

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	西村 拓
論文題目	Molecular basis for gene expression under anaerobic nitrate respiration in <i>Corynebacterium glutamicum</i> (コリネ型アミノ酸生産菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i> の嫌気硝酸呼吸時における遺伝子発現の分子基盤)		
(論文内容の要旨)			
グラム陽性コリネ型細菌<i>Corynebacterium glutamicum</i> は、グルタミン酸をはじめとした各種アミノ酸の工業生産に広く利用されている有用微生物である。本菌による従来のアミノ酸生産においては、酸素が欠乏すると、乳酸などの有機酸発酵産物の蓄積が起り、生産性が低下する。一方、近年ではこの酸素抑制条件下における有機酸生成を基盤として、バイオマス由来糖類からの化学原料および燃料の生産技術の開発が進められている。<i>C. glutamicum</i>は硝酸還元能を有し、その全ゲノム配列には硝酸呼吸への関与が予想される<i>narKGHJI</i>遺伝子クラスターが存在する。しかしながら、本菌は偏性好気性細菌としてこれまで認識されており、嫌気呼吸による生育は報告されていなかった。本論文では、<i>C. glutamicum</i>が硝酸呼吸により嫌気生育する通性嫌気性細菌であることを明らかにし、硝酸呼吸に必須な<i>nar</i>オペロンの転写制御機構の解析を行った。さらに、トランスクリプトーム解析により、本菌の嫌気硝酸呼吸時における遺伝子発現応答の全容を明らかにした。その主な内容は以下の通りである。 1) 硝酸塩を電子受容体とした<i>C. glutamicum</i>の嫌気培養試験の結果、本菌が硝酸呼吸により嫌氣的に生育することを初めて示し、<i>narKGHJI</i>遺伝子領域が硝酸還元酵素をコードし、硝酸呼吸に必須であることを明らかにした。 2) <i>narKGHJI</i>遺伝子領域の転写産物の解析から、<i>narKGHJI</i>遺伝子群が<i>narK</i> を5' 末端とする単一のオペロンを形成し、同オペロンの発現が嫌気硝酸呼吸条件下において顕著に誘導されることを示した。 3) <i>narKGHJI</i>オペロンのすぐ下流に位置する<i>arnR</i>遺伝子の欠損株 (Δ<i>arnR</i>) の硝酸還元能および<i>nar</i>オペロン転写量の解析から、<i>arnR</i>遺伝子が、好気条件下における<i>nar</i>オペロンの転写抑制に関与することを明らかにした。また、DNAマイクロアレイを用いた Δ<i>arnR</i>株の網羅的な遺伝子発現解析から、<i>nar</i>オペロンと同様に、一酸化窒素 (NO) の解毒への関与が予想されるフラボヘモグロビンをコードする<i>hmp</i>遺伝子の転写抑制に<i>arnR</i>遺伝子が関与することを明らかにした。 4) <i>arnR</i>遺伝子産物(ArnRタンパク質)が、<i>nar</i>オペロン、<i>hmp</i>遺伝子、および自身をコードする<i>arnR</i>遺伝子のプロモーター領域に特異的に結合する新規な転写因子であることを示し、これら3つの標的遺伝子のプロモーター領域内に存在するArnRの結合配列を決定した。 5) ArnRタンパク質が、鉄硫黄タンパク質に特徴的な320 nm、420 nm付近の吸収ピークを持つことを示した。C末端領域の3つのシステイン残基 (C179、C193、C223) をそれぞれアラニン残基に置換した変異型ArnRタンパク質が、いずれもこれらの波長に吸収ピークを持たないことから、ArnRがこれら3つのシステイン残基に配位結合した鉄硫黄クラスターと予想されるコファクターを持つことを示した。 6) 変異型ArnRは、<i>nar</i>オペロンおよび<i>hmp</i>遺伝子のプロモーター領域への結合活性を完全に消失しており、また、還元剤2-メルカプトエタノール処理によって、ArnR			

のDNA結合活性が著しく阻害を受けることから、酸素またはレドックスに応答した ArnRの活性制御が、3つのシステイン残基に配位結合したコファクターを通して行われることを示した。

- 7) 野生型あるいは3つの変異型ArnRをそれぞれ発現するプラスミドを $\Delta arnR$ 株に導入し、好気条件下における *nar* オペロンおよび *hmp* 遺伝子の転写レベルを評価した。その結果、3つのシステイン残基が、ArnRによる両標的遺伝子の転写抑制に必要であることが明らかとなった。
- 8) *nar* プロモーター領域内に存在するArnR結合配列の上流に、大腸菌CRPのホモログであるGlxRの推定結合配列を発見し、GlxRタンパク質がcAMP依存的にこの配列に結合することを示した。
- 9) *nar* プロモーター領域内GlxR結合配列への変異導入、およびcAMPの合成に参与する *cyaB* 遺伝子の欠損によるGlxRの転写活性への影響を、 β -ガラクトシダーゼを発現レポーターとして評価した結果、GlxRが、好気および嫌気硝酸呼吸両条件下において、ArnRとは独立して、*nar* オペロンの転写をcAMP依存的に正に制御することを明らかにした。
- 10) *C. glutamicum* 全3080遺伝子を対象に、嫌気硝酸呼吸条件下における網羅的な発現解析をDNAマイクロアレイを用いて行った結果、*nar* オペロンおよび *hmp* 遺伝子に加えて、中央代謝系、呼吸鎖、DNA損傷に対する修復系であるSOS応答など様々な細胞機能に参与する多数の遺伝子の発現変化が見出された。
- 11) 嫌気硝酸呼吸時に観察されたSOS応答に特徴的な転写および形態レベルの変化が、SOS応答遺伝子群の転写活性化に必要な *recA* 遺伝子の破壊株では観察されないこと、また、同条件下における *recA* 遺伝子破壊株の生存率が、野生株のそれと比較して著しく低下することから、RecA依存的なSOS応答が、嫌気硝酸呼吸条件下におけるコリネ型細菌の生存に重要な役割を果たしていることを明らかにした。この結果は、細菌におけるSOS応答の新しい生理的機能を示したものである。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* は、グルタミン酸をはじめとした各種アミノ酸の工業生産に広く利用されている。本菌による効率的なアミノ酸生産を行うためには、好氣的条件の維持が重要である。一方、酸素抑制条件下における有機酸生成を基盤として、バイオマス由来糖類からの化学原料および燃料の生産技術の開発が進められている。*C. glutamicum* は硝酸還元能を有し、その全ゲノム配列には、細菌に広く保存され硝酸呼吸への関与が予想される *narKGHJI* 遺伝子クラスターが存在する。しかしながら、本菌は偏性好気性細菌としてこれまで認識されていたことから、本菌の嫌気呼吸による生育についての報告はなかった。本論文では、*C. glutamicum* が硝酸呼吸により嫌気生育することを初めて明らかにし、硝酸呼吸に必須な *nar* オペロンの転写制御機構の解析を行った。また、嫌気硝酸呼吸時におけるトランスクリプトーム解析を行った。評価すべき点は以下の5点である。

- 1) *C. glutamicum* が硝酸呼吸により嫌気生育する通性嫌気性細菌であることを初めて明らかにし、硝酸呼吸に必須な *narKGHJI* オペロンの発現が、嫌気硝酸呼吸条件下において顕著に誘導されることを示した。
- 2) *nar* オペロンおよびフラボヘモグロビン (*hmp*) 遺伝子のプロモーター領域に結合し、好気条件下においてこれらの標的遺伝子の発現を抑制する新規な転写因子 ArnR を同定した。
- 3) 酸素またはレドックスに応答した ArnR による標的遺伝子の転写制御が、C 末端領域の3つのシステイン残基 (C179、C193、C223) に配位結合した鉄硫黄クラスターを介して行われることを明らかにした。
- 4) 大腸菌 CRP のホモログ GlxR が、ArnR とは独立して、*nar* オペロンの転写を cAMP 依存的に正に制御することを明らかにした。
- 5) 嫌気硝酸呼吸条件培養時の *C. glutamicum* のトランスクリプトーム解析から、様々な細胞機能に関与する多数の遺伝子の発現変化を明らかにした。特に DNA 損傷時に誘導される SOS 応答が、嫌気硝酸呼吸条件下における *C. glutamicum* の生存に重要なことを明らかにし、細菌における SOS 応答の新しい生理的機能を示した。

以上のように、本論文では、偏性好気性であると長年認識されていたアミノ酸生産菌 *C. glutamicum* が、硝酸呼吸により嫌氣的に生育する通性嫌気性菌であることを見出し、硝酸呼吸遺伝子のユニークな発現制御機構を持っていることを明らかにした。また、本菌の嫌気硝酸呼吸時における遺伝子発現応答の全容を明らかにした。これらの成果は、本菌の産業利用において鍵となる嫌気代謝の調節機構の解明に重要な知見を提供するもので、制御発酵学、応用微生物学、分子生物学などの分野に大きく寄与するものである。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成23年4月14日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降