

## 論文の内容の要旨

論文題目 代謝改変 と ゲノム進化工学による 微生物育種に関する研究

(Genome engineering through synthetic and evolutionary approaches)

氏名 桑原 (朝倉) 陽子

### 序

微生物は様々な産業に利用されている。特に、食品、健康・医薬、環境の分野では、アミノ酸、医薬原料、バイオ燃料等に見られる様に、微生物を用いた物質生産への期待は高い。

微生物を用いた物質生産においては、目的物質の生成効率を高めることは最も関心の高い課題の1つであり、目的物質の生合成に関わる代謝フラックスのみでなく、細胞全体の性質が望ましく改変された株を得ることが求められる。その様な微生物株の構築は、細胞プロセスやその遺伝的メカニズムを理解する研究と応用研究の成果によって可能になると考えられる。

本研究では、コリネ型細菌のグルタミン酸過剰生成機構を明らかにし、グルタミン酸合成に関する代謝改変によりグルタミン酸生産が向上することを示した。また、最適化された代謝経路を持つ宿主細胞の性質を最適化する方法として、制限修飾遺伝子による微生物進化の仕組みを利用して *Escherichia coli* でゲノム進化工学の手法を開発した。本方法が、ゲノム再編を加速してゲノムを迅速に作りかえる手法として有用であることを示すとともに、適応進化の過程で獲得された遺伝子発現変化やゲノムの変化から生体触媒として望ましい性質を持つ微生物細胞ゲノムの遺伝的構成を知る上でも大変有用であることを示した。

## Corynebacterium glutamicum のグルタミン酸生成機構の解明とグルタミン酸発酵への 応用

*Corynebacterium glutamicum* は、グラム陽性桿菌で、グルタミン酸を過剰生成する微生物として発見され、その後の発酵法によるアミノ酸生産のきっかけとなった。*C. glutamicum* の野性株では、生育に必須なビオチンを制限した条件や、ある種の脂肪酸エステル面活性剤や、ペニシリンを添加すると、グルタミン酸を過剰生成するようになるという特殊な性質を持つことが知られていた。その機構は未解明であったが、これらの条件下で細胞膜組成が変化することから、グルタミン酸過剰生成の原因として、膜透過性の変化が示唆されていた。また、これらの条件下で、グルタミン酸合成系と TCA 回路との代謝の分岐点で 2-オキソグルタル酸からサクシニル-CoA への反応を触媒している 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (ODHC) の活性が低下していることも観察されていた。

本研究では、*C. glutamicum* の ODHC の E1 $\alpha$  サブユニットをコードする *odhA* 遺伝子の欠損株を用いて、*C. glutamicum* のグルタミン酸過剰生産には ODHC 活性の弱化または欠損による代謝改変が有効であることを明らかにした。さらに、*odhA* 欠損株でグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性を調節して 2-オキソグルタル酸からグルタミン酸への代謝フラックスを最適化することによりグルタミン酸生産性が向上することを示し、特殊な過剰生成誘導の現象に注目が集まっていたコリネ型細菌のグルタミン酸生成においても、生産性の向上には、代謝フラックスをグルタミン酸生成に向かわせるように改変することが有効であることを明らかにした。また、*C. glutamicum* に特有なグルタミン酸過剰生成誘導処理と、代謝変化との関係についても解析し、これらの誘導処理の作用について考察した。

## 制限修飾遺伝子を用いたゲノム進化学

生物はゲノムや遺伝子発現を変化させることによりその環境に適応するように進化してきたと考えられる。適応には、複雑な細胞内や細胞間のプロセスを再編成することが伴うが、その過程を解明することは、生物学的にも非常に興味深く、また応用の観点からも有用である。

一方、近年のゲノム解析の結果から、制限修飾系がその自己選択とゲノム再編を促進する性質により微生物のゲノム進化に関与してきたことが明らかになってきた。

微生物を用いた効率的な物質生産のためには、最適化された代謝経路を組みこむ宿主細胞全体の性質も好ましく改良する必要がある。与えられた環境下で生体触媒としての細胞

の活性を高めるため、複雑な細胞のプロセスを最適に改変し再構成することが求められる。本研究では、*E. coli* で、制限修飾遺伝子を用いてゲノム進化を加速させて適応進化実験を行った。

まず、*E. coli* で、温度感受性プラスミド上の *paеR71* 制限修飾遺伝子の脱落に起因する染色体 DNA 損傷により細胞死が引き起こされる際の遺伝子発現変化を解析し、制限修飾遺伝子による自己選択とゲノム再編の可能性を示唆する結果を得た。遺伝子発現変化から、この細胞死のプロセスで、制限酵素による染色体 DNA 切断、SOS 誘導、DNA 二重鎖切断修復や DNA 組換え修復遺伝子の活性化、*rpoE* ( $\sigma^E$  をコードする) と  $\sigma^E$  レギュロンの誘導、染色体複製の抑制、ペリプラズムストレスや浸透圧ストレス、酸化ストレス等を含むストレスへの応答、エネルギー代謝の抑制、細胞膜合成の抑制、細胞膜の崩壊と溶菌が起こっていることが示唆された。*rpoE* はエンベロープの恒常性維持の他、定常期の溶菌に関与していることが知られているが、この細胞死の際にも溶菌が起こっていること、細胞死誘導後に発現上昇が見られた  $\sigma^E$  レギュロン遺伝子を過剰発現させると溶菌が起こることを明らかにした。また、染色体損傷に誘導される細胞死や溶菌は上記の遺伝子発現変化を含む複数の経路によって起こることを示唆する結果を得た。

次に、制限修飾遺伝子によってゲノム再編が促進され進化が加速されることを示し、これを利用して *E. coli* の細胞集団をモデル培養環境に適応進化させ生育を向上させた。目的の環境下での良好な生育は、物質生産のプラットフォーム細胞にとって最も望まれる特性の1つである。適応進化の各段階から単離したクローンを用いてゲノムやトランスクリプトームの変化を解析することにより、適応進化による生育向上が、菌体形成やエネルギー効率向上のみでなく、細胞間情報伝達やアミノ酸飢餓への応答を介した増殖への負の制御の解除等に関与する変異や遺伝子発現変化の協調的な働きによっていることを明らかにした。本方法が、微生物のゲノムを迅速に再編し改良することに利用できること、適応進化の過程で起こるゲノムの変化から目的に応じた最適ゲノムをデザインするための情報を得ることに利用できることを示すことができた。

上記の結果をもとに、デザインされた代謝改変とゲノム進化的手法の、物質生産株育種への応用について検証した。

## 総括

微生物等の生物機能の産業応用にあたっては、必要な遺伝的要素を最適な活性で発現させることのできるゲノムを得ることが1つのゴールであると考えられる。現状では、代謝経路のようにいくつかの細胞プロセスについては、各遺伝子やその相互作用に関する基礎

的な知見から合理的に構築し最適化することが可能であるが、ゲノム全体を最適化するためには情報が不足している。合理的な構築が難しい部分に関しては、本研究で示した様に、必要な遺伝的要素を持つゲノムの再編バリエーションから最適なものを選択するという進化的なアプローチを組み合わせる行うことが大変有効と思われる。その様にして得られる最適ゲノムの遺伝的背景と細胞プロセスとの相関を理解していくことも非常に興味深い。