

# 論文内容の要旨

論文題目 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

氏名 宅見和浩

## 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の形成、並びに鉄・硫黄クラスターの形成に関与するなど、生体内において重要な機能を担っている。一方、システインは比較的低濃度で生育を阻害するなど、原核生物、真核生物共に細胞毒性を示す性質を保有していることが知られている。バクテリアでは、その細胞毒性を回避するために細胞内のシステイン濃度を制御する複数のシステムを備えていることが、主に *Escherichia 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。しかしながら、システインの制御メカニズムの一部、特に分解や排出機構はシステインに対する関与が不明確な部分が多く、未だ解明されていない部分が多く存在していると考えられている。

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 5,000 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における環境負荷に対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、システインは細胞への毒性や複雑な代謝のレギュレーションが障壁となるため発酵による効率的な生産が非常に難しく、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 *Pantoea ananatis* を発酵生産の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* の両微生物を研究材料として選定し、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、議論が可能になると考えられた。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、バクテリアが保有するシステイン制御メカニズムのさらなる解明に加え、システイン発酵への応用可能性についても検討し、発酵による大量生産(高濃度化)の実現を目指した。

## 2. 結果

本研究では、まず始めに細胞内システイン濃度の制御に関わる因子を抽出することを目指し、*P. ananatis*、並びに *E. coli* のゲノム DNA ライブラリーから、システイン耐性に関与する遺伝子をスクリーニングした。また、得られた因子のシステイン発酵への応用可能性を、システイン生産モデル株を用いて検証した。

システイン耐性を指標とした *P. ananatis* のゲノム DNA ライブラリーからのスクリーニングでは、システインの分解に関わる cysteine desulfhydrase (以下 CD) をコードする *ccdA* (cysteine-inducible cysteine desulfhydrase A, locus tag: PAJ\_0331)、およびシステイン排出ポンプをコードする *cefA* (cysteine efflux pump A, locus tag: PAJ\_3026)、*cefB* (cysteine efflux pump B, locus tag: PAJ\_p0018) と筆者らにより命名された 3 つの因子を同定した (図 1)。これら同定遺伝子のうち、*ccdA*、*cefA* の転写は遺伝子のすぐ上流に位置する転写調節遺伝子である *ccdR* (locus tag: PAJ\_0332)、*cefR* (locus tag: PAJ\_3027) によりそれぞれ制御されており、システイン添加により速やかに、かつ強力的に誘導されることを明らかとした。特に *ccdA* は、*E. coli* にて見出された過去の CD とは異なり、*P. ananatis* においてほぼ単独で作用し、システインに直接応答する CD であることが判明した。続いて *P. ananatis* を宿主とするシステイン生産モデル株を用い、同定された 3 因子のシステイン生産への応用可能性を検証した。CD をコードする *ccdA* は遺伝子欠損により、排出ポンプをコードする *cefA*、*cefB* は過剰発現により、システイン生産量の増加が認められた。以上の結果より、*ccdA*、*cefA*、並びに *cefB* は *P. ananatis* においてシステイン耐性に関与する因子であり、生合成の調節機構に加わる重要な細胞内システイン制御機構を担っている可能性が示唆され、またシステイン発酵への応用が期待される因子であることが明らかとなった。

一方、システイン耐性を指標とした *E. coli* のゲノム DNA ライブラリーからのスクリーニングでは、*eamA* というシステイン/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システイン排出ポンプ、および *Methanocaldococcus jannaschii* の *cdsB* という cysteine desulfidase 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と相同性を持つ *yhaM* が取得された。*eamA* はシステインの排出ポンプとしても研究が進んでおり、システイン発酵への応用例も報告されている。そこで本研究では、*yhaM* に関して解析を実施した。*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 (*yhaO*) により制御されていることが知られているが、本研究を通じてシステイン添加により非常に速やかに、かつ強力的に誘導されることが明らかとなった。また、*E. coli* を宿主とするシステイン生産モデル株を用い、*yhaM* のシステイン生産への応用可能性を検証したところ、*yhaM* 欠損によりシステインの生産量が増加した。以上の結果より、*yhaM* はシステインにより発現制御される分解酵素をコードする遺伝子であり、システイン発酵への応用が期待される因子であることが示された。

システイン耐性を指標とするスクリーニングを通じ、細胞内システイン濃度の制御に必要な分解因子や排出ポンプの同定に成功した。続いて、より高いレベルでの発酵生産への応

用を目指し、*P. ananatis* を宿主とする高レベルなシステインの発酵生産株を用い、同定された因子の効果を検証するとともに、さらなる高生産菌の開発を目指した。

高レベルシステイン生産株は、システイン生合成における鍵酵素である serine acetyltransferase (SAT) および 3-phosphoglycerate dehydrogenase (3-PGDH) のフィードバック阻害型遺伝子、システイン排出因子 *leuE*、硫酸根・チオ硫酸根の取り込み因子 *cysPUWA* が過剰発現されており、1.2 g/L のシステイン蓄積が得られることが知られている AG4854 株を用いた。同定した因子の効果検証に際し、AG4854 株において細胞内のシステイン濃度が十分に高い(分解や排出が律速点となる)必要があることが予想された。そこで検証に先立ち、システイン生合成経路上にある各種遺伝子を AG4854 株に導入し、生合成経路上における律速点探索を実施した。探索の結果、システインの前駆体である *O*-acetylserine と、硫化物もしくはチオ硫酸の反応を触媒し、それぞれシステインおよび *S*-sulfo cysteine を生成する酵素である OASS-B (*O*-acetylserine sulfhydrylase-B、図 1 参照) をコードする *cysM* が律速である事が明らかとなった。

*cysM* の発現レベル向上によるシステイン生産量の増加が認められた一方、*cysM* を一定以上のレベルで過剰発現した場合には、逆にシステインの生産量が低下する現象も併せて観察された。その原因を探索したところ、*cysM* の過剰発現に伴って細胞内システイン濃度が上昇し、*ccdA* が誘導されてシステインの分解が生じ、生産量が低下することを見出した。そこで、*P. ananatis* にて主たる CD として機能する *ccdA* の欠損による分解の回避、もしくはシステイン排出ポンプとして機能する *cefA*、*cefB* の過剰発現による排出強化により、細胞内システイン濃度の低下および生産量の向上を目指した。その結果、どちらの手法においてもシステイン生産量の増加が認められ、同定された因子が高レベルの発酵生産にも有効であることが明らかとなった。特に排出ポンプを過剰発現させた場合に顕著な効果が得られ、最大 2.2 g/L のシステイン蓄積を確認した。この値は、過去に報告されている *E. coli* を宿主としたシステイン生産菌とほぼ同等の値である。

### 3. まとめ

本研究では *P. ananatis* および *E. coli* の両微生物を用い、システイン耐性に関連する遺伝子の探索を実施した。その結果、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と推察される 5 つの遺伝子、*ccdA*、*cefA*、*cefB*、*yhaM*、*eamA* を抽出した。さらに、システイン分解に関与する *ccdA*、*yhaM* は遺伝子欠損により、排出に関与する *cefA*、*cefB* は遺伝子増幅することにより、システイン生産量の増加が観察され、システイン生産への応用が可能であることを明らかとした。また、*ccdA*、*cefA*、*yhaM* はシステインにより速やかに誘導されることを見出し、バクテリアが保有するシステインに特化した細胞内濃度の調節機構を明らかとした。

さらに *P. ananatis* を宿主とする高レベルなシステイン生産菌 AG4854 株を用いて生合成経路上の律速点を探索し、OASS-B をコードする *cysM* が律速であることを明らかとした。

一方、*cysM* をあるレベル以上に増幅することにより細胞内システイン濃度が上昇、*ccdA* が誘導され、システインの分解による生産量の低下が認められた。分解を回避し、生産量を増加させるため、分解遺伝子 (*ccdA*) 欠損、もしくは排出ポンプ (*cefA*、*cefB*) の過剰発現を行ったところ、大幅な生産量向上を確認した。本結果により、*P. ananatis* を宿主とし、*E. coli* を宿主とした生産株とほぼ同等の力価を持つ株の構築に成功した。

以上のように、本研究成果はバクテリアにおける細胞内システイン濃度の制御機構を解明するのみならず、システイン発酵の産業化にも活用可能であり、今後の発展に向けた基盤となるものと期待される。

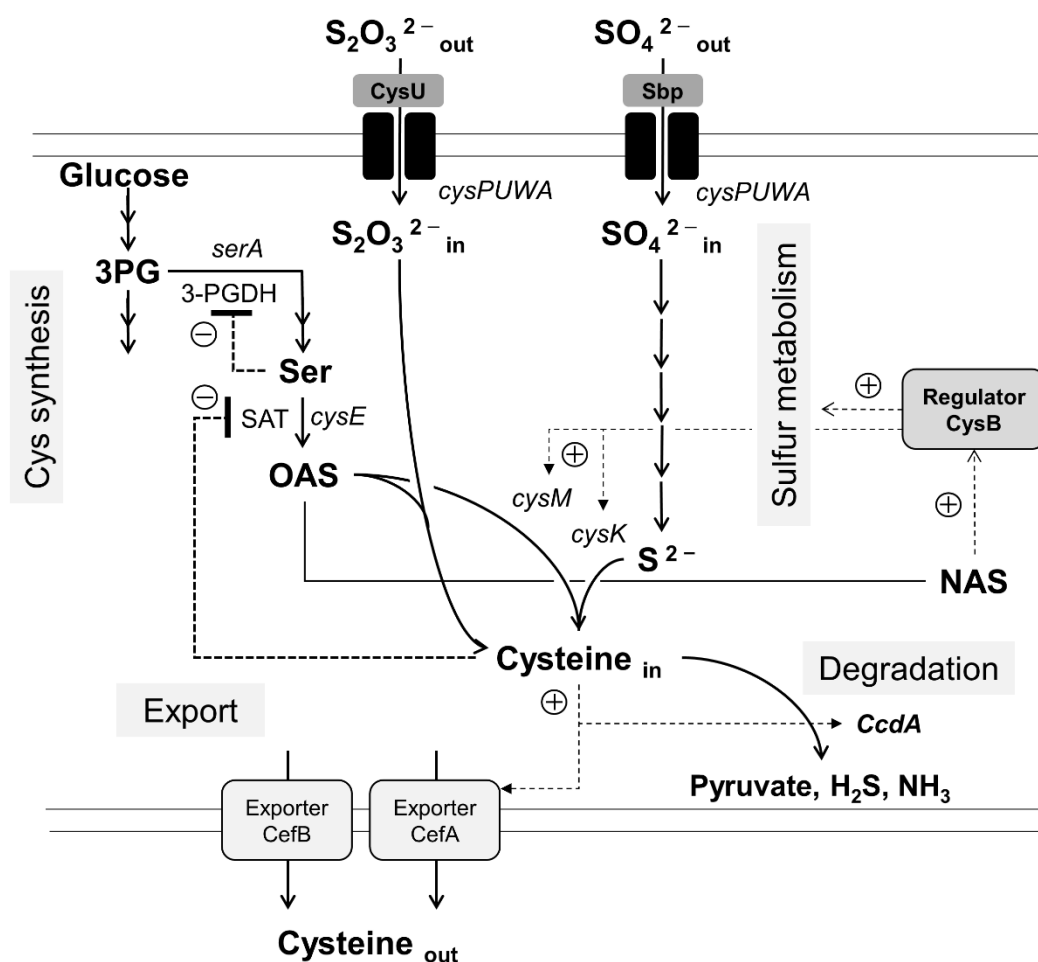


図 1. *P. ananatis* における細胞内システインレベルの推定制御メカニズム

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。