

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04792

研究課題名（和文）有用物質の効率的変換を指向したシンプル酵素触媒の構築

研究課題名（英文）Construction of simple biocatalyst for efficient bioconversion

研究代表者

田島 誉久 (Tajima, Takahisa)

広島大学・統合生命科学研究科（先）・准教授

研究者番号：80571116

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではシンプル酵素触媒を用いた有用物質変換触媒の構築と持続的に変換するための反応場の解析を行った。

有用物質変換触媒の構築では、フェルラ酸をバニリンに変換するシンプル酵素触媒を構築した。2段階酵素反応で低活性の酵素発現を向上させる手法、ツールの構築に取り組んだ。反応場の解析では、熱処理によるシンプル酵素触媒における反応場（細胞）への影響を検証した。シンプル酵素触媒では宿主の代謝活性の抑制と基質の膜透過性向上を目的として中温で熱処理を行うが、その影響が懸念される。蛍光タンパク質による評価系を構築し、蛍光強度による反応場からのタンパク質漏出の定量的評価を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はバイオによる有用化学品の効率的な生産技術に関わるシンプル酵素触媒の構築を目的としたものである。変換酵素を抽出・精製せずに用いることが可能な本触媒は手間やコストをかけずに効率的な酵素変換を実現できるものとして期待される。本研究により持続的に変換するための触媒構築や熱処理方法を見出され、本触媒の工業的利用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we constructed a simple biocatalyst for conversion of valuable chemical and analyzed the reaction field for sustained conversion.

In the construction of the biocatalyst, a simple biocatalyst for conversion of ferulic acid to vanillin was constructed, and a method and tool for improving the expression of low activity enzymes in a two-step enzymatic reaction were developed. In the reaction field analysis, we studied the effect of heat treatment on the reaction field (cells) in the simple biocatalyst. Heat treatment is performed at a moderate temperature to suppress the metabolic activity of the host and improve the membrane permeability of the substrate, but there are concerns about the effects of heat treatment. An evaluation system using fluorescent proteins was constructed, and quantitative evaluation of protein leakage from the reaction field by fluorescence intensity was performed.

研究分野：生物学

キーワード：酵素触媒 低温菌 熱処理

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

低温菌シンプル酵素触媒とは有用物質に変換する中温性酵素を低温菌に発現させて中温で熱処理と変換反応を行うことで、30°C以下でしか機能しない宿主(低温菌)代謝酵素の活性を抑制し、発現させた中温性酵素で変換するものである。つまり、変換酵素を宿主の代謝酵素から温度による切り分けを行うことで、変換酵素の機能を最大限に利用することを期待した酵素触媒である。また、熱処理には、宿主の代謝酵素の失活に加えて細胞内に発現させた酵素が添加した基質にアクセスしやすくなるという膜透過性の向上も期待される。したがって、本シンプル酵素触媒は変換酵素を細胞から抽出・精製することなく熱処理だけで反応効率を高めて、変換反応に利用できると考えられる。これまでに本酵素触媒の有効性を証明し、有用化学品を高収率で生成できることを示してきた。その一方で、さまざまな酵素発現に対応できるように活性の低い変換酵素の発現量を向上させることが求められる。また、熱処理した細胞から変換酵素が漏出することで反応を触媒を繰り返して利用できないという課題が生じた。変換酵素の漏出により低温菌シンプル酵素触媒の反応効率の低下や持続的利用が困難になることなどが懸念され、これらの課題を解決する必要がある。また、本研究で使用した低温性 *Shewanella* 属細菌における研究では培養時に細胞表面から菌体外膜小胞を生産することが確認され、膜小胞が細胞質内の変換酵素を内包する可能性や膜小胞が遊離する際に生じる間隙から変換酵素が反応液中に漏出する可能性がある。低温性 *Shewanella* 属細菌のようなグラム陰性細菌は熱処理等のストレスによっても膜小胞が生成することが知られているが、本研究で使用する低温菌では熱処理による細胞への影響については知見がない。

2. 研究の目的

本研究では低温菌シンプル酵素触媒を有用物質変換触媒として活用するために求められる基盤技術の確立のため、酵素発現ツールの構築を行うこと、熱処理による変換酵素の漏出への影響について基礎的な知見を得ること、および酵素漏出の改善を目的とした。

3. 研究の方法

変換酵素反応としてバニリンを生成する系をモデルとして酵素発現系を構築した。まず、酵素触媒の宿主として用いる低温性 *Shewanella* 属細菌においてバニリン生産と競合する代謝系の有無と、基質取り込みにおける熱処理効果を評価した。バニリン生成酵素遺伝子を導入する前の親株とバニリン生成に関与する物質(フェルラ酸、4-ビニルグアイアコール、バニリン)を親株の至適生育温度である 18°C で反応させて、基質の消費を調べた。本研究に用いるバニリン生合成経路は、フェルラ酸脱炭酸酵素と芳香族酸化酵素のみで反応が進み、補酵素による制限を受けない。また、大腸菌でバニリン生産を行うと大腸菌の生体内代謝酵素により副産物であるバニリルアルコールを生成する。この代謝酵素の発現を抑えなければバニリン収率は40%程度に留まる。したがって、低温菌における基質消費の有無がバニリンの収率に関わる。次にバニリン生成酵素遺伝子を広宿主域発現プラスミドにより導入し酵素発現株を構築し、基質の膜透過性における熱処理効果を評価した。酵素発現株を用いてフェルラ酸からバニリンへの変換を試み、バニリン生成酵素の至適温度・至適 pH での反応を行った。次に2段階目の反応である芳香族酸化酵素の酵素活性を高めるために高発現プラスミドベクターの構築を試みた。中間産物を残存させずにバニリンに変換するためには、律速反応である芳香族酸化酵素の発現量を向上させることが求められる。そこで、タンパク質の高発現系である T7 プロモーターによる発現系を導入したプラスミドの構築を行った。

酵素漏出の現象を確認するために緑色蛍光タンパク質による評価系を構築した。これまでに用いてきた低温性 *Shewanella* 属細菌を用いたシンプル酵素触媒の物質生産において変換酵素が細胞外に漏出することが示された。変換酵素の漏出は低温菌シンプル酵素触媒の反応効率を低下させ、触媒の持続的利用も困難になるため、この課題を解決する必要がある。漏出の現象をより簡便かつ迅速に捉えることを目的として、緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現させた低温菌を構築し、GFPの蛍光を指標としてタンパク質の漏出現象を蛍光分光計、顕微鏡、フローサイトメトリーを用いて評価した。また、これまでの研究から低温菌においてタンパク質の漏出が起きること、低温菌から膜小胞が分泌されることが明らかになっている。そのため、タンパク質の漏出方法は次の3つの可能性(膜透過性の向上による漏出、小胞化の際に、膜に穴が空いた状態になることによる漏出、小胞化の際に、膜小胞に内包されたことによる漏出)が考えられ、これらの可能性も検討した。細胞を分離するための遠心に加え、超遠心機を使用した高速な遠心分離を行うことで膜小胞を分離して評価した。

GFPの遺伝子を導入し、発現させた低温菌株ではタンパク質の漏出が確認された。また、当研究グループのこれまでの研究でイタコン酸の生成反応などに用いる変換酵素が漏出する一方で、β-ガラクトシダーゼは漏出しにくいことが確認された。このように変換酵素の種類によって漏出が起きる場合と起きない場合があり、使用する宿主の低温菌や熱処理は同様であることから、変換酵素の漏出の有無を決定する要因は変換酵素にあると考えられた。そこで本研究では、SDS-PAGEを用いて漏出するタンパク質を評価した後、CADとLacZをそれぞれGFPと融合させた

融合タンパク質を発現するプラスミドを作製し、低温性 *Shewanella* 属細菌に導入して当該タンパク質を発現する株を構築した。融合には、Flexible リンカー (-(-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-)) および *cad* と *lacZ* の酵素遺伝子を使用し、GFP は単量体で 27 kDa、CAD は二量体を形成して 116.2 kDa、LacZ は六量体を形成して 464 kDa であり、GFP と融合させることで GFP-CAD は 170.2 kDa、GFP-LacZ は 572 kDa の融合タンパク質を発現すると想定した。これらを用い、GFP 蛍光を指標とした融合タンパク質の低温菌細胞からの漏出を評価した。また、タンパク質の物性に関わらず、タンパク質の細胞外漏出を防ぐための知見獲得を目的に実験を行った。培養温度や培地成分等は膜流動性に影響を与える可能性があるため、培地組成等の条件検討を行うことでタンパク質漏出を抑制するための条件を評価した。また、評価の際に測定値にばらつきがあり、有意性を評価しづらい問題点があったため、この課題の解決にも取り組んだ。本研究で用いた低温菌は南極の海水や海水から単離されたことから海水塩による効果を期待して、培地を海水と同程度の塩濃度である約 3.5% になるように塩化ナトリウムを添加し、その影響を評価した。その後、培地や熱処理時の緩衝液に人工海水を添加した場合の影響についても同様に評価した。タンパク質の漏出割合に影響を与える可能性が考えられたため、人工海水の成分を参考に複数種類の緩衝液を作製し、その影響を評価した。

4. 研究成果

本研究に用いる低温菌株を用いて低温菌シンプル酵素触媒のバニリン生産への適用に関する評価を行ったところ、本研究に用いる低温菌株は競合代謝系を持たず、基質の膜透過性において熱処理の有無で顕著な差は見られなかった。これにより、本反応系においては熱処理を必要とせず変換が可能であった。複数の低温菌シンプル酵素触媒を用いてバニリン生産を行ったところ、バニリン生産には、律速反応となる芳香属酸化酵素の至適 pH である pH = 9 が適することが示された。バニリン収率は 67.0% であり、酵素発現の改善により、更なるバニリン収率の向上を期待される。また、バニリン生産に適する低温菌シンプル酵素触媒は、芳香属酸化酵素遺伝子を *tac* プロモーター側に配置して転写量を高めるようにプラスミドを導入した株で高い生産性を示した。pET システムによる高発現プラスミドベクターの構築を行ったところ、pET システムは想定通りに機能していないことが明らかとなった。発現系を再構成して構築に取り組む予定である。

次に、物質変換と競合する代謝系が存在する場合や基質の膜透過性向上を目的として行う熱処理により生じるタンパク質(酵素)の漏出を評価するため、GFP 発現株を構築し、GFP の蛍光強度を基にした漏出の定量的な評価系を確立した。タンパク質漏出の確認前に、GFP の熱安定性を確認と蛍光発現の確認を行ったところ、発現した GFP は評価に十分な熱安定性と蛍光発現が見られた。その後、熱処理による影響を調べたところ、熱処理を行うことで GFP の約 70% 程度が細胞外へ漏出していることが示唆された。また、細胞外へ漏出したタンパク質の大部分は反応液中へ漏出し、フローサイトメトリーによる解析から膜小胞にはほんの一部が内包されていることを確認した。GFP 発現株においては熱処理により大部分は反応液中へ漏出していることが示唆され、膜小胞がタンパク質を内包する割合は少ないことが明らかとなった。そのため、タンパク質を内包した膜小胞を触媒として活用することは困難であると考えられた。

SDS-PAGE を用いて低温菌の細胞外へ漏出するタンパク質の分子量について評価を行った。また、大きさの異なる融合タンパク質(GFP-CAD と GFP-LacZ)を作製してタンパク質漏出の評価を GFP による蛍光強度を用いて行った。その結果、細胞外へ漏出するタンパク質はタンパク質の分子量等の物性に依存している可能性があり、融合タンパク質のサイズが大きくなるほどタンパク質の漏出割合は減少することを確認した。以上の結果から、細胞外へタンパク質が漏出する原因の一つとしてタンパク質の大きさが関係することが示唆された。

タンパク質漏出の抑制に向けた取り組みとして培地組成の変化による影響を確認した。その結果、塩濃度の変化では改善が見られなかったが人工海水の添加による差異が見られた。しかし、人工海水の成分から特定成分の有意性を評価することは難しく、実験方法を改善した。菌体の状態を一定にすることで測定値が安定したが、以前の測定値と比較して半分程度の漏出割合を示し、タンパク質の漏出割合は菌体の状態が大きく影響する可能性が考えられた。そこで、改善した方法で再度人工海水を添加した培地で測定したところ、人工海水の添加による影響を確認できなかった。これにより、人工海水の添加は低温菌の細胞膜ではなく、菌体の状態に影響を与えていた可能性が考えられた。また、人工海水を添加したことで培養後の集菌や洗浄操作等で用いるバッファーとの間で塩濃度に大きな差があるために浸透圧が生じる。そのために多くのタンパク質が細胞外へ漏出していることが確認され、洗浄バッファーの塩濃度を培養時に添加した人工海水と同程度にして浸透圧をなくすことで細胞外へのタンパク質漏出を抑制できる可能性が考えられた。そこで、懸濁する溶液を評価したところ、人工海水で懸濁することで熱処理時のタンパク質漏出を抑制でき、浸透圧の影響ではなく、人工海水の主成分に含まれる無機塩のいずれかであることが示唆された。以上の結果から、低温菌の細胞外へのタンパク質漏出は菌体の状態が影響を与えていることが考えられ、熱処理時に使用する懸濁液に含まれる無機塩によりタンパク質漏出を抑制できる可能性が示唆された。

今後、これらの知見を基に持続的に利用できるシンプル酵素触媒の構築を進めたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 田島 誉久、緋田 安希子、加藤 純一	4. 巻 21
2. 論文標題 低温菌シンプル酵素触媒による効率的な物質変換	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 環境バイオテクノロジー学会誌	6. 最初と最後の頁 9~16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.50963/jenvbio.21.1_9	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 Luo Gonglinfeng, Fujii Sotaro, Koda Takumi, Tajima Takahisa, Sambongi Yoshihiro, Hida Akiko, Kato Junichi	4. 巻 132
2. 論文標題 Unexpectedly high thermostability of an NADP-dependent malic enzyme from a psychrophilic bacterium, <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 445~450
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2021.07.005	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 田島 誉久	4. 巻 50
2. 論文標題 環境微生物を活用した物質変換触媒	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本防菌防黴学会誌	6. 最初と最後の頁 129-134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 穴田康太、田島誉久、緋田安希子、加藤純一
2. 発表標題 低温菌シンプル触媒における酵素漏出の解析
3. 学会等名 生物工学若手研究者の集い 夏のオンラインセミナー2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 穴田 康太, 田島 誉久, 緋田 安希子, 加藤 純一
2. 発表標題 低温菌シンプル酵素触媒の熱処理による細胞構造への影響
3. 学会等名 創立100周年記念第74回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田島 誉久
2. 発表標題 低温菌を活用したシンプル酵素触媒の構築
3. 学会等名 支部創立20周年記念 第36回 若手研究者シンポジウム -温度を軸にした微生物研究- (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 五反田芽生, 田島誉久, 緋田安希子, 加藤純一
2. 発表標題 低温菌シンプル酵素触媒を活用したバニリンの効率的生産
3. 学会等名 支部創立40周年記念 日本生物工学会西日本支部大会2022 (第6回講演会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神田拓己, 羅宮臨風, 田島誉久, 緋田安希子, 藤井創太郎, 三本木至宏, 加藤純一
2. 発表標題 低温菌代謝酵素は中温で失活できるか
3. 学会等名 支部創立40周年記念 日本生物工学会西日本支部大会2022 (第6回講演会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 五反田 芽生, 田島 誉久, 緋田 安希子, 加藤 純一
2. 発表標題 低温菌シンプル酵素触媒を活用した効率的なバニリン生産
3. 学会等名 日本農芸化学会 2023年度 広島大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 穴田 康太, 田島 誉久, 緋田 安希子, 加藤 純一
2. 発表標題 低温菌シンプル酵素触媒の熱処理による酵素漏出の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2023年度 広島大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 羅 宮臨風, 神田 拓己, 田島 誉久, 藤井 創太郎, 三本木 至宏, 緋田 安希子, 加藤 純一
2. 発表標題 Cloning, overexpression and purification of a NADP-dependent malic enzyme with unusual thermostability from psychrophile <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部 第59回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 五反田 芽生, 田島 誉久, 緋田 安希子, 加藤 純一
2. 発表標題 低温菌シンプル酵素触媒を活用した有用物質の効率的生産
3. 学会等名 生物工学若手研究者の集い 夏のオンラインセミナー2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神田 拓己, 羅 宮臨風, 藤井 創太郎, 田島 誉久, 緋田 安希子, 三本木 至宏, 加藤 純一
2. 発表標題 低温菌において発見した耐熱性酵素の解析
3. 学会等名 生物工学若手研究者の集い 夏のオンラインセミナー-2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 羅 宮臨風, 藤井 創太郎, 神田 拓己, 田島 誉久, 三本木 至宏, 緋田 安希子, 加藤 純一
2. 発表標題 Unexpectedly high thermostability of an NADP-dependent malic enzyme from a psychrophilic bacterium, <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takahisa Tajima, Mohammad Mojarrad, Keisuke Hirai, Koji Fuki, Akiko Hida and Junichi Kato
2. 発表標題 Coproduction of 1,3-propanediol and 3-hydroxypropionic acid by psychrophile-based simple biocatalysts
3. 学会等名 The 26th Symposium of Young Asian Biological Engineers ' Community, YABEC 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Gonglinfeng Luo, Miho Fujino, Sho Nakano, Akiko Hida, Takahisa Tajima, and Junichi Kato
2. 発表標題 Efficient itaconic acid production by a psychrophile-based whole-cell biocatalyst
3. 学会等名 The 26th Symposium of Young Asian Biological Engineers ' Community, YABEC 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

低温菌を用いたシンプル酵素触媒の開発
<https://kato-lab.hiroshima-u.ac.jp/%e3%82%b7%e3%83%b3%e3%83%97%e3%83%ab%e8%a7%a6%e5%aa%92/>

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