

機関番号：32657

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580085

研究課題名（和文） コリネバクテリウム グルタミカムの新規なストレス応答機構

研究課題名（英文） Analysis of novel stress responses in *Corynebacterium glutamicum*

研究代表者

中松 亘 (NAKAMATSU TSUYOSHI)

東京電機大学・工学部・教授

研究者番号：40339065

研究成果の概要（和文）：コリネバクテリウム グルタミカム野性株のグルタミン酸過剰生産を誘導するストレス条件において転写量が増加する遺伝子計7種について機能解析を行い、*NCg12944*, *NCg12945*, *NCg12946* がグルタミン酸過剰生産誘導ストレスへの対応ばかりでなく、生育にも重要な機能を担う遺伝子であることが示唆された。また、グルタミン酸過剰生産ストレス時に中枢糖代謝に直結する酵素活性が顕著に増加することを見出した。

研究成果の概要（英文）：We analyzed 7 genes that are upregulated when glutamate overproduction is induced in *Corynebacterium glutamicum*. Our results suggested that 3 genes-*NCg12944*, *NCg12945*, and *NCg12946*-were responsible for not only coping with the stress that induced the overproduction of glutamate but also growth in a synthetic medium. Further, we found significantly increased activities of 3 enzymes that catalyze reactions directly connected with the central carbon metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：コリネバクテリウム グルタミカム、*Corynebacterium glutamicum*、ストレス応答
アミノ酸発酵

1. 研究開始当初の背景

我々はアミノ酸発酵等有用物質の生産で広く使用されている微生物であるコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) に関する研究を行ってきた。その過程で、この微生物がグルタミン酸を過剰生産する代表的条件、すなわち、ビオチン制限培養、脂肪酸系界面活性剤 (Tween 40) 添加培養、ペニシリン添加培養の3条件のい

れかにおいて転写量が大きく増加する遺伝子、およびこれら3条件のいずれの場合においても転写量が有意に増加する遺伝子を計7種 (*NCg10226*, *0917*, *2841*, *2944*, *2945*, *2946*, *2975*) 見出した。これらの遺伝子はいずれも50～90 アミノ酸残基程度から成る短いタンパク質をコードすると推定されているが、機能が明らかにされたものは無かった。

これらの遺伝子をプラスミドを用いて増

幅したところ、多くの遺伝子が生育やグルタミン酸生産に影響を及ぼすことが判明した。従って、これらの遺伝子はグルタミン酸過剰生産を誘導するストレスに応答し、菌の生育やグルタミン酸過剰生産を関係する非常に興味深い遺伝子であると推定された。

2. 研究の目的

コリネバクテリウム グルタミカム野性株のグルタミン酸過剰生産を誘導するストレス条件、すなわち、ビオチン制限培養、脂肪酸系界面活性剤 (Tween 40) 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転写量が大きく増加する遺伝子、およびこれら3条件のいずれの場合においても転写量が有意に増加する遺伝子を計7種の機能を解析し、微生物の新たなストレス応答機構の理解とその産業応用を目指すことである。

3. 研究の方法

(1) *C. glutamicum*として ATCC 13869 株を用いた。

(2) 培地は以下のものを用いた。CM2B培地: 10 g/l poly peptone, 10 g/l yeast extract, 5 g/l NaCl, 10 µg/l D-biotin (pH 7.0), グルタミン酸生産培地: 60 g/l glucose, 30 g/l (NH₄)₂SO₄, 0.4 g/l MgSO₄·7H₂O, 0.01 g/l FeSO₄·7H₂O, 0.2 mg/l thiamine, 60 µg/l D-biotin, 0.48 g nitrogen/l soybean protein hydrolysate 50 g/l CaCO₃, G20 培地: 20 g/l glucose, 10 g/l (NH₄)₂SO₄, 1 g/l KH₂PO₄, 0.4 g/l MgSO₄·7H₂O, 0.01 g/l FeSO₄·7H₂O, 0.2 mg/l thiamine, 60 µg/l D-biotin, 0.48 g nitrogen/l soybean protein hydrolysate, 50 g/l CaCO₃。

(3) グルタミン酸過剰生産培養は以下のように行った。CM2B プレートで生育させた菌体の1/8 プレート分を500 ml 容の坂ロフラスコに張り込んだ20 ml のグルタミン酸生産培地に植菌した。31.5°Cで24時間培養後、培養液の2 ml を取り、500 ml 容の坂ロフラスコに張り込んだ20 ml のグルタミン酸生産培地に植菌した。尚、ビオチン制限培養を行う場合には、D-biotin 濃度が3 µg/l の培地を使用した。更に18時間培養を行った後、微生物の生育と生成グルタミン酸量の測定を行った。微生物の生育は濁度を測定することで行った。生成グルタミン酸量の測定は、グルタミン酸オキシダーゼを用いる方法で行った。

(4) *NCg12944*, *NCg12945*, *NCg12946* 破壊株の構築は以下のように行った。*NCg12944*, *NCg12945*, *NCg12946* は染色体上に並んで存在し、これらがコードすると推定されるタンパ

ク質は非常に短く、またこれら3種のタンパク質の相同性が高いことから、3遺伝子をまとめて破壊することとした。*NCg12944* の下流側約76塩基と*NCg12946* の上流側約75塩基を残し、その間にカナマイシン耐性遺伝子を挿入することによって破壊遺伝子を作製した。相同組換え領域は*NCg12946* 上流約500 bp および*NCg12944* 下流約600 bp の領域を用いた。これを *sacB* 遺伝子を有しかつ *C. glutamicum* においては複製能を持たないプラスミド pBS4S に連結し、相同組換えにより染色体上の野生型遺伝子とプラスミド上の破壊遺伝子が置換された遺伝子破壊株を取得した。尚、*NCg12946* 上流約500 bp の増幅に用いた PCR プライマーは 5' -cctgagctggcaccagttcaatcagc-3' および 5' -ggtactgctcctgaatttgagcgc-3'、*NCg12944* 下流約600 bp の増幅に用いた PCR プライマーは 5' -agagcagttccagcacttc-3' および 5' -cctgagctccacacagacactg-3' である。また、破壊の確認は PCR によって行った。

(5) 相補株の作製は以下の3通りで行った。
① *NCg12944-NCg12946* 領域並びにプロモーター領域を含むと考えられる上流域約600塩基、更に下流域約400塩基を併せて増幅するために作製したプラスミドにクロラムフェニコール耐性遺伝子を連結したプラスミドを破壊株に導入した。

② *NCg12944-NCg12946* 領域を、最も上流に位置する *NCg12946* のRBS配列から最下流の *NCg12944* の更に下流約400 bp までをPCRにより増幅した。増幅したDNA断片を *C. glutamicum* と *E. coli* とのシャトルベクターである pVK7 にクロラムフェニコール耐性遺伝子を連結したプラスミドの *lac* プロモーター下流に連結したプラスミドを作製した。尚、増幅に用いたPCRプライマーの配列は 5' -ccacttaaaggagttcaacatgttcgatcag-3' (下線部は開始コドン) および 5' -gtctctgcggttccggaatcc-3' である。

③ 前記の通り、*NCg12944*, *NCg12945*, *NCg12946* は染色体上並んで存在し、これらがコードすると推定される3種のタンパク質は相同性が高いことから、最上流に位置する *NCg12946* のみで相補が可能か検討するために *NCg12946* のRBS配列から終止コドン下流15 bp までをPCRにより増幅し、*C. glutamicum* と *E. coli* とのシャトルベクターである pVK7 にクロラムフェニコール耐性遺伝子を連結したプラスミドの *lac* プロモーター下流に連結した作製した。尚、増幅に用いたPCRプライマーの配列は

5' -ccacttaaaggagttcaacatgttcgatcag-3' (下線部は開始コドン) および 5' -cttgaagcgtcccctcatgtgttcttaggaagag-

3' (下線部は終止コドンである。)

(6) 変異型 *NCg12946* の作製は以下のように行った。前述のように *NCg12946* は 56 アミノ酸残基よりなる短鎖のタンパク質をコードすると推定されている。*NCg12946* が転写後翻訳されて実際にタンパク質として機能しているのか否かを検証するため、以下の 3 種の変異型 *NCg12946* を作製した。

①開始コドンを終止コドンに変えた変異型 *NCg12946* を PCR により作製した。PCR に用いたプライマーは

5' -ccacttaaggaggttcaac tagttcgatcagattc ag-3' (下線部は開始コドンの位置 (終止コドンに変換), 斜体は変異箇所) および

5' -cttgaagcgtccctcatgtgttcttaggaagag-3' (下線部は終止コドン) である。

②開始コドンの直後に 1ヌクレオチドを挿入しフレームシフト変異を導入した *NCg12946* を PCR により作製した。PCR に用いたプライマーは

5' -ccacttaaggaggttcaacatgttcg tatcagattcag-3' (下線部は開始コドンの位置, 斜体は変異箇所) および

5' -cttgaagcgtccctcatgtgttcttaggaagag-3' (下線部は終止コドン) である。

③開始コドンの直後に終止コドンを導入した変異型 *NCg12946* を PCR により作製した。PCR に用いたプライマーは

5' -ccacttaaggaggttcaacatgttc tagcagattcag-3' (下線部は開始コドンの位置, 斜体は変異箇所) および

5' -cttgaagcgtccctcatgtgttcttaggaagag-3' (下線部は終止コドン) である。

作製した変異型 *NCg12946* は *C. glutamicum* と *E. coli* とのシャトルベクターである pVK7 にクロラムフェニコール耐性遺伝子を連結したプラスミドの *lac* プロモーター下流に連結し、*C. glutamicum* に導入した。

(7) 粗酵素抽出液の作製は以下のように行った。培養終了後の菌体を遠心にて回収後、0.2% (w/v) KCl で洗浄した。菌体をバッファー (100 mM TES-NaOH (pH 7.6), 30% (w/v) glycerol) にけん濁し、超音波により破碎した。未破碎菌体等を遠心にて除いた後、ゲルろ過カラムに通し、低分子物質を除去した。

(8) ピルビン酸:キノン オキシドレダクターゼ活性の測定は以下のように行った。100 mM MES-NaOH (pH 6.0), 10 mM MgCl₂, 0.1 mM TPP, 1.0% (w/v) Triton X-100, 10% (w/v) glycerol, 300 μM DCPIP, 100 mM pyruvate および粗酵素抽出液から成る反応液を用いた。40°C で反応を行い、600 nm での吸光度の変化を測定した。

(9) イソクエン酸リアーゼ活性の測定は以下のように行った。100 mM MOPS-NaOH (pH 7.3), 0.2 mM NADH, 2.5 mM イソクエン酸, 10.0 U/μl 乳酸デヒドロゲナーゼ, および粗酵素抽出液から成る反応液を用いた。30°C で反応を行い、340 nm での吸光度の変化を測定した。

(10) マリックエンザイム活性の測定は以下のように行った。100 mM Tris-HCl (pH 7.8), 5 mM MgCl₂, 0.6 mM NADP⁺, 40 mM L-リンゴ酸, および粗酵素抽出液から成る反応液を用いた。30°C で反応を行い、340 nm での吸光度の変化を測定した。

4. 研究成果

(1) *NCg12944*, *NCg12945*, *NCg12946* 破壊の効果: *NCg12944-2946* 領域をカナマイシン耐性遺伝子に置換することで破壊した株はグルタミン酸生産培地ではほとんど生育しなかった。そこで、G20 培地と CM2B 培地での生育について検討を行った。図 1 に示すように、複合培地である CM2B 培地では破壊株も比較的良好に生育したが、合成培地である G20 培地では対照に比べ生育が悪かった。

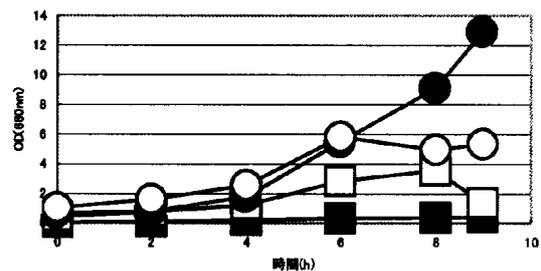


図 1 *NCg12944*, *NCg12945*, *NCg12946* 破壊の生育

●: 野生株 (empty vector 保有), G20 培地、
○: 野生株 (empty vector 保有), CM2B 培地、
■: 破壊株, G20 培地、□: 破壊株, CM2B 培地

破壊株の CM2B 培地での生育が比較的良好だったことから当該領域が栄養要求に関与する可能性が考えられたため、G20 培地に CM2B 培地の成分である polypeptone および/または yeast extract を添加した培地における破壊株の生育について検討を行った。破壊株の生育は、G20 培地に polypeptone および/または yeast extract を添加した培地では改善した (データ示さず)。従って、*NCg12944*, *NCg12945*, *NCg12946* は栄養要求に関与している可能性が考えられた。

(2) *NCg12944*, *NCg12945*, *NCg12946* 破壊株への *NCg12944*, *NCg12945*, *NCg12946* 領域導

入の効果：作製した破壊株が標的遺伝子のみが破壊された目的のものであるかどうか確認する目的で、方法の項に記載し3種類の相補株の作製を行った。そのうちのひとつである *NCg12944-NCg12946* 領域並びにプロモーター領域を含むと考えられる上流域約 600 塩基、更に下流域約 400 塩基を増幅するために作製したプラスミドを破壊株に導入したところ、部分的ではあるものの生育の回復が認められた。この傾向は、*NCg12944-NCg12946* 領域を最も上流に位置する *NCg12946* の RBS 配列から最下流の *NCg12944* の更に下流約 400 塩基までを導入した場合にも認められた。

(3) *NCg12944*, *NCg12945*, *NCg12946* 破壊株への *NCg12946* 領域導入の効果：*NCg12944*, *NCg12945*, *NCg12946* がコードすると推定されるタンパク質の類似性は高いことから、最上流に位置する *NCg12946* の RBS 配列から終止コドン下流 15 塩基までをプラスミドを用いて破壊株に導入したところ、*NCg12944-NCg12946* 領域を導入した場合と同程度の生育の改善が見られた。

(4) *NCg12946* がタンパク質をコードしているか否かについての検討：*NCg12946* は 56 アミノ酸残基より成る短鎖のタンパク質をコードすると推定されている。*NCg12946* が転写後翻訳されて実際にタンパク質として機能しているか否かを検証するために作製した3種類の変異型 *NCg12946*、すなわち①開始コドンを終止コドンに変更したもの、②開始コドンの直後に1ヌクレオチドを挿入しフレームシフト変異が生じるようにしたもの、③開始コドンの直後に終止コドンを導入したものそれぞれを、プラスミドで *NCg12944*, *NCg12945*, *NCg12946* 破壊株に導入したところ、いずれも *NCg12946* 単独で導入した場合と同程度の生育の改善が見られた。従って、*NCg12946*、おそらく *NCg12944*, と *NCg12945* も、タンパク質に翻訳されることなく機能していることが示唆された。

(5) グルタミン酸過剰生産ストレス時の中枢糖代謝に直結する酵素活性の変化：グルタミン酸過剰生産ストレス下では2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性およびピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性が低下し、糖代謝のフラックスがグルタミン酸生成方向に変化していることが既に知られている。本研究では、グルタミン酸過剰生産ストレス下の菌体より調製した粗酵素抽出液中のピルビン酸：キノン オキシドレダクターゼ活性、イソクエン酸リアーゼ活性、マリックエンザイム活性について測定を行ったところ、非ストレス条件に比べ、ピルビン酸：キノン オキシドレダクターゼ活性は最大約 300%、イソ

クエン酸リアーゼ活性は最大約 180%、マリックエンザイム活性は最大約 290%と大きく変化していることが判明した。これからの酵素活性の大きな変化は、グルタミン酸過剰生産ストレス時の糖代謝フラックスの大きな変化を示していると考えられる。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計1件)

①鈴木 康寛, 橋本 賢一, 川崎 寿, 中松 亘, *Corynebacterium glutamicum* の *NCg12944-NCg12946* 遺伝子破壊の影響、日本農芸化学会大会、2009年3月28日、福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中松 亘 (NAKAMATSU TSUYOSHI)
東京電機大学・工学部・教授
研究者番号：40339065

(2) 研究分担者

川崎 寿 (KAWASAKI HISASHI)
東京電機大学・工学部・教授
研究者番号：90349788

(3) 連携研究者 なし