

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780071

研究課題名（和文） アンチセンスRNA発現系を用いた微生物代謝改変技術の最適化

研究課題名（英文） Optimization of technologies for improving microbial metabolisms using antisense RNA expression system

研究代表者

平沢 敬（HIRASAWA TAKASHI）

大阪大学・大学院情報科学研究科・助教

研究者番号：20407125

研究成果の概要（和文）：本研究では、コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* の *odhA* 遺伝子 mRNA に対するアンチセンス RNA 発現系を例に、アンチセンス RNA 発現系が微生物代謝改変技術として利用可能であるのかを検討した。また、長さの異なるアンチセンス RNA の設計や標的 mRNA の構造に基づく設計を行うことで、代謝改変を行うために有効なアンチセンス RNA を設計することができるのか検討し、アンチセンス RNA 発現系の最適化を試みた。

研究成果の概要（英文）：In this study, effectiveness of antisense RNA expression system was examined using antisense RNA expression system for *odhA* mRNA of a coryneform bacterium *Corynebacterium glutamicum*. Moreover, effective design of antisense RNA for improving metabolisms and optimization of antisense RNA expression system were tried by constructing the antisense RNAs with various length and those based on the secondary structure of target mRNA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：応用微生物学・代謝工学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：アンチセンス RNA・コリネ型細菌・グルタミン酸・2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体・*odhA*

1. 研究開始当初の背景

微生物を用いた物質生産を行う際、目的とする物質の生産へと代謝の流れを向かわせるために、変異処理やさまざまな遺伝子工学的手法が用いられる。その際、目的とする物質の生産へと代謝の流れを向かわせるために、さまざまな代謝経路（例えば副生成物の合成経路）を遮断することが要求される。一般的に、代謝経路の遮断には、その反応を触媒する酵素をコードする遺伝子を破壊する

（ノックアウト）という手法がとられる。しかしながら、代謝経路の完全な遮断は、宿主細胞の増殖や糖消費の低下などの悪影響をもたらす場合もある。そのため、当該代謝経路を完全には遮断せずに流量を減少させる、すなわちコードする遺伝子の発現や酵素合成を完全になくすのではなくそれらを低下させる（ノックダウン）ための技術が必要となる。近年、RNAi 法に代表されるように RNA 分子を用いた遺伝子改変技術が注目されてい

る。原核微生物の場合は、RNAi 法は用いることができないが、標的遺伝子のアンチセンス RNA (以降 asRNA と記述する) を細胞内で発現させることにより遺伝子の発現量をコントロールすることができると考えられる。asRNA の発現は、標的となる遺伝子の mRNA と対合することでその翻訳過程を阻害することができると思われ。

2. 研究の目的

本研究では、asRNA を微生物細胞内に人工的に発現させ、その発現量を制御することで、標的となる代謝経路の流量 (フラックス) を制御することができるのかを検討し、asRNA 発現系を微生物による物質生産系に応用することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、グルタミン酸生産菌として知られる *Corynebacterium glutamicum* について、TCA サイクルの酵素の 1 つである 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体 (2-oxoglutarate dehydrogenase complex; ODHC) について、触媒サブユニット E1 α をコードする *odhA* 遺伝子に対する asRNA を細胞内に発現させる系を例に、*odhA* asRNA の発現によるグルタミン酸生産の変化について解析した。

C. glutamicum によるグルタミン酸生産は、界面活性剤である Tween 40 や β -ラクタム系抗生物質であるペニシリンの添加などにより誘導されることが知られている (Nara et al., 1964, Agric. Biol. Chem., 28:120-124; Takinami et al., 1965, Agric. Biol. Chem., 29: 351-359)。また、これらの処理により *C. glutamicum* がグルタミン酸を生産しているときには、ODHC の比活性が低下することにより代謝のフローがグルタミン酸の生産に向かうように変化することが知られている (Kawahara et al., 1997, Biosci. Biotechnol. Biochem., 61: 1109-1112)。そこで、*odhA* asRNA の発現が ODHC 比活性の変化やグルタミン酸生産にどのような影響を与えるのかを解析した。

(1) *odhA* asRNA 発現系の構築

odhA 遺伝子およびその上流配列に相当する DNA 断片を、*C. glutamicum* ATCC 13032 株のゲノム DNA を鋳型に PCR により増幅し、*C. glutamicum* の発現ベクター pEct (Sato et al. 2008, J. Biosci. Bioeng., 106: 51-58) の *lac* プロモーターの下流にアンチセンス鎖が転写されるように挿入した。そして、構築したプラスミドを ATCC 13032 株に導入した。

(2) グルタミン酸生産実験

C. glutamicum によるグルタミン酸生産は、合成培地を用い、坂口フラスコおよびジャーファーメンターにより培養することにより行った。また、グルタミン酸生産を誘発させるために、必要に応じて界面活性剤である Tween 40 および抗生物質であるペニシリンを添加した。

(3) ウェスタンブロッティングによる *OdhA* タンパク質発現量の測定

His₆ タグを N 末端に付加した *OdhA* タンパク質を大腸菌 BL21 (DE3) 株で発現させ、精製することにより精製 His₆-*OdhA* タンパク質を得た。そして、精製 His₆-*OdhA* タンパク質を用いて、ウサギポリクローナル *OdhA* 抗体を取得した。得られた *OdhA* 抗体を用いて、*odhA* asRNA を発現させた *C. glutamicum* 細胞のタンパク質中の *OdhA* タンパク質をウェスタンブロッティング法により検出し、asRNA の発現による *OdhA* タンパク質の発現量の変化を解析した。

4. 研究成果

(1) *odhA* asRNA の発現によるグルタミン酸生産

はじめに、*odhA* 遺伝子の open reading frame およびその上流に位置する Shine-Dalgarno (SD) 配列をカバーするような asRNA を *C. glutamicum* 細胞内で発現させ、グルタミン酸生産を誘導するか検討した。しかしながら、asRNA を発現させただけでは、グルタミン酸生産は誘導されなかった。また、Tween 40 を添加することによりグルタミン酸生産を誘導した状態で asRNA を発現させ、グルタミン酸生産がさらに増大するかどうか検討したところ、asRNA の発現によりさらなるグルタミン酸生産の増加が確認された。これらの結果から、asRNA の発現だけではグルタミン酸生産を誘導することができず、グルタミン酸生産を誘発する処理を行った状態で asRNA を発現させることでさらなるグルタミン酸生産の増大が可能であることが示された。

(2) *odhA* mRNA の二次構造に基づく asRNA の設計と asRNA の発現によるグルタミン酸生産

RNA の二次構造予測プログラム (http://www.genebee.msu.su/services/rna_2_reduced.html) を用いて *odhA* mRNA の二次構造を予測した。そして、1 本鎖として露出している部分が多く存在する領域を標的にした asRNA を 2 種類 (X および Y) 設計し、*C. glutamicum* 細胞へ導入した (図 1)。その結果、SD 配列を含むような領域をカバーする asRNA X を発現させた場合、Tween 40・ペニシリンそれぞれでグルタミン酸生産を誘導

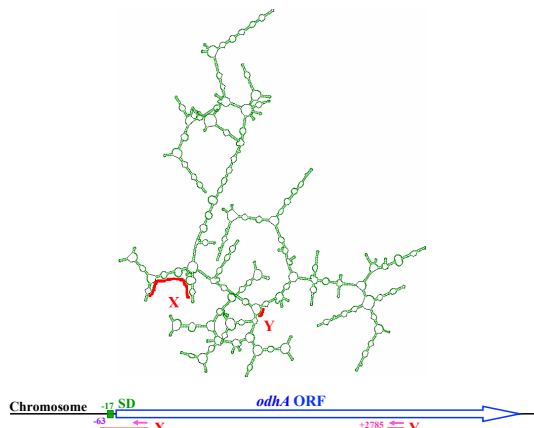


図1 *odhA* mRNAの構造とasRNAの標的とした領域(XおよびY)

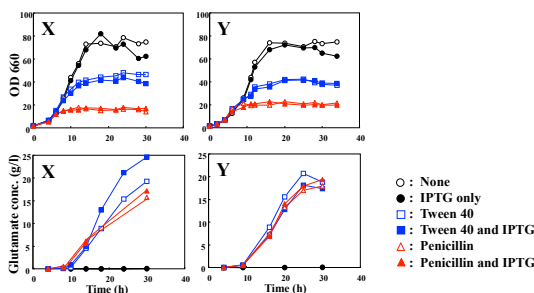


図2 *odhA* mRNAの構造に基づいて設計したasRNA(XおよびY)を発現させた際の増殖(OD660)およびグルタミン酸生産

した状態での生産量をさらに増大させることが可能であったことが示された(図2)。

(3) 異なる長さのasRNAの発現によるグルタミン酸生産

さまざまな長さの *odhA* asRNA を18種類設計し、*C. glutamicum* 細胞に導入した(図3)。そして、Tween 40・ペニシリンそれぞれでグルタミン酸生産を誘導した状態で *odhA* asRNA を発現させることで、グルタミン酸生産を増大させることができるかどうか検討した。Tween 40・ペニシリンいずれかでグルタミン酸生産を誘導した状態で、生産量をさらに増大させることが可能であったasRNAを見出すことに成功した。しかしながら、発現させるasRNAの長さや対応する *odhA* 遺伝子領域とグルタミン酸生産を増大させる効果の有無との間に、主だった関係性を見出すことはできなかった。

また構築したasRNAのうち2つのasRNA(DおよびO)については、Tween 40・ペニシリンそれぞれでグルタミン酸生産を誘導した状態での生産量をさらに増大させることが可能であった。この2つのasRNAともSD配列を含む領域に対合するものであったことか

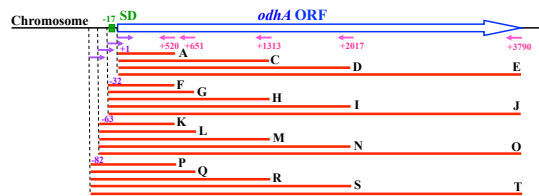


図3 異なる長さをもつasRNAの設計

A、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N、P、Q、R、S、Tの18種類のasRNAを設計した。赤線は標的となる領域を示す。また紫およびピンク色の矢印はPCR増幅に用いたプライマーを示す。Oは(1)で設計したasRNAを示す。

ら、SD配列を含む領域に対合するasRNAを発現させることが有効であることが示唆された。

(4) asRNAの発現による *C. glutamicum* の代謝変化の解析

asRNAの発現によるODHC比活性の変化とグルタミン酸生産増大の関係をさらに検証するため、*odhA* asRNAを発現させた細胞をジャーファーメンターにより培養し、ODHC比活性とグルタミン酸生産を測定した。なお、ここではasRNA 0を発現する株について解析を行った。またグルタミン酸生産の誘導には、Tween 40を用いた。

まず、*odhA* asRNA発現のみを行った際にODHC比活性がどのように変化するかを検討したところ(図4)、asRNA発現のみでODHC比活性が低下することが確認された。しかしながら、グルタミン酸の生産は認められなかった。このことは、*odhA* asRNAの発現によるODHC比活性の低下のみではグルタミン酸は生産されず、グルタミン酸生産を誘導する別の要因が必要であることが示唆された。

次に、Tween 40添加により低下したODHC比活性が *odhA* asRNAの発現によりどのように変化するかを検討したところ(図5)、Tween 40添加により低下したODHC比活性がさらに低下し、このときグルタミン酸生産のさらなる増大が確認された。これらの結果から、Tween 40等でグルタミン酸生産が誘導された状態でasRNAの発現によりODHC比活性をさらに低下させることでグルタミン酸生産の増大が引き起こされていることが示された。なお、*odhA* asRNAを発現しているときのOdhAタンパク質量の顕著な変化は確認されなかった。asRNAを発現していない *C. glutamicum* 細胞においては、Tween 40を添加してもOdhAタンパク質量には顕著な変化が見られなかったこと、またasRNAの発現によりODHC比活性低下量はわずかであったことから、OdhAタンパク質量の変化が確認できなかったものと推測される。

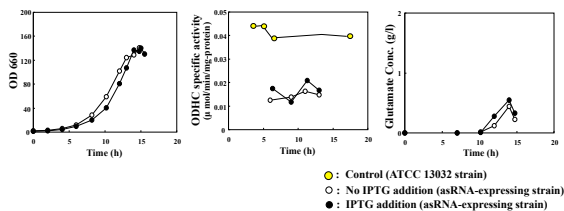


図 4 asRNA O を発現させたときの増殖 (OD660; 左)、ODHC 比活性 (中央)とグルタミン酸生産 (右) (ジャーファーメンターによる培養)

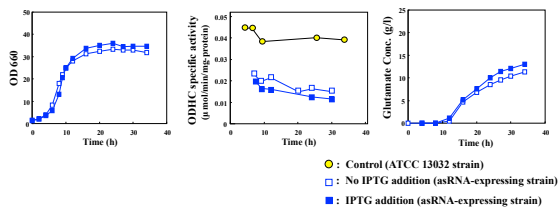


図 5 Tween 40 添加に加え asRNA O を発現させたときの増殖 (OD660; 左)、ODHC 比活性 (中央)とグルタミン酸生産 (右) (ジャーファーメンターによる培養)

(5) まとめ

以上の結果から、*odhA* asRNA 発現系を例に、asRNA の発現系が代謝経路の改変に利用可能であることが示された。asRNA の設計の際には、対象とする遺伝子の SD 配列に対応する配列を含めるようにすることが、代謝経路の遮断には効果的である可能性が示唆された。しかしながら、mRNA の構造や設計する asRNA の長さなどについて、設計する際の指針を得るには至らなかった。他の遺伝子を標的とした asRNA 発現系を用いた解析や、発現した asRNA の安定性を向上させる技術の導入あるいは新規開発などを行うことで、asRNA による代謝改変技術の可能性を向上させることができるものと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Jongpill Kim, Takashi Hirasawa, Masaki Saito, Chikara Furusawa, Hiroshi Shimizu. (2011) Investigation of phosphorylation status of OdhI protein during penicillin- and Tween 40-triggered glutamate overproduction by *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. In press. DOI: 10.1007/s00253-011-3275-6 査読有
- ② Katsunori Yoshikawa, Tadamasa Tanaka, Yoshihiro Ida, Chikara Furusawa, Takashi Hirasawa, Hiroshi Shimizu.

(2011) Comprehensive phenotypic analysis of single-gene deletion and overexpression strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 28:349-361. 査読有

- ③ Takashi Hirasawa, Chikara Furusawa, Hiroshi Shimizu. (2010) *Saccharomyces cerevisiae* and DNA microarray analyses: what did we learn from it for a better understanding and exploitation of yeast biotechnology? Appl. Microbiol. Biotechnol. 87:391-400. 査読有
- ④ Jongpill Kim, Hirohisa Fukuda, Takashi Hirasawa, Keisuke Nagahisa, Kazuo Nagai, Masaaki Wachi, Hiroshi Shimizu. (2010) Requirement of de novo synthesis of the OdhI protein in penicillin-induced glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 86:911-920. 査読有
- ⑤ Siraje Arif Mahmud, Takashi Hirasawa, Hiroshi Shimizu. (2009) Differential importance of trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various environmental stresses. J. Biosci. Bioeng. 109:262-266. 査読有
- ⑥ Yohei Shinfuku, Natee Sorpitiporn, Masahiro Sono, Chikara Furusawa, Takashi Hirasawa and Hiroshi Shimizu. (2009) Development and experimental verification of a genome-scale metabolic model for *Corynebacterium glutamicum*. Microb. Cell Fact. 8:43. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① 平沢 敬、金 鍾弼、古澤 力、清水 浩 コリネ型細菌によるグルタミン酸生産における OdhI タンパク質の役割 日本農芸化学会大会 2011 年度大会 2011 年 3 月 27 日 京都
- ② 馬越元基、平沢 敬、古澤 力、竹中康浩、菊池慶実、清水 浩 異種タンパク質を分泌生産するコリネ型細菌の代謝フラックス解析 第 62 回日本生物工学会大会 2010 年 10 月 29 日 宮崎
- ③ 大野 聡、古澤 力、田中章太郎、平沢 敬、清水 浩 大腸菌のゲノムスケール代謝モデルによる有用物質生産に向けた代謝予測 第 62 回日本生物工学会大会 2010 年 10 月 28 日 宮崎
- ④ 平沢 敬、金 鍾弼、古澤 力、清水 浩 *Corynebacterium glutamicum* によるグルタミン酸生産における OdhI タンパク質のリン酸化状態の解析 第 62 回日本生物工学会大会 2010 年 10 月 28 日 宮崎

- ⑤ 古澤 力、平沢 敬、小野直亮、清水 浩
ゲノムスケール代謝モデルによる代謝フ
ラックス予測とその実験的検証 第62回
日本生物工学会大会・大学発技術シーズ発
表会 2010年10月27日 宮崎
- ⑥ Kim Jongpill、福田洋久、平沢 敬、永久
圭介、古澤 力、清水 浩 プロテオミク
スによるコリネ型細菌グルタミン酸生産
メカニズム解析と生産性向上 化学工学
会第42回秋季大会 2010年9月8日 京
都
- ⑦ 平沢 敬、臼井佑希、古澤 力、山本奈津
子、森 浩禎、清水 浩 大腸菌の中央代
謝系酵素遺伝子発現調節株の構築-遺伝子
摂動が代謝におよぼす影響の解析に向け
て 第4回日本ゲノム微生物学会年会
2010年3月8日 福岡
- ⑧ 臼井佑希、平沢 敬、古澤 力、山本奈津
子、森 浩禎、清水 浩 大腸菌の細胞内
代謝に対する遺伝子摂動の影響の解析
第32回日本分子生物学会年会 2009年12
月12日 横浜
- ⑨ 平沢 敬、大久保亜紀、竹國正矩、吉川勝
徳、古澤 力、清水 浩 酵母を用いた
L-乳酸生産に関連する遺伝子のゲノムワ
イドな同定 第32回日本分子生物学会年
会 2009年12月9日 横浜
- ⑩ 馬越元基、平沢 敬、古澤 力、竹中康浩、
菊池慶実、清水 浩 異種タンパク質を分
泌生産するコリネ型細菌の代謝解析 第
61回日本生物工学会大会 2009年9月24
日 名古屋
- ⑪ 新福洋平、ソーピティポーン ナティ、
園 雅博、古澤 力、平沢 敬、清水 浩
ゲノムスケール代謝モデルを用いた
Corynebacterium glutamicum の代謝解析
とその実験的検証 第61回日本生物工学
会大会 2009年9月24日 名古屋
- ⑫ 新福洋平、Sorpitiporn Natee、園 雅博、
平沢 敬、古澤 力、清水 浩 ゲノム情
報を基盤とする代謝予測システムの開発
と実験検証 化学工学会第41回秋季大会
2009年9月16日 広島

[その他]

ホームページ等

<http://www-shimizu.ist.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平沢 敬 (HIRASAWA TAKASHI)

大阪大学・大学院情報科学研究科・助教

研究者番号：20407125

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：