

コリネ型アミノ酸生産菌の低酸素適応性に関わる遺伝子の解明

池田 正人
(信州大学 農学部)

研究の目的

アミノ酸発酵は多量の酸素を必要とする。酸素が不足すると、アミノ酸の代わりに有害な有機酸が蓄積し、発酵は成立しない。このため、溶存酸素を一定レベル以上に維持することが重要であり、その管理に多大なコストと労力が割かれている。もし、酸素が不足してもアミノ酸を効率よく生産する、いわば“低通気適応株”を育種できれば、アミノ酸発酵のみならず、酸素を要する発酵全般にプロセス効率化を図る新しい技術になるが、現在、そのような技術はない。我々は先に、種々の好気性菌の酸素要求特性を比較し、アミノ酸発酵菌コリネバクテリウム・グルタミカムが比較的低濃度の酸素濃度下でも生育することを報告した(1)。このことを踏まえれば、同菌には何らかの低酸素適応機能が備わっている可能性がある。そこで、我々は酸素の要求量が逆に高まった変異株を分離し、その回復遺伝子を特定する方法で、本菌における低酸素適応性に関わる機能をゲノム上から探索することを試みた。

方法

各種の低濃度酸素環境は、嫌気性菌や微好気性菌の簡易培養用に販売されている酸素吸収剤(スギヤマゲン、アネロパックシリーズ)および専用密閉容器を用い、メーカーのマニュアル(<http://www.sugiyama-gen.co.jp/micro/p35.html>)に従って酸素吸収剤の量を調節することにより構築した。高濃度酸素要求株は、ニトロソグアニンジンをを用いて定法により変異処理した野生株の変異処理菌体から、ピロドレプリカ法にて、低濃度(0.5%付近)の酸素環境下では生育できない変異株を選択することにより取得した。高濃度酸素要求株の同形質を回復させる遺伝子は、野生株のゲノムライブラリで高濃度酸素要求株を形質転換し、酸素濃度が0.5%または6%の低酸素条件下で生育する形質転換株を選択することによって取得した。このようにして取得した遺伝子の各種高濃度酸素要求株に対するクロス相補能は、各形質転換株を上述の低濃度酸素環境でプレート培養する方法、ならびにMM培地を含む試験管で静置培養する方法により調べた。

結果

1. 高濃度酸素要求株の誘導

酸素濃度を大気レベル(21%)から0%まで段階的に減らすと、コリネバクテリウム・グルタミカム野生株 WT-96 は酸素濃度の低下に伴い徐々に生育が弱まり、0.5%濃度付近にコロニー形成の限界があることがわかった(1)。WT-96 株を変異処理し、大気条件下では生育するが、低濃度(0.5%付近)の酸素環境下では生育できない変異株を多数分離した。これらの変異株の酸素に対する依存性をコロニー形成能によって調べた結果、いずれの変異株とも大気条件下では生育するものの、酸素が0.5%や6%の低い条件下では生

育できないか生育が著しく悪化することが示された。この内、典型的な表現型を示した5株 (OX-3、OX-96、OX-109、OX-112 および OX-119) の酸素依存性を図1に示す。

2. 高濃度酸素要求性を回復させるDNA断片の取得

これら5種の高濃度酸素要求株を受容菌として、野生株 WT-96 のゲノムライブラリから同形質を回復させるDNA断片のクローン化を試みた。いずれの変異株においても、酸素濃度が0.5%または6%の低酸素条件で選択することにより目的とする形質転換株が取得された。これら形質転換株のプラスミドを解析した結果、OX-3株の相補プラスミドとして1.9KbのEcoRI断片を有するpEco1.9が、OX-96株の相補プラスミドとして2.1KbのBamHI断片を有するpBam2.1が、OX-109株の相補プラスミドとして3.2KbのEcoRI断片を有するpEco3.2が、OX-112株の相補プラスミドとして1.1KbのEcoRI断片を有するpEco1.1が、そしてOX-119株の相補プラスミドとして1.8KbのBamHI断片を有するpBam1.8、3.2KbのBamHI断片を有するpBam3.2、および2.5KbのSalI断片を有するpSal2.5の3種プラスミドが得られた。図1に各々の形質転換株の種々酸素濃度条件下における生育能を示した。高濃度酸素要求株は酸素濃度が低い条件では生育しないのに対し、形質転換株はその形質が野生株に近いレベルにまで回復しているのがわかる。なお、同様なショットガンクローニングを別の10株の高濃度酸素要求株についても行ったが、得られたDNAはいずれも上記のいずれかのDNAと同一であった。

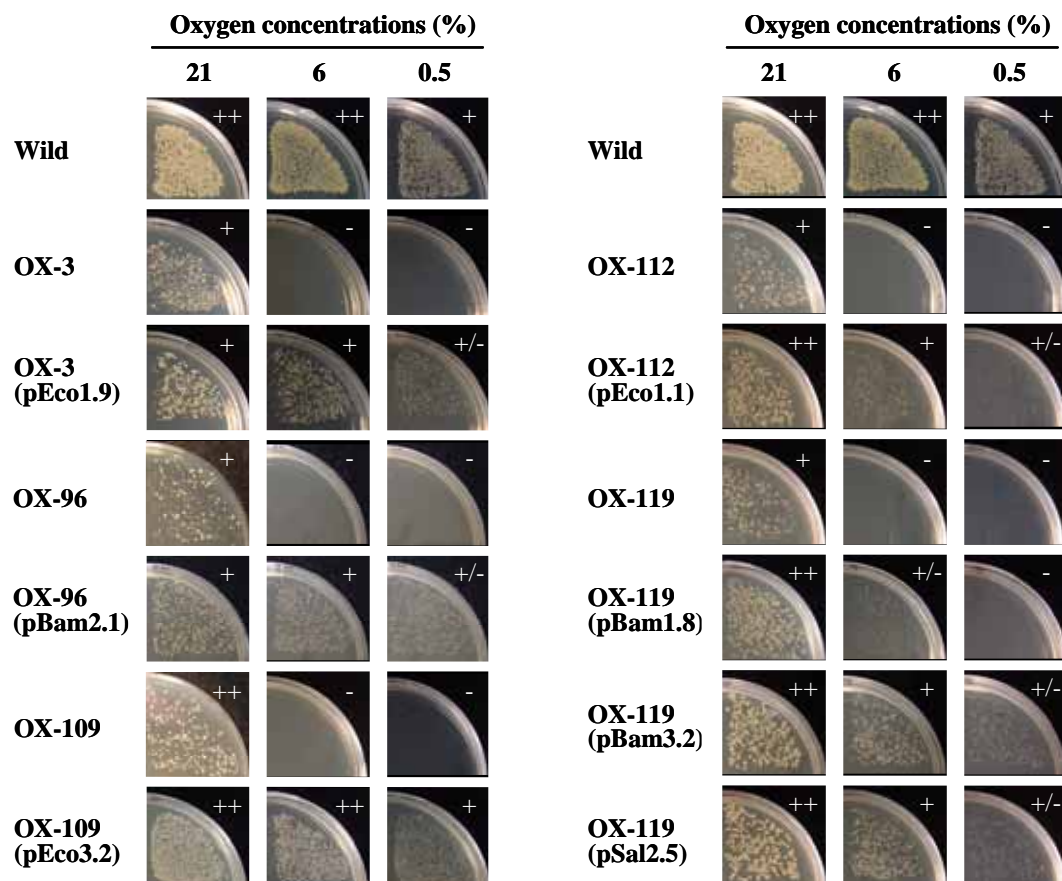


図1. 高濃度酸素要求株と相補クローンの各種酸素濃度下での生育
C. glutamicum 野生株WT-96およびその高濃度酸素要求株の培養希釈液(約 10^3 /ml)をBY寒天プレートに 50μ l塗布し、示された酸素濃度条件下、30℃で2日間培養後の生育を示す。

3. 高濃度酸素要求性に関わる遺伝子の特定

上記で得た7種のプラスミドにクローン化されたDNA断片の塩基配列を決定し、コリネバクテリウム・グルタミクムのゲノムデータベース(2)に照合して各DNA断片上に存在する完全長の遺伝子を検索した。その結果、pEco1.9にはCgl0807が、pBam2.1にはCgl1101とCgl1102の2遺伝子が、pEco3.2にはCgl2859とCgl2861の2遺伝子が、pEco1.1にはCgl0600が、pBam1.8にはCgl1427が、pBam3.2にはCgl2857とCgl2858の2遺伝子が、そしてpSal2.5にはCgl2857とCgl2859の2遺伝子が存在することがわかった。挿入断片上に2遺伝子を有するpBam2.1、pEco3.2およびpBam3.2については、各遺伝子のサブクローニングと相補試験により、相補能に関わる目的遺伝子が、それぞれ、Cgl1102、Cgl2859、Cgl2857であることを明らかにした。以上から、RNAポリメラーゼ²⁴因子Cgl0600、鉄の取り込みに関わるシデロフォア関連タンパク質Cgl0807、呼吸鎖に関わるフェレドキシンタンパク質Cgl1102、核酸の合成に関わるシチジル酸キナーゼCgl1427、そして機能未知の膜タンパク質Cgl2857およびCgl2859の計6遺伝子が、高濃度酸素要求性に関わる遺伝子として特定された(表1)(3)。いずれの遺伝子についても低酸素適応性との関連はこれまでに知られていない。なお、機能未知の膜タンパク質Cgl2857およびCgl2859のオーソログは、大腸菌や枯草菌等、他の属に属する微生物には見出せず、コリネバクテリウム・グルタミクムやコリネバクテリウム・エフィシヤンス等、いわゆる“グルタミン酸菌”に特有の遺伝子である。

4. 各遺伝子の5種高濃度酸素要求株に対するクロス相補能

OX-119株を相補するプラスミドとして、異なる2種の遺伝子Cgl1427とCgl2857を有するプラスミド、それぞれpBam1.8、pBam3.2が取得された(図1)。このことは、取得した遺伝子が別の遺伝子に変異をもつ変異株の高濃度酸素要求性をサプレスする能力を有することを示唆する。この可能性を、取得した全ての遺伝子について調べる

表 1. 取得したプラスミドと挿入断片上の推定遺伝子

Plasmid	Insert size (kb)	Genes (Putative functions)
pEco1.9	1.9	Cgl0807 (Siderophore-interacting protein)
pBam2.1	2.1	Cgl1101 (Membrane protein) Cgl1102 (Ferredoxin)
pBam2.1d	0.54	Cgl1102 (Ferredoxin)
pEco3.2	3.2	Cgl2859 (Membrane protein) Cgl2861 (Glycosyltransferase)
pEco1.1	1.1	Cgl0600 (RNA polymerase σ^{24} subunit)
pBam1.8	1.8	Cgl1427 (Cytidylate kinase)
pBam3.2	3.2	Cgl2857 (Membrane protein) Cgl2858 (Acyltransferase)
pSal2.5	2.5	Cgl2857 (Membrane protein) Cgl2859 (Membrane protein)

ため、各々の遺伝子について5種の変異株に対するクロス相補能を調べた。導入するプラスミドとして、Cgl2857およびCgl2859以外の4遺伝子は各々の遺伝子を単独で含むプラスミド、すなわちpEco1.9 (Cgl0807を含有)、pBam2.1d (pBam2.1からCgl1102のみをサブクローニングしたプラスミド)、pEco1.1 (Cgl0600を含有)、pBam1.8 (Cgl1427を含有)を用いた(表1)。一方、Cgl2857とCgl2859の両遺伝子は共に機能未知の膜タンパク質をコードし、ゲノム上で互いに隣接して存在することから、両遺伝子産物が複合体を形成して同一の機能を担っている可能性が高い。従って、両遺伝子をセットで持つプラスミドpSal2.5を用いた(表1)。これら5種のプラスミドの各種変異株における導入効果を、酸素供給が不十分な静置培養にて調べた。その結果、pEco1.1 (RNAポリメラーゼ²⁴因子)、pBam1.8 (シチジル酸キナーゼ)およびpSal2.5 (機能未知の膜タンパク質)の3種プラスミドは、対応する変異株の相補能だけでなく、他のいずれの変異株をも多かれ少なかれ相補する能力を有していることがわかった(3)。一方、他2種のプラスミド、pEco1.9 (シデロフォア関連タンパク質)およびpBam2.1d (フェレドキシンタンパク質)は、対応する変異株、それぞれOX-3およびOX-96に対してはクロス相補能を有していたが、他の3種変異株に対しては相補能を示さなかった(3)。つまり、これら2遺伝子については相補能が限定的であることを示している。以上と同様な結果は、プレート培養試験においても確認された。

結論

コリネバクテリウム・グルタミクムの野生株から変異誘導した高濃度酸素要求株を受容菌とし、それらの形質を回復させるDNA断片をクローン化することにより、高濃度酸素要求性に関わる遺伝子を計6種特定した。これらは、鉄の取り込みに関わるシデロフォア関連タンパク質Cgl0807、呼吸鎖に関わるフェレドキシンタンパク質Cgl1102、RNAポリメラーゼ²⁴因子Cgl0600、核酸の合成に関わるシチジル酸キナーゼCgl1427、そして機能未知の膜タンパク質Cgl2857およびCgl2859である。このうち後4者は、対応する変異株だけでなく他の変異株も広く相補する能力を有しており、低酸素環境での生育不良を回復させる汎用的能力を有することが示唆された。アミノ酸生産菌として長年にわたり変異育種された工業菌株は一般に、低酸素環境などのストレスに感受性を示し、野生株に比べて低酸素適応性が劣る。その遺伝的要因は不明であるが、本研究で特定した遺伝子を強化することで工業菌株の低酸素適応性を高められる可能性がある。

文献

1. Takeno, S., Ohnishi, J., Komatsu, T., Masaki, T., Sen, K., and Ikeda, M. Anaerobic growth and potential for amino acid production by nitrate respiration in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**:1173-1182 (2007)
2. Ikeda, M., and Nakagawa, S. The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**:99-109 (2003)

3. Ikeda, M., Baba, M., Tsukamoto, N., Komatsu, T., Mitsuhashi, S., and Takeno, S. Elucidation of genes relevant to the microaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**:2806-2808 (2009)