

*Corynebacterium glutamicum* における  
イソブタノールストレス応答機構の解明

辻本 敏博

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 ストレス微生物科学研究室

(高木 博史 教授)

平成27年12月15日提出

平成28年 1月19日改訂

平成28年 2月15日改訂

## 要約

イソブタノールはエタノールと比較してガソリンに近い化学的性質を有するため、エタノールに代わる次世代のバイオ燃料として期待されている。しかしアルコールは炭素数の増加に伴い細胞毒性が強くなることが知られており、イソブタノールを含む C4 アルコールは C2 アルコールであるエタノールよりも細胞毒性が強い。C4 アルコールであるイソブタノールおよび *n*-ブタノールが及ぼす細胞への影響については、主に *Escherichia coli* と *Clostridium acetobutylicum* で研究が行われており、生育阻害、細胞膜流動性の増大、グルコースの取込み阻害、細胞内 ATP 量の低下などが報告されている。トランスクリプトーム解析を用いたアルコール応答機構の解析により、*E. coli* および *C. acetobutylicum* において、*n*-ブタノールによりヒートショック等のストレス応答機構が誘導されることが明らかにされた。*E. coli* において、イソブタノール存在下の発現プロファイルより、イソブタノールにより細胞膜が破壊され、それに伴うキノンの機能不全により二成分制御系 ArcAB および PhoBR が活性化されることが示唆されている。

有用工業微生物 *Corynebacterium glutamicum* は、イソブタノール生産の宿主として用いられてきた *Saccharomyces cerevisiae*、および *E. coli* と比較して高いイソブタノール耐性を有するため、生産宿主として有望である。実際に当研究室において遺伝子改変により構築したイソブタノール生産株は、これまでの報告を超える 48 時間で 25 g/L という高いイソブタノール生産量を示した。さらに、オレイルアルコールを有機相とした二相培養系を用いることで培養液中のイソブタノール濃度が 1% 以下に抑えられ、生産量が 1.5-2 倍に向上した。このことは、培養液中に蓄積したイソブタノールによる細胞への影響がイソブタノール生産の律速となっていることを示唆している。イソブタノールに対するストレス応答機構を解明することは、イソブタノール生産のさらなる効率化を推し進めるための重要な手掛かりとなる。しかし、*C. glutamicum* におけるイソブタノールストレス応答に関する知見は乏しい。本研究ではイソブタノールに対するストレス応答機構を分子レベルで解明することを目的とした。

イソブタノールストレスによって引き起こされる遺伝子発現への影響を明らかにするため、トランスクリプトーム解析を行った。その結果、イソブタノールによって全 3201 遺伝子中、975 遺伝子の発現に変化が見られた(上昇; 483 遺伝子、低下; 492 遺伝子)。各遺伝子を機能で分類し、機能ごとの発現変化の傾向を解析した結果、アミノ酸代謝、核酸代謝、翻訳、および無機イオン代謝に関与する遺伝子は発現が減少する傾向が見られ、ヒートショックプロテイン (HSP)

遺伝子および転写関連遺伝子は発現が上昇する傾向が見られた。転写関連遺伝子のうち alternative シグマ因子 SigB と extracytoplasmic function (ECF)シグマ因子 SigE をコードする遺伝子の発現が大きく上昇していることに着目した。sigB の発現は SigE ともう一つの ECF シグマ因子 SigH によって制御されている。SigB は酸、熱、塩、エタノールなどのストレスへの耐性に関与し、ストレス環境下においてマスターレギュレーターとして機能すると考えられている。SigE は熱、SDS、リゾチームなどのストレスへの耐性に関与することが報告されているが、その制御下の遺伝子（レギュロン）および発現制御機構は明らかにされていない。そこで SigE のレギュロンを同定するため、sigE 欠損株およびその活性抑制因子 CseE の遺伝子欠損株のトランスクリプトーム解析を行った。cseE 欠損株では SigE が恒常的に活性化され、SigE の制御下にある遺伝子の発現は誘導されると考えられる。cseE の欠損により発現量が上昇し、かつ sigE 欠損株でイソブタノールによる発現誘導が低下した 12 遺伝子を SigE レギュロンとして同定した。

sigE の発現制御機構を解明するため DNA アフィニティー精製を行い、sigE プロモーター領域に結合する 5 つの転写制御因子を同定した。しかし、この 5 つの転写制御因子の遺伝子欠損株の解析から、これら転写制御因子はイソブタノールによる sigE の発現誘導には関与していないことが明らかとなった。近縁種 *Mycobacterium tuberculosis* において sigE ホモログの発現は、二成分制御系によって制御されている。そこで *C. glutamicum* においてイソブタノールによって強く誘導される二成分制御系 PhoSR に着目した。phoSR 欠損株においてイソブタノールによる sigE の発現誘導が消失し、エタノール、SDS ストレス条件下における sigE の発現上昇も phoSR 欠損株では消失した。以上の結果から PhoSR はイソブタノールなどの細胞表層ストレスに応答し、sigE の発現を活性化することが明らかとなった。さらに phoSR 欠損株は、イソブタノール、エタノール、SDS に対し耐性が著しく低下したことから、PhoSR はこれらストレス応答において重要であることが明らかとなった。

本研究によって、イソブタノールに応答する二成分制御系とその制御下にあるシグマ因子およびシグマ因子のレギュロンが明らかになった。また、この制御システムは、イソブタノールを含む細胞表層ストレス応答において重要な役割を担っていることが明らかになった。

## 目次

1.	序論.....	6
2.	方法と材料.....	18
2-1	菌株、培地、および培養条件.....	18
2-2	生育試験.....	18
2-3	RNA 抽出.....	18
2-4	マイクロアレイ解析.....	19
2-5	定量 RT-PCR.....	19
2-6	DNA アフィニティー精製.....	20
2-7	細胞内アミノ酸の定量.....	21
2-8	生菌数測定.....	21
3.	結果.....	25
3-1	イソブタノールによる生育阻害.....	25
3-2	イソブタノールストレスに応答した遺伝子の発現変化.....	25
3-2-1	各 COG カテゴリにおける発現変化の傾向.....	25
3-2-2	アミノ酸輸送体およびアミノ酸生合成遺伝子の発現変化.....	27
3-2-3	核酸生合成遺伝子の発現変化.....	28
3-2-4	翻訳関連遺伝子の発現変化.....	30
3-3	イソブタノールストレスに応答する転写制御機構.....	33
3-3-1	NAD 生合成遺伝子.....	33
3-3-2	ロイシンおよびトリプトファン生合成遺伝子.....	36
3-3-3	イソブタノールによる細胞内アミノ酸量への影響.....	40
3-3-4	芳香族化合物分解遺伝子.....	41
3-3-5	リン酸欠乏遺伝子の発現変化.....	43
3-3-6	シグマ因子.....	44
3-3-7	SigH レギュロンの発現変化.....	47
3-4	SigE レギュロンの同定.....	49
3-5	<i>sigE</i> の発現制御機構の解析.....	52
3-5-1	<i>sigE</i> プロモーター結合タンパク質の同定と機能解析.....	52
3-5-2	PhoSR による <i>sigE</i> の発現制御.....	55
3-6	PhoSR を介した細胞表層ストレス応答.....	58
3-6-1	<i>phoSR</i> 欠損株における <i>sigE</i> の発現への影響.....	58
3-6-2	<i>phoS</i> および <i>phoR</i> 欠損株のストレス感受性.....	59
4.	考察.....	61
5.	謝辞.....	66

6.	参考文献.....	67
----	-----------	----

## 1. 序論

### バイオ燃料への期待

世界の平均気温は過去 100 年で 0.74°C 上昇した。平均気温の上昇は近年になるほど加速している。また世界平均海面水位は過去 100 年で 17 cm 上昇し、北半球の積雪面積は広範囲に渡り減少している [1]。地球温暖化の影響は、日本においても現れつつある。農林水産省によると夏の高温により害虫被害や着実不良、農作物の生育不良などが報告されている [2]。これら現象は必ずしも地球温暖化が原因とは言い切れないが、地球温暖化が進めば、このような問題が頻繁に起こることが予想される。地球温暖化の進行を防ぐため、CO<sub>2</sub> 排出量の削減は人類にとって最重要課題の一つである。低炭素社会の実現に向けて、カーボンニュートラルな再生可能資源（バイオマス）から各種エネルギーや化学製品を生み出す技術体系（バイオリファイナリー）の構築が重要となる。現在、バイオリファイナリーの最大の製品はバイオエタノールである。バイオエタノールは石油を代替する新たなエネルギー資源として期待されている。バイオマスを原料としたエタノール生産技術は、アルコール飲料の醸造技術として長年培われてきた技術を応用し、1930 年代より米国およびブラジルを中心にバイオエタノールの商業レベルでの生産が行われてきた。特に米国のバイオエタノール生産は 2005 年にエネルギー政策法で再生可能燃料の基準が設けられて以降、急速に成長し、2014 年にはバイオエタノールの年間生産量は全世界で前年度より 43 億 L 増加し、930 億 L に達した (Fig. 1) [3, 4]。バイオエタノール生産の低コスト化が進み、The Chicago Board of Trade における 2015 年の市場価格は、およそ 40 円/L であった。

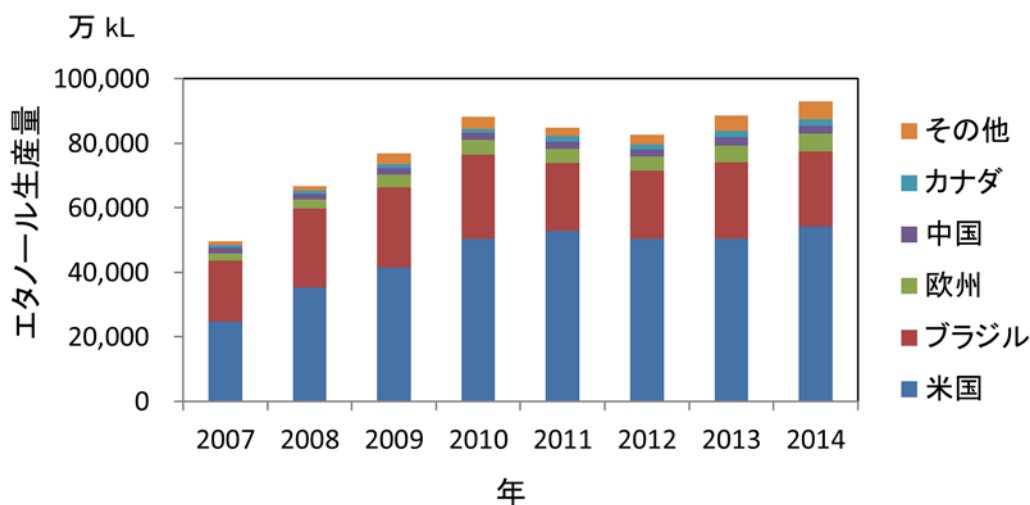


Fig. 1. 全世界におけるバイオエタノール生産量  
米国エネルギー省が発表した統計データ (<http://www.afdc.energy.gov/data/10331>)  
を参考に作成した。

Table 1. ガソリン、イソブタノール、およびエタノールの物性

	ガソリン	イソブタノール		エタノール
エネルギー密度 (MJ/L)	34.0	28.8	>	23.5
吸湿性	無	低	<	高
水への溶解度 (g/L)	不溶	87	<	$\infty$
腐食性	極めて低	低	<	高

### 次世代バイオ燃料ーバイオイソブタノールー

エタノールに次ぐ次世代のバイオ燃料として注目されているのが、イソブタノールである。イソブタノールはエネルギー密度がエタノールよりも高いため、イソブタノール混合ガソリンはエタノール混合ガソリンよりも出力や燃費が優れている (Table 1)。またイソブタノールは吸湿性が低いため、車内タンクに結露や雨水の侵入によって水が浸入した場合にエタノール混合ガソリンで見られるガソリンとの分離 (相分離) が起こりにくく、ガソリンとの混和性に優れている。イソブタノールは金属部品やゴム部品に対する腐食性がエタノールよりも低く、既存の設備 (エンジン等) が利用可能である [5]。近年、欧米企業によりバイオイソブタノールの商業生産が開始された。

### 多様化する自動車の動力源

米国ではシェールガス革命により低コストのエネルギー源が増産され、中東では原油の過剰供給に歯止めがかからず、2014年の夏には70円/Lを超えていた原油価格が2015年12月には33円/Lまで下落した。バイオエタノールおよびバイオイソブタノールの価格はそれぞれ40円および80円以上と割高であり、これらバイオ燃料をガソリン添加剤として利用を促すのは難しい状況である。さらに、ハイブリッドカーの登場や電気自動車、燃料電池車の開発が進められており、自動車の動力源が多様化していることも、バイオ燃料への期待感を弱めている。

### バイオイソブタノールの幅広い用途

イソブタノールはガソリン添加剤だけでなく、ジェット燃料や化学製品の原料としても期待されている (Fig. 2)。2010年における航空機からのCO<sub>2</sub>排出量は、世界のCO<sub>2</sub>総排出量のおよそ2%であり、運輸部門ではおよそ11%を占める (Fig. 3) [6, 7]。International Energy Agencyによると2050年に運輸部門の最大のCO<sub>2</sub>排出量割合を占めるのは航空部門であると予想されている。航空機に用





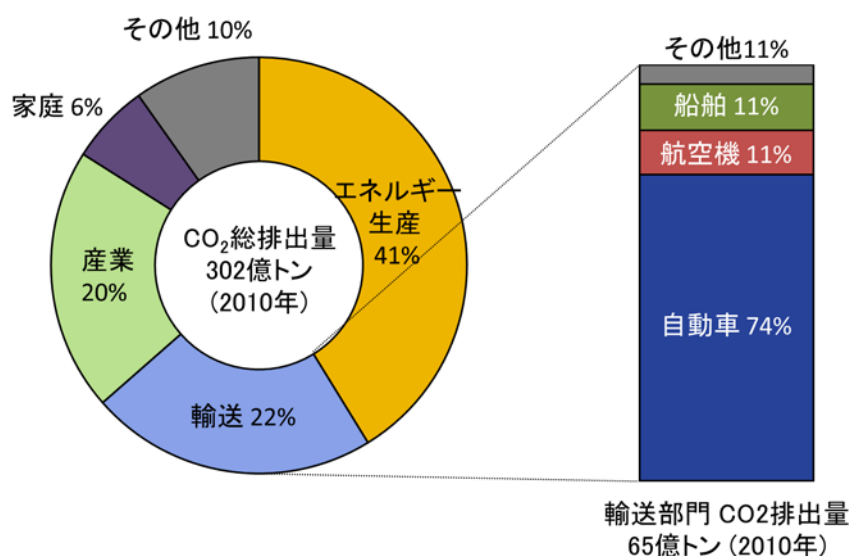


Fig. 3. 世界の部門別二酸化炭素排出量

いられるジェットエンジンはその構造上、液体燃料を必要とするため、CO<sub>2</sub>排出量の低い他の動力源に切り替えることは容易ではない。さらに今後も航空輸送の成長が予想されており、旅客数の増加やLCCの台頭により航空機起源のCO<sub>2</sub>排出量は増え続けることが予想される。そのため、航空機起源のCO<sub>2</sub>排出量削減対策としてバイオジェット燃料に大きな期待が寄せられている。ジェット燃料は炭素数C10~15の飽和炭化水素を主体とする混合物で、これら炭化水素はイソブタノールの重合により得ることができる。

低炭素社会を構築するためには、化学製品の原料を石油からバイオマスへと転換することも重要だ。イソブタノールは、化学プロセスによりブチルゴム、ポリエステルやPETなどの化学製品の原料としても利用できる (Fig. 2) [8]。化学製品は燃料製品に比べて単価が高いため、バイオマス由来の化学製品（グリーン化学品）の市場への導入に期待感が増している。

### 微生物によるブタノール生産のはじまり

ブタノール生産菌は1861年にPasturによって初めて発見された [9]。本格的に微生物によるブタノール生産が始まったのは、それより半世紀以上経った後、1914年に合成ゴムの生産を研究していたWeizmannらによって、ゴムの原料となるブタノールを生産する微生物として*Clostridium acetobutylicum*が単離されてからである。*C. acetobutylicum*は、糖を原料としてアセトン：ブタノール：エタノールを6：3：1の比で生成する。この性質を利用したのがアセトン・ブタノール・エタノール発酵（ABE発酵）である。このABE発酵は1914年に勃発した第一次世界大戦によって、需要が増した火薬の原料となるアセトンを供給するためにイギリスで劇的に発展した。当時、アセトンと同時に得られるブタノー

ルは単なる副生成物であったが、その後の自動車産業の急成長により、塗料の材料として需要が拡大した。1936年に Weizmann の特許切れを皮切りに、日本、インド、オーストラリア、そして南アフリカなど世界各国で ABE 発酵によるアセトンとブタノールの生産が開始された。しかし 1950 年以降、石油化学の発展により合成法によるブタノール生産が普及し、ABE 発酵によるアセトン・ブタノール生産は急速に減少していき、1960 年には、南アフリカの一部地域を除き、完全に ABE 発酵による工業生産は停止した。しかし近年、バイオ燃料としてブタノールを生産するために ABE 発酵の基礎および応用研究が活発化している。

### バイオブタノール生産の新たな展開

ABE 発酵によるブタノール生産では、アセトンの副生成による収率低下などが課題となる。2007 年に Astumi らによって ABE 発酵とは全く異なるブタノール生産技術が開発された[10]。Astumi らは、*Escherichia coli* を宿主として遺伝子組み換えによりケト酸デカルボキシラーゼ (KDC) とアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) を導入し、ブタノールおよびイソブタノールを含む炭素数 C3~5 アルコールを生産する菌株の構築に成功した (Fig. 4)。その後、*Bacillus subtilis*、*Corynebacterium glutamicum*、および *Saccharomyces cerevisiae* でも同様の方法によりイソブタノールが生産されることが報告された [11-13]。

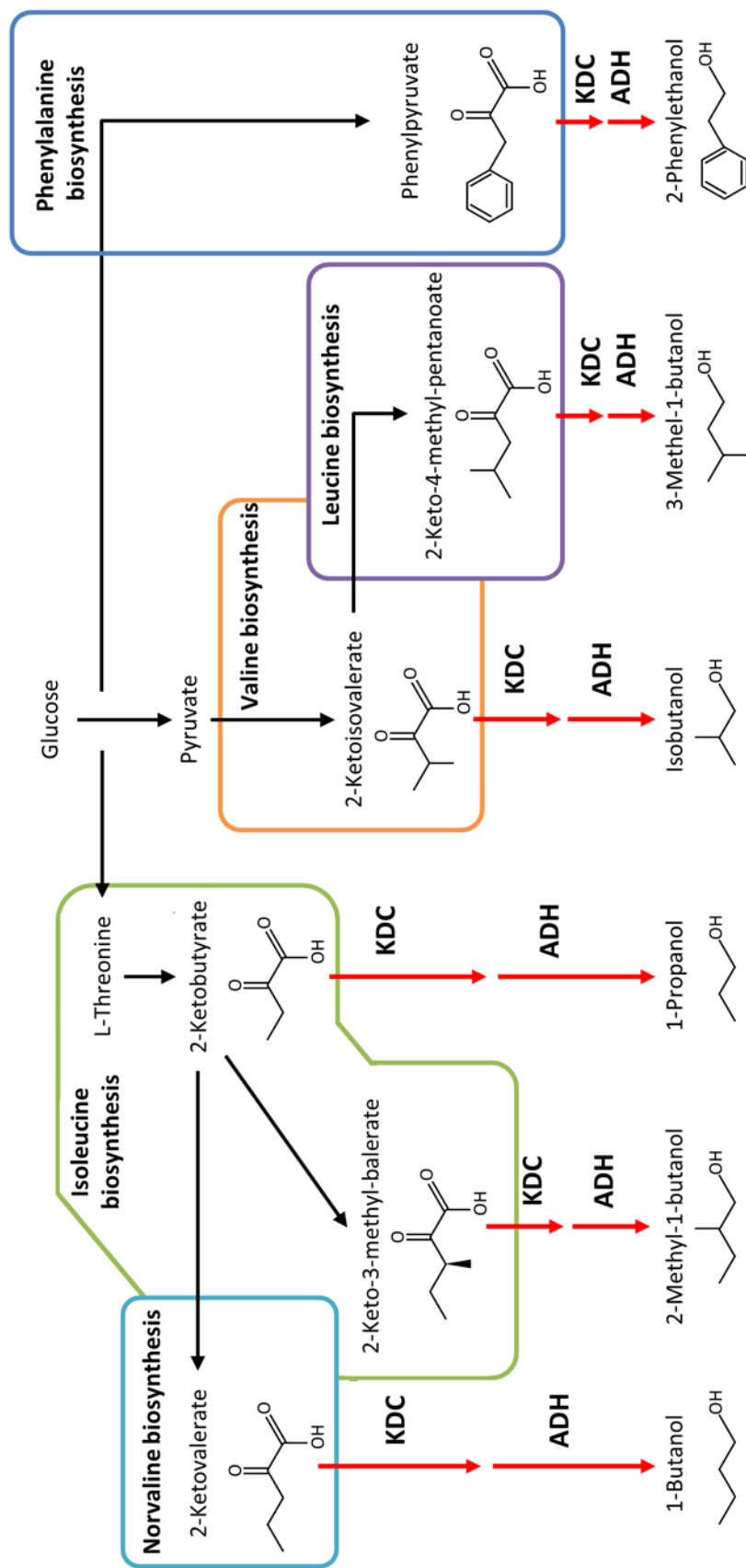


Fig. 4. 新規ブタノール生成経路  
*E. coli* における新規ブタノール生成経路を示した。KDC：ケト酸デカルボキシラーゼ、ADH：アルコールデヒドロゲナーゼ  
 [1]を参考に作成した。

## *Corynebacterium glutamicum* によるイソブタノール生産

高 GC 含量のグラム陽性細菌 *C. glutamicum* は 1956 年に L-グルタミン酸を生産する微生物として単離され、アミノ酸の工業生産宿主として用いられるようになった。現在では、*C. glutamicum* はアミノ酸の工業生産の大半を担っており、産業上欠かすことのできない有用微生物である。当研究室では、2007 年に *C. glutamicum* R のゲノム配列を解読し[14]、近年、*C. glutamicum* R を宿主として、

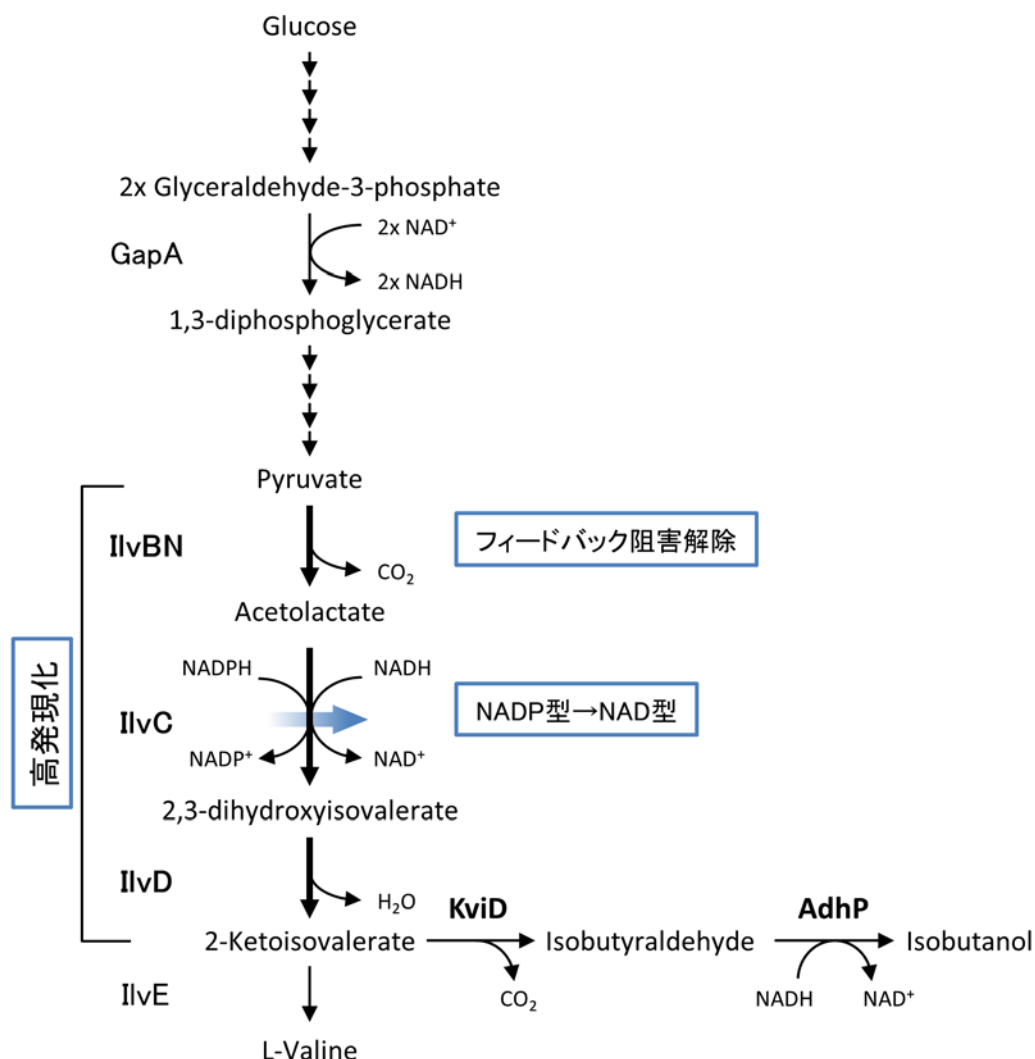


Fig. 5. *C. glutamicum* におけるイソブタノール生合成経路

*C. glutamicum* R を親株として構築されたイソブタノール生産株にはバリン生合成経路の最適化 (IlvBN のフィードバック阻害解除、IlvC の NAD 型化、IlvBNCD 高発現化) および *Lactococcus lactis* 由来の *kviD* と *E. coli* 由来の *adhP* が導入されている [2, 3]。GapA : グリセロールアルデヒドデヒドロゲナーゼ、IlvBN : アセトヒドロキシ酸シンターゼ、IlvC : アセトヒドロキシ酸レダクトイソメラーゼ、IlvD : ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ、IlvE : バリンアミノトランスフェラーゼ、KviD : 2-ケト酸デカルボキシラーゼ、AdhP : アルコールデヒドロゲナーゼ

遺伝子工学的手法を用いてアミノ酸やイソブタノールなどの有用物質の生産に取り組んできた。*C. glutamicum* は、*S. cerevisiae* や *E. coli* と比較して高いイソブタノール耐性を有するため、生産宿主として有望である (Table 3)。

当研究室では、バリン生合成経路の最適化によりバリン高生産株の構築に成功している [15]。この知見を基にイソブタノール生産株を構築した結果、それまでの報告を超える高生産性を示した (Fig. 5, Table 2)[16]。しかしながら、バリン高生産株におけるバリン生産性は 227 g/L であるのに対し、イソブタノール生産株のイソブタノール生産性は 27 g/L に留まる [15, 16]。その主な原因がイソブタノールの細胞毒性である。

### アルコールの細胞毒性

アルコールの細胞毒性の強さは、その疎水性の強さ、すなわちオクタノール/水分配係数 ( $\log P_{ow}$ ) に比例する [17]。疎水性の強いアルコールは細胞膜との親和性が高く、細胞膜内に蓄積しやすいと考えられており、実際にアルコールによって、細胞膜流動性の増大や細胞膜タンパク質の機能阻害が引き起こされることが知られている (Fig. 6) [18-21]。アルコール耐性の高さは、微生物種によって異なる (Table 3)。*C. glutamicum* は *E. coli* および *S. cerevisiae* よりもイソブタノール耐性が高いが、1.75%以上のイソブタノール存在下では、生育がほとんど阻害され、2.5% イソブタノール存在下では、グルコース消費が完全に阻害される [16, 22]。

### アルコール耐性向上が生産性向上の鍵

毒性の高い最終産物を反応系から除去する培養方法（二相培養系など）を用いることで、イソブタノールや芳香族化合物などの生産性が向上することが報告されている [3, 23-25]。これらの知見は、毒性を緩和することが生産性の向上につながることを示している。これまでにアルコール耐性株の育種が試みられ、そのうちの一部の研究ではアルコール耐性株においてアルコール生産性が向上することが報告されているが[26-28]、必ずしも耐性の向上は生産性の向上に

Table 2. 微生物におけるイソブタノール生産性

Microorganisms	Isobutanol (g/L)	Isobutanol productivity (g/L/h)	Reference
<i>E. coli</i>	22	0.2	[10]
<i>S. cerevisiae</i>	0.63	0.007	[29]
<i>B. subtilis</i>	5.5	0.09	[30]
<i>C. glutamicum</i>	13	0.26	[31]
<i>C. glutamicum</i>	27	0.53	[16]

つながらず、得られた耐性株の生産性が親株よりも低下するケースも報告されている [32-34]。生産性向上つながらず、耐性株によっにつながる耐性を付与するためには、アルコール耐性機構の理解を深めることが重要である。

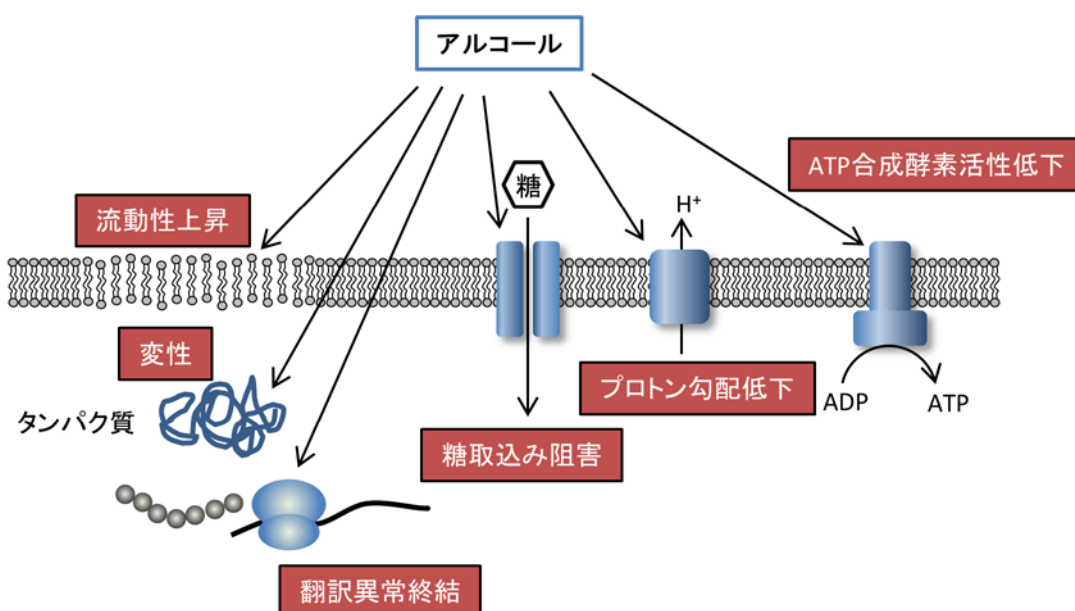


Fig. 6. アルコールによって引き起こされる細胞への影響

Table 3. 主要なアルコール生産微生物のアルコール耐性

	$\log P_{ow}$	Sensitivity (% v/v) <sup>a</sup>	Microorganism	Reference
Ethanol	-0.32	3.2%	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[35]
		7.0%	<i>Escherichia coli</i>	[35]
Butanol	0.88	0.75%	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[35]
		1.0%	<i>Escherichia coli</i>	[36]
		1.5%	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	[37]
Isobutanol	0.80	0.5%	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[35]
		1.0%	<i>Escherichia coli</i>	[35]
		1.75%	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	[22]

<sup>a</sup> 生育が70%以下に低下するアルコール濃度を示す。上記の値は培地、グルコース濃度、培養方法、スケール、培養時間などは考慮されていない。

## アルコール耐性機構

アルコールに対する耐性機構に関する知見が少ないが、アルカンなどの有機溶剤に対する耐性機構と重複する部分が多いと考えられている [36]。有機溶剤耐性機構を中心にアルコール耐性への関与が報告されている例について論ずる。主要な有機溶剤耐性機構として (1) 排出ポンプ、(2) 細胞膜脂質構成の変化、(3) ヒートショックプロテインが知られている。

### (1) 排出ポンプ

排出ポンプはプロトン駆動力を利用して細胞内の毒性物質を排出する膜輸送体であり、*E. coli* や *Pseudomonas putida* などのグラム陰性細菌において有機溶剤耐性に重要な役割を担っていることが知られている [36]。*E. coli* において多剤排出ポンプ AcrAB/TolC は有機溶剤耐性に重要であることが知られている [38]。内膜タンパク質 AcrB と外膜タンパク質 TolC をペリプラズムで膜融合タンパク質 AcrA がつないでおり、基質特異性は内膜タンパク質である AcrB に依存している。AcrAB/TolC は、エタノールおよびプロパノールへの耐性には関与していないことが報告されていたが [39]、AcrB にランダム変異を導入し、ブタノールを基質とする AcrB 変異体が見出され、AcrB 変異体の導入によりブタノール耐性が向上することが報告されている [40]。またアルコール耐性に関与する排出ポンプとしては ABC 輸送体 MdlB が見出されている。MdlB は、その基質は不明であるが、高発現によりイソペンタノール耐性が向上することが報告されている [41]。

### (2) 細胞膜脂質構成の変化

細胞膜脂質の飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸のバランスやシス型不飽和脂肪酸とトランス型不飽和脂肪酸のバランスを変化させることで、細胞膜流動性を制御し、有機溶剤による細胞膜の崩壊を防ぐ役割を担う。*E. coli* では、不飽和脂肪酸生合成遺伝子 *fabA* と *fabB* の発現誘導に関与する転写制御因子 *fadR* の欠損により、リン脂質の飽和脂肪酸が増加し、ヘキサンに対する耐性が向上することが報告されている [42]。Ingram は、*E. coli* において、C4 以下の短炭素鎖アルコールにより不飽和脂肪酸が増加し、飽和脂肪酸が減少することを報告している [43]。一方で、Huffer らは、*E. coli* においてエタノールおよびブタノールにより不飽和脂肪酸が減少し、飽和脂肪酸が増加することを報告している [35]。彼らの研究は有機溶剤耐性のように必ずしも耐性と飽和脂肪酸量が相関関係にあるわけではないことを示唆している。

### (3) ヒートショックプロテイン (HSP)

HSP とは、ヒートショックで発現が誘導されるタンパク質の折り畳みに関与する分子シャペロンやタンパク質の分解に関与するプロテアーゼのことを指す。アルコールストレスに対する HSP の役割は、タンパク質の変性による凝縮の抑

制とリフォールディングの促進を担っていると考えられている。*S. cerevisiae*では、アルコールによって HSP がタンパク質レベルで誘導されることが知られており [44]、*E. coli*、*C. acetobutylicum* および *S. cerevisiae* で、アルコールにより HSP 遺伝子の発現が上昇することが報告されている [45-48]。*C. acetobutylicum* において分子シャペロン GroESL の高発現によりブタノール耐性が向上し、野生株と比較して生産性が 40% 向上することが報告されている [49]。*Lactobacillus plantarum* および *E. coli* においても HSP の高発現によりアルコール耐性が向上することが報告されている [50, 51]。

これまで述べたようにアルコール耐性に寄与する機構が複数見出されており、いくつかの機構を組み合わせることでより強力な耐性を宿主に付与することができると考えられる。

### ストレス応答の網羅的解析

さらに近年、アルコールストレスによる細胞への影響の全容解明とアルコールストレス耐性に寄与する機構を見出すことを目的に、トランスクリプトーム解析を用いたストレス応答の網羅的解析が行われている。

*C. acetobutylicum* では、ブタノールにより核酸合成、アミノ酸生合成に関連する遺伝子の発現が変化することが示された [47]。*E. coli* では、トランスクリプトーム解析の結果からイソブタノールストレス応答に関与する 16 個の転写制御因子が同定された [45]。この研究により、イソブタノールは二成分制御系 ArcAB を活性化し、呼吸鎖関連遺伝子の発現を大きく変化させることが示された。また *E. coli* においてブタノールにより、酸化ストレス応答遺伝子の発現が上昇することが見出され、実際に細胞内の活性酸素種がブタノールにより増加することが示された [46]。この研究から酸化ストレス耐性がアルコールストレス耐性付与に有益であることが示唆された。*C. glutamicum* においては、これまでアルコール耐性機構およびアルコールストレス応答について解析が行われていなかった。

本研究では、*C. glutamicum* においてイソブタノール耐性に関与する遺伝子を見出すことを目指して、イソブタノールストレス応答機構の解析を行った。トランスクリプトーム解析を用いて、イソブタノールによる遺伝子発現への影響を解析した。イソブタノールに応答してトリプトファン生合成遺伝子、NAD 生合成遺伝子、シキミ酸利用および芳香族分解に関与する遺伝子、HSP 遺伝子、およびストレス応答に関与するシグマ因子をコードする *sigB* および *sigE* の発現が誘導されることを見出した。これら遺伝子の発現誘導機構について検証を行い、トリプトファン生合成遺伝子のアテニュエーションがイソブタノールの影



響を受けること、またシグマ因子をコードする *sigE* のイソブタノールに応答した発現上昇が二成分制御系 **PhoSR** によって制御されていることを見出した。さらに **PhoSR** はイソブタノール耐性に大きく寄与していることを明らかにした。本研究の得られた知見は、*C. glutamicum* のイソブタノールに対するストレス応答機構の解明につながると共に、イソブタノール耐性株の開発において有益な知見となる。

## 2. 方法と材料

### 2-1 菌株、培地、および培養条件

本研究で使用した菌株とプラスミドは Table 4 に、プライマーは Table 5 に記載した。 *sigB* 欠損株、 *cseE* 欠損株、 *phoS* 欠損株、 および *phoR* 欠損株は、公益財団法人地球環境産業技術研究機構の豊田晃一博士より分譲して頂いた。また LKStrp19-2 および LKSiclR1-2 は公益財団法人地球環境産業技術研究機構の須田雅子博士より分与して頂いた。

*E. coli* HST02 はプラスミドの構築のために使用し、lysogeny broth (LB) 培養液を用いて 37°C にて振とう培養 (200 rpm) した。

*C. glutamicum* R 株の培養には、A 培地 (2 g/L Urea、7 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.5 g/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、0.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、6 mg/L FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、6 mg/L MnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、0.2 mg/L Biotin、0.2 mg/L Thiamin-HCl、2 g/L Yeast extract、7 g/L Casamino acid) を使用した。

前培養は、4% グルコースを含む A 培地を使用し、33°C で振とう培養器 (200 rpm) で一晩培養を行った。

### 2-2 生育試験

4% グルコースを含む A 培地で対数増殖期 (OD<sub>610</sub> 1.0-2.0) まで培養し、終濃度 0%、1.0%、1.5%、2% (v/v) のイソブタノールを添加し、2、4、6、8 時間後の OD<sub>610</sub> を測定した。比増殖速度は、以下の式を用いて算出した。

$$\mu = (\ln OD_2 - \ln OD_1) / (t_2 - t_1)$$

t<sub>1</sub> および t<sub>2</sub> は OD<sub>610</sub> を測定した時間 (t) を示し、OD<sub>1</sub> および OD<sub>2</sub> は各時間 (t) における OD<sub>610</sub> を示す。

### 2-3 RNA 抽出

Total RNA の抽出には NucleoSpin® II (MACHEREY-NAGEL) を用いた。細胞培養液に等量の RNAProtect Bacteria reagent (Quiagen) を加え、室温にて 5 分間静置し、6,000 × g で 5 分間遠心した。ペレットを 0.1% β-メルカプトエタノールを含む RA1 (NucleoSpin® II) で懸濁した。懸濁液を 0.1 mm zirconia/ silica ビーズと混ぜ、FastPrep FP120 (BIO 101, Thermo Savant) を用いて 35 秒、速さ 6.5、間隔 5 分を 3 サイクル行い、細胞を破碎した。細胞破碎液を 29100 × g で 10 分間遠心した。上清を回収し、NucleoSpin® II のプロトコールに従い RNA の精製を行った。RNA 精製液は Recombinant DNaseI (TAKARA) を用いて 37°C にて 30 分間 DNase 反応を行った。DNase 反応後、フェノールクロロホルム抽出およびイソ

プロパノール沈殿を行い、RNA を精製した。

## 2-4 マイクロアレイ解析

4%グルコースを含む A 培地で対数増殖期まで培養し、0-2%（終濃度 v/v）のイソブタノールを添加し、添加直前（0分）と10分、20分、30分後に細胞培養液1mlを回収し、RNA抽出に用いた。

Agilent eArray platform (Agilent Technologies) を用いて作成された *C. glutamicum* R オリゴヌクレオチドアレイスライドを使用した [52]。各遺伝子プローブは2か所ずつセットされている。

cDNA は 10 µg の total RNA を用いて逆転写により合成し、SuperScript indirect cDNA labeling system (Life Technologies) を用いて Cy3 でラベルした。ラベルした cDNA (1.7 µg) を Blocking Agent と Hi-PRM hybridization buffer と混合し、65°C で回転式の Agilent hybridization oven で17時間、ハイブリダイゼーションを行った。その後、室温にて GE wash buffer 1 (Agilent) で1分間、37°Cにて GE wash buffer 2 (Agilent) で1分間、スライドを洗浄した。スライドを Agilent microarray scanner にセットしスキャンを行った。スキャンした画像からシグナル値を Feature Extraction software version10.5.5.1 (Agilent) で算出した。算出したシグナル値は GeneSpring GX version12.0 で解析を行い、ノーマライズは50パーセンタイルで percentile shift で行い、各サンプルの50パーセンタイルの値を揃えることでアレイ間の誤差を補正した。

遺伝子の機能分類には、cluster of orthologous groups (COG) を用いた。COG の割り当ては先行研究[16]を基に一部修正した。COG カテゴリごとの遺伝子発現傾向は、フィッシャーの正確確率検定を用いて解析した。

$$p\text{-value} = \frac{eC_a \times fC_c}{nC_g}$$

n はゲノム上の全遺伝子数、g は発現が上昇または低下したゲノム上の全遺伝子数を示す。e は COG カテゴリに含まれる全遺伝子数、a は COG カテゴリにおいて発現が上昇または低下した遺伝子数、f はゲノム上の全遺伝子数 (n) から e を除いた遺伝子数、c は発現が上昇または低下した全遺伝子数 (g) から a を除いた遺伝子数を示す。

## 2-5 定量 RT-PCR

Quantitative reverse-transcription PCR (定量 RT-PCR) は、Applied Biosystems 7500 Fast real-time PCR system (Life Technologies) を利用した。20 µl 反応液に 10 µl

FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche Diagnostics)、5 U murine leukemia virus (MuLV) reverse transcriptase (Applied Biosystems)、2 U RNase inhibitor、0.5  $\mu$ M フォワードプライマーとリバースプライマー、および total RNA を混合した。内在性コントロールとして 16S rRNA を使用し、1 ng total RNA を混合した。その他遺伝子の定量には 50 ng total RNA を混合した。50°C で 30 分間の逆転写反応後、95°C で 10 分間加熱し、95°C で 15 秒、60°C で 30 秒を 40 回サイクル行った。最低 3 回の実験を行い、平均値を算出した。

## 2-6 DNA アフィニティー精製

*sigE* プロモーター領域は、*sigE\_F* と *sigE-p\_R* を用いて転写開始点を基準に -420 から +15 を増幅した。PCR 産物は QIAquick PCR purification kit (Quiagen) を用いて精製した。精製した PCR 産物は、pGEM-T (Easy) Vector Systems を用いてクローニングし、*sigE-p* × pGEM-T を構築した。ビオチンタグを付加したプライマー sp6-bio と *sigE-p\_R* を用いて、*sigE* プロモーター領域を増幅した。PCR 産物を精製し、ビオチンタグ PCR 産物と 4 mg Dynabeads M-280 Streptavidin (Invitrogen) を混合し、Invitrogen のプロトコールに従い、マグネットスタンドを用いて非吸着 DNA を除去した。Dynabeads の平衡化には binding buffer (5 mM Tris-HCl、pH 7.5、0.5 mM EDTA、1 M NaCl) を用いた。

*C. glutamicum* を OD<sub>610</sub> 3-4 まで培養して、細胞培養液を回収し、TN buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5、50 mM NaCl) で洗浄し、ペレットを -80°C で保存した。ペレットを 5 ml binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5、1 mM EDTA、1 mM DTT、0.005% Tirtion-X 100) で懸濁した。1 ml の懸濁液を 250 mg の 0.1 mm zirconia/silica beads を入れた 15 ml チューブに加え、BIORUPTOR (東湘電機) を用いて超音波処理 5 秒間、インターバル 5 秒間を 45 分間繰り返し、細胞を破碎した。上清を回収し、4°C にて 50000 × g、25 分間の遠心を行った。上清を Dynabeads と混合し 4°C で 2 時間、回転させながら吸着させた。15000 × g で 1 分間の遠心を行い、マグネットスタンドを用いて上清を除去した。残ったビーズを 600  $\mu$ l wash buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5、1 mM EDTA、1 mM DTT、0.005% Tirtion-X 100、120 mM NaCl) で洗浄した。タンパク質を溶出するため、1 M Elution buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5、1 mM EDTA、1 mM DTT、0.005% Tirtion-X 100、1 M NaCl) を 40  $\mu$ l ずつビーズと混合し、マグネットスタンドを用いて上清を回収した。溶出液を 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel を用いた電気泳動によりタンパク質の分離を行った。タンパク質の LC-MS/MS による同定は、日本プロテオミクスに依頼した。

## 2-7 細胞内アミノ酸の定量

細胞乾燥重量を測定するため、4%グルコースを含む 10 ml の A 培地で一晚培養した細胞培養液から 1000  $\mu$ l、500  $\mu$ l、250  $\mu$ l を 2 サンプルずつ回収し、一方は生理食塩水で洗浄後、80°C で重量が一定になるまで乾燥させ、重量を測定した。もう一方は 1000  $\mu$ l になるように希釈して、OD<sub>610</sub> を計測した。計測した OD<sub>610</sub> と乾燥重量から相関係数を算出し、OD<sub>610</sub> と乾燥重量の相関係数を 0.2696 とした。細胞内アミノ酸の抽出は、Wittmann らの手法を参考にした [53]。OD<sub>610</sub> 2 程度まで培養し、吸引器を用いて 10 ml をろ過した (PTFE membrane filter, 孔径 50  $\mu$ m, 47 mm, ADVANTEC)。16 ml 生理食塩水で洗浄し、細胞の付着したメンブレンを 2 ml の蒸留水に浸し、100°C で 15 分間加熱した。抽出液を 4°C にて 16000  $\times$  g で 4 分間遠心を行い、上清を -25°C で保存した。アミノ酸の定量には、高速液体クロマトグラフィー (Prominence20A, Shimadzu) を用いた。

## 2-8 生菌数測定

前培養液を集菌し、OD<sub>610</sub> 50 となるように調製した。900  $\mu$ l のイソブタノール、エタノールまたは sodium dodecyl sulfate (SDS) と 1%グルコースを含む A 培地に 100  $\mu$ l の細胞液を混合し、33°C にて 1 時間、200 rpm でインキュベートした。その後、OD<sub>610</sub> 1 になるように希釈し、10 倍希釈の希釈系列を、 $1 \times 10^{-5}$  まで調製した。希釈系列をそれぞれ A 寒天培地に 5  $\mu$ l ずつスポットし、33°C でおよそ 20 時間培養後、撮影を行った。

Table 4. 本研究で使用した菌株とプラスミド

菌株・プラスミド	遺伝子型・特徴	由来
<b>菌株</b>		
<i>Escherichia coli</i>		
HST02	F'[traD36, proA <sup>+</sup> B <sup>+</sup> , lacI <sup>q</sup> , lacZΔM15]/Δ(lac-proAB), recA, endA, gyrA96, thi, e14-(mcrA-), supE44, relA, ΔdeoR, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)	TAKARA
JM110	dam, dcm, supE44, hsdR17, thi, leu, rpsL1, lacY, galK, galT, ara, tonA, thr, tsx, Δ(lac-proAB)/F'[traD36, proAB <sup>+</sup> , lacI <sup>q</sup> , lacZΔM15]	[54]
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> , ompT, hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> - m <sub>B</sub> -), gal(λcI 857, ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7gene1), dcm(DE3)	[55]
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		
R	野生株	[16]
ΔndnR	cgR_1153 (ndnR) 欠損	[56]
ΔqsuR	cgR_0491 (qsuR) 欠損	[57]
mprA mutant	mprA : : Tn	[58]
ΔsigB	cgR_1749 (sigB) 欠損	Not published
ΔsigE	cgR_1204 (sigE)欠損	This study
ΔcseE	cgR_1205 (cseE) 欠損	Not published
trpL W14X	trpL W14→X 変異	This study
Δ0115	cgR_0115 欠損	This study
ΔramB	cgR_0442 (ramB) 欠損	This study
ΔmtrA	cgR_0863 (mtrA) 欠損	This study
Δ2325	cgR_2325 欠損	This study
1637 mutant	cgR_1637 の 3 アミノ酸残基目が終始コドンに変異	This study
ΔphoS	cgR_2510 (phoS) 欠損	Not published
ΔphoR	cgR_2511 (phoR) 欠損	Not published
ΔltbR	cgR_1389 (ltbR) 欠損	This study
<b>プラスミド</b>		
pCRA725	<i>B. subtilis</i> の sacB を含む Suicide ベクター	[59]
sigEdel-pLKS	cgR_1204 (sigE)コード領域の上流と下流 1 kb の DNA フラグメントを含む pCRA725	This study
115del-pLKS	cgR_0115 のコード領域の上流と下流 1 kb の DNA フラグメントを含む pCRA725	This study
442del-pLKS	cgR_0442 (ramB)コード領域の上流と下流 1 kb の DNA フラグメントを含む pCRA725	This study
863del-pLKS	cgR_0863 (mtrA)コード領域の上流と下流 1 kb の DNA フラグメントを含む pCRA725	This study
1637 stop-pLKS	cgR_1637 の 3 アミノ酸残基目を終始コドンに変異させた DNA フラグメントを含む pCRA725	This study
2325del-pLKS	cgR_2325 コード領域の上流と下流 1 kb の DNA フラグメントを含む pCRA725	This study
LKStrp19-2	trpL W14→X 変異を含む pCRA725	Not published
LKSiclR1-2	cgR_1389 (ltbR) コード領域の上流と下流 800 kb の DNA フラグメントを含む pCRA725	Not published
sigE-p x pGEM-T	sigE プロモーター領域を含む pGEM-T	This study

Table 5. 本研究で使用したプライマー

プライマー	目的遺伝子	配列 (5'-3')
<b>遺伝子欠損に用いたプライマー</b>		
<i>sigEdel1.2-spe I</i>	<i>sigE</i>	GTACTTCGTCTCTCGCAATGATGCG
<i>sigEdel2</i>		GGACTTCTTTTTTCATATAAGTCATTTTG
<i>sigEdel3</i>		GTTCCAACCCACTAAAGTTGGTG
<i>sigEdel4.2-spe I</i>		GTGGCGATGTGGGAAATCCTATTGC
cgR_0115 del1 <i>sac I</i>	cgR_0115	CGAGCTCGAGGAATCCAGCGTTTCAATG
cgR_0115 del4 <i>sac I</i>		CGAGCTCCAATGGATTCAACGACGTGCAC
cgR_0115 del2		CAGCAGAAATCATGAAAATACTGTTTATAGGTCATC
cgR_0115 del3		GTTTTCATGATTTCTGCTGGTCGGCACTATC
cgR_0442 del1 <i>xba I</i>	cgR_0442	GATCTAGATGCGGAATCGG
cgR_0442 del2		GACATATATCGCGCCGTAAGAAAAG
cgR_0442 del3		GTACGGCGGATATATGTCTTTCCCATGGCATG
cgR_0442 del4 <i>xba I</i>		GCTCTAGACGAACGGAATGGTGATGTTG
cgR_863 del1 <i>xba I</i>	cgR_0863	GCTCTAGATTTCTTCGAGCAGATGCTC
cgR_863 del2		CGCTGTGGCAATTTTCTGTGACATGAGAATCCTTC
cgR_863 del3		CACAGAAAATTGCCACAGCGATTAAGTTTTTC
cgR_863 del4 <i>sal I</i>		ACGCGTCGACTCGATGCGCCTGGAATC
cgR_1637 del1 <i>sac I</i>	cgR_1637	CGAGCTCTGAGGTGCATCGTGCAG
cgR_1637 del2		CTGACGAGTTTGGAAGAAATCTAGTCGCTCG
cgR_1637 del3		GATTTCTTCCAACTCGTCAGTGACACGC
cgR_1637 del4 <i>sac I</i>		CGAGCTCGCTCGACGTGTCTGTAG
cgR_2325 del1 <i>xba I</i>	cgR_2325	GCTCTAGACACCTCATCACGAGTAGC
cgR_2325 del2		GAAATTGTGAAGCAGCAGGTGCTCTGAGTTAC
cgR_2325 del3		CACCTGCTGCTTCACAATTTCCATCCTCCG
cgR_2325 del4 <i>xba I</i>		GCTCTAGACTCGGACTCCATCATGTTAC
<b>DNA アフィニティー精製のプローブ作成に用いたプライマー</b>		
<i>sigE-F sph I</i>	<i>sigE</i> プロモーター	TGGCGCTGATGCTCTGATTC
<i>sigE</i> prom-R		GGACTTCTTTTTTCATATAAGTCATTTTGC
SP6-bio		CTCAAGCTATGCATCCAACG
<b>定量 PCR に用いたプライマー</b>		
RT_16S_F	16S rRNA	TCGATGCAACGCGAAGAAC
RT_16S_R		GAACCGACCACAAGGGAAAAC
1150-F	<i>nadS</i>	GTGCGCCTAAAGGGATTGGAGT
1150-R		AGGCAGTGGCAAAGGCGATAG
1151-F2	<i>nadC</i>	GCTGATGGTGACAGCTTTGAGAC
1151-R2		GACGTCCTCTGAATGAAGTTGAGAG
1152-F	<i>nadA</i>	TCACCTCAATTTATGGCGATGACAC
1152-R		GCGTTCAAACGCCCCTCA
1153-F	<i>ndnR</i>	AGCTATCTAGAACAGCTCTACT
1153-R		CGGACAAGTGCCCAATACAC

Table 5 の続き

Primer	目的遺伝子	Sequense (5'-3')
RT1391_Fw	<i>leuD</i>	CCGGTTCGCCGATATTTTC
RT1391_Rv		CCATGATGCCGGTCAAAAG
RT2916_Fw	<i>trpE</i>	TTCGTCCCTCGCGGAAATC
RT2916_Rv		AGTTTGGCGGTCTGGTTCTG
RT2917_Fw2	<i>trpG</i>	CAGCCAACCCGGACCTAAT
RT2917_Rv2		GCATCGGCAGGGTAACCA
RT2918_Fw2	<i>trpD</i>	GGTGGAGTGAAGCTGGTTAAGC
RT2918_Rv2		GCGGAACCCGGACTTGGA
RT2919_Fw	<i>trpC</i>	CAGCGTCGAAGCAGAAAAGG
RT2919_Rv		TGCGGTCCAACCTCTTCAC
RT2920_Fw	<i>trpB</i>	TCGTGCGTGAATTCCACAAG
RT2920_Rv		CGGTGCGCTCTAGCATCTG
RT2921_Fw	<i>trpA</i>	TCTCCGCCGCATCAAAG
RT2921_Rv		TGCCGAAGCCCAAGAAGA
kbt210-0491_RT-F	<i>qsuR</i>	TTCCCAGTTCTGTTCGTGG
kbt211-0491_RT-R		GCATTTCACTGATCGAATCCC
kbt216-0492_RT-F	<i>qsuA</i>	TGATCTTCTCATGGGCGTG
kbt217-0492_RT-R		AGGTTGGGAACATTTCTGCG
kbt212-0493_RT-F	<i>qsuB</i>	AATTGATCGTCCCCACATCG
kbt213-0493_RT-R		AGCTTCTTGCTTTTCGACGC
kbt214-0494_RT-F	<i>qsuC</i>	CATTTACGGACACGACACCTTG
kbt215-0494_RT-R		TAGCTCACCTTCGTGATTGCTC
kbt218-0495_RT-F	<i>qsuD</i>	ATGGTGTGCAGAAACTTCAGG
kbt219-0495_RT-R		CCGACTGCATTGTTGATGAC
cgR_0533_RT_FW2	<i>pitA</i>	GCGCTAGCCTTCGATTTCAC
cgR_0533_RT_RV2		TGTGGCCATCGCATTGC
cgR_2949_RT_FW2	<i>phoC</i>	TCGGTGGCACGCATACG
cgR_2949_RT_RV2		TCCATAGCGTTGAGCAGATCA
cgR_2478_RT_FW2	<i>pstS</i>	CACCGGTTCTCCGATGCT
cgR_2478_RT_RV2		CAACGAGCTGACCGGTAACA
cgR_0988_FW_RT	<i>mprA</i>	GATGCTGGCGCAGATGACTA
cgR_0988_RV_RT		GCGCCAACAGCTCTTCAAG
RT1204-F	<i>sigE</i>	CACCGCATCACCACT
RT1204-R		GCCTCCATGCGGATCTTG
RT2510_F	<i>phoS</i>	GCCAGCAAATGGAGAAGCA
RT2510_R		GCCTTCAACAACCTGGAATGGA
RT2511_F	<i>phoR</i>	TACGCAGACCTCACCTCAAC
RT2511_R		GATCTTTGCCTTGGACAGCAC
RT1210-F	cgR_1210	GCAGTGGATTTGCTCAGTGATAA
RT1210-R		TCAATCAGGTCCACACCAACA
RT1953-F	cgR_1953	TTGTACAGGCCCGGAATTC
RT1953-R		TGGAAGCTGCTCCAAAATACG
<i>sigBFW_RT</i>	<i>sigB</i>	CAAGATTGAAATGCTGCTTCGT
<i>sigBRV_RT</i>		CGACTGGCATGTCCAAGCT



### 3. 結果

#### 3-1 イソブタノールによる生育阻害

イソブタノール添加による生育への影響を Fig. 7 に示した。1%および 1.5% イソブタノールの添加によって比増殖速度の低下は見られたが、11 時間後の OD<sub>610</sub> は 0% とほぼ同程度であった。2% イソブタノールの添加によって比増殖速度は 50% 以下に低下し、11 時間後の OD<sub>610</sub> も約 1/2 に低下した (Fig. 7B)。本研究では、生育に明確に影響が見られた 2% をイソブタノールストレス条件として以降の解析に用いた。

#### 3-2 イソブタノールストレスに応答した遺伝子の発現変化

##### 3-2-1 各 COG カテゴリにおける発現変化の傾向

イソブタノールストレスが発現変化に及ぼす影響を解析するため、対数増殖期に 2% イソブタノールを添加する直前 (0 分) と添加して 10 分、20 分、30 分後における遺伝子の発現量を、マイクロアレイを用いて解析した。2% イソブタノール添加 10 分後では 483 遺伝子の発現が上昇、492 遺伝子の発現が低下、20 分後では 534 遺伝子の発現が上昇、622 遺伝子の発現が低下、30 分後では 508 遺伝子の発現が上昇、630 遺伝子の発現が低下した ( $p$ -value  $\leq 0.05$ )。

*C. glutamicum* R の遺伝子の機能カテゴリは、COG に基づき [60]、3201 遺伝子中 2117 遺伝子に COG が割り当てられている [16]。COG カテゴリごとに発現変化が見られた遺伝子数の割合を Fig. 8A に示した。ほとんどのカテゴリ (C, E, G, H, I, K, L, M, O, P, Q, R, S, T) において 10% 以上の遺伝子に発現変化が見られた。

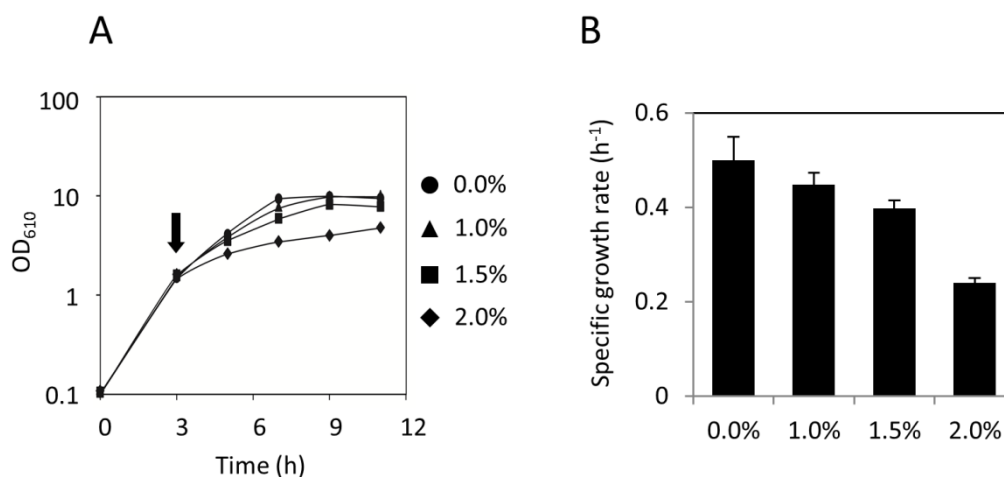


Fig. 7. イソブタノール存在下における *C. glutamicum* R の生育

0-2%のイソブタノールによる生育への影響を示した。矢印はイソブタノールを添加した時間を示している (A)。イソブタノール添加後の比増殖速度を示した (B)。

特にカテゴリ K (Transcription) と O (Posttranslational modification, protein turnover,

chaperones) は、全ての時間において発現上昇した遺伝子数の割合が高く、K は 24% 以上、O は 25% 以上の遺伝子の発現が上昇した。一方、カテゴリ F (Nucleotide transport and metabolism) は、全ての時間において発現が低下した遺伝子数の割合が高く、カテゴリ E (Amino acid transport and metabolism)、G (Carbohydrate transport and metabolism)、J (Translation)、P (Inorganic ion transport and metabolism) は、20 分以降で発現が低下した遺伝子数の割合が高かった。

さらにゲノム全体の発現傾向と比較して、有意な差が見られる COG カテゴリを探した。フィッシャーの正確確率検定を用いて、 $p$ -value を算出した。COG カテゴリにおける発現変化の傾向がゲノム全体と差が大きいほど、低い  $p$ -value で表される。カテゴリ K (Transcription) と O (Posttranslational modification, protein turnover, chaperones) は、全ての時間において  $p$ -value  $\leq 0.05$  以下を示し、有意な発現上昇の傾向が見られた (Fig. 8B)。カテゴリ E (Amino acid transport and metabolism)、G (Carbohydrate transport and metabolism)、J (Translation)、P (Inorganic ion transport and metabolism) は、少なくとも 20 分以降は  $p$ -value  $\leq 0.05$  以下を示し、有意に発現が低下する傾向が見られた (Fig. 8B)。

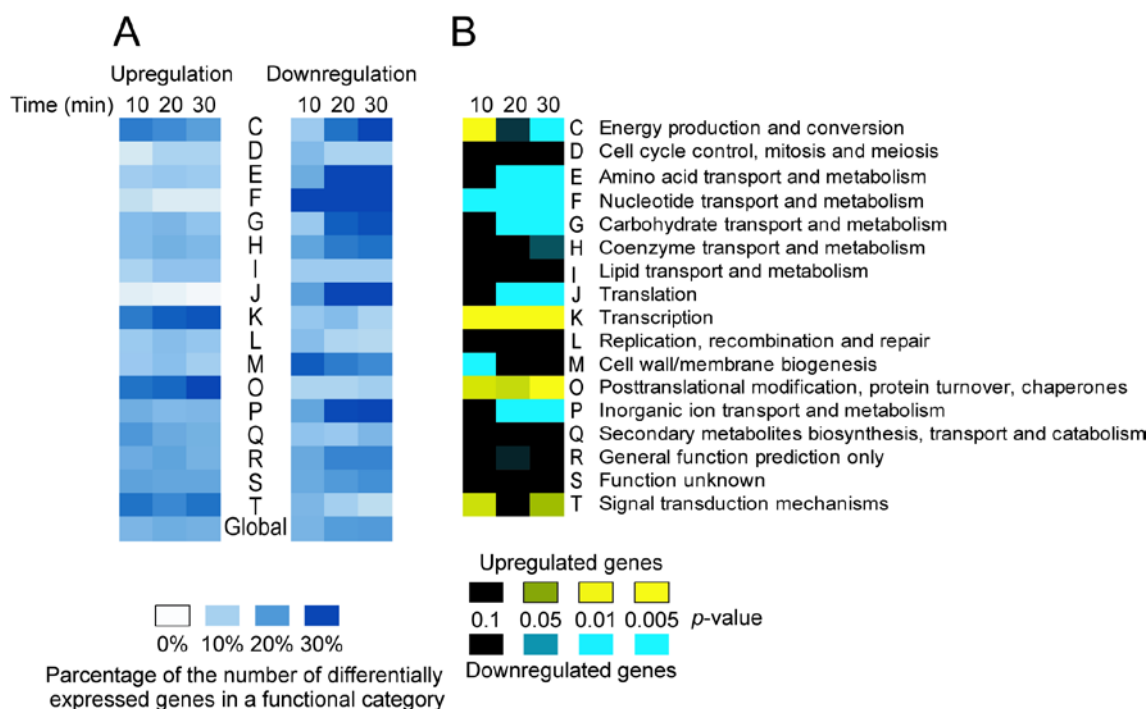


Fig. 8. 2% イソブタノール添加後の各 COG カテゴリの発現変化の傾向

2% イソブタノール添加後において発現が上昇または低下した遺伝子数の割合を COG カテゴリごとに示した (A)。Global はゲノム全体において発現が変化した遺伝子数の割合を示している。ゲノム全体における発現傾向と機能ごとの発現傾向を比較するため、フィッシャーの正確確率検定で算出した  $p$ -value を示した (B)。発現が上昇した遺伝子数の割合がゲノム全体の割合より多い場合は黄色で示し、発現が低下した遺伝子数の割合が多い場合は青色で示した。

### 3-2-2 アミノ酸輸送体およびアミノ酸合成遺伝子の発現変化

カテゴリ E (Amino acid transport and metabolism) に含まれるフェニルアラニン輸送体 *pheP*、グルタミン酸輸送体 *gluABCD*、およびリジン取込みに関与する *lysI* の発現はイソブタノールに応答して低下した。カテゴリ R (General function prediction only) に分類されているが、メチオニン輸送体として同定されている *metP*、*metN* も発現が低下した (Table 6)。

ロイシン生合成遺伝子 *leuA*、*leuB*、および *leuCD*、セリン生合成遺伝子 *serA*、*serC*、芳香族アミノ酸生合成に関わる *aroF* および *aroEKC*、チロシン生合成遺伝子 *tyrA*、グリシン生合成遺伝子 *glyA*、リジン生合成遺伝子 *dapC*、*dapD*、および *dapF*、セリンからメチオニン前駆体の生合成に関与する *metF*、ホモシステインからメチオニンの生合成に関与する *metE*、ヒスチジン生合成遺伝子 *hisE*、*hisG*、アスパラギン代謝遺伝子 *ansA*、アスパラギン酸代謝遺伝子 *aspA2*、プロリン生合成遺伝子 *proB*、およびアラニン生合成遺伝子 *araT* の発現は低下した (Table 7)。

イソブタノール生産に

重要なバリン生合成遺伝子の発現には有意な発現変化は見られなかった。一方で、トリプトファン生合成遺伝子 *trpEGDCBA* の発現は強く誘導された (Table 7)。

Table 6. 発現が変化したアミノ酸輸送体

ORF	Gene	Function	COG	Log <sub>2</sub> stress/control ratio at:		
				10 min	20 min	30 min
cgR_1065	<i>lysI</i>	L-lysine permease	E	<b>-1.94</b>	<b>-2.34</b>	<b>-2.31</b>
cgR_1113	<i>metP</i>	Na <sup>+</sup> -dependent transporters of the SNF family	R	-0.45	<b>-1.22</b>	<b>-1.63</b>
cgR_0752	<i>metN</i>	ABC-type transporter, ATPase component	R	-0.88	<b>-1.14</b>	<b>-1.42</b>
cgR_0751	<i>metI</i>	ABC transporter, transmembrane component	R	-0.78	<b>-1.22</b>	<b>-1.32</b>
cgR_1237	<i>pheP</i>	amino acid permease	E	<b>-3.11</b>	<b>-3.25</b>	<b>-3.30</b>
cgR_1781	<i>gluB</i>	glutamate secreted binding protein	E	-0.88	<b>-2.95</b>	<b>-3.48</b>
cgR_1782	<i>gluC</i>	glutamate permease	E	-1.06	<b>-3.46</b>	<b>-3.69</b>
cgR_1783	<i>gluD</i>	glutamate permease	E	-0.77	<b>-3.34</b>	<b>-3.76</b>
cgR_1780	<i>gluA</i>	glutamate uptake system ATP-binding protein	E	<b>-0.95</b>	<b>-2.44</b>	<b>-2.77</b>

**Bold:** *p*-value ≤ 0.05

Table 7. 発現が変化したアミノ酸代謝遺伝子

ORF	Gene	Function	COG	Log <sub>2</sub> stress/control ratio at:		
				10 min	20 min	30 min
<b>Leucine biosynthesis</b>						
cgR_0323	<i>leuA</i>	2-isopropylmalate synthase	E	-1.21	<b>-1.73</b>	<b>-2.17</b>
cgR_1364	<i>leuB</i>	3-isopropylmalate dehydrogenase	E	<b>-1.29</b>	<b>-0.56</b>	-0.41
cgR_1390	<i>leuC</i>	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	E	<b>-2.04</b>	<b>-2.04</b>	<b>-2.21</b>
cgR_1391	<i>leuD</i>	3-isopropylmalate dehydratase small subunit	E	-1.23	-1.27	<b>-1.51</b>
<b>Serine biosynthesis</b>						
cgR_0942	<i>serC</i>	phosphoserine transaminase	HE	-1.28	<b>-2.03</b>	<b>-2.03</b>
cgR_1362	<i>serA</i>	phosphoglycerate dehydrogenase	E	<b>-1.14</b>	<b>-1.97</b>	<b>-2.06</b>
<b>Chorismate biosynthesis</b>						
cgR_1083	<i>aroF</i>	probable phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	E	-1.07	-1.37	<b>-1.46</b>
cgR_1672	<i>aroC</i>	putative chorismate synthase	E	-1.67	<b>-1.52</b>	<b>-1.47</b>
cgR_1677	<i>aroE3</i>	probable shikimate 5-dehydrogenase protein	E	<b>-1.34</b>	<b>-1.66</b>	<b>-2.02</b>
<b>Tyrosine biosynthesis</b>						
cgR_0300	<i>tyrA</i>	putative prephenate dehydrogenase	E	<b>-2.54</b>	<b>-2.28</b>	<b>-2.50</b>
<b>Tryptophan biosynthesis</b>						
cgR_2916	<i>trpE</i>	anthranilate synthase component I	EH	<b>2.48</b>	<b>2.97</b>	<b>1.93</b>
cgR_2917	<i>trpG</i>	anthranilate synthase component II	EH	<b>2.70</b>	<b>3.47</b>	<b>2.57</b>
cgR_2918	<i>trpD</i>	anthranilate phosphoribosyltransferase	E	1.90	<b>2.88</b>	<b>2.13</b>
cgR_2919	<i>trpC</i>	indole-3-glycerol-phosphate synthase	E	1.96	<b>2.90</b>	<b>2.26</b>
cgR_2920	<i>trpB</i>	tryptophan synthase beta chain	E	1.65	<b>2.75</b>	<b>2.18</b>
cgR_2921	<i>trpA</i>	tryptophan synthase alpha chain	E	<b>1.52</b>	<b>2.54</b>	<b>2.69</b>
<b>Glycine biosynthesis</b>						
cgR_1087	<i>glyA</i>	serine hydroxymethyltransferase	E	<b>-1.75</b>	<b>-1.85</b>	<b>-1.70</b>
<b>Lysine biosynthesis</b>						
cgR_1186	<i>dapC</i>	putative aspartate aminotransferase	E	<b>-1.23</b>	<b>-1.02</b>	<b>-0.73</b>
cgR_1189	<i>dapD1</i>	tetrahydrodipicolinate succinylase	E	<b>-1.76</b>	<b>-1.22</b>	<b>-1.12</b>
cgR_1773	<i>dapF</i>	diaminopimelate epimerase	E	<b>-2.29</b>	<b>-2.26</b>	<b>-2.32</b>
<b>Methionine biosynthesis</b>						
cgR_1223	<i>metE</i>	homocysteine methyltransferase	E	0.21	-1.32	<b>-2.10</b>
cgR_2053	<i>metF</i>	5,10-methylenetetrahydrofolate reductasetase	E	<b>-1.35</b>	<b>-1.08</b>	<b>-0.95</b>
<b>Histidine biosynthesis</b>						
cgR_1564	<i>hisG</i>	ATP phosphoribosyltransferase	E	<b>-1.44</b>	<b>-1.55</b>	<b>-1.68</b>
cgR_1565	<i>hisE</i>	phosphoribosyl-ATP cyclohydrolase	E	<b>-1.30</b>	<b>-1.31</b>	<b>-1.44</b>
<b>Proline biosynthesis</b>						
cgR_2239	<i>proB</i>	glutamate 5-kinase protein	E	<b>-1.81</b>	<b>-1.99</b>	<b>-1.33</b>
<b>Alanine biosynthesis</b>						
cgR_2734	<i>alaT</i>	aspartate aminotransferase	E	<b>-2.83</b>	<b>-2.73</b>	<b>-2.85</b>
<b>Asparagine metabolism</b>						
cgR_2025	<i>ansA</i>	L-asparaginase	EJ	<b>-1.13</b>	-0.94	-0.71
<b>Aspartate metabolism</b>						
cgR_2809	<i>aspA2</i>	aspartate ammonia-lyase	E	-2.11	<b>-2.75</b>	<b>-3.21</b>

Bold:  $p$ -value  $\leq 0.05$ 

## 3-2-3 核酸合成遺伝子の発現変化

カテゴリ F にはピリミジン生合成遺伝子とプリン生合成遺伝子が含まれる。ピリミジン生合成遺伝子のうち、グルタミンから UTP の生合成に参与する *pyrBC-carBA-pyrF* および *cmk* は発現が低下した (Fig. 9)。dCTP 生合成に参与する *pyrG* と dTT 生合成に参与する *thyX* は発現が上昇したが、その他の dCTP および dTTP 生合成遺伝子には発現変化は見られなかった。プリン生合成遺伝子のうち、phosphoribosyl diphosphate (PRPP) から inosine monophosphate (IMP) の生合成に参与する *purF*、*purD*、*purN*、*purL*、*purQS*、*purK*、*purC*、および *purB*、そして IMP から ATP の生合成に参与する *purA* および *purB*、および IMP から GTP の生合成に参与する *guaB3*、*guaB1*、および *guaA* の発現が低下した (Fig. 10)。

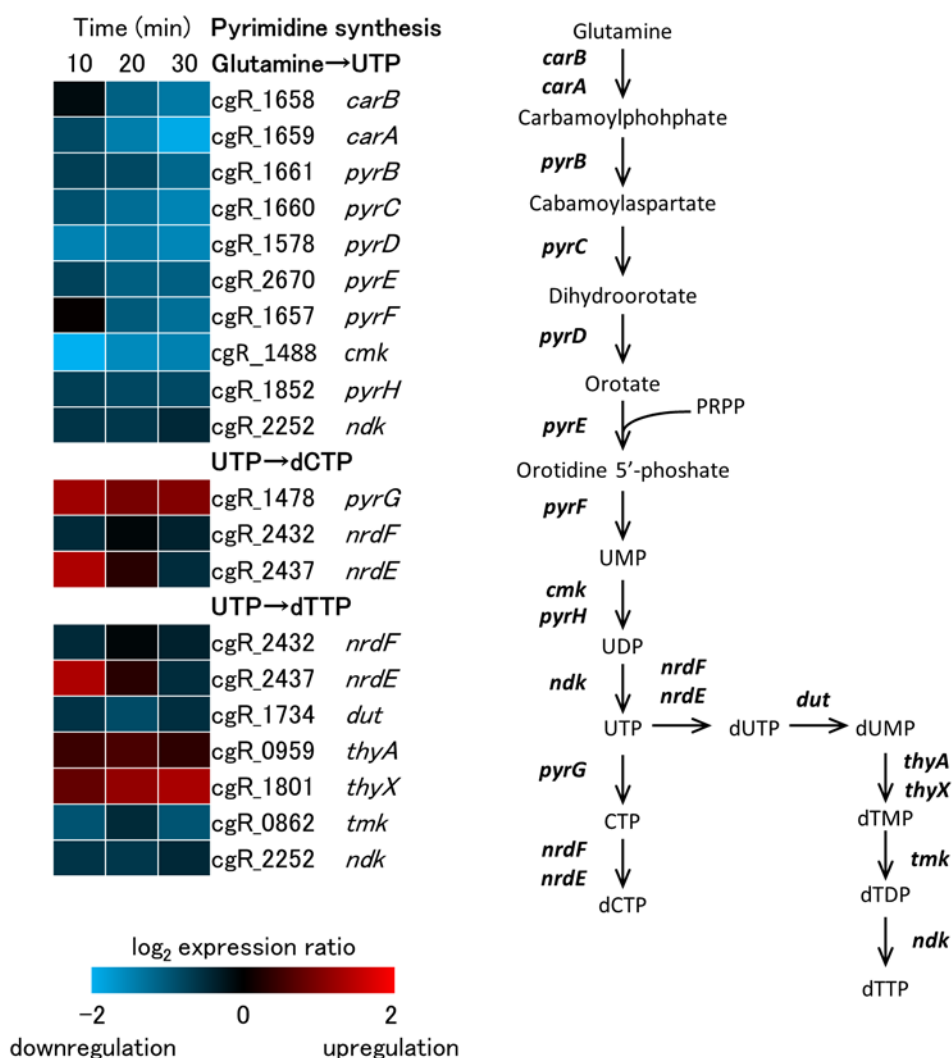


Fig. 9. ピリミジン生合成遺伝子の発現変化

イソブタノール添加 10 分後、20 分後、30 分後における発現量を示した。生合成経路は KEGG を参考に作成した。

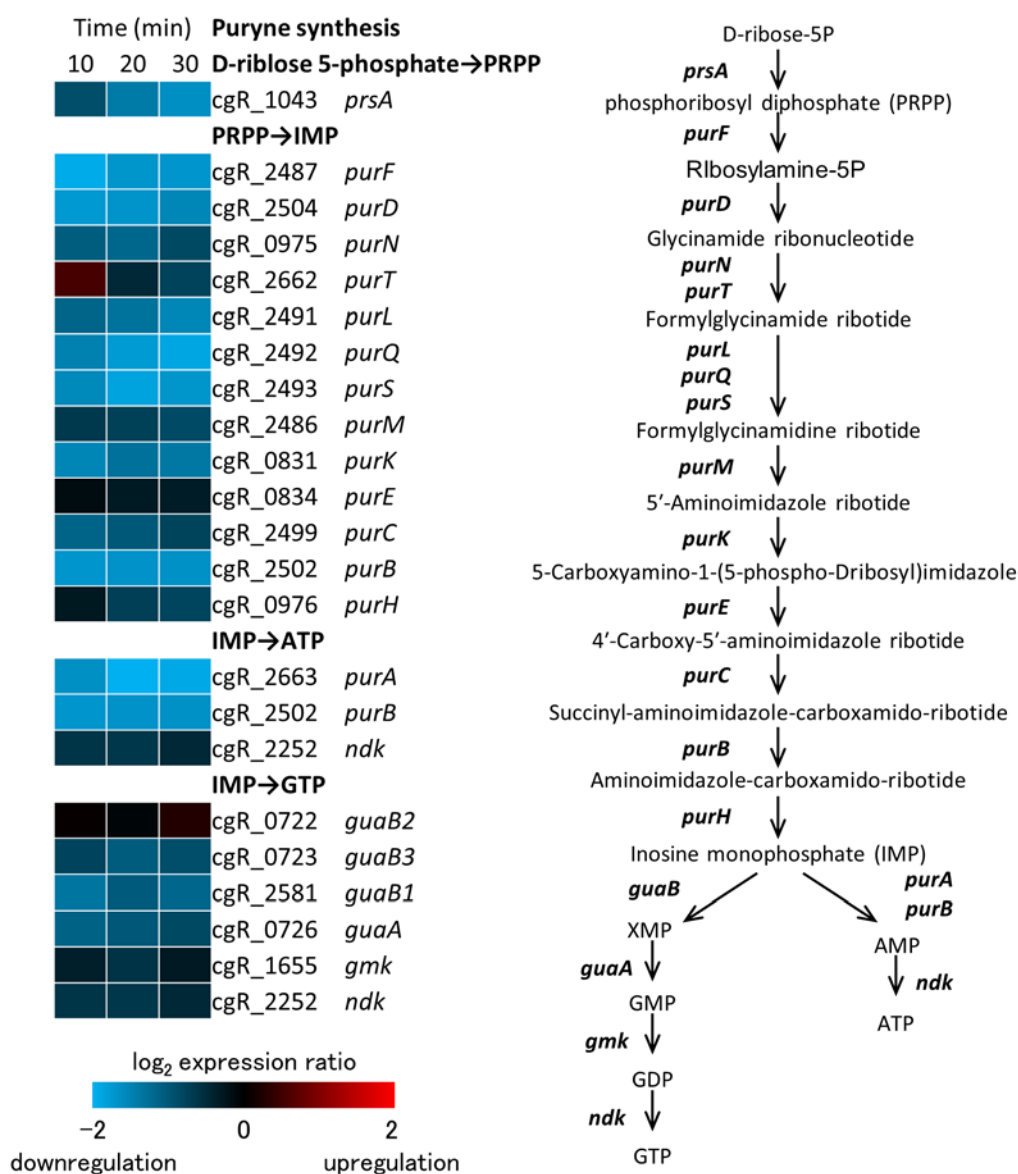


Fig. 10. プリン合成遺伝子の発現変化  
 イソブタノール添加 10 分後、20 分後、30 分後における発現量を示した。生合成経路は KEGG を参考に作成した。

### 3-2-4 翻訳関連遺伝子の発現変化

カテゴリ J (Translation) はイソブタノールに応答して発現が低下する傾向が見られた。翻訳プロセスに関与するリボソームサブユニットをコードする遺伝子や翻訳開始因子および延長因子をコードする遺伝子、tRNA および rRNA の合成に関与する *truA* および *rluD*、tRNA および rRNA の成熟に関与する *rph* および *mnpA*、tRNA および rRNA の修飾に関与する *spoU*、*cgR0939*、*miaAB*、および *trmD*、そしてアミノアシル tRNA 合成酵素をコードする遺伝子 *gltX*、*argS*、*aspS*、*hisS*、*thrS*、*proS*、*valS*、および *lysS* の発現が低下した (Table 8)。

Table 8. 発現変化が見られた翻訳関連遺伝子

ORF	Gene	Function	COG	Log <sub>2</sub> stress/control ratio at:		
				10 min	20 min	30 min
<b>Translation factor</b>						
cgR_0679	<i>infA</i>	translation initiation factor IF-1	J	-0.64	<b>-1.28</b>	<b>-1.58</b>
cgR_1442	<i>infC</i>	translation initiation factor IF3 protein	J	<b>-1.66</b>	<b>-0.84</b>	-1.19
cgR_1668	<i>efp</i>	translation elongation factor P/translation initiation factor eIF-5A	J	<b>-2.12</b>	<b>-2.25</b>	<b>-2.51</b>
cgR_1853	<i>tsf</i>	translation elongation factor Ts (EF-Ts)	J	-0.66	<b>-1.67</b>	<b>-1.74</b>
<b>Ribosomal small subunit</b>						
cgR_0605	<i>rpsJ</i>	30S ribosomal protein S10	J	-1.10	<b>-1.24</b>	<b>-1.19</b>
cgR_0612	<i>rpsS</i>	30S ribosomal protein S19	J	-0.26	<b>-0.75</b>	<b>-1.45</b>
cgR_0636	<i>rpsH</i>	30S ribosomal protein S8	J	-0.28	<b>-0.67</b>	<b>-1.02</b>
cgR_0680	<i>rpsM</i>	30S ribosomal protein S13	J	-0.37	<b>-1.03</b>	<b>-1.45</b>
cgR_0681	<i>rpsK</i>	30S ribosomal protein S11	J	-0.76	<b>-1.84</b>	<b>-1.90</b>
cgR_0682	<i>rpsD</i>	30S ribosomal protein S4	J	-0.32	<b>-1.17</b>	<b>-1.58</b>
cgR_0700	<i>rpsI</i>	30S ribosomal protein S9	J	-1.15	<b>-1.05</b>	<b>-1.25</b>
cgR_0980	<i>rpsR</i>	30S ribosomal protein S18	J	-1.03	<b>-1.43</b>	<b>-1.44</b>
cgR_0981	<i>rpsN</i>	30S ribosomal protein S14	J	-0.64	-0.89	<b>-1.10</b>
cgR_1805	<i>rpsO</i>	30S ribosomal protein S15	J	-0.79	<b>-1.37</b>	<b>-1.39</b>
cgR_1854	<i>rpsB</i>	30S ribosomal protein S2	J	-0.34	-0.93	<b>-1.36</b>
cgR_1941	<i>rpsP</i>	30S ribosomal protein S16	J	<b>-1.12</b>	<b>-1.95</b>	<b>-1.86</b>
cgR_2226	<i>rpsT</i>	30S ribosomal protein S20	J	-0.89	<b>-1.19</b>	-1.33
<b>Ribosomal large subunit</b>						
cgR_0579	<i>rplK</i>	50S ribosomal protein L11	J	-0.34	<b>-1.12</b>	<b>-1.64</b>
cgR_0580	<i>rplA</i>	50S ribosomal protein L1	J	-0.46	<b>-1.54</b>	<b>-2.09</b>
cgR_0588	<i>rplJ</i>	50S ribosomal protein L10	J	-0.39	<b>-0.82</b>	<b>-1.04</b>
cgR_0589	<i>rplL</i>	50S ribosomal protein L7/L12	J	-0.45	<b>-0.98</b>	<b>-1.18</b>
cgR_0607	<i>rplC</i>	50S ribosomal protein L3	J	-1.12	<b>-1.27</b>	<b>-1.40</b>
cgR_0608	<i>rplD</i>	50S ribosomal protein L4	J	-0.96	<b>-1.30</b>	<b>-1.35</b>
cgR_0610	<i>rplW</i>	50S ribosomal protein L23	J	-0.91	<b>-1.26</b>	-1.49
cgR_0611	<i>rplB</i>	50S ribosomal protein L2	J	-0.25	-0.65	<b>-1.19</b>
cgR_0613	<i>rplV</i>	50S ribosomal protein L22	J	-0.12	-0.64	<b>-1.01</b>
cgR_0641	<i>rpmD</i>	50S ribosomal protein L30	J	-0.26	<b>-0.78</b>	<b>-1.07</b>
cgR_0642	<i>rplO</i>	50S ribosomal protein L15	J	-0.07	<b>-1.13</b>	<b>-1.38</b>
cgR_0684	<i>rplQ</i>	50S ribosomal protein L17	J	-0.37	<b>-1.36</b>	<b>-1.91</b>
cgR_0699	<i>rplM</i>	50S ribosomal protein L13	J	-1.05	<b>-0.85</b>	<b>-1.11</b>
cgR_0982	<i>rpmG</i>	50S ribosomal protein L33	J	-0.64	<b>-1.11</b>	<b>-1.26</b>
cgR_0983	<i>rpmB</i>	50S ribosomal protein L28	J	-0.75	<b>-0.90</b>	<b>-1.14</b>
cgR_0986	<i>rpmE</i>	50S ribosomal protein L31	J	-0.72	-0.81	<b>-1.08</b>
cgR_0987	<i>rpmF</i>	50S ribosomal protein L32	J	-0.47	<b>-1.42</b>	<b>-1.63</b>
cgR_1040	<i>rplY</i>	50S ribosomal protein L25	J	<b>-1.46</b>	<b>-2.02</b>	<b>-2.08</b>
cgR_1443	<i>rpmI</i>	50S ribosomal protein L35	J	-1.42	<b>-0.90</b>	<b>-1.22</b>
cgR_1444	<i>rplT</i>	50S ribosomal protein L20	J	-1.28	<b>-0.96</b>	-1.11
cgR_1925	<i>rplS</i>	50S ribosomal protein L19	J	-0.64	<b>-1.57</b>	<b>-1.73</b>
cgR_2246	<i>rpmA</i>	50S ribosomal protein L27	J	<b>-1.36</b>	<b>-1.54</b>	-1.46
cgR_2247	<i>rplU</i>	50S ribosomal protein L21	J	<b>-1.26</b>	<b>-1.15</b>	<b>-1.21</b>
cgR_2440	<i>rpmJ</i>	50S ribosomal protein L36	J	<b>-1.16</b>	<b>-1.62</b>	-1.27
cgR_2989	<i>rpmH</i>	50S ribosomal protein L34	J	<b>-1.12</b>	<b>-1.04</b>	-1.09

Bold: p-value ≤ 0.05

Table 8 の続き

ORF	Gene	Function	COG	Log <sub>2</sub> stress/control ratio at:		
				10 min	20 min	30 min
<b>Pseudouridine synthase</b>						
cgR_0685	<i>truA</i>	probable tRNA pseudouridine synthase A protein	J	<b>-1.66</b>	<b>-2.49</b>	<b>-2.25</b>
cgR_2020	<i>rluD</i>	ribosomal large subunit pseudouridine synthase D	J	<b>-2.52</b>	<b>-2.49</b>	<b>-2.25</b>
<b>Posttranscriptional regulation</b>						
cgR_2974	<i>pcnA</i>	polyA polymerase	J	<b>-1.39</b>	<b>-1.42</b>	<b>-1.40</b>
<b>tRNA maturation</b>						
cgR_2414	<i>rph</i>	probable ribonuclease PH	J	<b>-0.86</b>	<b>-1.25</b>	-0.91
cgR_2988	<i>rnpA</i>	RNase P protein component	J	<b>-2.26</b>	<b>-1.92</b>	<b>-1.67</b>
<b>tRNA and rRNA modification</b>						
cgR_0762	<i>spoU</i>	putative tRNA/tRNA methyltransferase protein	J	<b>-1.43</b>	<b>-1.50</b>	<b>-1.71</b>
cgR_0939		23S ribosomal RNA methyltransferase	J	-1.66	<b>-1.99</b>	<b>-2.19</b>
cgR_1774	<i>miaA</i>	tRNA delta-2-isopentenylpyrophosphate (IPP) transferase	J	<b>-1.54</b>	-1.44	<b>-1.42</b>
cgR_1779	<i>miaB</i>	tRNA methylthiotransferase	J	<b>-2.53</b>	<b>-2.68</b>	<b>-2.30</b>
cgR_1937	<i>trmD</i>	tRNA (guanine-N1)-methyltransferase	J	<b>-1.26</b>	<b>-1.19</b>	<b>-1.37</b>
<b>Aminoacyl-tRNA synthetase</b>						
cgR_0310	<i>gltX</i>	glutamyl-tRNA synthetase-related protein	J	-0.25	<b>-1.24</b>	-1.12
cgR_1259	<i>argS</i>	arginyl-tRNA synthetase	J	-0.39	-0.71	<b>-1.20</b>
cgR_1683	<i>aspS</i>	probable aspartyl-tRNA synthetase protein	J	-1.43	-1.56	<b>-1.68</b>
cgR_1694	<i>hisS</i>	histidyl-tRNA synthetase	J	<b>-1.65</b>	<b>-1.83</b>	<b>-1.22</b>
cgR_1716	<i>thrS</i>	threonyl-tRNA synthetase	J	-0.65	<b>-0.99</b>	<b>-1.42</b>
cgR_1823	<i>proS</i>	probable prolyl-tRNA synthetase protein	J	<b>-1.37</b>	<b>-1.43</b>	<b>-1.45</b>
cgR_2258	<i>vals</i>	putative valine-tRNA ligase	J	<b>-1.79</b>	-1.01	<b>-1.33</b>
cgR_2588	<i>lysS</i>	lysyl-tRNA synthetase	J	<b>-2.25</b>	<b>-1.90</b>	<b>-1.82</b>
<b>Helicase</b>						
cgR_1238		superfamily II DNA and RNA helicase	LKJ	-1.71	<b>-1.04</b>	<b>-0.91</b>
<b>Peptidyl tRNA hidrolase</b>						
cgR_1036	<i>pth2</i>	peptidyl-tRNA hydrolase	J	<b>-1.95</b>	<b>-1.56</b>	<b>-1.72</b>
<b>Protein maturation</b>						
cgR_2642	<i>defI</i>	polypeptide deformylase	J	<b>-1.10</b>	<b>-1.47</b>	<b>-1.16</b>
<b>pppGpp synthetase</b>						
cgR_1804	<i>gpsI</i>	putative polyribonucleotide phosphorylase / guanosine pentaphosphatesynthetase	J	-1.19	<b>-1.13</b>	<b>-0.83</b>

**Bold:** *p*-value ≤ 0.05



### 3-3 イソブタノールストレスに応答する転写制御機構

カテゴリ K (Transcription) では、イソブタノールに応答して転写制御因子、二成分制御系およびシグマ因子をコードする遺伝子の発現が上昇した (Fig. 8)。 *C. glutamicum* のゲノムには、139 個の転写制御因子、12 組の二成分制御系および 7 個のシグマ因子がコードされている [61, 62]。これら転写制御機構によって制御される遺伝子 (レギュロン) に関して数多く報告されており、複雑な転写制御ネットワークが形成されていることが明らかとなってきた [62, 63]。イソブタノールに応答した遺伝子の発現変化と転写制御機構との関連性について検証した。

#### 3-3-1 NAD 生合成遺伝子

*ndnR-nadACS* はイソブタノールに応答して発現が強く誘導された (Table 9)。転写制御因子 NdnR をコードする *ndnR* は、NAD 生合成遺伝子 *nadACS* とオペロン (*ndnR* オペロン) を形成しており (Fig. 11A)、このオペロンの発現は、NAD 存在下において NdnR により負に制御される [56]。そこで、イソブタノールストレスに応答した *ndnR* オペロンの発現上昇への NdnR の関与を検証した。

Table 9. イソブタノールに応答した遺伝子とその転写制御因子

ORF	Gene	Function	COG	Log <sub>2</sub> stress/control ratio at:		
				10 min	20 min	30 min
<b>NdnR regulon</b>						
cgR_1153	<i>ndnR</i>	NrtR family transcriptional regulator	K	<b>4.21</b>	<b>4.50</b>	<b>4.18</b>
cgR_1152	<i>nadA</i>	quinolinate synthetase	H	<b>3.54</b>	<b>4.01</b>	<b>3.72</b>
cgR_1151	<i>nadC</i>	putative nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase	H	<b>2.97</b>	<b>3.82</b>	<b>3.92</b>
cgR_1150	<i>nadS</i>	cysteine sulfinatase desulfurase/cysteine desulfurase or related enzyme	E	<b>2.29</b>	<b>3.12</b>	<b>3.28</b>
<b>LtbR regulon</b>						
cgR_1390	<i>leuC</i>	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	E	<b>-2.04</b>	<b>-2.04</b>	<b>-2.21</b>
cgR_1391	<i>leuD</i>	3-isopropylmalate dehydratase small subunit	E	-1.23	-1.27	<b>-1.51</b>
cgR_2921	<i>trpA</i>	tryptophan synthase alpha chain	E	<b>1.52</b>	<b>2.54</b>	<b>2.69</b>
cgR_2920	<i>trpB</i>	tryptophan synthase beta chain	E	1.65	<b>2.75</b>	<b>2.18</b>
cgR_2919	<i>trpC</i>	indole-3-glycerol-phosphate synthase	E	1.96	<b>2.90</b>	<b>2.26</b>
cgR_2918	<i>trpD</i>	anthranilate phosphoribosyltransferase	E	1.90	<b>2.88</b>	<b>2.13</b>
cgR_2917	<i>trpG</i>	anthranilate synthase component II	EH	<b>2.70</b>	<b>3.47</b>	<b>2.57</b>
cgR_2916	<i>trpE</i>	anthranilate synthase component I	EH	<b>2.48</b>	<b>2.97</b>	<b>1.93</b>
<b>QsuR regulon</b>						
cgR_0492	<i>qsuA</i>	Putative quinate and/or shikimate transporte	GEPR	<b>4.62</b>	<b>2.11</b>	1.28
cgR_0493	<i>qsuB</i>	dehydroshikimate dehydratase	G	<b>4.66</b>	<b>2.26</b>	1.24
cgR_0494	<i>qsuC</i>	dehydroquinate dehydratase	E	<b>3.06</b>	<b>1.31</b>	0.23
cgR_0495	<i>qsuD</i>	quinate/shikimate dehydrogenase	E	<b>3.12</b>	<b>1.51</b>	<b>0.47</b>

**Bold:** *p*-value ≤ 0.05

Table 9 の続き

ORF	Gene	Function	COG	Log <sub>2</sub> stress/control ratio at:		
				10 min	20 min	30 min
<b>PcaO regulon</b>						
cgR_2280	<i>pcaH</i>	protocatechuate dioxygenase beta subunit	Q	<b>3.54</b>	-0.37	<b>-1.22</b>
cgR_2279	<i>pcaG</i>	protocatechuate dioxygenase alpha subunit	Q	<b>3.42</b>	-0.11	-1.04
cgR_2278	<i>pcaB1</i>	3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase	F	<b>2.78</b>	0.01	-0.56
cgR_2277	<i>pcaC</i>	4-carboxymuconolactone decarboxylase	S	<b>3.09</b>	0.33	-0.11
<b>PcaR regulon</b>						
cgR_2272	<i>pcaI</i>	probable fesuccinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit	I	0.41	<b>1.41</b>	<b>1.85</b>
cgR_2271	<i>pcaJ</i>	probable succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit	I	0.24	<b>1.26</b>	<b>1.80</b>
cgR_2273	<i>pcaR</i>	bacterial regulatory proteins, IclR family	K	<b>1.51</b>	<b>2.07</b>	<b>2.10</b>
cgR_2274	<i>pcaF</i>	putative acetyl-CoA:acetyltransferase	I	0.63	<b>1.68</b>	<b>1.66</b>
cgR_2275	<i>pcaD</i>	3-oxoadipate enol-lactone hydrolase/4-carboxymuconolactonedecarboxylase	R	0.56	<b>1.55</b>	<b>1.66</b>
cgR_2276	<i>pcaO</i>	ATP-dependent transcriptional regulator, LuxR family	K	0.53	<b>1.26</b>	<b>1.39</b>
<b>PhoR regulon</b>						
cgR_2511	<i>phoR</i>	putative two component response regulator	TK	<b>3.14</b>	<b>3.05</b>	<b>2.92</b>
cgR_2510	<i>phoS</i>	probable two component sensor kinase	T	<b>3.41</b>	<b>3.35</b>	<b>3.13</b>
cgR_2478	<i>pstS</i>	ABC-type phosphate transport system, secreted component	P	<b>3.70</b>	<b>3.50</b>	<b>2.69</b>
cgR_2477	<i>pstC</i>	ABC-type phosphate transport system, permease component	P	<b>3.21</b>	<b>2.66</b>	<b>1.87</b>
cgR_2476	<i>pstA</i>	ABC-type phosphate transport system, permease component	P	<b>3.57</b>	<b>3.39</b>	<b>2.31</b>
cgR_2475	<i>pstB</i>	ABC-type phosphate transport system, ATPase component	P	<b>2.68</b>	<b>2.74</b>	<b>2.16</b>
cgR_1446	<i>ugpA</i>	sn-glycerol-3-phosphate transport system permease protein	G	<b>2.80</b>	2.77	2.92
cgR_1447	<i>ugpE</i>	sn-glycerol-3-phosphate transport system permease protein	G	<b>2.26</b>	1.89	1.03
cgR_1448	<i>ugpB</i>	secreted sn-glycerol-3-phosphate-binding protein	G	1.46	1.78	0.59
cgR_1449	<i>ugpC</i>	ABC-type sugar transport systems, ATPase component	N	0.28	0.57	<b>0.90</b>
cgR_0084	<i>phoH1</i>	ATPase related to phosphate starvation-inducible protein	T	<b>1.82</b>	<b>1.65</b>	<b>1.99</b>
cgR_0412	<i>ushA</i>	probable 5'-nucleotidase precursor	F	-0.02	-0.43	-0.41
cgR_0533	<i>pitA</i>	putative low-affinity phosphate transport protein	P	<b>-3.64</b>	<b>-4.11</b>	<b>-4.24</b>
cgR_2495	<i>nucH</i>	predicted extracellular nuclease	R	0.29	0.41	0.12
cgR_2805	<i>glpQ1</i>	putative glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	C	<b>-0.09</b>	<b>0.10</b>	<b>0.32</b>
cgR_2949	<i>phoC</i>	putative secreted phosphoesterase	0	<b>4.12</b>	<b>3.31</b>	0.99

**Bold:** *p*-value ≤ 0.05

まず、*ndnR* オペロンのイソブタノールに反応した発現上昇が NAD の添加により抑制されるかを検証した。対数増殖期の培養液に 2%イソブタノールのみ、および 2%イソブタノールと 4 mM ニコチン酸 (NA: NAD の前駆物質) を添加し、その直前と添加 10 分後の細胞から抽出した total RNA を用いて定量 PCR 解析を行った。イソブタノールに反応した発現上昇はイソブタノールと同時にニコチン酸を添加しても見られたが、イソブタノールのみを添加した場合よりも発現量は低かった (Fig. 11B)。次に、*ndnR* の欠損による *ndnR* オペロンのイソブタノール反応への影響を検証した。*ndnR* 欠損株では、報告通り [56]、オペロンの発現量が野生株よりも高かった (Fig. 12)。*ndnR* 欠損株では *nadA* のイソブタノールに反応した発現上昇は見られなかったが、*nadC* および *nadS* の発現量はイソブタノール添加によって低下した (Fig. 12)。以上の結果から *ndnR* 欠損株においてオ

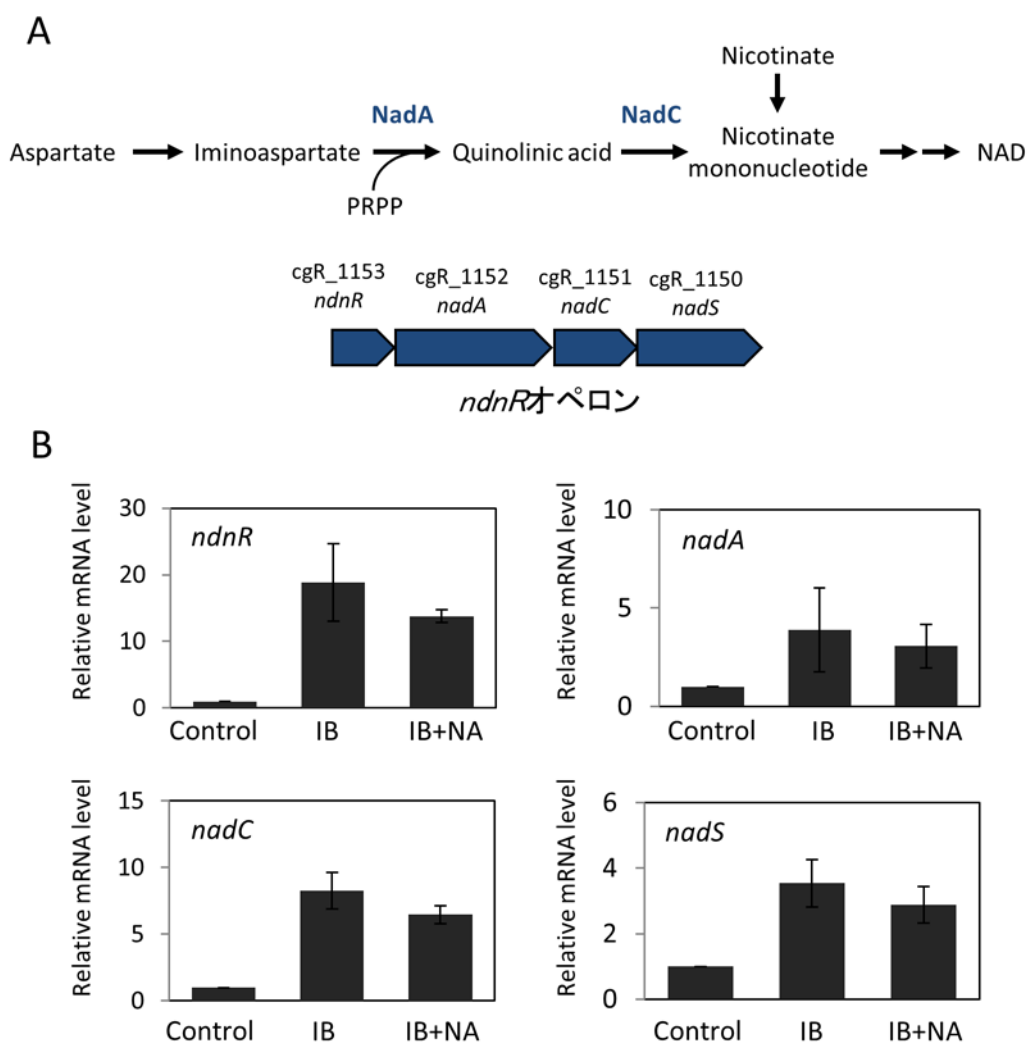


Fig. 11. ニコチン酸とイソブタノールの添加による *ndnR* オペロンの発現変化

NAD 生合成遺伝子クラスターと NAD 生合成経路を示した (A)。ニコチン酸の添加による *ndnR* オペロンのイソブタノールに反応した発現上昇への影響を示した (B)。Control はイソブタノール添加前、IB は 2%イソブタノール添加 10 分後、IB+NA は 2%イソブタノールと 4 mM ニコチン酸を同時に添加して 10 分後の発現量を示している。

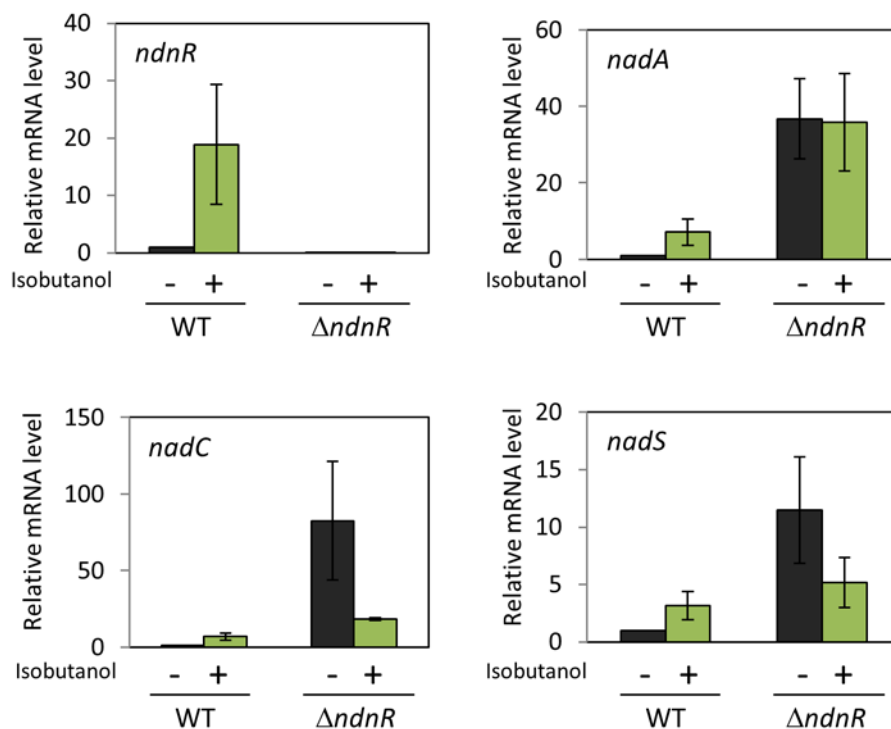


Fig. 12. *ndnR* 欠損株における *ndnR* オペロンのイソブタノールに応答した発現変化  
 野生株および *ndnR* 破壊株における *ndnR* オペロンの発現量を示した。  
 Isobutanol - はイソブタノール添加前における、+は2%イソブタノール添加10分後における  
 発現量を示している。発現量は、野生株における Isobutanol-に対する相対値として示した。

ペロンのイソブタノールによるさらなる発現の誘導が見られなくなったことから、イソブタノールに応答した発現上昇は NdnR による制御の脱抑制によって引き起こされたと考えられるが、ニコチン酸を同時添加した場合も発現誘導が見られたことから、NdnR の脱抑制は NAD 濃度の変化とは、独立した機構により引き起こされることが考えられる。また、*ndnR* 欠損株において、*nadC* および *nadS* の発現量がイソブタノール添加後に低下していることから、これら2つの遺伝子の発現を負に制御する転写制御機構が存在することが示唆された。

### 3-3-2 ロイシンおよびトリプトファン生合成遺伝子

*trpEGDCBA* はイソブタノールに応答して著しく発現が上昇した (Table 9)。  
*trpEGDCBA* はオペロンを形成しており (Fig. 13A)、*trp* オペロンの発現制御機構として転写制御因子 LtbR による制御とアテニュエーションが知られている。  
 LtbR は *trp* オペロンおよびロイシン生合成遺伝子 *leuCD* オペロンのリプレッサーとして同定された転写制御因子である [5]。先行研究と同様に、構築した *ltbR* 欠損株では *leuCD* オペロンの発現量はイソブタノール添加前において野生株と比較して30倍程度高かった (Fig. 13B)。一方で、*ltbR* 欠損株ではイソブタノー

ルに応答した発現低下は見られなかった。

*trp* オペロンの発現は *ltbR* 欠損株においても、野生株と同様にイソブタノールによる発現誘導が見られた (Fig. 13B)。これらの結果からイソブタノール条件下における *leuCD* の発現低下に *LtbR* が関与していることが示唆されるとともに、*trp* オペロンの発現上昇は他の転写制御機構によって制御されていることが明らかとなった。

*C. glutamicum* において *trpE* の上流にリーダー配列 (*trpL*) とアテニューエーター配列が見出されている [64]。*trpL* は 18 残基から成るポリペプチドをコードしており、コード領域内には連続した 3 つの Trp コドン (TGG) を有している (Fig. 14A)。トリプトファンが十分量存在する条件では、リボソームは正常に *TrpL* の終始コドンまで進むため、アテニューエーターがターミネーターを形成し、*trp* オペロンの転写を終結させる。一方で、トリプトファンが枯渇した条件では、*Trp*-tRNA の枯渇により連続した Trp コドン上でリボソームが停止することで、*trpE* 上流

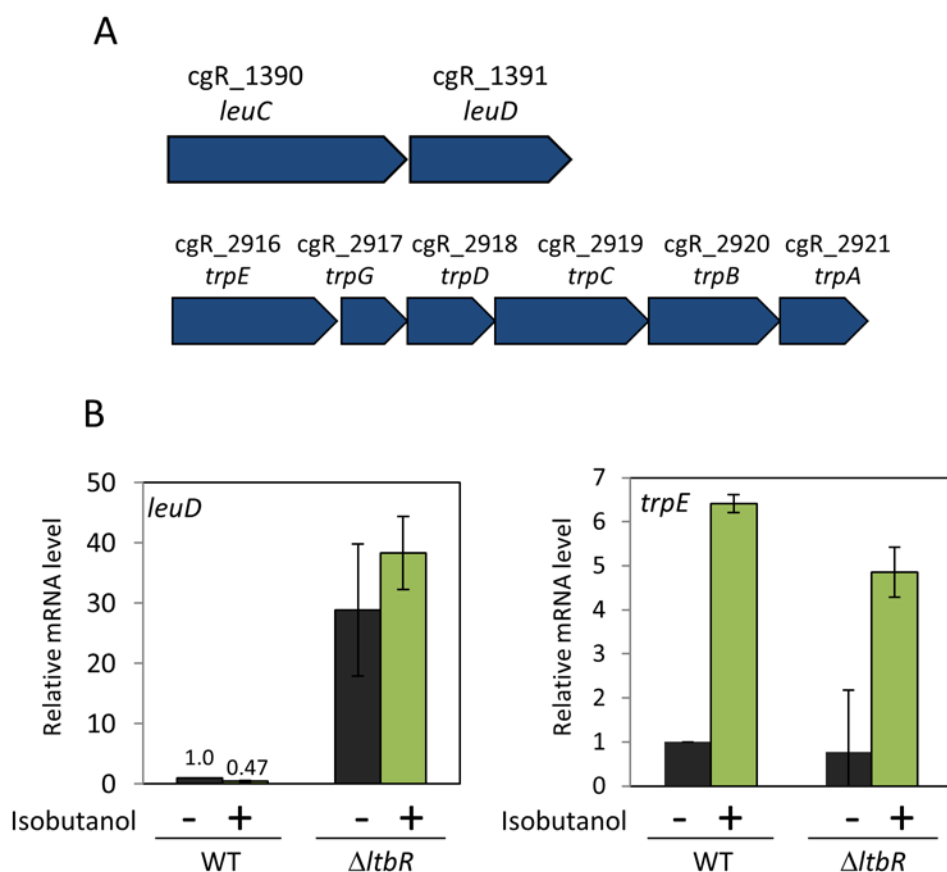


Fig. 13. *ltbR* 欠損によるロイシンおよびトリプトファン生合成遺伝子の発現への影響

ロイシン生合成遺伝子 *leuCD* オペロンおよびトリプトファン生合成遺伝子 *trp* オペロン(A)と野生株と *ltbR* 欠損株における *leuD* と *trpE* の発現量(B)を示した。Isobutanol - はイソブタノール添加前における、+は 2%イソブタノール添加 10 分後における発現量を示している。発現量は、野生株における Isobutanol-に対する相対値として示した。

に存在するターミネーターの形成を阻害し、*trp* オペロンの転写が誘導される (Fig. 14B)。この Trp コドンのうち 3 番目の TGG を TGA (終始コドン) に変異させることで、アテニュエーションによる転写終結が解除され、恒常的に *trp* オペロンの発現が誘導される (Fig. 14B) [64]。*trp* オペロンのイソブタノール応答にアテニュエーションが関与しているかを検証するため、イソブタノールと同時にトリプトファン (Trp) を添加し、*trp* オペロンの発現への影響を解析した。野生株において見られた *trp* オペロンのイソブタノールに応答した発現上昇は、Trp を同時に添加することで消失した (Fig. 15)。次に、*trpL* の連続した Trp コドンの 3 番目に変異を導入した *trpL* 変異株 (*trpL* W14X) を構築し、*trp* オペロンの発現量を解析した。*trpL* 変異株では、報告通り [64]、野生株と比べて *trp* オペロ

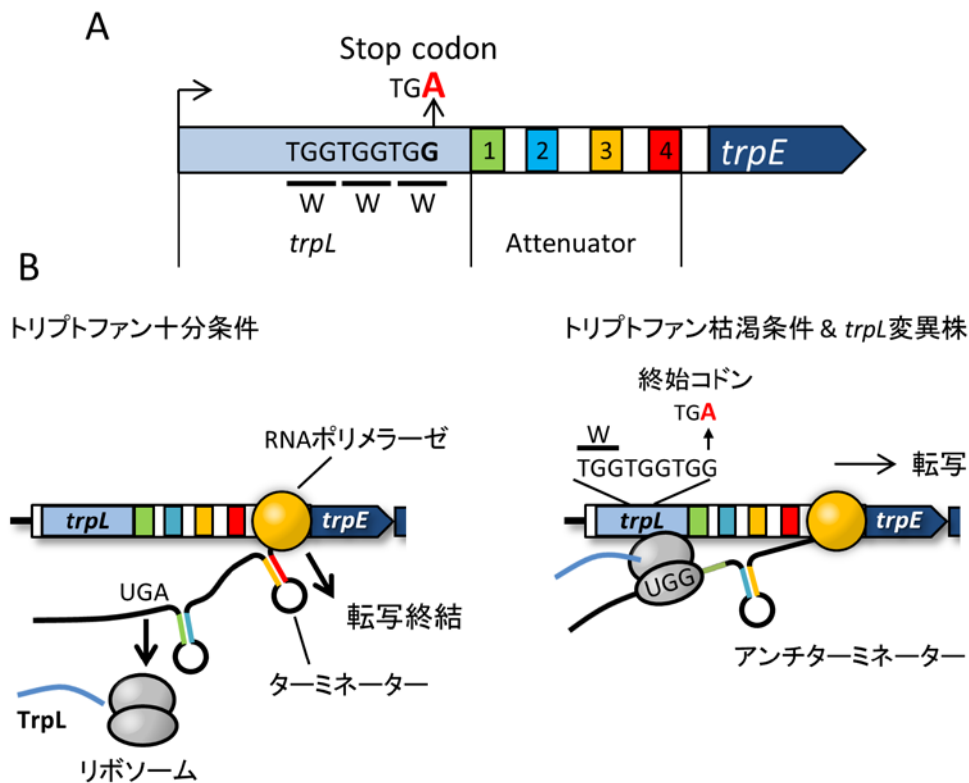


Fig. 14. *trp* オペロンのアテニュエーションによる発現制御

*trpE* 上流に存在するリーダーペプチドをコードする *trpL* とアテニュエーター (A) とアテニュエーションによる *trp* オペロンの発現制御 (B) を示した。

A: *trpE* 上流には、18 残基から成るポリペプチドをコードする *trpL* とアテニュエーターが存在する。アテニュエーターは、4 つの相補的な配列を含んでおり、ターミネーターとアンチターミネーターの 2 通りのステム・ループ構造を形成する。3 番目の Trp コドンに終始コドンに変異させることで、ターミネーターが形成されなくなる。

B: トリプトファンが十分量存在する環境では、3:4 ターミネーターを形成し、*trpE* 上流で転写が終結する。トリプトファンが欠乏した環境では、リボソームが連続した Trp コドンで停止することで、2:3 アンチターミネーターが形成され、*trp* オペロンが転写される。

*trpL* に終始コドンを導入すると、トリプトファン非依存的にアンチターミネーター構造が形成されるため、*trp* オペロンは恒常的に転写される。

ンの発現量が上昇した。一方、イソブタノール添加後にさらなる発現上昇は見られなかった (Fig. 16)。これらの結果から、*trp* オペロンのイソブタノールに反応した発現上昇にアテニュエーションが関与していることが示唆された。また、このことは、イソブタノール添加後に細胞内の Trp 濃度が減少したことを示唆している。

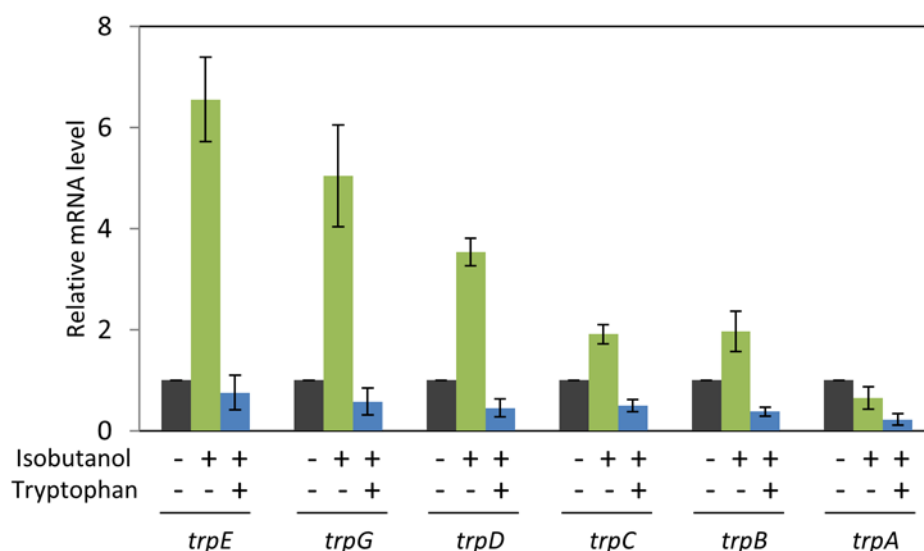


Fig. 15. トリプトファン添加による *trp* オペロンの発現への影響

野生株における *trp* オペロンの発現量を示した。Isobutanol- はイソブタノール添加前における、+は2%イソブタノール添加10分後における発現量を示している。Tryptophan-はトリプトファンを添加していないことを示し、+は98 mM トリプトファンをイソブタノールと同時に添加したことを示している。発現量は、野生株における Isobutanol-に対する相対値として示した。

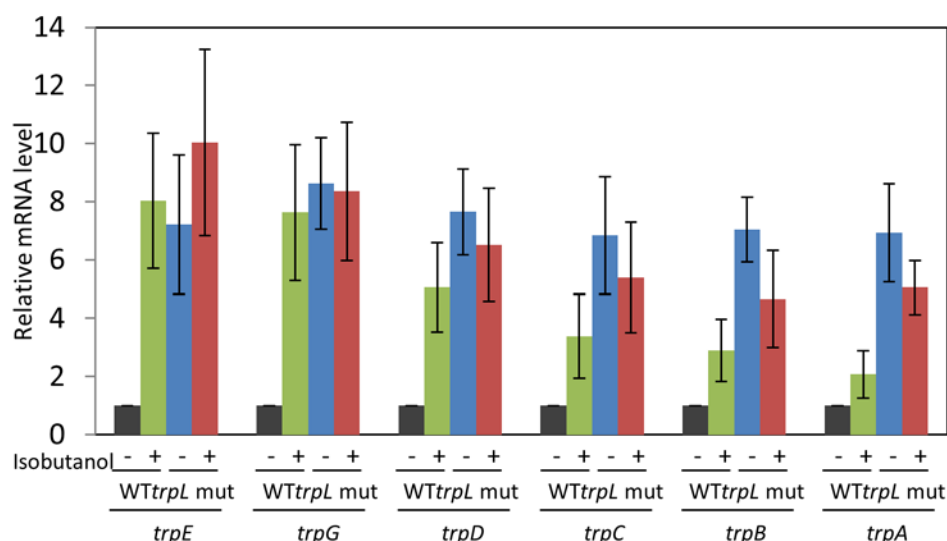


Fig. 16. *trpL* 変異による *trp* オペロンの発現への影響

野生株と *trpL* 変異株における *trp* オペロンの発現量を示した。Isobutanol- はイソブタノール添加前における、+は2%イソブタノール添加10分後における発現量を示している。発現量は、野生株における Isobutanol-に対する相対値として示した。

### 3-3-3 イソブタノールによる細胞内アミノ酸量への影響

3-3-2の結果から、イソブタノール条件下では細胞内のアミノ酸量が減少することが示唆された。そこで HPLC を用いてイソブタノール添加前と 10 分後の細胞内アミノ酸量を定量した。

細胞内 Trp 量は、イソブタノール添加 10 分後におよそ 1.5 倍に上昇した (Table 10)。本研究の条件では、*trp* オペロンの発現量とアミノ酸濃度との相関関係が見られなかった。*trp* オペロンのイソブタノールに応答した発現誘導の機構を明らかにするためには、イソブタノール添加直後から経時変化を観察する必要がある。

その他のアミノ酸で、最もイソブタノールによる影響を受けたアミノ酸はヒスチジンで、その細胞内量はイソブタノール添加後におよそ 3 倍に増加した。一方で、イソブタノール添加後に細胞内量が減少したアミノ酸はグリシンのみであった (0.8 倍)。多くのアミノ酸は、イソブタノール添加 10 後の細胞内量が増加する傾向が見られた。これらアミノ酸の生合成遺伝子の発現はイソブタノールにより低下しており、イソブタノール添加 10 分後の細胞内アミノ酸量と遺伝子の発現量との間に相関関係は見られなかった。

Table 10. イソブタノールによる細胞内アミノ酸量の変化

Aminoacid	Concentration $\mu\text{M/g}$ dry weight		
	0 min	10 min	Ratio (10 min/ 0 min)
Tryptophan	0.30 $\pm$ 0.0	0.44 $\pm$ 0.0	1.48 $\pm$ 0.1
Glycine	9.89 $\pm$ 3.3	7.83 $\pm$ 0.6	0.79 $\pm$ 0.3
Alanine	21.81 $\pm$ 2.2	29.22 $\pm$ 1.4	1.34 $\pm$ 0.1
Valine	4.75 $\pm$ 0.3	5.62 $\pm$ 0.5	1.18 $\pm$ 0.2
Leucine	2.26 $\pm$ 0.7	4.84 $\pm$ 0.8	2.14 $\pm$ 0.8
Isoleucine	1.53 $\pm$ 0.2	3.23 $\pm$ 0.2	2.12 $\pm$ 0.4
Methionine	0.35 $\pm$ 0.1	0.66 $\pm$ 0.3	1.86 $\pm$ 1.0
Phenylalanine	1.53 $\pm$ 0.1	1.62 $\pm$ 0.2	1.06 $\pm$ 0.1
Tyrosine	0.35 $\pm$ 0.1	0.99 $\pm$ 0.1	2.80 $\pm$ 1.0
Serine	1.77 $\pm$ 0.3	4.27 $\pm$ 0.3	2.41 $\pm$ 0.4
Threonine	32.33 $\pm$ 4.4	39.82 $\pm$ 5.1	1.23 $\pm$ 0.0
Aspartate	18.97 $\pm$ 4.8	28.84 $\pm$ 1.6	1.52 $\pm$ 0.3
Glutamate	254.06 $\pm$ 26.8	328.36 $\pm$ 31.1	1.29 $\pm$ 0.2
Histidine	0.92 $\pm$ 0.4	2.84 $\pm$ 0.6	3.08 $\pm$ 1.0
Lysine	5.82 $\pm$ 1.4	13.82 $\pm$ 3.6	2.37 $\pm$ 0.5
Arginine	1.89 $\pm$ 0.1	3.34 $\pm$ 0.3	1.77 $\pm$ 0.1



### 3-3-4 芳香族化合物分解遺伝子

興味深いことに、トリプトファン前駆物質であるシキミ酸の利用に関与する *qsuABCD* オペロンもイソブタノールに応答して発現が上昇した (Table 9)。 *C. glutamicum* における芳香族アミノ酸合成経路と関連する芳香族化合物分解経路を Fig. 17 に示した。 *qsuA* は putative quinate and/or shikimate transporter を、 *qsuB* は dehydroshikimate dehydratase を、 *qsuC* は dehydroquinatase を、 *qsuD* は quinate/shikimate dehydrogenase をコードしている。 *qsu* オペロンは、 *qsuA* の上流に位置する *qsuR* にコードされる転写制御因子 QsuR を介してコリスミ酸存在下で発現が誘導される [57]。 *qsu* オペロンのイソブタノール応答への QsuR の関与を調べるため、 *qsuR* 欠損株における *qsu* オペロンの発現変化を

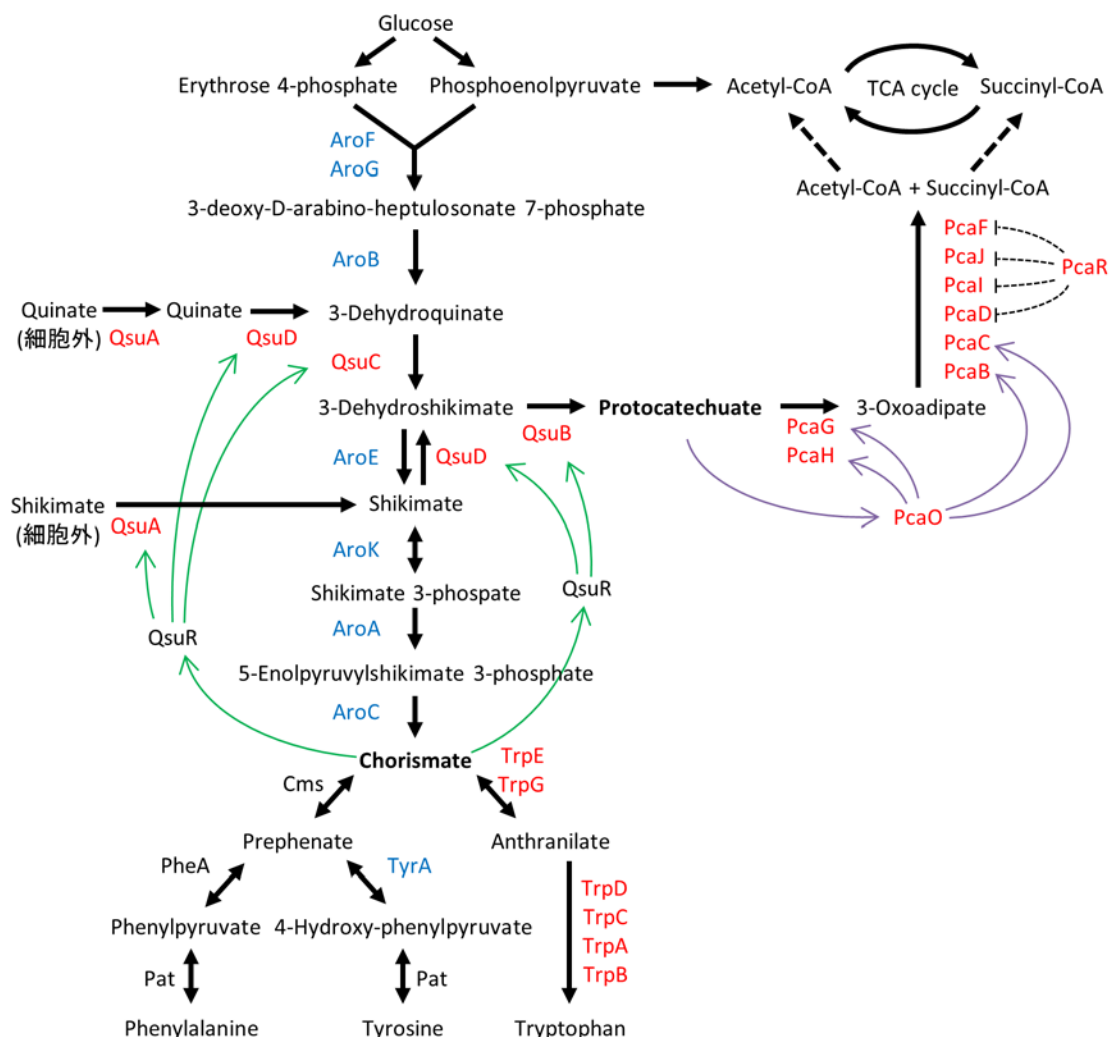


Fig. 17. 芳香族アミノ酸合成経路と芳香族化合物分解経路

イソブタノール添加後に発現が上昇した遺伝子を赤で、発現が低下した遺伝子を青で示した。緑色の矢印は、コリスミ酸に応答する転写制御因子とそのレギュロンを、紫色の矢印は、プロトカテク酸に応答する転写制御因子とそのレギュロンを示す。黒色の点線は、PcaR による転写抑制を示す。

解析した。*qsuR* 欠損株では、野生株と比べてイソブタノール添加前のオペロンの発現量が高かったが、イソブタノールに応答した発現上昇は見られなかった (Fig. 18)。この結果から、*qsu* オペロンの発現上昇に QsuR が関与していることが示唆された。

QsuBCD によってシキミ酸からプロトカテク酸が生成される (Fig. 17)。プロトカテク酸分解に関与する遺伝子 *pcaHGBC*、*pcaRFDO*、*pcaJI* はそれぞれオペロンを形成しており、プロトカテク酸からアセチル CoA とスクシニル CoA を生成する酵素と転写制御因子 PcaR および PcaO をコードする。*pcaHGBC* の発現は、PcaO によって正に制御されており、プロトカテク酸存在下で発現が誘導される [65]。*pcaFDO* および *pcaIJ* の発現は PcaR によって負に制御されていることが明らかにされているが、エフェクター分子は解明されていない [61]。*pcaHGBC* はイソブタノール添加 10 分後において発現が上昇し、20 分後以降は発現量がイソブタノール添加前と同程度まで低下した (Table 9)。*pcaIJ* および *pcaFDO* は添加 20 分後以降に発現上昇が見られた。

これら遺伝子の発現パターンから、イソブタノールストレス条件下ではコリスミ酸の蓄積が引き起こされ、一時的に芳香族化合物分解経路が活性化されていると考えられる。

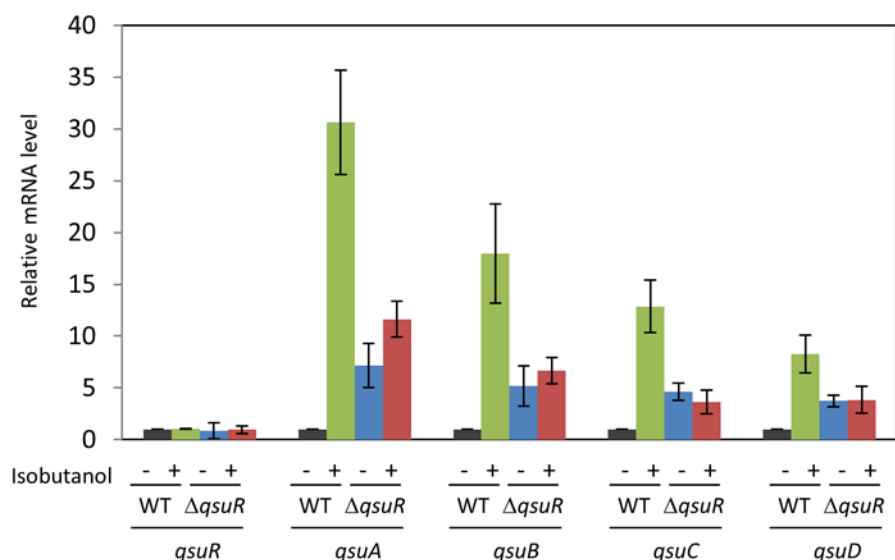


Fig.18. *qsuR* 欠損による *qsu* オペロンの発現への影響

野生株と *qsuR* 欠損株における *qsu* オペロンの発現量を示した。Isobutanol- はイソブタノール添加前における、+は2%イソブタノール添加 10 分後における発現量を示している。発現量は、野生株における Isobutanol- に対する相対値として示した。

### 3-3-5 リン酸欠乏遺伝子の発現変化

イソブタノールによってリン酸欠乏応答に関与する多くの遺伝子に発現変化が見られた (Table 9)。高親和性リン酸輸送体をコードする *pstSCAB* オペロン、ホストトランスフェラーゼをコードする *phoC*、ATP アーゼをコードする *phoH* の発現がイソブタノールに反応して誘導された。グリセロール 3 リン酸輸送体をコードする *ugpAEBC* オペロンのうち *ugpAE* はイソブタノール添加 10 後で有意な発現上昇が見られた。一方で、低親和性リン酸輸送体をコードする *pitA* の発現は低下した。これら遺伝子は、二成分制御系 PhoSR によって制御されている。PhoSR はリン酸欠乏条件下において、Table 9 に示した *pitA* を除く PhoR レギュロンの発現を誘導し、*pitA* の発現を抑制する [66, 67]。そこで、*phoS* および *phoR* 欠損株における *pstS*、*phoC*、および *pitA* の発現量を解析した。*pitA* と *pstS*、*phoC* の発現は *phoS* および *phoR* 欠損株においてもイソブタノールに反応した発現変化が見られた (Fig. 19)。したがって、イソブタノールに反応したリン酸欠

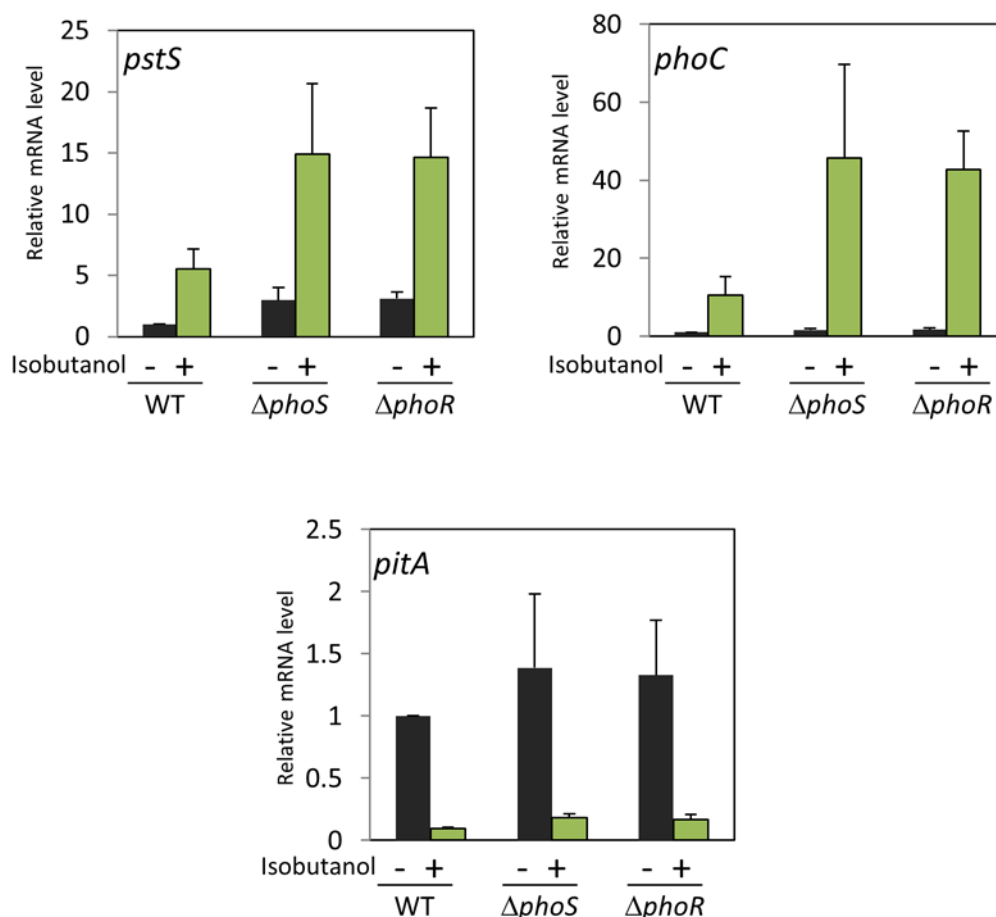


Fig. 19. *phoR* 欠損株におけるリン酸欠乏応答遺伝子

野生株、*phoS* 欠損株、および *phoR* 欠損株における *phoR* レギュロンの発現量を示した。Isobutanol - はイソブタノール添加前を示しており、+は 2%イソブタノール添加 10 分後の発現量を示している。発現量は、野生株における Isobutanol-に対する相対値として示した。

乏応答遺伝子の発現変化は **PhoSR** 非依存的であることが明らかとなり、他の制御機構が関与していることが示唆された。

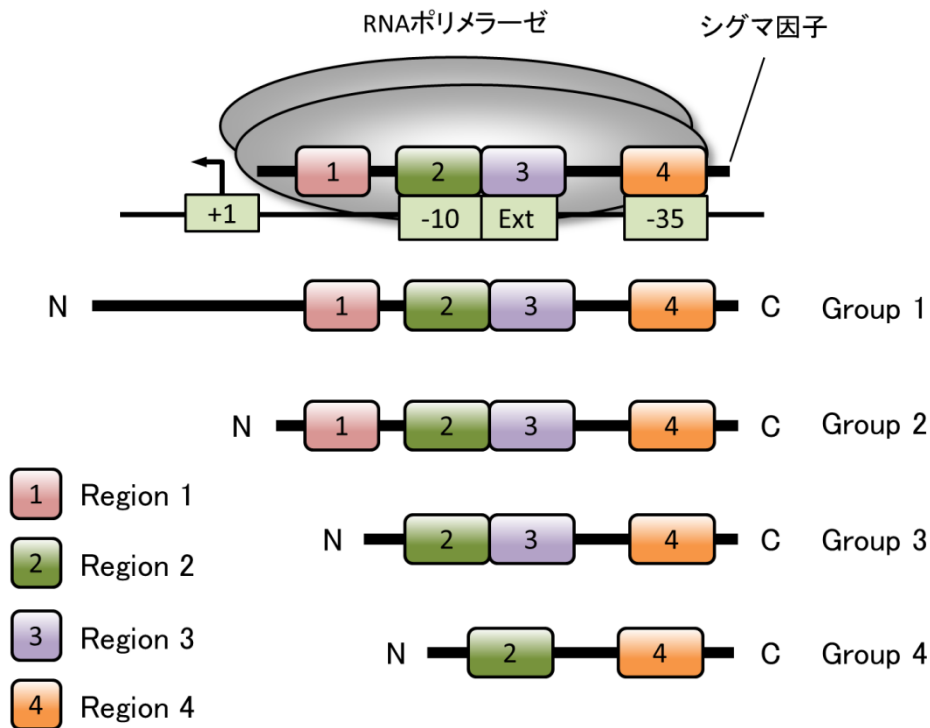
### 3-3-6 シグマ因子

シグマ因子は、細菌の RNA ポリメラーゼ複合体の構成因子の一つであり、プロモーター配列を認識する。細菌種によって有するシグマ因子の数は数個から数十個と異なるが、これらはドメイン構成により 4 種に分類できる (Fig. 20) [68-70]。Group 1 は 4 つのドメインから成り、生育に必須で、ハウスキーピング遺伝子の転写に必要なシグマ因子である。Group 2 は Group 1 と同様に 4 つのドメインを有するが、生育に必須ではない。Group 2 のシグマ因子は、ストレス条件下でハウスキーピング遺伝子の転写を維持する役割を担う。Group 3 は 3 つのドメインから成るシグマ因子で、*B. subtilis* や *Streptomyces coelicolor* において、胞子形成に関与している。Group 4 は region 2 と region 4 から成るシグマ因子で、細胞外ストレスに対する応答に関与している。そのため Extracytoplasmic function (ECF) とも呼ばれている。

*C. glutamicum* は 7 つのシグマ因子を有している (Table 11)。SigA は Group 1 に分類されるシグマ因子で、ハウスキーピング遺伝子の発現を制御する。SigB は Group 2 のシグマ因子で、定常期において SigA に代わり、ハウスキーピング遺伝子の発現を制御している [71]。また、*sigB* 破壊株は酸、塩、エタノール、低温、高温ストレスに対する感受性が上昇することが知られている [72]。さら SigB は様々な環境ストレス応答に関与していると考えられる [73, 74]。SigE は

Table 11. *C. glutamicum* のシグマ因子

	Gene	Type	Function	Consensus
SigA	cgR_1740	Group 1 (Primary)	ハウスキーピング遺伝子の発現	-35 - TTGACA -10 - TATAAT
SigB	cgR_1749	Group 2 (Alternative)	定常期、多様なストレス応答	-35 - GNGNCN -10 - TAMAATTGA
SigC	cgR_0331	Group 4 (ECF)	未解明	not determined
SigD	cgR_0719	Group 4 (ECF)	低酸素適応	not determined
SigE	cgR_1204	Group 4 (ECF)	細胞表層ストレス応答	not determined
SigH	cgR_0876	Group 4 (ECF)	熱・酸化ストレス応答	-35 - GGAATA -10 - GTTGAA
SigM	cgR_2979	Group 4 (ECF)	ジスルフィドストレス応答	-35 - GGAA -10 - GTTG



に SigB の発現は酸素欠乏や低 pH 条件により誘導されることが報告されており、

Region	Subregion	Function
1	1.1	RNA ポリメラーゼと複合体を形成していないシグマ因子の DNA への結合を阻害する。
	1.2	
2	2.1	RNA ポリメラーゼコア酵素と相互作用する。
	2.2	
	2.3	2 重らせんをほどこき、転写バブルを形成する。
	2.4	-10 領域を認識する。
3	3.0	extended-10 領域を認識する。
	3.1	
	3.2	
4	4.1	アクチベータと結合する。
	4.2	-35 領域を認識する。

Fig. 20. シグマ因子のドメイン構造

シグマ因子には 4 つのドメインがあり、その構成の違いにより 4 つのグループに分けられる。

+1 : 転写開始点、-10 : -10 領域、Ext : extended-10 領域、-35 : -35 領域

Group 4 に分類される ECF シグマ因子で、*sigE* を破壊すると界面活性剤 sodium dodecyl sulfate (SDS) やリゾチームなどの細胞表層ストレスに対する耐性が低下することが報告されている [75]。SigE の活性制御機構は *C. glutamicum* では解明されていないが、*M. tuberculosis* で詳細に解明されている。*M. tuberculosis* の SigE ホモログの活性は、アンチシグマ因子 RseA との相互作用により不活性化されている。ストレス条件下では、RseA の立体構造の変化またはプロテアーゼによる分解によって、SigE との相互作用が消失することで、SigE は RNA ポリメラーゼと複合体を形成できるようになる [76]。*C. glutamicum* では、SigE のアンチシグマ因子として CseE が同定されている [75]。SigH も Group 4 に分類される ECF シグマ因子で、ヒートショックに反応して HSP の発現を誘導する [77]。

マイクロアレイ解析から、イソブタノールによって *sigB* と *sigE* の発現が誘導されることが明らかとなった (Table 12)。*sigB* の発現は SigE と SigH に制御されていることが明らかにされている [78]。実際に *sigE* 欠損株では、*sigB* のイソブタノール添加後の発現量は著しく低下した (Fig. 21)。イソブタノール条件下では SigE が活性化され、*sigB* の発現が誘導されたと考えられる。

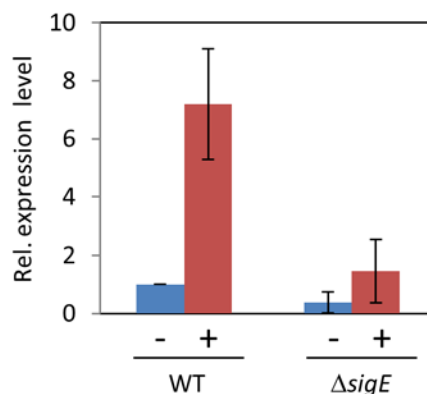


Fig. 21. *sigE* 欠損株における *sigB* の発現量

野生株および *sigE* 欠損株 ( $\Delta sigE$ ) における *sigB* の発現量を示した。- はイソブタノール添加前における、+ は 2% イソブタノール添加 10 分後における発現量を示している。発現量は、野生株におけるイソブタノール添加前 (-) に対する相対値として示した。

Table 12. シグマ因子の発現変化

ORF	Gene	Function	COG	Log <sub>2</sub> stress/control ratio at:		
				10 min	20 min	30 min
<b>Primary sigma factor</b>						
cgR_1740	<i>sigA</i>	RNA polymerase sigma 70 factor	K	0.41	<b>0.28</b>	-0.15
<b>Alternative sigma factor</b>						
cgR_1749	<i>sigB</i>	RNA polymerase sigma factor	K	<b>2.81</b>	<b>2.18</b>	<b>1.90</b>
<b>ECF sigma factor</b>						
cgR_0331	<i>sigC</i>	sigma-70 factor (ECF subfamily)	K	-0.17	0.53	<b>0.59</b>
cgR_0719	<i>sigD</i>	putative RNA polymerase sigma factor, ECF family	K	0.53	<b>0.58</b>	<b>1.21</b>
cgR_1204	<i>sigE</i>	putative RNA polymerase sigma factor, ECF family	K	<b>2.60</b>	<b>2.32</b>	<b>2.32</b>
cgR_0876	<i>sigH</i>	putative RNA polymerase sigma factor, ECF family	K	<b>0.83</b>	<b>0.60</b>	0.66
cgR_2979	<i>sigM</i>	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily	K	-0.18	-0.05	0.09

**Bold:** *p*-value  $\leq 0.05$

### 3-3-7 SigH レギュロンの発現変化

SigH はイソブタノールによる発現変化は見られなかったが、そのレギュロンである *clpB*、*clgR*、*dnaK-grpE-dnaJ-hspR*、*clpC*、*clpP1-clpP2*、*sufRBDCSU*、*trxB-trxA2-cwlM*、はイソブタノールにตอบสนองして発現が上昇した (Table 13)。これら遺伝子はヒートショックにより誘導されることが知られている [97]。一方で、同じくヒートショックで誘導される *groEL1*、*groES*、*groEL2* の発現には変化が見られなかった (Table 13)。*groEL1*、*groES*、および *groEL2* は SigA、SigM、およびリプレッサー HrcA によって制御されている (Fig. 22)[52]。これらの結果から SigH は、イソブタノールにより活性化されることが示唆された。

キノンオキシドレダクターゼをコードする *qor2* は *groESL* と転写制御因子 HrcA によって発現が制御されている [97]。しかしながら、*groESL* とは異なりイソブタノールにตอบสนองして発現が上昇した (Table 13)。*qor2* の発現は、QorR によっても負に制御されており、diamid 存在下で発現が誘導されることが報告されている [77]。イソブタノールにより diamid ストレスと類似したストレスが生じ、

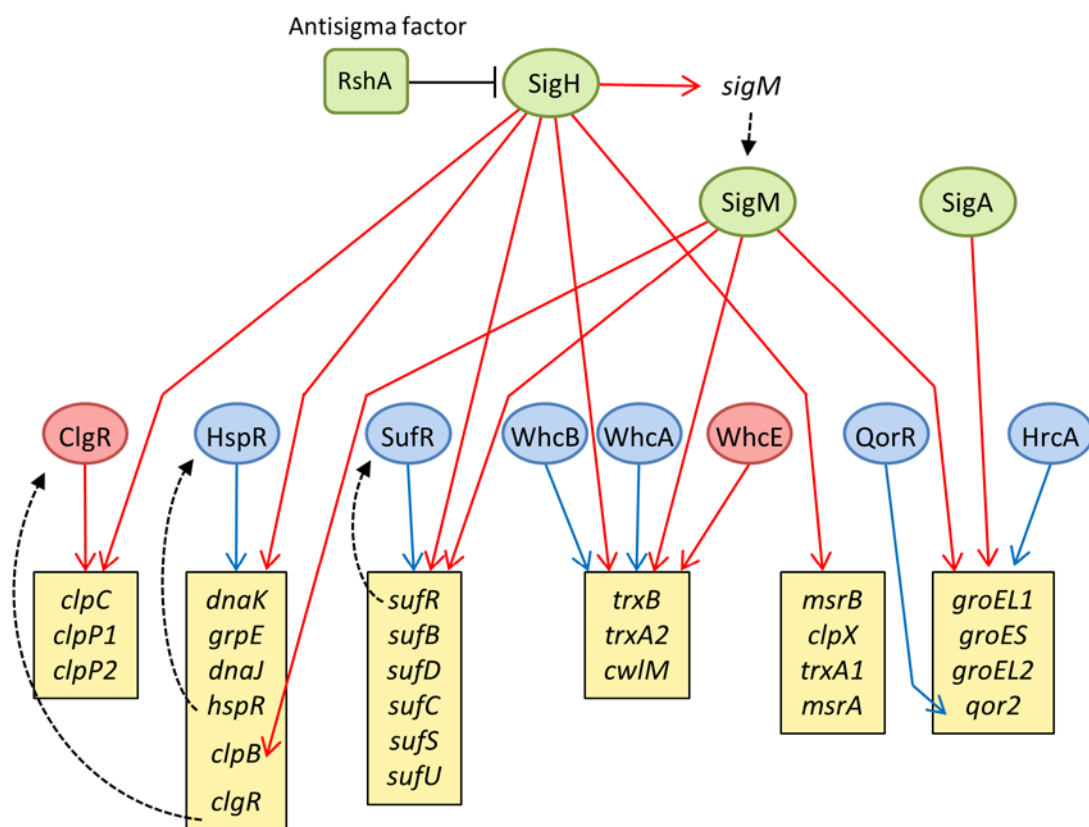


Fig. 22. ヒートショック応答に関与する転写制御因子とそのレギュロン

図の上層にシグマ因子を、下層にヒートショックで誘導される遺伝子[3, 4]とその転写制御因子を示した。シグマ因子は緑色の円、アンチシグマ因子は緑色の四角、アクチベーターは赤色の円、リプレッサーは青色の円、レギュロンは黄色の四角で示した。赤色の矢印は発現誘導、青色の矢印は発現抑制、黒色の実線はタンパク質の相互作用、黒色の破線はタンパク質への翻訳を示している。

その結果、QorR による制御の脱抑制が起こり *qor2* の発現が誘導されているのかもしれない。

Table 13. ストレス応答遺伝子の発現変化

ORF	Gene	Function	COG	Log <sub>2</sub> stress/control ratio at:		
				10 min	20 min	30 min
<b>SigH の制御下にある遺伝子</b>						
<b>ClgR regulon</b>						
cgR_2580	<i>clpC</i>	probable ATP-dependent protease (heat shock protein)	O	<b>1.86</b>	<b>2.00</b>	<b>1.38</b>
cgR_2308	<i>clpP1</i>	ATP-dependent clp protease proteolytic subunit ClpP1	NO	<b>1.95</b>	<b>1.87</b>	<b>1.60</b>
cgR_2307	<i>clpP2</i>	ATP-dependent clp protease proteolytic subunit ClpP2	NO	<b>1.55</b>	<b>1.64</b>	<b>1.25</b>
<b>HspR regulon</b>						
cgR_1792	<i>clgR</i>	predicted transcriptional regulator	K	1.55	<b>1.34</b>	<b>1.41</b>
cgR_2676	<i>clpB</i>	probable ATP-dependent protease (heat shock protein)	O	<b>4.19</b>	<b>4.24</b>	<b>4.02</b>
cgR_2690	<i>dnaK</i>	heat shock protein HSP70	O	<b>1.68</b>	1.68	<b>1.70</b>
cgR_2689	<i>grpE</i>	molecular chaperone GrpE (heat shock protein)	O	<b>2.43</b>	<b>2.45</b>	<b>2.31</b>
cgR_2688	<i>dnaJ</i>	chaperone with DnaK, heat shock protein (DnaJ protein)	O	<b>2.90</b>	<b>2.60</b>	<b>2.61</b>
cgR_2687	<i>hspR</i>	transcriptional regulator MerR family	K	<b>2.93</b>	<b>2.91</b>	<b>2.51</b>
<b>SufR regulon</b>						
cgR_1616	<i>sufR</i>	predicted transcriptional regulator	K	<b>2.32</b>	<b>2.38</b>	<b>2.17</b>
cgR_1615	<i>sufB</i>	component of an uncharacterized iron-regulated ABC-type transporter	R	<b>2.99</b>	<b>2.74</b>	<b>2.60</b>
cgR_1614	<i>sufD</i>	components of an uncharacterized iron-regulated ABC-type transporter	R	<b>2.65</b>	<b>2.52</b>	<b>2.03</b>
cgR_1613	<i>sufC</i>	iron-regulated ABC transporter ATPase subunit	R	<b>2.33</b>	<b>2.39</b>	<b>2.14</b>
cgR_1612	<i>sufS</i>	cysteine desulhydrase / selenocysteine lyase	E	<b>2.86</b>	<b>2.93</b>	<b>2.64</b>
cgR_1611	<i>sufU</i>	NifU homologs involved in Fe-S cluster formation	C	<b>2.37</b>	<b>2.56</b>	<b>2.20</b>
<b>Regulated by WhcE, WhcA, and WhcB</b>						
cgR_2980	<i>trxB</i>	thioredoxin reductase	O	<b>1.48</b>	<b>1.14</b>	<b>1.15</b>
cgR_2981	<i>trxA2</i>	thioredoxin	OC	<b>1.77</b>	<b>1.96</b>	<b>1.65</b>
cgR_2982	<i>cwlM</i>	N-acetylmuramyl-L-alanine amidase	M	<b>0.96</b>	<b>1.22</b>	<b>0.93</b>
<b>Others</b>						
cgR_1727	<i>msrB</i>	peptide methionine sulfoxide reductasetase-related protein	O	<b>1.93</b>	<b>1.78</b>	<b>1.38</b>
cgR_2269	<i>clpX</i>	probable ATP-dependent protease (ATP-binding specificity subunit)	O	<b>0.58</b>	<b>0.77</b>	<b>1.07</b>
cgR_2862	<i>trxA1</i>	thioredoxin	OC	<b>1.86</b>	<b>1.73</b>	1.44
cgR_2830	<i>msrA</i>	peptide methionine sulfoxide reductasetase	O	<b>3.13</b>	<b>2.75</b>	<b>2.37</b>
<b>SigA の制御下にある HSP 遺伝子</b>						
<b>HrcA regulon</b>						
cgR_0716	<i>groEL1</i>	60 kDa chaperonin (protein CPN60) (GroEL protein) L1	O	<b>0.88</b>	0.87	0.94
cgR_0715	<i>groES</i>	chaperonin 10 Kd subunit S	O	<b>0.62</b>	0.68	0.77
cgR_2619	<i>groEL2</i>	chaperonin cpn60 (60Kd subunit) L2	O	<b>0.86</b>	0.93	0.99
cgR_1436	<i>qor2</i>	predicted quinone oxidoreductase	MG	<b>2.71</b>	<b>2.48</b>	2.26

**Bold: p-value ≤ 0.05**



### 3-4 SigE レギュロンの同定

3-3-6 より、イソブタノールにより SigE が活性化されている可能性が示唆された。SigE は細胞表層ストレス応答に関与していることが先行研究[75]より報告されていることから、イソブタノールストレス応答においても重要な役割を担っていることが考えられる。しかしながら、SigE に制御されている遺伝子については、ほとんど解明されておらず、ストレス応答における SigE の機能は未知である。そこでイソブタノールに応答して発現が変化した遺伝子のうち、*sigE* に制御されている遺伝子を同定するため、*sigE* 欠損株およびアンチシグマ因子をコードする *cseE* 欠損株のマイクロアレイ解析を行った。*cseE* 欠損株では、野生株と異なり SigE に制御されている遺伝子の発現が、恒常的に活性化されると考えられる。そこで野生株と比較して *cseE* 欠損株において発現が上昇する遺伝子を抽出し、58 遺伝子を見出した (Table 14)。このうち野生株においてイソブタノールに応答して発現が上昇した遺伝子は 26 遺伝子あった ( $p\text{-value} \leq 0.05$ )。もし、これら遺伝子の発現上昇に SigE が関与しているならば、*sigE* 欠損株では野生株と比較して、イソブタノールによって誘導される発現量が低下すると予想される。*sigE* 欠損株におけるイソブタノール添加後の発現量を野生株と比較した結果、*sigE* 欠損株において 12 遺伝子のイソブタノールによる発現上昇が消失もしくは低下していた (Table 14)。本研究では、機能未知のタンパク質をコードする cgR\_1138、機能未知の膜タンパク質をコードする cgR\_1210、cgR\_1953、および cgR\_2317、機能未知の分泌タンパク質をコードする cgR\_1211、パーミアーゼをコードする cgR\_1077、デヒドロゲナーゼをコードする cgR\_0690、ヒドロラーゼをコードする cgR\_0802、エステラーゼをコードする cgR\_1227、オキシドレダクターゼをコードする cgR\_1338、LplA (lipoate-protein ligase) をコードする cgR\_1157、アシルホスファターゼをコードする cgR\_5035 を SigE レギュロンと推定した。今回、推定した SigE レギュロンはイソブタノールに応答した発現上昇が SigE 依存的である遺伝子を示している。SigE の制御下にあることがすでに分かっている *sigB* が検出されなかったことから複数の転写制御因子によって制御されている遺伝子は候補から除外されている可能性が高い。

Table 14. CseE 欠損株で発現が上昇した遺伝子

ORF	Gene	COG	stress /control in WT <sup>a</sup>	D <sub>cseE</sub> <sup>b</sup> /WT	D <sub>sigE</sub> <sup>c</sup> /WT at 10 min
イソブタノールによって発現が誘導される遺伝子					
<b>cgR_0690</b>	FAD/FMN-containing dehydrogenase	C	<b>3.30</b>	<b>1.94</b>	0.39*
<b>cgR_0802</b>	putative cell wall-associated hydrolase	M	<b>1.91</b>	<b>3.85</b>	0.20*
<b>cgR_1077</b>	permease of the major facilitator superfamily		<b>2.78</b>	<b>2.79</b>	0.31*
<b>cgR_1138</b>	hypothetical protein		<b>1.73</b>	<b>1.55</b>	0.46*
<b>cgR_1157</b>	<i>lplA</i> lipoate-protein ligase	H	<b>2.10</b>	<b>1.60</b>	0.42*
<b>cgR_1210</b>	conserved hypothetical membrane protein		<b>3.44</b>	<b>2.35</b>	0.07*
<b>cgR_1211</b>	conserved hypothetical secreted protein		<b>3.10</b>	<b>1.81</b>	0.06*
<b>cgR_1227</b>	predicted esterase of the alpha-beta hydrolase superfamily	R	<b>1.00</b>	<b>1.40</b>	0.43*
<b>cgR_1338</b>	putative oxidoreductase (related to aryl-alcohol dehydrogenases)	C	<b>1.02</b>	<b>1.83</b>	0.43*
<b>cgR_1953</b>	putative membrane protein		<b>4.28</b>	<b>3.32</b>	0.05*
<b>cgR_2317</b>	putative membrane protein-fragment	O	<b>3.48</b>	<b>2.57</b>	0.20*
<b>cgR_5035</b>	<i>acy</i> acylphosphatase	C	<b>4.24</b>	<b>2.43</b>	0.06*
cgR_0273	hypothetical protein		<b>1.47</b>	<b>1.37</b>	0.68
cgR_0477	hypothetical protein		<b>1.41</b>	<b>2.04</b>	0.61
cgR_0656	hypothetical protein	Q	<b>2.81</b>	<b>1.30</b>	0.97
cgR_1143	PEP phosphonmutase or related enzyme	G	<b>1.55</b>	<b>1.03</b>	0.52
cgR_1206	hypothetical protein	N	<b>1.89</b>	<b>2.31</b>	0.89
cgR_1257	similar to GTP pyrophosphokinase	S	1.60	<b>1.17</b>	0.62
cgR_1272	membrane protein containing CBS domain	N	<b>1.40</b>	<b>1.23</b>	0.74
cgR_2103	hypothetical protein		<b>3.52</b>	<b>1.31</b>	0.51
cgR_2111	putative exoribonuclease	K	<b>1.19</b>	<b>1.44</b>	0.57
cgR_2420	membrane protein (homolog of Drosophila rhomboid)	R	<b>1.47</b>	<b>1.23</b>	0.67
cgR_2512	bacterial regulatory proteins, MerR family	K	<b>1.54</b>	<b>1.14</b>	0.72
cgR_2857	putative regulatory protein	E	<b>3.03</b>	<b>1.68</b>	0.55
cgR_2892	putative quinone oxidoreductase	CR	<b>1.54</b>	<b>1.34</b>	0.69
cgR_2903	nitroreductase	C	<b>4.58</b>	<b>3.52</b>	1.03
cgR_2960	membrane protease subunit, stomatin/prohibitin homologs	O	<b>2.25</b>	<b>2.27</b>	0.52
cgR_6063	hypothetical protein		1.43	<b>1.31</b>	0.79

<sup>a</sup> 野生株におけるイソブタノール添加 10 分後/添加前の log2 比を示した。

<sup>b</sup> 非ストレス条件での *cseE* 欠損株と野生株の発現量の log2 比を示した。

<sup>c</sup> イソブタノール添加 10 分後における *sigE* 欠損株と野生株の発現量の log2 比を示した。

\*は野生株と比較して *sigE* 欠損株で発現量が 1/2 以下である遺伝子を示した。

**Bold:** *p*-value ≤ 0.05

Table 14 の続き

ORF	Gene	COG	stress /control in WT <sup>a</sup>	<i>DcseE</i> <sup>b</sup> /WT	<i>DsigE</i> <sup>c</sup> /WT at 10 min
イソブタノールによって発現が誘導されない遺伝子					
cgR_0038	organic hydroperoxide resistance protein	O	<b>-1.46</b>	<b>1.38</b>	1.12
cgR_0175	p-aminobenzoyl-glutamate transporter	H	<b>0.67</b>	<b>1.29</b>	0.44
cgR_0192	<i>mag</i> putative 3-methylpurine DNA glycosylase 3.2.2.-	L	0.35	<b>1.16</b>	0.61
cgR_0194	<i>hde</i> probable esterase/lipase protein 3.1.1.-	I	0.06	<b>1.09</b>	0.48
cgR_0195	haloacid dehalogenase-like hydrolase	R	<b>0.94</b>	<b>1.15</b>	0.51
cgR_0624	<i>dkg</i> 2,5-diketo-D-gluconic acid reductasetase 1.1.1.-	R	0.48	<b>1.63</b>	0.55
cgR_0693	serine protease	O	-0.65	<b>1.76</b>	1.00
cgR_0694	membrane protein	GER	0.22	<b>1.69</b>	0.81
cgR_0695	segregation ATPase FtsK/SpoIIIE family	D	-0.02	<b>4.65</b>	0.48
cgR_0697	hypothetical protein	0	<b>0.69</b>	<b>2.94</b>	0.65
cgR_0698	hypothetical protein	0	-0.32	<b>2.85</b>	0.63
cgR_1141	putative phosphoglycerate mutase 5.4.2.1	G	<b>0.99</b>	<b>1.19</b>	0.52
cgR_1142	strong similarity to hypothetical protein Rv2133c-Mycobacterium tuberculosis	0	<b>0.84</b>	<b>1.43</b>	0.59
cgR_1490	hypothetical protein	S	<b>-1.06</b>	<b>1.36</b>	0.54
cgR_1508	membrane protein containing CBS domain	N	-0.04	<b>1.56</b>	0.87
cgR_1509	membrane protein containing CBS domain	N	<b>-0.30</b>	<b>1.64</b>	0.76
cgR_1548	trypsin-like serine protease	0	<b>-1.84</b>	<b>1.50</b>	0.46
cgR_1849	putative membrane protein	0	0.01	<b>1.02</b>	0.61
cgR_1864	hypothetical protein	0	0.32	<b>1.67</b>	1.00
cgR_2052	GCN5-related N-acetyltransferase	R	0.55	<b>1.59</b>	0.47
cgR_2179	putative secreted protein	0	-0.51	<b>1.71</b>	0.43
cgR_2242	<i>dkgA</i> 2,5-diketo-D-gluconic acid reductasetase 1.1.1.-	R	<b>-1.50</b>	<b>1.21</b>	1.13
cgR_2350	putative mechanosensitive ion channel protein	M	<b>-1.57</b>	<b>1.09</b>	1.29
cgR_2494	<i>gpx</i> glutathione peroxidase 1.11.1.9	O	<b>-0.84</b>	<b>1.55</b>	0.51
cgR_2528	hypothetical protein	0	-0.55	<b>1.02</b>	0.50
cgR_2595	<i>folP1</i> dihydropteroate synthase 2.5.1.15	H	<b>0.43</b>	<b>1.21</b>	0.75
cgR_2727	<i>bglG</i> transcriptional antiterminator	K	<b>0.75</b>	<b>3.07</b>	0.77
cgR_2728	<i>bglA</i> beta-glucosidase 3.2.1.86	G	0.88	<b>3.82</b>	0.69
cgR_2729	<i>bglF</i> PTS system beta-glucoside-specific enzyme IIABC component 2.7.1.69	G	0.18	<b>4.63</b>	0.78
cgR_2959	<i>proP</i> proline/ectoine carrier	GEPR	-0.05	<b>2.31</b>	0.92

<sup>a</sup> 野生株における 2% イソブタノール添加 10 分後/添加前の log2 比を示した。

<sup>b</sup> 非ストレス条件での *cseE* 欠損株と野生株の発現量の log2 比を示した。

<sup>c</sup> 2% イソブタノール添加 10 分後における *sigE* 欠損株と野生株の発現量の log2 比を示した。

\*は野生株と比較して *sigE* 欠損株で発現量が 1/2 以下である遺伝子を示した。

**Bold:** p-value ≤ 0.05

### 3-5 *sigE* の発現制御機構の解析

*sigE* の発現は、イソブタノールによって誘導されることが明らかとなった。次に発現制御機構の解析を行った。

#### 3-5-1 *sigE* プロモーター結合タンパク質の同定と機能解析

*sigE* の発現制御機構を明らかにするため、プロモーター領域に結合するタンパク質の同定を試みた。まず、プロモーター領域を特定するために RACE 法を用いて *sigE* の転写開始点の決定を行った。転写開始点は、翻訳開始点と同位置であることが明らかとなった (Fig. 23)。転写開始点より+15 から-240 までの領域を含む DNA 断片をリガンドとして DNA アフィニティー精製を行い、SDS-PAGE で解析を行った (Fig. 24)。 *C. glutamicum* において見出されている多くの転写制

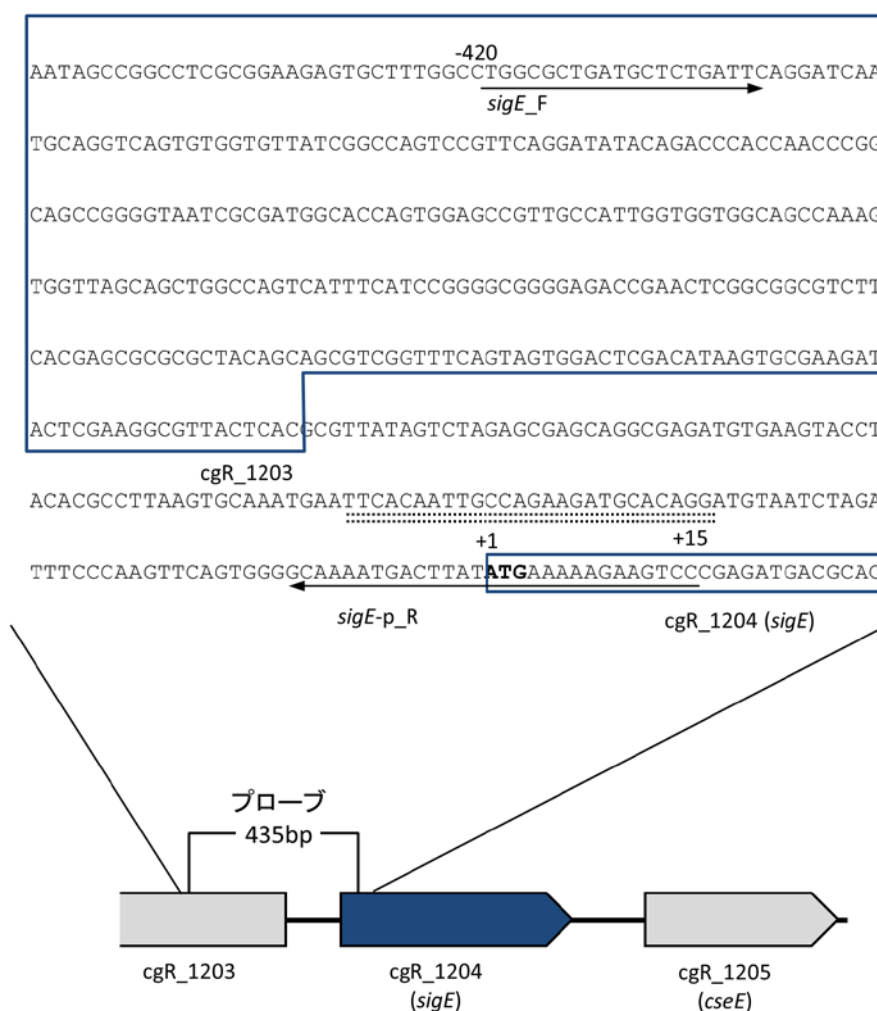


Fig. 23. *sigE* のプロモーター領域

*sigE* 上流付近の塩基配列を示した。+1 は *cgR\_1204 (sigE)* の転写開始点を示し、開始コドン ATG と同じ位置にある。青線の枠はコード領域を示す。矢印はリガンドの作製に使用したプライマーの位置を示している。二重点線は *phoR* 結合モチーフ様配列を示す。

御因子の分子量はおよそ 50 kDa 以下であることから、DNA アフィニティー精製により得られたタンパク質のうち、およそ 50 kDa 以下に検出されたバンドについてアミノ酸配列分析を行った。その結果、5 つの転写制御因子 (RamB, cgR\_0115, cgR\_1637, cgR\_2325, MtrA) が同定された (Table 15)。

RamB は、酢酸代謝に関与する遺伝子 *ack*、*pta*、*aceA*、および *aceB* のリプレッサーとして見出された [79]。MtrA は、浸透圧ストレス応答に関与する二成分制御系のレスポンスレギュレーターであり、グリシンベタイン輸送体 BetP をコードする *betP*、プロリン輸送体 ProP をコードする *proP* など 31 遺伝子の発現を制御していることが明らかにされている [80]。cgR\_0115 は LacI family 様の構造を持つタンパク質で、機能は未知である。cgR\_1637 は *S. coelicolor* の孢子形成に関与する転写制御因子 WhiA のホモログであるが、*C. glutamicum* における機能は解明されていない。cgR\_2325 は N 末に IclR と似た helix-turn-helix ドメインを持つタンパク質で、機能は未知である。IclR は *E. coli* においてグリオキシル酸経路に関与する遺伝子 *aceBAK* オペロンを制御するレプレッサーとして知られている [81]。

得られた各タンパク質をコードする遺伝子の欠損株を構築し、*sigE* のイソブタノール応答への影響を解析した。その結果、全ての欠損株でイソブタノールに応答した発現上昇が見られた (Fig. 25)。同定した 5 つの転写制御因子は、少なくとも単独ではイソブタノールに応答した発現上昇に関与していないことが明らかとなった。

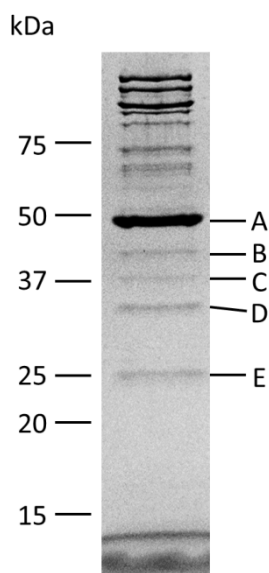


Fig. 24. *sigE* プロモーター領域に結合したタンパク質の SDS-PAGE

4% グルコースを含む A 培養液で対数増殖期まで培養した *C. glutamicum* R の細胞抽出液と DNA アフィニティービーズとインキュベートし、1 M NaCl で溶質した。A から E のバンドについてアミノ酸配列分析を行った。

Table 15. アミノ酸配列分析により同定されたタンパク質

Sample	ORF	Gene	Protein	MW	Score	Peptide	Coverage
A	cgR_0442	<i>ramB</i>	transcriptional regulator, MerR family	53,816	851	33	47
B	cgR_0683	<i>rpoA</i>	DNA-directed RNA polymerase alpha subunit	36,671	610	19	65
C	cgR_0561	<i>res2</i>	resolvase	37,728	353	12	47
	cgR_0395	<i>topA</i>	DNA topoisomerase	109,650	55	1	1
D	cgR_0115		ribose operon repressor	36,613	397	17	50
	cgR_0791		putative exodeoxyribonuclease	34,086	216	7	25
	cgR_1637		putative transcriptional regulator-WhiA homolog	35,618	146	5	19
E	cgR_2325		putative transcription regulator	28,897	413	19	58
	cgR_2870	<i>ssb</i>	single-stranded DNA-binding protein	23,301	150	4	27
	cgR_0863	<i>mtrA</i>	response regulator	24,943	46	2	21

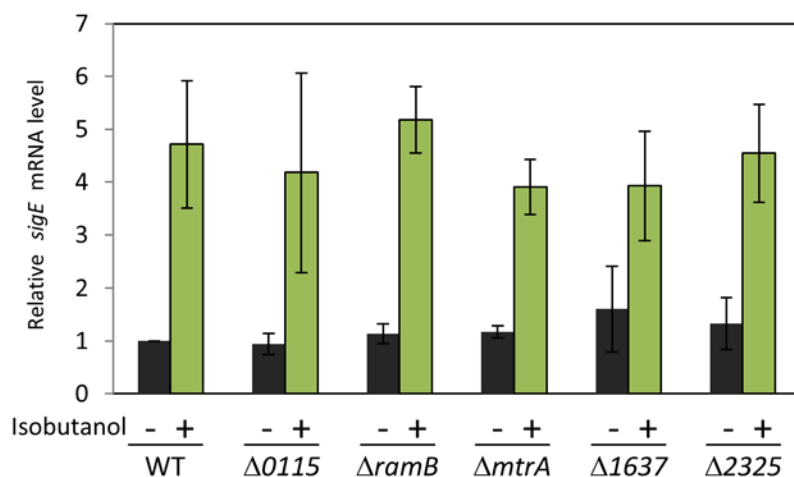


Fig. 25. 同定された転写制御因子の遺伝子欠損による *sigE* の発現への影響

野生株、cgR\_0115 欠損株( $\Delta 0115$ )、cgR\_0442 欠損株( $\Delta ramB$ )、cgR\_0863 欠損株( $\Delta mtrA$ )、cgR\_1637 欠損株( $\Delta 1637$ )、cgR\_2325 欠損株( $\Delta 2325$ )における *sigE* の発現量を示した。Isobutanol - はイソブタノール添加前における、+は 2%イソブタノール添加 10 分後における発現量を示している。発現量は、野生株における Isobutanol-に対する相対値として示した。

### 3-5-2 PhoSR による *sigE* の発現制御

近縁種 *Mycobacterium tuberculosis* における SigE ホモログは、細胞膜ストレス応答に関与する二成分制御系 MprAB によって発現が制御されていることが明らかにされている [82]。二成分制御系はセンサーキナーゼとレスポンスレギュレーターで構成される。特定の環境ストレスによりセンサーキナーゼの自己リン酸化が促進されるとともに、そのリン酸基によりリン酸化され活性型となったレスポンスレギュレーターは、ストレス適応に関与する遺伝子の発現を制御する。MprB はセンサーキナーゼをコードし、MprA はレスポンスレギュレーターをコードしている。MprAB は、界面活性剤や塩基性 pH で活性化されることから、細胞質外のタンパク質の構造異常を感知していると考えられている [82-84]。MprAB の発現は、MprA 自身と SigE により正に制御されていることが明らかとなっている [82]。

*C. glutamicum* は、MprAB を含む 12 組の二成分制御系を有している。*mprA* トランスポゾン破壊株を用いて、*sigE* の発現への影響を解析した結果、*mprA* は *sigE* のイソブタノールに応答した発現上昇に関与していないことが明らかとなった (Fig. 26)。

二成分制御系には自身の発現を制御している例が複数見出されている [85]。マイクロアレイ解析の結果から、イソブタノールに応答して発現が顕著に誘導された二成分制御系は *phoSR* であった (Fig. 27)。*phoS* はセンサーキナーゼ PhoS をコードし、*phoR* はレスポンスレギュレーター PhoR をコードする。PhoSR が *sigE* のイソブタノール応答性の発現上昇に関与しているかを検証するため、*phoS*

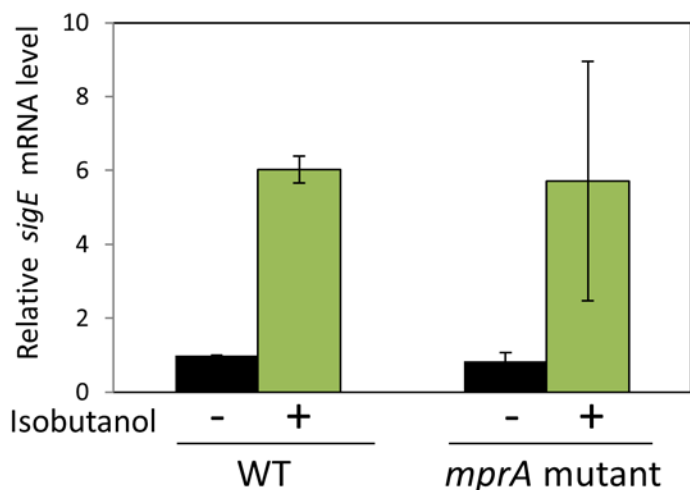


Fig. 26. *mprA* 破壊株における *sigE* の発現への影響

野生株および *mprA* トランスポゾン破壊株における *sigE* の発現量を示した。Isobutanol - はイソブタノール添加前における、+は 2%イソブタノール添加 10 分後における発現量を示している。発現量は、野生株における Isobutanol-に対する相対値として示した。

および *phoR* 遺伝子欠損株を構築し、*sigE* のイソブタノール応答への影響を調べた。対数増殖期にイソブタノールを添加し、その直前と添加 10 分後の *sigE* および SigE レギュロンの発現量を定量 PCR により解析した。その結果、*phoS* および *phoR* 欠損株では *sigE* のイソブタノールに応答した発現上昇が消失していた (Fig. 28)。*sigE* レギュロンとして推定した *cgR\_1210* および *cgR\_1953* と *sigB* の発現は、イソブタノールにより 4-6 倍に発現が誘導されるが、野生株と比較すると *phoS* および *phoR* 欠損株においてはイソブタノール添加後の発現量は 1/2 以下に低下した。これらの結果から *sigE* のイソブタノールに応答した発現上昇は PhoSR により制御されていることが明らかとなった。*phoS* 欠損株における各遺伝子の発現パターンは、*phoR* 欠損株における発現パターンとほぼ一致していることから、*sigE* の発現制御には PhoS による PhoR のリン酸化が必須であることが示唆された。

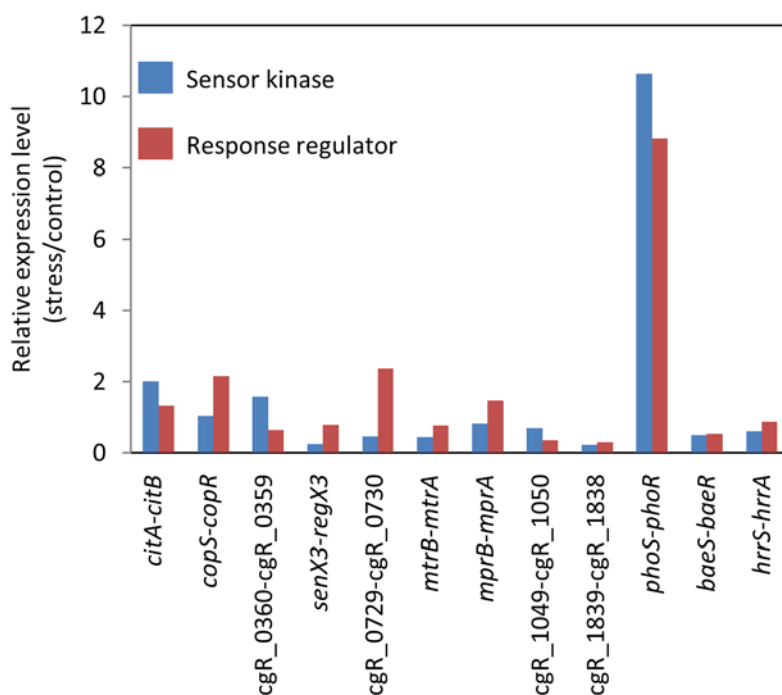


Fig. 27. イソブタノールによる二成分制御系の発現変化

野生株のマイクロアレイデータから二成分制御系の 2% イソブタノール添加 10 分後の発現量を示した。青色がセンサーキナーゼをコードする遺伝子の発現量、赤色がレスポンスレギュレーターをコードする遺伝子の発現量を示している。



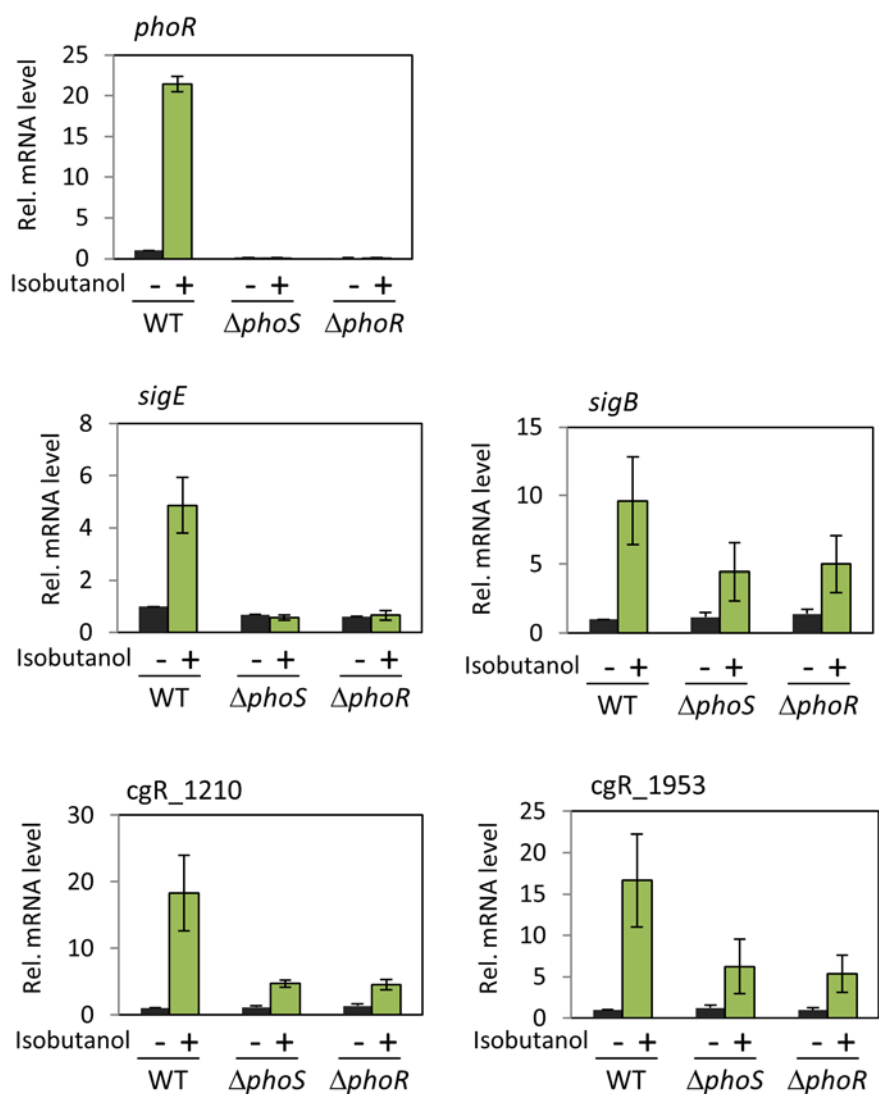


Fig. 28. PhoSR 欠損株におけるイソブタノール添加後の *sigE* と *sigE* レギュロンの発現量  
 野生株、*phoS* 欠損株、および *phoR* 欠損株における *sigE* および *sigE* レギュロンの発現量を示した。Isobutanol - はイソブタノール添加前における、+は 2%イソブタノール添加 10 分後における発現量を示している。発現量は、野生株における Isobutanol-に対する相対値として示した。

cgR\_1210: conserved hypothetical membrane protein

cgR\_1953: putative membrane protein

### 3-6 PhoSR を介した細胞表層ストレス応答

SigE は細胞の SDS 耐性に寄与すること、SigE の制御下にある SigB はエタノール耐性に寄与することが明らかとなっている [72, 75]。これらストレスに対する *sigE* および *sigB* の発現変化および各ストレスへの感受性に PhoSR が関与しているかを検証した。

#### 3-6-1 *phoSR* 欠損株における *sigE* の発現への影響

発現解析に用いたエタノールと SDS の濃度は、2%イソブタノールと同程度の増殖阻害効果を示す 7.5%と 0.01%とした (Fig. 29)。対数増殖期にエタノールまたは SDS を添加し、その直前と添加 10 分後の *sigE* および *sigB* の発現量を、定量 PCR を用いて解析した。その結果、野生株ではエタノールおよび SDS に応答して *sigE* および *sigB* の発現が上昇した (Fig. 30AB)。エタノールおよび SDS に応答した *sigE* の発現上昇は *phoS* および *phoR* 欠損株では完全に消失した。エタノール添加後の *sigB* の発現量は、野生株と比較して *phoS* および *phoR* 欠損株では 1/2 程度に低下し、SDS による *sigB* の発現上昇は、*phoS* および *phoR* 欠損株では完全に消失した (Fig. 30B)。

以上の結果から、*sigE* はエタノールおよび SDS ストレスに応答して発現が誘導され、その発現誘導は PhoSR によって制御されていることが明らかとなった。*sigB* の SDS 応答は PhoSR に依存的であり、*sigE* の発現パターンと一致した。*sigB* のエタノールに応答した発現誘導の 50%は PhoSR に依存的であった。

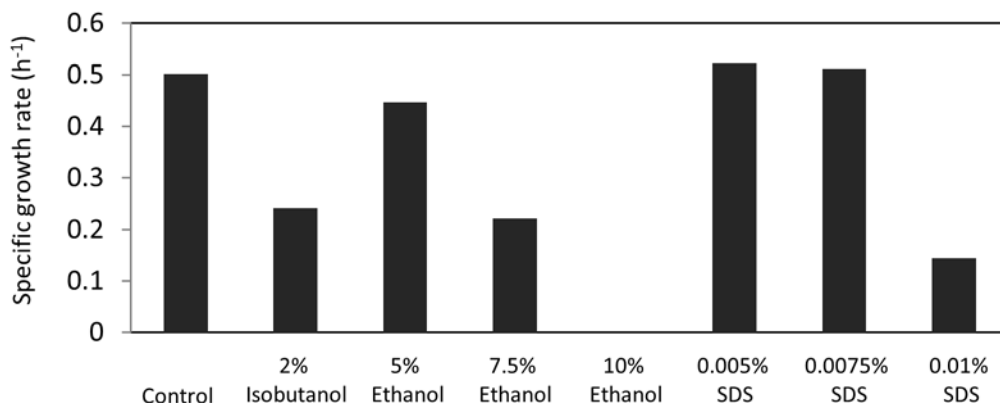


Fig. 29. エタノールおよび SDS 添加後の比増殖速度

*C. glutamicum* を培養し、対数増殖期にイソブタノール、エタノール、および SDS をそれぞれ添加した。非増殖速度は添加直前と 1.5-2 時間後の濁度を用いて算出した。Control は、非ストレス条件における比増殖速度を示す。

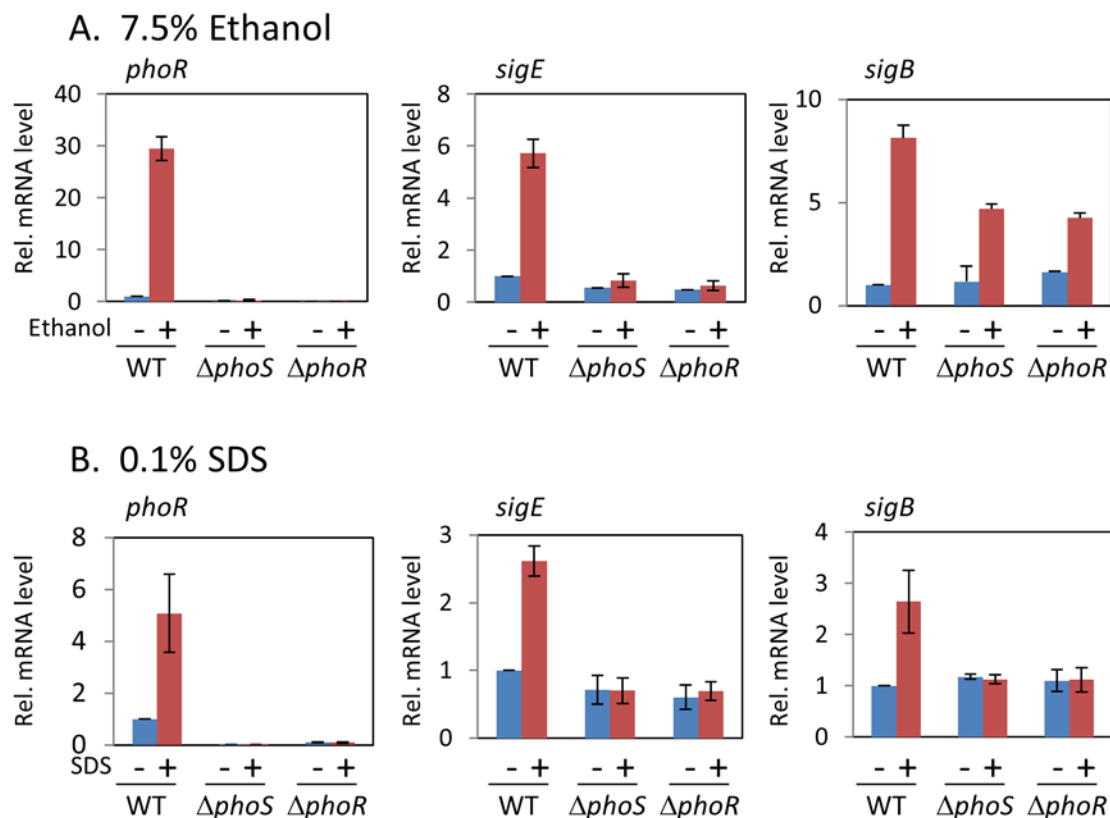


Fig. 30. PhoSR 欠損株におけるエタノールおよび SDS ストレス条件下での *sigE* の発現量  
 野生株、*phoS* 欠損株、および *phoR* 欠損株における *sigE* および *sigB* の発現量を示した。対数増殖期に 7.5%エタノール(A)または 0.01% SDS (B)を添加して、10 分後の発現量を示した。発現量は、野生株におけるエタノールまたは SDS 添加前に対する相対値として示した。

### 3-6-2 *phoS* および *phoR* 欠損株のストレス感受性

二成分制御系 PhoSR は、これまでリン酸欠乏応答に関与する転写制御因子として考えられていたが、本研究の結果からイソブタノール、エタノールおよび SDS に対するストレス応答にも関与することが明らかとなった。これらストレスに対する PhoSR の生理的役割を明らかにするため、*phoS* および *phoR* 欠損株のストレス感受性を調べた。非ストレス条件下における生菌数が、全ての株において同程度であることを確認した (Fig. 31)。*phoS* 欠損株および *phoR* 欠損株はイソブタノール、エタノールおよび SDS の全てに対し野生株よりも高い感受性を示した。以上の結果から、PhoSR はストレス条件下における生存維持に重要な役割を果たしているが明らかとなった。*sigE* 欠損株はエタノールと SDS に対し野生株よりも高い感受性を示したが、*phoS* 欠損株および *phoR* 欠損株よりも生菌数は多かった。予想とは異なり *sigE* 欠損株のイソブタノール感受性は、野生株と同程度であった。以上の結果より、PhoS および PhoR 欠損株のイソブタノ

ール感受性の上昇は、*sigE* レギュロン以外の要因による影響であると考えられる。一方、*sigB* 欠損株のイソブタノールおよびエタノール感受性は野生株および *sigE* 欠損株と比較して上昇した。**SigB** レギュロンもイソブタノールおよびエタノール耐性に関与していることが明らかとなった。

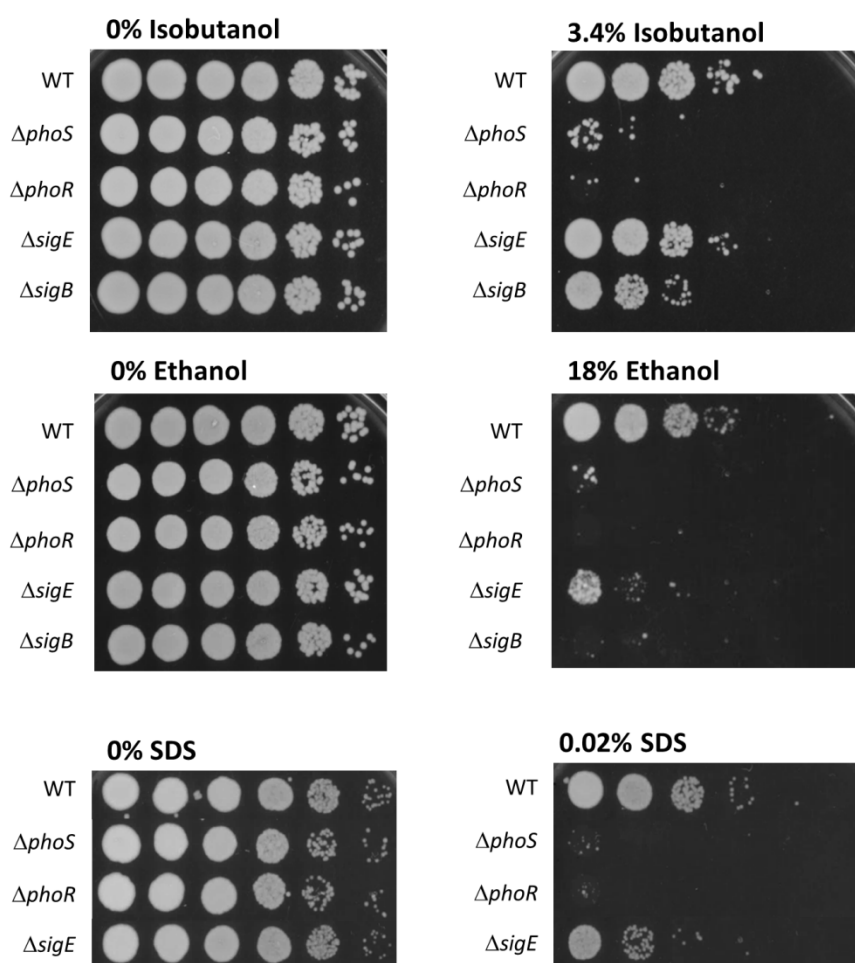


Fig. 31. *phoS* 欠損株および *sigE* 欠損株におけるストレス感受性

3.4%イソブタノール、18% エタノール、0.02% SDS に対する感受性試験の結果を示した。少なくとも2回以上の実験を行い同様の結果を得た。

## 4. 考察

本研究では、*C. glutamicum* Rにおけるイソブタノールストレス応答を網羅的に解析した。イソブタノールストレスに応答して、アミノ酸輸送体、アミノ酸生合成、核酸合成、および翻訳に関与する遺伝子の発現が低下すること、転写制御およびタンパク質の折り畳みやリサイクルに関与する遺伝子の発現が上昇することを示した。またイソブタノールの影響を受けて遺伝子の発現変化に関与する転写制御機構として、NAD 生合成遺伝子のリプレッサーNdnR、ロイシン生合成遺伝子のレプレッサーLtbR、*trp* オペロンのアテニュエーション、シキミ酸利用遺伝子のアクチベーターQsuR、二成分制御系 PhoSR、シグマ因子 SigE を見出した (Fig. 32)。

### イソブタノールによるアミノ酸生合成経路の抑制

イソブタノールにより多くのアミノ酸輸送体および生合成遺伝子の発現が低下した。*E. coli* において、突然変異を利用した育種により選抜されたエタノール耐性変異株ではロイシン、ヒスチジン、トリプトファン生合成遺伝子の発現が上昇していることが見出されている [86]。アミノ酸輸送体および生合成遺伝子の発現を最適化することで、イソブタノール耐性の向上につながるかもしれない。

### イソブタノールによるアテニュエーションへの影響

イソブタノールストレスにより、多くのアミノ酸生合成遺伝子の発現が低下した。一方で、トリプトファン生合成遺伝子の発現は、イソブタノールに応答して強く誘導された。*C. acetobutylicum* ではブタノール添加 10 分後の *trp* オペロンの発現量は低下しており、*E. coli* でもイソブタノール添加 10 分後の *trp* オペロンの発現量は低下する [45, 47]。*C. glutamicum* は、これら細菌とは異なるトリプトファン生合成遺伝子の発現パターンを示した。イソブタノールに応答した *trp* オペロンの発現上昇のプロセスには 2 つの可能性が考えられる。一つは、イソブタノールストレスによって細胞内のトリプトファンが枯渇状態に陥ったことにより *trp* オペロンの発現が誘導された可能性である。一般的にアルコールは、細胞膜やタンパク質を変性させる性質を有しており、イソブタノールによって細胞内アミノ酸の流出や酵素活性の低下が引き起こされ、トリプトファン枯渇状態に陥った可能性が考えられる。しかし、イソブタノール 10 分後では、細胞内トリプトファン量の枯渇は見られなかった。*trp* オペロンの発現量と細胞内トリプトファン量との関係を明らかにするためには、イソブタノール添加直後から継時的に *trp* オペロンの発現量とトリプトファン量を観察する必要がある。

もう一つは、イソブタノールによって翻訳の異常な終結が誘導されたことによりアテニュエーションによる制御が解除された可能性である。*E. coli* においてエタノールにより異常な翻訳終結が引き起こされることが示唆されている [87]。もしエタノールと同様にイソブタノールも異常な翻訳終結を引き起こすならば、イソブタノールによるリーダーペプチドの異常な翻訳終結が、あたかもトリプトファン枯渇状態のようにアンチターミネーターの形成を促進した可能性が考えられる。上記 2 つの仮説のいずれかが正しければ、アテニュエーションにより発現が制御される遺伝子の発現は、*trp* オペロンと同様の発現パターンを示すと考えられる。*ilvBNC*、*leuA*、および *aroF* は *trp* オペロンと同様にリボソームを介したアテニュエーションにより発現が制御されている [88-90]。しかしながら、*ilvBNC* はイソブタノールに応答した発現変化が見られず、*leuA* および *aroF* はイソブタノールに応答して発現が低下した。*trp* オペロンとの発現パターンの違いは、細胞内アミノ酸の量の違いが影響しているのかもしれない。イソブタノールが及ぼすアテニュエーションへの影響を理解するには、さらなる解析が必要である。

#### イソブタノールストレス応答に関与する転写制御機構

イソブタノールに応答して発現が変化した遺伝子には、多数の転写制御因子が含まれていた。これはイソブタノールが様々な転写制御ネットワークに直接的または間接的に影響を与えることを示唆している。ECF シグマ因子 **SigH** はヒートショックに関与する転写制御ネットワークにおいて中心的な役割を担う。ヒートショック応答に関与する **SigH** レギュロンであるシャペロンやプロテアーゼをコードする遺伝子の発現がイソブタノールによって誘導されたことから、イソブタノールによって **SigH** は活性化されることが示唆された。*E. coli* においてもヒートショック応答に関与するシグマ因子  $\sigma^H$  の制御下にある HSP 遺伝子 *clpB*、*dnaJ*、および *htpG* (いずれもシャペロンをコードする) などがブタノールによって誘導されることが報告されている [46]。*C. acetobutylicum* においても、HSP 遺伝子 *dnaK*、*dnaJ*、および *groESL* などがブタノールに応答しての発現が上昇するが[47]、これら遺伝子の発現制御に関与するシグマ因子は同定されていない。

シグマ因子 **SigB** および **SigE** もまた様々なストレス応答に関与することが知られている。*sigB* の発現は **SigH** および **SigE** によって制御されている [4, 78]。本研究により *sigE* の発現は、イソブタノールによって誘導されることが明らかとなった。さらに **SigE** は 12 遺伝子のイソブタノール応答性の発現誘導に必須であることが明らかとなった。この 12 遺伝子の多くは機能未知であるが、*sigE* 欠損株はエタノールおよび SDS 感受性を示したことから、**SigE** レギュロンはエ

タノールおよび SDS 耐性に寄与していることが示唆された。一方で、イソブタノール感受性は野生株と同程度であったことから、イソブタノール耐性には SigE レギュロンは寄与が小さいもしくは関与していないと考えられる。この結果は、エタノールとイソブタノールでは毒性機構が異なることを示していると考えられる。

*sigE* の発現は、二成分制御系 PhoSR によって制御されていることが明らかとなった。*sigE* プロモーター領域には PhoSR 結合モチーフ様の配列が見られる (Fig. 21)。二成分制御系 PhoSR は、リン酸欠乏応答に関与する転写制御因子として見出された [66]。PhoSR がリン酸欠乏シグナルをどのようにセンシングしているかはまだ明らかとなっていないが、他の細菌における PhoSR ホモログについてはその活性化機構について解析が行われている。*E. coli* におけるセンサーキナーゼ PhoR (PhoS ホモログ) の自己リン酸化は、リン酸輸送体 PstSCAB とシャペロン様タンパク質 PhoU を介して複合体を形成することで不活性化されている。細胞外のリン酸濃度の低下に伴うリン酸輸送体 PstSCAB の立体構造変化を感知して PstSCAB-PhoU-PhoR の相互作用が消失することで自己リン酸化が活性化される [91]。また PhoR はイソブタノールによっても活性化されることが報告されている [45]。*B. subtilis* においてセンサーキナーゼ PhoR (PhoS ホモログ) の自己リン酸化は、細胞膜上の還元型キノンとタイコ酸中間代謝物によって不活性化されることが報告されているが、リン酸欠乏に応答した PhoR の自己リン酸化の活性化機構は解明されていない [92, 93]。*M. tuberculosis* における PhoSR ホモログは全く異なる役割を担っている。PhoSR ホモログである PhoPR は動物細胞内での生存率や細胞壁合成阻害効果をもつバンコマイシンに対する耐性に寄与している [94]。PhoPR レギュロンは病原性に重要な細胞壁の脂質合成に関与していることが明らかとなっている [95]。*M. tuberculosis* のセンサーキナーゼ PhoR (PhoS ホモログ) の自己リン酸化の活性制御機構は明らかではないが、細胞外の  $Mg^{2+}$ 、 $Cl^-$ 、 $H^+$  濃度が関与していると考えられている [96]。本研究より *C. glutamicum* では、PhoSR はイソブタノール、エタノール、および SDS に応答した *sigE* の発現上昇を制御していることが明らかとなった。イソブタノール、エタノール、および SDS によるストレスはセンサーキナーゼ PhoS の自己リン酸化を活性化するシグナルとなっていると考えられる。さらに PhoSR は、イソブタノール、エタノールおよび SDS ストレス耐性に大きく寄与していることが明らかとなった。PhoSR レギュロンには、これらストレスに対する耐性に関与している遺伝子が含まれていると考えられる。PhoSR およびそのレギュロンの機能を解明することは、*C. glutamicum* のアルコール耐性付与に有益な知見となる。

本研究で得られた知見は、*C. glutamicum* のイソブタノールに対するストレス

応答を理解するための重要な手がかりとなるとともに、イソブタノール耐性株を構築する際に、遺伝子組換えのターゲット遺伝子を選択する基準として有用であると考えられる。本研究において示したイソブタノールに応答する転写制御ネットワークに関する知見は、イソブタノール生産において重要な遺伝子の発現をストレス条件下においても適切に制御する機構として応用することで、理想的なイソブタノール生産株の構築に役立てられるだろう。



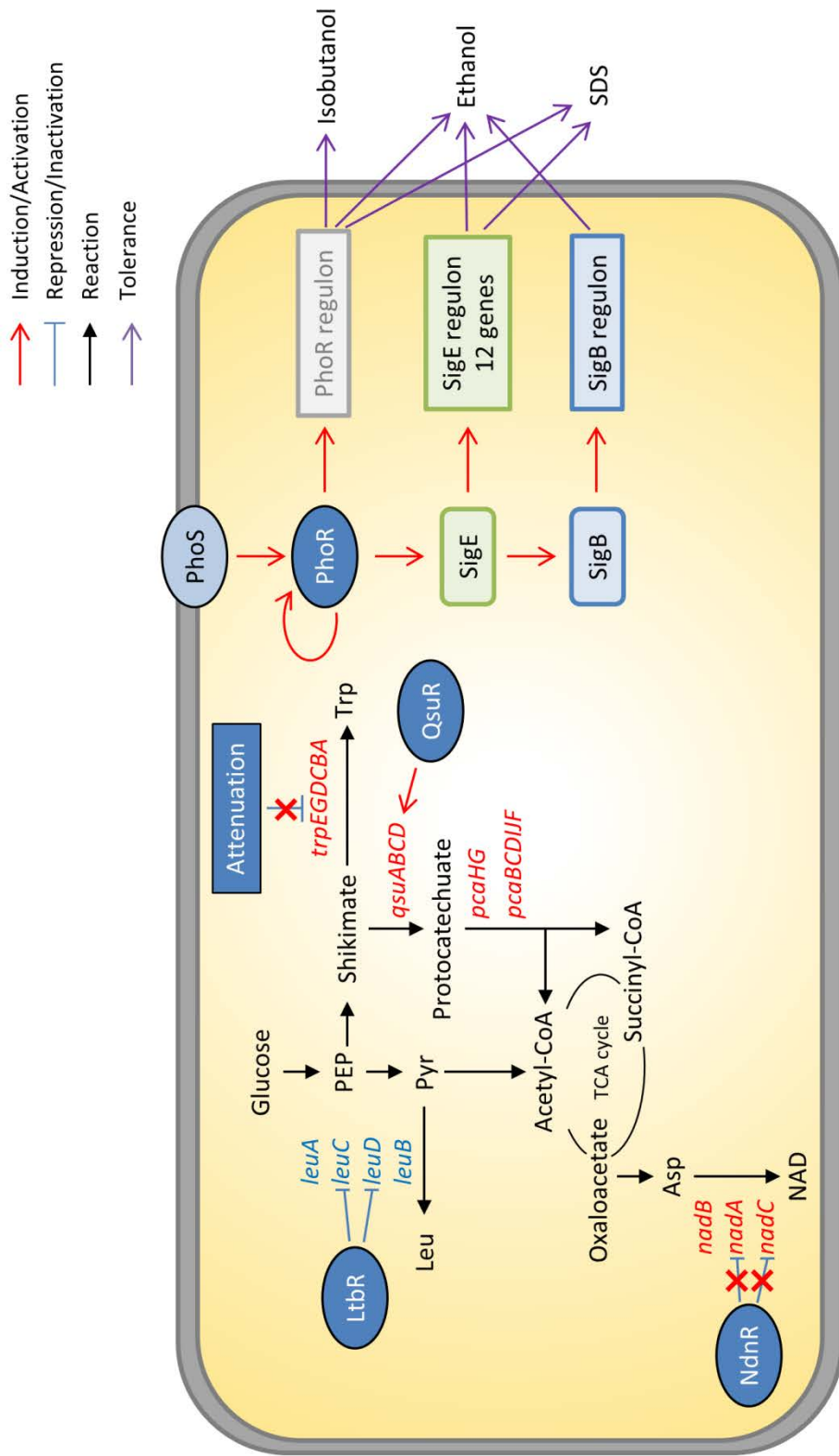


Fig. 32. イソブタノール応答に関する転写制御機構。イソブタノールは、LtbR を介して leuCD の発現抑制、NdnR の脱抑制の促進、アテニューエーションによる転写終結の解除を引き起こすことが示唆された。また PhoSR およびシグマ因子を介した転写カスケードは、ストレス耐性に重要であることが明らかとなった。

## 5. 謝辞

本研究の遂行ならびに論文の作製にあたり、懇切丁寧なご指導を賜りました公益財団法人地球環境産業技術研究機構バイオ研究グループの乾将行グループリーダー代行に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行ならびに論文の作製にあたり、熱心にご指導頂きました公益財団法人地球環境産業技術研究機構の豊田晃一博士に厚く御礼申し上げます。

また本研究にあたり、有益なご助言、ご指導を頂きました公益財団法人地球環境産業技術研究機構の寺本陽彦博士、田中裕也博士、須田雅子博士、北出幸広博士、久保田健博士、小川昌規博士（現・株式会社 KRI）、山本省吾博士（現・長瀬産業株式会社）に深く感謝いたします。

## 6. 参考文献

1. Intergovernmental Panel on Climate Change. (2007) IPCC Fourth Assessment Report: Climate Change 2007,
2. 農林水産省. (2014) 地球温暖化影響調査レポート,
3. REN Renewables 2015 Global Status Report. ed. (REN21 Secretariat)
4. Renewable Fuels Association. (2015) Ethanol Industry Outlook 2015
5. 高濃度アルコール燃料に関する安全性等調査委員会資料 (2001-2002),
6. International Energy Agency. (2015) CO2 Highlights 2015
7. Intergovernmental Panel on Climate Change. (2014) IPCC Contribution of Working Groups III Fifth Assessment Report Chapter 8: Transport
8. Youichiro, T., Kunihiro, M., Takuro, O., Yoshiaki, M., and Matthew, P.W. Method for manufacturing biomass-derived polyester and biomass-derived polyester., WO 2012173220 A1, 2012-12-20.
9. Jones, D. T., Woods, D. R. (1986). Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol. Rev.* 50, 484–524.
10. Atsumi, S., Hanai, T., and Liao, J.C. (2008). Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature* 451, 86-89.
11. Jia, X., Li, S., Xie, S., and Wen, J. (2012). Engineering a metabolic pathway for isobutanol biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168, 1-9.
12. Smith, K.M., Cho, K.M., and Liao, J.C. (2010). Engineering *Corynebacterium glutamicum* for isobutanol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 1045-1055.
13. Savrasova, E.A., Kivero, A.D., Shakulov, R.S., and Stoyanova, N.V. (2011). Use of the valine biosynthetic pathway to convert glucose into isobutanol. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 1287-1294.
14. Yukawa, H., Omumasaba, C.A., Nonaka, H., Kos, P., Okai, N., Suzuki, N., Suda, M., Tsuge, Y., Watanabe, J., Ikeda, Y., Vertes, A.A., and Inui, M. (2007). Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R. *Microbiology* 153, 1042-1058.
15. Hasegawa, S., Uematsu, K., Natsuma, Y., Suda, M., Hiraga, K., Jojima, T., Inui, M., and Yukawa, H. (2012). Improvement of the redox balance increases L-valine production by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 865-875.

16. Yamamoto, S., Suda, M., Niimi, S., Inui, M., and Yukawa, H. (2013). Strain optimization for efficient isobutanol production using *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 2938-2948.
17. Kabelitz, N., Santos, P.M., and Heipieper, H.J. (2003). Effect of aliphatic alcohols on growth and degree of saturation of membrane lipids in *Acinetobacter calcoaceticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 220, 223-227.
18. Stanley, G.A., Hobley, T.J., and Pamment, N.B. (1997). Effect of acetaldehyde on *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* subjected to environmental shocks. *Biotechnol. Bioeng.* 53, 71-8.
19. Alexandre, H., Berlot, J.P., and Charpentier, C. (1994). Effect of ethanol on membrane fluidity of protoplasts from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* grown with or without ethanol, measured by fluorescence anisotropy. *Biotechnol. Tech.* 8, 295-300.
20. Petrov, V.V. and Okorokov, L.A. (1990). Increase of the anion and proton permeability of *Saccharomyces carlsbergensis* plasmalemma by normal alcohols as a possible cause of its deenergization. *Yeast* 6, 311-318.
21. Plesset, J., Palm, C., and McLaughlin, C.S. (1982). Induction of heat shock proteins and thermotolerance by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Communications* 108, 1340-1345.
22. Oide, S., Gunji, W., Moteki, Y., Yamamoto, S., Suda, M., Jojima, T., Yukawa, H., and Inui, M. (2015). Thermal and solvent stress cross-tolerance conferred to *Corynebacterium glutamicum* by adaptive laboratory evolution. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2284-2298.
23. Cho, C., Choi, S.Y., Luo, Z.W., and Lee, S.Y. (2015). Recent advances in microbial production of fuels and chemicals using tools and strategies of systems metabolic engineering. *Biotechnol. Adv.* 33, 1455-1466.
24. Connor, M.R., Cann, A.F., and Liao, J.C. (2010). 3-Methyl-1-butanol production in *Escherichia coli*: random mutagenesis and two-phase fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1155-1164.
25. Sariaslani, F.S. (2007). Development of a combined biological and chemical process for production of industrial aromatics from renewable resources. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 51-69.
26. Desmond, C., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., and Ross, R.P. (2004). Improved stress tolerance of GroESL-overproducing *Lactococcus lactis* and orobiotic *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5929-5936.
27. Yu, K.O., Jung, J., Ramzi, A.B., Choe, S.H., Kim, S.W., Park, C., and Han, S.O.

- (2012). Increased ethanol production from glycerol by *Saccharomyces cerevisiae* strains with enhanced stress tolerance from the overexpression of SAGA complex components. *Enzyme Microb. Technol.* 51, 237-243.
28. Alper, H., Moxley, J., Nevoigt, E., Fink, G.R., and Stephanopoulos, G. (2006). Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science* 314, 1565-1568.
  29. Brat, D., Weber, C., Lorenzen, W., Bode, H.B., and Boles, E. (2012). Cytosolic re-localization and optimization of valine synthesis and catabolism enables increased isobutanol production with the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels*. 5, 65.
  30. Li, S., Huang, D., Li, Y., Wen, J., and Jia, X. (2012). Rational improvement of the engineered isobutanol-producing *Bacillus subtilis* by elementary mode analysis. *Microb. Cell. Fac.* 11.
  31. Blombach, B., Riester, T., Wieschalka, S., Ziert, C., Youn, J.W., Wendisch, V.F., and Eikmanns, B.J. (2011). *Corynebacterium glutamicum* tailored for efficient isobutanol production. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3300-10.
  32. Atsumi, S., Wu, T.Y., Machado, I.M., Huang, W.C., Chen, P.Y., Pellegrini, M., and Liao, J.C. (2010). Evolution, genomic analysis, and reconstruction of isobutanol tolerance in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* 6, 449.
  33. Zhao, Y.S., Hindorff, L.A., Chuang, A., Monroe-Augustus, M., Lyrstis, M., Harrison, M.L., Rudolph, F.B., and Bennett, G.N. (2003). Expression of a cloned cyclopropane fatty acid synthase gene reduces solvent formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2831-2841.
  34. Baer, S.H., Blaschek, H.P., and Smith, T.L. (1987). Effect of Butanol Challenge and Temperature on Lipid Composition and Membrane Fluidity of Butanol-Tolerant *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2854-2861.
  35. Huffer, S., Clark, M.E., Ning, J.C., Blanch, H.W., and Clark, D.S. (2011). Role of Alcohols in Growth, Lipid Composition, and Membrane Fluidity of Yeasts, Bacteria, and Archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6400-6408.
  36. Dunlop, M.J., Dossani, Z.Y., Szmidt, H.L., Chu, H.C., Lee, T.S., Keasling, J.D., Hadi, M.Z., and Mukhopadhyay, A. (2011). Engineering microbial biofuel tolerance and export using efflux pumps. *Mol. Syst. Biol.* 7.
  37. Borden, J.R. and Papoutsakis, E.T. (2007). Dynamics of genomic-library enrichment and identification of solvent tolerance genes for *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3061-3068.

38. Aono, R. (1998). Improvement of organic solvent tolerance level of *Escherichia coli* by overexpression of stress-responsive genes. *Extremophiles* 2, 239-248.
39. Ankarloo, J., Wikman, S., and Nicholls, I.A. (2010). *Escherichia coli* mar and *acrAB* mutants display no tolerance to simple alcohols. *Int. J.f Mol. Sci.* 11, 1403-1412.
40. Fisher, M.A., Boyarskiy, S., Yamada, M.R., Kong, N., Bauer, S., and Tullman-Ercek, D. (2014). Enhancing tolerance to short-chain alcohols by engineering the *Escherichia coli* AcrB efflux pump to secrete the non-native substrate n-butanol. *ACS Synth. Biol.* 3, 30-40.
41. Foo, J.L., Jensen, H.M., Dahl, R.H., George, K., Keasling, J.D., Lee, T.S., Leong, S., and Mukhopadhyay, A. (2014). Improving microbial biogasoline production in *Escherichia coli* using tolerance engineering. *Mbio* 5.
42. Oh, H.Y., Lee, J.O., and Kim, O.B. (2012). Increase of organic solvent tolerance of *Escherichia coli* by the deletion of two regulator genes, *fadR* and *marR*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 1619-1627.
43. Ingram, L.O. (1976). Adaptation of membrane lipids to alcohols. *J. Bacteriol.* 125, 670-678.
44. Piper, P.W. (1995). The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol. Lett.* 134, 121-127.
45. Brynildsen, M.P. and Liao, J.C. (2009). An integrated network approach identifies the isobutanol response network of *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* 5, 277.
46. Rutherford, B.J., Dahl, R.H., Price, R.E., Szmidt, H.L., Benke, P.I., Mukhopadhyay, A., and Keasling, J.D. (2010). Functional genomic study of exogenous n-butanol stress in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1935-45.
47. Alsaker, K.V., Paredes, C., and Papoutsakis, E.T. (2010). Metabolite stress and tolerance in the production of biofuels and chemicals: gene-expression-based systems analysis of butanol, butyrate, and acetate stresses in the anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol. Bioeng.* 105, 1131-1147.
48. Chandler, M., Stanley, G.A., Rogers, P., and Chambers, P. (2004). A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. Microbiol.* 54, 427-454.
49. Tomas, C.A., Welker, N.E., and Papoutsakis, E.T. (2003). Overexpression of *groESL* in *Clostridium acetobutylicum* results in increased solvent production

- and tolerance, prolonged metabolism, and changes in the cell's transcriptional program. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4951-4965.
50. Fiocco, D., Capozzi, V., Goffin, P., Hols, P., and Spano, G. (2007). Improved adaptation to heat, cold, and solvent tolerance in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 909-915.
  51. Zingaro, K.A. and Papoutsakis, E.T. (2012). Toward a Semisynthetic Stress Response System To Engineer Microbial Solvent Tolerance. *Mbio* 3.
  52. Toyoda, K., Teramoto, H., Yukawa, H., and Inui, M. (2015). Expanding the regulatory network governed by the extracytoplasmic function sigma factor sigma(H) in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 197, 483-496.
  53. Wittmann, C., Krüger, J.O., Kiefer, P., Binz, T., and Heinzle, E. (2004). Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria. *Anal. Biochem.* 327, 135-139.
  54. Yanischperron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.
  55. Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J.Mol. Biol.* 189, 113-130.
  56. Teramoto, H., Suda, M., Inui, M., and Yukawa, H. (2010). Regulation of the expression of genes involved in NAD de novo biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5488-5495.
  57. Kubota, T., Tanaka, Y., Takemoto, N., Watanabe, A., Hiraga, K., Inui, M., and Yukawa, H. (2014). Chorismate-dependent transcriptional regulation of quinate/shikimate utilization genes by LysR-type transcriptional regulator QsuR in *Corynebacterium glutamicum*: carbon flow control at metabolic branch point. *Mol. Microbiol.* 92, 356-368.
  58. Suzuki, N., Okai, N., Nonaka, H., Tsuge, Y., Inui, M., and Yukawa, H. (2006). High-throughput transposon mutagenesis of *Corynebacterium glutamicum* and construction of a single-gene disruptant mutant library. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3750-3755.
  59. Inui, M., Kawaguchi, H., Murakami, S., Vértés, A.A., and Yukawa, H. (2004). Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for fuel ethanol production under oxygen-deprivation conditions. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 8, 243-254.
  60. Tatusov, R.L., Koonin, E.V., and Lipman, D.J. (1997). A genomic perspective on

- protein families. *Science* 278, 631-637.
61. Brinkrolf, K., Brune, I., and Tauch, A. (2006). Transcriptional regulation of catabolic pathways for aromatic compounds in *Corynebacterium glutamicum*. *Genetics and Molecular Research* 5, 773-789.
  62. Schroder, J. and Tauch, A. (2010). Transcriptional regulation of gene expression in *Corynebacterium glutamicum*: the role of global, master and local regulators in the modular and hierarchical gene regulatory network. *FEMS. Microbiol. Rev.* 34, 685-737.
  63. Toyoda, K. and Inui, M. (2015). Regulons of global transcription factors in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 45-60.
  64. Heery, D.M. and Dunican, L.K. (1993). Cloning of the *trp* gene cluster from a tryptophan-hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*: identification of a mutation in the *trp* leader sequence. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 791-799.
  65. Zhao, K.X., Huang, Y., Chen, X., Wang, N.X., and Liu, S.J. (2010). *PcaO* positively regulates *pcaHG* of the beta-ketoadipate pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 192, 1565-1572.
  66. Kocan, M., Schaffer, S., Ishige, T., Sorger-Herrmann, U., Wendisch, V.F., and Bott, M. (2006). Two-component systems of *Corynebacterium glutamicum*: deletion analysis and involvement of the PhoS-PhoR system in the phosphate starvation response. *J. Bacteriol.* 188, 724-732.
  67. Schaaf, S. and Bott, M. (2007). Target genes and DNA-binding sites of the response regulator PhoR from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 189, 5002-5011.
  68. Pátek, M. and Nesvera, J. (2011). Sigma factors and promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 154, 101-113.
  69. Rodrigue, S., Provvedi, R., Jacques, P.-E., Gaudreau, L., and Manganelli, R. (2006). The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS. Microbiol. Rev.* 30, 926-941.
  70. Sachdeva, P., Misra, R., Tyagi, A.K., and Singh, Y. (2010). The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*: regulation of the regulators. *FEBS. J.* 277, 605-626.
  71. Larisch, C., Nakunst, D., Hueser, A.T., Tauch, A., and Kalinowski, J. (2007). The alternative sigma factor SigB of *Corynebacterium glutamicum* modulates global gene expression during transition from exponential growth to stationary phase. *BMC Genomics* 8.



72. Halgasova, N., Bukovska, G., Ugorcakova, J., Timko, J., and Kormanec, J. (2002). The *Brevibacterium flavum* sigma factor SigB has a role in the environmental stress response. *FEMS Microbiol. Lett.* 216, 77-84.
73. Ehira, S., Shirai, T., Teramoto, H., Inui, M., and Yukawa, H. (2008). Group 2 sigma factor *sigB* of *Corynebacterium glutamicum* positively regulates glucose metabolism under conditions of oxygen deprivation. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5146-5152.
74. Jakob, K., Satorhelyi, P., Lange, C., Wendisch, V.F., Silakowski, B., Scherer, S., and Neuhaus, K. (2007). Gene expression analysis of *Corynebacterium glutamicum* subjected to long-term lactic acid adaptation. *J. Bacteriol.* 189, 5582-5590.
75. Park, S.D., Youn, J.W., Kim, Y.J., Lee, S.M., Kim, Y., and Lee, H.S. (2008). *Corynebacterium glutamicum* sigmaE is involved in responses to cell surface stresses and its activity is controlled by the anti-sigma factor CseE. *Microbiology* 154, 915-923.
76. Barik, S., Sureka, K., Mukherjee, P., Basu, J., and Kundu, M. (2010). RseA, the SigE specific anti-sigma factor of *Mycobacterium tuberculosis*, is inactivated by phosphorylation-dependent ClpC1P2 proteolysis. *Mol. Microbiol.* 75, 592-606.
77. Ehira, S., Ogino, H., Teramoto, H., Inui, M., and Yukawa, H. (2009). Regulation of quinone oxidoreductase by the redox-sensing transcriptional regulator QorR in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* 284, 16736-16742.
78. Nesvera, J., Holatko, J., and Pátek, M. (2012). Analysis of *Corynebacterium glutamicum* promoters and their applications. *Subcell. Biochem.* 64, 203-221.
79. Gerstmeir, R., Cramer, A., Dangel, P., Schaffer, S., and Eikmanns, B.J. (2004). RamB, a novel transcriptional regulator of genes involved in acetate metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 186, 2798-2809.
80. Brocker, M., Mack, C., and Bott, M. (2011). Target genes, consensus binding site, and role of phosphorylation for the response regulator MtrA of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 193, 1237-1249.
81. Molina-Henares, A.J., Krell, T., Guazzaroni, M.E., Segura, A., and Ramos, J.L. (2006). Members of the IclR family of bacterial transcriptional regulators function as activators and/or repressors. *FEMS. Microbiol. Rev.* 30, 157-186.
82. He, H.J., Hovey, R., Kane, J., Singh, V., and Zahrt, T.C. (2006). MprAB is a stress-responsive two-component system that directly regulates expression of sigma factors SigB and SigE in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 188, 2134-2143.

83. Pang, X., Vu, P., Byrd, T.F., Ghanny, S., Soteropoulos, P., Mukamolova, G.V., Wu, S., Samten, B., and Howard, S.T. (2007). Evidence for complex interactions of stress-associated regulons in an *mprAB* deletion mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* 153, 1229-1242.
84. White, M.J., He, H., Penoske, R.M., Twining, S.S., and Zahrt, T.C. (2010). PepD Participates in the Mycobacterial Stress Response Mediated through MprAB and SigE. *J. Bacteriol.* 192, 1498-1510.
85. Bott, M. and Brocker, M. (2012). Two-component signal transduction in *Corynebacterium glutamicum* and other corynebacteria: on the way towards stimuli and targets. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 1131-1150.
86. Horinouchi, T., Tamaoka, K., Furusawa, C., Ono, N., Suzuki, S., Hirasawa, T., Yomo, T., and Shimizu, H. (2010). Transcriptome analysis of parallel-evolved *Escherichia coli* strains under ethanol stress. *BMS Genomics* 11.
87. Haft, R.J.F., Keating, D.H., Schwaegler, T., Schwalbach, M.S., Vinokur, J., Tremaine, M., Peters, J.M., Kotlajich, M.V., Pohlmann, E.L., Ong, I.M., Grass, J.A., Kiley, P.J., and Landick, R. (2014). Correcting direct effects of ethanol on translation and transcription machinery confers ethanol tolerance in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E2576-E2585.
88. Morbach, S., Junger, C., Sahm, H., and Eggeling, L. (2000). Attenuation control of *ilvBNC* in *Corynebacterium glutamicum*: Evidence of leader peptide formation without the presence of a ribosome binding site. *J. Biosci. Bioeng.* 90, 501-507.
89. Pátek, M. (2007). Branched-chain amino acids. F.V. Wendisch, ed. (Springer-Verlag Berlin Heidelberg), pp. 129-162.
90. Neshat, A., Mentz, A., Rueckert, C., and Kalinowski, J. (2014). Transcriptome sequencing revealed the transcriptional organization at ribosome-mediated attenuation sites in *Corynebacterium glutamicum* and identified a novel attenuator involved in aromatic amino acid biosynthesis. *J. Biotechnol.* 190, 55-63.
91. Gardner, S.G., Johns, K.D., Tanner, R., and McCleary, W.R. (2014). The PhoU protein from *Escherichia coli* interacts with PhoR, PstB, and metals to form a phosphate-signaling complex at the membrane. *J. Bacteriol.* 196, 1741-1752.
92. Schau, M., Eldakak, A., and Hulett, F.M. (2004). Terminal oxidases are essential to bypass the requirement for ResD for full Pho induction in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 186, 8424-8432.
93. Botella, E., Devine, S.K., Hubner, S., Salzberg, L.I., Gale, R.T., Brown, E.D.,

- Link, H., Sauer, U., Codee, J.D., Noone, D., and Devine, K.M. (2014). PhoR autokinase activity is controlled by an intermediate in wall teichoic acid metabolism that is sensed by the intracellular PAS domain during the PhoPR-mediated phosphate limitation response of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 94, 1242-1259.
94. Walters, S.B., Dubnau, E., Kolesnikova, I., Laval, F., Daffe, M., and Smith, I. (2006). The *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR two-component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 60, 312-330.
95. Asensio, J.G., Maia, C., Ferrer, N.L., Barilone, N., Laval, F., Soto, C.Y., Winter, N., Daffe, M., Gicquel, B., Martin, C., and Jackson, M. (2006). The virulence-associated two component PhoP-PhoR system controls the biosynthesis of polyketide-derived lipids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 281, 1313-1316.
96. Broset, E., Martin, C., and Gonzalo-Asensio, J. (2015). Evolutionary landscape of the *Mycobacterium tuberculosis* complex from the viewpoint of PhoPR: implications for virulence regulation and application to vaccine development. *Mbio* 6.
97. Ehira, S., Teramoto, H., Inui, M., and Yukawa, H. (2009). Regulation of *Corynebacterium glutamicum* heat shock response by the extracytoplasmic-function sigma factor SigH and transcriptional regulators HspR and HrcA. *J. Bacteriol.* 191, 2964-2972.