

大腸菌ゲノム情報を活用したシステインの代謝制御機構の解明と発酵生産への応用

●高木 博史 ◆大津 厳生 ◇森 浩禎
奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科

<研究の目的と進め方>

ゲノムワイドな研究を病気の予防・診断・治療、または創薬に応用することは非常に重要である。我々はゲノム情報を利用して、微生物を用いた発酵法による有用物質の産生機構を解明し、発酵生産への有用性を実証することにより、成果を社会に還元する。

生理的および工業的に重要なシステイン (Cys) は厳密で複雑な代謝制御を受けている。我々は大腸菌のゲノム情報とリソースを活用し、Cys の代謝制御機構への理解を深め、Cys の発酵生産への有用性を実証する。具体的には、大腸菌非必須遺伝子ライブラリー (Keio collection, Aska library) およびダブルノックアウト株ライブラリーを用い、①新規な Cys トランスポーターの探索、②未知の Cys 生合成経路の解明、③ Cys 発酵生産への応用を行う。

Cys の生産性向上には細胞内に蓄積した Cys の細胞外への積極的な排出が有効であり、ゲノム情報を活用した新規な Cys トランスポーターの探索が重要な戦略であると考えた。また、細胞内の Cys 生合成量のさらなる増加を目的に、未だに解明されていない別の生合成経路に着目する。このような重複経路を探し出すために有効な解析法の一つとして、合成致死 (一つの遺伝子欠損では致死にならないが、別の遺伝子欠損が加わると致死性を示す) がある。本研究では、最少培地で Cys 要求性になり合成致死を示す場合、重複経路のステップである可能性が高く、これらすべてを網羅的に探索することで、O-acetylserine と $S_2O_3^{2-}$ から O-acetylserine sulfhydrylase B により sulfocysteine を経て Cys に変換される経路を明らかにすることが可能であると考えた。

<2008 年度の研究計画>

- ①新規 Cys トランスポーターの探索：Cys によって大腸菌の生育が阻害されることを利用し Keio collection を活用して、Cys 感受性または耐性菌をスクリーニングし、Cys 排出に関与する遺伝子を探索する。
- ②未知の Cys 生合成経路の解明：大腸菌の Cys 生合成には O-acetylserine sulfhydrylase A (OASS-A) により O-acetylserine (OAS) と SO_4^{2-} からの経路1と、O-acetylserine sulfhydrylase B (OASS-B) により OAS と $S_2O_3^{2-}$ から合成される sulfocysteine を経由する経路2がある (Fig. 1)。経路1の制御機構はよく理解されているが、経路2は酵素の特定を含めた制御機構は解明されておらず、このステップの解明は Cys 生合成系の完全な理解と Cys 生産の新たな手段となり得る。そこで、OASS-A 欠失株を構築し、さらに別の遺伝子欠失を加えたダブルノックアウト株ライブラリーを構築する。次に、構築したライブラリーから Cys 要求性を示す株を取得し、sulfocysteine から Cys への変換に関与する。

- ③ Cys 発酵生産への有用性の実証：得られた基礎的知見に基づき、Cys 発酵生産に適したメタボリック・パスウェイ (生成系の強化、分解系の弱化、排出系の強化) を有するモデル大腸菌を作製し、Cys 発酵生産への有用性を検証する。

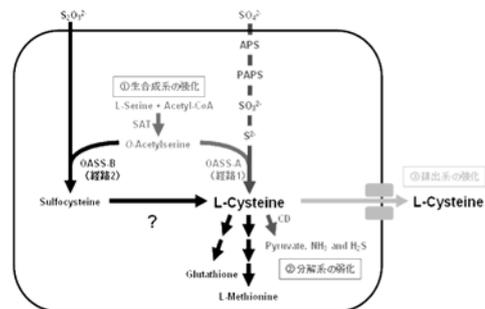


Fig.1

<2008 年度の成果>

①新規な Cys トランスポーターの探索

Keio collection (約 3,985 × 2 クローン) の中から、野生株と比較して Cys 感受性を示す 24 の候補株を取得した。その中から外膜のポーリンである TolC の遺伝子欠損 ($\Delta tolC$) 株は、特に明確で強い Cys 感受性を示した。一方、 $\Delta tolC$ 株にプラスミドで *tolC* 遺伝子を導入すると、得られた形質転換体は野生株並みに Cys 感受性を相補できた。このことから、TolC タンパク質が Cys 耐性に関与していることが明らかとなった。

大腸菌における Cys の排出に関しては、これまでに YdeD, YfiK, CydDC および Bcr などの内膜の因子が知られている。通常、アミノ酸の排出系は内膜の因子であり、その強化によって目的のアミノ酸の排出が促進される。現状では、Cys を含むアミノ酸の排出促進 (アミノ酸発酵) には内膜の排出因子を強化する手法が一般的であり、外膜バリアの透過に必要な因子は重要視されなかったため、Cys の排出に TolC などの外膜因子が必要であるかどうかは不明であった。そこで、単独での Cys 排出能が知られている内膜因子 YdeD と TolC との組み合わせによる Cys 生産性への効果を調べた。その結果、Cys 生産のモデル菌株に YdeD を過剰発現させた場合に比べ、TolC と YdeD の両方を過剰発現させると、より短時間で多くの Cys (約 3 倍) を細胞外に分泌生産することができた (論文 2, 特許 1)。

◆論文発表

- 1) 大津厳生：巧妙なり！タンパク質へのS-S結合導入システム。生物工学, 86, 446 (2008)。
- 2) Iwao Ohtsu, Natthawut Wiriyathanawudhiwong, Zhao-Di Li, Hirotsada Mori, and Hiroshi Takagi: The outer membrane TolC is involved in cysteine tolerance and overproduction in

◆学会発表

- 1) 新規システイントランスポーターの探索とその機能解析. 日本農芸化学会2008年度大会 (横浜)
- 2) 大腸菌システイントランスポーターYdeDの機能解析. 日本農芸化学会2008年度大会 (横浜)
- 3) Natthawut Wiriyathanawudhiwong, 大津厳生, Zhaodi Li, 仲谷豪, 高木博史: 大腸菌システインデスルフラゼIscSの機能解析とシステイン生産への応用, 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 (神戸)
- 4) Zhaodi Li, 大津厳生, Natthawut Wiriyathanawudhiwong, 仲谷豪, 高木博史: 大腸菌外膜タンパク質ポーリンTolCの機能解析とシステイン生産への応用, 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 (神戸)

◆特許出願

- 1) 特許2008-40167: L-システイン生産菌及びL-システインの製造法

<国内外での成果の位置づけ>

大腸菌、*Salmonella typhimurium*におけるCys生合成経路とその制御機構はよく理解されており、鍵酵素SATに対するCysによるフィードバック阻害とN-acetylserineとCysBタンパク質による硫黄同化経路酵素群の遺伝子発現調節により、野生株の細胞内でCysが過剰合成されることはない。また、CDによる分解系の存在およびCysによるCDの誘導も報告されており、細胞内ではCysの蓄積が抑えられている。これまでに、生育が速くゲノム情報やリソースも整備されている大腸菌を用い、Cys代謝制御の完全解除を目的とした菌株の育種が鋭意続けられてきたが、従来の製法(加水分解抽出法、酵素法)を凌駕できず、生合成系強化と分解系弱化的組合せには限界がある。

そこで、従来の発想を転換し、Cysが生合成されても過剰蓄積しない菌株の育種法として細胞膜排出系の強化により、ゴールに到達できる可能性が見出された。その結果、これまで知られていなかったCysトランスポーターが同定され、その過剰発現株を用いて、グルコースからの直接発酵が一部で実用化されてきた(海外)。しかしながら、コスト的に優位な加水分解物からの抽出法には、廃液処理の問題が指摘されており、直接発酵法によるCys生産性の向上が望まれている。我々は未だ解明されていない大腸菌の新規生合成経路の解明により、これまでにない生合成経路を活用したCys発酵生産が可能になる成果と位置付けている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

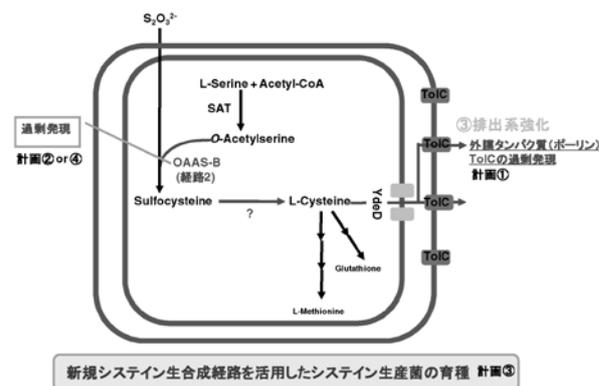
当初の計画通り、まず計画①に着手した。大腸菌のゲノム情報をもとに、Cys排出に関与する外膜タンパク質TolCを同定し、その発酵生産への有用性を実証した(論文2, 特許1)。これまでにペリプラズムに存在するタンパク質でCys排出に関与するものはまったく知られていなかったが、今回のスクリーニングにより、ペリプラズムに存在するタンパク質でその遺伝子を破壊するとCys感受性を示す複数の遺伝子を取得することができた。また、これらのタンパク質の機能は、Cysの排出による大腸菌の生育阻害の緩和ではなく、まったく異なる機構であることを明らかにしている(特許出願準備中)。今後は本研究課題と区別して、

それらタンパク質のCys感受性への関与について解析することとし、計画①を完了する。

2009年度は、計画②のダブルノックアウト株ライブラリーを用いた未知のCys生合成経路に関与する遺伝子の同定と、そのCys発酵生産への有用性の検証(計画③)を行う予定である。ダブルノックアウトライブラリーの構築は、これから半年の課題であるが、材料の準備に時間を要した時のために、新たに別の方法による探索を計画に加える。特許出願準備中のため、詳細を省略するが、ある機能に共通のモチーフを大腸菌のゲノム情報から検索し、現在、9つの候補遺伝子にまで絞り込んでいる。今後、これら遺伝子を過剰発現し、タンパク質を精製後、*in vitro*でsulfocysteineからCysへの反応を触媒できるかどうかについて調べる。

<今後の課題>

計画②のダブルノックアウト株ライブラリーの作製には、本学同研究科の森浩禎教授(連携研究者)の開発したリソースを活用するため、情報交換を緊密にし、いかに迅速にダブルノックアウトライブラリーを構築するかが課題である。また得られた知見の効果が、計画③の検証で明確に現れるように、sulfocysteine過剰蓄積株の取得も試みる必要がある。以上のように、最終年度は下記Cys生産菌の育種を念頭に置き、効率的な計画の遂行と、今回得られた知見をCys発酵生産に応用し、その有用性を実証する。



<成果公表リスト>

- 1)論文
 1. 0901141007
Ohtsu, I., Wiriyathanawudhiwong, N., Li, Z., Mori, H. and Takagi, H.: The outer membrane TolC is involved in cysteine tolerance and overproduction in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 81, 903-913 (2009).
- 2)産業財産権
 1. 0901141023
特許2008-40167: L-システイン生産菌及びL-システインの製法