

# メカノセンシティブチャネルを利用した新規発酵技術の創成

橋本 賢一

東京電機大学 工学部 環境化学科

## 研究の目的

微生物を用いた有用物質の直接発酵を考えた場合、細胞内での代謝経路を最適化することと合わせ、目的物質の細胞外への排出効率を向上させることが重要である。しかし、膜タンパク質の詳細な機能を解析し、開発することは困難であった。メカノセンシティブチャネルの一種である NCgl1221 チャネルは *C. glutamicum* の主要なグルタミン酸排出担体である。我々はこのチャネルはグルタミン酸以外にもアスパラギン酸、フェニルプロピオン酸、リシンを通過させることを明らかにしている。この NCgl1221 チャネルを新規排出担体として利用することで、既存の有用物質生産株の物質生産性を向上させることができると考えた。現在排出担体の知られていない、イノシン酸グアニル酸生産に着目した。既に報告されている大腸菌を親株としたイノシン酸、グアニル酸の生合成系を強化した株<sup>(1)</sup>に対し、NCgl1221 を発現することで、生産性が向上すると考えた。また、メカノセンシティブチャネルを基とした物質生産に適した排出担体の開発を目指し、NCgl1221 チャネルの開口特性を解析することを目的とした。

## 方法

### 1. NCgl1221 チャネル導入によるイノシン酸、グアニル酸生産性への影響

*C. glutamicum* は通常の生育条件でグルタミン酸を細胞外へ排出することはないが、biotin の制限、Tween 40 の添加、penicillin の添加などにより生育の抑制とグルタミン酸過剰生成が誘導される。これらの条件により、NCgl1221 チャネルが開口しやすい状態となることが予想される。イノシン酸、グアニル酸の排出担体として NCgl1221 チャネルを利用する場合、このチャネルは通常状態と比較して開きやすい状態であることが必要である。NCgl1221 チャネルは生育条件においてグルタミン酸を細胞外に蓄積するようになる A111V 変異体と W15CSLW 変異体が知られている<sup>(2)</sup>。これら変異体は野生体と比較し、より開口しやすい構造であることが予想された。これらの変異型 NCgl1221 チャネルを既知のイノシン酸、グアニル酸生産合成強化株(*E. coli* FADR *add edd yicP pgi xapA ushA aphA/pMWKQ*)に発現させ、培養を行った。

### 2. NCgl1221 チャネルの開口特性の解析

NCgl1221 チャネルを用いて新規物質排出担体を開発するためには、このチャネルの開口特性を詳細に知る必要がある。このチャネルは細胞膜の張力により開口するため、細胞膜の状態がチャネルの開口特性に大きく影響している可能性が考

えられた。本研究では *C. glutamicum* の細胞膜と、*E. coli* の細胞膜での NCgl1221 チャンネルの開口特性をパッチクランプ法による電気生理学的な解析を行った。

## 結果

### 1. NCgl1221 チャンネル導入によるイノシン酸、グアニル酸生産性への影響

大腸菌を親株としたイノシン酸生産菌に対し、A111V 変異型 NCgl1221、W15CSLW 変異型 NCgl1221 をプラスミドベクターを用いて発現させたところ、生育の向上とイノシン酸生産量の向上が確認された。

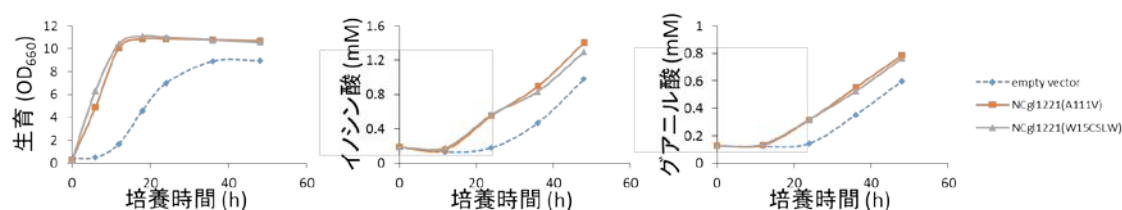


図 1. NCgl1221 チャンネル導入株での生育とイノシン酸、グアニル酸生産量

### 2. NCgl1221 チャンネルの開口特性の解析

細胞に直接アクセスするパッチピペットのサイズ(先端口径約  $1\ \mu\text{m}$ )から、原核微生物を対象としたパッチクランプ法を用いた解析を行うためには、対象となる細胞を巨大化する必要がある。これまで *E. coli* や *Bacillus subtilis* の巨大細胞は取得することができているが、*C. glutamicum* の巨大細胞は取得することができなかった。本研究では新たに *C. glutamicum* の巨大細胞の取得系を構築した。*C. glutamicum* の細胞表層には特有のアラビノガラクトタン層、ミコール酸層がある。エタンブトールによるアラビノガラクトタン生成抑制に伴うミコール酸層の定着抑制条件下で SI 法<sup>③</sup>による培養を行うことによってパッチクランプ法を適用するに十分なサイズの *C. glutamicum* の巨大細胞を形成することに成功した。

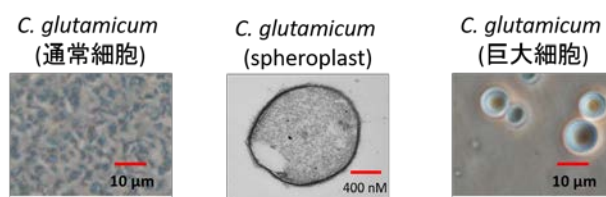


図 2. *C. glutamicum* の巨大細胞

取得した *C. glutamicum* の巨大細胞と野生型の NCgl1221 を発現させた大腸菌の巨大細胞を対象としたパッチクランプ法によるチャンネルの開口特性を比較した。*C. glutamicum* の細胞膜における NCgl1221 チャンネルは大腸菌の細胞膜における NCgl1221 チャンネルと比較し、より生理的条件に近い  $-80\ \text{mV}$  のピペット電圧をかけた条件では一度開口すると膜張力をかけていない条件でもしばらくは開口状態を維持することが明らかとなった。

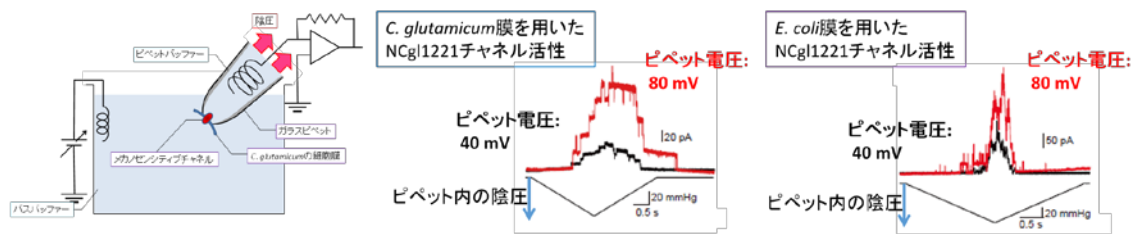


図 3. *C. glutamicum*、大腸菌の細胞膜における NCgl1221 チャンネルの開口特性

## 結論

本研究により、A111V 変異型、W15CSLW 変異型 NCgl1221 チャンネルの導入によりイノシン酸、グアニル酸の生産効率の向上が確認された。これより、NCgl1221 チャンネルを新規物質排出担体として利用することでイノシン酸、グアニル酸の生産効率向上を目指す道が示唆された。現在、NCgl1221 を利用したヌクレオシドや、排出担体が見出されていない他のアミノ酸の生産性を向上させるためのプロジェクトが立ち上がっている。

しかし、*C. glutamicum* のグルタミン酸発酵と比較すると、現在の条件ではまだまだ生産効率が低い。パッチクランプ法による解析により NCgl1221 チャンネルは *C. glutamicum* において、一度開口するとしばらく開口状態を継続することが明らかになった。細胞膜の脂質状態は宿主となる細胞ごとに異なる。今後、宿主となる細胞の細胞膜条件に適した NCgl1221 チャンネルの開発や、細胞膜の脂質状態を変化させる培養条件の開発などにより更なる物質生産の効率化が望めると考えている。

## 文献

- (1) Kakehi, M., Usuda, Y., Tabira, Y., and Sugimoto, S. (2007) Complete deficiency of 5'-nucleotidase activity in *Escherichia coli* leads to loss of growth on purine nucleotides but not of their excretion. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **13**:96-104.
- (2) Nakamura, J., Hirano, S., Ito H., and Wachi, M. (2007) Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:4491-4498
- (3) Kuroda, T., et al. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**:16897-16904