

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

メタノール資化性菌 *Methylophilus methylotrophus* の L-リジン代謝解析  
および L-リジン生産菌としての分子育種

氏 名 郡 司 義 哉

発酵による工業生産では、安価で豊富に存在する原料を使用することは重要である。C1 化合物であるメタンはその豊富な埋蔵量から注目される炭素資源である。そしてメタノールはメタンから容易に合成可能であり、さらに低価格、高純度、保管および運搬の容易性などの理由から未来型資源として注目されている。メタノールを原料とした有用物質生産の検討はこれまでも行われているが、メタノール資化性菌の変異育種が難しいことから、実用的なレベルの研究例は少ない。そこで、従来の変異育種に加えて DNA 組換え手法を組み合わせることでメタノール資化性菌へ適用することで、メタノールを原料としたアミノ酸生産の研究を行った。

グラム陰性偏性メタノール資化性菌、*Methylophilus methylotrophus* のリジン (L-lysine) 代謝解析を行った結果、特徴的な代謝制御システムを見出した。さらに、L-lysine 過剰生産株を解析する過程で、L-lysine の細胞外への排出過程に、その効率的な生産を阻むボトルネックが存在することを明らかにした。そしてこれを解消することで飛躍的にメタノールからの L-lysine の生産量が増大した。従来の代謝改変のみによる目的アミノ酸の過剰生産方法とは異なる、アミノ酸排出系の改変というアプローチにより、これまで困難とされてきた偏性メタノール資化性菌からの L-lysine 高生産株を得ることに成功し、今後の工業生産への応用に繋がる重要な道を切り開いた。

## 第1章 偏性メタノール資化性菌 *M. methylotrophus* の L-lysine 代謝系の解析

*M. methylotrophus* AS1 は過去にシングルセルプロテイン生産菌として工業利用された実績があり、さらに(1)メタノールを唯一の炭素源およびエネルギー源としたときの生育速度が速く炭素源あたりの菌体収量が高い、(2)遺伝子組み換え技術の適用が容易である、(3)胞子形成をせず、取り扱いや保存なども容易である、(4)比較的高い温度(37°C)での生育が良好である、といったアミノ酸を含めた物質生産の宿主として非常に魅力的な性質を有している。

まず、この *Methylophilus methylotrophus* の L-lysine 生合成代謝経路の解析を行った。アスパラギン酸キナーゼ (AK, aspartokinase)、アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素 (ASADH, aspartsemialdehyde dehydrogenase)、ジヒドロジピコリン酸合成酵素 (DDPS, dihydrodipicolinate synthase)、ジヒドロジピコリン酸還元酵素 (DDPR, dihydrodipicolinate reductase) およびジアミノピメリン酸脱炭酸酵素 (DPDC, diaminopimelate decarboxylase) の酵素解析を行い、*M. methylotrophus* はジアミノピメリン酸経路で L-lysine 生合成していることがわかった。*M. methylotrophus* の AK 活性は L-threonine によるフィードバック阻害を受け、L-threonine および L-lysine による協奏フィードバック阻害を受けることがわかった。しかし、L-lysine によるフィードバック阻害は受けず、これまでに知られている AK とは異なる阻害様式であった。DDPS 活性は L-lysine による比較的穏やかなフィードバック阻害を受けることがわかった。また、L-lysine のアナログである *S*-(2-aminoethyl)-L-cysteine(AEC)耐性株のなかから選抜された L-lysine を微量分泌する株(G49 株)の AK および DDPS はフィードバック阻害が部分的に緩和(脱感作)されていた。AK および DDPS をコードする *ask*, *dapA* 遺伝子を株および G49 株よりクローニングして配列比較を行ったところ、G49 株の *ask*, *dapA* 遺伝子にはそれぞれ点変異が導入されていることが明らかになった。この *ask* の変異点は AK のアロステリック調節部位として知られる領域に導入されており、一方、*dapA* の変異点は既知のアロステリック調節部位とは異なる、DDPS と L-lysine の結合領域と推定される 106 番目のチロシン残基に導入されていた。

## 第2章 *M. methylotrophus* からの L-lysine 生産菌の育種

前項で得られた AK および DDPS に加えて、さらに L-lysine 生合成経路上の酵素の制御について調べるため、ASADH、DDPR、および DPDC をコードする遺伝子のクローニングおよび詳細な酵素の解析をおこなった。その過程で、DDPR が L-lysine によって顕著に阻害を受けることがわかり、我々は AK、DDPS に加えて DDPR の制御も解除することで L-lysine 生産量が増大すると予想した。そこで L-lysine による阻害を受けない *E. coli* 由来 DDPR をコードする *dapB* 遺伝子を広宿主域ベクターに搭載して、L-lysine アナログである AEC に対する耐性株に導入したところ、L-lysine 生産が顕著に増大した。さらにこれを改変したプラスミドを導入する

ことで、*M. methylotrophus* においてメタノールを炭素源とした L-lysine の生産量は 1g/L に達した。

### 第 3 章 変異型 L-lysine 排出因子の導入による L-lysine 生産能の向上

*M. methylotrophus* に、*E. coli* 由来で L-lysine に対するフィードバック阻害が緩和された脱感作型 DDPS をコードする *dapA24* 遺伝子を導入すると培地中に L-lysine が分泌されるが、同時に細胞内の L-lysine 濃度が顕著に上昇していた。そこで細胞外への L-lysine 分泌を促進するために *Corynebacterium glutamicum* 2256 由来の L-lysine/L-arginine 排出担体 (LysE) の *M. methylotrophus* への導入を試みた。野生型 *lysE* を発現するプラスミドは *M. methylotrophus* へ安定に導入されなかったが、その操作の過程で、自然変異が導入された特別な *lysE* (*lysE24* と命名) を偶然取得した。これを *M. methylotrophus* に導入したところ L-lysine 生産を誘導することがわかった。また、この形質転換体は L-lysine アナログである *S*-(2-aminoethyl)-L-cysteine が及ぼす生育阻害に対する耐性を獲得していた。この *lysE24* 変異は *lysE* 遺伝子の中央付近での 1 塩基挿入変異であり、この産物は野生型の LysE 蛋白質とは異なる構造を持つ可能性が考えられた。*dapA24* の導入により L-lysine 生産が誘導された *M. methylotrophus* に更に *lysE24* を追加導入すると、細胞内の L-lysine の蓄積濃度は顕著に低下した。そして、この *dapA24* と *lysE24* を同時に持つ *M. methylotrophus* はそれぞれを単独で持つ株と比較して約 10 倍の L-lysine を生産することがわかった (ジャーファーメンターでの L-lysine 生産量は 11.3/gL)。以上の結果より、本変異型 *lysE24* の遺伝子産物は L-lysine 分泌に関与し、また *M. methylotrophus* における L-lysine 生産において重要な因子であると思われた。

### 第 4 章 変異型 L-lysine 排出因子 LysE24 の発現機構の解析

野生型 *lysE* は 233 アミノ酸をコードしうる ORF をもつ。前項で得た *lysE24* は *lysE*-ORF のほぼ中央部分にフレームシフト変異があり、本来より短い ORF (121 アミノ酸をコード) で終了するが、LysE24 活性 (*M. methylotrophus* での L-lysine 分泌誘導活性) の発揮には、その ORF の下流領域も必須であった。種々の変異遺伝子を作成して調べた結果、*lysE24* では、短い ORF の翻訳の後、それに続く ORF の翻訳が再開し、結局、*lysE24* からは 2 種のペプチドが合成されることが示唆された。また、後半の ORF の翻訳は、前半の ORF の翻訳と共役して行われることが LysE24 の機能発現に必須であることもわかった。更に、*lysE24* はコリネ型細菌や *E. coli* では機能を発揮せず、別のメチロトローフである *Methylobacillus glycoagens* で L-lysine 分泌誘導活性を示した。LysE24 は LysE 蛋白質を分割したようなユニークな構造をもつ変異型であり、また、この特徴的な構造がメチロトローフで L-lysine 排出活性を発揮するために必須なのかもしれない。