

アミノ酸・核酸発酵におけるトランスクリプトーム解析

今泉 明・臼田 佳弘*

アミノ酸あるいは核酸は調味料、サプリメント、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、多くのアミノ酸や核酸の原料となるヌクレオシドはグルコースなどの糖を原料として、微生物を発酵生産菌として用いる発酵法により生産されている。従来、発酵生産菌の開発には、最終生産物による代謝阻害や抑制の解除、生合成経路の強化、不要な副生物の生成経路の遮断といった改変が主に行われてきた。言い換えると、これまでの菌株開発は代謝経路上の情報に基づいた改変が中心であった。一方、近年のゲノム解析とその関連解析技術の発展に伴い、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析、メタボローム解析といった代謝に関わる網羅的な情報を利用することが可能になってきた。これら情報を活用して、効率的な生産菌の開発を可能にすることが期待されている。中でも、トランスクリプトーム解析は、酵母のエタノール発酵において示されたように¹⁾、発酵過程の全遺伝子の mRNA の挙動を網羅的に把握するツールの一つとして利用価値は非常に高く、さまざまな利用が可能である。代表的なアミノ酸生産菌の一つである *Corynebacterium glutamicum* においても本手法の活用が報告されている^{2,3)}。本稿では、筆者らがトランスクリプトーム解析を *Escherichia coli* を用いたアミノ酸などの発酵生産菌の開発研究に応用した例について紹介する。

グローバル転写因子欠損によるアミノ酸生産能の向上

微生物の多くの遺伝子の発現は、グローバルレギュレーターと呼ばれる転写制御因子により調節されている。これらの因子は環境変化に反応して、多くの遺伝子の発現に変化をもたらすことによって、微生物の生育や代謝を調節する。しかし、このような環境適応は、場合によってはアミノ酸などの生産物の生産能の低下を引き起こす可能性がある。たとえば、ArcAB (anaerobic response control) という2成分制御系は、現在知られているだけでも約 100 個以上の遺伝子の発現を制御し、環境中の酸素濃度の低下に反応して *E. coli* の代謝を好気的な代謝から嫌気的な代謝に変換する役割を果たしている。*E. coli* の中央代謝経路の一つである TCA サイクルの遺伝子の多くは ArcA により発現が負に制御されている

表1. *arcA* 遺伝子破壊のアミノ酸生産への効果

	アミノ酸蓄積 (g/l)	
	グルタミン酸	アルギニン
対照	15.1	3.7
<i>arcA</i> 破壊株	16.7	15.4

ことから、ArcA が活性化しているときには TCA サイクルの代謝フラックスが低下し、本経路を經由して合成されるアミノ酸の生合成が抑制される可能性がある。そこで、このようなグローバルレギュレーターを欠損させることにより、生産菌の環境変化への応答を解除し、より安定的に生産能を維持することが可能になることが期待できる。

アミノ酸生産菌から ArcAB 2 成分制御系の制御タンパクをコードする *arcA* 遺伝子の破壊株を取得した。破壊株においては、グルタミン酸やアルギニンなどの TCA サイクルを經由して生合成されるアミノ酸の生産能が顕著に向上する結果を得た (表1)。

これらの生産菌や野生株の *arcA* 遺伝子破壊株において実際に ArcA 支配下の遺伝子の発現が変化しているかどうかをトランスクリプトーム解析により検証した。その結果、*arcA* 遺伝子欠損株では、TCA サイクルの遺伝子を含む ArcA により発現制御を受ける遺伝子群 (ArcA レギュロン) の発現が上昇しており、通常好気的と考えられる培養環境中においてもこの現象は確認された (図1)。また、ArcA レギュロンの遺伝子産物の酵素の活性上昇も *arcA* 破壊株で確認された⁴⁾。

これまで発酵生産菌の開発は、生合成経路に関わる遺伝子の発現を個別に強化するというプロセスを繰り返すことによりなされてきた。しかし、グローバルレギュレーターを欠損させることで、わずか 1 ステップで、多数の遺伝子の発現を強化できることが示され、しかも異なる発酵生産菌に対して共通して有効であるという例が示されたことから、本技術が発酵生産菌開発の効率化に貢献することが実証された。さらに、トランスクリプトーム解析を併用することで仮説の検証のみならず、仮説の構築もより網羅的なレベルで実行可能となり、新たな開発ターゲットの抽出にも有効であることが期待される。

*著者紹介 味の素 (株) ライフサイエンス研究所 (主任研究員) E-mail: yoshihiro_usuda@ajinomoto.com

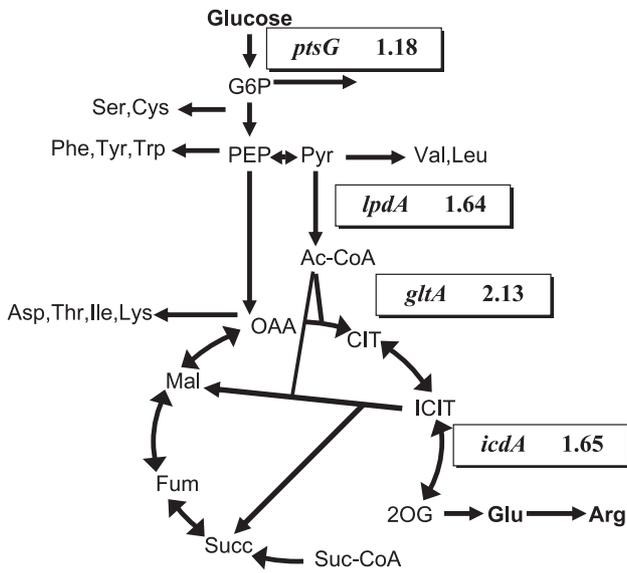


図1. *arcA* 遺伝子破壊株における遺伝子発現変化. グルタミン酸やアルギニン合成に関与する ArcA レギュロン遺伝子の発現量の変化を対照株に対する比率で示した.

核酸分解因子の探索とその欠損株による ヌクレオシド排出

プリンヌクレオチドである 5'-IMP, 5'-GMP は、グルタミン酸ソーダと並ぶまみ物質であることが知られている。近年アミノ酸の排出に関しては多くの知見が得られるようになってきたが、ヌクレオチドの利用や排出に関してはあまり知られていない。そこで筆者らは、プリンヌクレオチドの分解活性を担う遺伝子の同定と欠損化を試みた。*E. coli* における主要なヌクレオチド分解活性はペリプラズムに存在するヌクレオチダーゼ UshA であることが知られていた。*E. coli* 野生株より *ushA* 欠損株を取得し、ヌクレオチドによる生育を調べたところ、生育は著しく低下するが、5'-IMP あるいは 5'-GMP を唯一の炭素源として生育が可能であった。さらに、ヌクレオチ

ド分解活性が残存し、プリンヌクレオチド、あるいはその代謝物により誘導されていることが推定された。そこで、*ushA* 欠損株において、5'-IMP, 5'-GMP, それぞれを炭素源としたときのトランスクリプトーム解析を実施し、野生株と比較を行った。5'-IMP と 5'-GMP を C 源とした時に共通して発現が上昇する遺伝子を抽出し、さらに、遺伝子産物がペリプラズムに移行すると仮定し、シグナル配列の予測によって、候補遺伝子の絞込みを行った。その結果、2つの候補遺伝子が抽出され、そのうちの1つ *AphA* にヌクレオチドの分解活性を検出した。*AphA* は酸性フォスファターゼであることが知られていたが、中性条件化での誘導は予想外の結果であった。そこで、ノザンハイブリダイゼーションでも、その誘導を確認した。さらに *AphA* のヌクレオチド資化における効果を調べるため、*ushA*, *aphA* の二重欠損株を取得し、ヌクレオチドを唯一の炭素源とした培地においてその資化性を調べたところ、*ushA* 欠損株では生育が認められたが、*ushA*, *aphA* の二重欠損株では資化性が完全に失われることが明らかとなった (図2)。

このヌクレオチド分解活性欠損の効果をさらに検討するため、ヌクレオシドであるイノシンを培地中に生産するイノシン生産菌を用いた⁵⁾。イノシン生産菌より、*ushA*, *aphA* の二重欠損株を取得し、イノシンを生産する培養条件で培養したところ、イノシン生産菌では菌体外の 5'-IMP が検出されないのに対し、*ushA*, *aphA* の二重欠損株では 0.8 g/l の 5'-IMP が菌体外に検出された。さらに 5'-IMP から 5'-GMP を合成する酵素群をコードする *guaBA* オペロンを導入し、生産培養を行ったところ約 0.1 g/l の 5'-GMP を培地中に検出した。リン酸基を持つヌクレオチドは膜を透過できないことが知られていることから、この結果は *E. coli* がヌクレオチドを排出する担体を有していることを強く示唆する結果となった (図3)⁵⁾。

通常、*E. coli* では、ヌクレオチド資化に関与するフォ

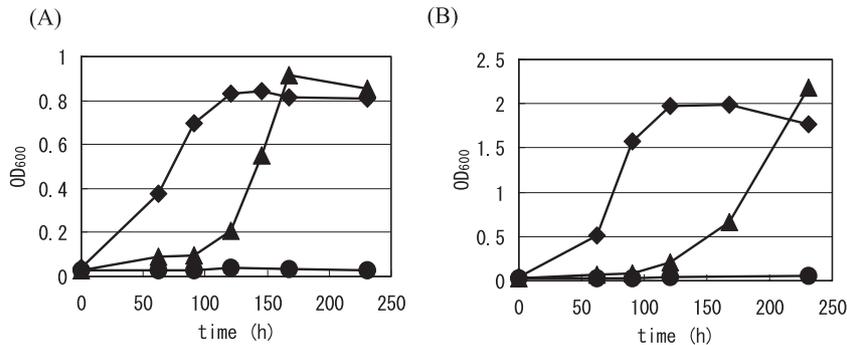


図2. 分解活性欠損株のヌクレオチドでの生育. 野生株 (◆), *ushA* 欠損株 (▲), および *ushA*, *aphA* 二重欠損株 (●) を 5'-IMP (A) あるいは 5'-GMP (B) を唯一の炭素源とした M9 培地で培養した.

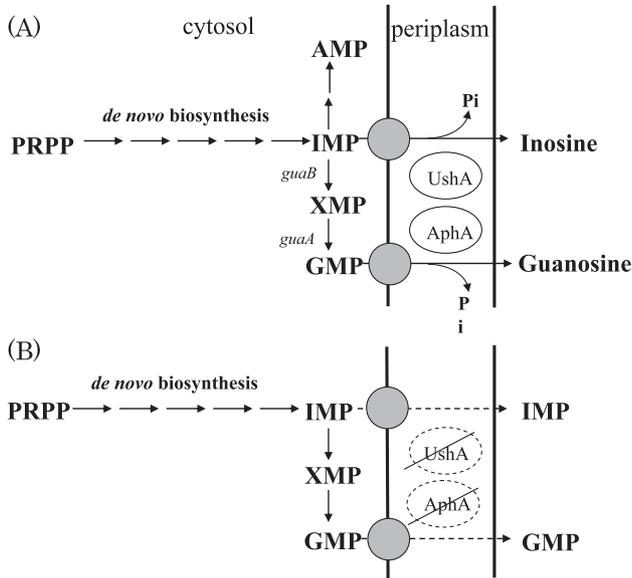


図3. *E. coli*におけるプリンヌクレオチドの分解と排出. *De novo*合成された5'-IMP, 5'-GMPは通常の状態ではペリプラズムで分解され排出される (A). 分解活性欠損株 (*ushA, aphA*二重欠損株)では5'-IMP, 5'-GMPがヌクレオチド排出担体 (灰色丸印)によって菌体外に排出されると推定される (B).

スファターゼとしては、アルカリフォスファターゼであるPhoAが知られているが、トランスクリプトーム解析を用いて、予想外の因子を見いだすことができた. このようにトランスクリプトーム解析を用いて、適切な条件で比較を行うことにより、目的の因子探索にも利用できることが示された.

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の向上

微生物は培養初期に急速に生育 (対数増殖) した後、生育は停止する (定常期). 通常、目的物質は培地中の要求アミノ酸などの減少により生育速度がある一定以下になった場合に培地中に蓄積されることが多いが、その一方で、目的物質の生産速度は定常期において徐々に低下していく傾向がある. 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、定常期でも生産速度を維持できるということ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. しかし、単に目的物質への生合成経路の遺伝子発現を強化するだけでは目的とする形質を得ることはできない. そこで、筆者ら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生産菌を取得することを試みた.

さまざまな培地、培養条件で *E. coli* 野生株を培養し、

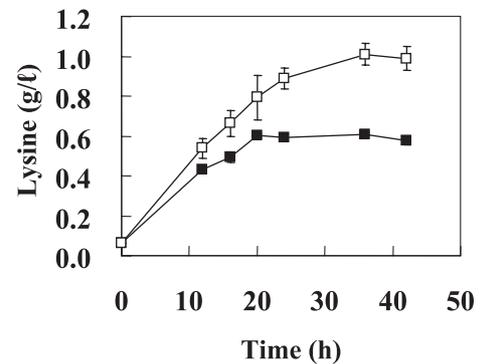


図4. *rmf* 遺伝子破壊株のリジン生産. リジン生産菌対照株 (■) と *rmf* 遺伝子破壊株 (□) のリジン生産培養を行った.

増殖期、および定常期でのトランスクリプトームデータを取得し、これらの条件下で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した. 多数の遺伝子が抽出されたが、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* 遺伝子に着目した. 本遺伝子産物であるRMF (ribosome modulation factor) 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の機能から、定常期においてはRMF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推定した.

この仮説を検証するために *E. coli* のリジン生産菌より *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対照株と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を認めた (図4) 7).

酵素発酵生産への *rmf* 遺伝子破壊の応用

rmf 遺伝子破壊による生産性の向上を他の発酵生産菌開発に応用展開を図るため、トランスクリプトーム解析によって *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プロファイルを示すことが明らかとなった. 具体的には、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によって制御され、PhoBの結合配列 (Pho box) をプロモーター配列の近傍に有することが知られ

ている。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た。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。この知見を応用して *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、あるいはグアノシンなどのヌクレオシドとピロリン酸からそれぞれ、ヌクレオチドである 5'-IMP、5'-GMP を生成する工業的に有用な酵素である⁸⁾。 *M. morganii* 由来の酸性フォスファターゼをコードする *phoC* 遺伝子の上流域には Pho box と相同な配列が存在しており、 *E. coli* の *rmf* 遺伝子破壊株を宿主として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た。 *rmf* 遺伝子破壊株において本酵素遺伝子を持つプラスミドを導入し、発現させたところ、対照と比較して酸性フォスファターゼ酵素生産量が約 1.5 倍向上する結果を得ることができた (図 5)⁹⁾。このように発酵生産に有用な因子の取得のみならず、トランスクリプトーム解析により解明された遺伝子ネットワーク情報を有用遺伝子の発現に活用した例を示した。

今後の展望

このようにトランスクリプトーム解析は、アミノ酸や核酸などの発酵生産菌の開発においても、有用かつ必須のツールとなっている。単に目的とする物質の生合成経路を強化するだけでなく、発酵過程全体の最適化を行うことや、これまで予測もつかなかったような細胞内の情報伝達ネットワークを解明することも可能になると期待され、さらに応用の幅は広がっていくであろう。さらに、トランスクリプトーム解析が安価で容易に利用可能になれば、近い将来には、発酵の工程管理などにも応用可能と考えられる。

また、トランスクリプトーム解析以外にも、ゲノム解

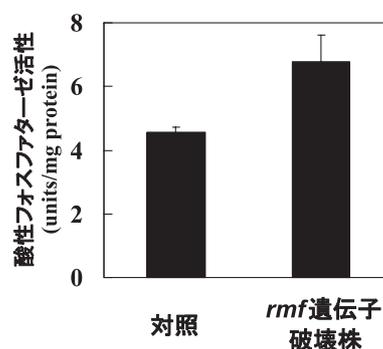


図5. *rmf* 遺伝子破壊株の酸性フォスファターゼ活性。対照株および *rmf* 遺伝子破壊株に *M. morganii* 由来 *phoC* 遺伝子搭載プラスミドを導入し、菌体内の酸性フォスファターゼ活性を測定した。

析、プロテオーム解析、メタボローム解析、さらには、代謝フラックス解析といった網羅的な解析手法の進展は著しい。これらの解析を統合することにより、さらに発酵生産菌の状態をより精度高く、かつ動的に把握することが可能になることが期待される。実際、 *C. glutamicum* においてはそのような試みが報告されている¹⁰⁾。精度の高い網羅的なデータを取得し、効率的に活用することが、研究開発の質と効率の飛躍的な向上につながることを期待される。

本研究は、味の素株式会社発酵技術研究所にて実施されたものであり、同研究所の田平有紀子氏、笥雅博氏を始めとする共同研究者との成果である。

文 献

- 1) DeRisi, J. *et al.*: *Science*, **278**, 680 (1997).
- 2) Hayashi, M. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1337 (2002).
- 3) Glanemann, C. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **61**, 61 (2003).
- 4) 田平有紀子ら：日本農芸化学会大会講演要旨集， p.78 (2005).
- 5) Matsui, H. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 570 (2001).
- 6) Kakehi, M. *et al.*: *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, in press.
- 7) Imaizumi, A. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **117**, 111 (2005).
- 8) Mihara, Y. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 2811 (2000).
- 9) Imaizumi, A. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 949 (2006).
- 10) Kromer, J. O. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **186**, 1769 (2004).