



図 ゲノム育種の方法論

1. 変異育種された生産菌と親株の野生株で塩基配列を比較して生産菌ゲノム上の変異を同定する
2. 野生株にその変異を導入し、生産に対する有効性を判定する
3. 生産に対して有効であった変異のみ野生株に積み上げる

トランスクリプトーム解析系の構築

まず *C. glutamicum* のゲノム配列情報を基に、糖の資化に関わる解糖系、ペントースリン酸経路、TCA 回路などの中央糖代謝とアミノ酸合成経路の約 120 遺伝子で DNA マイクロアレイを作製した。次いで、最初の応用例として、*C. glutamicum* の一部遺伝子でノーザン解析が報告されている酢酸代謝のトランスクリプトーム解析を行なった。

酢酸またはグルコースを単一炭素源とする最少培地で *C. glutamicum* 野生株 ATCC 13032 を培養し、発現プロファイルを比較した。酢酸で誘導発現が報告されている各遺伝子(*pta*, *ack*, *aceA*, *aceB*) で、既知データと符号する結果が得られ、DNA マイクロアレイの実用性が検証された。酢酸を単一炭素源とした場合、生育に必要なアミノ酸、核酸などを合成するために糖新生が促進されているはずである。TCA 回路から糖新生に向かうルートとして、一般に、リンゴ酸からピルビン酸を介してホスホエノールピルビン酸に進むルートと、オキサロ酢酸から直接ホスホエノールピルビン酸に向かうルートの 2 つが知られる。酢酸培養では、前者のルートに与る *malE* が 0.3 倍に下がっているのに対し、後者のルートに与る *pck* は 10 倍以上に上昇していた。この結果は、*C. glutamicum* の酢酸代謝においては後者の *pck* のルートが優勢であることを示唆している。

ゲノム解析の結果から、*C. glutamicum* にはグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子が既知の *gapA* の他にもう 1 つ存在することが明らかになった(*gapB*)。本研究におけるトランスクリプトーム解析では、酢酸培養時に *gapA* は 0.4 倍に下がっているのに対し、*gapB* は 4 倍に上昇していた。2 つの *gap* 遺伝子の発現が逆方向に制御されていることがわかり、解糖と糖新生の新たな制御ステップの存在が示唆された。以上、*C. glutamicum* の DNA マイクロアレイを独自に開発し、その有用性を示した。

L-リジン生産菌のトランスクリプトーム解析

C. glutamicum の L-リジン発酵を題材にゲノム育種を進める中で、L-リジン生合成の末端経路と中央糖代謝の有効変異を集めても工業レベルに耐えうる L-リジン生産性は得られないことが分かった。この結果は従来知られていない機構が L-リジン生産に寄与していることを示唆していると考えられた。そこで、多段階の変異育種を経て造成された L-リジン生産菌 B-6 株を遺伝子発現の観点から解析することとした。L-リジン生合成経路上の遺伝子に関してノーザン解析を行ない、野生株と B-6 株での転写レベルを比較した。その結果、L-リジン生合成の鍵酵素アスパルトキナーゼをコードする *lysC* の転写レベルが B-6 株では数倍程度に上昇していることを見出した。*C. glutamicum* において *lysC* の転写抑制による制御は知られていないことから、未知の制御により *lysC* の転写レベルが上昇していることが示唆された。そこで B-6 株のトランスクリプトーム解析を行なった。

野生株と比較した場合、B-6 株の転写プロファイルの特徴は以下の 2 つであった。① ペントースリン酸経路の遺伝子の高発現と TCA 回路の遺伝子の発現レベルの低下。② アミノ酸生合成遺伝子の全般的な発現上昇。①の中央糖代謝系遺伝子の発現変動は報告されている L-リジン生産菌の代謝フラックス解析の結果と一致している。一方、②のアミノ酸合成系遺伝子全般の発現上昇はこれまで *C. glutamicum* で知られていない制御である。野生株と比べて 50 倍に発現上昇していた L-ロイシン合成系の *leuCD* を除くと、その他の多くのアミノ酸合成系遺伝子の発現上昇は 10 倍以下の比較的低いレベルであった。アミノ酸生合成系の全般的な発現上昇は大腸菌などで知られる (p)ppGpp を介した緊縮応答を想像させる結果である。そこで *C. glutamicum* において緊縮応答を引き起こすことが報告されているセリンヒドロキサメートを添加した場合の野生株の転写プロファイル変動を解析した。その結果、一部のアミノ酸合成遺伝子については転写上昇が認められたものの、B-6 株の転写変動結果とは異なる点もあり、他の制御系の関与も示唆された。以上、多段階に渡り変異育種された L-リジン生産菌 B-6 株では、*lysC* を含む多くのアミノ酸合成系遺伝子の発現レベルが上昇していることを明らかにした。

トランスクリプトーム解析のゲノム育種への応用

C. glutamicum L-リジン生産菌 B-6 株では緊縮応答を起こしたかのようにアミノ酸合成系遺伝子全般の転写レベルが上昇していた。この結果から B-6 株のアミノ酸合成系遺伝子に変異が入り、L-リジン以外のアミノ酸合成能が弱まることで緊縮応答が引き起こされ、それが L-リジン生産に有効に働いている可能性を考えた。B-6 株は L-ロイシンの部分要求性を示す。そこで L-ロイシン合成経路上の遺伝子に着目し、野生株と比較することで変異を探索した。解析で明らかになった変異の評価は、*C. glutamicum* 野生株 ATCC 13032 に L-リジン生合成末端経路の 2 つの有効変異 (*lysC*、*hom*) を導入した AHD-2 株を宿主とし、ゲノム上に相同組換えにて各々の塩基置換変異を導入し、表現型を評価することで行なった。L-ロイシン合成経路の複数の変異の中で、イソプロピルリンゴ酸デヒドラターゼ大サブユ

ニットをコードする *leuC* の変異 (456 番目の Gly が Asp に置換) を AHD-2 株に導入したところ、最少培地での生育が AHD-2 株と比較して遅くなり、L-ロイシンを添加するとこの生育遅延は回復した (*lysC*、*hom*、*leuC* の 3 点変異株は ADL-3 株と命名した)。この結果から *leuC* 変異が B-6 株の L-ロイシン部分要求性の原因変異であると考えられた。

5L ジャー培養で L-リジン生産に対する *leuC* 変異の導入効果を検証したところ、L-リジン力価は AHD-2 株と比較して ADL-3 株では約 14% 向上した。トランスクリプトーム解析の結果、ADL-3 株では L-リジン合成の鍵酵素遺伝子 *lysC* を含む多くのアミノ酸合成系遺伝子の転写レベルが上昇していることが明らかになった。この結果は L-ロイシン部分要求性を付与する *leuC* 変異が転写レベルの変動を引き起こすことで L-リジン生産性の向上に関わっている可能性を示している。

さらに *leuC* 変異による L-ロイシン制限効果と緊縮応答との関連を調べた。*C. glutamicum* で (p)ppGpp の合成・分解に関わり、その破壊により (p)ppGpp が蓄積できなくなることを報告されている *rel* 遺伝子の破壊効果を検証した。AHD-2 株、ADL-3 株で *rel* を欠失させ、5L ジャー培養で L-リジン生産、転写変動への影響を調べた。その結果、*rel* 欠失株ベースでも *rel*⁺ベースでの効果と変わらず *leuC* 変異は L-リジン生産性向上と転写変動をもたらすことが明らかになった。以上、L-リジン生産菌の *leuC* 変異は *rel* 依存の緊縮応答とは異なる、従来知られていない機構で *lysC* を含むアミノ酸合成系遺伝子の発現上昇を引き起こしていることを明らかにした。

まとめ

本研究ではまず、アミノ酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* において、DNA マイクロアレイを利用したトランスクリプトーム解析系を構築した。工業レベルに育種された L-リジン生産菌をトランスクリプトームの観点から解析することでアスパルトキナーゼ遺伝子 *lysC* の発現上昇を含むグローバルな転写変動が起きていることを見出した。この結果をもとに生産菌の有効変異 *leuC* G456D 変異を同定した。同変異が *rel* 依存の緊縮応答とは異なる、従来知られていない機構で *lysC* を含むアミノ酸合成系遺伝子の発現上昇をもたらしていることを明らかにした。*C. glutamicum* の L-リジン発酵研究の長い歴史の中で、このような制御の存在はこれまで知られていなかった。以上、アミノ酸生産菌育種研究におけるトランスクリプトーム解析の有用性が示された。