

平成 21年 5月 20日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18580071  
 研究課題名（和文） 好気性コリネ型アミノ酸生産菌の酸素要求性改変  
 研究課題名（英文） Engineering of oxygen-requiring properties  
 in aerobic *Corynebacterium glutamicum*  
 研究代表者  
 池田 正人（IKEDA MASATO）  
 信州大学・農学部・教授  
 研究者番号：00377649

研究成果の概要：好気性のアミノ酸生産菌コリネバクテリウム・グルタミクムは嫌気条件でも硝酸呼吸により生育できることを見出し、硝酸呼吸に関わる遺伝子群を同定した。この硝酸呼吸を作動させることで嫌気条件でもアミノ酸の微量生成を認め、アミノ酸の嫌気発酵の可能性を示した。一方、野生株から酸素の要求量が高まった高濃度酸素要求株を変異誘導し、その形質の相補能により、酸素利用に関わる遺伝子を6種同定した。これらの遺伝子の中には遺伝子増幅によって静置培養での生育速度が若干ながら改善するものが見られた。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,800,000	0	1800,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：発酵生産

## 1. 研究開始当初の背景

アミノ酸、ヌクレオチド、抗生物質等の発酵では、酸素の供給が律速となるがゆえ、発酵の高速化（生産性アップ）が阻まれている場合が少なくない。従来からの対策として発酵タンクの新設や改造を伴う培養工学的アプローチが取られてきたが、コストの問題で設備投資がままならないという現状がある。もし、設備に頼らない、菌株サイドからの対応が可能になれば、工業的に大きな価値を生むと思われるが、現在、そのような技術はない。

## 2. 研究の目的

アミノ酸発酵は多量の酸素を必要とする。酸素が不足すると、アミノ酸の代わりに有害な有機酸が蓄積し、発酵は成立しない。このため、溶存酸素を一定レベル以上に維持することが重要であり、その管理に多大なコストと労力が割かれている。もし、酸素が不足してもアミノ酸を効率よく生産する、いわば“低通気適応株”を育種できれば、アミノ酸発酵のみならず、酸素を要する発酵全般にプロセス効率化を図るための新しい技術開発の可能性を提案することができる。従って、本研

究は、アミノ酸発酵菌の酸素要求量に関わる遺伝子や、本菌における呼吸の仕組みを解明すると共に、“低酸素適応株”の育種戦略を示すことを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) コリネバクテリウム・グルタミクムの酸素要求特性を調べ、環境条件により酸素要求量低減の可能性を探る。併せて、酸素に代わる電子受容体の有無、かつ、その利用による酸素要求量低減の可能性を探る。

(2) 酸素の要求量が逆に高まった変異株を分離し、その回復遺伝子を特定する方法で、酸素の運搬/利用に関わる遺伝子を同定する。

(3) 糖代謝で発生する電子は通常、酸素に受け渡される。すなわち、酸素は電子の受容体として必要となっている。この電子を酸素でなくアミノ酸合成にまわす代謝工学を行い、菌本来の酸素要求量低減の可能性を検証する。

(4) 以上のようにして得た酸素利用に関わる遺伝子や呼吸の仕組みに関する知見、さらには電子の授受の仕組みの改変を目指す代謝工学を、目的とする低酸素適応株の育種に応用する。

### 4. 研究成果

(1) 酸素濃度を大気レベル(21%)から0%まで段階的に減らすと、コリネバクテリウム・グルタミクム野生株は酸素濃度の低下に伴い徐々に生育が弱まり、0.5%濃度付近にコロニー形成の限界があることがわかった。一方、硝酸が微量(0.1%)存在すると、無酸素環境でも弱いながら生育できるようになり、本菌は酸素の代わりに硝酸を電子の受容体とする、いわゆる硝酸呼吸を行えることがわかった。アスパラギン酸系列やグルタミン酸系列のアミノ酸生産菌を、硝酸を微量添加した寒天培地で培養すると、無酸素環境下でもアミノ酸生成が起こることをバイオアッセイで認めた。

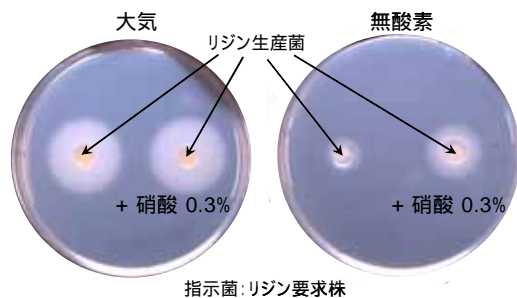


図1. 無酸素条件下でのリジン生産 (バイオアッセイ)

図1に大気条件および無酸素条件下でのリジン生産能を示した。無酸素下でも硝酸が存在するとリジン生成が起こることがハロー形成により明らかである。この結果は、酸素が本菌の生育に不可欠な物質ではなく、酸素呼吸の仕組みを別の仕組みに代替できれば、“低酸素適応株”の育種が不可能ではないことを示す。

(2) 本菌のゲノムには硝酸還元系遺伝子のホモログ(*nark2GHJ1*)が見いだされた。各遺伝子産物の推定機能に基づいて3種の鍵遺伝子(硝酸還元に関わる *narG*と *narJ*、および硝酸輸送に関わる *nark2*)を選択し、野生株から各々を欠失させた変異株を造成した。 *narG*と *narJ*の欠失株はともに硝酸還元活性と同時に硝酸依存の嫌気生育能を消失していた。 *nark2*の欠失株は硝酸還元活性を保持していたが、硝酸依存の嫌気生育能は損なわれていた。以上より、本菌の硝酸呼吸能は同領域のみに担われていると結論した。なお、酸素と硝酸が共存する環境では酸素呼吸を優先し、酸素が消失して初めて硝酸呼吸が始まることも見出した。しかし、その仕組みについては不明である。

(3) コリネバクテリウム・グルタミクムの野生株から変異誘導した多数の高濃度酸素要求株を受容菌として、本菌のゲノムライブラリから同形質を回復させるDNA断片を種々取得した。これらの塩基配列をデータベース解析し、DNA領域として6種を同定、次いでサブクローニングにより目的とする遺伝子を特定した。これらの中には、鉄の取り込みに関わるシデロフォア関連タンパク質や機能未知の膜タンパク質、シグマ因子等が含まれていた。一例として、図2に高濃度酸素要求株OX-3と同株の相補クローン(シデロフォア関連タンパク質遺伝子を含むプラスミドを保有)の種々の酸素濃度条件下における生育能を示した。

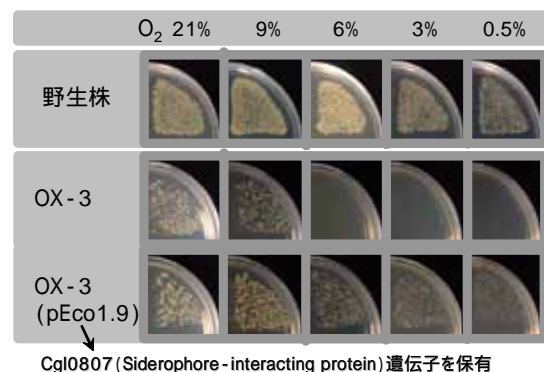


図2. 高濃度酸素要求株OX-3と相補クローンの酸素要求特性

図 2 より、OX-3 株は酸素濃度が低い条件では生育しないが、クローンはその形質が野生株に近いレベルにまで回復しているのがわかる。

野生株における各遺伝子の増幅効果を、最少培地を用いて攪拌培養と静置培養の 2 条件にて評価した。通常の攪拌培養では、いずれの遺伝子の増幅株もベクターのみの増幅株（対照株）に比べて生育速度が悪化する傾向を示したが、静置培養では対照株と同等か、むしろそれ以上の生育速度を示した。この結果は、これらの遺伝子の機能を強化することで、宿主菌株の低酸素適応性を高められる可能性を示すものである。

(4) NADH を発生する NAD 型酵素を NADP 型に改良または置換できれば、電子を酸素でなくアミノ酸合成にまわすことが可能となって酸素要求量を低減できる可能性がある。そこで、解糖系における NADH の発生源であるグリセルアルデヒド-3-リン酸 デヒドロゲナーゼ(Gap)に着目し、まず、本菌のもつ 2 種の Gap、すなわち GapA と GapB の生理的意義を解析した。その結果、NAD 型 GapA は解糖および糖新生の両方向の代謝に関わり、NADP 型 GapB は糖新生に関わること、さらに GapB は目的に叶う NADP 型でありながらグルコース代謝に関わる解糖方向の反応を行わないことがわかった（図 3 A）。

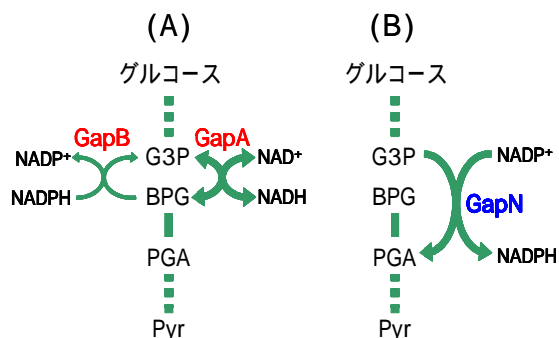


図 3 . GapAとGapB(A)およびGapN(B)の反応様式

一方、嫌気性菌には NADP 型でかつグルコース代謝に働く GapN の存在が知られる(図 3 B)。そこで、自前の GapAB 遺伝子に代えて、嫌気性菌の NADP 型 GapN のみを発現するコリネバクテリウム・グルタミクムの育種を試みた。GapN を持つことが報告されているストレプトコッカス・ミュータンスから同遺伝子をクローン化した。ついで、コリネバクテリウム・グルタミクム *gapB* 株ベースに、その GapA 遺伝子を GapN 遺伝子で ORF 置換し、ゲノム上での GapN 発現株を造成した。本株はグルコースで生育できるが、生育速度は野生株の 2 割程度であった。しかし、同株の長時

間培養液から、グルコースでの生育速度が大きく改善されたサブレッサー株を取得した。今後、このサブレッサー株の酸素要求特性ならびにアミノ酸生産性を評価していく。

#### 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 1 件)

Takeo, S., Ohnishi, J., Komatsu, T., Masaki, T., Sen, K. & Ikeda, M.: Anaerobic growth and potential for amino acid production by nitrate respiration in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**:1173-1182 (2007). 査読有, 信州大学機関リポジトリ <https://soar-ir.shinshu-u.ac.jp/dspace/handle/10091/272>

[ 学会発表 ] (計 7 件)

馬場将弘、小松朋葉、三橋敏、竹野誠記、池田正人：コリネ型アミノ酸生産菌の低酸素適応性に関わる遺伝子の解明、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 28 日、マリンメッセ福岡

村田了祐、小林亮介、三橋敏、竹野誠記、池田正人：異種細菌の NADP 型 GapN を発現するコリネ型細菌の育種、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 28 日、マリンメッセ福岡

Takeo, S., Komatsu, T., Masaki, T., Sen, K. & Ikeda, M.: Anaerobic growth and potential for amino acid production by nitrate respiration in *Corynebacterium glutamicum*. *Metabolic Engineering VII: Health and Sustainability*, September 14-19, 2008, Mexico.

小松朋葉、馬場将弘、大西淳子、竹野誠記、池田正人：コリネ型アミノ酸生産菌の酸素利用に関わる機能の探索、日本農芸化学会 2007 年度関西支部・中部支部合同大会、2007 年 9 月 22 日、中部大学

竹野誠記、正木達也、大西淳子、池田正人：コリネ型アミノ酸生産菌の硝酸呼吸遺伝子、日本農芸化学会 2007 年度大会、2007 年 3 月 26 日、東京農業大学

小松朋葉、大西淳子、竹野誠記、池田正人：コリネ型アミノ酸生産菌の高濃度酸素要求性変異株、日本農芸化学会 2007 年度大会、2007 年 3 月 26 日、東京農業大学

小林亮介、大西淳子、竹野誠記、池田正人：コリネ型アミノ酸生産菌における GapB の生理的特性、日本農芸化学会 2007 年度大会、2007 年 3 月 26 日、東京農業大学

〔その他〕

ホームページ

<http://karamatsu.shinshu-u.ac.jp/lab/ferment/index.htm>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

池田 正人 (IKEDA MASATO)

信州大学・農学部・教授

研究者番号：00377649

### (2)研究分担者

竹野 誠記 (TAKENO SEIKI)

信州大学・農学部・助教

研究者番号：30422702

### (3)連携研究者