知遺伝子の増幅株を用いた遺伝学的解析

*NCgl0226*, *NCgl0917*, *NCgl2841* について、上流に隣接する遺伝子末端部位から各遺伝子のストップコドンまでを含む領域を大腸菌とコリネ型細菌のシャトルベクター pVK7 にクローニングしたものを構築した。*NCgl2944*, *NCgl2945*, *NCgl2946* については3つの遺伝子の相同性が高かつ隣接していることから、*NCgl2946* の上流に隣接する別の遺伝子末端部位から3つの機能未知遺伝子最下流の *NCgl2944* のストップコドンまでを含む領域を pVK7 にクローニングしたものを構築した。構築した各プラスミドで野生株を形質転換し、得られた株を機能未知遺伝子増幅株とした。ペニシリン添加条件下、ピオチン制限条件下でのグルタミン酸生産能について、構築した各遺伝子増幅株および野生株の比較を行った。

(3) レポーターを利用した機能未知遺伝子上流域配列のプロモータアッセイ

機能未知遺伝子上流域にストレス応答性のプロモータが存在するかどうかを確認する目的で、GFP 遺伝子および RFP 遺伝子をレポーターとするプロモータアッセイ系を構築した。大腸菌とコリネ型細菌のシャトルベクター pVK6 の改変型ベクター pVK61 を利用して、ポジティブコントロールプラスミドとして、コリネ型細菌で機能することが知られている *CspB* プロモータ下流に GFP 遺伝子あるいは RFP 遺伝子を挿入したものを構築した (図1)。また、ネガティブコントロールプラスミドとして、ポジティブコントロールプラスミドからプロモータ領域を欠損させたものを構築した (図2)。さらに、ネガティブコントロールプラスミドの *Bam* HI サイト、*Nco* I サイト間に、*NCgl0226*, *NCgl0917*, *NCgl2841*, *NCgl2944*, *NCgl2945*, *NCgl2946* 各遺伝子上流域配列を挿入したものを構築し、プロモータアッセイに用いた (図3)。

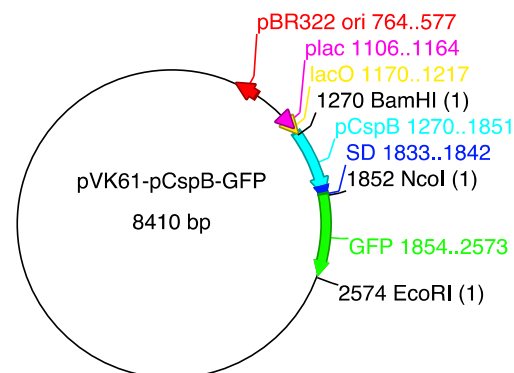


図1. ポジティブコントロールプラスミド

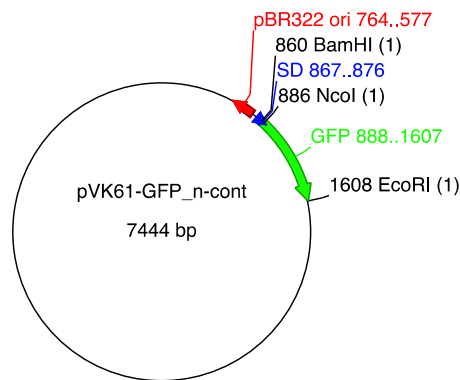


図 2. ネガティブコントロールプラスミド

上記のように構築したプラスミドで *C. glutamicum* 13869 株を形質転換して得られた株を培養し、培養開始 3 時間後にペニシリンあるいは Tween40 を添加して、添加後 12 時間の菌体を回収し、超音波破碎と遠心操作でタンパク質抽出液を調製した。抽出液に GFP, RFP の励起波長の光を照射し、蛍光を分析した。

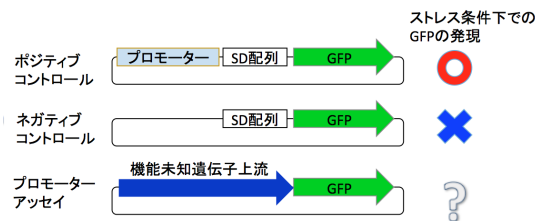


図 3. プロモータアッセイ

#### 4. 研究成果

##### (1) 機能未知遺伝子の遺伝学的解析

7 種類の機能未知遺伝子のうち 6 種類について、増幅株と欠損株をそれぞれ構築した。増幅株について、グルタミン酸過剰生産誘導性ストレスに対する応答性を調べたところ、いずれの増幅株も対照株と差異は認められなかった。一方、ピオチン制限培養条件下において、1 種類の遺伝子破壊株については、対照株に比べ生育ならびにグルタミン酸生産性の上昇傾向が認められた。2 種類の遺伝子破壊株については対照株に比べ生育ならびにグルタミン酸生産性の低下傾向が認められた。残りの遺伝子破壊株については、対照株に比べ生育が上昇する傾向が認められたが、グルタミン酸生産性には差異が認められなかった。ペニシリン添加培養条件下では、1 種類の遺伝子破壊株において、対照株に比べ糖消費量ならびにグルタミン酸生産性の低下傾向が認められた。その他の株については同条件下における対照株との顕著な差異は認められなかった。Tween40 添加培養条件下では、1 種類の遺伝子破壊株において、対照株に比べ糖消費量ならびにグルタミン酸生産性の上昇傾向が認められた。その他の株については同条件下における顕著な差異が認められなかった。

上記の解析ではある程度の傾向は認められた。しかし、増幅株、破壊株どちらについて

も再現性を確認するために実験を重ねたところ、実験を重ねるほど結果の再現性が低下し、明確な結論を下すのが難しい状況に陥っている。構築した株を保存するためにグリセロールストックを作製し、実験の都度グリセロールストック保存株から培養を行っているのであるが、実はこのグリセロールストックという操作がある種のストレスになっており *C. glutamicum* の生理状態に影響を与えてしまうのではないかと、そのために実験の再現性が低下しているのではないかと考えるべき事象も認められている。遺伝的不安定性も考慮する必要があることから、増幅株および欠損株の再構築を含めて実験材料を見直し、実験条件を慎重に再検討中である。本研究期間に完了しなかった残り 1 種類の遺伝子の破壊株構築・増幅株構築についてもプロセスを見直しながら継続している。

##### (2) 機能未知遺伝子上流域配列のプロモータアッセイ

機能未知遺伝子上流域領域に存在すると想定されるストレス応答性プロモータを同定する目的で、構築した GFP をレポーターとする系を用いてプロモータアッセイを試みた。まだ培養条件や測定条件を含め検討を重ねている予備的な段階にあるが、ある程度の定性的な評価は可能なことが分かった。しかし、現在の実験系では GFP の存在量を再現良くかつ定量的に評価して、どの領域がストレス応答性プロモータを含むのかどうかの判断は難しい。自家蛍光の影響をどのように排除するか、どのように測定値を標準化するかが現時点における主な課題である。RFP をレポーターとする系も構築し、どちらの系がコリネ型細菌におけるプロモータアッセイとして優れているかを検討中である。今後は、これまでに構築した研究基盤を発展させ、ストレス応答性遺伝子の機能を明らかにするとともに、ストレス応答性遺伝子産物ないしストレス応答性プロモータを利用した有用物質生産系の開発を続けたい。

#### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 7 件)

山崎 穰、竹澤 俊大、加藤 雄己、橋本 賢一、川崎 寿、夏目 亮、中松 巨  
“ *Variovorax* sp. 由来、及び *Burkholderia* sp. 由来組換え -Phe アミノアシラーゼの性質解析 ” 日本農芸化学会 (2014 年 3 月 30 日、東京)

竹澤 俊大、山崎 穰、加藤 雄己、井桁 啓介、若林 佳佑、二階堂 圭輔、橋本 賢一、川崎 寿、夏目 亮、中松 巨  
“ バリオボラックス属細菌およびバークホルデリア属細菌に由来する 2 つの フェニルアラニンアミノアシラーゼの発現、精製、性質解析 ” 国際酵素工学会議 (2013 年 9 月 24 日、富山)

若林 佳佑,山崎 穰,橋本 賢一,夏目  
亮,川崎 寿,中松 亘 “ *Burkholderia*  
属細菌由来 -フェニルアラニンア  
ミノアシラーゼの組換え発現と精製 ”  
日本農芸化学会 (2013年3月25日、  
仙台)

井桁 啓介,二階堂 圭輔,橋本 賢一,  
夏目 亮,川崎 寿,中松 亘  
“ *Variovorax* 属細菌由来(R)- フェ  
ニルアラニンアミノアシラーゼの  
組換え発現と精製 ” 日本農芸化学会  
(2013年3月25日、仙台)

橋本 賢一,山下 周子,北嶋 俊一,  
矢部 勇,夏目 亮,中松 亘,川崎 寿,  
和地 正明 “ *Corynebacterium*  
*glutamicum* 由来のグルタミン酸排出  
チャネルである NCgl1221 遺伝子産物  
のC末端ドメインの電気生理学的手法  
を用いた機能解析 ” 日本農芸化学会  
(2013年3月25日、仙台)

山口 竜也,浅野 健太郎,橋本 賢一,  
宮崎 達雄,川崎 寿,夏目 亮,鯉坂  
勝美,中松 亘 “  
-*N*-acetylgalactosaminidase を用い  
た糖ペプチドの合成 ” 日本農芸化学  
会 (2013年3月25日、仙台)

浦田 明慧,木間 栄光,坂本 理香,  
伊藤 慶之,三友 さやか,橋本 賢一,  
川崎 寿,夏目 亮,中松 亘 “ コリネ  
型細菌に特異的に作用する生理活性  
物質の探索 ” 日本農芸化学会関東支  
部大会 (2012年10月27日、新潟)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

夏目 亮 (RYO NATSUME)

東京電機大学・工学部・准教授

研究者番号：60637671