

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05789

研究課題名（和文）酵素タンパク質に驚異的な耐性を与える細菌膜小胞を用いた産廃トリ羽毛分解への挑戦

研究課題名（英文）Challenge for degradation of chicken feathers by a thermophilic bacterium
Meiothermus ruber H328

研究代表者

渡部 邦彦（Watanabe, Kunihiko）

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：90184001

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：有馬温泉土壌から単離された好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328株を用いて、トリ羽毛分解の向上を試みた。まず、同菌株が産生する膜小胞の量を増加させるため、degP遺伝子の破壊を行い約3倍程度の膜小胞量の増加を示すことに成功した。次に、膜小胞の細胞表層に多量に存在するS-layerタンパク質（SlpA）を足場に、膜小胞上での同在が確認できていない、しかしケラチン分解に関与するprotein oxidoreductase（Pdo7）を融合させた株（SP株）を作成し、膜小胞表面への提示を試み成功している。加えて、羽毛分解物のバイオポリマーとしての有用性も確認している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好熱性細菌によるトリ羽毛分解はこれまでに例がなく、H328株が産業廃棄物であるトリ羽毛を有効に分解できるツールであることを示すことができたことは、社会的意義を証明することができたと考えている。さらに、細菌では想像していなかった膜小胞という新規な放出現象を、このトリ羽毛分解を通じて確認することができ十分な検証を施しており、学術的意義についても大変高い研究であったと考えている。さらに、異なる分野の研究者と、バイオポリマーとしての道を開いたことは、今後のトリ羽毛分解物の有用性の確認に繋がり、今後の更なる研究の発展に道をつける研究であったと考えている。

研究成果の概要（英文）：This study dealt with degradation of chicken feathers by a thermophilic bacterium *Meiothermus ruber* H328 strain. The mutant of H328 strain deleting degP gene was constructed to improve the producing ability of membrane vesicles. As a result, its producing ability was recognized by use of fluorescent dyes and the sizes of the membrane vesicles showed the smaller size than the regular one by the electron microscopy analysis. Furthermore, the change of membrane vesicles in quality was tried by use of S-layer protein (SlpA) as a scaffold protein and protein oxidoreductase (Pdo7) as a surface displayed protein, respectively. Finally, the improvements by the change in quality was attained and the effect of membrane vesicles on feather degradation was confirmed. In other experiments, degradation of chicken feathers would contribute to the improve in application as biopolymer. The degradation of chicken feathers by the strain H328 would provide various possibility for application.

研究分野：応用微生物学

キーワード：トリ羽毛分解 好熱性細菌 プロテアーゼ 膜小胞 タンパク質酸化還元酵素 バイオポリマー

研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

宗教的制約がないことからトリ肉は他の家畜の肉以上に世界中で大量に消費されている。そのため養鶏業などから排出される世界的なトリ羽毛は莫大な量に達し、国内だけでも年間 1 万トンを超える。しかし有効な転用先もないことから、処理が厄介な産業廃棄物となりほとんどが焼却処分されている。トリ羽毛は、強固なタンパク質であるケラチン分子から構成され、システイン残基修飾を中心に複雑な分子架橋が集積するため、酵素等でも分解しにくい難分解性の動物タンパク質であり、プロテアーゼとシステイン架橋を開裂する酵素系を有する微生物が効率的な分解を担うとされているが、報告される微生物でもその基礎的構造の検討や応用は不十分なままである。

本研究代表者は、このトリ羽毛ケラチンを強力に分解する好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 を、神戸・有馬温泉から単離し[Matsui *et al. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009]、複雑な超巨大分子複合体構造をとるケラチン分解性プロテアーゼを見だし研究を開始した。それまで自然界に潜む微生物機能を用いてケラチンを含む産業廃棄物である難分解性動物タンパク質を分解・再生利用に導く研究を展開してきた [渡部邦彦、化学と生物 2010]。この研究過程でスクリーニングされた微生物が持つ特徴的なプロテアーゼに焦点を絞り [Miyake *et al. J. Bacteriol.* 2006, Kawasaki *et al. J. Biol. Chem.* 2010, Sakamoto *et al. J. Biochem.* 2013 等]、難分解性動物タンパク質の分解に関する機能解明を行って来た。とりわけトリ羽毛ケラチン分解については、ケラチン分解性プロテアーゼ (MrH_0874) だけでなく、システイン架橋の開裂を促進するタンパク質ジスルフィドオキシドレダクターゼ (Pdo7, MrH_1589) の増強も H328 株のゲノム情報 [Inada *et al. Genome Announce.* 2013] を用いて行っている [武田 *et al. 日本農芸化学会大会 2019 年*]。加えて、H328 株は細胞表層から膜小胞 (membrane vesicle) を出芽様に放出し、これにケラチン分解性酵素群が含まれることを免疫電子顕微鏡解析などから突きとめている [Yamaoka *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2014]。特筆すべきことに、60 という高温で常識を越える高濃度の SDS (30%) やアセトンやブタノールなどの有機溶媒 (40%) を含む変性剤共存下でも、48 時間以上変性・失活することなくケラチンなどを強力に分解し、この変性剤大勢の特性が膜小胞により付与されることも見出した [Kataoka *et al. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014]。この驚異的な変性剤耐性を与える細菌膜小胞を応用し、トリ羽毛分解に確実に貢献するケラチン分解性プロテアーゼやタンパク質ジスルフィドオキシドレダクターゼなどを膜小胞に搭載し、膜小胞の量的および質的改良を加え、これまでに例のない産業廃棄物トリ羽毛分解処理の実例を示したいという考えから、本研究を計画した。

2. 研究の目的

産業廃棄物として大量に排出されるトリ羽毛が効率的に分解できないことが問題点であり、この問題解決に対処する。そのため、申請者が発見・単離した好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株を用い、トリ羽毛分解に確実に貢献する 2 つの酵素タンパク質 (ケラチン分解性プロテアーゼとタンパク質ジスルフィドオキシドレダクターゼ) にターゲットを絞り膜小胞への搭載を目指す。この驚異的な変性剤耐性を与える細菌膜小胞を応用し、H328 株が産生する膜小胞の量的および質的改良を加え、これまでに例のない産業廃棄物トリ羽毛分解処理の実例を示すことを目的にする。これにより、トリ羽毛構造の詳細な解明を可能にし、分解物のバイオプラスチックとしての価値を示すことで産廃トリ羽毛の処理の道筋を示すことがさらなる目的である。

3. 研究の方法

トリ羽毛の分解に使用する細菌は、好熱性細菌 *M. ruber* H328 株およびその遺伝子組換え株を用いた。H328 株の培養は YS 培地 (0.5% yeast extract, 0.5% sucrose)、55 あるいは 60 で 2, 4, 6 日間行い、その培養上清をサンプルとした。多段階の遠心後、濾過 (孔サイズ 0.45 μm) を行うことで細胞を分離し、超遠心 (110,000 $\times g$, 2h) を経て膜小胞画分を得た。H328 株が産生する膜小胞の量的改良については、膜小胞の定量を行い、膜小胞画分に対し、膜脂質染色用蛍光色素の増加する蛍光強度を測定することで行った。別途、膜小胞画分の TEM 観察、SDS-PAGE、特徴的なバンドの MALDI-TOF-MS/MS 解析 (AXIMA-Performance) を行った。H328 株変異株構築は、H328 株ゲノムに対する相同組換えにより行った。選択マーカーとして、*degP* 株は耐熱化カナマイシン耐性遺伝子 *htk* を、質的改良を行なった研究において膜小胞に多量に存在する細胞表層タンパク質 S-layer protein (SlpA) (MrH_2961) と目的タンパク質 protein

disulfide oxidoreductase 7 (Pdo7) (Mrh_1589)を遺伝子レベルで融合した SP 株は、耐熱化ハイグロマイシン耐性遺伝子 *hph5* を用いた。SP 株に対しては、融合タンパク質 Pdo7 抗体を用いた Western blotting 解析、ケラチンを基質に用いた S-S 結合還元活性測定を調べた。

4. 研究成果

(1) 量的改良: H328 株の *degP* 遺伝子破壊による膜小胞生産産生能向上。ペリプラズム局在のシャペロン/プロテアーゼ DegP を欠損させ (*degP* 株)、この *degP* 株に対し、膜小胞産生能および産生される膜小胞について検討した。野生型 (WT) 株が培養温度 55-60°C で至適生育と羽毛分解を示すのに対し、*degP* 株の 60°C 培養では、顕著な熱感受性を示した。膜小胞の定量は、WT 株では培養温度 55-60°C の変化に対し蛍光強度の変化はほとんど見られず、熱ストレス条件下である 60°C で培養した *degP* 株は、培養 6 日目で WT 株の約 3-4 倍の蛍光強度が得られた。次に 60°C 培養膜小胞サンプルの TEM 観察を行い、WT 株、*degP* 株の粒子サイズを確認し、*degP* 株が 100 nm 以下の小さな粒子サイズを示すことを見出した。*degP* 遺伝子の欠失が、膜小胞生産産生能向上に繋がることを示した。この内容は、すでに文献にして発表しており、以下のアドレスで照会して貰いたい (<https://doi.org/10.1186/s13568-021-01328-z>)

(2) 質的改良: protein disulfide oxidoreductase である Pdo7 タンパク質の、膜小胞に大量に存在する表層タンパク質 S-layer protein (SlpA) (MrH_2961)をその足場タンパク質として用いた融合させた株 (SP 株)の作成に有効な protein disulfide oxidoreductase (Pdo7)を、これまで同株で確認されて来た膜小胞への提示を中心に行なった。この目的を達成するために、膜小胞の細胞表層に多量に存在する S-layer protein (SlpA)(MrH_2961) を足場に、ケラチン分解に関与するが、膜小胞上での局在が確認できていない protein oxidoreductase (Pdo7)(MrH_1589)を融合させた株 (SP 株) を作成し、膜小胞表面への提示を試みた。細胞表層タンパク質である SlpA を足場タンパク質として Pdo7 を融合させた SlpA-Pdo7 融合株 (SP 株) を相同組換えにより作成した。作成した SP 株は 55°C、60°C での培養において、どちらも WT 株と同様に問題なく増殖した。次に膜小胞画分に対する SDS-PAGE において、WT 株と SP 株の SlpA バンドを比較すると、SP 株において SlpA のバンドが Pdo7 の分子量(25 kDa)分、高分子側にシフトしていることが判った。膜小胞画分を Pdo7 抗体を用いた Western blotting 解析に供した結果、SP 株で SlpA と融合した位置での Pdo7 の存在を確認した。これらの結果から、作成した SP 株において、SlpA に Pdo7 が融合されていることが判った。H328 株のトリ羽毛を含む培地での培養における回転数を、180 rpm から 190 rpm に上げると、酵素タンパク質の表面提示による膜小胞の質的改良を達成することができた。

(3) トリ羽毛分解物のバイオポリマーとしての有効性確認。

ジスルフィド結合を消失させる好熱性細菌 *M. ruber* H328 株が生産する酵素を用いて地鶏羽毛を処理し、その羽毛粉末を熱プレス成形して樹脂化を行なったところ、粉末化の過程でトリ羽毛は非晶化し、樹脂化過程では シートの再積層が酵素処理した場合、強く阻害されることが分かった。トリ羽毛に含まれるジスルフィド結合は、羽毛ケラチンの高次構造の形成に影響している可能性が示唆された。一方、かさ高い木質繊維を羽毛樹脂の強化繊維として利用することで、5 wt%未満の低充填度であっても、木質繊維間の水素結合の形成によるインターロック効果により、羽毛樹脂の力学特性の改善や軟化温度が高められることが判った。この内容は、すでに文献にして発表しており、以下のアドレスで照会して貰いたい (<https://doi.org/10.2115/fiberst.2022-0013>)

(4) その他の結果

トリ羽毛分解とは直接的な関係性は少ないが、低温耐性細菌 *Exiguobacterium undae* Su-1 株が生産する細胞外メタロプロテアーゼ EuPrt の Ca²⁺依存的な遺伝子発現に関する研究を行っている。Su-1 株の最少培地を作製し、Ca²⁺添加による *euPrt* 遺伝子転写量の変化を定量リアルタイム PCR 解析 (rt-qPCR) により評価した。また細胞外 Ca²⁺添加による細胞内 Ca²⁺濃度の変化を高周波誘導結合プラズマ発光分光分析 (ICP-AES) により評価し、*euPrt* 遺伝子転写量の増加との関係性を調査した。これらの研究については、すでに文献にして発表しており、以下のアドレスで照会して貰いたい (<https://doi.org/10.1093/bbb/zbac109>)

また、古来から行われている実際の清酒製造、山廃仕込み法において、清酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と共存する乳酸菌類を 4 株単離し、これらの影響について検討を加えた内容を発表している。これも以下のアドレスで照会して貰いたい (<https://doi.org/10.1002/fsn3.3280>)

これら2つの研究は、新種の細菌の単離と定量リアルタイム PCR 解析 (rt-qPCR) による評価という2つにおいて、将来的に応用する可能性の高い技術である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yuki Asano, Manato Onishi, Kaito Nishi, Kazunori Kawasak, Kunihiro Watanabe.	4. 巻 11
2. 論文標題 Enhancement of membrane vesicle production by disrupting degP gene in <i>Meiothermus ruber</i> H328	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 AMB Express	6. 最初と最後の頁 170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13568-021-01328-z	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 該当する
1. 著者名 85.河原 豊・栗原 夏実・大野 岳輝・渡部 邦彦・田中 俊一・山本 真揮・脇坂 博之	4. 巻 78
2. 論文標題 羽毛の酵素処理及び木質繊維の軽度の補強による羽毛樹脂の物性変化	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Fiber Science and Technology	6. 最初と最後の頁 114-120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2115/fiberst.2022-0013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kiyooki Arakawa, Junta Yanai, and Kunihiro Watanabe	4. 巻 86
2. 論文標題 Study of the Ca ²⁺ -dependent gene expression of EuPrt, an extracellular metalloprotease produced by the psychro-tolerant bacterium <i>Exiguobacterium undae</i> Su-1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience Biotechnology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1308-1317
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hisashi Fujiwara, Kunihiro Watanabe, and Yoshinori Wakai	4. 巻 -
2. 論文標題 Combination of four bacterial strains isolated from Yamahai-shubo in traditional Japanese sake brewing	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Food Science & Nutrition	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/fsn3.3280	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6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高岡 菜都美、渡部 邦彦
2. 発表標題 好熱性細菌 <i>Meiothermus ruber</i> H328 株におけるセラ チン分解性プロテアーゼ (MrH_0874) のリクルート解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kunihiko Watanabe
2. 発表標題 Enhancement of Membrane Vesicle Production by Disrupting the degP Gene in <i>Meiothermus ruber</i> H328
3. 学会等名 EMBO WS Bacterial Membrane Vesicles (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅野優希, 大西愛航, 川崎一則, 渡部邦彦
2. 発表標題 degP 遺伝子破壊による <i>Meiothermus ruber</i> H328 株 の膜小胞産生能強化に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020年大会 福岡大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡部邦彦
2. 発表標題 膜小胞の量的コントロールに関する研究 - シャペロン遺伝子破壊による膜小胞産生能向上の検討
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020年大会 福岡大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡部邦彦
2. 発表標題 細菌が放出する膜小胞に関する研究 - シャペロン遺伝子破壊による 膜小胞産生能向上の検討 -
3. 学会等名 日本農芸化学会 関西支部 web講演会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡部邦彦
2. 発表標題 膜小胞応用のための量的コントロールおよび表面提示・改良に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔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
研究 分 担 者	増村 威宏 (Masumura Takehiro) (50254321)	京都府立大学・生命環境科学研究科・教授 (24302)	

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
---------	---------