

機関番号：14501

研究種目：基盤研究B

研究期間：2008～2010

課題番号：20360375

研究課題名（和文） 非天然型膜構造を持つ有機溶媒耐性型の新規菌体触媒の開発

研究課題名（英文） Whole-cell biocatalyst with non-natural membrane structure

研究代表者

近藤 昭彦 (KONDO AKIHIKO)

神戸大学・工学研究科・教授

研究者番号：40205547

研究成果の概要（和文）：

本研究では、微生物の細胞表層に非天然分子を導入する新しい技術を開発し、菌体表層に有機溶媒耐性などの様々な機能を付与することを目指す。ビオチン-ストレプトアビジン相互作用を利用して、酵母の細胞表層に非タンパク質性の機能性分子を導入する技術の開発に成功した。また、非天然分子を修飾可能な酵素を探索し、細胞表層改変できる可能性を示した。今後、これら非天然分子を導入した新規菌体触媒の機能評価を行っていく。

研究成果の概要（英文）：

Introduction of non-natural, functional molecules on the cell surface was developed for establishment of several stress, such as organic medium containing broth. Using biotin-streptavidin interaction, non-natural molecules were successfully incorporated onto yeast cell surface. In addition, novel enzymes, which can conjugate some functional molecules on the cell surfaces, were explored. The evaluation of cell surface modified microorganisms' functions are undergoing such as stress tolerance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：生物化学工学

科研費の分科・細目：生物機能・バイオプロセス

キーワード：タンパク質、酵素、非天然分子、酵母、細胞表層提示

## 1. 研究開始当初の背景

化石資源の枯渇や環境問題の解決に向け、地球上に豊富に存在し再生可能なバイオマス資源の効率的な利用が求められている。このバイオマスからのエネルギーや様々な基幹化合物を低コスト・低環境負荷型プロセスで生産する技術の開発が世界的規模で急務

である。

バイオマスからエタノールや乳酸などを作るには、酵母や乳酸菌などの微生物による発酵技術が用いられる。しかしこれらの微生物は高分子化合物であるバイオマスをそのまま栄養源として利用できないためバイオマスをその構成成分であるグルコースやキ

シロースなどの単糖にまで熱や酸で分解する糖化工程が必要であり、バイオマス利用の高コスト化の原因となっている。これに対して細胞表面提示技術を用いる事で、これまでに発酵能とバイオマス分解能を併せ持った高機能性微生物を創製してきた。この技術を用いて糖化行程を大幅に簡略化し、エタノール生産量を維持したまま生産コストの大幅な削減に成功してきた。

一方で、これらの有用微生物は発酵過程でつくる生産物によって微生物自身がダメージを受け徐々に死滅する。酵母は発酵産物のエタノールの毒性のため、一度の発酵で生産できるエタノール濃度は最大でも15%ほどである。よって微生物に有機溶媒耐性を付与できれば、一度の発酵で高濃度のエタノールを作ることが可能になり大幅な生産コストダウンが期待できる。しかしながらこのような有機溶媒耐性を向上させる試みはこれまでほとんど行われていない。

また当研究グループでは「Whole cell biocatalyst」という菌体をそのまま触媒として用いた独自の高性能生体触媒を創製してきた。この高性能生体触媒を用いてバイオマス資源からの高収率かつ環境に優しいバイオディーゼル燃料の生産プロセス、及び医薬中間体や機能性食品など高付加価値のファインケミカルの低コスト生産プロセスの開発も推進している。これらはいずれも有機溶媒中の反応であるため、この Whole cell biocatalyst に有機溶媒耐性を付与できれば、大幅に収率を向上できると期待される。

そこで本研究では、微生物の表面に非天然分子を導入する技術を開発し、それを用いて Whole cell biocatalyst へ有機溶媒耐性を付与してより生産性の高いバイオプロダクションプロセスの構築、及び酵母のエタノール耐性を向上させたバイオマスからの高収率なエタノール生産プロセスの構築を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究では、微生物の表面に機能性分子を導入する技術を開発し、その技術を用いて有機溶媒耐性などの新たな機能を付与した微生物を創製して安定かつ高効率のバイオプロダクションプロセスの構築を目指した。微生物表面に非天然分子を導入し、既往の遺伝子工学的手法のみでは困難であった有機溶媒耐性などをその微生物に付与する。この安定化された機能性微生物を用いてバイオディーゼル及び、ファインケミカルなどの高付加価値を持つ有用物質の低コスト・高収率なバイオプロダクションプロセスの構築を目指した。

タンパク質をポリエチレングリコールなどのポリマーで修飾すると、そのタンパク質

の有機溶媒耐性や熱安定性が向上することが数多く報告されている。そこでこの概念を新たに微生物に適用し、細胞表面を機能性ポリマーなどの非天然分子で修飾してその微生物に有機溶媒耐性を付与する技術を開発する。

## 3. 研究の方法

微生物の表面に非天然分子を導入する手法として、ビオチン-ストレプトアビジン相互作用を用いた。大腸菌 *Escherichia coli* 由来のビオチンリガーゼ BirA をコードする遺伝子、及び酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来のビオチンリガーゼ yBL をコードする遺伝子を pGK404 ベクターの pGK プロモーターの下流に挿入し、それらを菌体内発現させるインテグレーション型プラスミド pGK404-BirA、pGK404-yBL を構築した。また、大腸菌 *Escherichia coli* 由来のアクセプターペプチド BAP をコードする遺伝子、及び酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来のアクセプターペプチド yAP をコードする遺伝子を、酵母表面提示ベクター-pFGK426 のアンカータンパク質 FL0428 をコードする遺伝子の上流へ挿入し、それらを表面提示させるマルチコピー型プラスミド pFGK426-BAP、pFGK426-yAP を構築した。

構築したプラスミドを酵母 *Saccharomyces cerevisiae* YPH499 株に酢酸リチウム法を用いて導入し、形質転換を行った。形質転換は pGK404-BirA、pFGK426-BAP のプラスミドをそれぞれ単独で導入したもの、pGK404-BirA と pFGK426-BAP の2つのプラスミドを導入したもの、および pGK404-yBL と pFGK426-yAP の2つのプラスミドを導入したもので行い、計4種類の形質転換体を取得した。

培養して回収した酵母菌体が目的タンパク質 BirA、yBL、BAP-Fl0428、yAP-Fl0428 を発現しているか、及び発現した BAP-Fl0428、yAP-Fl0428 がビオチン化しているかどうかを調べるためにウェスタンブロット解析を行った。新たな表面提示システムのモデル実験として、ビオチン提示酵母を用いて非天然分子を固定化できるかを調べた。以下に示す手順で、ビオチン提示酵母に streptavidin を添加し結合させ、その後 biotin-FITC を結合させたものを蛍光顕微鏡で観察した。

## 4. 研究成果

本研究ではその目的を達成するためにビオチンとストレプトアビジンの強い相互作用に注目し、ビオチンを細胞表面に提示させた酵母の作製を目指した。ビオチンはビタミン B 群に分類される水溶性の有機分子で、ストレプトアビジンは、熱・pH・変性剤等に対

して非常に高い安定性を持つ4量体タンパク質であり、これらを酵母と目的分子とをつなぐリンカーとして用いるためである。ビオチン提示酵母にストレプトアビジンを結合させ、そのストレプトアビジンにビオチン化した目的分子を結合させることで、結果として目的分子を細胞表層に提示させることが可能な、新たな細胞表層提示システムを開発できると考えられる。このシステムでは、酵素やその他の有用タンパク質等の天然分子に限らず、金属触媒などの非天然分子でさえも表層提示が可能である。

ビオチン提示酵母を作製するために、本研究では大腸菌 *Escherichia coli* 由来、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来の2種類のビオチンリガーゼ (BirA, yBL) を用いた。それらのビオチンリガーゼは15アミノ酸からなるアクセプターペプチド (BAP, yAP) を認識し、その中のリジン側鎖をビオチン化する酵素である。アクセプターペプチドをアンカータンパク質と融合させて酵母の細胞表層に提示させ、さらにビオチンリガーゼを菌体内で発現させることで、アクセプターペプチドがビオチン化した形で酵母に表層提示できるか検討を行った。これはアクセプターペプチドが酵母の生体内で生合成されてから、分泌シグナルの働きで細胞外へ移動するまでの間に、ビオチンリガーゼが生体内に存在するビオチンを用いてアクセプターペプチドをビオチン化させることを狙って設計している。

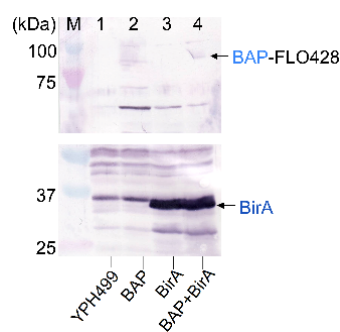
現在までに BAP, yAP を HeLa 細胞の表層に発現させ、BirA, yBL によってビオチン化させた例が報告されているが、酵母の細胞表層に提示させた例は報告されていない。また、この場合ビオチンリガーゼ BirA, yBL は同一細胞内で生産したものではなく、後から添加して反応させている。本研究では、BAP, yAP を酵母の細胞表層に提示させ、さらに BirA, yBL を同一菌体内で共発現させることで菌体内でビオチン化が起り、培養のみによってビオチン提示酵母を作製できると考えられる。

酵母由来のビオチンリガーゼ yBL とそのアクセプターペプチド yAP の発現を確認するためにウエスタンブロット解析を行った。yAP-FL0428 融合タンパクを標的とした抗体 (一次抗体: mouse anti-FLAG、二次抗体: anti-mouse IgG AP) を用いて検出したウエスタンブロット解析を行った。90kDa 付近にバンドが検出されたことから yAP-FL0428 融合タンパクの発現が確認された。次に、ビオチンリガーゼ yBL を標的とした抗体 (一次抗体: rabbit anti-myc、二次抗体: anti-rabbit IgG AP) を用いてウエスタンブロット解析を行った。75 kDa 付近にバンドが検出されたことから yBL の発現が確認された。これらの2

つの結果から、yBL と yAP は同一の菌体内に共発現していることが示された。

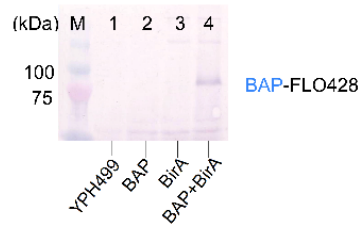
次に、共発現した酵母の yAP がビオチン化しているかを調べるために、streptavidin-AP を用いて検出した。yAP-FL0428 融合タンパク質が検出されるはずの 90 kDa 付近にバンドが確認できなかったことから、yAP のビオチン化は確認できなかった。これは、yBL の酵素活性が BirA と比べて約 90 倍も低いと報告されていることから、yBL が十分機能しなかったためビオチン化が起らなかったと考えられる。

そこで、大腸菌由来のビオチンリガーゼ BirA とそのアクセプターペプチド BAP の発現確認のためにウエスタンブロット解析を行った。BAP-FL0428 融合タンパク及び、BirA を標的とした抗体 (一次抗体: mouse anti-FLAG、二次抗体: anti-mouse IgG AP) を用いて検出したウエスタンブロット解析結果を下図に示す。



左から順に Lane M がマーカー、Lane 1 がネガティブコントロールとなる YPH499、Lane 2 が BAP、Lane 3 が BirA、Lane 4 が BAP と BirA を共発現させた酵母のタンパク抽出画分を流した。90kDa 付近と 37kDa 付近にバンドが検出されたことから、BAP-FL0428 融合タンパク、BirA それぞれの短独発現、および共発現が確認された。

次に、共発現した酵母の BAP がビオチン化しているかを調べるために、streptavidin-AP を用いて検出したウエスタンブロット解析結果を下図に示す。



BirA と BAP を共発現させた酵母の Lane でのみ 90kDa 付近にバンドが確認されたことから、発現させた BirA が機能して BirA がビオチン化したことが示された。

次に、蛍光顕微鏡観察によるビオチン表層提

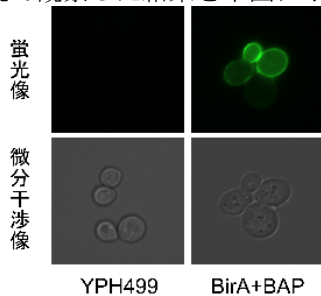
示の確認を行った。

#### yBL・yAP

yBL・yAP 共発現酵母の細胞表層にビオチンが提示されているかを確認するために蛍光顕微鏡観察を行った。yAP と yBL を共発現させた酵母、および control となる酵母に、streptavidin-FITC を加えたものを蛍光顕微鏡で観察した。ビオチンが表層提示されていた場合、ストレプトアビジンがそのビオチンと結合するため、酵母の細胞表層に蛍光が確認されるはずだが、この結果からは蛍光は確認できず、ビオチンは表層提示していないことが示された。

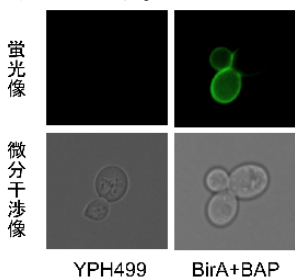
#### BirA・BAP

BirA・BAP 共発現酵母の細胞表層にビオチンが提示されているかを確認するために蛍光顕微鏡観察を行った。BAP と BirA を共発現させた酵母、および control となる酵母に、streptavidin-FITC を加えたものを蛍光顕微鏡で観察した結果を下図に示す。



BirA と BAP を共発現させた酵母の細胞表層に蛍光が見られることから、ビオチンが表層提示されたことが確認できた。このことから、ビオチン提示酵母の作製に成功したといえる。

更に新たな表層提示システムのモデル実験として、作製したビオチン提示酵母を用いて非天然分子を固定化できるかを調べた。まず、ビオチン提示酵母に streptavidin を添加し結合させ、その後 biotin-FITC を加え結合させたものを蛍光顕微鏡で観察した結果を下図に示す。



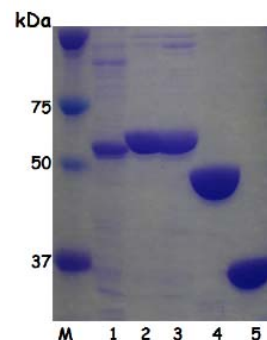
FITC は非天然分子なので、蛍光が酵母の細胞表層に確認できれば、非天然分子を固定化できたといえる。BAP と BirA を共発現させた酵

母の表層に蛍光が確認されたことから、ビオチン提示酵母にストレプトアビジン、ビオチンが段階的に結合し、その結果、非天然分子を酵母の細胞表層に提示することに成功した。

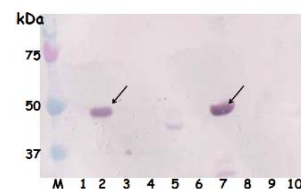
#### 非天然分子の修飾が可能な新規酵素の探索

酵素は様々な反応を触媒するため、非天然分子を細胞表層に導入可能な反応を触媒できる酵素の探索を試みた。中でも Sortase は、様々なグラム陽性菌に存在していることが知られており、ゲノムから予測された配列が Sortase Database としてまとめられている。Sortase Database を参考に以下のようにそれぞれの菌由来の Sortase の DNA をクローニングし、目的タンパク質を発現精製した。モデル分子として第1級アミンを持つ小分子ビオチンを用い、タンパク質へ非天然分子を導入可能かどうか検討した。

約30種類以上もの遺伝子をクローニングして発現精製したところ、そのうち4種類の Sortase の発現精製に成功した(下図)。



これら新規 Sortase を用い、非天然分子を修飾可能かどうか検討を行った。下図に示すように、ある特定のアミノ酸配列に対してアミンを含む小分子を特異的に連結できることが示された。これにより、非天然分子を修飾可能な新しい酵素を見出す事に成功した。現在、これらを用いた細胞表層への非天然分子導入について、検討を行っている。



以上より、本研究では酵母表層に非天然分子を導入する技術の開発に成功した。これまで遺伝子にコードされた分子しか細胞表層に提示できなかったが、本研究では様々な機能を持つ分子を酵母表層に提示できることが示された。今後、この技術を応用して細胞表

層に新規機能性分子を導入し、微生物の高機能化を進めていく。

## 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 Tanaka, T., Masunari, S., Ishii, J., Wakamura, K., Segawa, M., Fukuda, H., Kondo, A.

Displaying non-natural, functional molecules on yeast surfaces via biotin-streptavidin interaction.

Journal of Biotechnology, 145, 79-83, 2010

[学会発表] (計3件)

① 松本拓也・田中勉・近藤昭彦

Sortaseを用いた streptavidin の新規修飾技術の開発

生物工学会 6 2 回大会

2010. 10. 27-29

宮崎シーガイアワールドコンベンションセンターサミット

② 山田亮祐・田中勉・荻野千秋・近藤昭彦

セルラーゼ発現最適化バランス酵母を用いたセルロースからのエタノール発酵

生物工学会 6 2 回大会

2010. 10. 27-29

宮崎シーガイアワールドコンベンションセンターサミット

③ 山川瞬一・山田亮祐・田中勉・荻野千秋・近藤昭彦

長期エタノール発酵に向けたアミラーゼ表層提示発現酵母株の創製

化学工学会 第76年会 2011. 3. 22-24

東京農工大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

近藤 昭彦 (KONDO AKIHIKO)

神戸大学・工学研究科・教授

研究者番号：40205547

### (2) 研究分担者

田中 勉 (TANAKA TSUTOMU)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環重点研究部・助教

研究者番号：90436551

### (3) 連携研究者