

*Rhodococcus erythropolis*における有機溶媒応答に関する研究 —新規プロモーターの解析と溶媒耐性獲得に寄与する因子の探索—

学位論文内容の要旨

【背景および問題点】

Rhodococcus 属細菌は、多様な触媒能や有機溶媒に対する耐性能を持つ細菌である。これらの特性から、*Rhodococcus* 属細菌を物質生産などの生物工場として利用できる宿主として期待がもたれている。私が所属するグループでは、*R. erythropolis* による物質変換を目的とし、同菌における多目的用途に利用可能な宿主-ベクター系の開発を行ってきた。例えば、組換えタンパク質の発現ツールとしての発現ベクター、宿主細胞としてのリゾチーム感受性株、トランスポゾンを利用した宿主変異体構築システムなどが挙げられる。

現在にいたるまで微生物を用いた物質変換技術は多岐に渡り応用されており、特に医薬、化学、食品業界への寄与は著しいものがある。微生物変換に用いられる基質や生産物の大半は親水性物質であるが、複雑な分子構造を形成する医薬品などの中間体は疎水性物質が多く、このような疎水性物質を対象とした微生物変換技術は実用レベルにまで達してはいない。その理由として、疎水性基質が培養液層へ溶解しないこと、基質の溶解に使用される有機溶媒が微生物に対して毒性を示すことなどが挙げられる。この問題を解決すべく、広範囲に及ぶ触媒能や有機溶媒耐性能をもつ *Rhodococcus* 属細菌を宿主とした、有機溶媒存在下での変換系構築を目指した。そこで同系構築に向けて、*Rhodococcus* 属細菌における有機溶媒により発現誘導されるタンパク質の同定や遺伝子解析、そして有機溶媒耐性能の獲得に関与する因子の探索を行った。

【研究内容・結果】

1. *Rhodococcus erythropolis* PR4 株におけるメタノール誘導型プロモーターの機能解析と応用

はじめに *R. erythropolis* における有機溶媒により誘導されるタンパク質の同定を試みた。*R. erythropolis* に属する 4 株へ各種有機溶媒を培地に添加し培養後、各株より抽出した粗タンパク質を SDS-PAGE 解析へ供した。その結果、4 株に共通してメタノール（終濃度 1% または 5%）によりイソクエン酸リアーゼ (icl_{Re}) の発現が誘導されることを見出した。この icl_{Re} の発現制御機構の解明に向け、プロモーター解析を試みた結果、 icl_{Re} 翻訳開始コドン +1 とした場合、上流約 202 bp までがメタノール誘導型プロモーターとして機能し、終濃度 0.1% のメタノールでもプロモーター活性が増大することが確認された。一方、上流 102 bp まで短くすると、メタノール添加に関係なく高活性型の構成型プロモーターとして機能することが判明した。次にこのメタノール依存性発現制御機構を解明すべく、 icl_{Re} 上流域に結合するタンパク質の探索を行った。その結果、同定したタンパク質は、*Corynebacterium glutamicum* や *Mycobacterium tuberculosis* が持つ酢酸代謝に関与する転写抑制因子である RamB と高い相同性を示した。RamB_{Re} 欠損株を構築し機能解析を行うと、欠損株ではメタノールや酢酸ナトリウムによる ICL_{Re} の発現誘導の制御が不能になったことから、RamB_{Re} が転写抑制因子として機能を担うことが判明した。RamB_{Re} は icl_{Re} 上流域 3 カ所に結合することが示唆された。*C. glutamicum* や *M. tuberculosis* では icl 上流域における RamB 結合部位は 1 カ所と報告されているため、*R. erythropolis* における RamB_{Re} を介した発現制御機構は *C. glutamicum* や *M. tuberculosis* とは異なる可能性が考えられる。*C. glutamicum* や *M. tuberculosis* における ICL 発現誘導物質として知られる酢酸は、同物質を資化する代謝過程で産

まれるアセチル CoA のバランスを保つために ICL の発現が誘導されると考えられている。一方、*R. erythropolis* は酢酸ナトリウムを資化することはできるがメタノールを単一炭素源として資化することができない。これらのことから、*R. erythropolis* におけるメタノール誘導型プロモーターは、メタノールの刺激(シグナル)を受けて何らかのタンパク質因子を介してプロモーター活性を上げている可能性が考えられる。

以上の知見をもとに、*icl_{Re}* 上流域 303 bp (メタノール誘導型プロモーター) と上流域 102 bp (高活性な構成型プロモーター) を用いた 2 種の発現ベクターの構築を行った。これらの発現ベクターは *R. erythropolis* の幅広い株において機能することを見出し、更に多様な発現系の構築が可能になると考えられる。

本研究により、メタノールを疎水性物質へ溶かす可溶化剤として、またタンパク質発現の誘導剤として用いた *Rhodococcus* 属細菌を宿主とした物質変換系の構築が期待される。

2. *Rhodococcus erythropolis* におけるブタノール耐性獲得に必須な因子の探索

R. erythropolis において有機溶媒耐性の獲得に寄与する因子の同定を試みた。有機溶媒として *R. erythropolis* に対して毒性が高いと思われた 1-ブタノールとイソブタノールを使用した。これは 1-ブタノールに対する耐性能の獲得に至れば、幅広い有機溶媒に対する耐性能を獲得すると期待されるからである。はじめに、*R. erythropolis* の保存株について検討すると、1-ブタノール存在下 (終濃度 3%) にて最も高い耐性を示した株は、*R. erythropolis* DSM 311S 株であることが確認された。次に、この DSM311S 株を用い、計 3 回の UV 照射により耐性株の育種を行った。その結果、野生株では生育しない終濃度 2% もしくは 3% のイソブタノール存在下においても生育が可能な耐性株の獲得に成功した。次にその耐性株を用い、イソブタノールの添加により変動するタンパク質をプロテオーム解析により同定した。更に土壤中より 1-ブタノール耐性菌として同定された *Clostridium* sp. YN5 株と *Enterococcus faecalis* CM4a 株、DSM 311S 耐性変異株由来のゲノムライブラリーを構築し、同ライブラリーを導入した宿主細胞の 1-ブタノール耐性の比較を行い、同溶媒耐性に寄与する可能性のある遺伝子領域を単離した。

プロテオーム解析や遺伝子解析の結果より、溶媒耐性へ関与していると思われる遺伝子を構成型発現ベクターへクローニングし、溶媒耐性能が低い野生株へ形質転換した。形質転換体に対して 1-ブタノール (終濃度 1.7%) を用いた耐性試験を行った結果、ABC transporter substrate binding protein (ABC), Alkyl hydroperoxide reductase (AhcC), DNA-binding protein (DPS), elongation factor G (EFG), pyruvate oxidase (PoxB) をそれぞれ過剰発現した場合、生菌数が対照群の約 3 倍以上増えることが明らかとなった。ABC のみならず ABC transporter を構成する複数のタンパク質を過剰発現することは、菌体内の溶媒濃度を低下させる効果があると考えられる。DPS は、過剰発現することにより 1-ブタノールを介した DNA 損傷を防いだ結果により耐性を示したと考えられる。EFG は 1-ブタノールにより変性したタンパク質を補うために細胞内のタンパク質翻訳の活発化に寄与していると推測される。また、PoxB は、菌体が 1-ブタノールに曝された場合、細胞膜の損傷からのキノンの流出により死滅すると報告がされているため、PoxB の過剰発現により、キノールからキノン合成に代謝が働き、キノンの補填をする可能性などが考えられる。発現解析と並行して、*R. erythropolis* が 1-ブタノールに曝された際の細胞形態の変化を観察した結果、1-ブタノールは細胞の肥大化を引き起こすことが確認された。これは 1-ブタノールが細胞分裂に関与するタンパク質へ変性などの影響を与え、細胞分裂に対して阻害効果を及ぼしていると考えられる。

本研究では、1-ブタノールもしくはイソブタノールに対する耐性獲得に寄与する遺伝子の同定を行った。それら遺伝子の単独発現は、発現量に依存して溶媒耐性を高めることを見出したが、上記タンパク質の共発現が更なる溶媒耐性獲得に繋がるのか更なる解析が必要である。更に、細胞分裂と溶媒との関連性について研究を進めることにより新たに溶媒耐性付与技術の開発が可能になるかもしれない。

学位論文審査の要旨

主 査	客員教授	田 村 具 博
副 査	教 授	横 田 篤
副 査	客員教授	鎌 形 洋 一
副 査	客員准教授	湯 本 勲
副 査	客員准教授	森 田 直 樹

学 位 論 文 題 名

*Rhodococcus erythropolis*における有機溶媒応答に関する研究 —新規プロモーターの解析と溶媒耐性獲得に寄与する因子の探索—

本論文は、和文 124 項、図 44、表 13、5 章からなり、参考論文 13 編(原著論文 2 編、学会要旨 11 編)が付されている。

微生物を用いた物質変換技術は多岐に渡り、特に医薬、化学、食品など広い分野で利用されている。それら変換では、ほとんどが親水性物質を対象としており、疎水性物質について実用化されている例はほとんど無い。疎水性基質の培地に対する溶解度が低いことや、有機溶媒が細胞に対して強い毒性を示すため、疎水性物質の溶解剤として有機溶媒を培地に高濃度添加できないことなどが理由として挙げられる。化学合成法で製造される物質には、合成中間産物も含め疎水性物質が少なくなく、それら物質に対して、酵素を過剰発現した微生物を用いて部位特異的、立体特異的な反応ができるようになれば、環境にやさしいバイオプロセスの構築が可能になる。本研究は、有機溶媒存在下における微生物変換技術を構築・展開する上で非常に有益である。

Rhodococcus 属細菌をモデルとして、各種有機溶媒に対する応答を調べるため、まず細胞内タンパク質の変化を検討している。その結果、有機溶媒の種類や濃度に加え、使用した株細胞によって異なるタンパク質変動を示すことが認められた。一方、全ての株においてメタノールで共通のタンパク質が誘導されることを見出し、このタンパク質をプロテオーム解析により同定することに成功している。同定したタンパク質は、イソクエン酸リアーゼ(ICL)であり、遺伝子クローニングにより *icl* 遺伝子は、同遺伝子下流にコードされる 3 種の遺伝子とともに一つのオペロンを形成していることを明らかにした。

icl 遺伝子上流領域の解析から、同領域にはメタノールで誘導されるプロモーター(P_{icl})

配列を有し、更に詳細な解析より、同プロモーター内部に非常に高活性の新規構成型プロモーター(P_{cpi})領域を見出した。そしてこれらの知見をもとに新規発現ベクター(誘導型と構成型)の開発に成功している。今回発見されたプロモーターは、既存の発現ベクターに組み込まれているプロモーターとは誘導機構や活性の強さが異なることから、ベクターの組み合わせにより多様な発現系の構築が可能になる。更に、有機溶媒を疎水性物質の溶解剤として使用すると同時に、機能遺伝子の発現誘導剤としても使用することが可能になり、得られた成果は疎水性物質の変換技術開発に向けて高く評価される。

本研究では、メタノール誘導型プロモーターに対する転写因子(RamB)についても同定が行われ、同転写因子の機能解析と発現機構について考察がなされている。本研究で示された一連の研究は、有機溶媒によって誘導されるタンパク質の同定からその遺伝子発現機構に至るまで、広くかつ注意深く検討・考察されており、学術的にも評価される。

次に、疎水性物質の変換に関連付けた研究として、バイオブタノールの生産に向けて宿主細胞の溶媒耐性を強化するには、どのようなタンパク質を細胞内に発現すればよいのか検討が行われている。

R. erythropolis 放線菌をモデル細胞として、1-ブタノールに最も耐性を示した株(*R. erythropolis* DSM 311S)に対し育種を行った。UV 照射を3回行いながらスクリーニングした結果、野生株では生育出来ない環境下(イソブタノールの終濃度が2%もしくは3%存在下)においても生育が可能な耐性株の育種に成功した。

この耐性株を用いて、イソブタノール存在下に発現変動する45種のタンパク質(発現低下16種、発現増加29種)をプロテオーム解析により同定した。また育種株由来ゲノムライブラリーを1-ブタノール非耐性株に導入して1-ブタノール耐性に寄与する遺伝子を5種単離した。両解析から得られた遺伝子情報をもとに、45種の発現ベクターを構築し、1-ブタノール非耐性株を宿主としたブタノール耐性試験を行った。その結果、溶媒耐性を明らかに高めた遺伝子を5種同定した。

得られた遺伝子がコードするタンパク質は、ABC transporter substrate binding protein (ABC), Alkyl hydroperoxide reductase (AhcC), DNA-binding protein (DPS), elongation factor G (EFG), pyruvate oxidase (PoxB)であり、それらの過剰発現により、溶媒添加時の対照群に比べ生菌数が約3倍以上増えることを明らかとした。各遺伝子の過剰発現と有機溶媒耐性に関して考察されているが、特筆すべき点は、有機溶媒に暴露されることによって、細胞内蓄積量が低下したタンパク質を過剰発現することで溶媒耐性が高まるという知見である。これまで、溶媒により発現誘導されたタンパク質の過剰発現と溶媒耐性についての解析は多くなされているが、細胞内レベルの低下したタンパク質の過剰発現と溶媒耐性に関する報告は少ない。本成果は、新規な成果であると共に、溶媒耐性機構を検討する上で重要な知見を与えている。そして、溶媒耐性菌を構築する新たな手法となり得る可能性があり、高く評価される。

よって、審査員一同は、加川雄介が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。