

博士論文

バクテリアにおけるシステイン制御機構と  
システイン発酵に関する研究

宅見 和浩

# 目次

第1章 導入	1
1-1. 緒論	1
1-1-1. 背景	1
1-1-2. 細胞内システインの制御機構	1
1-2. 本研究の目的と意義	8
1-3. 本論文の構成	9
第2章 <i>Pantoea ananatis</i> におけるシステイン耐性に関与する因子の同定・解析、並びにシステイン発酵への応用	10
2-1. 緒論	10
2-2. 実験方法	11
2-2-1. 使用菌株およびプラスミド	11
2-2-2. 生育条件	18
2-2-3. システイン耐性遺伝子のスクリーニングおよび寒天プレート上での生育試験	18
2-2-4. 最少培地における生育を指標としたシステイン耐性試験	18
2-2-5. CD 活性染色	18
2-2-6. CD 活性測定	19
2-2-7. $\beta$ -Galactosidase <i>lacZ</i> レポーターアッセイ	19
2-2-8. 定量的 real-time PCR	19
2-2-9. システイン発酵	21
2-3. 結果	22
2-3-1. システイン耐性に関与する遺伝子のスクリーニング	22
2-3-2. <i>ccdA</i> および <i>cefA</i> のシステイン耐性への関与	26
2-3-3. <i>ccdA</i> にコードされる新規システイン誘導型 CD の解析	28
2-3-4. システインによる <i>ccdA</i> の発現誘導	31
2-3-5. <i>ccdA</i> のシステインによる転写誘導に関与する転写調節因子 ( <i>ccdR</i> ) の解析	33
2-3-6. <i>ccdA</i> のシステイン発酵生産への応用	33
2-3-7. システイン排出ポンプ <i>cefA</i> の機能解析	36
2-3-8. <i>cefA</i> のシステインによる転写誘導に関与する転写調節因子 ( <i>cefR</i> ) の解析	36
2-3-9. <i>cefA</i> の機能解析およびシステイン発酵生産への応用	38
2-3-10. <i>cefB</i> の機能解析およびシステイン発酵生産への応用	40
2-4. 考察	42
2-4-1. 各種バクテリアにて保存される <i>ccdA-ccdR</i> システム	42
2-4-2. システインの分解を主要な機能とする CcdA	44

2-4-3. フィードバック阻害耐性型 SAT のタイプとシステイン生産への影響.....	44
2-4-4. システイン排出ポンプが持つ安全弁としての機能.....	44
2-4-5. まとめ.....	45
第 3 章 <i>Escherichia coli</i> におけるシステイン耐性に関与する因子の同定・解析、並びにシステイン発酵への応用.....	48
3-1. 緒論.....	48
3-2. 実験方法.....	49
3-2-1. 使用菌株、プラスミドおよび生育条件.....	49
3-2-2. システイン耐性遺伝子のスクリーニング.....	52
3-2-3. 最少培地における生育を指標としたシステイン耐性試験.....	52
3-2-4. 定量的 real-time PCR.....	52
3-2-5. システイン発酵.....	52
3-3. 結果.....	53
3-3-1. システイン耐性に関与する遺伝子のスクリーニング.....	53
3-3-2 <i>yhaM</i> のシステイン耐性への影響.....	53
3-3-3. システインによる <i>yhaM</i> の誘導.....	57
3-3-4. <i>YhaM</i> のシステイン生産への応用.....	59
3-4. 考察.....	61
3-4-1. <i>YhaM</i> とシステイン耐性の関連.....	61
3-4-2. システイン排出ポンプ <i>EamA</i> .....	61
3-4-3. 各種バクテリアが備えるシステイン分解システム.....	64
3-4-3. まとめ.....	67
第 4 章 <i>Pantoea ananatis</i> を用いたシステインの発酵生産.....	68
4-1. 緒論.....	68
4-2. 実験方法.....	69
4-2-1. 使用菌株、プラスミド.....	69
4-2-2. 生育条件.....	74
4-2-3. 最少液体培地中における生育を指標としたシステイン耐性試験.....	74
4-2-4. CD 活性染色.....	74
4-2-5. <i>CysM</i> (OASS-B)活性の測定.....	74
4-2-6. システイン発酵生産.....	74
4-2-7. <i>CysM</i> バリエント株の CD 活性測定.....	74
4-3. 結果.....	76
4-3-1. <i>P. ananatis</i> を宿主とするシステイン生産菌としての可能性.....	76

4-3-2. 高レベル生産菌 AG4854 株を用いたボトルネック探索 .....	78
4-3-3. CcdA 誘導に伴うシステイン生産量の減少 .....	80
4-3-4. 高レベルシステイン生産菌における CcdA 欠損の導入 .....	83
4-3-5. システイン排出ポンプの利用 .....	85
4-4. 考察 .....	87
4-4-1. <i>P. ananatis</i> を用いたシステイン生産 .....	87
4-4-2. システイン生産株の宿主としての <i>P. ananatis</i> の適正さ .....	87
4-4-3. まとめ .....	88
第 5 章 総括 .....	89
5-1. 本研究を通じて同定された細胞内システイン濃度制御遺伝子 .....	89
5-2. システイン分解酵素 .....	90
5-3. システイン排出ポンプ .....	90
5-4. システイン生産宿主としての可能性 .....	91
5-5. システイン発酵生産性向上にむけて .....	92
参考文献 .....	94
原著論文 .....	101
謝辞 .....	102

## 第1章 導入

### 1-1. 緒論

#### 1-1-1. 背景

タンパク質中における L-Cysteine (以下、システイン) は、ジスルフィド結合を介したタンパク質の折り畳みや高次構造形成、並びに鉄・硫黄クラスターの形成に関与する (1) など、生体内において重要な機能を担っている。しかしながら、システインは低濃度であっても原核生物、真核生物共に細胞毒性を示すことが知られており (2-4)、それが故に細胞内のシステイン濃度は様々なシステム(代謝制御、分解、排出)を用いて厳密に制御されている。しかし強力な細胞毒性作用にも関わらず、特に分解や排出機構には未解明の部分が多く存在しており、システインに特化した因子はほとんど同定されていなかった。そこで、本研究では、システイン耐性に関わる因子の同定と解析を通じ、バクテリアが持つシステイン制御メカニズムのさらなる解明を目指した。

制御メカニズムの一層の解明は、システインの発酵生産という側面でも大きな意味を持つものと推察される。システインの世界市場は現在のところ年間約 3500 トンと、各種アミノ酸の中では比較的大きな市場であり、用途は医薬品、食品、化粧品、工業用など多岐に渡る。その製法は人毛・羽毛などの動物性タンパク質からの抽出法のほかに、酵素法、発酵法などのバイオテクノロジーを用いた製法が知られている。コスト面では抽出法が圧倒的に有利な状況であると言われているが、近年は製品の安全性や製造過程での環境への影響などに配慮する消費者の意識は高まってきており、ノンアニマル由来システイン、すなわち発酵生産品のニーズは上昇傾向にある。しかしながら、多くのアミノ酸は発酵による製法が有効であるが、システインに関しては上述のように、細胞への毒性や複雑な代謝のレギュレーションなどのために発酵による効率的な生産が非常に困難であり、システイン発酵はアミノ酸発酵の中でも難易度の高い発酵と考えられている。

このように、効率的な発酵法を開発することに社会的な意義が認められる一方、その達成には技術的な課題が存在する。その技術的な課題を解決するためには、「厳密な細胞内システイン濃度の調節機構を理解し、制御する」ことが必要になると考えられた。そこで本研究では、細胞内システイン濃度の制御メカニズムのさらなる解明とともに、同定された各種因子を用いた発酵生産への応用可能性も併せて検討し、効率的なシステイン発酵法を確立することを目指した。

#### 1-1-2. 細胞内システインの制御機構

*Escherichia coli* はシステインの制御機構に関して最もよく研究されているバクテリアであり、これまでの研究を通じて、① システイン生合成(酵素レベル)の調節、② 分解による調節、③ 排出による調節、④ 硫黄代謝(転写レベル)の調節、の 4 つの機構を中心に細胞内のシステインレベルを調節していることが明らかとなっている(図 1-1)。

① のシステイン生合成(酵素レベル)の調節機構に関しては、システインにより阻害されるセリンアセチルトランスフェラーゼ (serine acetyltransferase; SAT)、並びにシステイン生合成経路中の中間体であるセリンにより阻害される 3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ (3-phosphoglycerate

dehydrogenase; 3-PGDH)、の2つの鍵酵素に対するフィードバック阻害による調節が代表的なものとして知られている (5, 6)。細胞内のシステインレベルが上昇すると、そのシステインにより SAT が阻害され、システインの生合成を抑制する。さらに、SAT が阻害されることにより反応基質であるセリンの細胞内濃度が上昇し、3-PGDH を阻害する。この 3-PGDH は解糖系からシステイン・セリン生合成経路へ流入する炭素源の量を調節するバルブのような役目を担っており、3-PGDH が阻害されることによりシステイン生合成経路へ流入する炭素源が減少、システインを過剰に生合成しない機能を備えている(図 1-1 参照)。SAT や 3-PGDH は *E. coli* ではそれぞれ *cysE* と *serA* によってコードされるが、そのフィードバック阻害耐性型変異に関しては既によく研究されており、効果的な変異型 SAT として CysE5 (V95R および D96P) (6) や CysEX (T167A) (7) が、同じく変異型 3-PGDH として SerA346 (5) や SerA5 (409 stop) (8) などが知られている(図 1-2, 1-3)。システインの発酵生産にあたり、特に SAT のフィードバック阻害耐性は非常に重要であり、野生株ではシステインを検出可能なレベルでは生産できないが、変異型 SAT を導入することで初めて検出することが可能となる。このように、システイン生合成レベルの調節機構は研究が進んでおり、システイン発酵への応用も検討されている。

② の分解に関しては、*E. coli* では少なくとも 6 つの酵素 (CysK, CysM, MetC, MalY, TnaA, DcyD) がシステインデスルフィドラーゼ (cysteine desulfhydrase; CD) 活性を有していることが知られている (9)。CD はピリドキサール 5 リン酸 (PLP) を補酵素とし、システインをピルビン酸、アンモニア、硫化物に分解する ( $\text{Cysteine} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Pyruvate} + \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{S}$ ) ことにより過剰なシステインの蓄積を回避しているものと考えられる。しかしながら、これらの酵素はシステインの分解の他に、酵素本来の機能と考えられる重要な生理機能を有していることが知られている。例えば、CysK と CysM は *O*-アセチルセリンスルフィドラーゼ (*O*-acetylserine sulfhydrylase; OASS) であり、*O*-アセチルセリン (OAS) と硫化物からシステインを合成する反応を触媒する (10, 11)。シスタチオニン  $\beta$ -リアーゼファミリーに属する MetC や MalY は、シスタチオニンをホモシステインに変換する反応に代表されるように、様々な基質の C $\beta$ -S 結合を切断する機能を有している (12, 13)。TnaA はトリプトファンナーゼであり、L-トリプトファンをインドールとピルビン酸、アンモニアに加水分解する反応を担っている (14)。このように、*E. coli* ではシステイン分解以外の主要な生理機能を有する酵素の副反応として CD 活性を合わせ持つと考えるのが一般的である。また、DcyD は他の 5 種の CD とは異なり、D-システインを基質とするため (15)、細胞内のシステイン濃度制御に主として関与しているとは考え難い。一方、*Corynebacterium glutamicum* はシステイン分解以外の機能が見出されていない CD を一つだけ保有しており、*E. coli* とは異なったシステムを有している。しかしながら、この *aceD* にコードされる *C. glutamicum* の CD は、システインレベルに応答して作用する訳ではなく (16)、またシステイン代謝やシステイン耐性への関与も明らかとなっておらず、システインの分解を介した生理的機能の意義は分かっていない。以上のように、分解酵素は存在するものの、それによる細胞内システインの恒常性維持およびシステイン耐性に関する役割は、未だ明確なものとしていない。

③ システイン排出ポンプの生理機能の一つとして、細胞内に蓄積した過剰なシステインを細胞外に汲み出し、システインレベルを低下させる安全弁の役割が考えられる。発酵による細胞外シス

テインの蓄積を検証する検討において、いくつかの排出ポンプ (*LeuE*, *EamA*, *EamB*, *CydDC*, *Bcr*) がシステインの排出に寄与していることが報告されている (17-21)。しかしながら、「システインを排出するという機能を有すること」が、「細胞内のシステイン濃度調節に関与する生理機能を有すること」とは一概に言い難い。上記の排出ポンプは他の生理機能も有していることが知られており、それらの生理機能に付随してシステインが排出されている可能性が否定できない。例えば、*E. coli* において代表的なシステイン排出ポンプとして知られている *EamA* (17) と *EamB* (18) は、活性酸素種 (ROS) から細胞を防御するシステイン/シスチンシャトルシステムの構成要素としても知られている (22)。しかも、これらの排出ポンプは過酸化水素によって強く誘導されることから、ROS から細胞を守ることこそが主たる生理的な機能であると推察される (22)。*LeuE* はもともと L-ロイシンの排出ポンプとして同定され、様々なアミノ酸を排出することが報告されている。同時に、ロイシンおよび他のアミノ酸添加により誘導されることも報告されているが、システインにより誘導されるという知見は得られていない (23)。また、グルタチオンやシステインの排出を担う *CydDC* (19, 24) は、シトクロム<sub>c</sub>の会合に関与することが知られている (25)。さらに、*Bcr* をはじめとする多剤薬剤排出ポンプもシステインを排出することが知られているが、そもそもそれらは薬剤 (ピクシロマイシンなど) 排出ポンプとして同定されている (26)。以上のように、システインを排出することが知られている排出ポンプもまた、CD と同様に重要な他の生理機能を担っていると考えられており、これらの排出ポンプのシステインに対する基質特異性や、安全弁としての機能に関しては、未知な部分が多い。

④ *CysB* は硫黄源の取り込み、およびシステインの生合成経路を含む硫黄代謝に関連する多くの遺伝子の転写制御を司る、*LysR* ファミリーに属するマスターレギュレーターである (27-30)。細胞内に取り込んだ硫酸根 ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) やチオ硫酸根 ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) などの硫黄源を、システイン合成における硫黄源供給体である硫化物 ( $\text{S}^{2-}$ ) まで還元する遺伝子のほぼ全てを *CysB* レギュロンとして制御下に置いており、硫黄源の供給をコントロールしている (図 1-1)。この *CysB* は、システインにおける炭素骨格の最終中間体である *OAS* から自然反応で生じる *N*-アセチルセリン (*N*-acetylserine; *NAS*) (31) により活性化されることが知られている (32)。つまり、フィードバック阻害より制御されている炭素骨格に合わせて硫黄源を供給するシステムと考えられている。通常硫酸代謝は抑制された状態にあるが、必要に応じて活性化してシステインを合成するという、不必要にシステインを生成しないシステムとして機能しているものと考えられる。

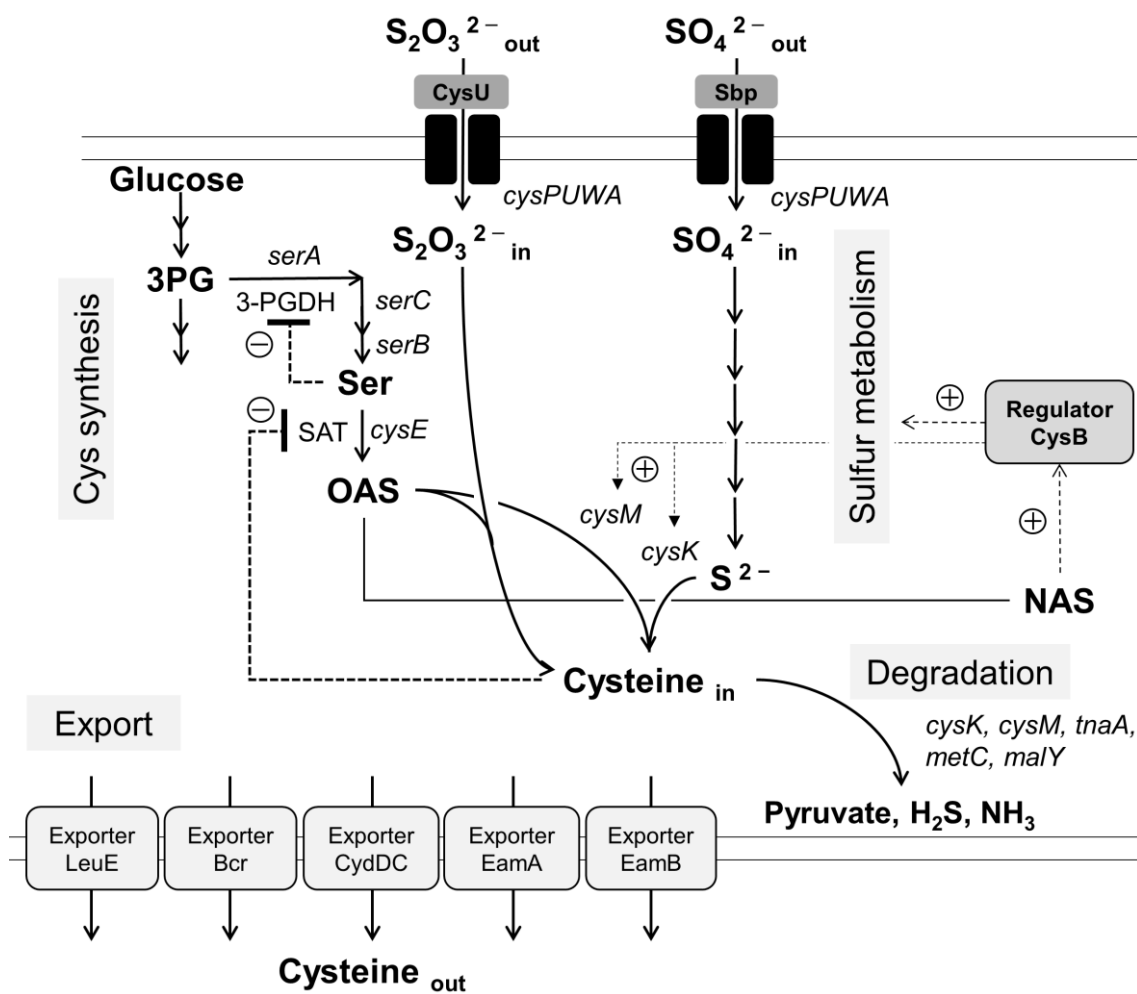


図 1-1. *E. coli* における細胞内システイン濃度の制御

*E. coli* のシステイン制御に関与する因子を簡略化し、記載した。点線は転写レベルや酵素的な制御を示す。NAS; *N*-アセチルセリン、OAS; *O*-アセチルセリン、3PG; 3-ホスホグリセリン酸、3-PGDH; 3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ、Ser; セリン、SAT; セリンアセチルトランスフェラーゼ。





**A**

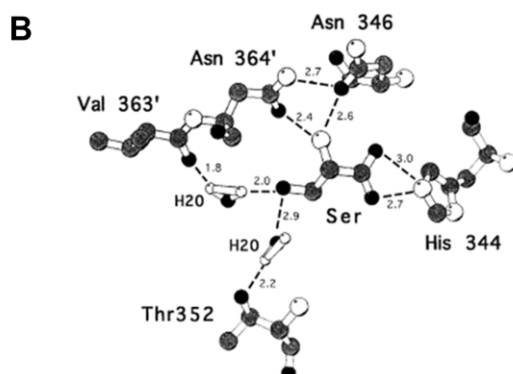
```

1 MAKVSLEKDK IKFLLVEGVH QKALESRAA GYTNIEFHKG ALDDEQLKES 50
51 IRDAHFIGLR SRTHLTEDVI NAAEKLVAIG CFCIGTNQVD LDAAAKRGIP 100
101 VFNAPFSNTR SVAELVIGEL LLLLRGVPEA NAKAHRGVWN KLAAGSFEAR 150
151 GKKLGIIGYG HIGTQLGILA ESLGMYVYFY DIENKLPLGN ATQVQHLSDL 200
201 LNMSDVVSLH VPENPSTKNM MGAKEISLMK PGSLLINASR GTVVDIPALC 250
251 DALASKHLAG AAIDVFPTEP ATNSDPFTSP LCEFDNVLLT PHIGGSTQEA 300
301 QENIGLEVAG KLIKYSNNGS TLSAVNFPEV SLPLHGGRRLL MHIHENRPGV 350
351 LTALNKIFAE QGVNIAAQYL Q TSAQMGYVV IDIEADEDVA EKALQAMKAI 400
401 PGTIRARL LY 410

```

SerA5 (409stop)
serA346 (N346A)

Feature Class	Location	Comment
Nucleotide phosphate binding region	161→162 238→240 292→295	NAD <sup>+</sup> binding region
Active-Site	240, 269, 292	The active-site residues Arg-240, Glu-269 and His-292
Conserved region	339→410	ACT domain



**C**

```

1 MAKVSLEKDK IKFLLVEGVH QSALENLRAA GYTNIEFHKG ALDAEALKAS 50
51 ARDAHFIGIR SRSQLTEEIF AAAEKLVAVG CFCIGTNQVD LNAAAKRGIP 100
101 VFNAPFSNTR SVAELVIGEM LMLLRGVPEA NAKAHRGIWN KIAKGSFEAR 150
151 GKKLGIIGYG HIGMQLGVLA ESLGMHVVYFY DIENKLPLGN ASQVRSLTQL 200
201 LNMSDVVSLH VPETASTQNM ISANELAQMK PGLLINASR GTVVDIPALC 250
251 EALASKQVGG AAIDVFPVEP ATNSDPFVSP LSEFDNVILT PHIGGSTEEA 300
301 QENIGIEVAG KLAKYSNNGS TLSAVNFPEV SLPMHGISAS RLLHIHENR 350
351 GVLTAIQIF AEQGINIAAQ YLQTSPPMGY VVIDIDAEHE LAEKALQLMK 400
401 AIPGTIRARL LY 412

```

serA348 (N348A)

図 1-3. *E. coli* 由来の 3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ (3-PGDH)

(A) *E. coli* が保有する 3-PGDH のアミノ酸配列およびドメイン情報。赤枠線にてフィードバック阻害耐性型 3-PGDH として知られる SerA346、SerA5 の変異部位を示す。(B) *E. coli* 由来 3-PGDH におけるセリン結合部位 (Al-Rabiee *et al. J Biol Chem* 271(38):23235-8 (1996) より引用)。(C) *P. ananati* 由来 3-PGDH のアミノ酸配列。赤枠内は *E. coli* 由来 3-PGDH の有効変異 SerA346 に該当する変異部位 SerA348 を示す。

### 1-1-3. システインの発酵生産

システインの代謝・制御メカニズムは *E. coli* における研究が最も進んでおり、システインの発酵生産も *E. coli* を宿主として用い、検証された例が最も多く存在する。例えば、分解酵素 (*tnaA*) 欠損と、フィードバック阻害耐性型 SAT をコードする変異型 *cysE* および、システイン排出機能を有する *bcr* を過剰発現させた株では約 500 mg/L の蓄積を有することが報告されている (20)。さらに、代表的な排出ポンプである *EamA*、変異型 SAT、3-PGDH を過剰発現させた株を用い、硫黄源としてチオ硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、硫酸アンモニウムを使用して発酵が行われた例では、それぞれ約 1.4 g/L、2.3 g/L、2.1 g/L の蓄積値が得られている (33)。このように、*E. coli* はシステイン発酵生産の宿主として研究が最も進んでいること、また遺伝子改変ツールが充実していること、物質生産のホストとしての実績が十分存在することより、工業生産化に向けた宿主として、最も適当であると考えられていた。

一方、*Pantoea ananatis* は腸内細菌科に属するグラム陰性のバクテリアであり (34)、これまでいくつかの種が植物病原体として研究されてきている (Review (35) 参照)。近年、遺伝子改変ツールの整備が進んだこともあり (34, 36, 37)、非病原体 *P. ananatis* およびその関連種の発酵生産への応用が活性化している。L-グルタミン酸 (38)、L-アスパラギン酸 (39)、L-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン (40) といったアミノ酸およびその関連物質や、ピロロキノリンキノン (37)、アスコルビン酸中間体 (41)、ビタミン E (42) などのビタミン類、および 2,3-ブタンジオール (43) のような化合物など、幅広い物質の生産に活用されつつあることが報告されている。さらに、*P. ananatis* は *E. coli* と比較して環境ストレス、特に酸性条件下に対する耐性が高いことが知られている (34, 44)。酸性条件下における発酵のメリットとしては、培養 pH の維持に必要なとされるアルカリの量を減らすことによるコスト削減や、好気発酵条件下における自発的な酸化反応が回避可能となることなどが挙げられる。システイン関連の研究実績という点においては *E. coli* と比較して劣るものの、*P. ananatis* が *E. coli* よりもシステイン発酵への応用という点で優れている可能性も否定できない。

## 1-2. 本研究の目的と意義

システインは医薬品、食品、化粧品、工業用など幅広い用途で用いられているが、特に医薬、食品、化粧品用途では摂取したり、皮膚に塗布したりするなど、人体に直接作用することから、人毛や羽毛からの抽出法由来のシステインに対して抵抗が大きく、ノンアニマル由来のシステインが強く求められている。ノンアニマル製品の製造方法として発酵法は代表的なものであり、実際、多くの医薬、食品、化粧品用アミノ酸は発酵法により製造された製品が市場に出回っている。しかしながら、システイン発酵は微生物を用いた発酵生産が極めて難しいアミノ酸であり、効率的な発酵生産方法の開発に十分な余地がある。

その理由として、1-1 でも述べたようにシステインは比較的低濃度でバクテリアの生育を阻害するなど、細胞への毒性作用を有していることが挙げられる。バクテリアはその細胞毒性を回避するため、細胞内のシステイン濃度を厳密に制御する複数のシステムを備えていることが、主に *E. coli* を中心とするシステイン代謝・制御メカニズムに関する過去の研究の中で報告されている。発酵による大量生産(高濃度化)を実現するには、その代謝・制御システムをより明確化し、生産に応用することが求められる。そこで本研究では、システイン耐性に関与する因子の同定と解析を通じ、システイン制御メカニズムのさらなる解明と、産業化への応用可能性を検討した。

これまでのシステイン代謝・制御メカニズムに関する研究は、主に *E. coli* を用いて行われていた。近年、*E. coli* と同じ腸内細菌科に属する *P. ananatis* を発酵生産宿主とした物質生産の産業応用化が数多く報告されており、システインの発酵生産に関しても *P. ananatis* の活用が可能ではないかと考えた。そこで本研究では、*E. coli*、*P. ananatis* の両微生物を材料として選定し、両バクテリアのシステイン耐性に関与する因子の同定を行った。2つの種を用いた検討を行うことにより、それぞれが保有するシステインの制御機構を比較でき、より深い理解、議論が可能となった。

本研究で得られる成果は、システインの発酵生産という産業への応用が期待できると同時に、各種微生物が持つシステイン制御メカニズムの詳細や、種間での保存性や多様性に関する知見を得る上で、学術的にも有意義なものである。

### 1-3. 本論文の構成

本論文は、5章から構成される。

第2章「*Pantoea ananatis*におけるシステイン耐性関連遺伝子の同定およびシステイン発酵への応用」では、システイン耐性を指標に、*P. ananatis*のゲノムライブラリーから新規システインデスルフィドラーゼ(CD)をコードする *ccdA* および新規排出ポンプをコードする *cefA*, *cefB* を選抜、同定した。*ccdA*, *cefA* の両遺伝子は、それぞれ *ccdR*, *cefR* という転写調節因子を介し、システインにより迅速かつ強力に誘導されることを明らかにした。特に *ccdA* は、*E. coli* にて見出された既知のCDとは異なり、*P. ananatis* においてはほぼ単独で作用し、システインに直接応答するCDであった。*ccdA* を欠損した株ではCD活性がほぼ消失することから、*P. ananatis* をシステインの発酵生産宿主に用いる大きなメリットであると考えられた。また、CDである *ccdA* は欠損することにより、排出ポンプである *cefA*, *cefB* は遺伝子増幅により、システインの発酵生産にポジティブな影響を及ぼすことが示された。

第3章「*Escherichia coli*におけるシステイン耐性関連遺伝子の同定およびシステイン発酵への応用」では、第2章と同様のスクリーニングを *E. coli* のゲノムライブラリーを用いて行った。その結果、既知の排出ポンプ *eamA* とともに、システインデスルフィダーゼ(cysteine desulfidase)をコードする遺伝子と相同性を持つ *yhaM* が選抜、同定された。*yhaM* は、転写調節因子である *yhaO* を介してシステインに対して非常に速やかに転写が誘導される、システイン誘導型のシステイン分解酵素であり、欠損によりシステイン生産量が増加することを明らかにした。なお、システインデスルフィダーゼに関しては後述する。

第4章「*Pantoea ananatis* を用いたシステインの発酵生産」では、第2章で同定された *ccdA*, *cefA* および *cefB* のシステイン生産への応用を検討した。前半部では *P. ananatis* を宿主とし、フィードバック阻害耐性型の鍵酵素や、システイン排出因子、硫酸根・チオ硫酸根の取り込み因子を強化したシステイン生産基本株を用い、生合成経路上における律速点を探索した。探索の結果、システイン生合成の最終ステップである *O*-アセチルセリンと硫化物からシステインへの反応を触媒する酵素、*O*-アセチルセリンスルフヒドラーゼ **B** をコードする *cysM* が律速点である事が明らかとなった。しかし、*cysM* の発現強度を一定レベル以上強化するに従い、生産量が低下していく現象が見出された。本現象は、細胞内システイン濃度の上昇に伴って *ccdA* が誘導されることによるシステイン分解が原因であることを明らかとした。後半部では、細胞内システインの分解を回避し、システイン生産性の向上を目指した。*ccdA* 欠損による分解の回避、もしくは *cefA*, *cefB* の過剰発現による菌体内システインの排出強化により、システイン生産量が大きく増加し、最大 2.2 g/L のシステイン蓄積を確認した。これにより、これまでに報告されている *E. coli* を宿主としたシステイン生産菌とほぼ同等の力価を持つ生産菌を、*P. ananatis* にて構築することに成功した。

第5章「総括」では、本博士論文の総括を行い、得られた知見の学術研究および産業上の利用可能性について今後の方向性を議論した。

## 第2章 *Pantoea ananatis* におけるシステイン耐性に関与する因子の同定・解析、並びにシステイン発酵への応用

### 2-1. 緒論

システインは多くのタンパク質の構成要素として、また低分子に対する硫黄分子の供与体として重要な役割を担っている。ただし、システインは比較的low濃度で生育を阻害するなど、バクテリアに対する毒性作用があるため、その細胞内濃度は厳密に制御されている。バクテリアでは、システイン合成経路における鍵酵素であるセリンアセチルトランスフェラーゼ(SAT)や3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ(3-PGDH)のフィードバック阻害、およびマスターレギュレーターであるCysBによる転写レベルでの制御などのシステムにより、細胞内システイン濃度はコントロールされていることが知られている。しかしながら、他の因子(例えば分解酵素や排出ポンプなど)が、どのように細胞内システインの恒常性維持に関与しているかは明確にされていない。

本章の研究では、腸内細菌科に属する*P. ananatis*のゲノムDNAライブラリーを*E. coli* MG1655株に導入し、システイン耐性を指標にスクリーニングを行うことでシステイン耐性に関与する因子の同定を目指した。その結果、3つの遺伝子の同定に成功した。

1つ目の遺伝子は*ccdA* (cysteine-inducible cysteine desulfhydrase A, locus tag: PAJ\_0331)と筆者らによって命名された、システイン誘導型のシステインデスルフィドラーゼ(CD)をコードする遺伝子であり、システインの分解に作用する。この*ccdA*の発現は、すぐ上流に位置する転写調節因子*ccdR* (locus tag: PAJ\_0332 もしくは *ybaO*)により調節されている。2つ目の遺伝子は*cefA* (cysteine efflux pump A, locus tag: PAJ\_3026)と筆者らによって命名された、システイン誘導型のシステイン排出ポンプをコードする遺伝子である。本排出ポンプも、そのすぐ上流に位置する転写調節因子*cefR* (locus tag: PAJ\_3027)により制御されている。これら2つの因子は、細胞内の過剰なシステインに直接応答し、細胞内の恒常性を速やかに保つ役割を保持していると推察される。つまり、この*ccdA*と*cefA*は細胞内外のシステイン濃度の変動に即座に対応する安全弁の機能を果たしていると考えられる。3つ目の遺伝子は、*cefB* (cysteine efflux pump B, locus tag: PAJ\_p0018)と筆者らによって命名された排出ポンプをコードする遺伝子であり、*cefA*とは異なりシステインにより直接誘導されないものの、システインを細胞外に積極的に排出することでシステイン耐性を獲得していると考えられた。

これらの因子は細胞内システイン濃度の調節に強く関与するものであり、システイン発酵生産における育種のターゲットとなり得る。本章では各遺伝子の機能解析と併せ、発酵生産への活用可能性も検討した。そして本検討結果は、*P. ananatis*によるシステインの発酵生産性向上に寄与し、産業化に向けた重要な知見になり得るものと考えられた。

## 2-2. 実験方法

### 2-2-1. 使用菌株およびプラスミド

本検討に用いた菌株およびプラスミドを、それぞれ表 2-1、表 2-2 に示した。また、特定の遺伝子欠損株を作製する際に用いたプライマーを表 2-3 に、プラスミド構築に使用したプライマーを表 2-4 に記載した。

*P. ananatis* における遺伝子の欠損、置換はすべて Katashkina らによって開発された  $\lambda$  RED 法 (36) によって行い、薬剤耐性遺伝子の除去は既報 (36) に記載されている  $\lambda$  Int/Xis 法により行った。一例として *ccdA* 欠損株の構築方法および概略図 (図 2-1) を以下に記載する。欠損する遺伝子に挿入する DNA カセットは PCR により取得した。まず始めに、プラスミド pMW- $\lambda attL$ -Km<sup>R</sup>- $\lambda attR$  を鋳型とし、遺伝子導入領域の相同配列約 50 塩基を 5' 端に保持する Dd0191-Fw および Dd0191-Rv をプライマーとした。PCR にて、挿入遺伝子領域の相同配列にカナマイシンマーカークが挟まれた構造の DNA フラグメントを得た。本フラグメントをエレクトロポレーションによりプラスミド pRSFRedTER を保持する SC17(0) 株に導入し、相同組換えにより遺伝子を挿入した。pRSFRedTER には Exo, Beta, Gam をコードする Lambda *red* オペロンが搭載されており、 $\lambda$  RED による遺伝子組換えを誘導することが可能となる。得られた形質転換体群から、薬剤を含む寒天培地にて組み換え体 (ドナー株) を選択した。このドナー株より PureElute bacterial genome kit (EdgeBio) を用いて染色体 DNA を抽出し、こうして得られた  $\Delta ccdA::kan$  フラグメントを含む染色体 DNA を対象株へエレクトロポレーションにて導入、相同組換えによる挿入を行った。 $\Delta ccdA::kan$  フラグメントが挿入された対象株 (通常 10 から 50 クローン程度得られる) を、カナマイシン含有の寒天プレート上で選択した。なお、*attL/R* を介した薬剤耐性遺伝子の除去には、Int/Xis リコンビナーゼをコードしたプラスミド pMW-intxis-cat を用い、phage  $\lambda$  site-specific Int/Xis system (36) により行った。

*E. coli* の遺伝子欠損には、Datsenko および Wanner によって開発された  $\lambda$  RED システム (45) を採用した。アラビノースにより誘導される  $\lambda$  RED 遺伝子を持った pKD46 プラスミドを用いて  $\lambda$  Red 相同組換えを誘発する一方、プラスミド pMW- $\lambda attL$ -Km<sup>R</sup>- $\lambda attR$  を鋳型に、PCR により作製したカナマイシン耐性遺伝子を含む遺伝子断片を導入した。これらの断片を作製するために用いられたプライマーは表 2-3 に記載した。*attL/R* を介した薬剤耐性遺伝子の除去は *P. ananatis* と同様に phage  $\lambda$  site-specific Int/Xis system にて行った。

本研究では、恒常発現プロモーター P<sub>nlp0</sub> を使用しているが、これは *E. coli* の *nlpD* 遺伝子 (locus tag; b2742) の上流約 300 塩基の配列に相当する。これらのフラグメントは、表 2-4 に記したプライマーを用いて MG1655 株のゲノムより増幅し、クローニングした。

*E. coli* 由来のフィードバック阻害耐性型 SAT をコードする *cysEX* を搭載する pACYC-E1 は、以下の方法にて取得した。*ompA* プロモーター制御下にある *eamA* および *cysEX* を搭載したプラスミド pACYC-DE1 を、Mnu I を用いて酵素消化し、セルフライゲーションさせることで、*eamA* 遺伝子内の約 330 塩基分を欠損した。

SC17 $\Delta$ lacZ-P<sub>ccdA</sub>-lacZ 株構築法を以下に示す。クロスオーバー PCR により *ccdA* の ORF の上流

と下流の相同配列を含む *lacZ-Km<sup>R</sup>* の融合断片を作成した。まず始めに、*P. ananatis* の *lacZ* フラグメントを、記載のプライマー (d0191::*lacZ-FW1*/d0191::*lacZ-RV1*) を用いて SC17 ゲノムを鋳型に PCR にて増幅した。続いて、カナマイシン耐性遺伝子を含むフラグメントを、pMW-*λattL-Km<sup>R</sup>-λattR* を鋳型に、記載のプライマー (d0191::*lacZ-FW2*/d0191::*lacZ-RV2*) を用いて PCR にて増幅し、作製した。最後に、両フラグメントを混合した溶液を鋳型に、2 種のプライマー (d0191::*lacZ-FW1*/d0191::*lacZ-RV2*) を用いたクロスオーバーPCR により、目的の遺伝子断片を作製した。得られた遺伝子断片はエレクトロポレーションにて SC17Δ*lacZ* 株に導入し、SC17Δ*lacZ-P<sub>ccdA</sub>-lacZ* 株を構築した。



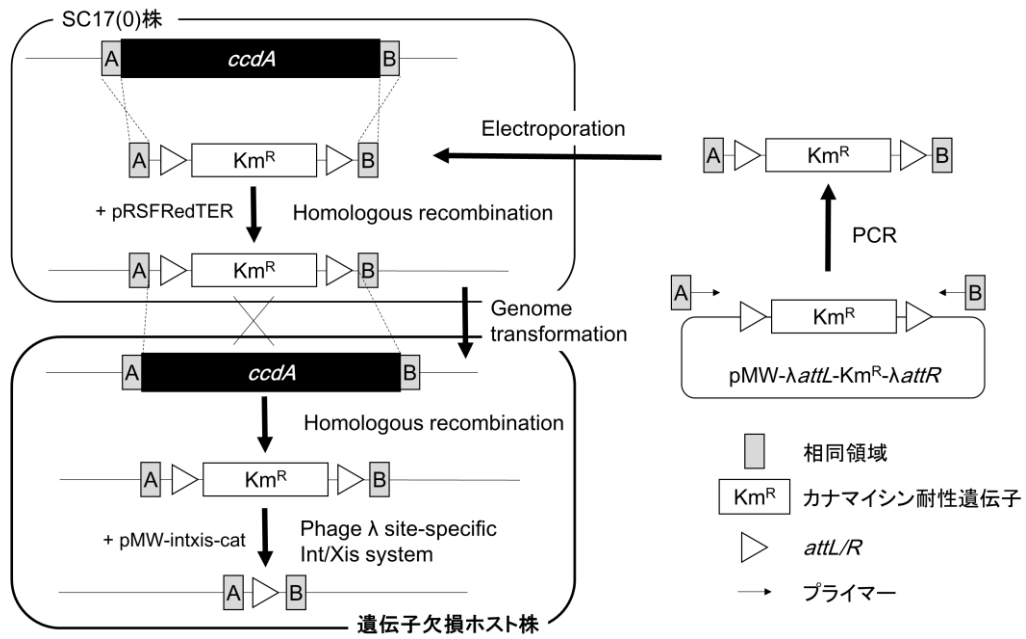


図 2-1. 遺伝子欠損株構築方法

*ccdA* 遺伝子欠損を例とし、本研究にて用いた遺伝子欠損株構築方法を示す。

表 2-1. 使用菌株<sup>a</sup>

菌株	説明	参照
MG1655	野生型 <i>Escherichia coli</i> MG1655 (ATCC 47076)	ATCC
W3110	野生型 <i>E. coli</i> W3110 (ATCC 27325)	ATCC
W3110 $\Delta$ metC	W3110 $\Delta$ metC	本章
SC17	野生型 <i>Pantoea ananatis</i> AJ13355 (34) 由来低粘性性株	NITE
SC17 $\Delta$ ccdA	SC17 $\Delta$ ccdA::Km <sup>R</sup>	本章
SC17 $\Delta$ ccdR	SC17 $\Delta$ ccdR::Km <sup>R</sup>	本章
SC17 $\Delta$ lacZ	SC17 $\Delta$ lacZ::Tet <sup>R</sup>	本章
SC17 $\Delta$ lacZ-P <sub>ccdA</sub> -lacZ	SC17 $\Delta$ lacZ::Tet <sup>R</sup> -P <sub>ccdA</sub> ::lacZ-Km <sup>R</sup>	本章
SC17 $\Delta$ cefA	SC17 $\Delta$ cefA::Km <sup>R</sup>	本章
SC17 $\Delta$ cefR	SC17 $\Delta$ cefR::Km <sup>R</sup>	本章
SC17 $\Delta$ ccdA $\Delta$ cefA	SC17 $\Delta$ ccdA $\Delta$ cefA::Km <sup>R</sup>	本章
CYS 1-1	pMIV-cysE5、pACYC177 を保持する SC17 株	本章
CYS 1-2	pMIV-cysE5、pACYC-ccdA を保持する SC17 株	本章
CYS 1-3	pMIV-cysE5 を保持する SC17 株	本章
CYS 1-4	pMIV-cysE5 を保持する SC17 $\Delta$ ccdA 株	本章
CYS 2-1	pMIV-CysE5、pACYC-eamA を保持する SC17 株	本章
CYS 2-2	pMIV-CysE5、pACYC-PA36ccR を保持する SC17 株	本章
CYS 2-3	pMIV-CysE5、pACYC-cefA を保持する SC17 株	本章
CYS 2-4	pMIV-CysE5、pACYC-PA36ccd を保持する SC17 株	本章
CYS 3-1	pACYC-E1、pMIV-5JS を保持する SC17 株	本章
CYS 3-2	pACYC-E1、pMIV-cefB を保持する SC17 株	本章
SC17(0)	SC17 株由来 $\lambda$ Red システム作動株	(36)

<sup>a</sup>Km<sup>R</sup>、Tet<sup>R</sup>、それぞれカナマイシン、テトラサイクリンへの耐性遺伝子; ATCC、American type culture collection; NITE、製品評価技術基盤機構。

表 2-2. 使用プラスミド <sup>a</sup>

プラスミド	説明	参照
pSTV29	クローニングベクター、p15a <i>ori</i> ; Cm <sup>R</sup>	Takara Bio
pCcdA	pSTV29, <i>ccdA</i> を含む 1.5 kb の DNA フラグメント <sup>b</sup>	本章
pCcdR	pSTV29, <i>ccdR</i> を含む 1.0 kb の DNA フラグメント <sup>b</sup>	本章
pCefA	pSTV29, <i>cefA</i> を含む 1.1 kb の DNA フラグメント <sup>b</sup>	本章
pCefR	pSTV29, <i>cefR</i> を含む 2.0 kb の DNA フラグメント <sup>b</sup>	本章
pPA36ccd	pSTV29, <i>cefA-cefR</i> を含む 2.7 kb の DNA フラグメント <sup>b</sup>	本章
pLeuE	pSTV29, <i>leuE</i> を含む 1.1 kb の DNA フラグメント <sup>b</sup>	本章
pEamA	pSTV29, <i>eamA</i> を含む 1.4 kb の DNA フラグメント <sup>b</sup>	本章
pMIV-5JS	クローニングベクター、SC101 <i>ori</i> ; Cm <sup>R</sup>	(46)
pMIV- <i>P<sub>nlp0</sub></i>	pMIV-5JS に <i>T<sub>rrnB</sub></i> ( <i>rrnB</i> ターミネーター) とともにクローニングした <i>E. coli</i> 由来 <i>P<sub>nlpD</sub></i> プロモーターを搭載	本章
pMIV- <i>cefB</i>	pMIV- <i>P<sub>nlp0</sub></i> にクローニングした <i>cefB</i> を搭載	本章
pMIV-CysE5	<i>omp</i> プロモーター制御下に <i>cysE5</i> ( <i>E. coli</i> ) を配置	(47)
pACYC177	クローニングベクター、p15a <i>ori</i> ; Km <sup>R</sup>	Nippon gene
pACYC- <i>eamA</i>	pACYC177, <i>eamA</i> ( <i>E. coli</i> ) を含む 1.4 kb の DNA フラグメント <sup>b</sup>	本章
pACYC- <i>cefA</i>	pACYC177, <i>cefA</i> を含む 1.1 kb の DNA フラグメント <sup>b</sup>	本章
pACYC-PA36ccd	pACYC177, <i>cefA-cefR</i> を含む 2.7 kb の DNA フラグメント <sup>b</sup>	本章
pACYC-PA36ccR	pACYC177, <i>cefR</i> を含む 2.0 kb の DNA フラグメント <sup>b</sup>	本章
pACYC-DE1	pACYC187, <i>ompA</i> プロモーター制御下に <i>E. coli</i> 由来 <i>eamA</i> 、 <i>cysEX</i>	(48)
pACYC-E1	pACYC187, <i>ompA</i> プロモーター制御下に <i>E. coli</i> 由来 <i>cysEX</i> ; Km <sup>R</sup>	本章
pHSG299	クローニングベクター、pMB1 <i>ori</i> ; Km <sup>R</sup>	Takara Bio
pHSG- <i>ccdA</i>	pHSG299, <i>ccdA</i> を含む 1.5 kb の DNA フラグメント <sup>b</sup> ; Cm <sup>R</sup>	本章
pMW- <i>λattL</i> -Km <sup>R</sup> - <i>λattR</i>	<i>λattL</i> -Km <sup>R</sup> - <i>λattR</i> カセット供与プラスミド; Ap <sup>R</sup> 、Km <sup>R</sup>	(36)
pMW- <i>intxis</i> -cat	pSC101-ts; <i>λ xis-int</i> による切り出し作動用プラスミド; Cm <sup>R</sup>	(36)
pRSFRedTER	P-element 制御下の <i>λ gam</i> 、 <i>bet</i> 、 <i>exo</i> 遺伝子、 <i>sacB</i> 遺伝子; Cm <sup>R</sup>	(36)

<sup>a</sup>Km<sup>R</sup>、Tet<sup>R</sup>、それぞれカナマイシン、テトラサイクリンへの耐性遺伝子; ATCC、American type culture collection; NITE、製品評価技術基盤機構; CDS、コーディング領域。

<sup>b</sup>CDS の上流約 300 bp、下流約 200 bp を含むフラグメント。

表 2-3. 遺伝子欠損に用いたオリゴ核酸配列一覧

遺伝子名	プライマー名	配列
<i>ccdA</i>	Dd0191-FW	5'CCGTGTCTGAAGCCTATTTTGCCCGCCTGCTGGGCTTGCCTTTTATTGC CTGAAGCCTGCTTTTTTATACTAAGTTGGCA-3'
	Dd0191-RV	5'CCGTGTCTGAAGCCTATTTTGCCCGCCTGCTGGGCTTGCCTTTTATTGC CTGAAGCCTGCTTTTTTATACTAAGTTGGCA-3'
<i>ccdR</i>	Dc0263-attR2	5'ACGGCATTATTCGCGGACGGGTCGCTCTGCTGGATAATGAAAAGCTT GGCCGCTCAAGTTAGTATAAAAAAGCTGAACGA-3'
	Dc0263-RV	5'TCAGGGGCCAACAGGCAGGGCTGTCGTGTATTTAATCTCTCCATCGC GATGAAGCCTGCTTTTTTATACTAAGTTGGCA-3'
<i>cefA</i>	Dd0663-FW	5'ATGGTGTTTGGCATTTTGATTGGCTGTGCGCTACAAACCGCCATTGCG GGCGCTCAAGTTAGTATAAAAAAGCTGAACGA-3'
	Dd0663-RV	5'GAAATCCAGAACGAAACGTCGCCCTTGACGACCGCGTCAGGCCACC GGATGAAGCCTGCTTTTTTATACTAAGTTGGCA-3'
<i>cefR</i>	Dc09478-FW2	5'GCGTTGCTCAGTCACATCAAGTCAGCGTGAACACCGTGTGAATGCC TGGTGAAGCCTGCTTTTTTATACTAAGTTGGCA-3'
	Dc09478-RV	5'GATTTACCGCCGTGCGGACCTACTACGAACGCCTCACTGAACGGCA TGGCGCTCAAGTTAGTATAAAAAAGCTGAACGA-3'
<i>lacZ</i>	DlacZ(Pa)-F	5'GTAATGTCATCTCAATGTGAGCGGATAACAATTTTACACAGGAGACT GCCTGAAGCCTGCTTTTTTATACTAAGTTGGCA-3'
	DlacZ(Pa)-R	5'TATTGGACGTCCTTACGCGAGAGTCAGGCAGGCGGAGCCTGCCCCG TCACGCTCAAGTTAGTATAAAAAAGCTGAACGA-3'
<i>metC (E.coli)</i>	D-W3110metC-FW	5'ATGGCGGACAAAAGCTTGATACTCAACTGGTGAATGCAGGACGCAG CAATGAAGCCTGCTTTTTTATACTAAGTTGGCA-3'
	D-W3110metC-RV	5'TTATACAATTCGCGCAAAACCGGCGTCCAGATCGGCAATCAGATCGT CGACGCTCAAGTTAGTATAAAAAAGCTGAACGA-3'
<i>ccdA::lacZ-Km<sup>R</sup></i>	d0191::lacZ-FW1	5'CCTACACGTGCCTTAAAATAATGACTTTCATCCGACCGGAAATGAAC GCCATGACCCTGGACAGAGATTC-3'
	d0191::lacZ-RV1	5'-TTATTTTTGTTGCCCCCAGATAAAC-3'
	d0191::lacZ-FW2	5'TCAGTGCAGGACGTTACAGCTACCAGTTTATCTGGGGCAACAAAA TAATGAAGCCTGCTTTTTTATACTAAGTTGGCA-3'
	d0191::lacZ-RV2	5'TGGCCCCGATCTGGCGCTTCTTAACCCCGTTAGTCAAGGTCTGATAGCG CACGCTCAAGTTAGTATAAAAAAGCTGAACGA-3'

表 2-4. プラスミド構築に用いたベクター及びオリゴ核酸配列一覧

プラスミド	ベクター	遺伝子源	配列
pCcdA	pSTV29	<i>P. ananatis</i>	5'-CGCGGATCCAAGCTTTTCATTATCCAGCAGAGCG-3' 5'-CGCGGATCCTAATGCTGTAGGGCCTGAACCAG-3'
pCcdR	pSTV29	<i>P. ananatis</i>	5'-CGCGGATCCGGTGTATCTTGTGTTGATCCAACCG-3' 5'-CGCGGATCCGGGCATCCATGTTTTGGTG-3'
pCefA	pSTV29	<i>P. ananatis</i>	5'-CGCGGATCCAGGCATTCAGCACGGTGTTC-3' 5'-CGCGGATCCAGCCGTATCCTGCAGCTC-3'
pCefR	pSTV29	<i>P. ananatis</i>	5'-CGCGGATCCAATGGCGGTTTGTAGCG-3' 5'-CGCGGATCCTGTAAAGGCTGGTCCCAC-3'
pLeuE	pSTV29	<i>E. coli</i>	5'-CGCGGATCCAGTGGTCATTTAGTGC-3' 5'-CGCGGATCCTGTGGGATTTGAAGCATCC-3'
pEamA	pSTV29	<i>E. coli</i>	5'-CGCGGATCCAATGGTCATAAATGGCAGCGTAGCGC-3' 5'-CGCGGATCCGCAGGGCGTTGCGGAACAAAC-3'
pACYC-eamA	pACYC177	<i>E. coli</i>	5'-CGCGGATCCAATGGTCATAAATGGCAGCGTAGCGC-3' 5'-CGCGGATCCGCAGGGCGTTGCGGAACAAAC-3'
pACYC-cefA	pACYC177	<i>P. ananatis</i>	5'-CGCGGATCCAGGCATTCAGCACGGTGTTC-3' 5'-CGCGGATCCAGCCGTATCCTGCAGCTC-3'
pACYC-PA36ccd	pACYC177	<i>P. ananatis</i>	5'-CGCGGATCCAGCCGTATCCTGCAGCTC-3' 5'-CGCGGATCCTGTAAAGGCTGGTCCCAC-3'
pACYC-PA36ccR	pACYC177	<i>P. ananatis</i>	5'-CGCGGATCCAATGGCGGTTTGTAGCG-3' 5'-CGCGGATCCTGTAAAGGCTGGTCCCAC-3'
pMIV-P <sub>nlp0</sub>	pMIV-5JS	<i>E. coli</i>	5'-AGCTGAGTCGACCCCCAGGAAAAATTGGTTAATAAC-3' 5'-AGCTGAGCATGCTTCCAAGTGCCTAATGACGC-3'
pMIV-P <sub>nlp0</sub> -cefB	pMIV-P <sub>nlp0</sub>	<i>P. ananatis</i>	5'-CCGTCGACATGAACGCATTACTCTATC-3' 5'-AATCTAGATTATAGCGTGCCCCGGCATG GG-3'
pHSG-ccdA	pHSG299	<i>P. ananatis</i>	5'-CGCGGATCCAAGCTTTTCATTATCCAGCAGAGCG-3' 5'-CGCGGATCCTAATGCTGTAGGGCCTGAACCAG-3'

## 2-2-2. 生育条件

すべての菌株は Luria-Bertani (LB) 培地 (49)、M9 最少培地 (49)、もしくは 1L あたり 15 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1.5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1 mg チアミン塩酸塩、1.7 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.15 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.7 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1.6 mg  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.3 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.25 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.6 g BD Bacto™ トリプトン (BD)、0.3 g BD Bacto™ 酵母エキス (BD)、0.6 g NaCl、20 g  $\text{CaCO}_3$ 、135 mg L-ヒスチジン $\cdot\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ 、4 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、2 mg ピリドキシン塩酸塩、60 g グルコースを混合して作製した発酵生産培地を用い、37°C (*E. coli*)、34°C (*P. ananatis*) にて培養した。なお、初発グルコース濃度を  $40 \text{ g l}^{-1}$  と設定した場合は、都度本文中に記載した。

培養する菌株に応じて、アンピシリンは  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ 、カナマイシンは  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ 、テトラサイクリンは  $12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ 、クロラムフェニコールは  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  の濃度で適宜添加した。

## 2-2-3. システイン耐性遺伝子のスクリーニングおよび寒天プレート上での生育試験

*P. ananatis* 野生株 SC17 のゲノム DNA を Sau3AI を用いて酵素消化し、アガロースゲル電気泳動にて分離後、約 10 kb の断片を回収した。回収した断片を pSTV29 の BamHI サイトに挿入し、ゲノムライブラリーを作製した。*P. ananatis* ゲノムライブラリーを *E. coli* MG1655 株にエレクトロポレーションにて導入し、2–4 mM のシステインを含有する M9 最少寒天培地にて 2 日間、37°C でインキュベーションした。こうして得られたシステイン耐性クローンを単離し、保持しているプラスミドから塩基配列を解読することで挿入されているゲノム領域を特定した。独立に取得された複数ゲノムの重複領域情報などからシステイン耐性に関与する候補遺伝子の絞り込みを行い、遺伝子を同定した。

## 2-2-4. 最少培地における生育を指標としたシステイン耐性試験

最少培地 (液体培地) における生育を指標とするシステイン耐性試験は以下の方法で行った。M9 最少培地にて一晩、試験管を振とう培養して得られた培養液を、1:100 倍となるよう  $50 \mu\text{M}$  のシステインを含んだ新たな M9 最少培地 3 ml に植菌し、一晩試験管にて振とう培養した。得られた培養液を、波長 600 nm における光学密度 ( $\text{OD}_{600}$ ) が 0.006 となるように菌体量を揃え、無添加もしくは  $200 \mu\text{M}$  のシステインを添加した 4 ml の M9 最少培地に植菌し TN-1506 incubator (アドバンテック東洋) を用いて、生育 ( $\text{OD}_{660}$ ) を自動的に計測した。

最少培地 (寒天培地) における生育を指標とするシステイン耐性試験は以下の方法で行った。M9 最少培地にて一晩、試験管を振とう培養して得られた培養液を、1:200–200000 に希釈後、0、0.5、4 mM のシステインを含有する M9 最少寒天培地上にスポットした。これらのプレートを 24 時間、37°C で培養し、生育を観察した。

## 2-2-5. CD 活性染色

各菌株を LB 培地に植菌し、一晩振とう培養した。得られた培養液を 1:100 倍希釈にて新たな LB 培地に植菌し、3–5 時間の振とう培養により対数増殖期に到達するまで生育させた。システイン

を添加する場合には 30 mM(最終濃度)を添加し、*E. coli* の場合は 37°C にて、*P. ananatis* の場合は 34°C にて培養を行った。その後、遠心分離により菌体を回収し、得られた菌体を洗浄バッファー(10 mM Tris-HCl(pH8.6)、100  $\mu$ M DTT、10  $\mu$ M ピリドキサルリン酸)にて 3 度洗浄したのち、洗浄バッファーで懸濁した。得られた懸濁液を超音波処理により菌体を破碎後、遠心分離をして粗酵素液を得た。Native PAGE および CD 活性解析は既報 (50) に従い行った。細胞抽出液中のタンパク質定量にはプロテインアッセイ CBB (Coomassie Brilliant Blue) 溶液(5 倍濃縮)(ナカライテスク)を用い、各レーンに 2  $\mu$ g のタンパク質を含有する細胞抽出液をアプライした。

#### 2-2-6. CD 活性測定

各菌株を 34°C で一晩振とう培養した前培養液を 1:100 倍希釈となるように本培養の LB 培地に植え継ぎ(フラスコ)、34°C での振とう培養により、波長 660 nm における光学密度(以下 OD<sub>660</sub>)が 0.3-0.5 に到達するまで培養を行った。システインを添加する条件の場合には培養中 25 mM システイン(最終濃度)を添加した。遠心分離によって菌体を回収、氷上にて 0.85% NaCl で 2 回洗浄後、50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> bovine serum albumin、10  $\mu$ M ピリドキサルリン酸を含む 0.1M リン酸カリウム緩衝液(pH 8.0)に懸濁した。菌体懸濁液を超音波にかけて菌体を破碎、遠心分離によって残渣を除去した上清を粗酵素液とした。粗酵素液を用いた CD 酵素活性の測定は文献 (15) の方法に従った。

#### 2-2-7. $\beta$ -Galactosidase *lacZ* レポーターアッセイ

一晩 M9 培地にて振とう培養した培養液(3 ml、試験管、34°C)を 1:25 希釈となるよう M9 培地に植え継ぎ(25 ml、フラスコ、34°C)、5 時間の振とう培養ののち対数増殖期に達した培養液(OD<sub>600</sub> = 0.3)に 0.1 mM(最終濃度)のシステインを添加した。対照としてシステインを添加しない条件(水添加)も同様に行った。添加後、1 時間ごとにサンプリングを行った(0-3 時間)。 $\beta$ -galactosidase 活性の測定は Miller らの方法 (51) に従った。反応は全て 28°C において行い、遠心分離により残渣を除去した上清を用いて波長 420 nm における吸収を測定し、Miller Unit として  $\beta$ -galactosidase 活性を求めた。各株 2 連で独立に培養及び活性測定し、平均値を実験データとして使用した。

#### 2-2-8. 定量的 real-time PCR

一晩 M9 最少培地にて振とう培養して得られた前培養液を、M9 最少培地 25 ml を新たに張り込んだ坂口フラスコに 1:100 倍希釈となるように植え継ぎ、34°C にて振とう培養を行った。約 6 時間培養し、対数増殖期に到達した培養液に最終濃度 0 mM(無添加)もしくは 1 mM となるようにシステインを添加し、システイン添加前と添加 2.5 分後、5 分後、10 分後にサンプリングを行った。各サンプリングでは 4 ml の培養液を 8 ml の RNA Protect Bacteria Reagent (Qiagen)と混ぜ合わせ、5 分間室温に置いた後、遠心分離により菌体のみを取得し、-80°C で冷凍保存した。保存されたサンプルより、RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて mRNA の調製を行った。DNase 処理は TURBO

DNA-free (Ambion)を用い、DNase の反応及び不活化をした。こうして調製された DNase 処理済の RNA サンプル 200 ng を用いて ExScript RT reagent kit (Takara Bio)により逆転写を行い DNA に変換した。

こうして調製された cDNA サンプルを、Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)を用いた real-time PCR によって定量した。なおプライマーは表 2-4 に示したものを、RT-PCR 機は 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems)を使用した。各サンプルの 16S RNA (*rrnB*)についても定量を行い、16S RNA の定量値を用いて RNA 量による標準化を行った。

表 2-5. 定量的 real-time PCR に用いたオリゴ核酸配列一覧

遺伝子名	配列
<i>ccdA</i>	5'-GCTCAGCGGACACACACTTAAT-3'
	5'-ACCTGATGCCCGGAAAATC-3'
<i>ccdA</i>	5'-ACGCGTCGAGCCTTCCTT-3'
	5'-CCGGTACGCGAAGCATTT-3'
<i>cefA</i>	5'-GTCACCTGCAAATCAACTGGAA-3'
	5'-AGCGACAGCGCCATCAG-3'
<i>rrnB</i>	5'-CGGTAATACGGAGGGTGCAA-3'
	5'-CCTGCGTGCGCTTTACG-3'



### 2-2-9. システイン発酵

各生産菌をLB寒天培地に塗り広げ、34°Cで一晩前培養を行った後、10- $\mu$ Lサイズの植菌用ループ(NUNC社ブルーループ)でプレート上約7cm分の菌体を1回掻き取り、2mlの発酵生産培地を張り込んだ大試験管(内径23mm、長さ20cm)に植菌した。32°Cにて振とう培養を行い、グルコースが完全に消費されたことを確認後、培養を終了した(おおよそ21-24時間)。培地中に生産されたシステイン(システイン関連物質を含む)はGaitonde法(52)により定量した。なおニンヒドリン反応液を添加する前に、サンプルに10mMのTris-HCl緩衝液(pH 8.5)にて調製した10mMのDTTを加え、10分間静置して還元処理を行った。本定量法では、システインの他にも酸化体(シスチン)やピルビン酸との縮合体(2-methyl-2,4-thiazolidine carboxylic acid)も検出される(17, 53)。またシステイン生合成経路においてシステインの前駆体となるS-sulfocysteineも同時に検出されるが、これらのシステイン類縁体は、生体反応および化学反応のいずれにおいても一段階の反応によりシステインに容易に変換することが可能である。つまり、類縁体を総システインとして検出することにより、実際のシステイン生産能を評価することが可能となる。システイン収率は1gの消費グルコースあたりに得られる産生システイン量(g)をパーセント表示した。各株とも4連で実験を行い、そのときのシステイン生産量(平均値)と標準偏差を示した。なお有意差の検定に関しては、T検定により2つの母集団におけるそれぞれの平均値の有意差( $P < 0.05$ )を判断した。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. システイン耐性に関与する遺伝子のスクリーニング

*P. ananatis* においてシステイン耐性に関与する遺伝子を探索すべく、*P. ananatis* のゲノム DNA ライブラリーを野生型 *E. coli* MG1655 株に導入し、2–4 mM のシステインを含有する M9 最少培地プレート上で2日間生育させた。得られたシステイン耐性が向上したクローンからプラスミド DNA を回収、配列を解読し、ゲノム重複領域の情報からシステイン耐性に関与する候補遺伝子の絞り込みを行い、システイン耐性を付与する遺伝子を3種同定した。

同定された遺伝子を解析した結果、ピリドキサル 5 リン酸 (PLP) 依存型酵素の一つであるトリプトファン合成酵素  $\beta$  スーパーファミリーに分類される酵素をコードする *ccdA* (cysteine-inducible cysteine desulphydrase, locus tag; PAJ\_0331) が見い出された (表 2-6)。*E. coli* では5つの L-CD および1つの D-CD がシステインをピルビン酸、アンモニア、そして硫化水素に変換することが知られている (9)。これらの酵素は全て PLP 依存型の酵素であり、そのうち3つ (CysM, CysK, DcyD) はトリプトファン合成酵素  $\beta$  スーパーファミリーに属している (15, 54, 55)。こうした配列上の特徴および、システイン耐性を付与する表現型から、*ccdA* は CD 活性を持つ新規酵素である可能性が考えられた。

二つ目には、*cefA* (cysteine efflux pump A, locus tag; PAJ\_3026) と筆者らが命名した LysE スーパーファミリー (56, 57) に属する複数膜貫通型 (SOSUI (58) による予測では5回膜貫通型) のトランスポーター様構造の因子をコードする遺伝子が同定され、システインの排出を担っていると推察された (表 2-6)。スクリーニングで得られた *cefA* を含むゲノム断片上には、*cefR* (cysteine efflux regulator, locus tag; PAJ\_3027) と筆者らが命名した HTH (helix-turn-helix) ドメインを保有する転写調節因子をコードする遺伝子が存在しており、この因子が *cefA* の転写制御に関与している可能性が考えられた。また同時に、*cefB* (cysteine efflux pump B; PAJ\_p0018) と筆者らにより命名された、複数膜貫通型 (SOSUI では9回膜貫通型であり、DMT (drug/metabolite transporter) スーパーファミリー (59) のモチーフを保有していると予測されている) のタンパク質をコードする遺伝子が見出された (表 2-6)。その構造上の特徴から、*cefA* と同じくシステインの新規排出ポンプであることが推察された。

取得されたクローンが保持するプラスミド上のゲノム重複領域情報から候補遺伝子の絞り込みを行ったが、この結果のみでは各因子がシステイン耐性の獲得に効果があるとは結論付けられない。そこで、各遺伝子をクローニングしたプラスミドをそれぞれ *E. coli* 野生株 MG1655 に導入し、M9 最少培地にて MG1655 株の生育を阻害するシステイン濃度 (200  $\mu$ M) において生育を改善させるか検証を行った。本実験の陽性対照には、既知のシステイン排出ポンプをコードする *eamA* (17)、*leuE* (21) を用いた。これにより、実験系の確認と同時に、システイン排出ポンプをコードしていると予想される *cefA*、*cefB* のシステイン排出能力を比較することが可能となる。

生育実験の結果、遺伝子を搭載していないベクターのみを保持する株では生育ラグが認められたが、陽性対照である *eamA*、*leuE* をマルチコピープラスミドにて導入した株は生育ラグが解消され

た結果が得られ、本実験が機能していることが確認できた(図 2-2)。 *ccdA*、*cefA* および *cefB* をマルチコピー化した株も、それぞれ陽性対照同様に生育ラグの消失が観察され、各遺伝子がシステイン耐性の付与に効果があることが、本実験により再確認された(図 2-2)。

一方、それぞれの因子によるシステイン耐性への影響については差異が認められた。*leuE* の過剰発現によるシステイン耐性効果は乏しく(生育ラグの減少幅が小さい)、これは **LeuE** がシステインを排出する能力が低いことに起因するものと推察された。元々 **LeuE** は L-ロイシンの排出担体として同定されており (23)、システインの排出能力は認められるものの、その能力は高くないことが示唆された。一方、**EamA** は既知のシステインを排出するポンプとしてよく知られており、発酵生産にも用いられるなど実績も多い (17, 60, 61)。実際にシステイン耐性効果も高く、システイン添加時の生育ラグはほとんど観察されなかった。*cefA* および *cefB* の過剰発現株は、*eamA* 過剰発現株と同様に生育ラグはほとんど認められないことから、**CefA** および **CefB** は **EamA** と同レベルの排出能力(システイン耐性)を有している可能性が示唆された。排出ポンプではないが、*ccdA* の過剰発現時にも、システイン添加時の生育ラグは認められなかったことから、他の因子と同様に、遺伝子増幅時に高いシステイン耐性効果が確認された。

表 2-6. スクリーニングで得られた遺伝子とそれらの特徴

遺伝子	アミノ酸数	推定膜貫通数 <sup>a</sup>	タンパク質ファミリー <sup>b</sup>	保有ドメイン <sup>c</sup> (位置)	<i>E. coli</i> の相同遺伝子 (%アミノ酸相同性)
<i>ccdA</i>	344	0	PLP-dependent enzyme	PALP (30-314)	CysM (27%) CysK (21%)
<i>cefA</i>	195	5	LysE sperfamily	RhtB (11-193)	EamB (27%) YigK (26%) YahN (24%)
<i>cefB</i>	301	9	DMT sperfamily	RhaT (12-281)	YedA (27%) YijE (23%) EamA (20%)

<sup>a</sup> 推定膜貫通数は SOSUI (58) を用いて予測した。

<sup>b</sup> PLP, Pyridoxal phosphate; DMT, Drug/metabolite transporter.

<sup>c</sup> PALP, Pyridoxal-phosphate dependent enzyme; RhtB, Threonine/homoserine/homoserine lactone efflux protein [Amino acid transport and metabolism]; RhaT, Carboxylate/Amino Acid/Amine Transporter [Transport and binding proteins, Amino acids, peptides and amines].

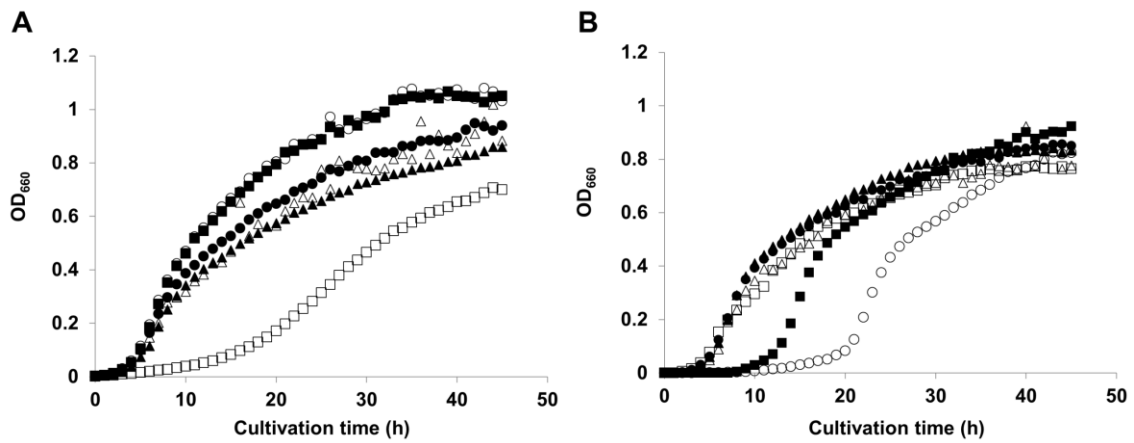


図 2-2. システイン耐性

システイン耐性を付与するとされる各遺伝子を搭載したプラスミドを保持する *E. coli* MG1655 を、200 μM のシステインを添加した M9 最少培地にて培養し、生育を観察した。空ベクター (pSTV29; ○) および *leuE* (pLeuE; ■)、*eamA* (pEamA; □)、*ccdA* (pCcdA; ●)、*cefA* (pPA36ccd; △)、*cefB* (pCefB; ▲) を保持した株の、システイン無添加条件下 (A) および 200 μM のシステイン添加条件下 (B) における代表的な生育曲線を示した。

### 2-3-2. *ccdA* および *cefA* のシステイン耐性への関与

これまでの検討を通じ、*ccdA* や *cefA*、*cefB* がシステイン耐性を付与する遺伝子であることが明らかとなった。この3つの遺伝子のうち、*ccdA* と *cefA* はそれぞれの遺伝子のすぐ上流には転写調節因子をコードしていると予想される遺伝子が存在することから、システインによる転写調節が行われているのではないかと推察された。実際、マイクロアレイによる予備試験では *ccdA* や *cefA* の転写は、1 mM のシステイン添加(cysteine shock)で増加することが示唆されている(データ示さず)。そこで、この2因子に関して詳細に解析することとした。

まず始めに、*cefA*、*ccdA* 両遺伝子のシステイン耐性への関与を詳細に検証すべく、*P. ananatis* SC17 株において各遺伝子欠損株を構築し、システインを含む寒天培地上での生育試験を行った。

*ccdA* と *cefA*、それぞれの遺伝子を欠損した株では、システイン存在下での生育が著しく阻害されること、欠損株に対し欠損遺伝子をプラスミドにて導入することにより、システイン感受性が相補されることが明らかとなった(図 2-3 A, B)。これにより、*cefA*、*ccdA* にコードされるタンパク質は、生育阻害を引き起こすシステイン濃度環境下において生育阻害を回避する働きを有することが改めて確認された。続いて、それぞれの遺伝子を単独欠損した株と、2重欠損した株のシステイン感受性を比較したところ、システイン添加時の生育阻害の程度に差異が観察された。*ccdA* 欠損株は *cefA* 欠損株と比較して、システインに対して高い感受性を持つことが確認された(図 2-2 C)。つまり、*cefA*、*ccdA* は異なったレベルのシステイン耐性を示すこと、*ccdA* は *cefA* に比べてシステイン耐性への寄与が大きいことが明らかとなった。さらに2重欠損株では単独欠損と比してシステイン感受性が高まることが確認され(図 2-3 C)、それぞれ異なるメカニズムにてシステイン耐性に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

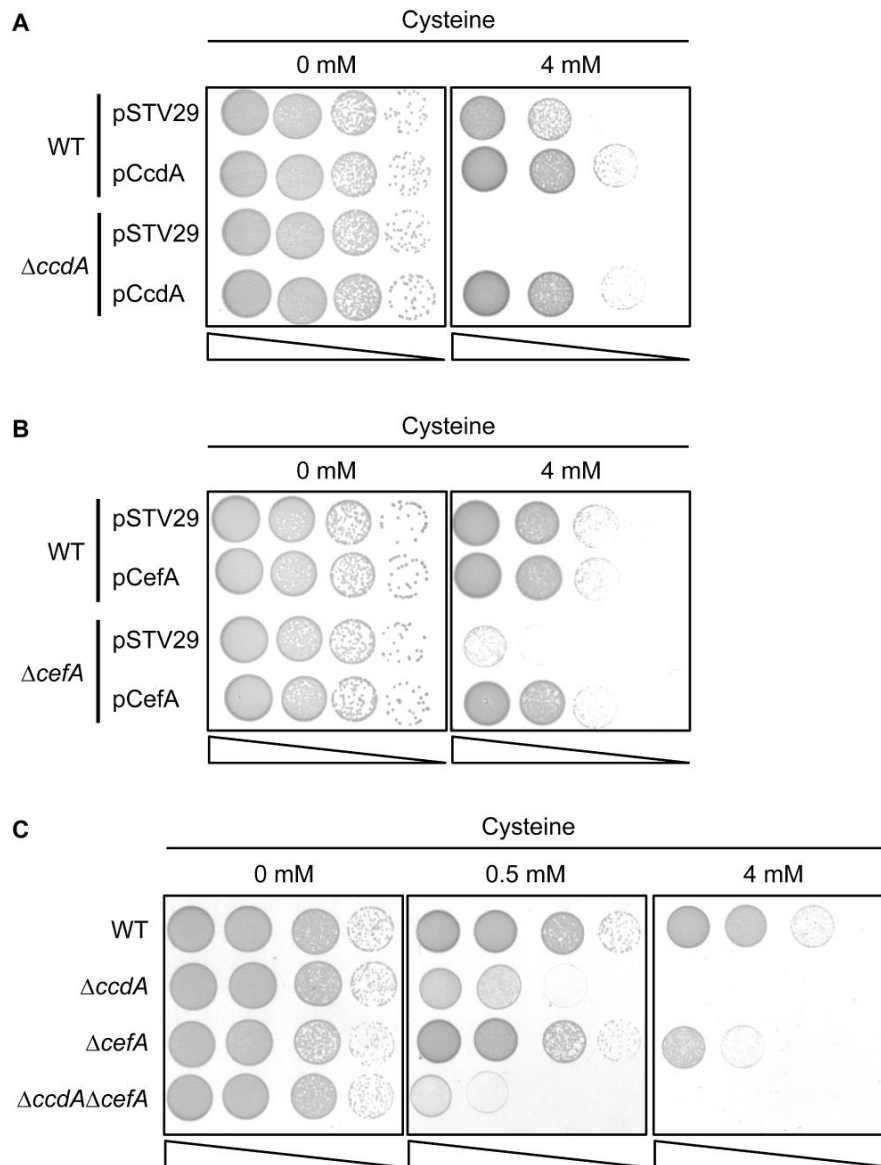


図 2-3. システイン感受性

各株のシステインへの感受性を、0、0.5、4 mM のシステインを含有する M9 プレート上での生育を指標に検証した。(A) 空ベクター (pSTV29) もしくは、*ccdA* を搭載したプラスミド (pCcdA) を保有する *P. ananatis* SC17 野生株 (WT) および *ccdA* 欠損株 SC17 $\Delta ccdA$ 。(B) 空ベクター (pSTV29) もしくは、*cefA* を搭載したプラスミド (pCefA) を保有する SC17 野生株 (WT) および *cefA* 欠損株 SC17 $\Delta cefA$ 。(C) SC17 野生株 (WT)、*ccdA* 欠損株 SC17 $\Delta ccdA$ 、*cefA* 欠損株 SC17 $\Delta cefA$ 、両遺伝子欠損株 SC17 $\Delta cefA\Delta ccdA$ 。

### 2-3-3. *ccdA* にコードされる新規システイン誘導型 CD の解析

続いて *ccdA* の機能について解析を行った。CD 活性を有する酵素の多くはトリプトファン合成酵素  $\beta$  スーパーファミリーに分類される。*CcdA* もまたトリプトファン合成酵素  $\beta$  スーパーファミリーに分類される PLP 依存酵素であることから、CD 活性を有する酵素である可能性が考えられた。

*CcdA* が CD であるかを確認するため、*ccdA* 欠損株や増幅株における細胞抽出液中の CD 活性を、活性染色にて検出した。LB 培地を用い、37°C で対数増殖期まで培養した細胞を回収し、粗酵素液を調製、native PAGE によりタンパク質を分離後、CD 活性の検出を行った。本実験が想定通り CD 活性を検出する系として機能しているかを確認するため、*E. coli* 野生株 W3110 株及び CD 活性を示すことが知られている cystathionine  $\beta$ -lyase をコードする *metC* (12) の欠損株 (W3110  $\Delta metC$ ) の活性染色を行った。その結果、*metC* 由来の CD 活性が検出され、実験系が適切に機能していることが確認された (図 2-4:lanes 1, 2)。

野生型 *P. ananatis* SC17 株では CD 活性を示すバンドがわずかに観察されるが、*ccdA* 欠損株ではそのバンドが消失することが明らかとなった (図 2-4:lanes 3, 4)。一方、マルチコピープラスミドにて *ccdA* を増幅した株では、CD 活性を示すバンドが強く検出された (図 2-4:lane 8)。以上の結果より、*ccdA* 遺伝子は CD をコードしていることが明らかとなった。さらに、培養液中に 30 mM システインを添加した条件において CD 活性が著しく増幅されることから、*CcdA* はシステインによって誘導されることが示された (図 2-4:lane 5)。さらに、*ccdA* 欠損株ではシステイン添加により増減するバンドは確認できず (図 2-4:lane 6)、*P. ananatis* では *CcdA* がシステインにより誘導される唯一の、かつ主として機能する CD である可能性が示唆された。

一連の活性染色実験により、*ccdA* がシステインにより誘導されること、また *CcdA* が CD であることが明らかとなったが、活性染色は定量性に乏しく、*CcdA* が *P. ananatis* が持つ総 CD 活性に対してどの程度の影響を及ぼしているのかを明確に示すことができない。そこで、その影響を定量的に把握するため、*P. ananatis* SC17 株と *ccdA* 欠損株のシステイン存在下、非存在下における細胞抽出液中の CD 活性を測定した。

その結果、システイン非添加条件下において、*ccdA* 欠損株は SC17 株に比べ CD 活性が 1/10 程度まで低下している (表 2-7) ことから、CD 活性を持つ酵素の中でも *CcdA* が特に中心的な役割を持つものであることが改めて確認された。また、SC17 株ではシステインの添加により活性が約 11 倍増加するのに対し、*ccdA* 欠損株ではこの増加が全く認められなかった (表 2-7)。以上の結果より、*CcdA* はシステインに応答する唯一の、そして *P. ananatis* において主要な活性を持つ CD であることが明らかとなった。



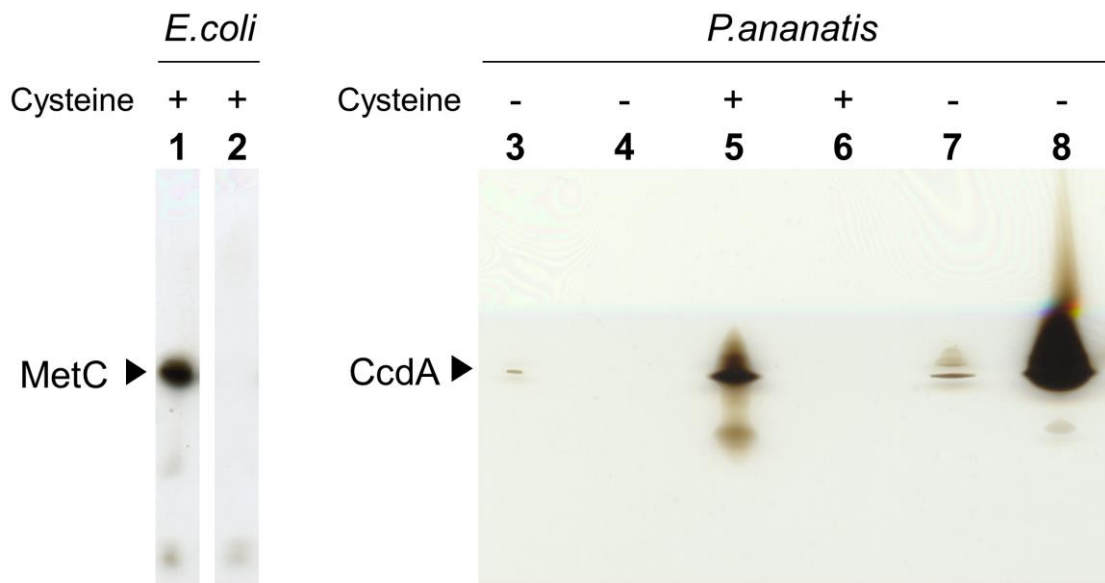


図 2-4. CcdA の CD 活性

*E. coli* の MetC (lanes 1, 2) と、*P. ananantis* の CcdA (lanes 3 から 8) の CD 活性染色。株と条件は以下の通り。Lane 1: *E. coli* 野生株 (W3110)、lane 2: *metC* 欠損株 (W3110 $\Delta$ *metC*)、lane 3: *P. ananantis* 野生株 (SC17)、lane 4: *ccdA* 欠損株 (SC17 $\Delta$ *ccdA*)、lane 5: 野生株 (SC17) に 30 mM システインを添加して培養した条件、lane 6: *ccdA* 欠損株 (SC17 $\Delta$ *ccdA*) に 30 mM システインを添加して培養した条件、lane 7: 空ベクター (pHSG299) を保持した野生株 (SC17)、lane 8: *ccdA* 搭載プラスミド (pHSG-*ccdA*) を保持した野生株 (SC17)。

表 2-7. システイン存在下、非存在下における細胞内 CD 活性 <sup>a</sup>

株名	システイン	CD 活性 <sup>b,c</sup> (mU)		
SC17	-	11.2	±	0.3
	+	121.9	±	3.7
SC17 $\Delta$ ccdA	-	1.1	±	0.1
	+	1.1	±	0.1

<sup>a</sup>CD, cysteine desulfhydrase

<sup>b</sup>1 U = 1  $\mu$ mol/min/mg-タンパク質

<sup>c</sup>値は独立した 4 連の実験の平均値 $\pm$ 標準偏差を示した。

#### 2-3-4. システインによる *ccdA* の発現誘導

CcdA はシステインに応答することが明らかとなったため、この応答が *ccdA* プロモーターに依存するものであるか否かを検証すべく、*lacZ* をレポーターとした解析を行った。染色体上の *ccdA* プロモーター下流に *lacZ* を連結した *P. ananatis* 株 (SC17  $\Delta$  *lacZ*-P<sub>*ccdA*</sub>-*lacZ*) を用い、システイン添加条件下における  $\beta$ -galactosidase 活性の経時変化を測定した。

その結果、システイン添加後に  $\beta$ -galactosidase 活性の上昇が確認され (図 2-5 A)、システインにより *ccdA* プロモーターが活性化されることが示唆された。より詳細な誘導のキネティクスを調べるため、システインによる誘導直後における mRNA の経時変化を real-time PCR によって解析した。その結果、システイン添加により mRNA レベルは速やかに上昇し、約 400 倍にまで増加した。加えて、添加 2.5 分後には既に mRNA レベルが最大値に近付いていることから、極めて大きくかつ素早い応答であることが明らかとなった (図 2-5 B)。誘導に必要な濃度については詳細な検討を行っていないが、調べた範囲では少なくとも 100  $\mu$ M のシステインを添加した場合には最大の mRNA レベルに達することから (データ示さず)、比較的低濃度でも応答するシステムであると推察された。

*E. coli* では CD 活性を示す酵素をコードする遺伝子の一つである *tnaA* の mRNA レベルがシステイン存在下において高くなることが報告されているが (50)、本実験と同じ実験系において *E. coli* *tnaA* mRNA の経時変化を調べたところ、システインによる誘導は認められなかった (データ示さず)。つまり *tnaA* は *ccdA* とは異なり、応答が遅く、かつ変化も大きくないことが示唆された。*ccdA* はシステインに対し、大きくかつ素早い応答であることから、よりシステイン分解に特化し、システイン耐性と強く関連した因子である可能性が考えられた。

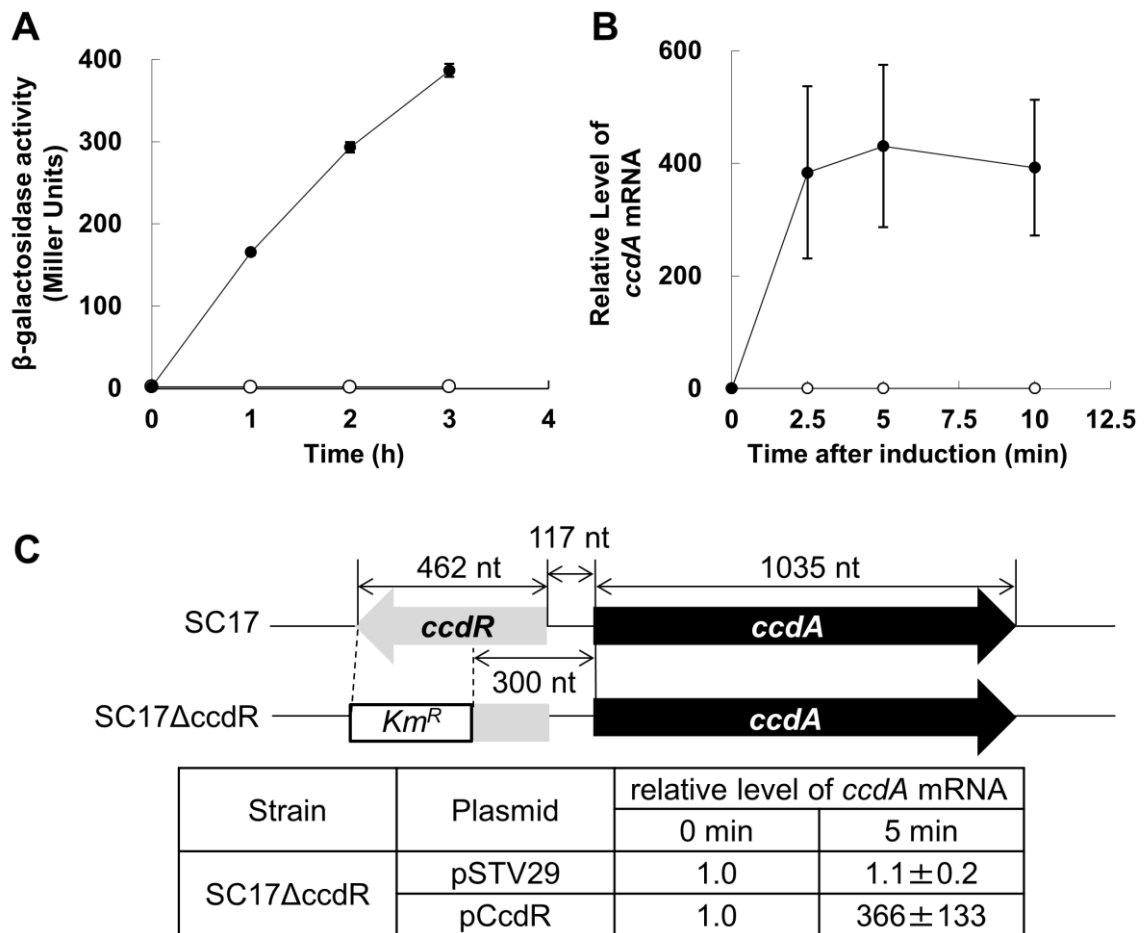


図 2-5. システインによる *ccdA* の転写誘導

(A) システインの存在・非存在下における  $P_{ccdA}$ -*lacZ* 融合による *ccdA* プロモーターの *lacZ* レポーターアッセイ。SC17 Δ*lacZ*- $P_{ccdA}$ -*lacZ* 株を M9 培地で対数増殖期まで培養し、100 μM のシステイン添加(●)、もしくはシステイン無添加(○)後の 0 から 3 時間まで毎時間 β-ガラクトシダーゼ活性を測定した。値は 2 つの独立した実験の平均値を示した。(B) システイン添加後の相対 *ccdA* mRNA 量。SC17(野生株)を M9 培地にて対数増殖期まで培養し、1 mM のシステインを添加(システインショック、●)、もしくは無添加(○)後の mRNA レベルをシステイン添加前のレベルと比較して示した。値は独立した 3 連の実験の平均値を、エラーバーは標準偏差を示した。(C) *ccdR* 欠損・プラスミド相補時における、システイン添加後の *ccdA* mRNA 相対値。(上部)*ccdR* の欠損コンストラクト。(下部)空ベクター(pSTV29)もしくは *ccdR* 搭載ベクター(pCcdR)を保持する *ccdR* 欠損株(SC17 Δ*ccdR*)を用いたシステインショック(1 mM)5 分後の *ccdA* の mRNA 量。値はシステインショック前(0 分 = 1)の値にて標準化した。独立した 3 連の実験の平均値+/-標準偏差を示した。nt: 塩基数。

### 2-3-5. *ccdA* のシステインによる転写誘導に関与する転写調節因子 (*ccdR*) の解析

次に、システインによる *ccdA* の転写誘導に関与する転写調節因子について解析を行った。*ccdA* の上流には僅か 117 bp を隔てて逆向きの方向 (divergent) の *ccdR* (cysteine-inducible cysteine desulphydrase regulator, PAJ\_0332 もしくは *ybaO*) と筆者らが命名した遺伝子が存在する。*CcdR* は putative LRP-like transcriptional regulator のアノテーションがされており、*E. coli* の *YbaO* (62) と約 74% の相同性があることからオーソログと考えられる。こうしたゲノム上での divergent の並びの関係は、しばしば転写調節因子とそのターゲット遺伝子の関係であることが知られているため、*ccdR* は *ccdA* の転写を調節している可能性が考えられた。本仮説を検証すべく、*ccdR* 欠損株を用い、システイン存在下における *ccdA* の誘導を real-time PCR によって調べた。なお、*ccdA* の発現制御に関与する可能性のある領域をできるだけ残すため、*ccdA* 上流 300 bp を残した状態で *ccdR* の欠損を行った (図 2-5 C)。

システイン添加後の *ccdA* の mRNA 量を real-time PCR で調べたところ、*ccdR* 欠損株では *ccdA* の転写量増加は認められなかった。一方、欠損した *ccdR* をプラスミドにて相補した株では、*ccdA* の誘導が回復することが明らかとなった (図 2-5 C)。以上の結果より、*ccdR* は *ccdA* のシステインでの誘導を制御する転写調節因子であることが示唆された。

### 2-3-6. *ccdA* のシステイン発酵生産への応用

*ccdA* は *P. ananatis* において主要な CD として機能し、細胞内のシステイン濃度を調節している因子であるため、システインの発酵生産菌の育種において重要なターゲットになり得るものと推察された。そこでシステイン生産モデル株を用い、*ccdA* の欠損および過剰発現によるシステインの発酵生産への影響を調べた。

システインの発酵生産において鍵酵素である SAT の導入が欠かせないが、本酵素はシステインによるフィードバック阻害を受けることが知られている (5, 6)。そのため、これまでに検討されてきた *E. coli* を用いたシステイン発酵においては、システインによるフィードバック阻害耐性型の SAT が用いられている (53, 63, 64)。今回の検討では、*ccdA* が発酵生産に及ぼす影響を観察することが目的であるため、野生株である *P. ananatis* SC17 株に、この *E. coli* 由来の変異型 SAT をコードする遺伝子 (*cysE5*) を導入したシンプルな生産モデル株にて評価を行った。なお野生型の SC17 株はこの変異型 SAT の過剰発現なしでは検出可能なレベルでシステインを生産できないことが、これまでの検討で確認されている (データ示さず)。

まず初めに変異型 SAT を導入したモデル株 (CYS 1-1) に対し、*ccdA* を過剰発現させた影響を観察した (CYS 1-2 株)。生産培養の結果、システインの生産量が大きく減少することが明らかとなった (表 2-8)。本生産モデル株では、変異型 SAT が導入されたことにより菌体内にシステインが滞留していると予想される。そのため *ccdA* を過剰発現した株では、細胞外に分泌する前にそのシステインが分解されることにより生産量が低下したと考えられ、*P. ananatis* においてシステインの分解を司る *CcdA* が持つ CD としての機能を考えると順当な結果と言える。一方、変異型 SAT を導入した株 (CYS 1-3) に対し、*ccdA* を欠損した生産モデル株 (CYS 1-4) ではシステイン生産量が大きく増

加していた(表 2-8)。これは、細胞内に留まっているシステインの分解が抑制されることにより、生産量が増加したものと推察された。以上の結果より、*P. ananatis* を用いたシステイン発酵生産において *ccdA* は非常に重要な生産菌育種のターゲットであることが明らかとなった。

表 2-8. *ccdA* 欠損および過剰発現がシステイン生産に及ぼす影響<sup>a</sup>

実験区 および株名	遺伝子型/ 導入遺伝子 <sup>d</sup>	産生システイン (mg l <sup>-1</sup> )	OD <sub>600</sub>	システイン収率 [% (g/g)]
実験 1 <sup>b</sup>				
CYS 1-1	<i>cysE*</i> , vector	169 ± 4	27.8 ± 0.5	0.28 ± 0.01
CYS 1-2	<i>cysE*</i> , <i>ccdA</i>	71 ± 5	23.5 ± 0.3	0.12 ± 0.01
実験 2 <sup>c</sup>				
CYS 1-3	WT, <i>cysE*</i>	202 ± 14	34.9 ± 0.6	0.34 ± 0.02
CYS 1-4	<i>ccdA::kan</i> , <i>cysE*</i>	516 ± 46	34.0 ± 1.5	0.84 ± 0.06

<sup>a</sup> 値は独立する 4 連の実験の平均値±標準偏差を示した。

<sup>b</sup> CYS 1-1 株および CYS 1-2 株はそれぞれ培養開始後 23 時間、25 時間で終了した。

<sup>c</sup> CYS 1-3 株および CYS 1-4 株は培養開始後 19 時間で終了した。

<sup>d</sup> フィードバック阻害耐性型 *cysE* (*cysE\**) として *cysE5* (*E. coli* 由来) を用いた。

### 2-3-7. システイン排出ポンプ *cefA* の機能解析

続いて *cefA* に関して詳細に解析を行った。前述のように、予備的に行ったマイクロアレイの実験において *cefA* が *ccdA* 同様にシステインショックにより転写誘導されることが示唆されたため、まず始めにシステイン存在下での *cefA* 発現のキネティクスを、*ccdA* と同様に real-time PCR にて検証した。その結果、*cefA* の mRNA レベルはシステイン添加の 2.5 分後には 4 倍にまで上昇することが明らかとなった。つまり、*cefA* もまたシステインに対して速やかに応答し、誘導されること因子であることが明らかとなった(図 2-6 A)。

### 2-3-8. *cefA* のシステインによる転写誘導に関与する転写調節因子 (*cefR*) の解析

*cefA* のすぐ上流には divergent に位置する *cefR* (locus tag: PAJ\_3027) が存在しており、システインを介した *cefA* の転写調節に関与しているのではないかと考えられた。2-3-5 項に記載したように、こうしたゲノム上での divergent の並びの関係は、しばしば転写調節因子とそのターゲット遺伝子の関係であることが知られており、また *cefR* 中には HTH (helix-turn-helix) ドメインを保有する転写調節因子様配列が存在していることから、その可能性は極めて高いと推察された。本仮説を検証するため、*cefR* 欠損株を用いてシステイン誘導後における *cefA* の mRNA 量を real-time PCR にて測定した。なお、*cefA* の発現制御に関与する可能性のある領域をできるだけ残すため、*cefA* の上流 300 bp を残した状態で *cefR* を欠損した。

検証の結果、*cefR* 欠損株では *cefA* の mRNA 量はシステイン添加の有無に関わらず増加しないことが分かった。一方、プラスミドで *cefR* を相補した場合には、*cefA* の転写誘導が回復し、mRNA レベルが増加することが明らかとなった(図 2-6 B)。以上の結果より、*cefR* はシステインを介して *cefA* の転写誘導を制御する転写調節因子である可能性が強く示唆された。

一連の研究を通じ、*cefA/cefR* は *ccdA/ccdR* と類似したシステムであることが明らかとなった。両システムの作用機序を詳細に解明するためには、システインを介したプロモーターへの結合アッセイや転写調節因子 (*CcdR*, *CefR*) の活性化のメカニズムを検証するなど、分子レベルでの解析が必要であると考えられる。さらに、両システムのクロストークの有無なども今後の興味深いテーマであり、*P. ananatis* における細胞内システインの制御機構を詳細に解明するためにも重要なポイントであると考えられる。



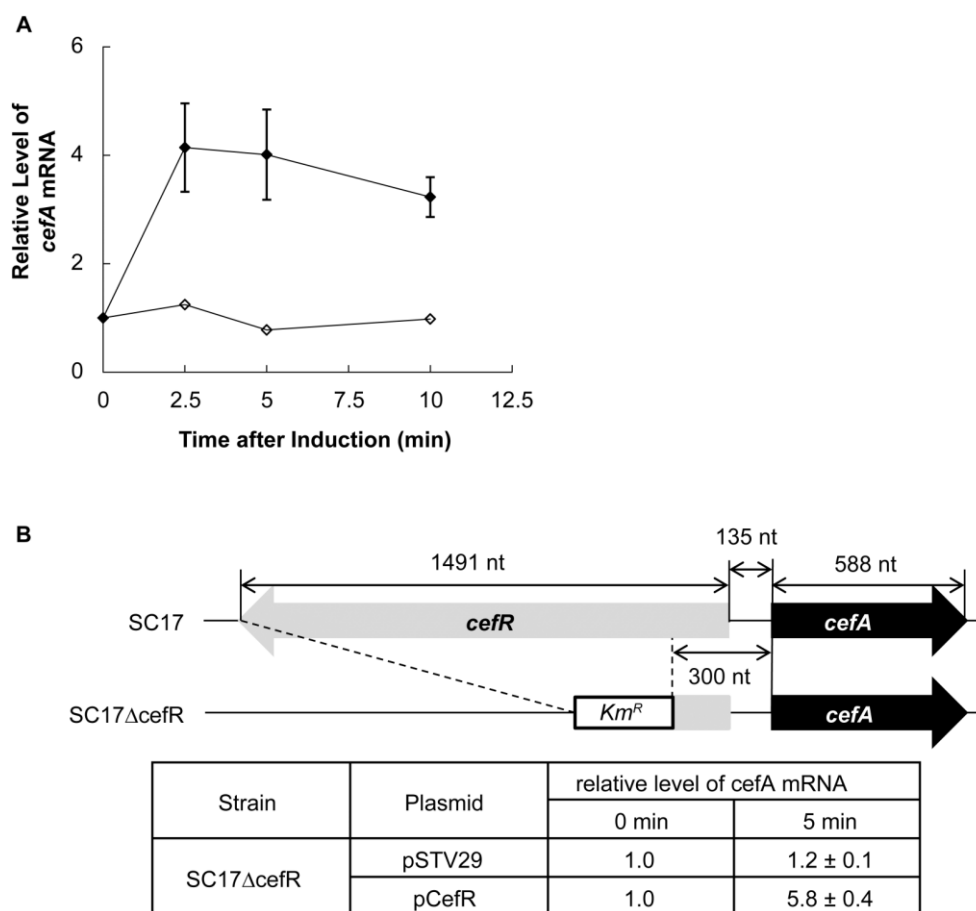


図 2-6. システインによる *cefA* 転写の誘導

(A) システイン添加後の相対 *cefA* mRNA 量の推移。SC17(野生株)を M9 培地にて増殖期まで培養し、1 mM のシステインを添加(システインショック、◆)、もしくは無添加(◇)後の mRNA レベルをシステイン添加前のレベルと比較して示した。値は独立した 3 連の実験の平均値を、エラーバーは標準偏差を示した。(B) *cefR* 欠損、プラスミド相補時における、システイン添加後の *cefA* mRNA 相対値。(上部) *cefR* の欠損コンストラクト。(下部) 空ベクター(pSTV29)もしくは *cefR* 搭載ベクター(pCefR)を保持する *cefR* 欠損株(SC17Δ*cefR*)を用いたシステインショック(1 mM)5 分後の *cefA* mRNA 量。値はシステインショック前(0 分 = 1)の値にて標準化した。独立した 3 連の実験の平均値±標準偏差を示した。nt: 塩基数。

### 2-3-9. *cefA* の機能解析およびシステイン発酵生産への応用

これまでの実験を通じ、*cefA* はシステインを介した *cefR* の転写制御を受けることが明らかとなったが、*cefA* の機能に関しては解明できていない。*CefA* はその配列情報より *LysE* スーパーファミリー (56, 57) に属する複数膜貫通型のトランスポーター様構造を有していることが推定されており、システインの排出を担っている可能性が高いと考えられた。そこで、*cefA* がシステイン排出能を有しているか、またシステインの発酵生産に応用可能かを検証することとした。この 2 つの項目を確認するため、システイン生産モデル株(細胞内にシステインを蓄積する株)にプラスミドにて *cefA* をマルチコピー化することで、システイン生産量が増加するかを検証した。このような発酵生産を用いた方法は、システインの排出ポンプとしての機能を確認する手法として実績がある (18, 20, 65)。なお生産モデル株として、細胞内にシステインを蓄積していることが明らかとなった(2-3-6 項参照) *P. ananatis* SC17 株に *E. coli* 由来のフィードバック阻害耐性型の変異 SAT をコードする遺伝子 (*cysE5*) をプラスミドにて導入した株を用いた。

本実験系の陽性対照として既知のシステイン排出担体をコードする *E. coli* 由来の *eamA* (17) を過剰発現させた *P. ananatis* 株を採用した。変異型 SAT の単独導入株と比較して、*eamA* を過剰発現した株ではシステイン生産性が大きく向上することが確認され、実験系の妥当性が確認された(表 2-9、実験 1)。同様に、*cefA* を過剰発現させた株を用いてシステインの発酵生産を行ったところ、システイン生産量の増加が認められたことから、*cefA* はシステインの排出ポンプをコードしている可能性が示唆された(表 2-9、実験 2)。加えて、*cefA* の転写調節因子と予想される *cefR* と *cefA* を同時に導入した株では、システイン生産において相乗効果が認められ、*cefR* が *cefA* の転写を調節している可能性が改めて示唆された。以上の結果より、*CefA* はシステインの排出ポンプであること、システインの発酵生産において重要な生産菌育種のターゲットとなり得ることが明らかとなった。

表 2-9. *cefA* および *cefR* のシステイン生産に及ぼす効果<sup>a</sup>

株名	導入遺伝子 <sup>c</sup>	システイン生産 ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	OD <sub>600</sub>	培養時間 <sup>b</sup> (時間)
実験 1 <sup>d</sup>				
CYS 1-1	<i>cysE*</i> , vector	169 ± 4.0	27.8 ± 0.5	23
CYS 2-1	<i>cysE*</i> , <i>eamA</i>	545 ± 28	21.8 ± 0.1	<19
実験 2				
CYS 1-1	<i>cysE*</i> , vector	226 ± 40	32.6 ± 0.8	20
CYS 2-2	<i>cysE*</i> , <i>cefR</i>	188 ± 50	32.9 ± 0.9	17.5
CYS 2-3	<i>cysE*</i> , <i>cefA</i>	496 ± 75	30.1 ± 1.3	19.5
CYS 2-4	<i>cysE*</i> , <i>cefA</i> , <i>cefR</i>	900 ± 96	29.9 ± 0.2	<16

<sup>a</sup> 値は独立した 4 連の実験の平均値 $\pm$ 標準偏差を示した。

<sup>b</sup> 培養は初発グルコース ( $60 \text{ g l}^{-1}$ ) を消費したことを確認し、停止した。

<sup>c</sup> フィードバック阻害耐性型 *cysE* (*cysE\**) として、*cysE5* (*E. coli* 由来) を用いた。

<sup>d</sup> 実験 1 は表 2-8 の実験 1 と同時に実施し、共通の対照株 (CYS1-1) を用いた。

### 2-3-10. *cefB* の機能解析およびシステイン発酵生産への応用

*cefB* には *ccdA* や *cefA* のようなシステインに応答した転写制御は認められないが、高濃度システイン下におけるスクリーニングにより取得された遺伝子であることから、細胞内システイン濃度を調節するための重要な因子であり、システインの発酵生産における生産菌育種の有効因子になり得るものと推察された。そこで、*cefB* の機能解析とともに、システイン発酵への応用可能性について検証することとした。*cefB* は DMT (drug/metabolite transporter) スーパーファミリー (59) のモチーフを有しているタンパク質をコードしていると予測されており、*cefA* と同様にシステインの排出ポンプをコードしている可能性が考えられた。そこで、*CefB* がシステイン排出能を有しているか、またシステインの発酵生産に応用可能かを検証するため、*CefA* の場合と同様に(2-3-9 項参照)システイン生産モデル株(細胞内にシステインを蓄積する株)にて *cefB* を過剰発現させた際の効果を観察した。

生産培養の結果、*cefB* の過剰発現によりシステイン生産能が大きく向上していることが確認された(表 2-10)。システイン耐性を高める効果が認められたこと、システイン生産能を向上させる機能を有していること、また典型的なトランスポーターと構造が予測されていることなどから、*cefB* はシステイン排出機能を有したトランスポーターであることが示唆され、またシステインの発酵生産に活用可能であることが明らかとなった。

表 2-10. *cefB* のシステイン生産に及ぼす効果<sup>a, b</sup>

実験区 および株名	導入遺伝子 <sup>d</sup>	産生システイン (mg l <sup>-1</sup> )	OD <sub>600</sub>	システイン収率 [% (g/g)]
CYS3-1 <sup>c</sup>	<i>cysE*</i> , vector	95 ± 6	4.3 ± 0.2	0.26 ± 0.04
CYS3-2	<i>cysE*</i> , <i>cefB</i>	209 ± 16	9.3 ± 0.2	0.36 ± 0.01

<sup>a</sup> 値は独立する 4 連の実験の平均値±標準偏差を示した。

<sup>b</sup> 培養開始後 18 時間にて培養を終了した。

<sup>c</sup> 培養終了時点にて残グルコース濃度 (20.3 ± 1.3 g l<sup>-1</sup>) が検出された。

<sup>d</sup> フィードバック阻害耐性型 *cysE* (*cysE\**) として、*cysEX* (*E. coli* 由来) を用いた。

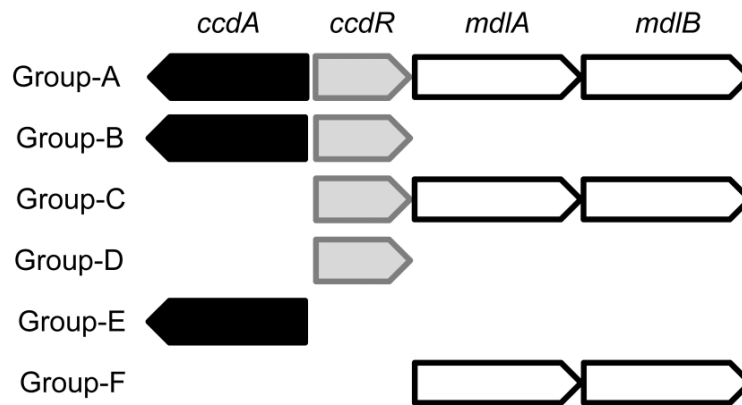
## 2-4. 考察

### 2-4-1. 各種バクテリアにて保存される *ccdA-ccdR* システム

本研究では、*P. ananatis* のシステイン耐性に関与するシステイン誘導型の CD 及び排出ポンプを同定した。バクテリアにおいて、システインによる転写誘導を介し、システイン耐性を誘導する遺伝子はこれまでに報告されておらず、これらが初めての例と考えられる。一方で Oguri らにより報告されている *cdsH-cutR* システム (66) (*Salmonella* における *ccdA-ccdR* のオーソログ)も類似した性質を持っていると推察されることから、バクテリアにおいてある程度保存されたシステムである可能性が考えられる。そしてこれらのシステムは、SAT や 3-PGDH のようなフィードバック阻害機構や、システイン合成関連遺伝子の転写調節因子である CysB やそのレギュロンによる調節機構と並び、システインの細胞毒性に対して対応するためにバクテリアが備える第3の機構であると考えられる。

本システムがバクテリア間でどのように保存されているかを STRINGS データベース (67) を用いて解析したところ、*ccdA-ccdR* の周辺遺伝子配置を中心に6つのグループに分類することができた(図 2-7)。*ccdA*、*ccdR* もしくはその両方のオーソログが存在する大半は  $\gamma$ -Proteobacteria であり、ごく一部  $\alpha$ -Proteobacteria が含まれた。*ccdA*、*ccdR* が両方存在する Group-A と Group-B が最も多く、腸内細菌科において広く保存されたシステムであることが分かる。また、STRING による解析では周辺でよく保存されている遺伝子群として *mdlAB* (predicted multidrug ABC transporter) が見出された。いずれの種でも *ccdR* と *mdlAB* の距離は数十 bp と非常に短く、オペロン構造を取っている可能性を含め何らかの機能的な関連も否定できない。特に興味深いのは *E. coli* 等、Group-C、D に属する種においては *ccdA* のオーソログが存在しないにも関わらず、転写調節因子である *ybaO* (*ccdR* オーソログ)のみが存在することである。進化の過程でたまたま *ybaO* だけが残ったのか、あるいは *mdlAB* との関連やその他で何らかの機能を持って存在しているのか、興味深い疑問である。

対照的にシステイン誘導型の排出ポンプとその転写調節遺伝子である *cefA-cefR* は、*P. ananatis* 以外では腸内細菌科の *Serratia* や *Erwinia* といったごく限られた種にのみ保存されていた。このような極めて限定的な保存性から、CcdA と比較してシステイン耐性への貢献度が低いこと、もしくは限られた特定の環境下でのみ作動する可能性などが推察された。実際、システインによる誘導の度合いは CcdA と比較して小さく(図 2-5 B、2-6 A)、またシステイン耐性へのインパクトも小さい(図 2-3 C)ことも確認されている。つまり、*cefA-cefR* システムはある特定の環境下において *ccdA-ccdR* システムを補完する役割を担っている可能性が考えられた。この二つのシステムのクロストークに関する検討や、結合アッセイ等によるシステインと転写調節の直接的な関与の証明に関しては、次なる課題であると考えられる。



<p><b>Group-A</b>  <i>Pantoea ananatis</i>, <i>Salmonella typhimurium</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i>,  <i>Citrobacter koseri</i>, <i>Photorhabdus luminescens</i>,  <i>Serratia proteamaculans</i>, <i>Enterobacter sp.638</i>,  <i>Photobacterium profundum</i>, <i>Yersinia enterocolitica</i></p>
<p><b>Group-B</b>  <i>Enterobacter sakazaki</i>, <i>Vibrio cholerae</i> N16961,  <i>Pseudomonas atlantica</i>,  <i>Rhodopseudomonas palustris</i> HaA2</p>
<p><b>Group-C</b>  <i>Escherichia coli</i>, <i>Shigella dysenteriae</i></p>
<p><b>Group-D</b>  <i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB18, <i>Bradyrhizobium japonicum</i>,  <i>Rhodobacter sphaeroides</i> 241</p>
<p><b>Group-E</b>  <i>Xanthomonas axonopodis</i>, <i>Xylella fastidiosa</i>9a5c, <i>Novosphingobium aromaticivorans</i></p>
<p><b>Group-F</b>  <i>Buchnera aphidicola</i> APS, <i>Wigglesworthia glossinidia</i>, <i>Hahella chejuensis</i>, <i>Aeromonas hydrophila</i></p>

図 2-7. 各種バクテリアにおける *ccdA-ccdR* のゲノムコンテキスト比較  
各グループには、代表的なバクテリア例を示した。

#### 2-4-2. システインの分解を主要な機能とする CcdA

1-1-2 項に記したように、これまでに知られている CD (*E. coli*) は CD 活性以外の酵素活性を保持しており、そちらが主要な生理機能と関連していると考えられる。一方、今回の研究を通じて明らかとなった *P. ananantis* が保有する CcdA は、システインの分解が主な生理機能と考えられる。その理由として以下の 2 点が挙げられる。1 つ目は *P. ananantis* が示すシステイン耐性のレベルの高さであり、*E. coli* と比較して高いシステイン耐性を示すことが予備的な検討で明らかとなっている(定量的な検討は第 4 章にて実施した。図 4-1 参照)。ここでは CcdA の存在が大きく寄与していることが推察される。*ccdA* 欠損によりその耐性が失われることは、この仮説を裏付けていると言える。2 つ目はシステインへの応答が極めて速く、大きいことが挙げられる。

以上のように、CcdA はシステイン耐性という生理機能と直接関連している点で明らかに他の CD とは異なった性質を有しており、システインの分解が主な機能と推察される。

#### 2-4-3. フィードバック阻害耐性型 SAT のタイプとシステイン生産への影響

SAT はシステイン生合成における最終ステップの反応を担う酵素であり、また目的産物であるシステインによりフィードバック阻害を受けることから、システインの生産菌育種において SAT の制御は非常に重要であると考えられる。

今回の検討では結果的に 2 種類の変異型 SAT を使用した。一つ目は V95R と D96P という 2 つのアミノ酸変異を伴う *E. coli* 由来の変異型 *cysE* 遺伝子 *cysE5* (6) であり、二つ目は T167A のアミノ酸変異を伴う、同じく *E. coli* 由来の変異型 *cysE* 遺伝子 *cysEX* (7) である。今回の検討ではシステイン生産モデル株として *ccdA* や *cefA*、*cefB* の効果を検証するために区別なく用いたが、二種の SAT 間で菌体生育に対して異なる表現型が認められた。*cysEX* を導入した株では、*cysE5* を導入した株と比較して著しく OD<sub>600</sub> の値が低く(OD<sub>600</sub> の値は表 2-9、2-10 を参照)、生育に悪影響を及ぼしている可能性が示唆された。*E. coli* を生産宿主とするこれまでの研究では、*cysEX* が広く用いられてきたが (22, 53, 64)、今回の検討で見出された生育差や、システインによる阻害から見る *in vitro* の酵素特性の結果 (6, 7) より、システイン生産への応用に関しては *cysE5* の方が *cysEX* に対して優れていると考えられた。なお以上の考察より、以降の検討では変異型の SAT として *cysE5* を用いている。

#### 2-4-4. システイン排出ポンプが持つ安全弁としての機能

*E. coli* やそれに類するバクテリアでは、システインを排出することが可能な数種のポンプを備えていることが知られている。しかしながら、それらの排出ポンプにはシステイン以外にも基質が知られており、それらの排出能力が重要な生理機能とリンクしていることが既に知られている(緒論 1-1-2 項参照)。実際、システインに対して応答するという報告は、これまでのところなされていない。一方、過剰のシステインに対して迅速に反応し、システイン耐性に寄与する *cefA-cefR* システムは、バクテリアにおいて初めて見いだされた、システインに特化した制御機構であると推察される。このように細胞毒性を有するシステインに特化し、迅速に反応する *cefA-cefR* システムは、分解酵素と共



に細胞内システイン濃度が上昇した際の安全弁として機能していると考えられる。

こうした毒性を持った物質を細胞の外に排出するという行為は、最も簡便な方法の一つである。しかし一方で、“取り込み・排出”というサイクルを無駄に回し、エネルギー的な不利益を引き起こす可能性も秘めている (68)。しかし、システインに関してはこのようなサイクルは発生しないと考えられる。システインは細胞質のような還元環境下では還元体として存在するが、ペリプラズムのような酸化環境下では酸化体(シスチン)として存在する (22)。 *E. coli* およびその関連微生物 (*P. ananatis* 含む) では、そのシスチンの取り込みに YdjN および FliY-YecSC という二つのトランスポーターが介在していることが知られている (60)。両システムともに、硫酸代謝の転写制御を司り、細胞内システインが枯渇した際にシステイン生産に関与する多くの遺伝子を活性化させる転写調節因子 CysB (27, 28) の支配下に置かれている (69)。つまり、システインの過剰蓄積によって排出ポンプが活性化されシステインが細胞外に排出されたとしても、CysB による取り込みが作動しない限りは、“取り込み・排出”というサイクルを無駄に回すことはないと考えられる。さらに、外膜のポーリンが細胞質とペリプラズム間の空転サイクルを防ぐ上で重要な役割を果たしていると考えられる。外膜のポーリンは、ペリプラズムに蓄積するシステインやシスチンを菌体外に排出する経路として機能することで、ペリプラズム内のシステインおよび関連物質の濃度上昇を抑制していると考えられる。実際、外膜チャネルの TolC はシステイン関連物質をペリプラズムから排出することでシステイン耐性に寄与していることが知られている (53)。

システイン耐性に大きく影響を及ぼす CefA と CefB の両排出ポンプであるが、システイン発酵への活用に限定されるかという点、そうでもない。一般に、バクテリアの持つアミノ酸排出ポンプの基質特異性は高くはないことが知られている (18, 21)。CefA や CefB も例外ではなく、様々なアミノ酸を認識し、排出することがプレリミナリーな検討より明らかとなっており、本性質より様々なアミノ酸の発酵生産への応用が期待され、検討が進められている (65)。

#### 2-4-5. まとめ

本研究にて見いだされた知見を含め、*P. ananatis* が持つシステイン代謝の制御機構を図 2-8 にまとめた。*E. coli* を用いた研究を通じ、システイン生合成経路の調節に関与する因子として、SAT や 3-PGDH のフィードバック制御 (5, 6)、転写調節因子である CysB (27-29) が知られているが、*P. ananatis* にも高い相同性を持ったそれらのオースログが存在し、同様の制御を受けることを確認している(データ示さず)。これら生合成経路の調節に関与する因子に加え、*P. ananatis* はシステインの細胞毒性に対して迅速かつ効果的に防御する新たな機構を備えていることが本研究を通じて明らかとなった。CcdA や CefA (恐らく CefB も) は、細胞内外のシステイン濃度が急激に変化するような環境下に対応するべく“安全弁”のような機能を保持していることが推察される。バクテリアにおいて、システインは生理的に重要な役割を担う一方、有害性という側面も持っている。その二面性により、バクテリアはそれぞれの種において、複雑で精巧な制御メカニズムを独自に進化させ、獲得してきたのではないかと推察される。

本研究を通じ、分解を担う CD の機能を抑えること、排出ポンプを強化することはシステインの発

酵生産を達成する上で重要な要素であることを示してきたが、これは *P. ananatis* をはじめとする関連微生物において、システインおよびその類縁体を発酵にて生産する場合に共通する知見であると考えられる。一方で *P. ananatis* は、その有用性から発酵による工業生産において重要な役割を担ってきた歴史があること (38, 70) に加え、分解活性のほとんどが今回同定された CcdA 一つに依存している極めてシンプルなシステムとなっていること、システインの排出に特化したポンプシステムを有することなどから、システイン発酵およびその工業化を成立させる上で効率的で有用な宿主として期待される。

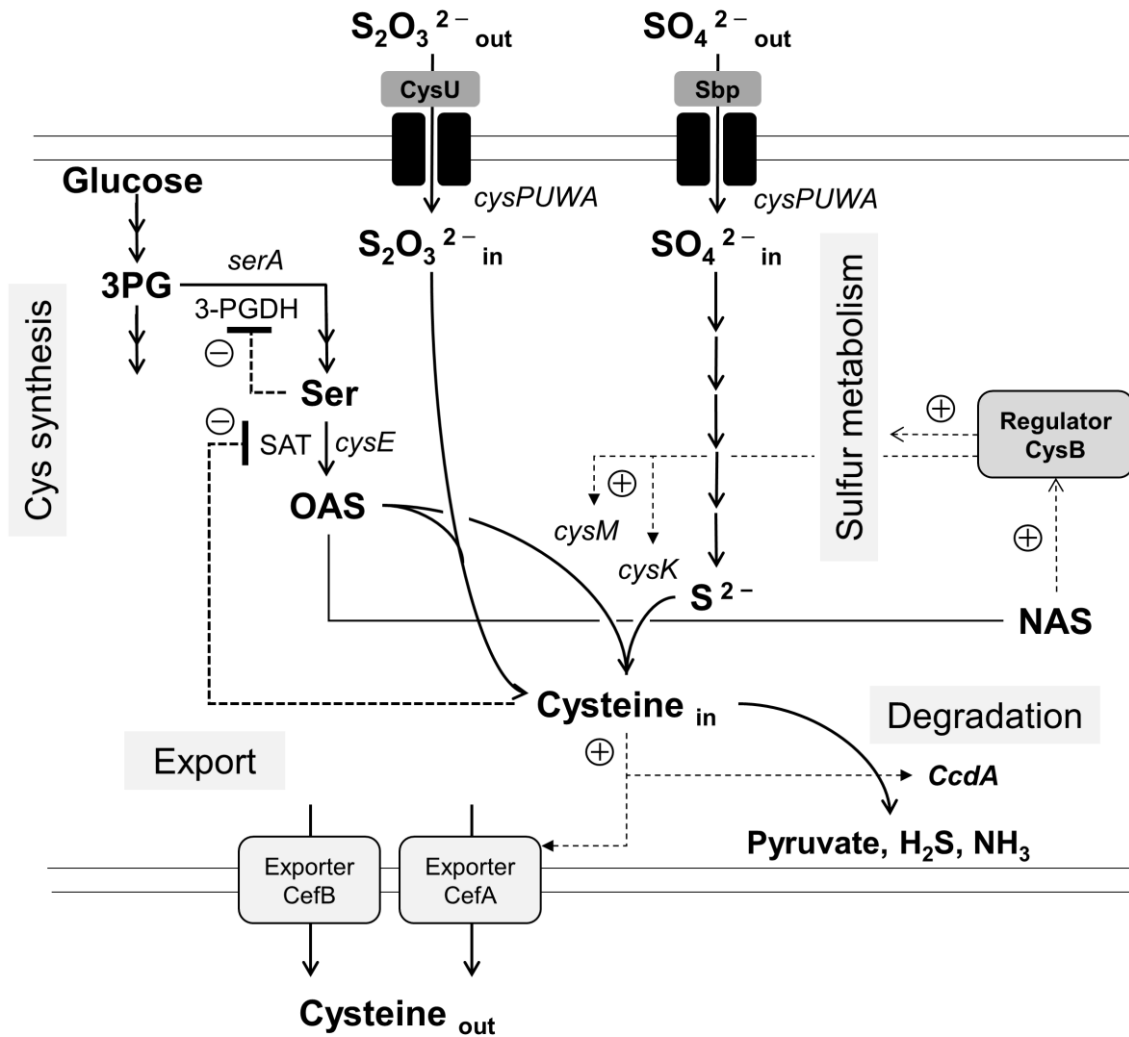


図 2-8. *P. ananatis* において推定される細胞内システインレベル制御メカニズム

点線は転写レベルや酵素的な制御を示す。NAS; N-アセチルセリン、OAS; O-アセチルセリン、3PG; D-3-ホスホグリセリン酸、3-PGDH; 3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ、Ser; セリン、SAT; セリンアセチルトランスフェラーゼ。

## 第3章 *Escherichia coli* におけるシステイン耐性に関与する因子の同定・解析、並びにシステイン発酵への応用

### 3-1. 緒論

システインは産業上重要なアミノ酸の一つであるが、微生物を用いた効率的な発酵生産方法の確立という点では未だ発展途上にある。システインは高濃度になるとバクテリアにとって毒性を発揮することから、その細胞内濃度は複数の調節機構により厳密に制御されている。その一つがシステインの分解機構であり、CD やシステインデスルフィダーゼ(下記参照)がその役割を担っている。第2章で明らかとなったように、*P. ananatis* では CcdA が CD として中心的な役割を担っていると考えられるが、*E. coli* ではシステイン分解活性を保有する酵素が数多く知られているものの、分解を通じた解毒作用の生理的な役割や、その特異性については明確になっていない。システインの発酵生産性を向上させるためには、厳密な制御システムを理解し、緩和していくことが必要である。つまり、主要なシステイン分解酵素を同定し、調節することは、システイン生産株の構築を促進する上で重要な位置を占めるものと考えられる。

本章では第2章で採用したスクリーニングと同様の手法を用い、*E. coli* のゲノムからシステイン耐性を付与する因子のスクリーニングを行った。その結果、*yhaM* というシステインを硫化物とピルビン酸、アンモニアに分解するシステインデスルフィダーゼをコードする遺伝子を同定した。細胞毒性を示すシステイン濃度下における *yhaM* 欠損株の生育挙動、並びに転写レベルでのシステインへの応答性などの表現型より、*yhaM* はシステイン誘導型のシステイン分解酵素をコードする遺伝子であり、*E. coli* においてシステインの有害性に対処する生理機能を有しているものと推察された。それが故に、*yhaM* は *E. coli* を宿主とするシステイン発酵生産において、その生産性を改善する有力なターゲットになるものと考え、本研究にて検証した。

## **3-2. 実験方法**

### **3-2-1. 使用菌株、プラスミドおよび生育条件**

本検討に用いた菌株およびプラスミドを表 3-1 に示した。すべての菌株は 37°C にて Luria-Bertani (LB) 培地、M9 最少培地 (49)、もしくは 発酵生産培地 (2-2-2 項参照)を用いて培養した。培養する菌株に応じて、カナマイシンは 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ 、クロラムフェニコールは 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  の濃度で適宜添加した。*E. coli* の遺伝子欠損は 2-2-1 項の記載に従い、Datsenko および Wanner によって開発された  $\lambda$ RED システム (45) により行った。*yhaM* および *eamA* の発現プラスミドは、マルチコピーベクター pSTV29 もしくは pACYC177 をベースに作製した。*yhaM*、*eamA* の PCR 産物を BamHI (プライマーの 5'および 3'末端に認識配列を付与している)にて酵素消化して pSTV29 に導入、pSTV-*yhaM*7 および pSTV-*ydeD*5 を得た。同様に酵素消化した PCR 産物を pACYC177 に導入し、pACYC-*yhaM*1 を得た。構築に使用したプライマーを表 3-2 に記載した。

表 3-1. 使用菌株およびプラスミド<sup>a</sup>

菌株・プラスミド	説明	参照
菌株		
MG1655	野生型 <i>Escherichia coli</i> MG1655 (ATCC 47076)	ATCC
MG1655ΔyhaM	MG1655ΔyhaM::Km <sup>R</sup>	本章
CYS 4-1	pMIV-cysE5、pACYC177 を保持する MG1655 株	本章
CYS 4-2	pMIV-cysE5、pACYC-yhaM1 を保持する MG1655 株	本章
CYS 5-1	pMIV-cysE5 を保持する MG1655 株	本章
CYS 5-2	pMIV-cysE5 を保持する MG1655ΔyhaM 株	本章
プラスミド		
pSTV29	クローニングベクター、p15a ori; Cm <sup>R</sup>	Takara Bio
pSTV-eamA5	pSTV29; <i>eamA</i> ( <i>E. coli</i> ) を含む 1.4 kb のフラグメント <sup>b</sup>	本章
pSTV-yhaM7	pSTV29; <i>yhaM</i> ( <i>E. coli</i> ) を含む 1.3 kb のフラグメント <sup>b</sup>	本章
pACYC177	クローニングベクター、p15a ori; Km <sup>R</sup>	Nippon Gene
pACYC-yhaM1	pACYC177; <i>yhaM</i> ( <i>E. coli</i> ) を含む 1.3 kb のフラグメント <sup>b</sup> ; Km <sup>R</sup>	本章
pMIV-cysE5	<i>ompC</i> プロモーター、 <i>cysE5</i> ( <i>E. coli</i> )、SC101 ori; Cm <sup>R</sup>	(71)

<sup>a</sup>Km<sup>R</sup>、Cm<sup>R</sup>、それぞれ、カナマイシン、クロラムフェニコールへの耐性遺伝子; ATCC、American type culture collection; CDS、コーディング領域。

<sup>b</sup>CDS の上流約 300 bp、下流約 200 bp を含むフラグメント。

表 3-2. 使用オリゴ核酸配列一覧

使用目的	配列
<i>yhaM</i> 欠損株作成	5'-ATGTTTGATTTCGACTTTAAATCCGTTATGGCAGCGTTACAT CCTCGCCGTTGAAGCCTGCTTTTTTATACTAAGTTGGCA-3' 5'-TTATCTGGCCTTGCTCGCCATAATCTCGATAATCTGCCGAT CCGTTTGCTCGCTCAAGTTAGTATAAAAAAGCTGAACGA-3'
<i>eamA</i> クローニング	5'-CGCGGATCCAATGGTCATAAATGGCAGCGTAGCGC-3' 5'-CGCGGATCCGCAGGGCGTTGCGGAACAAAC-3'
<i>yhaM</i> クローニング	5'-CGCGGATCCAAGATGCCTGCCGAGAAGATTAACG-3' 5'-CGCGGATCCGAGCGAGCTGGAAGCTATCG-3'
Realtime PCR: <i>yhaM</i>	5'-CTCGATTCCGCGAAGCTAAA-3' 5'-CCCCCACTTACCGCTCAA-3'
Realtime PCR: <i>yhaO</i>	5'-GCCATTATTACGCTGCCGTTT-3' 5'-CCATCGGACTTAACGTCTGGAT-3'
Realtime PCR: <i>metC</i>	5'-AAGCCGCCACCAAATATCTG-3' 5'-ACACGGCAGTGCCAATCA-3'

### 3-2-2. システイン耐性遺伝子のスクリーニング

*E. coli* 野生株 MG1655 のゲノム DNA を *Sau*3AI を用いて酵素消化し、約 10 kb の断片を回収した。回収した断片を pSTV29 の *Bam*HI サイトに挿入し、ゲノムライブラリーを作製した。ゲノムライブラリーを *E. coli* MG1655 株にエレクトロポレーションにて導入し、2–4 mM のシステインを含有する M9 最少寒天培地にて 2 日間、37°C でインキュベーションした。こうして得られたシステイン耐性クローンを単離し、保持しているプラスミドから塩基配列を解読することで挿入されているゲノム領域を特定した。取得されたゲノムの重複領域の情報などからシステイン耐性に関与する候補遺伝子の絞り込みを行い、遺伝子を同定した。

### 3-2-3. 最少培地における生育を指標としたシステイン耐性試験

寒天プレートでの生育試験は以下の方法にて行った。M9 最少寒天培地(硫黄源として  $\text{MgSO}_4$  を含む)上にて一晩培養して得られた菌体を、4 mM のシステインを添加した、それ以外の硫黄源を含まない M9 最少寒天培地( $\text{MgSO}_4$  の代わりに  $\text{MgCl}_2$  を添加)に塗布し、37°C で 2 日間培養し、生育を観察した。

液体培地での生育試験は以下の方法にて行った。3 ml の M9 最少培地を張り込んだ試験管を用い、一晩振とう培養して得られた前培養液を 1:100 倍希釈となるよう新たな 3 ml の M9 最少培地に植え継ぎ、対数増殖期まで培養した。本培養液を波長 600 nm における光学密度 ( $\text{OD}_{600}$ ) が 0.005 となるように菌体量を揃え、無添加もしくは 100  $\mu\text{M}$  のシステインを添加した 4 ml の M9 最少培地に植菌し TN-1506 incubator (アドバンテック東洋)を用いて、生育 ( $\text{OD}_{600}$ ) を自動的に計測した。

### 3-2-4. 定量的 real-time PCR

一晩 M9 最少培地にて振とう培養して得られた *E. coli* MG1655 の前培養液を、M9 最少培地 25 ml を新たに張り込んだ坂口フラスコに 1:100 倍希釈となるように植え継ぎ、37°C にて約 7 時間程度、 $\text{OD}_{600}$  が約 0.3 に到達するまで振とう培養した。得られた培養液に最終濃度 0 mM (無添加) もしくは 1 mM となるようにシステインを添加し、システイン添加前と添加 5 分後、20 分後にサンプリングを行った。この後の操作は 2-2-7 項に従った。増幅に用いたプライマーは表 3-2 に記載した。

なお、各サンプルの 16S RNA (*rrnB*) についても定量を行い、16S RNA の定量値を用いて RNA 量による標準化を行った。

### 3-2-5. システイン発酵

第 2 章 (2-2-9 項) と同様の方法にて行った。なお本章では、初発グルコース濃度は 40  $\text{g l}^{-1}$  に変更した。



### 3-3. 結果

#### 3-3-1. システイン耐性に関与する遺伝子のスクリーニング

第2章ではシステイン耐性を指標とするスクリーニング系を用い、*P. ananatis* のゲノム DNA ライブラリーからシステインの分解因子 (*ccdA*) およびシステインの排出ポンプ (*cefA*, *cefB*) を同定した。これらの因子は、システイン発酵への効果も認められていることから、本スクリーニング方法はシステイン代謝・発酵生産に重要な因子を発掘するのに適した系であると考えられた。前述のように(緒論 1-1-2 項参照)、*E. coli* では主たる CD や排出ポンプが未だ明確とされていない。そのため、*E. coli* のゲノム DNA ライブラリーを用いた同様のスクリーニングから、これらシステイン耐性に関与する因子が明らかとなることを期待した。

*P. ananatis* のゲノムライブラリーからのスクリーニングと同様に、*E. coli* のゲノム DNA ライブラリーを作製し、野生型 *E. coli* MG1655 株に導入、2-4 mM のシステインを含有する M9 最少培地プレート上で 2 日間生育させた。生育したクローンより、保持するプラスミド DNA を抽出、配列を解読し、重複領域の情報からシステイン耐性を付与する遺伝子を同定した。

その結果、*E. coli* のゲノム DNA ライブラリーからは二つの遺伝子座が見い出された。一つ目はシステイン/シスチンシャトルシステムという、活性酸素から細胞を防御するシステムに関与する *eamA* というシステイン排出担体であった (17, 22)。もう一つは、*Methanocaldococcus jannaschii* の *cdsB* というシステインデスルフィダーゼをコードし、システインの分解に関与するとされる遺伝子 (72) と 25% の相同性を持つ *yhaM* が取得された。なおシステインデスルフィダーゼは、CD と同様の反応 ( $\text{Cysteine} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Pyruvate} + \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{S}$ ) を示すが、PLP を補酵素として必要としない 4Fe-4S クラスター酵素として分類されている。

これらの遺伝子がシステイン耐性に関与する因子であることを確認するため、*E. coli* のゲノム DNA より *eamA*, *yhaM* の上流 300 bp および下流 200 bp を含む領域をクローニングし、同領域を導入した株を用いて上記スクリーニング条件にて再現性を確認した。その結果、それぞれの遺伝子を導入した株において、システインの耐性の向上が改めて確認された(図 3-1)。*eamA* は、システインの排出ポンプとして研究が進んでおり、*E. coli* を宿主とするシステイン生産において中心的な役割を担っていることが知られている (17)。つまり、*cefA*, *cefB* と同様に、システインの排出によりシステイン耐性を獲得していることが予想される。一方、*yhaM* は遺伝子配列情報から、システインの分解に関与する可能性が考えられるが、現時点では過剰発現によりシステイン耐性が向上することのみが明らかとなっている。そこで本章では、*yhaM* に関してさらなる解析を行い、システイン生産への応用可能性を探索することとした。

#### 3-3-2 *yhaM* のシステイン耐性への影響

もし *yhaM* がシステイン分解に関与する遺伝子であれば、欠損によりシステイン耐性が低下することが予想される。そこで、M9 最少培地において *E. coli* 野生株 MG1655 が生育阻害を示すシステイン濃度 (100  $\mu\text{M}$ ) 条件下における *yhaM* 過剰発現株・欠損株の生育を観察した。

その結果、野生株では生育が阻害され、増殖するまでに大きなラグが認められるが、*yhaM* を過

剰発現させた株では増殖するまでに必要な時間が短縮した(図 3-2)。一方、*yhaM* 欠損株では逆にラグが大きくなることが明らかとなり、システイン耐性が低下していることが確認された。これらの挙動より、**YhaM** はシステインの分解を通じてシステイン耐性を示す可能性が示唆された。

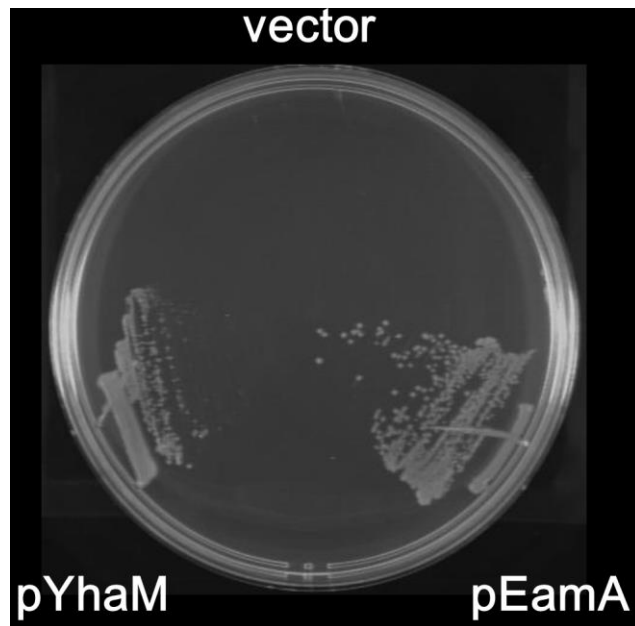


図 3-1. システイン耐性に対する *yhaM* の寄与

空ベクター (pSTV29) および *eamA*、*yham* を搭載したベクター (pSTV-*eamA5*、pSTV-*yhaM7*) を保持した *E. coli* MG1655 を 4 mM のシステインを含む M9 最少寒天培地上に塗布し、37°C にて 2 日間培養した。

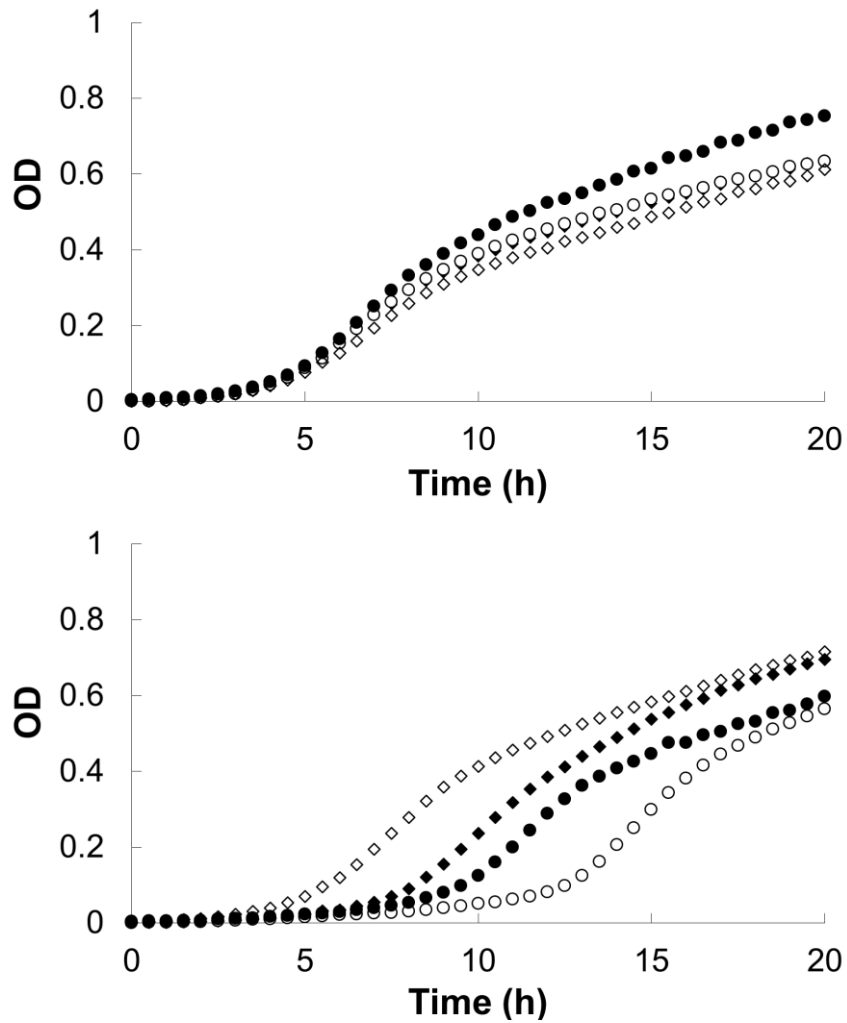


図 3-2. 生育阻害を示すシステイン濃度における *yhaM* 欠損および過剰発現の効果  
 M9 最少培地中にシステイン無添加(上部)および 100  $\mu$ M となるよう添加(下部)した条件における、  
 野生株 *E. coli* MG1655 (◆)、MG1655  $\Delta$  *yhaM* (○)、MG1655/vector (pSTV29) (●)、  
 MG1655/pYhaM (pSTV-*yhaM*7) (◇)の生育曲線。

### 3-3-3. システインによる *yhaM* の誘導

*P. ananatis* ではシステインに応答し、システイン耐性に強く関与する CD である CcdA が細胞内システイン濃度の制御に密接に関与していることが明らかとなった(第 2 章参照)。一方、*E. coli* では複数の CD 活性を示す酵素が知られているが、何れもシステインに対する明確な応答、並びに耐性と関与する明確な生理機能は明らかとなっていない。本研究のスクリーニングにて、数ある分解酵素の中から唯一 YhaM が取得されたことを受け、同因子が *P. ananatis* の CcdA に相当する機能を有しているか、検討した。

ここでは第 2 章で採用した手法と同様に、システインショック(システイン添加)後の転写誘導について定量的 PCR を用いて解析を行った。なお、本検討では *yhaM* と同時に *yhaO* の mRNA レベルの経時変化も同時に検証した。*yhaO* は配列情報より複数膜貫通型のタンパクであり、*yhaM* の上流に位置していることからオペロンを形成していると推察され (regulon DB; <http://regulondb.ccg.unam.mx/>)、システインの輸送を担っている可能性も考えられた。また、システインによる誘導が生じないことが明らかとなっている CD をコードする *E. coli* 由来の *metC* を陰性対照に用いた。

システインショック後の、*yhaM*、*yhaO*、*metC* の mRNA 経時変化を図 3-3 に示した。その結果、*yhaM* や *yhaO* はシステインショック後、速やかに誘導されることが明らかとなった。その応答は 5 分以内と非常に早く、変動幅も非常に大きい(*yhaM* は 80 倍、*yhaO* は 100 倍)ことから、*yhaM*(および *yhaO*) は *P. ananatis* の *ccdA* のように、システインに直接応答する因子と推察された(誘導の速度や変動幅に関する議論は、考察 3-4 項を参照)。本結果は YhaM がシステイン分解に関与し、*E. coli* におけるシステインの解毒作用に寄与しているという仮説を裏付けるものであり、さらに、これまでシステインに対して明確に応答する CD が認められなかった *E. coli* において、専らシステインの分解に作用する因子であるものと考えられた。(本結果や過去の文献 (72, 73) から推論される YhaM の機能に関する議論は考察 3-4 項を参照)。

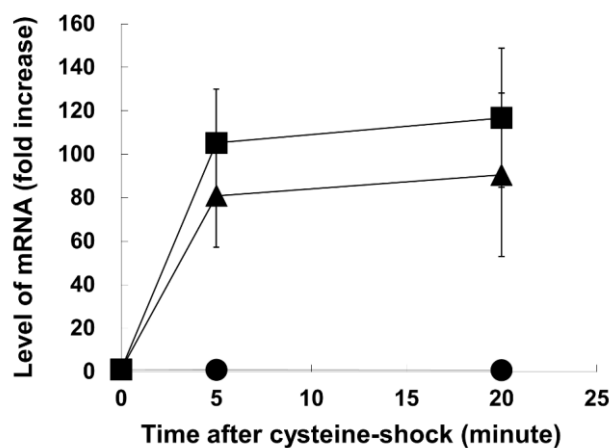


図 3-3. システインによる *yhaM* および *yhaO* の転写誘導

システイン添加(システインショック)後の *yhaM*(▲)、*yhaO*(■)、*metC*(●)の mRNA レベルの推移。mRNA レベルはシステイン添加前の mRNA 量に対する相対値で示した。値は独立する 3 連の実験の平均値を、エラーバーは標準偏差を示す。

### 3-3-4. YhaM のシステイン生産への応用

これまでの検討を通じ、YhaM は *E. coli* においてシステインによる誘導を介し、細胞内システイン濃度の上昇に対して第一に機能する分解酵素である可能性が推察された。つまり、遺伝子工学技術を用いた *E. coli* システイン生産菌構築を目指すにあたり、重要な因子であると考えられる。その可能性を検討すべく、*E. coli* MG1655 を基本宿主とするシステイン生産モデル菌株を用い、*yhaM* の過剰発現、並びに欠損の効果をシステインの発酵生産量を指標に確認した。

モデル菌株は、野生株にフィードバック阻害耐性型 SAT を導入した株を採用した。本モデル株は、細胞内にて生合成されたシステインの細胞外への排出が律速段階となっており、菌体内に滞留したシステインは分解酵素により分解されることが推察される。従って、システイン生産と分解活性の効果を調べる系として適していると考えられた。実際、*P. ananatis* を宿主とするシステイン生産モデル菌 (*E. coli* のフィードバック阻害耐性型 SAT を搭載) においても、*P. ananatis* にて主として機能する CD である CcdA を欠損することにより、システイン生産量が増加することが確認されている (2-3-6 項を参照)。

野生型 *E. coli* MG1655 に *E. coli* 由来のフィードバック阻害耐性型 SAT をコードする *cysE5* 遺伝子 (6) を搭載したプラスミドを導入し、得られた菌株を用いて YhaM のシステイン生産に及ぼす効果を検証した。表 3-3 には YhaM をマルチコピープラスミドにて過剰発現させた際のシステイン発酵生産量を、表 3-4 には *yhaM* を欠損した際の生産量を示した。YhaM を過剰発現させた際にはシステインの生産量は大幅に減少し (表 3-3)、*yhaM* 欠損株ではシステイン生産量は大きく上昇した (表 3-4)。以上の結果より、システイン生産において *yhaM* はネガティブな因子であり、欠損により生産能が向上することが明らかとなった。

上述のように本モデル株を用いたシステイン生産の条件下では、菌体内にシステインが滞留していると予想されるため、本条件下では *yhaM* はシステインによる誘導を受けている状態であると考えられる。実際、*yhaM* の欠損によりシステインの生産量が上昇していることから、*yhaM* 存在下ではシステインの分解により生産量が低下していることが予想される。すなわち、*yhaM* がシステインの分解に関与するというこれまでの仮説と矛盾しない結果が得られた。また、システインの発酵生産において重要な育種のターゲットになり得ることが明らかとなった。

表 3-3. システイン生産における *yhaM* 過剰発現の影響<sup>a</sup>

株	導入遺伝子 <sup>b</sup>	システイン (mg l <sup>-1</sup> )	収率 (%)	OD <sub>660</sub>
CYS 4-1	<i>cysE*</i> , vector	74.6 ± 7.0	0.187 ± 0.018	21.7 ± 0.8
CYS 4-2	<i>cysE*</i> , <i>yhaM</i>	14.9 ± 1.1	0.037 ± 0.003	22.0 ± 0.8

<sup>a</sup> 値は独立する 5 連の実験の平均値 $\pm$ 標準偏差を示した。培養中のプラスミド脱落を防ぐため、20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  のカナマイシンおよび、25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  のクロラムフェニコールを培地中に添加した。培養は培養開始 21–24 時間後、生産培地中のグルコース(40 g l<sup>-1</sup>)を消費した時点で終了した。

<sup>b</sup> フィードバック阻害耐性型 *cysE*(*cysE\**)として、*cysE5* (*E. coli* 由来)を用いた。

表 3-4. システイン生産における *yhaM* 欠損の影響<sup>a</sup>

株	遺伝子型/導入遺伝子 <sup>b</sup>	システイン (mg l <sup>-1</sup> )	収率 (%)	OD <sub>660</sub>
CYS 5-1	WT, <i>cysE*</i>	64.6 ± 4.5	0.164 ± 0.011	28.6 ± 0.8
CYS 5-2	<i>yhaM::kan</i> , <i>cysE*</i>	316.2 ± 74.4	0.810 ± 0.195	29.4 ± 0.9

<sup>a</sup> 値は独立する 4 連の実験の平均値 $\pm$ 標準偏差を示した。培養中のプラスミド脱落を防ぐため、25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  のクロラムフェニコールを培地中に添加した。培養は培養開始 15–17 時間後、生産培地中のグルコースを 95% 以上 (>38 g l<sup>-1</sup>)消費した時点で終了した。

<sup>b</sup> フィードバック阻害耐性型 *cysE*(*cysE\**)として、*cysE5* (*E. coli* 由来)を用いた。



## 3-4. 考察

### 3-4-1. YhaM とシステイン耐性の関連

YhaM は、はじめに *M. jannaschii* においてシステインデスルフィダーゼとして発見された (72)。Shimada らは *E. coli* において YhaM を見だし、システインにより誘導される硫化水素形成型のシステイン分解酵素で、システインの解毒作用に関与していることを明らかとしていた (73)。これらの知見は、「YhaM は、*E. coli* ではシステイン分解において主要な酵素として関与し、システインの発酵生産を確立するにあたり、重要な因子の一つである(図 3-4)」という、本研究を通じて得られた結論を支持するものである。

*E. coli* では複数の CD が存在するが、それらの多くはシステイン分解とは異なる酵素活性を介した、他の重要な生理機能を有していることが知られている。しかしながら、これら主たる生理機能に加え、システインの分解という機能を持つことによどのような生理的意義があるのかは明らかとなっていない。一方、*yhaM* は本研究にて得られた結果より、「専らシステインの分解を担い、*E. coli* では主に働く分解酵素である」と推察できる。その第 1 の根拠として、*yhaM* がシステインにより非常に速やかに誘導された、という結果が挙げられる。*E. coli* ではこれまでに *tnaA* がシステインに応答して発現誘導されることが知られていたが (9)、あくまで培養中に長時間かけて発現量が上昇しているに過ぎず、システインショックによる速やかな応答は *tnaA* では認められていない(データ示さず)。つまり、*tnaA* はシステイン刺激に直接応答する因子であるとは考えにくい。一方、本研究を通じて *yhaM* のシステインに対する応答は非常に速やかで、かつ大規模な動態(mRNA レベルで約 80 倍に増加する)を示すことが明らかとなり、*yhaM* がシステインにより直接誘導され、細胞内システイン濃度上昇を速やかに抑制する因子であると推察された。第 2 の根拠として、*yhaM* の欠損や過剰発現により、細胞のシステイン生産能が劇的に変化した、という結果が挙げられる。細胞内システイン濃度が高まるシステイン生産モデル株において、YhaM による分解の影響が明確に示されている。そして第 3 の根拠は、今回の *E. coli* のゲノムライブラリーからのスクリーニングでは YhaM を除く他の既知 CD は取得されなかったという結果である。外界のシステイン濃度上昇を感知し、細胞内の恒常性を維持する機能として分解酵素では YhaM のみが検出されたことは、*E. coli* において主に働く分解酵素であると考ええるに十分な根拠と考えられる。実際、第 2 章にて同様のスクリーニング手法にて得られた分解因子である *ccdA* は *P. ananantis* において主要な CD として機能しており、本仮説を支持するものと考えられる。

### 3-4-2. システイン排出ポンプ EamA

EamA は *E. coli* においてシステインやシステイン生合成前駆体である OAS の排出を担うポンプとして知られている (17)。システインを細胞外に排出する機能を有するトランスポーターは EamA 以外にも EamB や LeuE、CydDC、Bcr といったものが知られている (18-21) が、その中で過剰発現した際にシステイン耐性に関与する排出ポンプとして今回同定されたのは EamA のみであった。つまり、*E. coli* にて同定された数種の排出ポンプの中で EamA は最も効果的に排出をすることが可能であると考えられる(図 3-4)。しかしながら、EamA は CefA のようにシステインによって誘導さ

れるという知見は得られておらず、むしろ過酸化水素によって強く誘導されることから、ROS (活性酸素種)から細胞を守るこそが主たる生理的な機能であると考えられている (22)。細胞内のシステイン濃度の恒常性維持を主たる機能としていないものの、システインを排出するという機能としてはこれまでに同定された他の排出ポンプと比較して、最も優れているものと推察される。以上より、発酵生産に応用する上で育種ターゲットとして重要な因子であると考えられる。実際に EamA はシステインの発酵生産に活用された例はこれまでにいくつか報告されている (17, 60, 61) ことに加え、本研究においても効果が確認されており(表 2-9)、システインの高生産株育種に向け CefA、CefB とともに活用が期待される。

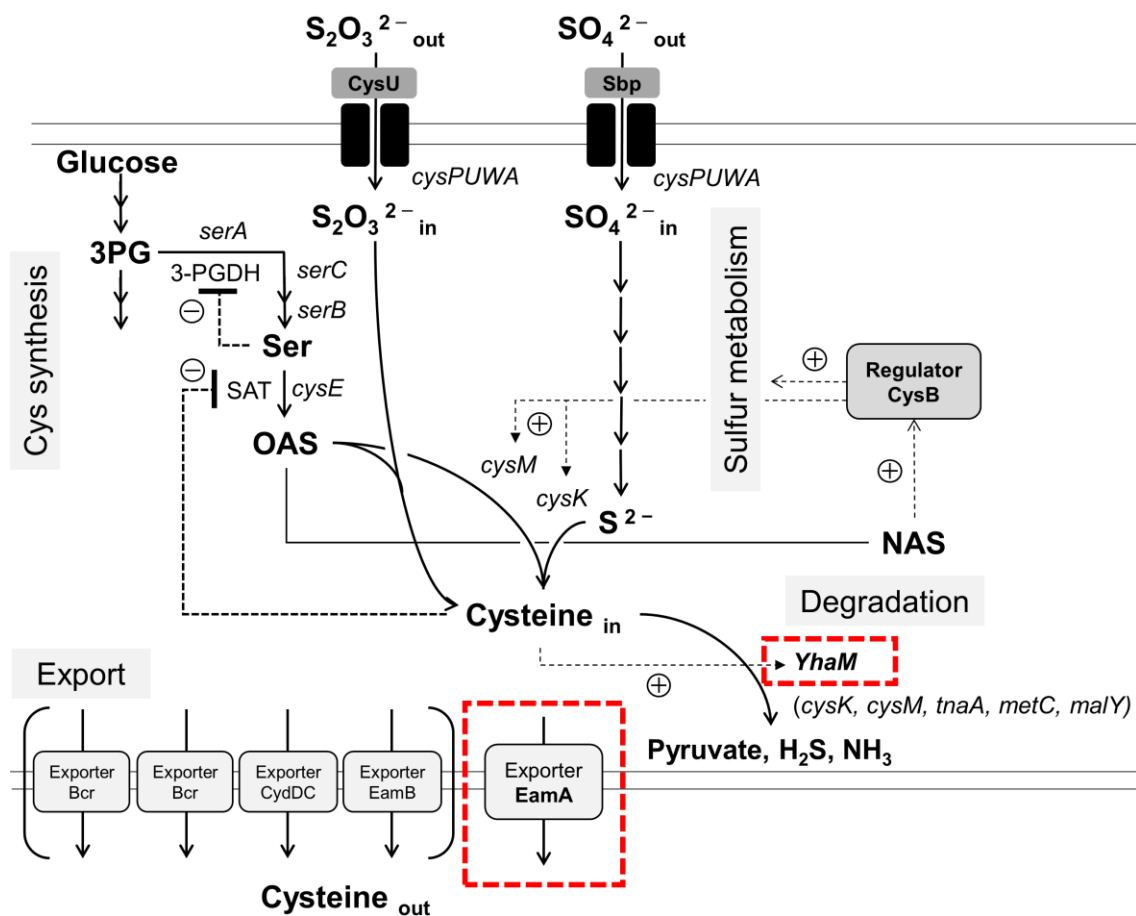


図 3-4. *E. coli* における細胞内システインレベル制御メカニズム

点線は転写レベルや酵素的な制御を、赤枠点線内は本研究により明らかとなった部分を示す。  
 NAS; *N*-アセチルセリン、OAS; *O*-アセチルセリン、3PG; *D*-3-ホスホグリセリン酸、3-PGDH; 3-ホスホ  
 グリセリン酸デヒドロゲナーゼ、Ser; セリン、SAT; セリンアセチルトランスフェラーゼ。

### 3-4-3. 各種バクテリアが備えるシステイン分解システム

システインによる YhaM の誘導は、転写調節因子である YbaO を介して行われることが最近の研究で明らかとなった (73)。*P. ananantis* の CD である CcdA、およびその *Salmonella enterica* オースログである CdsH もまたシステインにより誘導されるが、これらの CD も YbaO の *P. ananantis* オースログである CcdR、およびその *S. enterica* オースログである DecR により転写制御される (66)。つまり、同じ解毒作用を有するこれら二つのシステイン分解システム (YhaM および CcdA/CdsH) が共通の転写制御因子 (YbaO/CcdR/DecR) を有していることとなる。しかしながら、これら分解酵素間のアミノ酸配列の相同性は低く、また反応機構が異なるため酵素学的には異なる酵素として分類されている (CcdA/CdsH はシステインデスルフィドラーゼ (CD)、YhaM はシステインデスルフィダーゼ)。*P. ananantis* (および *S. enterica*) では、ゲノム上にて *ccdA* は *ccdR* に隣接する形に配備されており、遺伝子クラスターを形成している。一方で *E. coli* では、*ybaO* に隣接する部位から *ccdA* が消失しているが、その代わり *yhaOM* オペロンがゲノム上の異なる場所に配置されている。バクテリアにおいて知られている二つの異なるシステイン分解機構が、一つの共通した転写調節因子 (*ccdR/DecR/YbaO*) によって調節されていると予想された。そこで、これらのシステムが各種バクテリア間にてどのように保存されているのかを調査した (図 3-5 a: 関連遺伝子群)。

YhaM-YhaO は限られたバクテリア種において保持されており、数種の  $\gamma$ -Proteobacteria、特に腸内細菌科バクテリアに保存されていた。興味深いことに、同一の種においても保存状況は異なっており、例えば *E. coli* では K-12 株や O157:H1 は *yhaO* と *yhaM* の両遺伝子を保持するが、CFT073 は *yhaM* のみ保持している。同様に、*S. enterica* CT18 は *yhaOM* が存在する一方、LT2 は *yhaM* のみ保持している。さらには、CcdR-CcdA/DecR-CdsH システムも主には  $\gamma$ -Proteobacteria に、また一部の腸内細菌科に限定されている。

腸内細菌科バクテリアにおけるこれら遺伝子群の保存状況をまとめるべく、STRINGS データベース (67) を用いて検索を行い、ゲノムの位置関係に基づき 4 つのグループに分類した (図 3-5 b)。Group-A、Group-B はそれぞれ *P. ananantis* 型および *E. coli* 型の遺伝子配置を持つものにより構成されている。興味深いことに、Group-C のように全セット有しているバクテリア群もあれば、Group-D のように調節因子である *ybaO/ccdR* のみ保有し、対応遺伝子である *ccdA* や *yhaOM* を持たないものも存在する。同じ腸内細菌科においても、本システムでは様々なバリエーションが存在しており、それはそれぞれ特定の環境下における複雑な要求性を反映しているものと推察される。最近の研究において、両方のセットを保有する Group-C に属する *S. enterica* では、好気条件下では CdsH が、嫌気条件下では YhaM が強く誘導されることが明らかとなった (74)。つまり、それぞれのシステムは各バクテリアがさらされる環境下に応じて取捨選択され、発展してきた可能性がある。これら分解に関する全体的なシステムを理解し、必要に応じて遺伝子改変を行うことは、バクテリアを用いたシステインの発酵生産を目指す上で非常に重要であると考えられる。

また *yhaM* が、排出ポンプをコードしている *yhaO* とオペロンを形成している (73) という事実も非常に興味深い。ペリプラズムにおけるシステインの毒性が細胞に及ぼす影響に関しては近年明らかにされており (22, 60)、ペリプラズムのシステインを除去するために、細胞が主として機能する分

解因子とともに特異的な排出因子を転写レベルで制御することは理にかなっていると考えられる。つまり、数ある CD の中で *yhaM* と *yhaO* がパートナーとして存在している意義が説明できる。*yhaO* がシステインの排出に関してどのように関与しているのか、システインの発酵生産に活用できるのかを解明するのは、次なる課題であると考えられる。

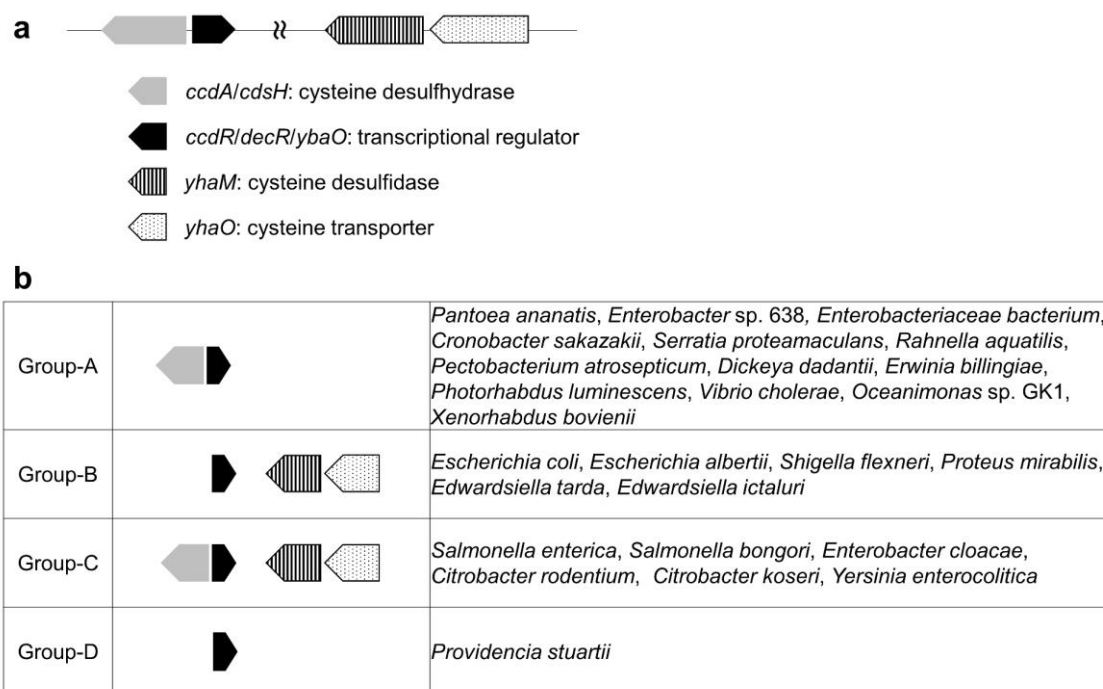


図 3-5. 腸内細菌科のバクテリアにおけるシステイン分解に関与する遺伝子群の保存状況

(a) バクテリアにて保存されているシステイン分解に関与する遺伝子群の配置。(b) 腸内細菌科のバクテリアに存在するシステイン分解に関与する遺伝子群の保存パターンおよびその分類。分類に関しては、代表的なバクテリアを例として示した。また、いくらかのバリエーションは存在するが（例えば *yhaO-yhaM* を保有していない Group-A に属するが、*Xenorhabdus bovienii* は *yhaO* を保持しており、また *yhaO-yhaM* を保有している Group-B や C に属するが、*E. coli* strains (例えば CFT073) や *S. enterica* strains (例えば CT18) などは *yhaO* を持っていない)、STRING (<http://string-db.org/>) より得られたデータに基づき、Group-A から D の代表的な 4 グループに分類した。

### 3-4-3. まとめ

システインが示す細胞毒性のため、細胞は複雑なシステイン分解調節機構を備える必要があった。効率的な発酵生産を目指す上で、その分解活性の由来を理解し、制御することは必要不可欠である。特に *E. coli* では、YhaM を除く他の CD にはシステインの他にも重要な他の生理機能を有しているため、分解活性のみを制御することが難しい。つまり、単純にこれらの CD を欠損するだけでは細胞内の重要な生理機能が損なわれる、或いはシステイン生合成そのものが損なわれる（例えば、CD 活性を有する CysK や CysM はシステイン生合成を担う酵素でもある；1-1-2 項参照；図 3-4）可能性が否定できない。それ故に、ターゲット遺伝子を慎重に選び、その発現レベルを最適化することが重要となる。*yhaM* はシステイン分解という機能に特異的であり、また培養においてネガティブな影響を与えないことから、数ある分解因子の中でも育種ターゲットとして第一選択肢になり得るものと考えられる。実際に本研究において、*yhaM* を欠損しても OD や培養時間、その他の培養パラメーターにおいて悪影響は認められていない（表 3-4）。

システインの発酵生産を行うにあたり、遺伝子欠損等による分解活性の調節は、生産株育種において最重要ポイントの一つと考えられる。*P. ananatis* のようにシンプルな CD のシステムを有しているバクテリアであれば育種の難易度は低くなるが、*E. coli* のように複雑な CD システムを有している場合、上述のように難易度が高くなることが想定される。そのため、本研究により *E. coli* における主要な分解酵素が特定できたことは大きな成果であり、今後は *E. coli* を用いたシステイン生産株の育種開発が大きく進捗することが予想される。

## 第4章 *Pantoea ananatis* を用いたシステインの発酵生産

### 4-1. 緒論

システインは産業上重要なアミノ酸であり、効率的な発酵法の開発が求められている。高濃度システインによる細胞毒性作用に対処するため、細胞は様々な制御機構により細胞内システイン濃度を厳密に制御している。その制御機構を理解し、調節を緩和させ、システインの毒性作用を調節することは、システインの発酵生産を確立する上で必須である。制御機構としては、鍵酵素のフィードバック阻害や、分解、排出ポンプ、マスターレギュレーターによる生合成遺伝子の転写制御などが挙げられ、これら機能の解明やシステインの発酵生産への応用について、*E. coli* を用いて盛んに研究されてきた。

第2章、第3章の検討を通じ、*P. ananatis* および *E. coli* におけるシステイン耐性に関与する因子が取得された。そこで本章では、CcdA、CefA、CefB 等、見出された因子をどのように育種に活用できるのか、それを高レベルのシステイン生産菌(宿主は *P. ananatis*)にて検証するとともに、高生産化を目指した。その結果、生合成系の律速点(*cysM*)解除および、システインの分解に関与する *ccdA* の欠損もしくはシステイン排出ポンプをコードする遺伝子 *cefA*、*cefB*、*E. coli* 由来の *eamA* の増幅により、システインの生産量を大幅に増加させることに成功した。システインの最大蓄積濃度は 2.2 g/L に達し、現在までに報告されている *E. coli* を用いた発酵生産の最大値に並ぶ結果が得られた。

システイン耐性に関与する因子として取得された *ccdA* の欠損や *cefA*、*cefB* の過剰発現は、*P. ananatis* によるシステイン発酵生産を確立する上で重要な位置を占めるとともに、生産へ応用が可能であることが明らかとなった。また、システイン生合成経路の最適化と組み合わせることにより、より効率的な生産菌の開発が可能になることも併せて示された。本研究を通じ、*P. ananatis* を宿主としたシステインの効率的な発酵法開発の基盤となる知見が得られた。

なお、本章では *P. ananatis* 由来と *E. coli* 由来の遺伝子が用いられているが、遺伝子源を明確にするため、遺伝子名の後ろに *P. ananatis* 由来のものは(Pa)、*E. coli* 由来のものは(Ec)と記載した。



## 4-2. 実験方法

### 4-2-1. 使用菌株、プラスミド

本研究に用いた用いた菌株を表 4-1 に、プラスミドを表 4-2 に示し、プラスミド構築用のプライマーを表 4-3 に示した。

本章では、恒常発現プロモーター $P_{nlpD}$ を使用しているが、これは *E. coli* の *nlpD* 遺伝子 (locus tag; b2742) の上流約 300 塩基および、*P. ananatis* の *nlpD* 遺伝子 (locus tag; PAJ\_2318) の上流約 180 塩基の領域を指している。これらのフラグメントは、表 4-3 に記したプライマーを用いて MG1655 株もしくは SC17 株のゲノムより増幅した。*E. coli* の *nlpD* プロモーター ( $P_{nlp0}$ ) の-10 から-35 領域を改変し、プロモーターバリエント ( $P_{nlp23}$ ) を取得した (21)。また、*P. ananatis* 由来 *nlpD* のシャインダルガノ (SD) 配列部 (オリジナルは  $P_{nlp4}$  と表記) を改変し、 $P_{nlp1}$  を得た (21)。各プロモーターおよび SD 配列を表 4-4 に示した。これらのプロモーターおよび SD 配列のフラグメントを、制限酵素 SalI および PaeI を用いて酵素消化したプラスミド pMIV-5JS (46) に挿入し、各種  $P_{nlpD}$  バリエントを持ったプラスミド (pMIV- $P_{nlp0}$ 、pMIV- $P_{nlp23}$ 、pMIV- $P_{nlp4}$ 、pMIV- $P_{nlp1}$ ) を得た。

*cysM* にコードされる OASS-B の発現強度が異なるバリエントの作製は、Mu フェージによるトランスポゾン挿入システム (75) により行った。*cysM* 遺伝子 (Ec) を、MG1655 の染色体を鋳型に表 4-3 に示すプライマーを用いて増幅した。得られたフラグメントを pMIV- $P_{nlp4}$  および pMIV- $P_{nlp1}$  プラスミドにクローニングし、それぞれ pMIV- $P_{nlp4}$ -*cysM*、pMIV- $P_{nlp1}$ -*cysM* を作製した。このプラスミド上では、クロラムフェニコール耐性マーカーおよび  $P_{nlpD}$  制御下の *cysM* が、mini Mu を介した染色体への転移が誘発されるようにデザインした Mu フェージのアタッチメントサイトに隣接するよう配置されている。このプラスミドを、Mu transposase を発現するヘルパープラスミド pMH10 を保持している SC17 株にエレクトロポレーションにて導入した。Mu フェージを介したゲノムへの挿入に関する操作は既報 (21, 76) に従った。 $P_{nlpD}$ -*cysM* カセットを染色体上に有する SC17 株は、クロラムフェニコールを添加した寒天培地上にて選択した。選択された株より染色体 DNA を回収し、システイン生産株 AG4854 へエレクトロポレーションにて導入、相同組み換えによる  $P_{nlpD}$ -*cysM* カセット導入を行った。クロラムフェニコールを添加した寒天培地上にて選択し、AG4854 株ベースの OASS-B バリエント (AG6180、AG6181、AG6184) を得た。

表 4-1. 使用菌株

菌株とプラスミド	説明 <sup>a</sup>	参照 <sup>b</sup>
菌株 ( <i>E. coli</i> )		
MG1655	野生型 <i>Escherichia coli</i> MG1655 (ATCC 47076)	ATCC
菌株 ( <i>P. ananatis</i> )		
SC17	野生型 <i>Pantoea ananatis</i> AJ13355 由来の低粘性化変異株	NITE
SC17-D	SC17 $\Delta ccdA::Km^R$	第 2 章
AG4854	システイン生産菌; SC17 株のゲノム上に、 <i>ompC</i> 制御下の <i>cysE5</i> と $P_{nlp8}$ 制御下の <i>leuE</i> (Mu) のフラグメント、 $P_{nlp8}$ 制御下の <i>serA348</i> (Mu) フラグメントが挿入され、 <i>cysPUWA</i> のプロモーター領域を $P_{nlp8}$ に置換した株	(21, 61) <sup>c</sup>
AG6181	CysM 強化バリエント; AG4854 のゲノム上に $P_{nlp1}$ プロモーター支配下に置いた <i>cysM</i> (Mu) を挿入	本章
AG6180	CysM-enhanced variant; AG4854 のゲノム上に $P_{nlp1}$ プロモーター支配下に置いた <i>cysM</i> (Mu) を挿入	本章
AG6184	CysM 強化バリエント; AG4854 のゲノム上に $P_{nlp4}$ プロモーター支配下に置いた <i>cysM</i> (Mu) を挿入	本章
AG4854-D	AG4854 $\Delta ccdA::Km^R$	本章
AG6181-D	AG6181 $\Delta ccdA::Km^R$	本章
AG6180-D	AG6180 $\Delta ccdA::Km^R$	本章
AG6184-D	AG6184 $\Delta ccdA::Km^R$	本章
SC17 (0)	SC17 株由来 $\lambda$ Red システム作動株	(36)

<sup>a</sup> $Km^R$ 、カナマイシン耐性 ;(Mu)、Mu トランスポゾンシステムによる染色体への遺伝子挿入。

<sup>b</sup>ATCC、American type culture collection; NITE、独立行政法人 製品評価技術基盤機構。

<sup>c</sup>参考文献中では AG4854 株は EYPS1976(s)として記載されている。

表 4-2. 使用プラスミド

プラスミド	説明 <sup>a</sup>	参照
pMIV-5JS	クローニングベクター、SC101 <i>ori</i> ; Cm <sup>R</sup>	(46)
pMIV- P <sub>nlp(x)</sub>	pMIV-5JS に T <sub>rrmB</sub> ( <i>rrmB</i> ターミネーター) とともにクローニングした P <sub>nlpD</sub> プロモーターバリエント (x = 0, 4 もしくは 1)	本章
pMIV-cefB	pMIV-P <sub>nlp23</sub> にクローニングした <i>cefB</i>	本章
pMIV-eamA	pMIV-P <sub>nlp0</sub> にクローニングした <i>E. coli</i> 由来 <i>eamA</i>	本章
pMIV-P <sub>nlp4</sub> -cysM	pMIV-P <sub>nlp4</sub> にクローニングした <i>E. coli</i> 由来 <i>cysM</i>	本章
pMIV-P <sub>nlp1</sub> -cysM	pMIV-P <sub>nlp1</sub> にクローニングした <i>E. coli</i> 由来 <i>cysM</i>	本章
pACYC177	クローニングベクター、p15a <i>ori</i> ; Km <sup>R</sup>	Nippon Gene
pACYC-ccdA	pACYC177 にクローニングした <i>P. ananatis</i> 由来 <i>ccdA</i>	第 2 章
pACYC-EamA	pACYC177 にクローニングした <i>P. ananatis</i> 由来 <i>eamA</i>	第 2 章
pACYC-PA36ccd	pACYC177 にクローニングした <i>P. ananatis</i> 由来 <i>cefA-cefR</i>	第 2 章
pMH10	Mu transposase をコードする Mu-phage A・B、Mu repressor をコードする <i>cts62</i> 遺伝子、λ phage repressor 遺伝子 <i>cI857</i> を搭載した pACYC177; Km <sup>R</sup>	(77)
pMW-λattL-Km <sup>R</sup> -λattR	λattL-Km <sup>R</sup> -λattR カセットのドナー; Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	(36)
RSF-Red-TER	P-element 制御下の λ <i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i> 遺伝子, <i>sacB</i> 遺伝子; Cm <sup>R</sup>	(36)

<sup>a</sup>Ap<sup>R</sup>, Km<sup>R</sup>, Tet<sup>R</sup>, Cm<sup>R</sup>, それぞれアンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール耐性。

表 4-3. プラスミド構築に用いたオリゴ核酸配列

プラスミド名	ベクター	遺伝子/ プロモーター	遺伝子源	プライマー配列
pMIV-P <sub>nlp0</sub>	pMIV-5JS	P <sub>nlpD</sub>	<i>E. coli</i>	5'-AGCTGAGTCGACCCCCAGGAAAAATTGGTTA ATAAC-3' 5'-AGCTGAGCATGCTTCCAAGTGCCTAATGAC GC-3'
pMIV-P <sub>nlp4</sub>	pMIV-5JS	P <sub>nlpD</sub>	<i>P. ananatis</i>	5'-AGCTGAAAGCTTGCATGCACGCGTGGCGATCT GGCCTGACTGC-3' 5'-AGCTGAGTCGACCCCGTGGTGGCAACCTTTAA AAAAGTGC-3'
pMIV-P <sub>nlp23</sub> -cefB	pMIV-P <sub>nlp23</sub>	<i>cefB</i>	<i>P. ananatis</i>	5'-CCGTCGACATGAACGCATTACTCTATGC-3' 5'-AATCTAGATTATAGCGTGCCCGGCATGGG-3'
pMIV-P <sub>nlp0</sub> -eamA	pMIV-P <sub>nlp0</sub>	<i>eamA</i>	<i>E. coli</i>	5'-ACGCGTCGACATGTGCGGAAAAGATGGGGTG-3' 5'-CTAGTCTAGATTAAGTCTCCACCTTTACCGC-3'
pMIV-P <sub>nlp4</sub> -cysM	pMIV-P <sub>nlp4</sub>	<i>cysM</i>	<i>E. coli</i>	5'-AGCTGAGTCGACGTGAGTACATTAGAACAAA CAA-3' 5'-AGCTGATCTAGAAGTCTCCGATGCTATTAATCC-3'
pMIV-P <sub>nlp1</sub> -cysM	pMIV-P <sub>nlp1</sub>	<i>cysM</i>	<i>E. coli</i>	5'-AGCTGAGTCGACGTGAGTACATTAGAACAAA CAA-3' 5'-AGCTGATCTAGAAGTCTCCGATGCTATTAATCC-3'
pSTV-leuE	pSTV29	<i>leuE</i>	<i>E. coli</i>	5'-CGCGGATCCAGTGGTCAATTTAGTGC-3' 5'-CGCGGATCCTGTGGGATTTGAAGCATCC-3'
pSTV-cefB	pSTV29	<i>cefB</i>	<i>P. ananatis</i>	5'-CGCGGATCCTGTTTACGGTAATCCTGTC-3' 5'-CGCGGATCCACAAGTGCAGGGCTTTC-3'

表 4-4. 各種プロモーターおよび SD 配列一覧

プロモーター	由来	配列 (5'から 3'端)
<i>P<sub>nlp0</sub></i>	<i>E. coli</i>	GCATGCTTCCAACCTGCGCTAATGACGCAGCTGGACGAAGGCGGGATT CTCGTCTTACCCGTAGGGGAGGAGCACCAGTATTTGAAACGGGTGCGT CGTCGGGGAGGCGAATTTATTATCGATACCGTGGAGGCCGTGCGCTTT GTCCCTTTAGTGAAGGGTGAGCTGGCTTAAAACGTGAGGAAATACCT GGATTTTTCTGGTTATTTTGCCGCAGGTCAGCGTAT <u>CGT</u> GAAACATCTT TTCCAGTGT <u>TCAGT</u> AGGGTGCCTTGCACGGT <u>AAT</u> TATGTCACTGGTTA TTAACCAATTTTTCTGGGGGTCGAC(ATG)
<i>P<sub>nlp23</sub></i>	<i>E. coli</i>	GCATGCTTCCAACCTGCGCTAATGACGCAGCTGGACGAAGGCGGGATT CTCGTCTTACCCGTAGGGGAGGAGCACCAGTATTTGAAACGGGTGCGT CGTCGGGGAGGCGAATTTATTATCGATACCGTGGAGGCCGTGCGCTTT GTCCCTTTAGTGAAGGGTGAGCTGGCTTAAAACGTGAGGAAATACCT GGATTTTTCTGGTTATTTTGCCGCAGGTCAGCGTAT <u>AA</u> TGAACATCTT TTCCAGTGT <u>TCAGT</u> AGGGTGCCTTGCACGGT <u>TATA</u> ATGTCACTGGTTA TTAACCAATTTTTCTGGGGGTCGAC(ATG)
<i>P<sub>nlp4</sub></i>	<i>P. ananatis</i>	GCATGCACGCGTGGCGATCTGGCCTGACTGCCTTGTTAGCATTCTTC ATAACTGTTTCATGGAATCAGGTAGTTGATATTGCTACTATCCAGTTCAT TCAACGAAAATCCAGCGTTTAAACGTGCCGCACAGTGATTGTGCTGGT GAGACGAGTAAGTCAGTTTTTTAAAGGTTGCCACCACGG <u>G</u> TCGAC(A TG)
<i>P<sub>nlp1</sub></i>	<i>P. ananatis</i>	GCATGCACGCGTGGCGATCTGGCCTGACTGCCTTGTTAGCATTCTTC ATAACTGTTTCATGGAATCAGGTAGTTGATATTGCTACTATCCAGTTCAT TCAACGAAAATCCAGCGTTTAAACGTGCCGCACAGTGATTGTGCTGGT GAGACGAGTAAGTCAGTTTTTTAAAGGTTGCCACCACGG <u>A</u> TCGAC(A TG)

#### 4-2-2. 生育条件

第2章(2-2-2)と同様の方法にて行った。

#### 4-2-3. 最少液体培地中における生育を指標としたシステイン耐性試験

第2章(2-2-4)と同様の方法にて行った。

#### 4-2-4. CD 活性染色

各菌株を LB 培地に植菌し、一晩振とう培養した。得られた培養液を 1:25 となるよう 50 ml の発酵生産培地を張り込んだフラスコに植菌し、対数増殖期に到達するまで 4 時間、32°C にて振とう培養した。その後、遠心分離により菌体を回収し、得られた菌体を洗浄バッファー(pH 8.6 の 10 mM Tris-HCl、100  $\mu$ M DTT、10  $\mu$ M ピリドキサルリン酸)にて 3 度洗浄したのち、洗浄バッファーに懸濁した。得られた懸濁液の超音波処理によって菌体を破砕後、遠心分離により破砕片を取り除き、細胞抽出液を得た。細胞抽出液中のタンパク質量の定量は 2-2-5 項に記載の方法に従い、1 サンプルあたり 4  $\mu$ g のタンパク質を使用して Native PAGE に供し、CD 活性を検出した。

#### 4-2-5. CysM(OASS-B)活性の測定

各菌株を LB 培地に植菌し、一晩振とう培養した。得られた培養液を 1:20 となるよう、5 mg ml<sup>-1</sup> のグルコースを含む LB 培地 4 ml に植菌し、OD<sub>600</sub> が 2.5 に到達するまで試験管にて 30°C で培養した。1 ml の培養液から遠心分離により菌体を回収し、得られた菌体を 100 mM のリン酸カリウムバッファー(pH 7.2)にて洗浄し、450  $\mu$ l の 100 mM リン酸カリウムバッファー(pH 7.2)に懸濁した。超音波処理により菌体を破砕し、遠心分離により菌体抽出液を得た。得られた菌体抽出液 40  $\mu$ l に 160  $\mu$ l の反応液(100 mM のリン酸カリウムバッファー(pH 7.2)、10 mM *O*-acetylserine、2 mM チオ硫酸ナトリウム)を添加し、34°C で 20 分反応を行った。反応後、65°C で 10 分熱することにより反応を停止し、得られた反応液中のシステインを Gaitonde 法 (52) にて測定した。酵素活性の単位 (U) は、1 分間の反応で得られる、菌体抽出液中の総タンパク 1 mg あたりの産生システイン ( $\mu$ mol) にて表した。

#### 4-2-6. システイン発酵生産

第2章(2-2-9)と同様の方法にて行った。

#### 4-2-7. CysM バリエント株の CD 活性測定

各菌株を LB 培地中で一晩、34°C にて振とう培養した前培養液を、1:25 倍希釈となるように本培養の発酵生産培地に植え継ぎ、OD<sub>600</sub> = 4-5 になるまで 32°C にて振とう培養を行った。遠心分離により得られた菌体を、4°C で 0.85% NaCl 溶液で洗浄後、50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> bovine serum albumin、10  $\mu$ M ピリドキサルリン酸を含む 0.1 M リン酸カリウム緩衝液(pH 8.0)に懸濁した。菌体懸濁液の超音波処理を通じて菌体を破砕、遠心分離によって細胞抽出液を得た。抽出液を用いた CD 酵素活

性の測定は既報 (15) に従った。なお抽出液中の総タンパク質濃度は、CBB (Coomassie Brilliant Blue) を用いた標準的な方法にて測定した。

### **4-3. 結果**

#### **4-3-1. *P. ananatis* を宿主とするシステイン生産菌としての可能性**

第2章、第3章の研究を通じ、*P. ananatis* は *E. coli* と比較して分解系がシンプルであり、排出系も発達していることが明らかとなった。野生株である *E. coli* MG1655 株と *P. ananatis* SC17 株を用い、両種のシステインに対する感受性を比較したところ、*P. ananatis* SC17 株は 10 倍程度高いシステイン濃度環境下においても、*E. coli* MG1655 株と同等の生育を示した(図 4-1)。

このように、*P. ananatis* はシステインに対してシンプルかつ強力な耐性システム(*ccdA* や *cefA*、*cefB*)を有しており、これらを上手く利用することにより *E. coli* を上回るシステイン生産菌の宿主となり得る可能性が示唆された。そこで、*P. ananatis* が持つシステイン生産菌宿主としての可能性を追求すべく、システイン生合成経路の最適化および新規システイン関連因子(*ccdA*、*cefA*、*cefB*)の活用による高レベル生産菌の構築を行うこととした。



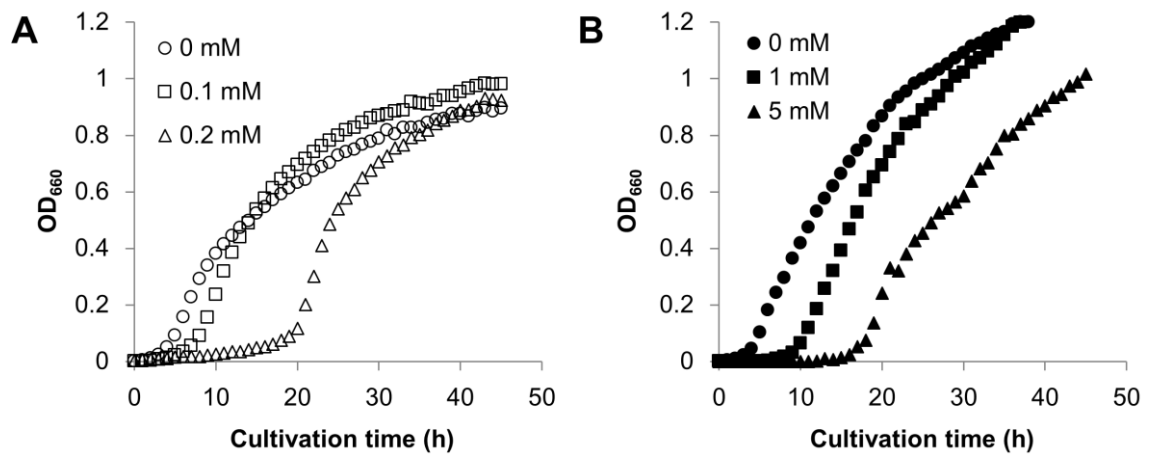


図 4-1. *E. coli* MG1655 と *P. ananatis* SC17 のシステイン耐性

両バクテリア間のシステインへの感受性を、システインを添加した M9 培地における生育を指標に検証した。(A)システインを無添加(○)、0.1 mM(□)、0.2 mM(△)の濃度にて添加した条件下における *E. coli* の生育曲線。(B)システインを無添加(●)、1 mM(■)、5 mM(▲)の濃度にて添加した条件下における *P. ananatis* の生育曲線。

#### 4-3-2. 高レベル生産菌 AG4854 株を用いたボトルネック探索

*P. ananatis* を宿主としたシステインの発酵生産株として、これまで生産モデル株として用いてきた、*E. coli* 由来のフィードバック阻害耐性型 SAT を過剰発現させたシンプルな株の他に、より高レベルのシステイン生産菌 AG4854 株が知られている。この AG4854 株は、システイン生産の鍵となる二つの酵素、SAT と 3-PGDH の両方をフィードバック阻害耐性型に変換した形で導入されており、チオ硫酸を硫黄源とした発酵生産において、1 g/L 程度のシステイン蓄積が得られることが報告されている (61)。SAT は *cysE5* (Ec) という、既に述べた V95R と D96P という二つのアミノ酸置換を伴う変異型 *cysE* (Ec) が用いられている。一方、3-PGDH は SerA348 という、N348A というアミノ酸置換を伴う変異型 *serA* (Pa) が用いられている (*E. coli* 由来変異型 *serA* の N346A に該当; 図 1-3 C)。また、システインの排出ポンプとして、元々 L-ロイシンの排出担体として同定され (23)、システインも排出することが知られている (21) *leuE* (Ec) が過剰発現されている。さらに、硫酸根を供給する過程においてボトルネックとされる (55)、*cysPUWA* (Pa) によりコードされるチオ硫酸のトランスポーターである CysPUWA も強化されている。

このように生合成系の鍵酵素が脱感作化され、さらに排出ポンプや硫酸根の取り込み因子が強化された AG4854 株であるが、さらなる高生産を達成するためにはシステイン生産におけるボトルネックを探索、同定し、解消する必要があると考えた。そこで、セリン生合成に関与する *serB* (Pa) 並びに *serC* (Pa)、OAS からシステインへの変換を行う O-アセチルセリンスルフヒドリラーゼをコードする *cysK* (Ec)、*cysM* (Ec) をそれぞれ AG4854 株に導入し、システインの生産量を確認することでボトルネックとなっている遺伝子を選抜することとした。

その結果、OASS-B をコードする *cysM* (Ec) を導入した際にシステインの生産量が増加することが確認され (図 4-2; AG4854 株と AG6181 株の比較)、CysM が関与する過程が AG4854 株におけるボトルネックであることが明らかとなった (AG6180 株と AG6184 株については次項 4-3-3 にて解説する)。一方で、その他の遺伝子を導入した際には明確な差異は確認できなかった (データ示さず)。本結果は、CysM のアイソザイムである OASS-A をコードしている *cysK* (Ec) の過剰発現ではシステインの生産量増加は確認できないことを意味する。硫酸根からのシステイン合成 ( $\text{OAS} + \text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{cysteine} + \text{acetate}$ ) は CysM と CysK 共に可能であるが、チオ硫酸根からの合成 ( $\text{OAS} + \text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3 \rightarrow \text{S-sulfocysteine} + \text{acetate}$ ) は CysM のみ可能であることから、今回の生産培養ではシステインの生合成が硫黄源として添加したチオ硫酸 (チオ硫酸は硫黄源として、即座にシステイン生合成に利用可能) より行われたことを示唆するものと考えられた。

以上より、高レベルシステイン生産菌 AG4854 株のボトルネックが CysM であることが明らかとなり、*cysM* (Ec) の発現レベルを上げることによりシステイン生産量をさらに増加できるものと推察された。

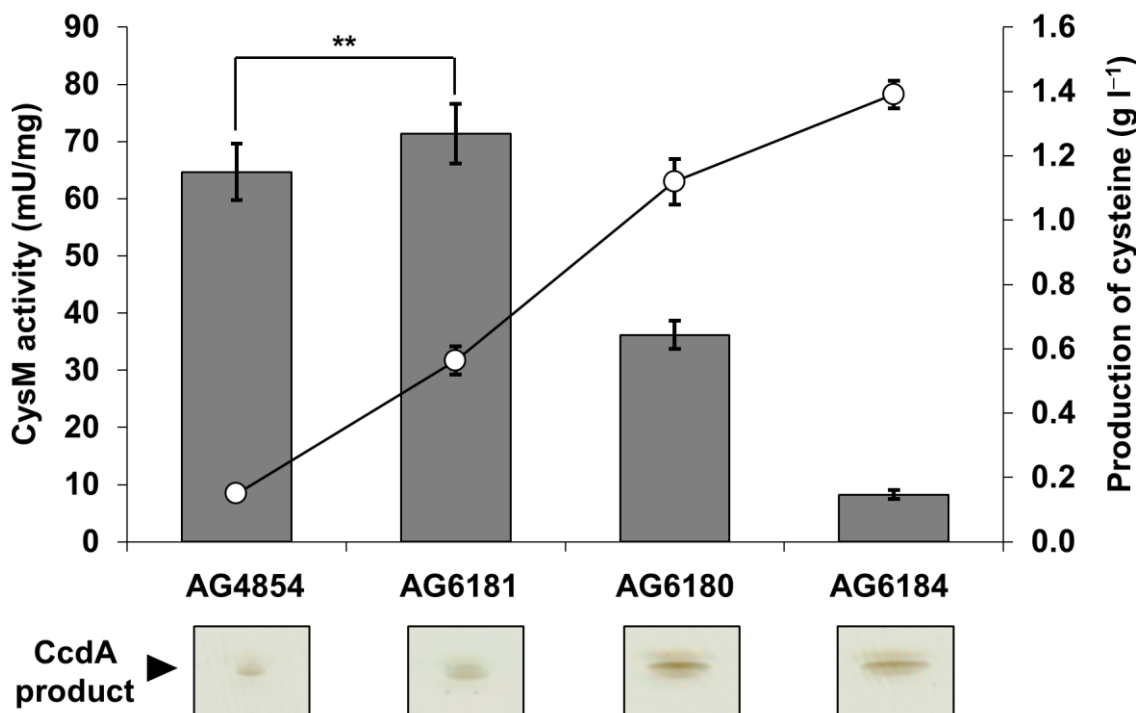


図 4-2. CysM の過剰発現がシステイン生産および CcdA 活性に及ぼす影響

*P. ananatis* 高システイン生産株 (AG4854) および AG4854 をベースに構築された各 CysM 強化バリエーション (AG6181、AG6180、AG6184) における、培地中に産生されるシステイン生産量 (灰色棒) および細胞抽出液中の CysM (*O*-アセチルセリンスルフィドヒドラーゼ B) 活性 (○) を示した (上部)。また各株の細胞抽出液を native PAGE に供し、*ccdA* 産物を活性染色により観察した (下部)。発酵生産培養は、初発グルコース濃度を 40 g l<sup>-1</sup> に設定し、全てのグルコースを消費した時点で培養を停止した。値は独立する 4 連の実験の平均値を、エラーバーは標準偏差を示した。有意差の検定は、*t* 検定によりそれぞれの平均値 (n = 4) の有意差を判断した。\**P* < 0.01。

### 4-3-3. CcdA 誘導に伴うシステイン生産量の減少

AG4854 株のシステイン生産におけるボトルネックが CysM であることが明らかとなったため、*cysM*(Ec)の発現強度最適化を行うこととした。発現強度の異なる二つの *P. ananatis* 由来 *nlpD* プロモーター(*P<sub>nlp4</sub>*、*P<sub>nlp1</sub>*)に連結した *cysM*(Ec)を、mini-Mu を介してゲノムに挿入することにより、異なる CysM(Ec)発現レベルを有するバリエント3株(AG6181、AG6180、AG6184)を作製した。取得したバリエント株の CysM 活性を定量的に把握するため、親株である AG4854 株を含む各株における細胞抽出液中の相対 CysM 活性を、チオ硫酸を硫黄源とした OASS 活性測定により検出した。

その結果、親株の AG4854 株では約 10 mU/mg であった CysM 活性は、AG6181 株では約 3 倍、AG6180 株では約 6 倍、AG6184 株では約 7.5 倍にまで増加しており(図 4-2)、CysM 活性が増加したバリエント株が作製できたことが確認された。システインの生産に関しては、CysM 活性を増加させた株(図 4-2; AG6181)にて最高値が得られた一方、さらに CysM 活性が上昇した株では、逆にシステイン生産量が減少した(図 4-2; AG6180、AG6184)。以上の結果より、CysM 活性が親株と比較して 3 倍となった AG6181 株が最適化された菌株であり、システインの蓄積は約 1.3 g/L に達した。

しかしながら、ボトルネックである CysM を最適化したにも関わらず蓄積の上昇幅は約 0.2 g/L とわずかな増加にとどまった。さらなる生産量向上に向けて CysM 活性が上昇した際にシステイン生産量が減少する原因を探索し、解決する必要があると考えた。第2章での検討を通じ、*P. ananatis* では細胞内システイン濃度が上昇した際に、分解酵素である *ccdA*(Pa)が誘導されることが明らかとなった。このシステイン生産量の低下は、CysM 活性の上昇によりシステイン合成が進んだことで、細胞内システイン濃度が高まった結果、*ccdA* が誘導されてシステインが分解されたことに起因するのではないかと推察された。そこで、CysM 強化によるシステインの減少と CcdA の関連性を検証するため、各 CysM バリエント株における CcdA の CD 活性を観察した。

各株を発酵生産培地にて培養し、粗酵素液を調製、native PAGE により分離した後、CD の活性染色を行った。その結果、CcdA のバンドは CysM 活性に応じて増加していることが明らかとなった(図 4-2)。特にシステイン生産が大きく低下した株(AG6180 と AG6184)では CcdA 活性を示すバンドが大きくなっており、システイン生産の減少は *ccdA* にコードされる CD であるという仮説を支持する結果となった。なお、活性染色のゲル上には CcdA 以外の CD は検出されず(データ示さず)、CcdA はシステイン生産の減少に影響を与える唯一の CD である可能性が改めて示唆された。

活性染色を用いた手法は、CcdA 以外の CD の寄与がほぼないことを示すには有効であるが、定量性に欠けるのが欠点である。そこで、より定量的に解析するため、各 CysM バリエント株における粗細胞抽出液中の CD 活性を測定した。定量的結果、活性染色と同様にシステイン生産量が減少した AG6180、AG6184 株では、生産量が減少しなかった株(AG4854、AG6181 株)と比較して CD 活性が 4 倍程度に増加していることが明らかとなった(表 4-5)。次に、各 CysM バリエント株について *ccdA* 欠損株を作製し、粗細胞抽出液中の CD 活性を解析した。その結果、*ccdA* 欠損下では CysM 強化により引き起こされる CD 活性の上昇は認められず(表 4-5)、CysM 発現を強化した株における CD 活性の上昇は CcdA により引き起こされることが明らかとなった。以上の結果より、

CysM 発現を強化したシステイン生産株では、細胞内システイン濃度の上昇に伴って CcdA が誘導され、システイン分解による生産量の低下が生じることが明らかとなった。また CcdA は、システイン生産に影響を及ぼす唯一の CD であり、CysM 活性を上昇させた条件下ではシステイン生産に悪影響を及ぼす因子であることが、合わせて明らかとなった。

表 4-5. 様々な CysM 強度を有するシステイン生産株の粗酵素液中 CD 活性

株名	<i>ccdA</i>	CD 活性(mU) <sup>a, b</sup>
AG4854	WT	1.0 ± 0.07
AG6181		1.2 ± 0.12
AG6180		4.1 ± 0.40
AG6184		3.3 ± 0.41
AG4854-D	<i>ccdA::kan</i>	1.0 ± 0.03
AG6181-D		0.9 ± 0.09
AG6180-D		0.9 ± 0.18
AG6184-D		1.1 ± 0.04

<sup>a</sup> 値は独立する 3 連の実験の平均値±標準偏差を示した。

<sup>b</sup> 1 U = 1 μmol/min/mg of protein と定義した。

#### 4-3-4. 高レベルシステイン生産菌における CcdA 欠損の導入

これまでの研究を通じ、高レベルシステイン生産菌 AG4854 株のボトルネックは CysM である一方、*cysM*(Ec)強化により細胞内システインが上昇し、CcdA が誘導され、システイン生産量が低下する現象が明らかとなった。そこで、様々な CysM 強度を有するシステイン生産株 (AG4854、AG6181、AG6184) において *ccdA* (Pa) を欠損させ、CcdA による分解を回避した条件下におけるシステイン生産量を観察した。

各株を培養した結果、AG4854 株では *ccdA* 欠損による生産量の増加は認められなかったが、CysM 強度が高い AG6181、AG6184 株では欠損によりシステイン蓄積が増加することが確認された (表 4-6)。つまり、CysM を強化した条件下では CcdA によるシステイン分解は大きな影響を及ぼしており、高レベルなシステイン生産株を用いてシステイン生産を向上させる上で *ccdA* の欠損は、重要な役割を担うことが明らかとなった。一方で、*ccdA* 欠損は各株の CysM 活性の上昇 (図 4-2 参照) に従い、生育 (OD) や代謝活性 (グルコース消費速度) に悪影響を及ぼすことも明らかとなった (表 4-6; 到達菌体量および培養時間を参照)。

以上の結果より、CysM はシステイン生産能向上に寄与することは確実であるものの、*ccdA* 存在下では逆にシステイン生産量は低下する傾向にあり、*ccdA* 非存在下においてはシステインの生産量は増加するものの生育に悪影響を及ぼすことが明らかとなった。特に CysM 活性が高い株 (AG6184) では顕著にその傾向が認められ、*ccdA* 欠損下では非欠損下と比較して半分のグルコースしか消費せず、半分の菌体量 (OD) に留まる一方、システイン生産量の増加幅は大きかった。これらの現象は、システインの細胞内濃度が高まっているにも関わらず、CcdA による分解が生じないことに起因するシステインの細胞毒性作用によるものと推察された。発酵生産量を増加させるためには、システイン分解を回避することが有効と考えられるが、分解作用が消失することは細胞内システイン濃度の調節機構が失われることを意味しており、それによる悪影響が生じることが明らかとなった。

表 4-6. システイン発酵生産における *ccdA* 欠損効果<sup>a</sup>

株名	<i>ccdA</i>	産生システイン (mg l <sup>-1</sup> )	OD <sub>600</sub>	システイン収率 [% (g/g)]	培養時間 (h) <sup>b</sup>
AG4854	WT	1246 ± 42	17.4 ± 0.3	3.1 ± 0.1	<16
AG6181		1384 ± 54	16.5 ± 0.8	3.5 ± 0.1	18–20
AG6184		169 ± 4	12.6 ± 1.0	0.4 ± 0.0	21–21.5
AG4854-D	<i>ccdA::kan</i>	1254 ± 273	16.3 ± 0.5	3.1 ± 0.7	17.5–18.5
AG6181-D		1576 ± 144	15.1 ± 0.5	3.9 ± 0.4	20–21
AG6184-D		283 ± 39	6.3 ± 0.1	1.6 ± 0.4	>21.5 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> 値は独立する 4 連の実験の平均値±標準偏差を示した。

<sup>b</sup> 初発グルコース濃度を 40 g l<sup>-1</sup> に設定し、全てのグルコースを消費した時点で培養を停止した。

<sup>c</sup> 培養終了時点にて残糖濃度 (22.1 ± 1.4 g l<sup>-1</sup>) が検出された。



#### 4-3-5. システイン排出ポンプの利用

細胞内システイン濃度の上昇を回避する手段として、システイン分解の他には細胞外への排出を促進させる方法が知られている(第2章参照)。そこで、CysMの過剰発現に伴う細胞内システインレベルの上昇による悪影響が認められる環境下において、排出ポンプがシステインを細胞外に排出することによる悪影響の回避とシステイン生産量の向上が認められるかを確認することとした。

より明確に排出ポンプの効果を確かめるべく、高いCysM活性を保持し、生育が遅く、システイン生産量が低下することが明らかとなっているAG6184株を用いて検証した。検証には*P. ananatis*にて同定された*cefA*(Pa)、*cefB*(Pa)並びに、*E. coli*のゲノムライブラリーからシステイン耐性に影響を及ぼす因子として取得された*eamA*(Ec)を排出ポンプとして用いた。本検討では、菌体内のシステイン濃度が上昇した際の排出ポンプの効果を検証するとともに、排出ポンプの種類による効果の大きさも同時に検証した。なお、今回の実験ではCefAの機能を十分に発揮させるために、CefAは自身の転写制御因子であるCefR(第2章参照)と共に導入した。

生産培養の結果、EamA、CefA、CefBのどの排出ポンプを導入した株においてもシステインの低生産性が大きく改善することが明らかとなった(図4-3)。つまり、CysM強化により増加した細胞内システインを排出ポンプにより細胞外に汲み出すという組み合わせが機能し、効果を発揮した結果、システインの生産性が向上したものと考えられた。また、この排出ポンプを過剰発現させた株の生産培養では糖消費速度はほぼ同等であり、到達菌体量は同等か、むしろやや増加する傾向にあり(データ示さず)、*ccdA*(Pa)欠損時のような生育の悪化は認められなかった。つまり生合成経路強化による細胞内システイン濃度の上昇に対し、排出ポンプの強化は効果が大きく、また理想的な解決策であることが示唆された。

今回の検討では*ccdA*は欠損されていないため、細胞内システインの濃度によっては一部分解されていると予想される。菌体の排出能力が十分高まった状態であれば、*ccdA*欠損による細胞内システイン濃度の上昇を防ぐことができ、さらなる生産量の向上が期待できる。*ccdA*欠損と排出ポンプ強化の組み合わせは、システイン生産向上に向けた次なる課題と考えられる。また、今後は発現レベルの最適化などを通じ、各排出因子の最大能力を引き出す検討が必要である。今回の検討では、各排出ポンプが持つシステイン生産に対する能力を定量的に測定するのではなく、あくまで各排出ポンプがシステイン生産に及ぼす寄与を定性的に測定したに過ぎない。各システイン排出ポンプの能力、特性を把握し、生産株の状況に応じて適用することが必要になるものと考えられる。

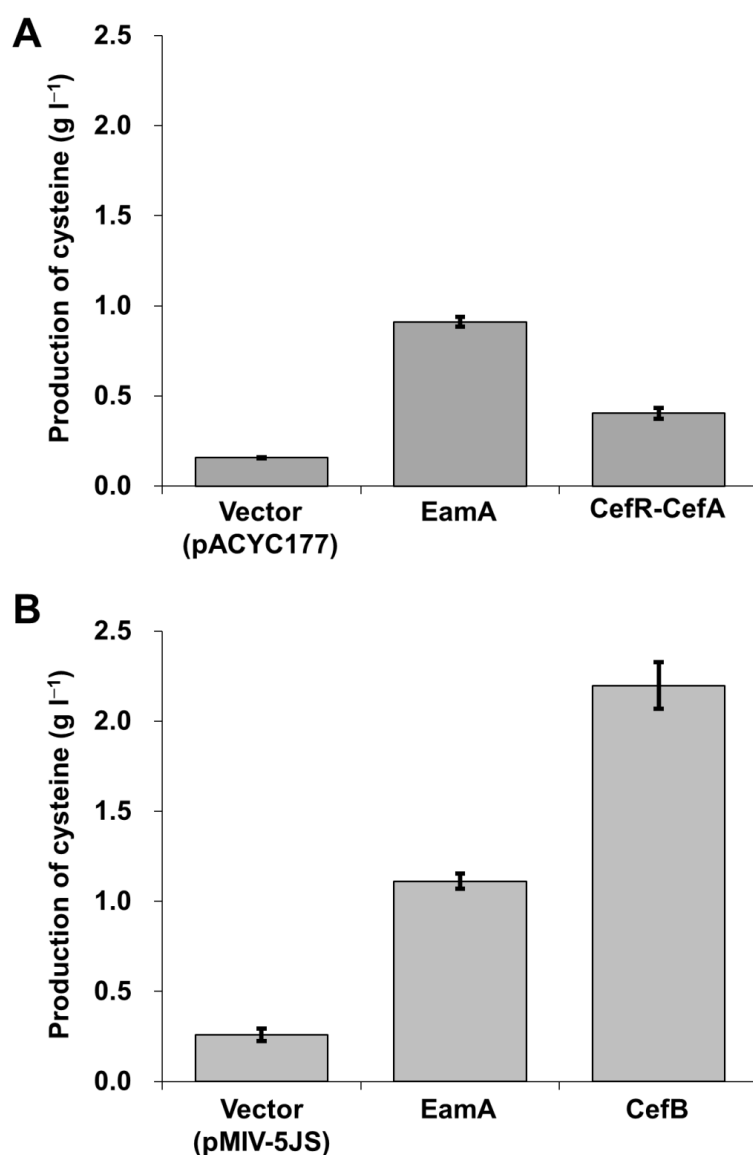


図 4-3. 高レベルシステイン生産菌 AG6184 における排出ポンプ強化の効果

システイン排出ポンプをコードする各遺伝子をプロモーター領域と共に pACYC177 (ベクター) に搭載し、AG6184 に導入した株 (A)、もしくは *P<sub>nlp0</sub>* に連結する形で pMIV-5JS (ベクター) に搭載し、AG6184 に導入した株 (B) のシステイン生産量を示した。(A) 初発のグルコース濃度は 60 g l<sup>-1</sup> にて行った。培養開始後 28 時間で培養を終了し、この時点でおおよそ 40 g l<sup>-1</sup> のグルコースを消費していた (10% 程度の誤差範囲)。 *cefA* の機能を完全に発揮させるため、pACYC-PA36ccd を用いて転写調節因子である *cefR* を同時に導入した。(B) 初発のグルコース濃度は 40 g l<sup>-1</sup> にて行った。40 g l<sup>-1</sup> のグルコースを消費していた (10% 程度の誤差範囲) 培養開始後 22 時間の段階で生産培養を終了した。両実験ともに独立する 4 連の実験の平均値を、エラーバーは標準偏差を示した。

## 4-4. 考察

### 4-4-1. *P. ananatis* を用いたシステイン生産

本研究では *P. ananatis* AJ13355 を親株とするシステイン高生産菌 AG4854 株を宿主とし、システインの効率的な発酵生産を目指した。本株のシステイン生合成経路上におけるボトルネックが *cysM* (Ec) であることを見出し、CysM 活性を上昇させたが、活性があるレベルを超えた際にシステイン生産量の減少が認められた (図 4-2)。本現象は、細胞内システインレベルの上昇に伴うシステイン分解酵素 CcdA の誘導発現に起因することが明らかとなり、システイン分解遺伝子の欠損、もしくはシステイン排出ポンプの過剰発現と組み合わせることにより、生産量の上昇が確認された (表 4-6、図 4-3)。つまり、第 2 章にて同定された *ccdA* (Pa) によりコードされるシステイン分解酵素および *cefA* (Pa)、*cefB* (Pa)、*eamA* (Ec) にコードされる排出ポンプが、高レベルのシステイン生産菌にも応用可能であり、システインの発酵生産に有用であることが改めて明らかとなった。

以上の結果より、*P. ananatis* を用いて一層高レベルなシステインの発酵生産を成立させるためには、主要な分解酵素をコードする *ccdA* を欠損し、システインの排出ポンプをコードする *cefA* や *cefB* を過剰発現させることに加え、システイン生合成経路上の遺伝子 (例えば *cysM*) と組み合わせることが必要であると考えられる。本研究にて得られた最大蓄積はおよそ 2.2 g/L であり (図 4-3 B)、この値は現在報告されている *E. coli* を用いた発酵生産の最大値である 2.3 g/L (33) とほぼ同じレベルである。今回の研究を通じて同定した重要な因子の発現量調整とともに、システイン生合成経路のボトルネック解消を段階的に進めることにより、*P. ananatis* によるシステイン生産量はさらに増加させられるものと考えられる。

### 4-4-2. システイン生産株の宿主としての *P. ananatis* の適正さ

*P. ananatis* はアミノ酸やその類縁体を発酵で生産するのに最も適した宿主の一つであり、システイン発酵においても *E. coli* やその他の微生物と比較して様々なメリットがあると考えられる。

第一に、*P. ananatis* が有する特異的でシンプルなシステイン分解システムである。細胞内のシステイン分解活性を調節することは、発酵生産を志向する上で非常に重要なポイントである。*P. ananatis* では CcdA のみが主要な CD として機能しており、*ccdA* (Pa) の単独欠損によりシステインの生産性やシステイン耐性に大きく影響を及ぼすことが本研究にて明らかとなるなど、CcdA の制御は *P. ananatis* を用いてシステイン発酵を成立させる上で非常に重要な役割を担うものと考えられる。*E. coli* においても CD を欠損することはシステイン発酵に対して有用であるものの、*E. coli* は複数の主要な CD を保持しているため、CD 活性を大幅に低下させることが難しく、複数の既知 CD 遺伝子を欠損した株においても CD 活性が多分に残ってしまうことが知られている (9)。つまりこれまでの知見では、CD 活性を取り除き、分解を完全に避けるにはまだ不十分であり、今後も CD 活性を有する遺伝子を同定していく必要がある。加えて、*E. coli* の既知 CD の多くは他の重要な生理機能を備えており、遺伝子欠損により生育に悪影響が生じることが推察される。4-3-2 項に記載したように、CysK や CysM といった OASS は、*O*-アセチルセリンと硫化物からシステインを生産する反応に関わっている (10, 11)。またシスタチオン-β-リアーゼファミリーに属する MetC や MalY は、

様々な基質の C $\beta$ -S 結合を切断し、シスタチオンinからホモシステインに変換する (12, 13)。加えて、トリプトファンナーゼである TnaA は L-トリプトファンを加水分解し、インドール、ピルビン酸、そしてアンモニアに変換する (14)。これら重要な機能が失われた際のデメリットは、CD 活性の排除というメリットを上回ってしまう可能性が高いと推察される。

第二のメリットは、トランスポーターを通じたシステインの細胞外への排出機構であり、*P. ananatis* はシステインを細胞外へくみ出す独自のシステムを保有している。その一つがシステインにより誘導される排出ポンプである CefA であり、細胞内システインが過剰となった際に、そのシステインレベルを制御する機構の一つと考えられる(第 2 章参照)。今後は、基質特異性や排出速度、そして生産に最適な発現量など、CefA および CefB の特性をさらに解明していく必要がある。排出ポンプの基質特性の低さに起因する副産物の排出を制御することや、細胞制御機構の混乱を避けるためにも発現レベルの調節は、様々なアミノ酸発酵生産を開発していく上で極めて一般的である (78)。

そして第三には、*P. ananatis* が *E. coli* と比較して環境ストレス、特に酸性条件下に対して高い耐性を示すという性質である (34, 44)。酸性条件下における発酵のメリットとしては、アルカリの使用量を下げられることによる使用コスト削減や、好気発酵条件下における自発的な酸化反応を避けることができることなどが挙げられる。以上のことから、*P. ananatis* はシステインの発酵生産に有利な宿主であると考えられる。

#### 4-4-3. まとめ

本研究を通じて *P. ananatis* を用いたシステインの発酵生産の可能性に関して重要な知見が得られた。「分解」と「排出」を調整する基本的な二つのメカニズムが明らかとなり、次の段階として、これらの知見を工業生産が可能な生産株構築に応用していくことが期待される。適切な排出ポンプを選択すること、生育や基質消費速度、副生物といったネガティブな要因を管理しながら排出ポンプの発現量をファインチューニングすることにより、さらなる生産性向上が目指せるものと考えられる。排出ポンプや分解酵素の最適化を完了した後は、システイン生合成経路上のボトルネック探索を行いながら、一步一步育種開発を進めていく必要があると考えられ、CysM の最適化はその第一歩になると思われる。生産量の最大化やスケールアップといった工業化段階への挑戦はもう少し先になるが、本研究はシステインおよびその類縁体の商業生産を実現する過程において重要な知見になるものと考えられる。

## 第5章 総括

### 5-1. 本研究を通じて同定された細胞内システイン濃度制御遺伝子

本研究では、*P. ananatis* および *E. coli* のゲノムライブラリーからのシステイン耐性を付与する遺伝子のスクリーニングを通じ、5つのシステイン代謝制御に関連する因子を同定した(表5-1)。*P. ananatis* のゲノムライブラリーからのスクリーニングでは、システインデスルフィドラーゼをコードする *ccdA*、およびシステイン排出ポンプをコードする *cefA*、*cefB* が同定された。一方、*E. coli* のゲノムライブラリーからのスクリーニングではシステインデスルフィダーゼをコードすると考えられる *yhaM*、排出ポンプをコードする *eamA* が同定された。これらの遺伝子のうち、*ccdA*、*cefA*、*yhaM* の転写は遺伝子のすぐ上流に位置する転写制御遺伝子(それぞれ *ccdR*、*cefR*、*ybaO*)により制御されており、システイン添加により速やかに、かつ強力に誘導されることが明らかとなった。

これらの遺伝子は、システイン耐性に関与することが明らかとなっており、分解・排出を通じて細胞内システイン濃度の上昇を抑え、細胞毒性作用を回避する機能を有していることが類推される。また分解に関与する *ccdA*、*yhaM* の遺伝子欠損により、また排出に関与する *cefA*、*cefB* の遺伝子増幅により、生産モデル株においてシステイン生産量が増加することが確認されている。このように本研究では、細胞内システイン濃度調節に関わる遺伝子を同定するとともに、システイン生産への応用が可能となることも併せて明らかとした。

しかしながら、各分解酵素の酵素特性(基質特異性や反応速度)は不明であり、生体内における各因子の機能やシステイン制御に関する役割の大きさを判断するためにも、酵素特性を把握することは今後の課題である。同様に、排出ポンプに関しても、*CefA*、*CefB* の基質特異性や排出速度を把握することは、システイン生産への応用展開を見据える上で非常に重要であると考えられる。

表5-1. 本研究を通じて同定されたシステイン代謝関連遺伝子一覧

宿主	遺伝子名	機能	転写制御
<i>P. ananatis</i>	<i>ccdA</i>	Cysteine desulphydrase	<i>ccdR</i> を介してシステインに応答
	<i>cefA</i>	Cysteine exporter	<i>cefR</i> を介してシステインに応答
	<i>cefB</i>	Cysteine exporter	—
<i>E. coli</i>	<i>yhaM</i>	Cysteine desulfidase	<i>ybaO</i> を介してシステインに応答
	<i>eamA</i>	Cysteine exporter	—

## 5-2. システイン分解酵素

*E. coli* では少なくとも 6 つの酵素 (CysK, CysM, MetC, MalY, TnaA, DcyD) が CD 活性を有しており、システインの分解に関与していることが知られていた (10-15)。今回、その酵素群にシステインにより誘導されるシステインデスルフィダーゼをコードすると考えられる *yhaM* が加わった。既知の CD はシステインの分解という機能の他に、重要な主たる生理機能を有していることが知られているが、YhaM はシステインにより強力に誘導され、システイン耐性に関与していることから、システインの分解により特化した酵素であることが推察される。YhaM に類似したシステムは *P. ananatis* にも存在しており、*P. ananatis* では CcdA がシステインにより強力に誘導され、システイン耐性を付与する CD として機能している。*E. coli* におけるシステインデスルフィダーゼ活性を含むシステインの分解活性を測定することが必要であるが、YhaM と CcdA は類似した機能であるものの、システインの分解への寄与は CcdA の方が大きいことが、*E. coli* と *P. ananatis* それぞれの野生株が示すシステイン耐性度 (図 4-1) から推察される。両分解酵素ともに、システインショックを与えた 5 分後には発現量が大幅に上昇することが確認されているが (図 2-5 B、3-3)、その誘導の強度や、システイン耐性に対する寄与度には差異があることが示唆された。

また、腸内細菌科バクテリアにおける CcdA、YhaOM の保存状況に関しては 3-4-2 項にて議論したが、*E. coli* のように転写調節因子と YhaOM を保有しているものと、*P. ananatis* のように転写調節因子と CcdA を保有しているもの、*S. enterica* のように転写調節因子とともに YhaOM、CcdA の両カセットを保持するものなど、異なる種間におけるシステイン耐性度の比較はそれぞれの分解酵素の寄与や共存性を議論する上で興味深い点である。特に、両酵素を保持する種におけるそれぞれの酵素の発現挙動や分解活性、システイン耐性を調べることにより、それぞれのシステムが示す特性や意義が明らかとなり、各微生物種がどういった戦略で細胞内システイン濃度を制御しているか深く議論できるものと考えられる。

## 5-3. システイン排出ポンプ

システインを排出する機能を有する排出ポンプとして EamA や EamB、CydDC、Bcr、LeuE など がこれまでに報告されていたが (17-21)、本研究を通じて新たに *P. ananatis* が保有する CefA 並びに CefB がここに加わった。また、今回のシステイン耐性を指標とするスクリーニングの結果より、実質的に細胞内システイン濃度の調節に関与する排出ポンプは EamA、CefA、および CefB であることが示唆された。今回の検討では、*E. coli* と *P. ananatis* のゲノムライブラリーからのスクリーニング、すなわちそれぞれのオリジナルプロモーターの発現制御下での探索となるため、発現量の差異による影響は排除できないが、上述の 3 つの排出ポンプ以外のものは生理機能としてシステインの排出に関与する優先度は低いものと推察できる。各ポンプが有する基質特性を把握する必要はあるが、細胞内のシステイン濃度上昇回避に寄与する EamA、CefA、CefB は、システイン排出において中心的な役割を担う排出担体である可能性が極めて高いものと推察される。すなわち、システイン生産への応用は、この 3 つの排出ポンプに関し優先的に検討を進めるべきであることが示唆された。実際、システイン生産のモデル株を用いた筆者らのプレリミナリーな検討では、3 つの

排出ポンプでのみ、実質的なシステイン生産への効果が確認された(データ示さず)。

その中で CefA は、CefR を介してシステインにより誘導されるという、他の二つと異なる特徴を有している。細胞内のシステインレベル上昇時に作用するという、生理機能上極めてリーズナブルなシステムであるものの、システイン生産への応用という観点からは、柔軟性に問題がある可能性がある。本来システインにより制御されているものを、過剰発現化、恒常発現化した際に予期せぬ挙動を示す可能性が考えられ、最適化の難易度が高いことが予想される。実際にプレリミナリーな検討において、恒常発現化した CefA をシステイン生産に応用した条件では、CefR と組み合わせて使用した条件と比較して排出ポンプの機能を十分発揮できなかった例が確認されている。すなわち、CefA の使いこなしに関してはもう一段の機能把握と最適化が必要になると思われる。

またシステイン生産への活用という観点では、排出ポンプの改良(アミノ酸変異の導入)も有効な手段であると考えられる。排出性能や基質特異性を変化させ、システイン排出により特化した排出ポンプに改良することも可能である。実際、筆者らはシステイン耐性を指標としたスクリーニングにより、改良にも成功している (21)。

#### 5-4. システイン生産宿主としての可能性

本研究では *P. ananatis* および *E. coli* の両微生物を用い、システイン関連遺伝子探索やシステイン発酵への応用を検討した。これら検討を通じ、*E. coli* と *P. ananatis* はシステインの細胞内濃度制御において異なるシステムを有していることが明らかとなった。図 4-1 に示すように、*E. coli* と比較して *P. ananatis* は高いシステイン耐性を示す。*P. ananatis* ではシステインにより強力に誘導される CcdA が大きな役割を果たしているものと推察され、*P. ananatis* は一つの強力な分解酵素により高濃度のシステインを回避するシステムを有していると理解できる。対して *E. coli* では、CcdA と同様にシステインにより誘導される YhaM を保持しているが、システイン耐性への影響は CcdA と比較して小さいと考えられる。その一方で、他の生理機能を保持しつつ、CD 活性を示す酵素を数多く有している。

どちらのシステムが生存上有利であるかは判断できないが、システイン発酵の生産宿主としては *P. ananatis* のように明確な分解酵素が存在するタイプの方が有利であると考えられる。理想的には、細胞内の分解活性をゼロにし、強力な排出ポンプにより細胞毒性を示す濃度に到達する前に細胞外に汲み出すことが求められる。つまり、発酵生産するにあたり、分解は回避すべき最も大きな課題の一つであり、*E. coli* のように複数、しかも他の重要な生理機能を有している酵素が兼ねている場合は、欠損による分解回避の難易度は極めて高くなる。実際、*E. coli* にてシステイン分解に関与する酵素群を欠損した場合において、CD 活性は残存する上、重要な生理機能が阻害される影響により菌体生育が悪化する。一方、*P. ananatis* では *ccdA* の欠損により CD 活性はほぼゼロになるうえ(表 2-7)、生育に悪影響を及ぼさないことが明らかとなった(図 2-3 A)。

一方、排出ポンプについては、導入するポンプは数種のポンプ(例えば EamA、EamB、LeuE、CefA、CefB など)の中から選択でき、発現量も株に応じて調節することが可能となる。すなわち、*P. ananatis* のように一つの分解酵素が役割のほぼ全てを担っているタイプを生産宿主とし、その分解

遺伝子を欠損、さらには適した排出担体(この場合は *E. coli* 由来のものでも *P. ananatis* 由来のものでも、最適な排出ポンプを採用できる)を活用することで、システインの生産量を向上させることができるのではないかと考えられる。

### 5-5. システイン発酵生産性向上にむけて

本研究を通じて同定されたシステイン耐性に関与する因子は、いずれもシステイン生産量上昇に寄与することが明らかとなった。しかしながら、それらの因子は生産モデル菌にて効果が確認されたのみであり、今後は実用的な生産株においてさらなる高生産化を推進する必要がある。鍵酵素である SAT、3-PGDH のフィードバック阻害耐性型の導入、増幅した菌株に対し、分解因子の欠損や排出ポンプの強化、代謝経路上の律速ポイントの同定と解除を、適切に実行しなくてはならないことが第 4 章の検討を通じて明らかとなった。すなわち、システインの効率的な発酵生産を達成するには、常に細胞内のシステイン濃度の変化をモニターし、対処しながら育種を行う必要がある。

例えば、本研究に用いた *P. ananatis* システイン生産菌 AG4854 株を起点に考えると、以下のような育種が考えられる。まず初めに、「システイン代謝経路上の律速点探索と解消(本株では CysM)」を行い、システインの生合成を促進させる。すると細胞内のシステイン濃度が上昇し、CcdA が誘導されて分解による生産量の低下が生じるため、続いて「分解遺伝子(ccdA)の欠損」を行う。分解因子の欠損に伴い、細胞内システイン濃度が一層上昇し、生育が悪化するため(表 4-7)、次に「排出ポンプ(EamA、CefA もしくは CefB)の過剰発現」を行い、細胞内のシステイン濃度を低下させると同時に生産量を上昇させる。なお、どの排出ポンプをどういった発現量で使用するかは、生育やシステイン生産量を指標として選択する必要があると考えられる。このように生合成経路の強化後に、「分解の回避」並びに「排出能力の強化」を行うことにより、高レベルのシステイン生産株が構築できるものと予想される。

上述のように分解と排出の 2 点を整えることで初めて再度「システイン代謝経路上の律速点探索と解消」に向けた育種が可能となる。しかしながら、ボトルネックを解消することにより、CysM 強化時と同様、細胞内システイン濃度の上昇が再び生じることが予想される、そこで、再度「排出ポンプの最適化」を行うことで、さらなる高収率が目指せるものと考えられる。こうしたステップバイステップの育種開発方法が、地道ではあるが効果的であると思われる。ただし、生育やシステイン生産量のみを指標に探索・最適化することは効率性に欠くため、代謝中間体であるセリンや OAS、NAS、各種システイン類縁体を検出する系を構築し、モニターすることで育種効率性を高めていくことが期待される。

また現在は試験管を用いた培養にとどまっているが、ファーメンターを用いた培養プロセス開発も工業化に向けて重要な役割を担うものと考えられる。特に細胞内濃度の制御が非常に重要となるシステインの生産においては、培養プロセス開発に伴う生産性向上に伴い、生育遅延が生じたり、収量が逆に低下したりする可能性が極めて高く(試験管培養を指標に最適化した株ではフィットしない)、培養プロセスに応じた菌株改良が必要になると推察される。本研究を通じてシステインの細胞内濃度調節に関与する因子が概ね出そろったことから、工業化に向けた研究開発という側面で



は、培養プロセス開発が重要になるものと考えられる。

## 参考文献

1. Flint DH, Tuminello JF, Miller TJ. 1996. Studies on the synthesis of the Fe-S cluster of dihydroxy-acid dehydratase in *Escherichia coli* crude extract. Isolation of *O*-acetylserine sulfhydrylases A and B and beta-cystathionase based on their ability to mobilize sulfur from cysteine and to participate in Fe-S cluster synthesis. *J Biol Chem* 271:16053–67.
2. Sorensen MA, Pedersen S. 1991. Cysteine, even in low concentrations, induces transient amino acid starvation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 173:5244–6.
3. Hennicke F, Grumbt M, Lermann U, Ueberschaar N, Palige K, Bottcher B, Jacobsen ID, Staib C, Morschhauser J, Monod M, Hube B, Hertweck C, Staib P. 2013. Factors supporting cysteine tolerance and sulfite production in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 12:604–13.
4. Stipanuk MH, Dominy JE, Jr., Lee JI, Coloso RM. 2006. Mammalian cysteine metabolism: new insights into regulation of cysteine metabolism. *J Nutr* 136:1652S–1659S.
5. Al-Rabiee R, Zhang Y, Grant GA. 1996. The mechanism of velocity modulated allosteric regulation in D-3-phosphoglycerate dehydrogenase. Site-directed mutagenesis of effector binding site residues. *J Biol Chem* 271:23235–8.
6. Kai Y, Kashiwagi T, Ishikawa K, Ziyatdinov MK, Redkina EI, Kiriukhin MY, Gusyatiner MM, Kobayashi S, Takagi H, Suzuki E. 2006. Engineering of *Escherichia coli* L-serine *O*-acetyltransferase on the basis of crystal structure: desensitization to feedback inhibition by L-cysteine. *Protein Eng Des Sel* 19:163–7.
7. Heinrich P, Leinfelder W. April 2001. Process for preparing *O*-acetylserine, L-cysteine and L-cysteine-related products. US patent US6218168(B1).
8. Wich G, Leinfelder W, Backman K. January 2001. Microorganisms for the production of tryptophan and process for the preparation thereof. US patent US6180373(B1).
9. Awano N, Wada M, Mori H, Nakamori S, Takagi H. 2005. Identification and functional analysis of *Escherichia coli* cysteine desulfhydrases. *Appl Environ Microbiol* 71:4149–52.
10. Becker MA, Kredich NM, Tomkins GM. 1969. The purification and characterization of *O*-acetylserine sulfhydrylase-A from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 244:2418–27.
11. Zhao C, Kumada Y, Imanaka H, Imamura K, Nakanishi K. 2006. Cloning, overexpression, purification, and characterization of *O*-acetylserine sulfhydrylase-B from *Escherichia coli*. *Protein*

Expr Purif 47:607–13.

12. Brown EA, D'Ari R, Newman EB. 1990. A relationship between L-serine degradation and methionine biosynthesis in *Escherichia coli* K12. *J Gen Microbiol* 136:1017–23.
13. Zdych E, Peist R, Reidl J, Boos W. 1995. MalY of *Escherichia coli* is an enzyme with the activity of a beta C-S lyase (cystathionase). *J Bacteriol* 177:5035–9.
14. Li G, Young KD. 2013. Indole production by the tryptophanase TnaA in *Escherichia coli* is determined by the amount of exogenous tryptophan. *Microbiology* 159:402–10.
15. Soutourina J, Blanquet S, Plateau P. 2001. Role of D-cysteine desulfhydrase in the adaptation of *Escherichia coli* to D-cysteine. *J Biol Chem* 276:40864–72.
16. Wada M, Awano N, Haisa K, Takagi H, Nakamori S. 2002. Purification, characterization and identification of cysteine desulfhydrase of *Corynebacterium glutamicum*, and its relationship to cysteine production. *FEMS Microbiol Lett* 217:103–7.
17. Dassler T, Maier T, Winterhalter C, Bock A. 2000. Identification of a major facilitator protein from *Escherichia coli* involved in efflux of metabolites of the cysteine pathway. *Mol Microbiol* 36:1101–12.
18. Franke I, Resch A, Dassler T, Maier T, Bock A. 2003. YfiK from *Escherichia coli* promotes export of O-acetylserine and cysteine. *J Bacteriol* 185:1161–6.
19. Pittman MS, Corker H, Wu G, Binet MB, Moir AJ, Poole RK. 2002. Cysteine is exported from the *Escherichia coli* cytoplasm by CydDC, an ATP-binding cassette-type transporter required for cytochrome assembly. *J Biol Chem* 277:49841–9.
20. Yamada S, Awano N, Inubushi K, Maeda E, Nakamori S, Nishino K, Yamaguchi A, Takagi H. 2006. Effect of drug transporter genes on cysteine export and overproduction in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 72:4735–42.
21. Takumi K, Nonaka G. July 2014. An L-amino acid-producing bacterium and a method for producing an L-amino acid. European patent EP2218729(B1).
22. Ohtsu I, Wiriyathanawudhiwong N, Morigasaki S, Nakatani T, Kadokura H, Takagi H. 2010. The L-cysteine/L-cystine shuttle system provides reducing equivalents to the periplasm in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 285:17479–87.

23. Kutukova EA, Livshits VA, Altman IP, Ptitsyn LR, Ziyatdinov MH, Tokmakova IL, Zakataeva NP. 2005. The *yeaS* (*leuE*) gene of *Escherichia coli* encodes an exporter of leucine, and the Lrp protein regulates its expression. *FEBS Lett* 579:4629–34.
24. Pittman MS, Robinson HC, Poole RK. 2005. A bacterial glutathione transporter (*Escherichia coli* CydDC) exports reductant to the periplasm. *J Biol Chem* 280:32254–61.
25. Poole RK, Gibson F, Wu G. 1994. The *cydD* gene product, component of a heterodimeric ABC transporter, is required for assembly of periplasmic cytochrome c and of cytochrome bd in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 117:217–23.
26. Nishino K, Yamaguchi A. 2001. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183:5803–12.
27. Monroe RS, Ostrowski J, Hryniewicz MM, Kredich NM. 1990. In vitro interactions of CysB protein with the *cysK* and *cysJ/H* promoter regions of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 172:6919–29.
28. Hryniewicz MM, Kredich NM. 1991. The *cysP* promoter of *Salmonella typhimurium*: characterization of two binding sites for CysB protein, studies of in vivo transcription initiation, and demonstration of the anti-inducer effects of thiosulfate. *J Bacteriol* 173:5876–86.
29. Parry J, Clark DP. 2002. Identification of a CysB-regulated gene involved in glutathione transport in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 209:81–5.
30. Henikoff S, Haughn GW, Calvo JM, Wallace JC. 1988. A large family of bacterial activator proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6602-6.
31. Flavin M, Slaughter C. 1965. Synthesis of the succinic ester of homoserine, a new intermediate in the bacterial biosynthesis of methionine. *Biochemistry* 4:1370-5.
32. Ostrowski J, Kredich NM. 1989. Molecular characterization of the *cysJ/H* promoters of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: regulation by *cysB* protein and *N*-acetyl-L-serine. *J Bacteriol* 171:130-40.
33. Yamamoto K, Oshima T, Nonaka G, Ito H, Ishihama A. 2011. Induction of the *Escherichia coli* *cysK* gene by genetic and environmental factors. *FEMS Microbiol Lett* 323:88–95.
34. Hara Y, Kadotani N, Izui H, Katashkina JI, Kuvaeva TM, Andreeva IG, Golubeva LI, Malko DB, Makeev VJ, Mashko SV, Kozlov YI. 2012. The complete genome sequence of *Pantoea ananatis*

- AJ13355, an organism with great biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:331–41.
35. Coutinho TA, Venter SN. 2009. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. *Mol Plant Pathol* 10:325–35.
  36. Katashkina JI, Hara Y, Golubeva LI, Andreeva IG, Kuvaeva TM, Mashko SV. 2009. Use of the lambda Red-recombineering method for genetic engineering of *Pantoea ananatis*. *BMC Mol Biol* 10:34.
  37. Andreeva IG, Golubeva LI, Kuvaeva TM, Gak ER, Katashkina JI, Mashko SV. 2011. Identification of *Pantoea ananatis* gene encoding membrane pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent glucose dehydrogenase and *pqqABCDEF* operon essential for PQQ biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* 318:55–60.
  38. Moriya M, Izui H, Ono E, Matsui K, Ito H, Hara Y. December 2001. L-glutamic acid-producing bacterium and method for producing L-glutamic acid. US patent 6331419(B1)
  39. Kuvaeva TM, Smirnov SV, Ivanova ON, Kivero AD, Katashkina JY. June 2015. Bacterium of enterobacteriaceae family producing L-aspartic acid or L-aspartic acid-derived metabolites and a method for producing L-aspartic acid or L-aspartic acid-derived metabolites. US patent US9051591(B2).
  40. Kumagai H, Suzuki H, Katayama T, Nawata M, Nakazawa H. June 2011. Mutant tyrosine repressor, a gene encoding the same, and a method for producing L-DOPA. US patent US7964709(B2).
  41. Dodge TG, Valle F. June 2011. Uncoupled productive and catabolic host cell pathways. European patent EP2055773(B1).
  42. Yoon SH, Kim JE, Lee SH, Park HM, Choi MS, Kim JY, Lee SH, Shin YC, Keasling JD, Kim SW. 2007. Engineering the lycopene synthetic pathway in *E. coli* by comparison of the carotenoid genes of *Pantoea agglomerans* and *Pantoea ananatis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:131–9.
  43. Jiang XW. May 2007. Using *Pantoea agglomerans* KFS-9 fungus to produce 2, 3 butanediol, and application in cosmetic. Chinese Patent Office, CN1958785 (A).
  44. Izui H, Hara Y, Sato M, Akiyoshi N. July 2003. Method for producing L-glutamic acid. US patent US6596517(B2).

45. Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6640-5.
46. Sycheva EV, Serebryanyy VA, Yampolskaya TA, Preobrazhenskaya ES, Stoyanova NV. May 2008. Mutant acetolactate synthase and method for producing branched-chain L-amino acids, Japanese patent JP5813907(B2).
47. Nonaka G, Takumi K. August 2011. L-cysteine-producing bacterium and a method for producing L-cysteine. US patent US8008048(B2).
48. Takumi K, Nonaka G. January 2014. L-cysteine-producing bacterium and method for producing L-cysteine. European patent EP2679680(A1).
49. Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
50. Awano N, Wada M, Kohdoh A, Oikawa T, Takagi H, Nakamori S. 2003. Effect of cysteine desulhydrase gene disruption on L-cysteine overproduction in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 62:239-43.
51. Miller JH. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
52. Gaitonde MK. 1967. A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. *Biochem J* 104:627-33.
53. Wiriyanawudhiwong N, Ohtsu I, Li ZD, Mori H, Takagi H. 2009. The outer membrane TolC is involved in cysteine tolerance and overproduction in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 81:903-13.
54. Levy S, Danchin A. 1988. Phylogeny of metabolic pathways: *O*-acetylserine sulphydrylase A is homologous to the tryptophan synthase beta subunit. *Mol Microbiol* 2:777-83.
55. Sirko A, Hryniewicz M, Hulanicka D, Bock A. 1990. Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: nucleotide sequence and expression of the *cysTWAM* gene cluster. *J Bacteriol* 172:3351-7.
56. Vrljic M, Sahm H, Eggeling L. 1996. A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* 22:815-26.

57. Nandineni MR, Gowrishankar J. 2004. Evidence for an arginine exporter encoded by *yggA* (*argO*) that is regulated by the LysR-type transcriptional regulator ArgP in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186:3539–46.
58. Hirokawa T, Boon-Chieng S, Mitaku S. 1998. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14:378–9.
59. Jack DL, Yang NM, Saier MH, Jr. 2001. The drug/metabolite transporter superfamily. *Eur J Biochem* 268:3620–39.
60. Ohtsu I, Kawano Y, Suzuki M, Morigasaki S, Saiki K, Yamazaki S, Nonaka G, Takagi H. 2015. Uptake of L-cystine via an ABC transporter contributes defense of oxidative stress in the L-cystine export-dependent manner in *Escherichia coli*. *PLoS One* 10:e0120619.
61. Ziyatdinov MK, Samsonov VV, Gusyatiner MM. March 2016. A method for producing an L-cysteine, L-cystine, a derivative or precursor thereof or a mixture thereof using a bacterium of enterobacteriaceae family. European patent EP2486123(B1).
62. Yokoyama K, Ishijima SA, Clowney L, Koike H, Aramaki H, Tanaka C, Makino K, Suzuki M. 2006. Feast/famine regulatory proteins (FFRPs): *Escherichia coli* Lrp, AsnC and related archaeal transcription factors. *FEMS Microbiol Rev* 30:89–108.
63. Wirtz M, Hell R. 2003. Production of cysteine for bacterial and plant biotechnology: application of cysteine feedback-insensitive isoforms of serine acetyltransferase. *Amino Acids* 24:195–203.
64. Kawano Y, Ohtsu I, Takumi K, Tamakoshi A, Nonaka G, Funahashi E, Ihara M, Takagi H. 2015. Enhancement of L-cysteine production by disruption of *yciW* in *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng* 119:176–9.
65. Savrasova EA, Stoyanova NV, Nonaka G, Yamazaki S, Takumi K. June 2013. Method for producing an L-amino acid using a bacterium of the Enterobacteriaceae family. US patent 8460903(B2).
66. Oguri T, Schneider B, Reitzer L. 2012. Cysteine catabolism and cysteine desulphydrase (CdsH/STM0458) in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 194:4366–76.
67. Snel B, Lehmann G, Bork P, Huynen MA. 2000. STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. *Nucleic Acids Res* 28:3442–4.
68. Danchin A. 2009. Cells need safety valves. *Bioessays* 31:769–73.

69. Chonoles Imlay KR, Korshunov S, Imlay JA. 2015. Physiological roles and adverse effects of the two cystine importers of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 197:3629–44.
70. Izui H, Moriya M, Hirano S, Hara Y, Ito H, Matsui K. 2007. Method for producing L-glutamic acid by fermentation accompanied by precipitation. US patent 20070134773(A1).
71. Nonaka G, Takumi K. 2011. L-cysteine-producing bacterium and a method for producing L-cysteine. US Patent 8008048(B2).
72. Tchong SI, Xu H, White RH. 2005. L-cysteine desulfidase: an [4Fe-4S] enzyme isolated from *Methanocaldococcus jannaschii* that catalyzes the breakdown of L-cysteine into pyruvate, ammonia, and sulfide. *Biochemistry* 44:1659-70.
73. Shimada T, Tanaka K, Ishihama A. 2016. Transcription factor DecR (YbaO) controls detoxification of L-cysteine in *Escherichia coli*. *Microbiology* 162:1698-1707.
74. Loddeke M, Schneider B, Oguri T, Mehta I, Xuan Z, Reitzer L. 2017. Anaerobic cysteine degradation and potential metabolic coordination in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 199.
75. Abalakina EG, Tokmakova IL, Gorshkova NV, Gak ER, Akhverdyan VZ, Mashko SV, Yomantas YAV. 2008. Phage Mu-driven two-plasmid system for integration of recombinant DNA in the *Methylophilus methylotrophus* genome. *Appl Microbiol Biotechnol* 81:191–200.
76. Doroshenko V, Airich L, Vitushkina M, Kolokolova A, Livshits V, Mashko S. 2007. YddG from *Escherichia coli* promotes export of aromatic amino acids. *FEMS Microbiol Lett* 275:312–8.
77. Livshits VA, Doroshenko VG, Mashko SV, Akhverdian VZ, Kozlov YI. August 2007. Amino acid producing strains belonging to the genus *Escherichia* and method for producing an amino acid. European patent EP1149911(B1).
78. Eggeling L, Flickinger MC. 2009. Microbial Metabolite Export, *Encyclopedia of Industrial Biotechnology* doi:10.1002/9780470054581.eib426. John Wiley & Sons, Inc.



## 原著論文

**Takumi K, Nonaka G.**

2016. Bacterial Cysteine-Inducible Cysteine Resistance Systems. *J Bacteriol* **198**:1384–1392.

**Nonaka G, Takumi K.**

2017. Cysteine degradation gene *yhaM*, encoding cysteine desulfidase, serves as a genetic engineering target to improve cysteine production in *Escherichia coli*. *AMB Express* **7**:90.

**Takumi K, Ziyatdinov MK, Samsonov V, Nonaka G.**

2017. Fermentative Production of Cysteine by *Pantoea ananatis*. *Appl Environ Microbiol* **83** (5). pii: e02502-16.

## 謝辞

本研究を学位論文にまとめるに当たり、多くの御支援と御指導を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻微生物学研究室准教授 有岡学先生に深く御礼申し上げます。

本研究を学位論文にまとめるに当たり、御助言と御指導を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻微生物学研究室教授 吉田稔先生、応用微生物学研究室教授 石井正治先生、細胞機能工学研究室教授 西山真先生、醗酵学研究室教授 大西康夫先生に深く御礼申し上げます。

研究全般にわたる多大なご助言、ご支援を賜りました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科ストレス微生物学研究室教授 高木博史先生、筑波大学准教授 大津巖生先生、博士研究員 河野佑介先生に深く御礼申し上げます。

研究全般にわたる多大なご助言、ご支援を賜りました AGRI Mikhail Gusyatiner 博士、Mikhail Kharisovich Ziyatdinov 博士、Viktor Samsonov 博士に御礼申し上げます。

論文執筆および研究全般にわたる多大なご支援、ご指導を賜りました味の素株式会社 伊藤久生 博士、中西一夫 博士、野中源 博士、鈴木智子 氏、武井謙典 氏、山崎俊介 氏に御礼申し上げます。