

平成21年度科学研究費補助金実績報告書（研究実績報告書）

1. 機関番号 1 4 6 0 3 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学
3. 研究種目名 特定領域研究 4. 研究期間 平成 20年度 ～ 平成 21年度
5. 課題番号 2 0 0 1 8 0 1 8

6. 研究課題名 大腸菌ゲノム情報を活用したシステインの代謝制御機構の解明と発酵生産への応用

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
5 0 2 7 5 0 8 8	<small>フリガナ タカギ ヒロシ</small> 高木 博史	バイオサイエンス研究科	教授

8. 研究分担者(所属研究機関名については、研究代表者の所属研究機関と異なる場合のみ記入すること。)

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名
6 0 3 9 5 6 5 5	<small>フリガナ オオツ イワオ</small> 天津 巖生	バイオサイエンス研究科	助教
	<small>フリガナ</small>		

9. 研究実績の概要

下欄には、当該年度に実施した研究の成果について、その具体的内容、意義、重要性等を、交付申請書に記載した「研究の目的」、「研究実施計画」に照らし、600字～800字で、できるだけ分かりやすく記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。

大腸菌にはシステイン (Cys) を *O*-acetylserine sulfhydrylase A (OASS-A) により *O*-acetylserine (OAS) と SO_4^{2-} から合成する経路1と、OASS-Bにより OAS と $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ から生成する sulfocysteine を介して合成する経路2が存在する。これまでに経路1の制御機構の解除を中心とした Cys 生産菌の育種が続けられてきたが、経路1だけでは合成系の強化にも限界がある。一方、経路2は sulfocysteine から Cys への還元に関わる酵素やその制御機構が未解明であるが、経路1と比べ硫黄同化経路でのエネルギー消費が少ないため、その知見を発酵生産へ応用することで、Cys 生産性の向上が期待できる。まず、経路1の OASS-A 遺伝子 (*cysK*) と経路2の OASS-B 遺伝子 (*cysM*) を破壊した二重欠損株を作製したところ、予想通り Cys 要求性を示したことから、大腸菌の Cys 生合成経路には1と2しか存在せず、二重欠損株ライブラリーを用いた解析が可能であることが判明した。現在、Keio collection と *cysK* 破壊株を接合させた二重欠損株ライブラリーを用いて、Cys 要求を示す菌株を単離し、新規経路に関与する遺伝子の探索を行なっている。また、すでに高等動物において、glutaredoxin (Grx) が sulfocysteine を Cys に還元する反応を触媒することが報告されている。そこで、大腸菌に存在する酸化還元酵素が sulfocysteine から Cys への還元活性を示すかどうかについて評価した。9種類の酸化還元酵素に His タグを融合した組換え酵素を精製し、酵素活性を測定した。その結果、Grx1, 2, 3は sulfocysteine の Cys への還元を触媒することが明らかになった。さらに、*in vivo*での効果を確認するために、これら酸化還元酵素をそれぞれ過剰発現させた Cys 生産菌を構築し、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ を硫黄源とした Cys 生産実験を行った。その結果、Grx1 及び Grx と相同性の高い還元酵素 NrdH の過剰発現株では、Cys 生産量が有意に増加 (20-40%) しており、これらの還元酵素の過剰発現が Cys 発酵生産に有効であることが示された。

10. キーワード

- (1) ゲノム情報 (2) システイン発酵 (3) スルホシステイン
 (4) _____ (5) _____ (6) _____
 (7) _____ (8) _____ (裏面に続く)

11. 研究発表（平成21年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計（ 1 ）件 うち査読付論文 計（ 1 ）件

著者名	論文標題			
Iwao Ohtsu, Natthawut Wiriyathanawudhiwong, Susumu Morigasaki, Takeshi Nakatani, Hiroshi Kadokura, and Hiroshi Takagi	The L-cysteine/L-cystine shuttle system provides reducing equivalents to the periplasm in <i>Escherichia coli</i>			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Journal of Biological Chemistry	有	In press	■■■	

著者名	論文標題			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
			■■■	

著者名	論文標題			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
			■■■	

〔学会発表〕 計（ 7 ）件 うち招待講演 計（ 0 ）件

発表者名	発表標題		
大津巖生、Natthawut Wiriyathanawudhiwong、高木博史	システイン排出トランスポーターの生理的意義：DsbA-DsbB-Ub 酸化システムによる大腸菌の細胞内レドックスの制御機構		
学会等名	発表年月日	発表場所	
第4回トランスポーター研究会	2009年5月23日	東京	

発表者名	発表標題		
Iwao Ohtsu, Natthawut Wiriyathanawudhiwong, Hiroshi Takagi	Molecular mechanism of growth inhibition of <i>Escherichia coli</i> by L-cysteine		
学会等名	発表年月日	発表場所	
11 th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins	2009年8月3日	Vienna	

発表者名	発表標題		
Natthawut Wiriyathanawudhiwong, Iwao Ohtsu, Friedrich Srienc, Hiroshi Takagi	Cysteine overproduction by engineered <i>Escherichia coli</i> strain with a high ethanol yield		
学会等名	発表年月日	発表場所	
11 th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins	2009年8月3日	Vienna	

発表者名	発表標題		
大津巖生、Natthawut Wiriyathanawudhiwong、高木博史	大腸菌システイン排出トランスポーターの生理的意義：細胞内で生じる活性酸素種の除去機構		
学会等名	発表年月日	発表場所	
2009年度日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部、日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同沖縄大会	2009年10月31日	沖縄	

発表者名	発表標題	
仲谷 豪、大津 徹生、Natthawut Wiriyanawudhiwong、高木 博史	還元ストレスによる大腸菌の生育阻害機構の解析	
学会等名	発表年月日	発表場所
2009年度日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部、日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同沖縄大会	2009年10月31日	沖縄

発表者名	発表標題	
大津 徹生、Natthawut Wiriyanawudhiwong、高木 博史	大腸菌のシステイントランスポーターの生理的意義：ペリプラズム内で生じる過酸化水素の除去機構	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本農芸化学会2010年度大会	2010年3月29日	東京

発表者名	発表標題	
仲谷 豪、大津 徹生、高木 博史	大腸菌における新規システイン生合成酵素の探索と発酵生産への応用	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本農芸化学会2010年度大会	2010年3月29日	東京

〔図 書〕 計 (0) 件

著者名	出版社		
	書名	発行年	総ページ数

12. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出 願〕 計 (0) 件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取 得〕 計 (0) 件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別

13. 備考

※ 研究者又は所属研究機関が作成した研究内容又は研究成果に関するwebページがある場合は、URLを記載すること。

--