

論文の内容の要旨

論文題目 絶対メタノール資化菌 *Methylobacillus* sp. 12S 株の
細胞外多糖生合成系の解析

氏名 吉田 貴子

C1 化合物であるメタンは天然ガスの主要成分であり、豊富な天然資源として注目を集めている一方、温暖化寄与係数が二酸化炭素と比較して 21 倍も高く、環境への安易な放出が問題視されている。またメタノールはメタンから一段階で合成可能であり、同様に豊富な資源として注目を集めてきた。これら C1 化合物は安価で大量に入手可能であることから、古くから発酵基質としての応用が検討されている。本研究では、C1 資化菌の多くが EPS 生産能を保持していることに着目し、豊富な天然資源である一方、環境汚染物質でもあるメタンやその合成物メタノールから各種糖物質を発酵生産することを目的とした。本研究ではメタノールを C1 化合物のモデル物質として選定し、EPS 生産能を有するメタノール資化菌をスクリーニングした。得られた菌株から、遺伝子工学的手法を用いてオリゴ糖、単糖といった糖物質を生産する変異株の作製を試みるほか、その EPS 生合成系遺伝子について分子生物学的に解析することを目的とした。

【EPS 生産能を有するメタノール資化菌の土壌からの単離とその EPS の構造解析】

千葉県田畑土壌 50 種より EPS を生産するメタノール資化菌をスクリーニングした結果、ムコイド形態を呈する 12S 株を単離した。メタン資化性の有無および 16S rDNA 配列の相同性に基つき、本菌株は絶対メタノール資化性 *Methylobacillus* 属と同定された。

また、12S 株が生産する EPS をメタノランと命名し、その構造を解析した結果、グルコース、ガラクトース、マンノースを約 2.4 : 1.0 : 1.0 の割合で含む分子量 10^5 - 10^6 の多糖であることを明らかにした。 *Methylobacillus* 属細菌の中で多糖生産が報告されている菌株では、いずれの場合もポリグルコースの合成が確認されている。 12S 株は、これら既知の菌株とは異なり、グルコースのほかにマンノース、ガラクトースといった中性糖を含むヘテロ多糖を生産していることから、新種の可能性が強く示唆された。

【単糖、オリゴ糖を生産する変異株の構築とその蓄積物質の同定】

メタノランの構造より、12S 株はメタノールを基質としてグルコースを生産するポテンシャルが高いことが推測された。 さらに、12S 株は絶対メタノール資化菌であるため、自らが細胞外に蓄積する糖物質を、それが例えグルコースであっても異化することができない性質も有しており、メタノールから糖物質を発酵生産する菌株として非常に有効であることが示唆された。 そこで、12S 株の EPS 生合成能に変異を加えることで、グルコースなどの単糖や低分子の糖を細胞外へと蓄積する変異株の構築を試みることにした。 Tn5 挿入変異により構築した 11 種の EPS 合成能欠損 (EPS-) 変異株から、単糖、オリゴ糖を細胞外に蓄積する変異株のスクリーニングを試みた結果、培養上清中に著量の還元糖を蓄積する変異株を計 3 株取得した。 これら変異株が蓄積する糖を同定した結果、いずれの菌株もメタノランの主要構成糖であるグルコースの他に、4 炭糖であるエリスロース、トレオース、さらに構造未決定の 2 糖を蓄積していることが明らかとなった。

【12S 株のメタノラン生合成に関わる遺伝子の単離と解析】

EPS-変異株 Ma1 株より Tn5 により破壊された遺伝子領域をクローニングし、gene walking により約 10.0-kb の遺伝子領域について塩基配列を決定し、多糖合成に関わると推測される 7 個の遺伝子 *epsABCKLDE* (図 1) の存在を明らかにした。 推定アミノ酸配列に基づく相同性検索の結果、EpsA は LuxR superfamily に属する転写調節タンパク質と有意な相同性を示し、同 family に保存されている DNA-binding モチーフも同様に保存していた。 EpsB および EpsE は、夾膜多糖、リポ多糖合成系でよく研究が進められている Wzy 依存型多糖合成モデルにおける糖転移酵素と、ペリプラズムから細胞表層への輸送に関与するタンパク質にそれぞれ相同性を示し、同様に各酵素に特異的なコンセンサス配列も保存していた。 また EpsK および EpsL は cAMP-binding domain とタンパク質の folding に関与する peptidyl prolyl cis-trans isomerases (PPI) に共通のモ

チーフをそれぞれ保存していた。しかし EpsD および EpsC は既知のいずれのタンパク質とも相同性を示さなかった。

遺伝子破壊により各 Eps タンパク質のメタノラン合成における関与を検討した結果、EpsB, EpsD, EpsC はメタノラン合成に必須であることが確認され、見出された 2 種のクラスター (*epsABC* および *epsKLDE*) はメタノラン合成系遺伝子群をコードしていることが強く示唆された。さらに、Wzy 依存型多糖合成モデルに関わる糖転移酵素ならびに輸送タンパク質と相同性を有する EpsB, EpsD がメタノラン合成に必須であることから、同多糖も類似の機構により合成されることが強く示唆された。Wzy 依存型多糖合成モデルでは、まず細胞内膜上の lipid carrier 上に繰り返し単位である repeating unit が合成され、これが膜中をペリプラズム側へと転移した後、Wzy によって未成熟多糖へと重合され、細胞表層へと輸送されると推測されている。EpsB は、特に lipid carrier 上に repeating unit を合成する際に最初の糖を転移させる酵素と相同性を示したことから、EpsB 破壊株と野生株より膜タンパク質を抽出し、メタノラン構成糖にあたる、UDG-glucose, UDP-galactose, GDP-mannose に対する lipid carrier への取り込み能を比較した。その結果、EpsB は、lipid carrier へ glucose を転移する glucose-1-phosphate transferase であることが同定された。

LuxR superfamily の転写制御因子と有為な相同性を示した EpsA の破壊株では多糖生産量が 50% まで低下しており、メタノラン合成に必須ではないが関与していることが確認された。さらに EpsA の 12S 株内での構成的な発現は、メタノランの過剰生産を引き起こすことが観察され、同タンパク質がメタノラン合成系遺伝子群の正の制御に関わることが強く示唆された。一方、EpsK および EpsD は、遺伝子破壊の結果、メタノラン合成に必須ではない、もしくは代替する機能を有するタンパク質が他に存在することが推測された。

【総括と今後の展望】

従来の発酵技術では、メタンやメタノールを基質とする場合、生産菌株は C1 資化菌に限られており、おのずと生産可能な物質種にも制限が生じていた。しかし、本研究で構築したグルコースを細胞外に蓄積する変異株とそのほかの有用物質生産菌株とを 2 段階発酵することで、多様な物質をメタノールから生産可能になることが期待される。また、erythrose のアルジトール体であるエリスリトールを発酵生産する系は既に構築されており、実際に人工甘味料の一種として実用化されている。しかし、erythrose や threose といったテトロースに関する有効な発酵生産系は構築されていないことから、

本研究で得られた変異株は、新規な糖物質の生産菌株としての意義も有していることが期待される。

一方、EpsA はメタノラン合成系遺伝子群の正の転写制御に関わると推測された。EpsA は LuxR superfamily に特異的なモチーフを保存しており, quorum sensing を含めた環境刺激に応答する可能性が考えられる。本タンパク質がどのような環境に応答して発現を正に switch しているのかを明らかに出来れば, 12S 株におけるメタノラン生産の生物学的意義について知見が得られることが期待される。特に, かねてから提唱されている RMP 経路と EPS 合成の生化学的関連性について検証する上で重要な知見を与えるであろう。

また, EpsL はメタノラン合成に必須ではないものの, folding catalyst 様タンパク質と有意な相同性を示したことは, 非常に興味深い。既知の多糖合成系遺伝子群でこのようなクラスター構造の例は報告がなく, 本 *eps* 遺伝子群の一つの特色とも言える。*Pseudomonas aeruginosa* のアルギン酸合成に関する研究で, 転写制御因子である MucA への変異はアルギン酸の過剰生産を引き起こすだけでなく, ペリプラズムに局在したタンパク質の正常な folding を補助する disulfide bond isomerase, DsbA の過剰発現も誘導することが観察されている。この報告からも, 多糖合成に直接的には関与しない folding catalyst を多糖合成系遺伝子群内にコードし, 同一の転写制御下に置くことは, 多糖生産の高効率化に役立っている可能性が推測された。今後は, EpsL の機能についての詳細な解析も必要と思われる。

また本研究で解読した *epsE* の下流には, *Rhizobium meliloti* のスクシノグリカン鎖長調節・重合に関わる酵素遺伝子 *exoP* と相同性の高い遺伝子領域が見出されている。よって, メタノラン合成系を分子生物学的に明らかにするには, さらに *epsE* 下流領域の塩基配列も決定する必要がある。

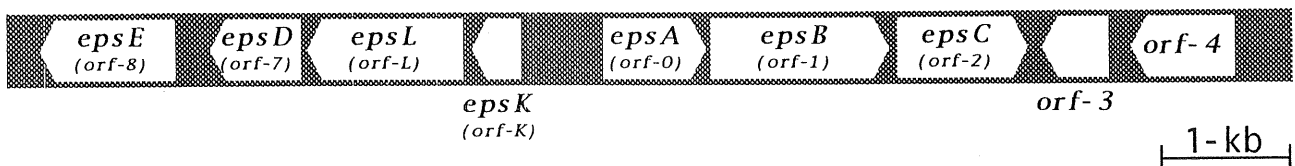


図1. *eps* 遺伝子群の構造