

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 12 月 17 日現在

機関番号：32657

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580124

研究課題名(和文)電気生理の手法を用いた微生物のイオン排出システムの解析と新規排出システムの創製

研究課題名(英文) Analysis of microbial machinery for excretion by using patch-clamp method and creation of novel excretion system

研究代表者

川崎 寿 (KAWASAKI, Hisashi)

東京電機大学・工学部・教授

研究者番号：90349788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：様々な有用化合物を生産する微生物細胞工場の創製が望まれているが、目的有用化合物の全てに対してそれを特異的に細胞外へ排出する担体が予め天然に存在する可能性は低いと考えられる。

また、その合理的デザインも現時点では極めて困難である。

我々は、これまで困難であった排出活性を直接、1細胞、リアルタイムで計測するパッチクランプ法を微生物細胞に適用する独自のシステムを構築した。次に、そのシステムを用いて実際に排出活性を確認した上で、排出担体遺伝子の微生物細胞工場への導入を行い、Exporter Engineeringが「合成生物学」による微生物生産工場の創製において重要な因子の一つであることを示した。

研究成果の概要(英文)：While it is hoped that microbial cell factories can be created to produce various useful compounds, it is thought unlikely that a pre-existing natural exporter exists that can selectively export all of these useful compounds out of the cell. In addition, rational design of such exporters is, at present, extremely difficult. This is thought to be one cause of the inability of designed microbial cell factories to perform as expected, and there is demand for a breakthrough for this problem.

In this study, having confirmed the export activity of actual gene product using our unique patch-clamp system, we introduced exporter genes into microbial cell factories, and showed that exporter engineering is highly important in the creation of microbial cell factories by systems biology or synthetic biology.

研究分野：応用微生物学

キーワード：排出 代謝工学 合成生物学 発酵 Corynebacterium チャネル パッチクランプ法

1. 研究開始当初の背景

微生物機能を活用した有用物質の生産において細胞内で合成された物質を細胞外へ排出するプロセスは極めて重要である。有用物質排出系に関する報告は存在するものの、その重要性に見合う十分な解析はなされてこなかった。この主な理由は、膜タンパク質が担う排出システムは解析が困難なことである。

パッチクランプ法は膜を横切るイオンの輸送を電流として測定する方法で、リアルタイム性、定量性に優れると共に膜内外の電位差や物質組成、膜張力などを変化させることが可能なイオン輸送システム解析法として優れたものである。しかしながら、微生物への適用例は極めて限られてきた。我々は、装置の改良はもちろんのこと、細胞調製方法などについても改良を重ね微生物細胞にこのパッチクランプ法を適用し信頼性の高いデータを得るシステムを構築していた。更に我々は、この微生物解析のために独自のパッチクランプシステムを用いて、コリネ型細菌のグルタミン酸生産への関与が報告されている *NCgl1221* 遺伝子産物の解析や大腸菌の呼吸酵素の水素イオン排出についての解析が可能な段階まで準備を進めていた。

2. 研究の目的

(1) 微生物のイオン排出システムについて独自に開発したパッチクランプ装置を用いて基質特異性、エネルギー依存性、膜張力依存性など従来の方法では困難な解析を構造データを加味しつつ行う。

(2) 得られた結果を基に新たな排出システムを創製し、従来の発酵生産の効率を高めると共にこれまで発酵生産がなされていなかった物質の発酵生産への道を拓く。

3. 研究の方法

(1) グルタミン酸の工業生産に利用されている *Corynebacterium glutamicum* のグルタミン酸排出への関与が遺伝学的に示されている膜張力依存性チャンネル(メカノセンシティブチャンネル)について、独自に開発したパッチクランプシステムを用いて基質特異性、エネルギー依存性、膜張力依存性などを解析した。本システムを用いた実験方法の詳細は我々が既に報告したもの (*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 2012, pp.2546-2549) と同様であるが、簡潔に以下に記す。微生物細胞にパッチクランプ法を適用するためには細胞を大きくする必要があり、*C. glutamicum* 細胞を大きくする方法は知られていない。そこで巨大細胞調製法が既知である *Bacillus subtilis* を宿主とし、*C. glutamicum* 由来の当該遺伝子を発現させた細胞を巨大化して使用した。細胞の巨大化も既報に従い、リゾチムを用いてスフェロプラストを形成させた後、細胞壁合成阻害剤

存在下で培養することで行った。本研究では輸送の方向が重要である。すなわち細胞内で合成されたグルタミン酸の細胞外への輸送を観察することが目的である。そこで、巨大化細胞内に形成される反転膜胞をパッチクランプ実験に用いた。

パッチピペットはナリシゲの PC10 を用い、Drummond Scientific から購入したキャピラリー マイクロピペットを引き延ばして作成した。上記の方法で作成した反転膜胞に接近させ、吸引して密着させた後 Zap パルスを与えることで反転膜胞内とパッチピペット内を連結した。増幅器は日本光電の CEZ-2400 をベースに改良を加えたものを使用した。バッファは以下の組成のものを基本とし、適宜必要な基質を含むものを調製した。Bath buffer: 50.0 mM HEPES, 600 mM sorbitol, 10.0 mM MgCl₂, 29.2 mM KOH, pH 7.00

(2) (1)の結果を踏まえ、*Corynebacterium glutamicum* のグルタミン酸排出への関与が遺伝学的に示されている膜張力依存性チャンネル(メカノセンシティブチャンネル)をコードする遺伝子を *E. coli* 野生型株および各種有用物質を生産するよう育種された株に導入し、その効果を検証した。当該遺伝子の取得は、*C. glutamicum* の染色体 DNA を鋳型とした PCR によって行った。遺伝子の *E. coli* への導入はプラスミドを用いて行った。有用物質生産 *E. coli* を培養する際の培地は以下のものを基本に、必要な抗生物質等を含むものを用いた。生産培地: 20 g/L glucose, 16 g/L (NH₄)₂SO₄, 1 g/L KH₂PO₄, 0.01 g/L FeSO₄·7H₂O, 0.01 g/L MnSO₄·5H₂O, 1 g/L MgSO₄·7H₂O, 3 g/L MgSO₄·7H₂O, 30 g/L CaCO₃, and 100 mM IPTG (pH 7.1)。生産物の定量は、グルタミン酸についてはヤマサのグルタミン酸測定キットをその他のアミノ酸については島津製作所のアミノ酸測定装置を用いて行った。また、核酸系化合物の分析は、Shodex Asashipak GS-220 HQ カラムを用いた HPLC によって行った。

4. 研究成果

Corynebacterium glutamicum のグルタミン酸排出への関与が遺伝学的に示されている膜張力依存性チャンネル(メカノセンシティブチャンネル)の独自に開発したパッチクランプシステムを用いた解析

上記の方法に従って、*Corynebacterium glutamicum* のグルタミン酸排出への関与が遺伝学的に示されている膜張力依存性チャンネル(メカノセンシティブチャンネル)の遺伝子 (*NCgl1221*) を発現させた *Bacillus subtilis* 細胞を巨大化し、巨大スフェロプラスト内に形成された反転膜胞を用い、独自に開発したパッチクランプシステムによる解析を行った。

その結果、図 1 に示すように、反転膜胞に圧力をかけ、かつ、液胞様構造体外部をグルタミン酸を含むバッファに置換した場

合に、グルタミン酸が液胞様構造体の外部から内部へ移動した方向（反転膜胞であるので、生細胞では細胞の内部から外部の方向）に対応する電流が確認された。対照であるグルタミン酸を含まないバッファーに置換した場合にはこの電流値の約 20%であったことから、グルタミン酸を含むバッファーに置換した場合に観測された電流の大部分はグルタミン酸によるものと考えられる。すなわち、NCgl1221 遺伝子産物は膜張力依存性チャンネル（メカノセンシティブチャンネル）であり、膜張力にตอบสนองして開孔し、その孔はグルタミン酸を通すことが明らかとなった。更に、アスパラギン酸を含むバッファーに置換した場合も同様の電流が観測された。上記の実験の際には、ATP 等の高エネルギーリン酸化合物等はバッファーに加えていないため、観察されたグルタミン酸やアスパラギン酸の輸送は、それらの濃度勾配によって生じたものと考えられた。

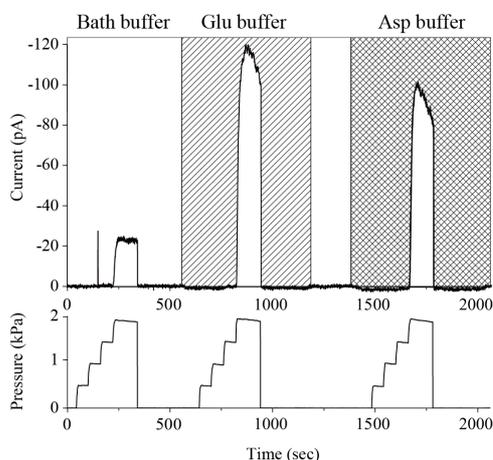


図1 NCgl1221 遺伝子産物の独自に開発したパッチクランプシステムによる解析

上記と同様の手法を用いて、フェニルアラニンの類縁化合物であるフェニルプロピオン酸やリシンが NCgl1221 遺伝子産物を通過するか検討を行った。その結果、両者ともグルタミン酸やアスパラギン酸と同様に、ATP 等を必要とせず濃度勾配のみで NCgl1221 遺伝子産物を通過することが明らかとなった。

C. glutamicum のグルタミン酸排出チャンネル遺伝子の他の有用物質生産微生物への導入効果

上記のように、*C. glutamicum* の NCgl1221 遺伝子産物はグルタミン酸排出チャンネルであり、このチャンネルの基質特異性は寛容であることが判明した。このことを生きた細胞で検証すること、並びに有用物質生産への利用可能性を検討することを目的として、合成生物学的手法を用いて、フェニルアラニンを生産するよう育種された *E. coli*、リシン

を生産するよう育種された *E. coli*、イノシンを生産するよう育種された *E. coli* それぞれに、*C. glutamicum* のグルタミン酸排出チャンネル遺伝子をプラスミドを用いて導入し、培養評価を行った。*C. glutamicum* のグルタミン酸排出チャンネルは上記のように膜張力にตอบสนองして開閉するメカノセンシティブチャンネルであるため、野生型 *C. glutamicum* のグルタミン酸生産の誘導には界面活性剤添加等の処理が必要である。ここで実施する実験においては、このような処理の副次的作用を排除する目的で gain-of-function の変異 (A111V (Nakamura *et al.*, AEM, 73, 4491 (2007))) を持つ遺伝子を導入した。フェニルアラニンを生産するよう育種された *E. coli* としては、フィードバック抑制が解除された宿主に、フィードバック阻害が解除された DS および CM-PD、並びに SK 遺伝子をプラスミドで導入した株 (特開 H5-344881)、リシンを生産するよう育種された *E. coli* としては、フィードバック阻害が解除された AK 遺伝子をプラスミドで導入した株 (日本国特許 2926990)、イノシンを生産するよう育種された *E. coli* としては、フィードバック抑制解除、イノシン分解系欠損、糖中央代謝系改変、アデニン系物質代謝系改変の変異をもつ宿主にフィードバック阻害が解除されたアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子をプラスミドで導入した株 (BBB, 70, 3069 (2006)) を用いた。*C. glutamicum* のグルタミン酸排出チャンネル遺伝子を導入した *E. coli* の培養は、基本的には研究の方法で記した方法に従い、必要に応じて抗生物質やその株が要求する物質を添加して実施した。

回収した培養上清を分析した結果、遺伝子導入によって、今回使用したフェニルアラニン生産株のフェニルアラニン生産量は対照と比較して約 2.5 倍、リシン生産株のリシン生産量は約 1.5 倍、イノシン生産株のイノシン生産量は約 9% 増となり、生産株によって効果の程度に差異が認められたものの、いずれの場合でも有意な効果があった。

したがって、*C. glutamicum* のグルタミン酸排出チャンネルは、生きた細胞においてもパッチクランプシステムでの解析結果同様、輸送する基質に対する特異性は低いと考えられた。また、その特性は様々な有用物質の生産において活用できる可能性が示された。

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)

Yamashita, C., Hashimoto, K., Kumagai, K., Maeda, T., Takada, A., Yabe, I., Kawasaki, H., and Wachi, M.^{*},
L-Glutamate secretion by the

N-terminal domain of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 mechanosensitive channel. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, **77**, 2013, pp.1008-1013
Hashimoto, K., Murata, J., Konishi, T., Yabe, I., Nakamatsu, T., and Kawasaki, H., Glutamate is excreted across cytoplasmic membrane through the NCgl1221 channel of *Corynebacterium glutamicum* by passive diffusion., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, **76**, 2012, pp.1422-1424

〔学会発表〕(計8件)

澤田康之、橋本賢二、中松亘、曾我部正博、川崎寿、分子動力学シミュレーションに支援された Tween 40 による *Corynebacterium glutamicum* のグルタミン酸過剰生成誘導機構の解析、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 03 月 27 日、岡山大学(岡山県・岡山市)
三井岳志、小西智之、橋本賢二、矢部勇、川崎寿、メカノセンシティブチャンネル遺伝子のリジン生産菌への導入効果、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 03 月 27 日、岡山大学(岡山県・岡山市)
Konishi, T., Hashimoto, K., Yabe, I., Kawasaki, H., Effects of introducing a mechanosensitive channel gene from *Corynebacterium glutamicum* into *Escherichia coli*, Mechanosensory transduction satellite symposium in junction with IUPAB2014, 2014 年 7 月 30 日~8 月 2 日、Gold Coast (オーストラリア)
Hashimoto, K., Konishi, T., Yabe, I., Kawasaki, H., Applicability of mechanosensitive channel in *Corynebacterium glutamicum* as a versatile exporter, 16th European Congress on Biotechnology, 2014 年 7 月 13 日~7 月 16 日、Edinburgh (英国)
橋本賢二、小西智之、李双春、三井岳志、中松亘、川崎寿、汎用型物質排出担体としての *Corynebacterium glutamicum* 由来圧力依存性チャンネルの有用性、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 03 月 30 日、明治大学(神奈川県・川崎市)
Kawasaki, H., Yabe, I., Hashimoto, K., L-Glutamate excretion through the NCgl1221 channel and its potential as a tool for exporter engineering、

Methods for the investigation of ion transport machinery in biological membranes, 2013 年 10 月 16 日、Italian institute of culture (千代田区・東京都)
Hashimoto, K., Konishi, T., Yabe, I., Nakamatsu, T., Kawasaki, H., Mechanosensitive channel as a potentially versatile exporters, Society for industrial microbiology and biotechnology annual meeting, 2013 年 08 月 11 日、San Diego (USA)
橋本賢二、山下周子、北嶋俊一、矢部勇、夏目亮、中松亘、川崎寿、和地正明、*Corynebacterium glutamicum* 由来のグルタミン酸排出チャンネルである NCgl1221 遺伝子産物の C 末端ドメインの電機生理学的手法を用いた解析、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 03 月 25 日、東北大学(宮城県・仙台市)

〔図書〕(計1件)

川崎寿、和地正明、学会出版センター、化学と生物(*Corynebacterium glutamicum* のグルタミン酸排出チャンネルの発見とその有用物質生産への展開)、2012 年、pp.441-449

〔産業財産権〕
出願状況(計1件)

名称: プリン系物質の製造法
発明者: 川崎寿、橋本賢二、中松亘、浅原貴之
権利者: 東京電機大学および味の素株式会社 (出願後味の素株式会社に譲渡済)
種類: 特許
番号: 特願 2013-161662
出願年月日: 2013 年 08 月 02 日
国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
川崎 寿 (KAWASAKI, Hisashi)
東京電機大学・工学部・教授
研究者番号: 90349788

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

橋本 賢一 (HASHIMOTO, Ken-ichi)

東京電機大学・工学部・助教

研究者番号：70508382