

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15743

研究課題名(和文) 貧栄養耐性細菌を利用したD-アミノ酸発酵法の開発

研究課題名(英文) Establishment of a D-amino acid fermentation method using oligotroph

研究代表者

秋田 紘長 (Akita, Hironaga)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・主任研究員

研究者番号：10738024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)： 研究を開始した当初、貧栄養耐性細菌 *Enterobacter oligotrophicus* を利用したD-アミノ酸生産株の作製を計画していましたが、*E. oligotrophicus* の遺伝子操作法を確立できなかったため、過去に作製したピルビン酸生産大腸菌株を利用して検討しました。D-アミノ酸生産株は作製できませんでしたが、D-アミノ酸代謝酵素遺伝子を破壊したピルビン酸高生産大腸菌株の作製など、開発に必要な素地は準備できました。

一方、D-アミノ酸の発酵生産に有用な細菌を単離するため、自然界より採取した環境土壌を対象に広範なスクリーニングを並行して実施し、新種を含む数種の細菌を単離・同定しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、医薬品やヘルスケア製品を中心にD-アミノ酸の需要が急速に高まっています。一方、複数種の酵素を利用した多段階反応によって合成されているため、D-アミノ酸は高価であり、高純度D-アミノ酸の量産が課題となっています。D-アミノ酸の発酵生産法の開発は、高純度D-アミノ酸の安価な供給を可能にする可能性があり、本研究により発酵生産法の開発に必要な素地を準備できました。従って、これらの研究成果は、社会的意義を有すると考えられます。

研究成果の概要(英文)： To develop a D-amino acid-producing strain, I was planning to use *Enterobacter oligotrophicus* as the starting material. However, I could not establish a genetic engineering method for *E. oligotrophicus*, I used a pyruvate-producing *Escherichia coli* strain, which had been prepared in my previous study. Although the D-amino acid-producing strain has not yet developed, I was able to prepare the groundwork necessary for the development, including the production of a pyruvate-producing *E. coli* strain with gene disruption of D-amino acid metabolizing enzyme genes.

On the other hand, to isolate bacteria useful for fermentative production of D-amino acids, screening for environmental soil samples was carried out in parallel, and bacteria including novel species were isolated and identified.

研究分野：応用微生物学

キーワード：D-アミノ酸 D-アラニン 発酵生産 新種細菌

## 1. 研究開始当初の背景

アミノ酸には不斉炭素が存在するため、D-アミノ酸と L-アミノ酸の 2 種類の鏡像異性体が存在します。L-アミノ酸は生体内で様々な役割を持つのに対し、D-アミノ酸は生物の細胞内には存在しないとされてきました。しかし、近年の分析技術の発展により、ヒトを含めた高等生物の細胞内に D-アミノ酸が微量に存在し、重要な生理機能を持つことが解明され始めています。それに伴い現在では、欧米諸国を中心に製薬や抗生剤等の医薬品、化粧品やサプリメント等のヘルスケア製品に D-アミノ酸が利用されています。またその需要は、日本を含めたアジア諸国を中心に今後さらに増大することが試算されています (図 1)。

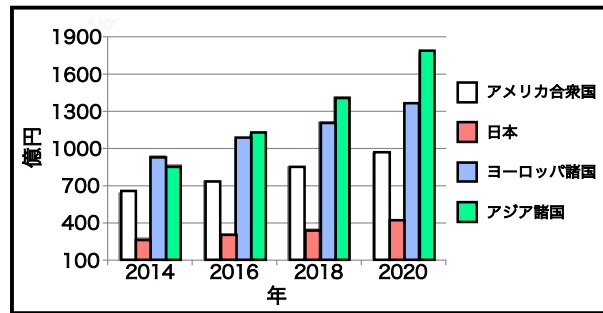


図 1 D-アミノ酸含有製品の市場規模

有用物質の供給源として、D-アミノ酸の必要性が急速に高まる一方で、最も安価な D-アミノ酸である D-アラニンが約 500 円/g で販売されているなど、D-アミノ酸は高価なため、その利用が限られています。そのため、D-アミノ酸に関連した新たな生理機能の解明や研究成果が社会実装された事例は僅かです。D-アミノ酸の主な合成法は、酵素合成法と化学合成法に大別されます。特に酵素合成法は化学合成法と比べて、合成に必要なエネルギーと副産物の生成が抑えられるため、現在までに数種の方法が工業化されています。但し、既存の酵素合成法には、後述の問題点があります：①人工物質である DL-アミノ酸前駆体の化学合成が必須、②酵素活性が低いため多量の酵素が必要、③複数の酵素を利用するため合成工程が複雑。

## 2. 研究の目的

採択者は、「高純度 D-アミノ酸の安価な供給は、D-アミノ酸に関連した研究開発を促し、新たな産業価値の創出に貢献する」と考えました。そこで、本研究では、「高純度 D-アミノ酸の安価な供給を可能にするため、D-アミノ酸生産株を作製し、D-アミノ酸の発酵生産法の基盤技術を開発する」ことを目的としました。なお、本研究では、D-アミノ酸の中でも特に産業用途に優れる D-アラニンにターゲットを絞り、D-アラニン生産株の作製を目指しました。

## 3. 研究の方法

### (1) 相同組換えによる遺伝子破壊

大腸菌 JW1179 株 (*Δdadx*)と JW4013 株 (*Δalr*)からゲノム DNA をそれぞれ抽出後、FRT 配列を含む破壊対象遺伝子 (カナマイシン耐性遺伝子)を PCR により増幅し、pTA2 にクローニングしました。次に、得られた pTA2 に含まれるカナマイシン耐性遺伝子をクロラムフェニコール耐性遺伝子に置換し、pTA2/FRT 配列+クロラムフェニコール耐性遺伝子を得ました。さらに、pTA2/FRT 配列+クロラムフェニコール耐性遺伝子を鋳型に利用して、FRT 配列+クロラムフェニコール耐性遺伝子を PCR により増幅しました。最終的には、増幅した FRT 配列+クロラムフェニコール耐性遺伝子と pKD46、pCP20 を利用した相同組換えにより、ピルビン酸高生産大腸菌株に内在する *dadx* と *alr* を破壊しました。

### (2) NAD(P)<sup>+</sup>依存性 meso-ジアミノピメリン酸脱水素酵素のスクリーニング

採択者は X 線結晶構造解析により、好熱菌 *Ureibacillus thermosphaericus* 由来の NADP<sup>+</sup>依存性 meso-ジアミノピメリン酸脱水素酵素の補酵素認識機構を解明した実績があります<sup>①</sup>。また菌体内では NADPH と NADH の両補酵素が混在するため、D-アラニンを菌体内生産する場合、両補酵素を利用できた方が生産効率は高まります。そこで、解明した補酵素認識機構に基づいて、ピルビン酸のアミノ化により D-アラニンを合成可能な NAD(P)<sup>+</sup>依存性 meso-ジアミノピメリン酸脱水素酵素をデータベース上でスクリーニングし、*Bacteroides ovatus* (アクセッション番号：EFF52303)、*Dysgonomonas mossii* (JAHALL010000019)、*Firmicutes bacterium* (NLY11302)、*Parabacteroides distasonis* (WP\_121736562)、*Phocaeicola vulgatus* (WP\_117699949)、*Prevotella bivia* (WP\_036862254)、*Syntrophomonadaceae bacterium* (NLX88724)由来の酵素を候補に選定しました。

各種酵素の人工合成遺伝子を pET100 にクローニングし、各種発現ベクターを作製しました。次に、各種発現ベクターを用いて大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換後、IPTG 不要の自動発現培地であるオーバーナイトエクスプレス中で形質転換体を培養し、meso-ジアミノピメリン酸脱水素酵素を菌体内発現させました。各種培養物から粗酵素液を調製後、SDS-PAGE により発現量を確認し、粗酵素液の D-アラニン合成活性を測定しました。

D-アラニン合成活性は、200 mM グリシン (pH 9.0)、200 mM NH<sub>4</sub>Cl (pH 9.0)、5 mM ピルビン酸、0.1 mM NAD(P)H および粗酵素を含む反応液 (1 mL)を調製し、既報の測定方法により評価しました<sup>①</sup>。

### (3) 有用細菌のスクリーニング

自然界より採取した種々の環境土壌 1g を滅菌水 10 mL で懸濁後、懸濁液を 1.5%寒天培地に塗布し、25-37°C で 3 日間平板培養しました。コロニー形成を確認後、1.5%寒天培地を用いて複数回の平板培養を繰り返し、コロニーを純化しました。

コロニー純化により得られた単離株を対象に、系統解析 (16S rRNA 遺伝子やハウスキーピング遺伝子、ゲノム DNA の相同性解析)、表現型解析 (炭素資化性や生育可能 pH・温度の解析)、化学解析 (細胞壁脂肪酸組成やキノンシステムの分析) をそれぞれ実施しました<sup>②</sup>。

## 4. 研究成果

### (1) アラニンラセマーゼ遺伝子破壊株の作製

採択者が腐葉土より単離・同定した新種細菌 *Enterobacter oligotrophicus* CCA6<sup>T</sup> は、栄養源が乏しい貧栄養条件下で優位に増殖し、栄養源が抱負な栄養条件下では大腸菌と同等の優れた増殖速度を示します<sup>③</sup>。そこで、本株を利用した D-アラニン生産株の作製を試みました。しかしながら、本株の遺伝子操作は難しく、ピルビン酸代謝関連酵素の遺伝子を破壊できませんでした。そこで、過去に作製したピルビン酸高生産大腸菌株<sup>④</sup>を本研究に利用しました。

ピルビン酸高生産大腸菌株内には、二種類のアラニンラセマーゼ遺伝子 (*alr* と *dadx*) が内在します。アラニンラセマーゼは、D-アラニンから L-アラニンへの可逆的な変換を触媒します。即ち、ピルビン酸高生産大腸菌株を用いて D-アラニンを合成した場合、アラニンラセマーゼの作用による D-アラニンの生産収率の低下が予想されます。そこで、相同組換えにより二種類のアラニンラセマーゼ遺伝子を破壊し、アラニンラセマーゼ遺伝子破壊株を新たに作製しました。

### (2) D-アラニン合成活性の評価

各種粗酵素液の D-アラニン合成活性を測定した結果、D-アラニン合成活性は 0.1 U/mg 以下になりました。D-アミノ酸の酵素合成法に産業利用されている酵素の比活性は 8.0 U/mg 以上であり、産業利用を想定した場合、今回解析した酵素の活性は不十分と判断しました。今後も酵素のスクリーニングを継続し、得られた酵素とアラニンラセマーゼ遺伝子破壊株を利用して、D-アラニン生産株を作製する予定です。

### (3) 新種細菌の単離・同定

D-アラニン生産株の作製に有用な細菌を新たに単離するため、自然界より採取した環境土壌を対象にスクリーニングを実施しました。

スクリーニングの結果、*Deinococcus kurensis* KR-1<sup>T</sup><sup>⑤</sup> や *Enterobacter oligotrophicus* CCA3<sup>⑥</sup>、*Enterobacter roggenkampii* CCI9<sup>⑦</sup>、*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* CCI2<sup>⑧</sup>、*Paenibacillus glycanilyticus* subsp. *hirosimensis* CCI5<sup>T</sup><sup>⑨</sup> を単離・同定しました。4 種類のハウスキーピング遺伝子を用いたマルチローカス遺伝子解析の結果より、*D. kurensis* KR-1<sup>T</sup> は類縁種とは明確に異なり (図 2)、最類縁種とのゲノム DNA 相同性が 96% 以下のため、*Deinococcus* 属の新種細菌として提唱し、The Microbiology Society より新種認定されました。今後、単離細菌の遺伝子操作が可能か検討する予定です。

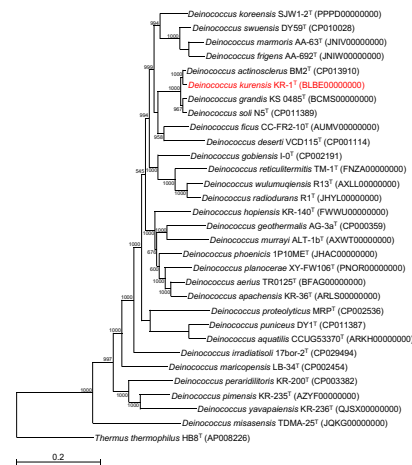


図 2 *D. kurensis* KR-1<sup>T</sup> のマルチローカス遺伝子解析解析

### <引用文献>

- ① Akita et al. (2018) Artificial thermostable D-amino acid dehydrogenase: creation and application. *Front Microbiol*, 9:1760.
- ② Akita and Kimura (2022) A simple method for the screening, isolation, and identification of novel bacteria. *J Environ Biotechnol*, 22:1-4.
- ③ Akita et al. (2019) *Enterobacter oligotrophica* sp. nov., a novel oligotroph isolated from leaf soil. *Microbiologyopen*, 8:e00843.
- ④ Akita et al. (2016) Pyruvate production using engineered *Escherichia coli*. *AMB Express*, 6:94.
- ⑤ Akita et al. (2020) *Deinococcus kurensis* sp. nov., isolated from pond water collected in Japan. *Arch Microbiol*, 202:1757-1762.
- ⑥ Akita et al. (2021) Draft genome sequence of *Enterobacter oligotrophicus* CCA3 isolated from leaf soil. *Microbiol Resour Announc*, 10:e01289-20.
- ⑦ Akita et al. (2021) Isolation, draft genome sequencing and identification of *Enterobacter roggenkampii* CCI9. *J Genomics*, 9:1-5.
- ⑧ Akita et al. (2021) Draft genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* CCI2 isolated from leaf soil. *Microbiol Resour Announc*, 10:e0034321.
- ⑨ Akita et al. (2021) *Paenibacillus glycanilyticus* subsp. *hirosimensis* subsp. nov., isolated from leaf soil collected in Japan. *Arch Microbiol*, 203:1787-1793.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Akita Hironaga, Itoiri Yuya, Takeda Noriyo, Matsushika Akinori, Kimura Zen-ichiro	4. 巻 203
2. 論文標題 Paenibacillus glycanilyticus subsp. hirosimensis subsp. nov., isolated from leaf soil collected in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Microbiology	6. 最初と最後の頁 1787 ~ 1793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00203-020-02166-6	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 -
1. 著者名 Akita Hironaga, Itoiri Yuya, Takeda Noriyo, Kimura Zen-ichiro, Inoue Hiroyuki, Matsushika Akinori	4. 巻 10
2. 論文標題 Draft Genome Sequence of Enterobacter oligotrophicus CCA3, Isolated from Leaf Soil	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01289-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.01289-20	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 -
1. 著者名 Akita Hironaga, Itoiri Yuya, Ihara Sota, Takeda Noriyo, Matsushika Akinori, Kimura Zen-ichiro	4. 巻 202
2. 論文標題 Deinococcus kurensis sp. nov., isolated from pond water collected in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Microbiology	6. 最初と最後の頁 1757 ~ 1762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00203-020-01845-8	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 -
1. 著者名 Akita Hironaga, Itoiri Yuya, Takeda Noriyo, Kimura Zen-ichiro, Inoue Hiroyuki, Matsushika Akinori	4. 巻 9
2. 論文標題 Isolation, draft genome sequencing and identification of Enterobacter roggenkampii CC19	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Genomics	6. 最初と最後の頁 1 ~ 5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/jgen.46294	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 -

1. 著者名 Akita Hironaga, Itoiri Yuya, Takeda Noriyo, Kimura Zen-ichiro, Inoue Hiroyuki, Matsushika Akinori	4. 巻 10
2. 論文標題 Draft Genome Sequence of <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> CCI2, Isolated from Leaf Soil	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e0034321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00343-21	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 -

1. 著者名 Akita Hironaga, Kimura Zen-ichiro	4. 巻 22
2. 論文標題 A simple method for the screening, isolation, and identification of novel bacteria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Environmental Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1~4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.50963/jenvbio.22.1_1	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 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
---------------------------	-----------------------	----

#### 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
---------	---------