

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：23303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05797

研究課題名(和文) 酸による遺伝子発現誘導システムの開発

研究課題名(英文) Development of acid inducible promoter in *Escherichia coli*

研究代表者

中川 明 (Nakagawa, Akira)

石川県立大学・生物資源環境学部・講師

研究者番号：10573107

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)：本研究は、安価な遺伝子誘導プロモーターの開発を目的として、酸による誘導システムを構築することを目的としている。既知の酸誘導プロモーターを解析したところ、*gadE*プロモーターを改変することによって、約200bpの酸誘導制御領域を構築できた。しかし、このプロモーターの発現量が少なかったため、基本転写領域を強めたところ、発現量は上昇したが、酸誘導性が弱まってしまった。そこで、強めた基本転写制御領域をわずかに弱めたところ、良好な誘導性を見いだせた。更にこのプロモーターを利用してタンパク質過剰発現を行ったが、菌体に酸誘導性の活性を見いだせたものの、明瞭なタンパク質過剰発現には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化成品は基本的に化学合成法で生産されるが、植物の有効成分等複雑な分子は化学合成法では難しいことがある。その場合、例えばアミノ酸等は、微生物の発酵技術で生産される事がある。微生物発酵生産では反応を促進するタンパク質を過剰に作らせる必要があるが、過剰に作らせるには現状ではコストがかかってしまう。本研究は安価な酸を加えるだけでタンパク質を過剰に作らせることができる可能性を秘めており、安価な化成品生産に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to construct an acid induction system for the developing an inexpensive gene induction promoter. According to analysis of known acid-induced promoters, we successfully constructed an acid-inducible 200 bp promoter by modifying the *gadE* promoter. However, the expression level of this promoter was low. Next, when the basal transcription region was strengthened, the expression level increased, but the acid inducibility weakened. Therefore, when the strengthened basic transcriptional control region was slightly weakened, acid inducibility was found again. Furthermore, protein overexpression was performed using this promoter, and although acid-induced activity was found in the cells, no clear protein overexpression was achieved.

研究分野：応用微生物学

キーワード：大腸菌 微生物発酵 合成生物学 プロモーター工学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物を利用した有用物質の発酵生産は、グリーンケミストリーの必要性や環境負荷低減という観点から、昨今、様々な物質において利用されている技術である。発酵生産技術には、タンパク質製剤や生合成経路における酵素の発現等、タンパク質の効率的な発現が必須である。しかし、タンパク質の高発現は時として、微生物にとって毒であり、生育を阻害してしまう、一方で、生産には大量のタンパク質発現が望まれている。こうしたジレンマを解決するために、生育期には発現を抑え、十分な生育後にタンパク質発現を行う、いわゆる発現誘導系が構築されている。しかし、非常に研究の進んだ大腸菌においてさえ、高価な誘導物質を必要とする発現誘導系が主流となっている。

そこで、応募者は、安価な発現誘導系として、酸誘導系を提案する。酸誘導プロモーターは、安価な塩酸や酢酸を単純に培地に加え、pH5.5 程度にするだけで、発現誘導が可能である。また、通常物質生産における微生物の培養には糖を用いるために、有機酸が生成され、培地が酸性になるため、糖のフィードによる半自動的な誘導も可能にする。

大腸菌における酸誘導プロモーターは、いくつか同定されているものの、その制御は発現誘導系として用いるには複雑すぎるため、即座には利用できない。

よって、本研究では、単純な酸誘導系プロモーターを創製することを目的として、既存の酸誘導プロモーターの解析から酸誘導に適したプロモーター配列を明らかにする。

応募者の提案する酸誘導系は、有用化合物の微生物発酵生産における基盤技術として、重要な役割を果たせると考えられる

2. 研究の目的

本研究の目的は、まず、難解である大腸菌における酸誘導プロモーターを解析し、酸に応答する最小エレメントを同定することにある。更に、その最小エレメントを用いてタンパク質発現及び植物二次代謝産物等の有用な化合物を生産することである。

3. 研究の方法

(1) GadEXW の DNA 結合配列は非常に似ており、主として Gad Box と呼ばれる配列に結合する。しかし、Gad Box のみで酸によって誘導されるかは未だ検証されておらず、応募者はまず、Gad Box が酸誘導に十分であることを検証する。既知の酸誘導プロモーターである *gadB* プロモーター及び *gadE* プロモーターについて検証した。それぞれのプロモーター領域を *lacZ* 遺伝子に融合し、 β -ガラクトシダーゼ活性を指標に酸誘導性を観察し、更にプロモーター領域を狭めることによって、酸誘導性を示す領域を同定する。

(2) もう一つのアプローチとして、Gad Box を拡張することにより、酸誘導性を見出すことを試みた。既知の *gadB*、*gadE* プロモーターにおける Gad Box を広げることにより、どの領域がどの程度酸誘導性に寄与しているかを明らかにし、有用な酸誘導プロモーターを創製する

(3) 同定された酸誘導プロモーターを利用して、タンパク質過剰発現や物質生産を試みる

4. 研究成果

(1) 酸誘導性を観察するにあたって、LacZ Assay 系を構築した。当初、結果が振れていたが、

Assay に用いる培養液量を増やすことにより、安定的な結果が得られるようになった。最初に *gadB* 遺伝子の酸誘導性について観察を行った。その結果、液体培地であまりエアレーションが良くない条件において、およそ6倍程度の酸誘導性が確認された。しかし、エアレーションがよい場合、2倍程度とあまりきれいな誘導は見られなかった(図1)。生育相は対数増殖期での酸誘導がもっとも大きな誘導性を示した。*gadB* 遺伝子の酸応答に關与する制御領域 Gad Box のみでは、酸誘導性を示さなかったが、Gad Boxの周辺を広げるにつれて酸誘導性を示すようになった。続いて *gadB* のプロモーター領域を段階的に削除することによって、酸誘導性を観察した。しかし、その応答の度合いは低く、削るごとに徐々に酸誘導性は示さなくなったが、核となるような酸誘導性を示すエレメントは発見されなかった(図2)。ただし、特に GadXW の結合領域が、酸誘導性を示す重要な配列であることはわかった。*gadB* の酸誘導性プロモーターの解析は、領域が長いために、解析が難しいと判断した。

(2) *gadB* 遺伝子の解析が不首尾のため、もう一つの酸誘導性を示す *gadE* の制御領域について研究を進めた。明瞭な酸誘導性が確認されたが、その発現量は低く、応用利用は難しいと判断した。*gadE* のプロモーターの 因子結合配列をコンセンサス配列に近づけることにより強化したプロモーターを作製した。その結果、こちらの Gad Box においてもそれのみでは酸誘導性は発揮されなかったが、3つある Gad Box の内、F1 と F2 を融合したプロモーターにおいて酸誘導性が認められた。F1、F2 を融合した配列は 400bp と比較的長いため、F1 と F2 の間の配列を縮めたところ、およそ 200bp 以内に2つの Gad box を含むようなプロモーターで、十分な酸誘導性が認められた。このプロモーターを酸誘導転写制御因子をコードしている *gadE*、*ydeO*、*evgA* を欠失している大腸菌内に導入したところ、酸誘導性が見られなかった。この 200bp 領域は YdeO や EvgA の制御領域を含まないため、YdeO や EvgA に直接的に制御されていない可能性が考えられる。更に、本プロモーターは非常に弱く、応用性が乏しく、観察もしにくいいため、基本転写制御領域を *lacUV5* のものと置換した。その結果、20 倍の活性を示し、酸誘導性も確認された。しかし、本プロモーターは非酸性条件下で転写されているために誘導性という点では利用しにくい。すなわち、発現量の増加は観察されたが、酸誘導性が弱くなり、また、酸を添加していない状況でも発現が見られたことから、応用利用可能性は乏しいという結果になった(図2)。

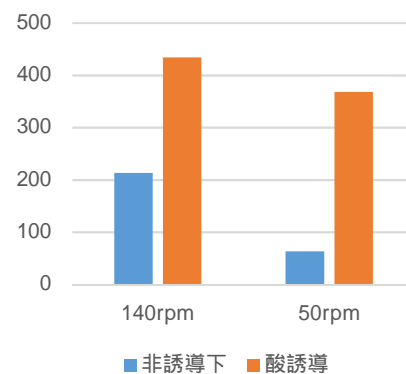


図1 *gadB* プロモーターのエアレーションの違いと酸誘導性

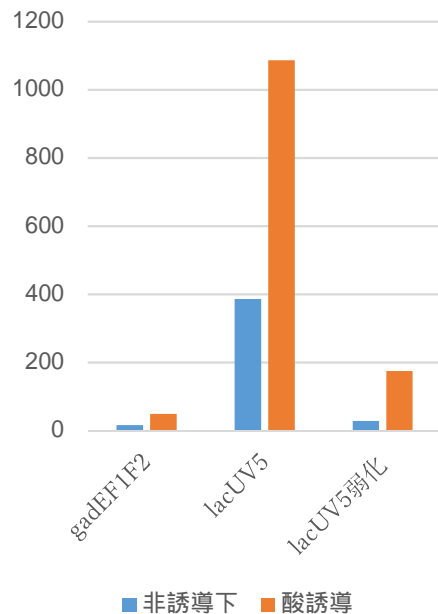


図2 改変型 *gadE* プロモーターの酸誘導性

(3) 誘導性強化のため、酸誘導に重要な役割を果たしている GadE、RcsB を過剰発現した株で

gadE 基本転写強化プロモーターの酸誘導性を検証したが、酸誘導性に大きな変化は見られなかった。

(4) *lacUV5* の基本転写制御領域の配列を弱めることにより、非誘導下における発現を抑えたところ、およそ6倍の酸誘導性を観察することができたが、改変型 *gadE* プロモーターのわずか3倍程度の活性を示した。

(5) *lacUV5* 弱化型 *gadE* プロモーターに *Pseudomonas putida* 由来のドーパデカルボキシラーゼ遺伝子を融合させ、タンパク質レベルでの発現誘導性を観察したが、明瞭な発現誘導は観察されなかった。

(6) 今後の課題として、*lacUV5* 型 *gadE* プロモーターをベースとして、リークレベルを低減する必要がある。酸誘導性転写制御因子には転写を抑えることにより酸誘導性を示すものもあるため、それら因子結合配列を導入することにより、応用性の高い酸誘導プロモーターを開発する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 (R)ーレチクリンの生産方法	発明者 中川明、南博道	権利者 石川県立大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-116701	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------