

異種タンパク質を分泌生産する コリネ型細菌の代謝フラックス解析

馬越元基¹、平沢 敬¹、古澤 力¹、竹中康浩²、菊池慶実²、清水 浩^{1*}

¹大阪大学 大学院情報科学研究科 パイオ情報工学専攻

²味の素株式会社 発酵技術研究所

*〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-5 電話/Fax: 06-6879-7446

E-mail: shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* はアミノ酸の発酵生産に用いられる一方、異種タンパク質を分泌生産させる際の宿主として注目されている。昨年度の本大会において我々は、放線菌由来のトランスグルタミナーゼを分泌生産する組換えコリネ型細菌について、細胞内代謝の変化とタンパク質分泌能の関係を報告した。本研究では、このトランスグルタミナーゼを分泌生産するコリネ型細菌の細胞内代謝を詳細に解析するために、¹³C 代謝フラックス解析を行った。また、代謝フラックス解析の結果をもとに、トランスグルタミナーゼの生産性を向上させることが可能であるのか検討した。

1. はじめに

コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* はグルタミン酸の生産菌として発見され [1, 2]、以来多くのアミノ酸の工業生産に用いられている。近年、この *C. glutamicum* を用いた異種タンパク質の分泌生産系が構築され、数百 mg/L 以上の放線菌由来のトランスグルタミナーゼ (TGase) の分泌生産に成功している [3]。コリネ型細菌は、宿主本来のタンパク質分泌量が少ない、またプロテアーゼ活性が無いなどの利点から、異種タンパク質分泌系の宿主としても高い潜在能力を持っていると期待される。

昨年度の本大会にて筆者らは、コリネ型細菌を用いた異種タンパク質の分泌生産系においては、代謝と生産性に何らかの関連があることを報告した [4]。すなわち、代謝の制御によって、その生産性を向上させることが可能であると期待される。そこで、¹³C 代謝フラックス解析 (¹³C-MFA) により細胞の代謝状態を定量化することとした。この手法は炭素の安定同位体である ¹³C で標識した炭素源を細胞に取り込ませ、その代謝産物中の ¹³C 濃縮度を分析することで、炭素源の代謝経路への流束を推定するものである。本研究ではこの問題を解消し、タンパク質由来のアミノ酸を利用した ¹³C-MFA によって代謝の変動を解析する系を構築し、その技術を異種タンパク質を分泌生産するコリネ型細菌

菌に適用した。そして ¹³C-MFA の結果に基づき TGase の生産性向上のための戦略を導き出し、評価した。

2. 方法

(1) 使用菌株・培養

本研究では、放線菌由来の TGase を分泌生産する組換えコリネ型細菌 *C. glutamicum* YDK010/pPSPTG11 および空ベクターを導入した株 YDK010/pPK4 を使用した [3]。培養には 500 ml 容ジャーファーメンターを用い、250 ml の合成培地にて回分培養を行った。また、¹³C-MFA のために、¹³C 標識グルコース ([1-¹³C]グルコース・[U-¹³C]グルコース) を培養開始時から加えた。

(2) ¹³C-MFA

培養途中で経時的に培養液を回収し、遠心分離により菌体を取得した。取得した菌体を塩酸により加水分解し、菌体構成アミノ酸サンプルを得た。その後、サンプルを誘導体化し、ガスクロマトグラフ-質量分析 (GC-MS) に供することで、各アミノ酸の ¹³C 濃縮度を測定した。そして、培養中にどの程度細胞が ¹³C で標識されたのかを考慮しながら、測定したアミノ酸の ¹³C 濃縮度に基づき、細胞内代謝フラックス分布を推定した。

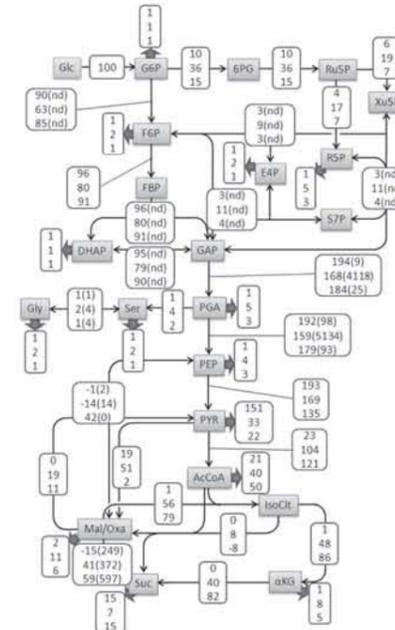


図 1 TGase 分泌生産株の代謝フラックス分布
OUR/GUR 比が 0.22 (上段)、1.4 (中段)、2.0 (下段) のときの代謝フラックス分布を示す。なお、それぞれにおける TGase の糖消費に対する収率は 0.22、1.2、0.50 (mg/mmol glucose consumed) であった。

3. 結果と考察

(1) タンパク質由来のアミノ酸を用いた代謝フラックス解析系の確立

代謝状態の変動がある培養系では、タンパク質由来のアミノ酸にはさまざまな情報が混在する。その中から、必要な情報のみを抽出することで、代謝フラックス解析に適用することを検討した [5]。

あるサンプリング時間でのアミノ酸の ¹³C 濃縮度データを X_1 、その次のサンプリング時間でのアミノ酸の ¹³C 濃縮度データを X_2 とする。この 2 つのサンプリング時点間の代謝状態が定常であり、かつその代謝状態を反映した真の ¹³C 濃縮度データが A であるとする、以下の式が成り立つ。

$$X_2 = A \times G + X_1 \times (1 - G)$$

ただし G は ¹³C 標識基質を取り込んで増殖した細胞の割合を表す。そして、GC-MS により分析した X_1 および X_2 から、 G およびフラックス解析に必要な情報である A を導き、代謝状態が刻々と変化する場合は代謝フラックス分布を推定することとした。

(2) コリネ型細菌を用いた異種タンパク質分泌生産系における代謝解析

複数回の培養の結果、TGase の分泌生産においては、酸素取り込み速度 (OUR) とグルコース取り込み速度

(GUR) の比 OUR/GUR に応じて、タンパク質の収率が変化することを昨年度の本大会にて報告した [4]。特に培養後期には経時的な OUR/GUR 比の増加とタンパク質収率の低下が見られた。そこで、(1) で確立した技術を適用し、代謝状態とタンパク質生産性の関係を解析した。その結果、培養後期に TCA サイクルへのフラックス比が増加することがわかった。TCA サイクルへのフラックス比の増加は、細胞内の NADH/NAD⁺ 比の上昇を招き、その結果解糖系が阻害されることで、OUR/GUR 比が上昇したと考えられた。よって、OUR/GUR 比を低下させることが、TGase の生産性の向上につながるかと期待された。

(3) ¹³C-MFA の結果に基づく TGase 生産性の向上

(2) の結果を踏まえて、乳酸生産を促すことによって細胞内の NADH/NAD⁺ 比を低下させることを試みた。乳酸トランスポーターはプロトンの排出と同時に乳酸を細胞外へ排出するため、細胞外のプロトン濃度が低い方が乳酸生産に有利だと考え、培養 pH を引き上げた。その結果、OUR/GUR 比の経時的な増加傾向が見られなくなり、タンパク質収率の低下傾向が穏やかになった。これにより、最終的なタンパク質の収率が 1.3 倍に上昇した。フラックス解析技術を用いて代謝状態の変化を解析し、その結果に基づいた戦略により異種タンパク質の生産性向上に成功した。

4. 今後の展望

代謝フラックス解析は今後、多様な目的のために利用可能な技術としてますます発展するだろう。コリネ型細菌を用いた異種タンパク質の生産においても、更なる知見の蓄積によって、生産性向上にむけた強力なツールの一つとして活用していきたいと考えている。

参考文献

[1] Kinoshita S, et al.: J. Gen. Appl. Microbiol., 3, 193-205 (1957)
 [2] Udaka S: J. Bacteriol., 79, 754-755 (1960)
 [3] Date M, et al. J. Biotechnol., 110, 219-226 (2004)
 [4] 馬越元基ら: 第 61 回日本生物工学会大会要旨集 2Lp27 (2009)
 [5] Antoniewicz M. R., et al.: Metab. Eng., 90, 277-292 (2007)