

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月12日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580089

研究課題名（和文） コリネバクテリウム・グルタミクムの酸素要求性改変への代謝工学

研究課題名（英文） Engineering of oxygen-requiring properties  
in *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（和文）：コリネバクテリウム・グルタミクムにおいて微好気生育能に関わる遺伝子を6種同定した（Cgl10807, Cgl1102, Cgl10600, Cgl1427, Cgl2857, Cgl2859）。この内、核酸合成に関わる Cgl1427（シチジル酸キナーゼ遺伝子）を中心とした解析から、同機能が低酸素環境での正常な DNA 合成に重要な役割を担っていることを明らかにし、同菌において酸素が不足すると DNA 合成が生育の律速になりうることを初めて示唆した。一方、酸素の必要量そのものを減らすとの観点から、解糖系で NADH に代えて NADPH を産生するコリネ菌を育種し、物質生産宿主としての可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：We identified six genes relevant to the microaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum*; Cgl10807, Cgl1102, Cgl10600, Cgl1427, Cgl2857, and Cgl2859. Among these, the Cgl1427 gene encoding cytidylate kinase was shown to play an important role in DNA synthesis when cells were grown under low oxygen concentrations, suggesting that DNA synthesis might become a limiting factor for growth under oxygen limitation. Meanwhile, from the viewpoint of reducing oxygen requirement itself, we engineered a *C. glutamicum* strain with a modified glycolytic pathway that can generate NADPH instead of NADH, and showed its potential as a host for biotechnological processes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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) 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、コリネバクテリウム・グルタミクムの微好気生育に関わる遺伝子を特定する。

(2) 上記で特定した遺伝子の内、まず最初に核酸合成に関わる遺伝子に焦点を当てて、破壊株の造成と微好気生育能への影響を解析し、低酸素適応性との関連を解析する。

(3) 上記で特定した遺伝子の内、機能未知の膜タンパク質遺伝子に焦点を移して、破壊株の造成と微好気生育能への影響を解析し、低酸素適応性との関連を解析する。

(4) NAD 型 GapA に代えて異種細菌の NADP 型 GapN を発現するコリネバクテリウム・グルタミクムの育種を行い、この代謝工学が同菌の生理および物質生産にどのような影響を及ぼすかについて検討する。

## 4. 研究成果

(1) コリネバクテリウム・グルタミクムのゲノムから遺伝学的なアプローチで微好気生育能に関わる遺伝子を6種特定した。これらは、機能未知の膜タンパク質遺伝子2種 (Cgl2857 & Cgl2859)、シグマ因子 SigD 様遺伝子 (Cgl10600)、核酸の合成に関わるシチジル酸キナーゼ様遺伝子 (Cgl1427)、鉄の取り込みに関わるシデロフォア様遺伝子 (Cgl10807)、そして呼吸鎖に関わるフェレドキシン様遺伝子 (Cgl1102) であった。

(2) 上記6種遺伝子のうち、Cgl1427 遺伝子は、他菌種のシチジル酸キナーゼ遺伝子との相同性解析および酵素活性測定により、アノテーション通り、シチジル酸キナーゼ (図1)

をコードする遺伝子であると結論した。同遺伝子の破壊株では微好気条件の静置培養で生育が有意に悪化し、同遺伝子を含むプラスミドの導入で回復したことから、本遺伝子が確かに微好気生育に必要な機能を担っていることを確認した。

しかし、好気条件である攪拌培養で、同破壊株は野生株と比べ生育速度に差は無いものの、培養初期のラグ期のみが長期化するという現象を見出した。この現象はシード培養後半に起こる低酸素障害に起因していると考え、シードから本培養への移送時期を早めたところ、本問題は確かに解消された。本菌の DNA 合成には酸素が関わることから、破壊株ではシード培養後期、酸素不足に起因して DNA 合成能が低下しており、活発な DNA 合成が求められる本培養の初期に DNA 合成が律速になってラグ期が長期化している可能性がある。この仮説を検証するため、DNA 合成の鍵酵素リボヌクレオチドレダクターゼ (活性発現に酸素を要求) (図1) の遺伝子群をプラスミドに集約して破壊株に導入すると、ラグ期長期化が有意に改善された。さらに、Cgl1427 破壊株が静置培養で示す生育悪化も、同プラスミドを導入するとほぼ完全に解消された。

以上は、コリネバクテリウム・グルタミクムにおいて、低酸素環境下での正常な DNA 合成にリボヌクレオチドレダクターゼおよびシチジル酸キナーゼが重要な役割を担っていることを示しており、DNA 合成が低酸素適応能を改善するうえで目を向けるべき重要な視点であることを示唆するものである。

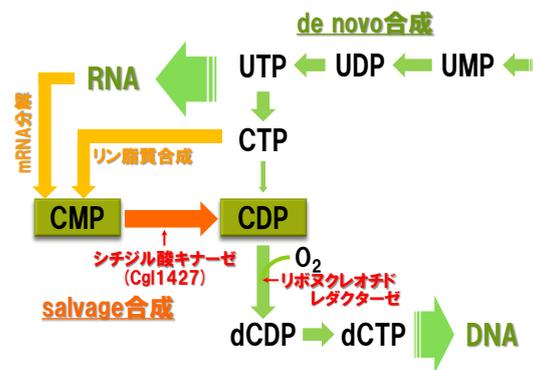


図1. ピリミジン生合成経路

(3) 機能未知の膜タンパク質遺伝子 Cgl2859 についても、破壊実験により、確かに微好気生育能に関わることを確認するとともに、上記の Cgl1427 と同様、低酸素環境での DNA 合成の効率に影響を与えていることを示唆する知見を得た。なお、同遺伝子は、そのホモログが大腸菌や枯草菌など他の微生物には存在せず、いわゆるコリネ型グルタミン酸生産菌に特有であり、機能は依然、不明である。

(4) 酸素の必要量そのものを減らすとの観点から、自前の NAD 型 GapA 代えて、ミュータンス菌の NADP 型 GapN を発現するコリネ菌の育種を行ってきた(図 2)。この GapN 発現株はグルコースで良好に生育できなかつたが、同株から生育が部分的に改善されたサプレッサー株を取得できることを見出した。代表株は NADPH 産生型の GapN 活性を保持しており、この株をベースに育種したリジン生産菌は対照株に比べて有意に高いリジン生産能を示した。酸素要求量の低下とリジン合成への NADPH 供給強化の 2 つの効果が相まった結果と推察される(図 2)。

代表株の全ゲノム解析を行い、サプレッサー変異が転写終結因子 Rho のミスセンス変異 (R696C) であることを突き止めた。同変異を GapN 株に導入すると確かに生育が改善されたが、野生株バックグラウンドでは生育への影響は見られず、代謝生理への影響は軽微と判断された。

なお、この位置の変異は大腸菌で Rho の転写終結活性に必要な ATP 加水分解活性を低下させ Rho の働きを弱めることが報告されている。従って、同変異を有するコリネ菌では Rho 依存遺伝子のリードスルーが起こり、下流遺伝子の発現上昇が起こっている可能性がある。

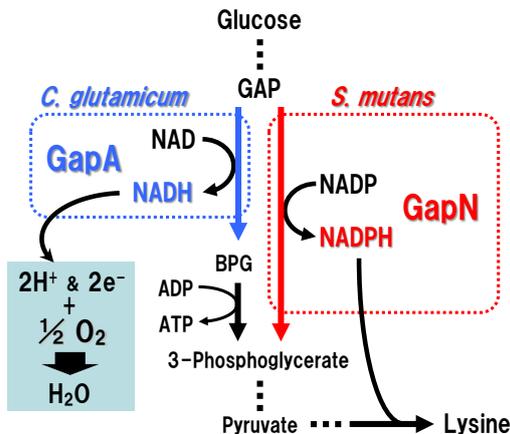


図 2. NAD型GapAおよびNADP型GapNの反応様式

## 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 2 件)

- ① Takeo S., Murata R., Kobayashi R., Mitsuhashi S. & Ikeda M.: Engineering of *Corynebacterium glutamicum* with an NADPH-generating glycolytic pathway for L-lysine production. Appl. Environ. Microbiol., 76(21):7154-7160 (2010). 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>

e/handle/10091/272

- ② Ikeda M., Baba M., Tsukamoto N., Komatsu T., Mitsuhashi S. & Takeo S.: Elucidation of genes relevant to the microaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum*. Biosci. Biotech. Biochem., 73(12):2806-2808 (2009). 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 12 件)

- ① 竹野誠記, 品川宗一郎, 村田了祐, 林 幹朗, 妹尾彰宏, 三橋 敏, 池田正人: コリネ型アミノ酸生産菌 GapN 発現株の生育を改善するサプレッサー変異の解析、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 25 日、京都女子大学
- ② 塚本修平, 白倉大輔, 馬場将弘, 三橋 敏, 竹野誠記, 池田正人: コリネ型アミノ酸生産菌の微好気生育に関わる核酸合成系遺伝子の機能解析、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 25 日、京都女子大学
- ③ Ikeda M.: From genome to producers in Glutamic acid bacteria., International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS 2011), 2011 年 9 月 8 日, 札幌コンベンションセンター
- ④ Ikeda M.: Redesign of *Corynebacterium glutamicum* redox metabolism on the model of *Streptococcus mutans*. BIT's 4th Annual World Congress of Industrial Biotechnology, 2011 年 4 月 26 日, Dalian, China
- ⑤ 竹野誠記, 村田了祐, 妹尾彰宏, 三橋 敏, 池田正人: コリネ型アミノ酸生産菌における還元力(NADPH)産生の代謝工学、日本農芸化学会 2011 年度大会シンポジウム、2011 年 3 月 28 日、京都女子大学
- ⑥ 村田了祐, 品川宗一郎, 妹尾彰宏, 三橋 敏, 竹野誠記, 池田正人: コリネ型アミノ酸生産菌の GapN 発現株が有するサプレッサー変異の特定、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 27 日、京都女子大学
- ⑦ 塚本修平, 馬場将弘, 白倉大輔, 牧内 勇, 三橋 敏, 竹野誠記, 池田正人: コリネ型アミノ酸生産菌の微好気生育に関わ

る膜タンパク質遺伝子の機能解析、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 27 日、京都女子大学

- ⑧ 池田正人：アミノ酸発酵菌の代謝工学、第 21 回微生物資源ワークショップ、2010 年 11 月 27 日、玉川大学
- ⑨ 池田正人：アミノ酸生産菌の低酸素適応性の改良に臨む、信州生物工学シンポジウム、2010 年 10 月 1 日、信州大学繊維学部
- ⑩ Takeo S., Murata R., Kobayashi R., Mitsuhashi S., Ikeda M.: Engineering of a *Corynebacterium glutamicum* with an NADPH-generating glycolytic pathway for L-lysine production. 11<sup>th</sup> International Symposium of the Genetics of Industrial Microorganisms. 2010 年 6 月 30 日, Melbourne, Australia
- ⑪ 竹野誠記、村田了祐、三橋 敏、池田正人：解糖系で NADPH を産生するコリネ型細菌の育種とリジン生産、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京大学
- ⑫ 馬場将弘、塚本修平、三橋 敏、竹野誠記、池田正人：コリネ型アミノ酸生産菌の微好気生育に関わる遺伝子の機能解析、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京大学

[図書] (計 1 件)

- ① Ikeda M. & Takeo S.: Genetic engineering of Corynebacteria. ASM Press, Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, 3rd Edition, Section III, Chapter 16: 225-237 (2010).

[その他]

ホームページ等

<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