Rhodococcus 工業生産菌のニトリル分解遺伝子群の解析と応用

Analysis and application of the gene cluster involved in nitrile degradation of industrial *Rhodococcus*

筑波大学大学院生命環境科学研究科

橋本 義輝 Yoshiteru HASHIMOTO

戸来 幸男 Sachio HERAI

東端 啓貴 Hiroki HIGASHIBATA

小林 達彦 Michihiko KOBAYASHI

Key words: Hyper-inducible expression; nitrilase; nitrile hydratase; *Rhodococcus*; *Streptomyces*

1. はじめに

Rhodococcus 属放線菌は有用物質を生産する微生物としてだけでなく、近年、芳香族化合物や塩素系化合物に対し高い分解活性を示す微生物として知られている。筆者らは、毒性化合物であるニトリル¹⁾およびイソニトリル^{2), 3)}の微生物代謝研究を行ってきており、特に、これまで研究対象とした *Rhodococcus rhodochrous* J1 菌（以下、J1 菌と略）はすでに、（アクリロニトリルからの）アクリルアミドや、（3-シアノピリジンからの）ニコチンアミドの工業生産に使用されるに至っている。現在、本菌のみならずさまざまな *Rhodococcus* 属微生物の高い潜在能力がさらに広範囲の物質生産や環境浄化に還元されることが期待されている。

2. *Rhodococcus* 属工業生産菌のニトリル分解経路にかかわる酵素の誘導発現

J1 菌における（猛毒性の性質を与えるシアノ基を含む）ニトリル化合物の分解代謝は二つに大別できる（図1）。一つは、ニトリラーゼ酵素によりニトリルが酸とアンモニアに分解される経路であり、もう一つは、ニトリルヒドラーゼ酵素（以下、NHase と略）⁴⁾によりニトリルはいったんアミドに分解され、その後、アミダーゼ酵素により酸とアンモニアに分解される経路であるが、培地へ添加する誘導物質の種類を変えることにより本菌のニトリル分解様式

はがらりと変わる。すなわち、培地にイソバレロニトリル（あるいはε-カプロラクタム）を誘導物質として添加した場合、ニトリラーゼが無細胞抽出液の35%以上を占めるほど大量に生成する。一方、コバルトイオン存在下で、培地に尿素を誘導物質として添加した場合、高分子量型 NHase（以下、H-NHase と略）が生成し、同じく、コバルトイオン存在下で、培地にシクロヘキサンカルボキサミドを誘導物質として添加した場合には、低分子量型 NHase（以下、L-NHase と略）が生成する⁵⁾。特に、H-NHase の生成は無細胞抽出液の50%以上を占める。このように、ニトリラーゼ⁶⁾や H-NHase⁷⁾の遺伝子プロモーターは非常に強力な転写活性をもつことが示唆されたことから、筆者らは本菌のニトリル代謝酵素を対象として、世界で初めて *Rhodococcus* 属のプロモーターを同定、転写開始点の決定を行い、デリーション実験やノーザン解析などにより DNA・RNA 両レベルで各酵素の遺伝子発現調節機構を解明した。

3. *Rhodococcus* 属に由来する誘導型発現系の *Streptomyces* 属放線菌への利用

一方、*Streptomyces* 属放線菌は、生理活性物質生産菌として工業的に広く利用されており、今日の応用微生物学上、極めて重要な菌群となっている。*Streptomyces* 属での有用物質生産の重要性に鑑み、現在、本属において発現が制御可能な誘導型の大量発現系の開発が望まれている。実際、*Streptomyces* 属放線菌において誘導性プロモーターを利用した報告例はほとんどない^{8), 9)}。しかし、これらは①発現が微弱である、②宿主域が狭い、③2次代謝産物に代表される有用物質生産に悪影響を及ぼす可能性が考えられる抗生物質を誘導剤として用いる、などさまざまな問題点が存在するために、その有用性は極めて限られているのが現状である。また、これを改良する誘導発現・大量発現の報告例もこれまでにない。

筆者らは、J1 菌のニトリラーゼや H-NHase の (*Rhodo-*

図1 2種類のニトリル分解経路

coccus 属由来の) 遺伝子プロモーターが *Streptomyces* 属でも機能すれば面白いと思い、研究を行った。まず、J1 菌のニトリラーゼ系を対象とし、ニトリラーゼの構造遺伝子 (*nitA*) とその制御遺伝子 (*nitR*) をともに、*Streptomyces* 属用プロモーター検索ベクターに挿入し、*S. lividans* を形質転換させた結果、*Rhodococcus* 属の誘導型発現調節機構が *Streptomyces* 属においても働くことが初めて明らかになった。また、誘導的に発現したニトリラーゼは全可溶性タンパク質の 20% に達し、*Streptomyces* 属においても本誘導発現系が極めて強力に機能することが判明した。本発現調節に必要とされる最小領域の決定を目的として、デリベーション実験および *Streptomyces* 属放線菌内での発現を検討した結果、ニトリラーゼ遺伝子プロモーター (P*nitA*)・転写調節タンパク質 (NitR)・誘導剤という極めてシンプルな構成要素のみで本誘導発現系が機能することが明らかとなった。次に、得られた結果を基に、ニトリラーゼ誘導発現系を用いた新規誘導型タンパク質発現系 (P*nitA*-NitR) (図 2) を保持する高発現ベクター pSH19 (図 3) の構築を試みた¹⁰⁾。本発現系 (図 2) はマルチクローニングサイトおよび *nitR* 遺伝子のすぐ上流に P*nitA* を、また上流からの転写のリードスルーを防ぐために P*nitA* の上流にはターミネーターを配置した。本ベクター系を利用した発現系では、誘導物質を添加することにより転写活性化タンパク質 NitR が目的タンパク質の発現を顕著に促進するだ

けでなく、NitR 自身の発現も促進し、そこに再び誘導物質が作用することで、目的タンパク質の自己増幅的な発現が期待できる。

この新規発現系を用いて異種タンパク質の発現を試みた結果、グラム陽性細菌由来のニトリラーゼのみならず、グラム陰性細菌由来のカテコール-2,3-ジオキシゲナーゼ¹¹⁾、イソニトリルヒドラターゼ¹²⁾などのタンパク質の誘導的な大量発現に成功した。カテコール-2,3-ジオキシゲナーゼは、全可溶性タンパク質の 40% に及ぶ極めて著量の誘導的生成が確認された。P*nitA*-NitR 系は、この系に含まれる構成要素が最小単位であり、従来報告のある *tipA* プロモーターのように誘導発現に際し *trans* に働く他の染色体由来因子を必要としない。このため、P*nitA*-NitR 系を保持するプラスミドが複製するすべての放線菌で利用可能と考えられる。実際、本発現系が *S. lividans* のみならず、ゲノム情報解読の完了した *Streptomyces avermitilis*¹³⁾ や *Streptomyces coelicolor* A3(2)¹⁴⁾、学術研究で汎用される *Streptomyces griseus* など幅広い宿主で機能することを確認した。

一方、尿素により誘導がかかる H-NHase に関しては、本遺伝子 (*nhhBA*) 発現にその上流域が必須であり、本領域には、大腸菌由来の調節遺伝子 *marR* や *hpcR* と相同性を示す遺伝子 (*nhhD*) と、*Pseudomonas aeruginosa* のアミダーゼの負の調節遺伝子である *amiC* と相同性を示す遺伝子 (*nhhC*) が存在する。また、これらの調節遺伝子は、アミド化合物 (尿素など) による *nhhBA* の誘導発現において転写レベルでの制御にかかわっている。この H-NHase 遺伝子クラスターに関しても、ニトリラーゼと同様に、*E. coli*-*Streptomyces* シャトルベクターを用いて *S. lividans* を形質転換させ、誘導剤として尿素を培地に添加して検討した結果、H-NHase の著量発現が確認できた。しかしながら、その発現は誘導的ではなく構成的であり、現在、さらに検討を進めている。

4. おわりに

Rhodococcus 属のニトリラーゼおよびニトリルヒドラターゼ遺伝子プロモーターを利用した発現系における著量のタンパク質生成は従来までに報告されているいかなる *Streptomyces* 属タンパク質発現系をも凌駕する。P*nitA*-NitR 誘導型発現系は、*Streptomyces* 属放線菌の基礎研究用ツール、例えば大腸菌における *lac* プロモーター系や pET システムなどのような遺伝子発現の制御やタンパク質の大量発現ツールとして利用できる。近年相次いでゲノム情報解読がなされ今後ますます盛んになるポストゲノム研究、特に、タンパク質の機能解析において、その能力が

図 2 新規誘導型発現系 (P*nitA*-NitR 系)

図 3 誘導発現プラスミド pSH19

いかなく発揮されることが期待される。

また、これらの発現系を用いることで種々の有用タンパク質・生理活性物質の生産性が向上した *Streptomyces* 属放線菌の育種改良が期待される。筆者らは、*Streptomyces* 属放線菌での「もの作り」、すなわち誘導剤の安全性やコストを当初から念頭におき、 ϵ -カプロラクタムや尿素のように毒性が低くかつ安価な物質を誘導剤として使用可能な *PnitA*-*NitR* 系を構築した。幅広い宿主域をもつ特性が最大限に活用され、本発現系が多くの放線菌の育種改良・物質生産に広く利用されれば幸いである。

本研究は、池田治生教授、大村 智教授（北里大学生命科学研究所）との共同研究で達成されたもので、懇切なご助言を賜り心より感謝申し上げます。さらに、研究を行い多大なご協力をいただいた株本浩樹君、廣石綾子さん、間世田英明助手に厚くお礼申し上げます。

本研究は、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 産業技術研究助成事業からサポートをいただきました。ここに厚くお礼申し上げます。なお、本研究は 21 世紀 COE プログラム「複合生物系応答機構の解析と農学的高度利用」プロジェクト (<http://www.tara.tsukuba.ac.jp/~coe21/>)（生命科学領域）の一環として行ったものである。

- 1) M. Kobayashi and S. Shimizu: *Nature Biotech.*, **16**, 733–736 (1998).
- 2) M. Goda, Y. Hashimoto, S. Shimizu, and M. Kobayashi: *J. Biol. Chem.*, **276**, 23480–23485 (2001).
- 3) H. Fukatsu, Y. Hashimoto, M. Goda, H. Higashibata, and M. Kobayashi: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 13726–13731 (2004).
- 4) Y. Asano, Y. Tani, and H. Yamada: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2251–2252 (1989).
- 5) M. Kobayashi, T. Nagasawa, and H. Yamada: *Trends Biotechnol.*, **10**, 402–408 (1992).
- 6) H. Komeda, Y. Hori, M. Kobayashi, and S. Shimizu: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 10572–10577 (1996).
- 7) H. Komeda, M. Kobayashi, and S. Shimizu: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 4267–4272 (1996).
- 8) T. Schmitt-John and J. W. Engels: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 493–498 (1992).
- 9) E. Takano, J. White, M. J. Thompson, and M. J. Bobbs: *Gene*, **166**, 133–137 (1995).
- 10) S. Herai, Y. Hashimoto, H. Higashibata, H. Maseda, H. Ikeda, S. Ōmura, and M. Kobayashi: **101**, 14031–14035 (2004).
- 11) C. Nakai, H. Kagamiyama, M. Nozaki, T. Nakazawa, S. Inoue, Y. Ebina, and A. Nakazawa: *J. Biol. Chem.*, **258**, 2923–2928 (1983).
- 12) M. Goda, Y. Hashimoto, M. Takase, S. Herai, Y. Iwahara, H. Higashibata, and M. Kobayashi: *J. Biol. Chem.*, **277**, 45860–45865 (2002).
- 13) H. Ikeda *et al.*: *Nature Biotech.*, **21**, 526–531 (2003).
- 14) S. D. Bentley *et al.*: *Nature*, **417**, 141–147 (2002).