

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850047

研究課題名(和文) コリネ型細菌における長鎖脂肪酸排出輸送体の同定

研究課題名(英文) Identification of a long-chain fatty acid transporter in *Corynebacterium glutamicum*

研究代表者

竹野 誠記 (TAKENO, Seiki)

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号：30422702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：コリネバクテリウム・グルタミカムの脂肪酸分泌生産株を題材に、長鎖脂肪酸の排出輸送体の同定を試みた。目的の輸送体の候補遺伝子を4種抽出し、これらの単独および多重破壊を分泌株で実施した。4重破壊株では、脂肪酸非生産条件下では生育に影響が見られなかったのに対して、脂肪酸分泌生産条件下では生育が著しく悪化することを突き止めた。各候補遺伝子の単独破壊株のうち、1つの候補遺伝子の単独破壊株のみが、形質転換株間で個体差はあるものの4重破壊株と類似の傾向を示した。以上から、この遺伝子が脂肪酸排出に関わる有力候補であると考えられる。なお、現時点では、他の3遺伝子のいずれか1つ以上が関与している可能性も残る。

研究成果の概要(英文)：We attempted to identify a long-chain fatty acid transporter using fatty acid-producing strains of *Corynebacterium glutamicum*. After selecting four candidate genes for the transporter, we conducted single and multiple disruptions of these genes in the fatty acid-producing strain. The resulting quadruple-deletion strain exhibited severely impaired growth under culture conditions that enable extracellular production of fatty acids. However, such impairment was not observed under the conditions that do not permit fatty acid production. Similar results were observed only for the single-deletion strain in which a certain gene was disrupted. From these results, this gene is regarded to be the prospect involved in fatty acid transport. At present, there remains the possibility that one or more of the other candidates are also involved in the transport.

研究分野：応用微生物学

キーワード：fatty acid transporter *C. glutamicum*

1. 研究開始当初の背景

(1) 細菌を用いた脂肪酸生産のほとんどは大腸菌(脂肪酸分解欠損株)を出発宿主とするものであり、これらには共通の基盤技術が用いられている。その技術とは、チオエステラーゼを細胞質で過剰発現させるというものである(引用文献1)。大腸菌では、脂肪酸は、アシルキャリアタンパク質(ACP)に結合したアシル-ACPの形で生合成されるが、これをチオエステラーゼで遊離脂肪酸に加水分解すると、アシル-ACPによる脂肪酸生合成のフィードバック調節が回避されて、脂肪酸が過剰生産するという仕組みである。大腸菌では、ある種の多剤排出トランスポーターが、その排出基質の一つとして脂肪酸を排出することが示唆されているものの、その詳細については不明である。

(2) 脂溶性物質は細胞膜に自由に溶け込むため、自由拡散で透過すると考えられてきた。しかし、ヒトでビタミンEの吸収に脂質輸送体の関与が示唆されると(引用文献2)、脂質の膜透過にも選択的な輸送体が関わっていると考えられ始めていた。

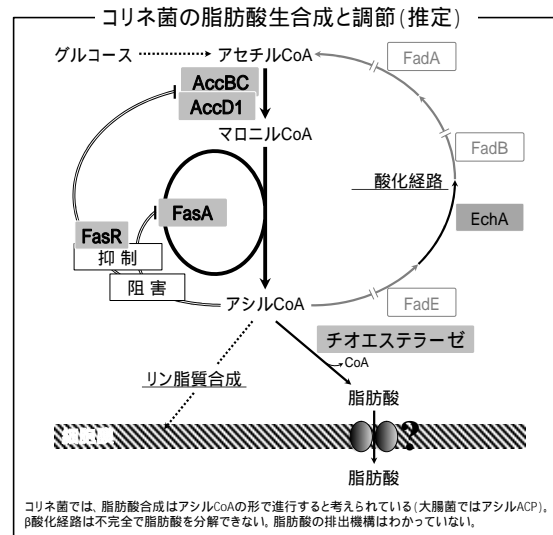
(3) 我々は、産業上重要な *Corynebacterium glutamicum* (以下、コリネ菌)では初めてとなる、長鎖脂肪酸を分泌生産する変異株を取得していた。その研究の過程で、コリネ菌では野生株から一段の自然変異によって脂肪酸分泌生産株が容易に得られることを見出していた(引用文献3; Takeno et al. 2013. *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**:3776-6783)。このことは、コリネ菌では1変異により脂肪酸の過剰合成と分泌が起こることを意味している。この知見に基づき、元来、脂肪酸の分解代謝系をもたないコリネ菌には、一種の解毒機構として、脂肪酸に特異的な排出系が備わっている可能性があると考えた。

(4) 脂肪酸の分泌生産に輸送体の関与を実証できれば、排出機能の育種ターゲットとしての重要性を提案できる。また、コリネ菌で脂肪酸生産の基盤となる技術を構築できれば、脂肪酸に留まらず、脂肪酸合成経路を経て合成される下流の機能性物質にも発酵生産の可能性を広げられると期待される。しかし、そのような排出輸送体はコリネ菌におい

ても同定されていなかった。

2. 研究の目的

我々が取得した長鎖脂肪酸の分泌生産株を用いて、その分泌に関わる排出輸送体を特定することを目的とした。



3. 研究の方法

(1) 分泌生産株は以下の と を用いた。

fasR 遺伝子破壊株 (*fasR* 株): 脂肪酸生合成遺伝子群のリプレッサータンパク質である FasR の機能喪失は、コリネ菌にオレイン酸を主体とする長鎖脂肪酸の過剰合成と分泌を同時に引き起こす。この知見は『1. 研究開始当初の背景』の(3)で述べた分泌生産株 PAS-15 の解析によって得ていたものであり、引用文献3にて既に報告を済ませていた。

PCC-6 株: PAS-15 株からさらに2段階の自然変異育種を重ねることによって取得した、脂肪酸の分泌生産量が段階的に向上した株である。この株が有する有効変異は全ゲノム解析で特定を済ませていた (*fasR20*, *fasA63^{pd}*, *fasA2623* の3変異; 引用文献3)。いずれも脂肪酸合成に関わる変異である。

(2) 排出輸送体の候補遺伝子を抽出する目的で、コリネ菌のゲノム情報を用いて網羅的な *in silico* 解析を行った。

<http://www.genome.jp/kegg/genes.html>

(3) *in silico* 解析で抽出した候補遺伝子に

ついてリアルタイム PCR を行い、野生株 - fasR 株 (脂肪酸分泌生産株) 間での比較発現解析を行った。

(4) 分泌生産株 PCC-6 を宿主に、比較発現解析により特定した遺伝子の単独および多重破壊を実施した。遺伝子破壊は Ohnishi らの既報 (引用文献 4) に従い、内部領域をインフレームで削除することにより行った。

(5) 取得した破壊株の生育特性を解析した。培養には、1%のグルコースを単一炭素源とする最少培地を用いた。

4. 研究成果

(1) ゲノム情報を用いた *in silico* 解析の結果、合計 26 種の遺伝子を候補遺伝子として抽出した。これら候補遺伝子はいずれも、排出する基質は不明であるものの、脂質との関連が示唆される遺伝子である。さらに解析を進めたところ、どの遺伝子もその上流に FasR の結合モチーフ (引用文献 5) を有さないことから、いずれも FasR の支配下遺伝子ではないことが示唆された。

(2) 上記の 26 遺伝子を対象とした野生株 - fasR 株間での比較発現解析の結果、大半の遺伝子は両者間で有意な差が認められなかったが、うち 4 遺伝子については fasR 株で有意に発現量が上昇していることを突き止めた。目的とする輸送体遺伝子はこれら 4 遺伝子に含まれていると考えられた。

(3) 目的の輸送体遺伝子であるならば、その破壊は脂肪酸分泌生産株の生理や脂肪酸生産量に影響を及ぼすはずである。PCC-6 株を宿主に上記 4 遺伝子の単独および多重破壊を行った結果、4 遺伝子すべてを破壊した株では、脂肪酸非生産条件下では生育に影響が見られなかったのに対して、脂肪酸分泌条件下では生育が著しく悪化することを突き止めた。各候補遺伝子の単独破壊株のうち、1 つの候補遺伝子の単独破壊株のみが、形質転換株間で個体差はあるものの 4 重破壊株と類似の傾向を示した。以上から、この遺伝子が脂肪酸排出に関わる有力候補であると考えられた。なお、現時点では、他の 3 遺伝子のいずれか 1 つ以上が関与している可能性も残

る。今後、細胞内の遊離脂肪酸濃度および脂肪酸生産性の評価も含めた詳細な解析が必要である。

<引用文献>

1. Cho and Cronan., *J. Biol. Chem.*, **270**:4216-4219 (1995)
2. 植田和光, 化学と生物 **50**:385-389 (2012)
3. Takeno et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**:6776-6783 (2013)
4. Ohnishi et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**:217-223 (2002)
5. Nickel et al., *Mol. Microbiol.*, **78**:253-265 (2010)

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)

[学会発表](計4件)

堀一将, 田中利果, 林幹朗, 竹野誠記, 池田正人: 還元力高産生コリネ型細菌によるペントース-リン酸経路非依存バリン発酵, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 3 月 18 日, 京都女子大学

村田紀子, 内蔵萌, 林幹朗, 竹野誠記, 池田正人: コリネ型細菌における新規脂肪酸増産変異, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 3 月 18 日

川上春佳, 加藤峻介, 林幹朗, 竹野誠記, 池田正人: ピメリン酸バイオアッセイ用に開発した指示菌 BioF-4 株の特性解析, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 3 月 18 日, 京都女子大学

中村絵梨, 長島堯, 林幹朗, 竹野誠記, 池田正人: コリネ型細菌の持つ 2 種の I 型脂肪酸合成酵素のリポ酸合成への関与, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 3 月 18 日, 京都女子大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/agriculture/lab/ferment/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

竹野 誠記 (TAKENO, Seiki)
信州大学・学術研究院農学系・准教授
研究者番号 : 30422702

(4)研究協力者

池田 正人 (IKEDA, Masato)
信州大学・学術研究院農学系・教授
研究者番号 : 00377649