

3S-Bp02 「硫黄代謝」から見える細胞代謝の世界～サルファインデックス解析の活用による合理的な分子育種～

○河野 祐介, 秦野 智行, 天津 厳生, 高木 博史
(奈良先端大・バイオ)
ykawano@bs.naist.jp

炭素や窒素の代謝と比べて「硫黄」の代謝には未知の部分は多いが、LC-MS/MSを用いた硫黄化合物種に特化したメタボローム解析の技術発展に伴い、我々は新たな硫黄代謝メカニズムやその巧みな制御機構を明らかにしつつある。本シンポジウムでは、大腸菌や酵母などの微生物を基軸に、最新の硫黄メタボローム解析や次世代シーケンス、発光タンパク質 Lux システムを活用した培養時のリアルタイム遺伝子発現解析、*in silico* 解析(転写因子の既知標的プロモーター配列群からのコンセンサス配列の抽出とゲノムサーチによる転写因子の新規な標的遺伝子の探索)などの解析テクニックの組合せによる硫黄代謝メカニズムの解明および合理的な分子育種による有用物質生産株の創製への取り組みを紹介する。

このようなアプローチで、我々は、大腸菌の機能未知遺伝子 *yciW* が硫黄代謝に関わることを見出し、システインの毒性緩和や、システイン下流の代謝産物であるグルタチオンもしくはホモシステインへの硫黄フローへの関与を明らかにした。さらに、この知見を含硫アミノ酸であるシステインの大量生産株の育種へと展開し、*yciW* 遺伝子の機能欠損がシステイン生産性を亢進することを明らかにした。

他方、「硫黄」化合物では未知であった各栄養源の選択的な利用機構についても検討し、硫酸イオン (SO_4^{2-}) に対して、よりエネルギー的にシステイン合成の効率が高いチオ硫酸イオン ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) が、優先利用される現象(チオ硫酸リプレッション)を大腸菌において世界で初めて発見した。さらに、サプレッサー変異株の解析や二重破壊株ライブラリーの解析から、チオ硫酸リプレッションに関与する遺伝子の同定にも成功し、その制御メカニズムを明らかにしつつある。このチオ硫酸リプレッションを解除したシステイン生産大腸菌の分子育種が、安価な硫酸塩からのシステイン発酵生産に有用であることも突き止めた。以上の結果をもとに、従来のシステイン生産菌と比べて、安価な硫酸塩からのシステイン発酵生産性の向上と低コスト化に成功した。

現在、システイン生産に有効な遺伝子改変技術の応用により、ヒトなどで高い抗酸化能を発揮し、システインを前駆物質とする「エルゴチオニン」のような付加価値の高い含硫機能性物質の大量生産に向けた合成生物学的な分子育種に挑戦している。本発表では、これらのプロセスやその効果について紹介・議論したい。なお、本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の支援を受けて行った。

Cellular metabolism world from the viewpoint of “sulfur metabolism” ~rational molecular breeding by making use of sulfur index analysis

○Yusuke Kawano, Tomoyuki Hatano, Iwao Ohtsu, Hiroshi Takagi
(Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words L-cysteine biosynthesis, sulfur metabolism, *Escherichia coli*

3S-Bp03 芳香族アミノ酸水酸化酵素の物質生産への応用

○佐藤 康治, 大利 徹
(北大院・工)
syasu@eng.hokudai.ac.jp

近年、代謝工学や合成生物学的手法を駆使し、天然から入手困難な有用物質を発酵生産する代謝経路を *de novo* で設計、遺伝子組換え系の確立された微生物に実装するアプローチが注目されている。この要因の1つとして、次世代シーケンサーの登場により多種多様な生物種から遺伝子情報が容易に取得でき、新規生成経路の発見が加速されていることが挙げられる。このように新規遺伝子の探索が進められる一方で、既知遺伝子の中から物質生産系の拡張が期待される遺伝子を発掘することも重要といえる。このような観点から、我々は過去の情報を活用し、天然から入手困難なヒドロキシチロソールを生産する人工代謝経路を構築したので紹介したい (Metab. Eng. 2012)。

芳香族アミノ酸水酸化酵素 (AAAH) は、Tyr や Trp を神経伝達物質として重要な L-DOPA や 5-ヒドロキシトリプトファンへ、また Phe を Tyr へと変換する。つまり、芳香族アミノ酸の芳香族側鎖へ酸素分子と補酵素テトラヒドロbiopterin (BH4) を用い、位置選択的に水酸基を導入する反応を触媒する。ヒトにおいて、これら遺伝子の欠損はフェニルケトン尿症やジストニア等の一因となることから、医療分野で主に研究が進められてきた。他方、本酵素が触媒する位置選択的な水酸化反応は物質生産の観点から興味もたれるが、発酵生産への応用はこれまで報告例はなかった。この原因として、本酵素の利用する補酵素 BH4 が挙げられる。つまり、発酵生産に利用される大腸菌や酵母は BH4 を生合成できないため、効果的に反応が進行しないと考えられていた。しかし我々は、大腸菌に BH4 生合成および再生に関与する遺伝子すべてを導入することで、この課題は克服できると考え検討を進めた。この検討過程で BH4 再生関連遺伝子とチロシン水酸化酵素 (TyrH) 遺伝子を共発現させた場合、生成物 L-DOPA が得られることを発見した。この結果は、大腸菌内に BH4 代替物が存在することを意味している。調査の結果、大腸菌は BH4 とは側鎖構造の異なるテトラヒドロbiopterin (MH4) を生合成し、さらにその生合成遺伝子 *folX* および *folM* が同定されていることもわかった (Ikemoto, K. et al., Biol. Chem. 2002, Pribat, A. et al., J. Bacteriol. 2010)。そこで MH4 の関与を証明するため *folX* および *folM* 破壊株の L-DOPA 生産能を検証した。その結果、その合成能が消失したため MH4 が BH4 代替物として機能することが証明された。以上より、AAAH は大腸菌を宿主とした物質生産へ応用可能であることが示された。

次に、TyrH のヒドロキシチロソール生産への応用について検討した。ヒドロキシチロソールはポリフェノールの1種で、オリーブオイルに見出される強力な抗酸化物質である。これはオリーブが産生するオレウロペインの分解により得られるが、その生合成経路は複雑である。そこでより単純な代謝経路を設計し、発酵生産の可能性について検討した。この設計した代謝経路では L-DOPA は脱炭酸酵素、モノアミン酸化酵素、および内性アルコール脱水素酵素によりヒドロキシチロソールへと変換される。ここでポイントとなるのは脱炭酸酵素の基質特異性である。つまり Tyr が基質となりチロソールが副生される経路を遮断するため、L-DOPA 特異的脱炭酸酵素が必要である。探索の結果、ブタ由来酵素が目的に合致した基質特性を有することを見出し適用したところ、予想通りチロソールの副生なく目的化合物を生産できることを明らかとした。

現在は AAAH の利用を拡大すべく検討を進めている。バクテリアも AAAH である Phe 水酸化酵素 (PheH) をもつため、それを利用した Tyr 生産の可能性について検討しているので報告する。

Application of aromatic amino acid hydroxylases to fermentative production

○Yasuharu Satoh, Tohru Dairi
(Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words aromatic amino acid hydroxylase, tetrahydrobiopterin regeneration, neurotransmitter biosynthesis