

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12400

研究課題名(和文) 中度好塩性細菌におけるアミノ酸代謝制御機構の解明とリサイクルバイオ技術への応用

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism for regulation of amino acid metabolism in moderately halophilic bacteria and its application to recycle biotechnology

研究代表者

仲山 英樹 (NAKAYAMA, Hideki)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(環境)・教授

研究者番号：30324982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：中度好塩性細菌ハロモナスは、アスパラギン酸(Asp)経路を介して有用性が高いエクトインを浸透圧調節物質として生合成できる。本研究で得た、グルタミン酸(Glu)過剰生産変異株であるGOP株により、Glu経路を介して有用性が高い多様な浸透圧調節物質を生合成する細胞工場の開発が可能となった。実際、GluをGABAに変換するGADシステムをGOP株に導入し、高塩環境下でGABAを主要な浸透圧調節物質として生合成できるGOP-Gad株の創製に成功した。今後は、バイオマス由来の多様な炭素・窒素源を資化する能力に優れたGOP-Gad株を活用することにより、持続可能なGABA生産細胞工場の開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ハロモナスは、アスパラギン酸経路を介してエクトインを生合成する能力以外に、グルタミン酸経路を介してGABA等の多様な浸透圧調節物質が生合成できることが初めて示された。今後は、GOP株の変異遺伝子を解析することにより、アスパラギン酸経路またはグルタミン酸経路を介した、ハロモナスにおける浸透圧調節物質の生合成機構の学術的な解明が進むことが期待される。また、得られた学術的知見を応用することにより、廃バイオマスから有用性の高い多様なアミノ酸類を生産するハロモナス細胞工場の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：A moderate halophile *H. elongata* can biosynthesize ectoine as a high-value osmolyte via aspartic acid metabolic pathway. While the *H. elongata* GOP strain, which is an ectoine-deficient Glutamic acid-Over-Producing mutant identified here, opens doors to the biosynthesis of valuable osmolytes via glutamic acid metabolic pathway. In fact, by installing a GAD system into *H. elongata* GOP strain, we successfully created the higher salt-tolerant *H. elongata* GOP-Gad strain, which biosynthesize GABA as its major osmolyte. With ability to thrive in high salinity environment and to assimilate biomass-derived carbon and nitrogen sources, *H. elongata* GOP-Gad strain developed in this work can be used in the development of a sustainable GABA producing cell factory.

研究分野：環境生物学

キーワード：ハロモナス 浸透圧調節物質 エクトイン グルタミン酸 -アミノ酪酸(GABA) 細胞工場 廃バイオマス アミノ酸代謝

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

これまでに、中度好塩菌の備えた広塩性の鍵となる動的塩濃度の変化に適応するための細胞内浸透圧調節物質として、「適合溶質」と称される機能性に優れた水溶性の低分子有機化合物の生合成に関する研究が国内外で展開され、浸透圧調節以外にも優れた機能性を示す ECT 等のアミノ酸類やトレハロース等の糖類他、多様な適合溶質の存在が明らかとなっている。近年、適合溶質の機能を付与した食品・飼料や化粧品・医薬品も開発されており、適合溶質の産業利用の需要も高まっているため、高効率な適合溶質の発酵生産技術の開発が必要とされている。

H. elongata の主要な適合溶質として知られる ECT は、単純な炭素源と窒素源からアスパラギン酸を経由するアミノ酸代謝制御系を経て速やかに生合成され(図1)、細胞内で浸透圧調節物質として機能できることに加え、生体膜および生体分子の構造および活性を維持する保護機能に優れている。それゆえ *H. elongata* は、高塩濃度環境下で十分量の ECT を効率的に生合成するために最適化したアミノ酸類の代謝制御機構を進化の過程で獲得したと考えられる。

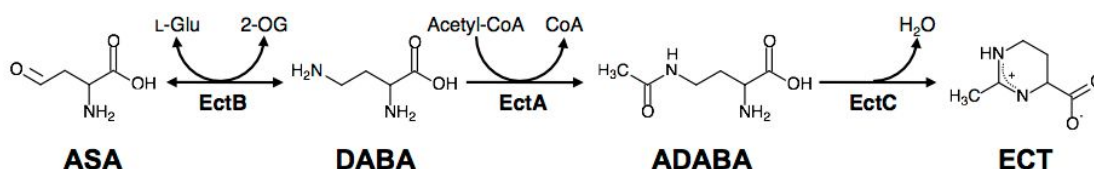


図1. アミノ酸代謝系から派生した ECT の生合成経路

中度好塩菌 *H. elongata* では、アスパラギン酸を前駆体とするリジン、メチオニン、スレオニン等のアミノ酸生合成系の重要ハブ基質となるアスパラギン酸-β-セミアルデヒド(ASA) から、2,4-ジアミノ酪酸 (DABA)、*N*₇-アセチル 2,4-ジアミノ酪酸 (ADABA) を経る 3 段階の酵素反応により ECT が生合成される。

現在、*H. elongata* は肉製品の発酵用塩水に生息する有用発酵微生物として認知されており、ECT の工業生産株としての実用性にも優れている。しかしながら、ECT を生合成するために最適化されたアミノ酸類の代謝制御機構については未詳のままである。特に、ECT に代表される機能性に優れた浸透圧調節物質を化粧品や医薬品に用いるファインケミカル市場へのインパクトも大きいいため、ECT 生合成に関わるアミノ酸類の代謝制御機構の解明は、機能性に優れた浸透圧調節物質の産業利用の観点からも意義深い。しかしながら、*H. elongata* による ECT 以外のアミノ酸類の発酵生産に関しては、研究代表者のグリシンベタインやジメチルグリシンの製造法に関する特許はあるが、代謝系が ECT 生合成に最適化されているために実用化レベルに至っておらず、*H. elongata* におけるアミノ酸類の代謝制御機構の解明が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、主要な適合溶質として、ECT をアスパラギン酸経路により生合成する中度好塩性細菌ハロモナス (*Halomonas elongata*) に着目し、ECT 生合成に最適化されたアミノ酸代謝制御機構の解明を目的とした。特に本研究では、ECT 生合成オペロンを欠失した塩ストレス感受性の KA1 株から派生した、塩ストレス耐性の自然突然変異株の取得を行い、高塩濃度条件下で浸透圧調節物質として生合成されるアミノ酸を同定し、エクトイン以外の有用なアミノ酸類を生産できるハロモナス細胞工場を開発することを最終目的とした。

3. 研究の方法

ECT 生合成系遺伝子を欠失した塩ストレス高感受性の *H. elongata* KA1 株を親株とした馴化継代培養法により、特定のアミノ酸類が過剰に生合成されることで塩ストレス高感受性が抑制された突然変異株を取得して変異遺伝子を同定し、選択的な ECT 生合成のために最適化されたアミノ酸類の代謝制御機構を解明する。

さらに、得られた突然変異株の解析により得られた学術的知見を応用し、エクトイン以外のアミノ酸類を生合成できるハロモナス細胞工場の開発を行う。

4. 研究成果

本研究で得た、グルタミン酸過剰生産変異株である GOP 株により、グルタミン酸経路を介して有用性が高い多様な浸透圧調節物質を生合成するハロモナス細胞工場の開発が可能となった。実際、グルタミン酸の脱炭酸反応により GABA を生合成する GAD システムを GOP 株に導入することにより、高塩環境下で GABA を主要な浸透圧調節物質として生合成できる GOP-Gad 株の創製に成功した (図 2)。研究成果により、ハロモナスは、アスパラギン酸経路を介してエクトインを生合成する能力以外に、グルタミン酸経路を介して GABA 等の多様な浸透圧調節物質が生合成できることが初めて示された。

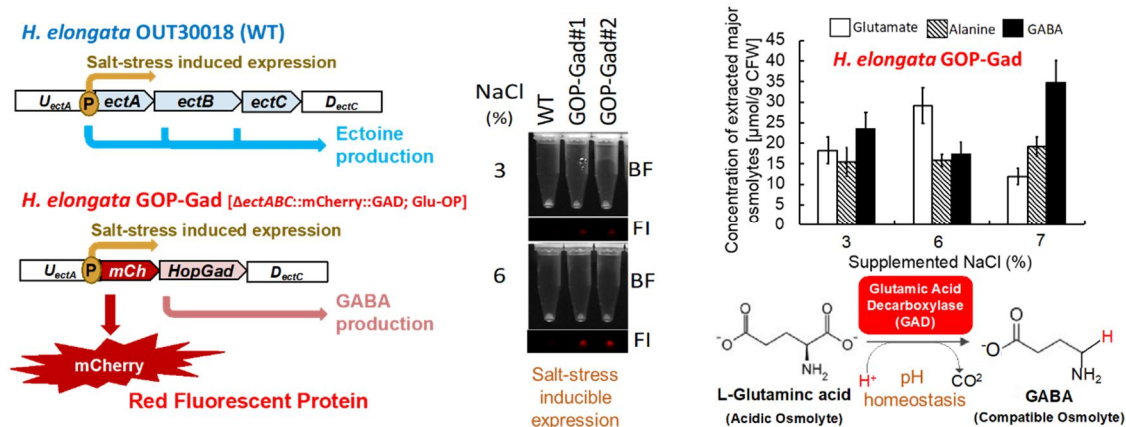


図 2. 本研究成果の概要.

ハロモナス GOP 株のゲノム上の塩ストレス誘導性のエクトイン生合成オペロンの部位に赤色蛍光タンパク質 mCherry とグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) をコードした人工オペロンを挿入した GOP-Gad 株を創製し、グルタミン酸による酸ストレスを抑制すると同時に浸透圧調節物質として GABA を生産することにより、塩ストレス耐性も向上することが示された。

今後は、GOP 株の変異遺伝子を解析することにより、アスパラギン酸経路またはグルタミン酸経路を介した、ハロモナスにおける浸透圧調節物質の生合成機構の学術的な解明が進むことが期待される。また、得られた学術的知見を応用することにより、廃バイオマスから有用性の高い多様なアミノ酸類を生産するハロモナス細胞工場の開発が期待できる。さらに、細胞表面工学と組み合わせることにより細胞内でアミノ酸類を細胞表面で有用ペプチドや酵素など生産する細胞工場の開発が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakayama H, Kawamoto R, Miyoshi K	4. 巻 439
2. 論文標題 Ectoine production from putrefactive non-volatile amines in the moderate halophile Halomonas elongata	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IOP Conference Series: Earth and Environmental Science	6. 最初と最後の頁 012001 ~ 012001
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1755-1315/439/1/012001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鄒子燕, 仲山英樹
2. 発表標題 フィターゼを細胞表層に提示したアーミングハロモナス細胞の創製
3. 学会等名 2020年度日本フードファクター学会・日本農芸化学会西日本支部大会合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nakayama H, Kawamoto R, Miyoshi K
2. 発表標題 Ectoine production from putrefactive non-volatile amines in the moderate halophile Halomonas elongata
3. 学会等名 The 6th International Symposium Innovative Bioproduction Indonesia on Biotechnology and Bioengineering 2019 (ISIBio 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仲山英樹
2. 発表標題 好塩性微生物を活用したリサイクルバイオ技術の開発研究
3. 学会等名 日本農芸化学会令和元年度西日本支部例会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鄒子燕, 仲山英樹
2. 発表標題 ハロモナス細胞工場を用いた廃棄バイオマス原料からの - アミノ酪酸生産
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会 (要旨による発表)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三好勝之, 河本亮, 仲山英樹
2. 発表標題 好塩性細菌ハロモナスにおける炭素・窒素比率の異なる最小培地中での適合溶質生産特性の解析
3. 学会等名 第56回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鄒子燕, 仲山英樹
2. 発表標題 フィターゼを細胞表層に提示した単細胞エコフィールドの開発に資するハロモナス由来のフィターゼ遺伝子の探索
3. 学会等名 第58回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Zou Z, Nakayama H
2. 発表標題 Development of Halomonas elongata cell factory, which produces GABA in the cell and displays phytase on the cell surface
3. 学会等名 73rd SBJ Annual Meeting
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仲山 英樹, 河本 亮, 三好 勝之
2. 発表標題 中度好塩性細菌Halomonas elongata における不揮発性腐敗アミンを単一炭素・窒素源としたエクトイン生産
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 植田充美(監修), 渡邊幸夫, 黒田浩一, 秦洋二, 都築正男, 高木俊幸, 濱真司, 野田秀夫, 芝崎誠司, 白川利朗, 北川孝一, 瀨脇智満, 谷浩行, 伊東祐二, 森岡弘志, 福田夏希, 宮川(蓑毛)藍, 異島優, 小田切優樹, 仲山英樹, 他14名	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 246
3. 書名 細胞表層工学の進展(仲山分担執筆, 第4章4, 中度好塩菌の細胞内と細胞表層を活用した低環境負荷型の機能性飼料添加物の開発)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>長崎大学 環境生物工学研究室(仲山研究室)ホームページ https://nakayamalab.com researchmap https://researchmap.jp/nakayamah/</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	鄒 子燕 (Zou Ziyan)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	三好 勝之 (Miyoshi Katsuyuki)		
研究協力者	仲山(カオティエン) プラ (Kaothien-Nakayama Pulla)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関