

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月22日現在

機関番号：10106

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05338

研究課題名（和文）微生物由来界面活性物質の分子デザイン技術の高度化

研究課題名（英文）Molecular structure design for microbial biosurfactant

研究代表者

小西 正朗 (Masaaki, Konishi)

北見工業大学・工学部・准教授

研究者番号：90533860

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,700,000円

研究成果の概要（和文）：環境調和型次世代界面活性剤として、利活用が期待されている微生物由来界面活性物質のひとつであるマンノシルエリスリトールリピッド(MEL)の微生物工場として、*Pseudozyma hubeiensis*に着目し、遺伝子工学・代謝工学を駆使した、非天然型MELの選択的かつ効率的な培養生産ならびにその機能について研究した。ドラフトゲノムデータを基に設計した遺伝子破壊用DNAを用いて、アセチルトランスフェラーゼ遺伝子破壊株を取得し、脱アセチル化MEL (MEL-D)を選択的に合成し、界面物性について評価した。同時に副生産した3つのアシル基を持つ3本鎖MEL-Dの合成にも成功した。

研究成果の概要（英文）：We focused a smut fungi *Pseudozyma hubeiensis* as cell factory for producing mannosylerythritol lipids (MEL), which are attractive material as a next generation eco-friendly surface active reagent. Using genetics and metabolic engineering, non-natural MEL was attempted to produced selectively and efficiently by the mutants. Deacetylated MEL (MEL-D) was synthesized by a acetyltransferase-knock out mutant, and was characterized as a surfactant. Furthermore, a novel tryacylated MEL-D was also synthesized.

研究分野：生物化学工学

キーワード：酵母 バイオサーファクタント 界面活性剤 表面張力 液晶

1. 研究開始当初の背景

石油由来の化学合成品から、より環境に優しい化合物の生産技術が求められている。植物バイオマスを原料として酵母が生産するバイオサーファクタント (BS) は、既存の界面活性剤にはない特異な自己集合特性を示し、高付加価値・高機能な化成品などとして利用されつつある。しかしながら、生産される物質の種類が限定されることや、生化学反応のため、有機合成のように基質や反応条件を変えて、分子の多様性を制御することが難しい。申請者らは、分子多様性を確保するため、様々な環境から新しい BS 生産菌を探索してきた。しかしながらスクリーニングによる多様性の拡張には限界がある。例えば、申請者が主に研究しているマンノシルエリスリトールリピッド (MEL) は結合しているアセチル基の数で MEL-A, MEL-B, MEL-C があり、それぞれの成分を選択的に生産できる株は発見できたものの、アセチル基のない MEL-D やアシル基が一本の一本鎖 MEL を選択的に生産できる株は発見できていない。そこでゲノム解析による代謝遺伝子同定を含めた分子育種を行うことで従来効率的に得られなかった中間代謝物を系統的かつデザイン的に生産することを目的に着目し研究を進めてきた。モデル宿主として、過去に報告のある生産菌の中でも最も効率的にマンノシルエリスリトール (MEL) を生産する *Pseudozyma hubeiensis* SY62 についてゲノム解析により、MEL 合成に関与する遺伝子群の特定に至った。また、それらの遺伝子を破壊するための遺伝子導入法についても開発した。

2. 研究の目的

これまでの検討で明らかとなった MEL 合成関連遺伝子の配列情報や遺伝子導入方法を発展させ、PCR によるターゲット遺伝子のクローニングならびに制限酵素サイトに依存しない DNA 結合反応を利用した遺伝子破壊用 conjugate の網羅的作成手法、シンプルな前処理によるエレクトロポレーション法を組み合わせた簡便・迅速・網羅的な遺伝子破壊法を組み合わせた迅速遺伝子破壊技術を開発する。それぞれの実験条件はこれまでの検討で確定しつつある(詳細は研究計画・方法に記載)。MEL 合成関与する遺伝子を網羅的に破壊し、破壊株ライブラリーを作成する。その破壊株を使用して、MEL を 10 g 以上生産し、精製後、詳細な構造解析・表面張力・自己集合など基礎物性を測定することで、新規 MEL 分子の同定ならびに機能について、網羅的な情報をシステムティックに収集する。実験室で容易に 10 g 以上の収量でこれらの物質を合成するためには、数 10~100 g/L 程度の生産収率が必要であるが、親株の MEL 生産性(129 g/L/week)から考えて、達成可能な目標といえる。理論的には、脱アセチル化体の MEL-D の選択的生産の他、脂肪酸鎖が 1

分子の 1 本鎖 MEL を 2 種類、それらの脱アセチル化体、希少糖アルコールのマンノシルエリスリトール(ME)とそのアセチル化体が合成できる可能性がある。前述した物質は報告されていないか存在は報告されているものの生産量が少なく物性や機能性が調査できていない。これらの物性・機能性を調べることで従来報告されていない新しい MEL 同族体の機能を網羅的に明らかにする。

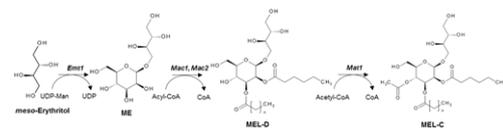


図 1 MEL の生合成経路

3. 研究の方法

(1) 遺伝子破壊株の作成

アルカリ SDS 法により、*P. hubeiensis* SY62 株からゲノム DNA を抽出し、遺伝子破壊用 Conjugate に使用する DNA 配列の鋳型 DNA として用いた。アセチルトランスフェラーゼ (Mat1) 遺伝子破壊用カセットはドラフトゲノム解析データを用いて設計したプライマーにより、増幅したものと、別途、*Ustilago*-大腸菌シャトルベクター pUXV1 由来のハイグロマイシン耐性遺伝子マーカーを増幅したものを Gibson Assembly 法を用いて、pUC19 にクローニングした。M13 プライマーセットを用いて破壊 conjugate を増幅した PCR 産物を遺伝子破壊用 DNA として用いた。遺伝子は海洋 DNA 1 µg をエレクトロポレーション法により、SY62 株に導入した。遺伝子は買い株候補からゲノム DNA を抽出し、mat1 を PCR 増幅することで、遺伝子破壊株を選別した。

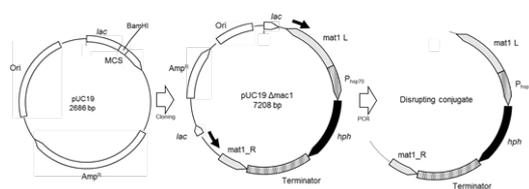


図 2 遺伝子破壊用 DNA

(2) MEL 生産方法

5-L 容量の卓上ファーメンターを用いて、MEL を生産した。遺伝子破壊株は hygromycin B を含む YM 培地で 25°C, 200 rpm で 2 日間前培養した。2.5L の MEL 生産用培地を仕込んだファーメンターに前培養液 20 ml を植菌し、溶存酸素量 50%以上を維持しながら培養した。MEL は培養液 5 ml に対し、等量の酢酸エチルを加えて、酸性条件下で抽出し、抽出液中の MEL を測定することで定量した。薄相クロマトグラフィー(TLC)で MEL の生成

ならびに組成を確かめた。MEL の定量には Inertsil SIL-100A カラムを装着した HPLC 装置を用いて成分を分画し、蒸発光散乱検出器で定量した。菌体量は酢酸エチル抽出後の菌体懸濁液にエタノールを添加し、遠心分離することで残存した酢酸エチルを除去した。さらに1回水洗後、もとの培養液量の蒸留水で再懸濁した菌体懸濁液の乾燥重量を測定した。

(3) 構造解析

糖脂質の構造解析はシリカゲルカラムにより分離精製した糖脂質を重クロロホルムもしくは重クロロホルム/重水(1:1)に溶解し JASCO ECA600 核磁気共鳴スペクトル分析装置により、¹H-, ¹³C-NMR 分光分析した。脂肪酸側鎖部分は 5%塩酸メタノール試薬によりメチルエステル化反応後のサンプルを TC-WAX カラムを装着したガスクロマトグラフ質量分析計でメチルエステルとして分析した。分子量はマトリックス支援レーザーイオン化飛行時間質量分析計 (MALDI-TOF/MS)により測定した。

(4) 機能評価

表面張力は Whilhelmy 型自動表面張力計 (CBVP-Z)を用いて測定した。液晶形成について簡易的に評価するため、水進入法と偏光顕微鏡法により液晶形成を観察した。

4. 研究成果

(1) MEL-D の生産

変異体候補株の中から PCR 法と代謝物の TLC 解析結果から SY62-MM36 株を *mat1* 破壊株として選択した。TLC 分析では野生株が生産する MEL-A, B, C よりも移動度が低い糖脂質スポットが検出された (図 3B)。HPLC では MEL-A, MEL-B, MEL-C の溶出時間がそ

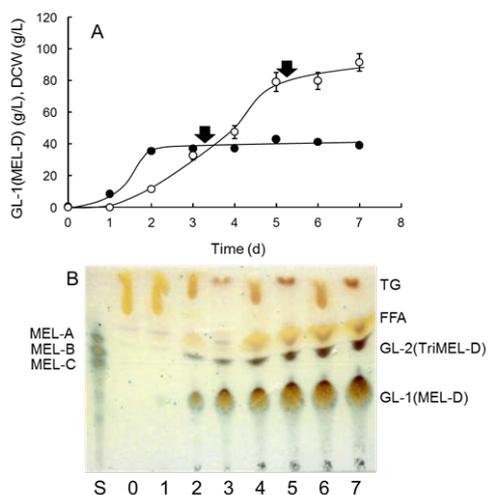


図 3. *mat1* 破壊株による MEL 生産 (A) 乾燥菌体重量と MEL 生産量の変化, (B) TLC 分析

れぞれ 6.51, 6.84, 7.22 分であったのに対し、GL-1 (MEL-D) の場合、7.94 分であった。

5L ジャーファーマンターで MEL 生産を検討したところ、7 日間で 96.1 g/L の MEL を生産できた。その体積あたりの生産性は 13.1 g/L であった。新規糖脂質を選択的かつ効率的に生産できた。

(2) MEL-D の構造確認

新規糖脂質の分子構造は以下の NMR データから推定した。GL-1 は MEL-D、GL-2 はオレイン酸が付加した 3 本鎖 MEL-D であることがわかった。

GL-1(MEL-D): ¹H-NMR (600 MHz, chloroform-d/methanol-d = 1:1) δ (ppm) 5.46 (*d*, *J* = 2.7 Hz, 2H), 4.90 (*dd*, *J* = 9.6, 2.7 Hz, 1H), 4.82 (*s*, 1H), 4.06 (*q*, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.91 (*d*, *J* = 11.7 Hz, 1H), 3.79-3.71 (*m*, 3H), 3.69 (*dt*, *J* = 14.0, 3.6 Hz, 3H), 3.62-3.52 (*m*, 3H), 3.39 (*t*, *J* = 7.6 Hz, 1H), 3.31 (*s*, 1H), 2.37 (*dd*, *J* = 15.5, 8.6 Hz, 3H), 2.35-2.22 (*m*, 2H), 1.75 (*s*, -3H), 1.69-1.61 (*m*, 2H), 1.61-1.54 (*m*, 1H), 1.46-1.10 (*m*, 37H), 1.09-0.76 (*m*, 12H); ¹³C-NMR(600 MHz, chloroform-d/methanol-d = 1:1) δ (ppm) 174.2, 173.9, 99.6, 77.7, 74.4, 72.8, 72.1, 71.7, 70.0, 65.4, 63.9, 61.8, 34.3-29.5(x10), 25.2, 25.1, 23.1, 22.8, 13.8, 13.7; MALDI-TOF/MS: [M + Na]⁺ = 559, 587.

GL-2 (Tri-MEL-D) (acetone contaminated): ¹H-NMR (600 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): 5.51-5.46 (*m*, 1H), 5.43-5.19 (*m*, 8H), 4.99-4.89 (*m*, 2H), 4.77 (*d*, *J* = 16.5 Hz, 1H), 4.29 (*dd*, *J* = 11.7, 3.4 Hz, 1H), 4.25-4.11 (*m*, 4H), 3.99 (*qd*, *J* = 11.8, 2.9 Hz, 3H), 3.95-3.89 (*m*, 3H), 3.89-3.83 (*m*, 4H), 3.83-3.76 (*m*, 3H), 3.74-3.66 (*m*, 3H), 3.59 (*qd*, *J* = 6.0, 2.1 Hz, 1H), 3.48-3.41 (*m*, 1H), 2.51-2.26 (*m*, 13H), 2.13-1.83 (*m*, 15H), 1.79-1.44 (*m*, 12H), 1.44 (*s*, -1H), 1.47-1.13 (*m*, 104H), 1.10-0.65 (*m*, 21H); ¹³C-NMR(600 MHz, chloroform-d) δ (ppm): 174.6, 174.4, 174.2, 173.7, 173.5, 99.2, 73.5, 71.6, 70.8, 70.4, 70.3, 68.9, 68.8, 65.9, 65.8, 65.1, 63.4, 62.1, 34.2, 31.9, 34.4-34.1, 31-29.2, 27.3, 27.2, 25.0, 24.8, 22.8, 22.7, 14.2; MALDI-TOF/MS: [M + Na]⁺ = 823, 851

MEL-D のアシル基の炭素鎖長は親株と同様に 6 から 10 の飽和脂肪酸が含まれていることがわかった。

(3) MEL-D の性質

MEL-D の表面張力測定の結果、臨界ミセル濃度(CMC)は $2.0 \times 10^{-5} M$ で 29.7 mN/m まで表面張力が下がった。3 本鎖 MEL-D は CMC は $3.0 \times 10^{-5} M$ であった(図 4)。MEL-D の CMC 値はこれまでに報告がある *P. tsukubaensis* (Fukuoka et al. 2011)より高かった。アシル基が既報のものより短いため、親水性疎水性バランスが高くなったためと考えられた。

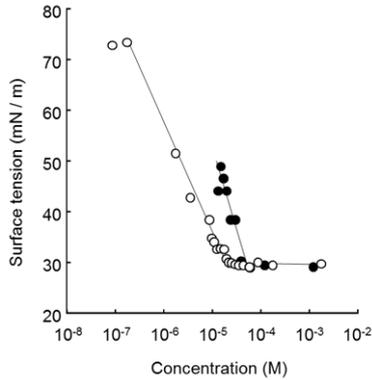


図 4. 糖脂質水溶液の表面張力
○: MEL-D, ●: 三本鎖 MEL-D

水進入法による液晶形成の観察において、MEL-D では MEL-D 高濃度側の幅広い濃度範囲でラメラ液晶相と思われる像が観察された。これは、既報の *P. tsukubaensis* 由来の MEL-D と同等の結果であった。リオトロピック液晶相の形成には、アシル基よりも親水基である糖鎖部分の構造依存性が高いことが示唆された。

三本鎖 MEL-D の場合、ラメラ相もしくはヘキサゴナル相と思われる液晶相が濃度勾配間で認められた。

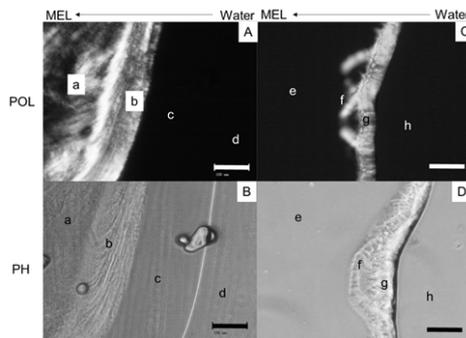


図 5 水進入法による液晶形成能測定
A: 偏光観察 (MEL-D), B: 位相差観察 (MEL-D), C: 変更観察 (三本鎖 MEL-D), D: 位相差観察 (三本鎖 MEL-D)

(4) 一本鎖 MEL の合成

一本鎖 MEL の合成のため、アシルトランスフェラーゼ *mac1* および *mac2* の破壊株の作成を試みたが、MEL 生産性がなくなりました。原因は不明であるが、意図した遺伝子組換えが起こらず、MEL 合成代謝経路をノック

アウトしてしまった可能性がある。再度遺伝子破壊系を再設計し、遺伝子破壊株の作出に取り組んでいる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Konishi M., Makino M.: Selective production of deacetylated mannosylerythritol lipid, MEL-D, by acetyltransferase disruption mutant of *Pseudozyma hubeiensis*. *J. Biosci. Bioeng.* 125: 105-110 (2018) 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. 牧野幹、小西正朗 “組換え *Pseudozyma hubeiensis* SY62 株による MEL-D 生産”、第 69 回日本生物工学会大会、早稲田大学、東京、平成 29 年 9 月 11~14 日
2. 吉田優太、小西正朗 “マンノシルエリスリトールリピッド生合成に関わるアシル転移酵素破壊株の作製”、第 68 回日本生物工学会大会、富山国際会議場、富山市、平成 28 年 9 月 30 日
3. 小西正朗 “代謝改変による新規微生物由来界面活性物質の生産” 日本分析化学会第 65 年会、札幌、平成 28 年 9 月 15 日
4. 小西正朗、吉田由佳、堀内淳一 “コーンコブ糖化液を用いた効率的バイオサーファクタントの生産” 第 67 回日本生物工学会大会、城山観光ホテル、鹿児島、平成 27 年 10 月 26 日
5. 吉田優太、堀内淳一、小西正朗 “*Pseudozyma hubeiensis* SY62 株のための分子生物学的手法の開発” 第 67 回日本生物工学会大会、城山観光ホテル、鹿児島、平成 27 年 10 月 26 日
6. 吉田優太、堀内淳一、小西正朗 “組換え技術による一本鎖 MEL の選択的生産方法の検討” 化学工学会第 47 秋季大会、北海道大学札幌キャンパス、札幌、平成 27 年 9 月 9 日

[その他]

ホームページ等

北見工業大学バイオプロセス工学研究室

<http://www.chem.kitami-it.ac.jp/laboratory/konishi/bioprocess/Main.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小西 正朗 (KONISHI, Masaaki)

北見工業大学・工学部・准教授

研究者番号：90533860