

論文の内容の要旨

論文題目 定常期、飢餓ストレスに応答する遺伝子の発現制御による *Escherichia coli* のアミノ酸などの発酵生産能向上に関する研究

氏 名 今 泉 明

緒言

アミノ酸は調味料、飼料添加物、医薬品原料、化成品原料など幅広い用途に用いられ、その需要は年々高まっている。現在多くのアミノ酸は *Corynebacterium glutamicum* や *Escherichia coli* (*E. coli*) などの微生物を用いた発酵法により生産されている。これらの微生物を用いて発酵を行うにあたり、生産菌の能力向上は製造コスト削減、環境負荷の低減に対して重要である。これまでに、生産菌の開発は、主に最終生産物による代謝阻害・抑制の解除や目的生産物への生合成経路の強化、不要な副生物の生成経路の遮断を行うことにより行われてきた。

一般的に発酵微生物による目的産物の生成は培地中の要求アミノ酸などの枯渇により定常期に移行した後に培地中に著量蓄積されるようになるが、生産速度は定常期初期においては高いものの、経時的に低下する傾向が認められる。工業生産上は、生産速度が最大値のまま一定に保たれることが望ましく、定常期での目的物質の生産速度の維持は、工業生産に耐え得る生産菌においては重要な形質である。

一方、微生物はストレス環境下での生存、あるいは恒常性の維持のため、様々なストレス応答機構を有している。これらの因子は微生物の増殖、代謝に大きな影響を及ぼしており、目的物質の生成能の経時変化から考えて、これらの機構が発酵生産能に対しても正負両面から影響していることが推察される。しかしながら、これらがアミノ酸等の発酵生産に対して実際にどのように作用しているのかについての知見は乏しい。

そこで、本研究ではリジン、グルタミン酸などのアミノ酸を過剰生成する *E. coli* 変異株を用いたアミノ酸発酵過程で発生していると考えられるストレス、具体的には定常期、要求アミノ酸飢餓への応答に関与する因子の発酵生産能へ及ぼす影響を遺伝子発現の面から解析を行い、更に発酵生産能の制御に寄与していると考えられる遺伝子の増幅株、欠損株を構築し、それらの株の諸性質について検討を行った。

1. 定常期特異的に発現する *rmf* 遺伝子の破壊による発酵生産能向上

まず、本研究では定常期に特異的に発現が上昇する遺伝子群の中に、発酵生産速度の維持を阻害する何らかの因子があるという仮説を立て、本因子を不活性化することで目的とする形質を備えたような生産菌を取得することを試みた。そこで、様々な培地、培養条件で *E. coli* 野生株を培養し、増殖期、および定常期での遺伝子発現のプロファイリングを DNA マクロアレイを用いて行い、共通して定常期において特異的に発現が上昇する遺伝子を抽出することを試みた。その中でいずれの条件でも非常に強く定常期において発現が上昇する遺伝子の一つとして *rmf* 遺伝子を見出した。本遺伝子産物である RMF (Ribosome Modulation Factor) タンパクは、リボソームを 2 量体化し、その翻訳活性を停止させることが知られている。このような RMF タンパクの機能から、定常期においては RMF タンパクの増加によりアクティブなリボソームの数が減少することにより目的物質への生合成経路の酵素の新規合成が低下し、結果として生産速度が低下しているのではないかと仮定した。

そこで、*E. coli* のリジン過剰生成株 WC196 より *rmf* 遺伝子の破壊株を取得し、そのリジン生産能の評価を行った。その結果、本遺伝子の破壊株は元株に比較して定常期でのリジンの生産能が大きく向上することが認められた(図 1)。同様の効果はグルタミン酸生産菌においても認められ、定常期において、RMF タンパクの増加によるリボソームの不活性化が *E. coli* を用いたアミノ酸発酵生産において生産速度の低下をもたらす因子であることが示唆された。

2. *rmf* 遺伝子破壊株の特性解析と酵素発酵生産への応用

次に、本研究では *rmf* 遺伝子破壊のその他の発酵生産菌開発への応用展開を図ることを考え、*rmf* 遺伝子破壊株において高発現している遺伝子を網羅的に探索することにした。その結果、興味深いことに *rmf* 遺伝子破壊株においては、培地中のリン酸の有無に関わらず、リンが枯渇したときに野生株が示す遺伝子発現プロファイルと非常に類似した遺伝子発現パターンを示すことが明らかとなった。具体的には、リボソームタンパクをコードする遺伝子群の発現が顕著に低下していること、リンが枯渇したときに発現することが知られている Pho レギュロン遺伝子群が常時高発現していることが確認された。Pho レギュロンの遺伝子は PhoR-PhoB 2 成分制御系の制御タンパク PhoB が結合する配列(Pho box)をプロモーター配列の近傍に有する。そこで、Pho レギュロンの遺伝子の遺伝子産物であるアルカリフォスファターゼの活性を調べたところ、*rmf* 遺伝子破壊株では酵素活性が増加していることが確認され、この現象はアルカリフォスファターゼをコードする *phoA* 遺伝子が自分自身のプロモーターによって発現されているときに認められ、ラクトースやアラビノース存在下において発現が誘導されるようなプロモーターなど、他のプロモーターの制御下で発現されているときはこの現象は認められないことが確認された。

この結果と、RMF タンパクの機能はリボソームの 2 量体化による翻訳活性の阻害であること、菌体内のリボソーム量はフィードバック制御により厳密に制御されていることなどを考慮すると、リボソーム生合成機構とリン代謝機構の間に、これまで知られていない新規の制御機構が存在することが示唆された。

更に、この知見を産業上に応用することを考え、*Morganella morganii* の酸性フォスファターゼの生産に応用することを試みた。本酵素は酸性フォスファターゼであるとともに、イノシン、グアノシンなどのヌクレオシドとピロリン酸から 5'-IMP、5'-GMP などのうまみ物質として知られるヌクレオチド類を生成する反応を触媒することが知られており、工業的に有用な酵素である。*Morganella morganii* 由来の酸性フォスファターゼをコードする *phoC* 遺伝子の ORF 上流域には Pho box と相同な配列が存在しており、*rmf* 遺伝子破壊株を利用することで本酵素の生産能が向上することが期待される。実際に *rmf* 遺伝子破壊株において本酵素を発現させたところ、対照に比較して酵素生産量が 1.5~2 倍向上することが確認された(図 2)。

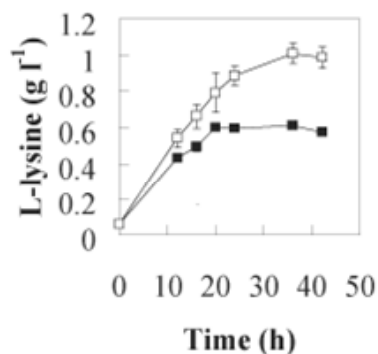


図 1. *rmf* 遺伝子破壊株のリジン生産

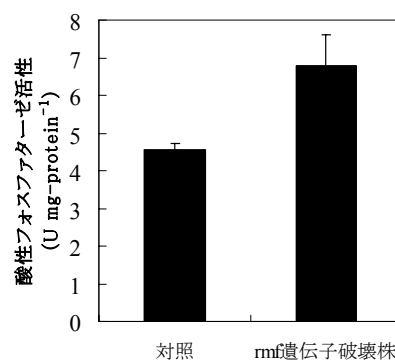


図 2. *rmf* 遺伝子破壊株の酸性フォスファターゼ活性

(■ : 対照株、□ : *rmf* 遺伝子破壊株)

3. 緊縮応答とアミノ酸生産との関連解析

上記のように、*rmf* 遺伝子は定常期においてアミノ酸、酵素などの発酵生産能を抑制する因子として機能していることが明らかとなってきた。*rmf* 遺伝子の発現は、菌体内のシグナル分子である ppGpp(グアノシン-3',5'-2 リン酸)により正に制御されることが報告されている。ppGpp は、微生物がアミノ酸飢餓などのストレスにさらされたときに生成され、いわゆる緊縮応答を誘導することが知られている。一方、アミノ酸生産菌はその育種過程において、目的とする生成物への代謝経路の強化や不要な副生物生成経路の遮断、あるいは発酵過程における菌体量の制御などを目的として、結果としてアミノ酸要求性を付与されているものが多い。したがって、発酵過程中に要求アミノ酸の飢餓が発生し、菌体内に ppGpp が蓄積するような状況になっていると推測される。しかしながら、ppGpp の蓄積がアミノ酸発酵に対して正の効果があるのか、負の効果があるのかは未だ不明である。

そこで、ppGpp 合成酵素をコードする *relA* 遺伝子、*spoT* 遺伝子の破壊株、増幅株をアミノ酸生産菌より取得し、その影響を解析した。その結果、*E. coli* のグルタミン酸過剰生成株の *relA* 遺伝子破壊株においては、生育、グルタミン酸生産量は大きく低下した。一方、*relA* 遺伝子過剰発現株においては、グルタミン酸生産能は顕著に上昇した(表 1)。*relA* 遺伝子過剰発現によるアミノ酸生産能向上は、グルタミン酸過剰生成株だけでなくリジン過剰生成株においても認められ、ppGpp がアミノ酸発酵が成立するためには必須の因子であるということが示唆された。

更に、グルタミン酸過剰生成株とその *relA* 遺伝子破壊株、過剰発現株を要求アミノ酸が充足、あるいは枯渇した条件で培養を行い、そのときの生育、グルタミン酸生産、菌体内の ppGpp 蓄積の関係を解析した。その結果、菌体内 ppGpp の蓄積と、グルタミン酸生産量の間には正の相関関係が認められた(図 3)。以上の結果から、要求アミノ酸の枯渇に伴う菌体内 ppGpp 蓄積の上昇が、グルタミン酸過剰生産を誘導することが示唆された。

表1 グルタミン酸生産菌 MG1655S とその *relA* 遺伝子破壊株(MG1655SA)の生育(OD_{600})とグルタミン酸生産へ及ぼす *relA* 遺伝子増幅効果

pM15 : ベクターのみ、pMrelA' : truncated *relA* 遺伝子増幅プラスミド、pMrelA : *relA* 全長増幅プラスミド
 $Y_{p/s}$: 対消費糖グルタミン酸重量収率 p value : $Y_{p/s}$ の対照に対する t 検定の結果
 括弧内の数字は標準偏差(n=3)を示す

Strain	Plasmid	OD_{600}	Glutamate			Residual glucose
			$g\ l^{-1}$	$Y_{p/s}$	p value ^a	$g\ l^{-1}$
MG1655S	pM15	17.81 (0.20)	15.80 (0.14)	0.395 (0.004)		0.0 (0.0)
MG1655SA	pM15	7.49 (0.77)	1.92 (0.20)	0.178 (0.050)	N.T. ^b	29.2 (3.8)
MG1655S	pMrelA'	17.92 (0.32)	16.67 (0.25)	0.417 (0.006)	0.023	0.0 (0.0)
MG1655SA	pMrelA'	7.01 (0.01)	2.70 (0.35)	0.370 (0.056)	N.T. ^b	32.7 (0.1)
MG1655S	pMrelA	17.49 (0.12)	19.23 (0.15)	0.481 (0.003)	0.000	0.0 (0.0)
MG1655SA	pMrelA	16.91 (0.56)	18.47 (0.42)	0.462 (0.009)	0.000	0.0 (0.0)

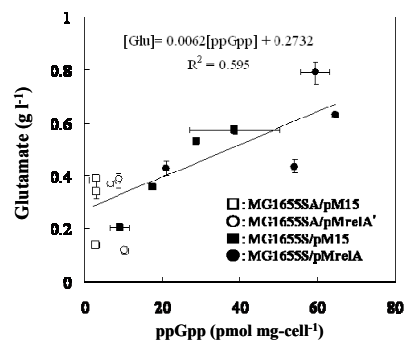


図3 グルタミン酸生産菌における菌体内ppGpp蓄積とグルタミン酸生産量との関係
 エラーバーはn=3の標準偏差を示す

結論

本研究においては、*Escherichia coli* のアミノ酸過剰生産株を用いたアミノ酸発酵生産過程で発生していると考えられるストレスに着目し、特にこの中で定常期における翻訳機能の抑制を担う *rmf* 遺伝子、アミノ酸飢餓応答に関与する *relA* 遺伝子に着目し、これらの遺伝子産物がアミノ酸発酵生産過程において及ぼす影響について解析を行った。その結果、*rmf* 遺伝子の発現が定常期の発酵生産能の低下に関与していることを明らかにした。また、要求アミノ酸の枯渇に伴い *relA* 遺伝子産物により合成される ppGpp が菌体内に蓄積することにより、アミノ酸の過剰生成が誘導されることを明らかとした。以上のことから、これまで明らかになっていなかった微生物によるアミノ酸過剰生成機構は、これまで考えられていたような代謝経路の変異などだけでなく、微生物の環境応答にも大きく依存していることが示唆された。