

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19137

研究課題名（和文）高生産性細菌創製に向けた膜透過性ペプチドを基盤とした革新的な形質転換技術の開発

研究課題名（英文）Development of a novel biomolecule delivery system for the establishment of high productivity mutant strains

研究代表者

MORI TETSUSHI (MORI, TETSUSHI)

東京農工大学・工学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：00590100

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：化合物の生産分野においては、“高生産性細菌株”の樹立は極めて重要である。現在、細菌の高生産性株は従来の形質転換技術に大きく依存してきたが従来法は、限定された細菌種にしか応用できない、低い導入率、かつ煩雑であることが問題視されてきた。本研究は、これらの課題を解決できる膜透過性ペプチド（CPP）を用いた新規形質転換技術の開発に挑戦した。その結果、CPPは多様多様な細菌に対して高効率導入可能であることが確認され、従来の形質転換手法と並ぶあるいは超えるような手法に発展可能と大いに期待できると示唆された。今後、CPPの応用を形質転換しにくい細菌あるいは新規の細菌に適応可能な形質転換技術に発展したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌は様々な有用化合物を産生し、これらの化合物は原料として産業あるいは医療分野により、我々が使用する日用品や薬などの生産に繋がる。そこでこれらの商品のデマンドを満たすためにそして新たな商品を提供するためにはその原料の供給・生産の向上が必要不可欠である。現在、細菌を遺伝的に操作し有用化合物の産生を向上させる技術は開発されているが、これらの技術は限定された細菌種にしか応用できない、低い導入率、かつ煩雑であることが課題となっている。本研究はこれらの課題を解決できるかつ細菌の能力を最大限に活かす新たなアプローチとして膜透過性ペプチドの利用の検証し、またその可能性を証明した。

研究成果の概要（英文）：The establishment of highly efficient “bacterial factories” to produce important compounds is crucial for industry and pharmaceuticals. Nevertheless, we are still highly dependent on conventional transformation methods that are tedious, hindered by strain specificity and low transformation efficiencies to establish these strains. In this work, we proposed the use of cell-penetrating peptides (CPP) as an alternative approach to overcome these difficulties. From our results, we showed that CPP can be employed against diverse bacterial strains with high permeation efficiency and can be used for characterization and evaluation of proteins in vivo. We hope to further optimize the application of CPPs, working towards the transformation and manipulation of novel and hard-to-transform bacterial strains.

研究分野：応用微生物学

キーワード：高生産性細菌株 膜透過性ペプチド 形質転換技術

1. 研究開始当初の背景

細菌は多様多種であり、そして産業にとって多くの有用性化合物を産生できる能力を持つことから、新規および高品質の物質の生産において重要な資源として大きく注目されている。また、より高効率に目的の物質の生産を向上するには、“高生産性細菌株”の樹立が極めて重要である。しかし、現在、多くの“高生産性細菌株”の樹立は主にエレクトロポレーション、接合伝達、コンジュゲーションといった従来の形質転換技術に大きく依存してきたため、産業で応用可能な細菌種は複数のみに限定されてしまう。つまり、より多くの細菌種、そしてより簡便に“高生産性細菌株”を樹立できる技術があれば、物質生産の分野に革命的な影響をもたらすと期待できる。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえて、本研究は、1)細菌種を問わない、2)高い導入効率、かつ3)簡便であるといった3要素を満たす革命的な形質転換技術の開発に挑戦した。また、CPP-DNA 重合体の合成技術を確認し、高生産性細菌株の作成を試みると計画した。上記の3要素全てを満たす技術を開発するには研究実施等は膜透過性ペプチド(CPP)に着目した。CPPは30以下のカチオン性および疎水性アミノ酸残基を組み合わせたものからなり、膜タンパク質などを介さずに、多くの細菌が持つ脂質二重膜を自然に透過できるペプチドである。要するに、CPPは原理的にほとんどの細菌種に対して利用可能であり、最も問題とされている様々な細菌への応用性の問題を解決できる。

3. 研究の方法

(1) 多様多種な細菌に対するCPPの導入評価

初めに、多様多種な細菌に対して、CPPの汎用性を証明するために系統的に離れた細菌種を選定しCPPの導入を行った。本研究では、アエロモナス科から1菌種、コマモナス科から3菌種、腸内細菌科から11菌種、モラクセラ科から2菌種、スフィンゴモナス科から2菌種、シュードモナス科から2菌種、キサントバクテリヤ科から1菌種、キサントモナス科から3菌種、シアノバクテリア属から1菌種に加え、形質転換が難しいパエニバシラス科から1菌種、合計28菌種に対して評価した。また、CPPは両親媒性やカチオン性のものを22種類の合成を行い細菌への導入を試みた。

(2) CPPを用いたパエニバシラス科およびシアノバクテリア属の細菌に対するタンパク質の機能解明

パエニバシラス科やシアノバクテリア属には産業および医療分野において有用化合物を産生できる多くの細菌種が属している。特にパエニバシラス科の細菌に関しては、今まで多くの菌種は発見されているが、従来の技術により形質転換に成功しているのは1種に限る。本研究では、これらの科・属に属する、*Paenibacillus* sp. YYML68および*Synechocystis* sp. PCC6803株に対してCPP-ペプチド核酸(PNA)の重合体(CPP-PNA)を利用し、細胞内のタンパク質の機能解明の可否を行った。

(3) CPP-DNA重合体の合成

さらに、高生産性細菌株の樹立の新規技術の開発に向けてCPP-DNAの重合体の合成を試みた。本研究ではCPP-DNA重合体の合成はジスルフィド結合による合成法を利用した。

4. 研究成果

(1) CPPを利用した新たな形質転換アプローチとしての可能性

CPPを利用した新たな形質転換アプローチとして証明するためには、多様多種な細菌に対して導入評価実験を行う必要がある。そこで、上記に記載した系統的に離れた28菌種に対して1種類のCPPを導入した結果、一部の細菌種においては80%以上の導入効率が観察されたものの、一部の細菌種においては、50%以下の導入効率あるいはCPPの導入が認められなかった。他のCPPを利用した際にも同様な結果が得られた。この結果よりCPPの導入は細菌種によって異なることが示唆され、CPPの導入は細菌の膜の組成との関連性があると考察した。この考察をもとに、様々なアミノ酸残基からなるCPP、計22種類を合成し、再度上記の細菌種に導入を行った。その結果、CPPの種類を使い分けることでほとんどの細菌種への導入を60%以上の高い導入効率が認められた。特に導入しにくいパエニバシラス科に属する菌に関しては、本研究で合成したCPPは80%以上の導入効率も確認できた。なお、これらの細菌中、アエロモナス科に属する*Aeromonas salmonicida*株のみにおいてはCPPの導入効率は20%程度であった。*A. salmonicida*株の膜組成を調査したところ、この細菌は特殊な膜構造を有し、古細菌

菌と似た構造、S レイヤーを持つことがわかった。本研究で合成した CPP はグラム陽性およびグラム陰性細菌の通常の膜構造に適応できる CPP を利用したため、*A. salmonicida* 株への導入効率の結果に関しては説明できた。今後、*A. salmonicida* 株のような特殊な膜組成を持つ細菌に導入可能な CPP のデザインおよび合成を行う予定である。

(2) CPPを用いたパエニバシラス科およびシアノバクテリア属の細菌に対するタンパク質の機能解明

上記の成果から、CPP を利用することで、多様多様な細菌への高効率の導入を評価できたが、形質転換技術としての可能性を証明するためには、CPP をキャリアとして、生体分子を細胞内への導入の評価も必要である。本研究では、CPP にペプチド核酸を重合させ、細菌内でのタンパク質の機能解明を試みた。本研究では、*Paenibacillus* sp. YYML68 および *Synechocystis* sp. PCC6803 株、それぞれに対して検証を行った。

Paenibacillus sp. YYML68 株は大型紅藻から単離され、ポリ多糖であるカラギーナンを分解する能力を持っている。しかし、YYML68 株からカラギーナンを分解できる酵素はまだ未解明である。そこで、カラギーナン分解酵素をコードする候補遺伝子に対して CPP-PNA 重合体を合成し、YYML68 株に導入し、カラギーナン分解アッセイを行った結果、これらの候補遺伝子の中から新たなカラギーナン分解酵素の発見に繋がった。次に、*Synechocystis* sp. PCC6803 株では、本細菌が保有する D-乳酸デヒドロゲナーゼ (Ddh;D-乳酸変換酵素) をターゲットとし、本酵素の翻訳制御を行った。同様に、Ddh 酵素をコードする遺伝子に対して CPP-PNA 重合体を合成し、PCC6803 株に導入した結果、Ddh 酵素の翻訳を制御することによる新たな現象を発見できた。

(3) CPP-DNA 重合体の合成

本研究では研究項目 1) および 2) が成功したことから、新たな試みとして、高生産性細菌株の樹立を目的として、CPP-DNA 重合体の合成も行った。CPP および DNA をジスルフィド結合による合成法を試して見たが、思うように目的の重合体の合成にはできなかった。

上記の研究項目 (1) と (2) の結果から、CPP は多様多様な細菌に対して高効率導入可能であることが確認され、従来の形質転換手法と並ぶあるいは超えるような手法に発展可能と大いに期待できる。今後、CPP のさらなる可能性を引き続き追求し、形質転換しにくい細菌あるいは新規の細菌に適応可能な形質転換技術に発展する。また、本研究期間中に研究項目 (3) は成功できなかったため、こちらも引き続き CPP-DNA 重合体の合成を行い、高生産性細菌株の樹立を挑戦する。

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 Yokoi Yasuhito, Kawabuchi Yugo, Zulmajdi Abdullah Adham, Tanaka Reiji, Shibata Toshiyuki, Muraoka Takahiro, Mori Tetsushi	4. 巻 27
2. 論文標題 Cell-Penetrating Peptide-Peptide Nucleic Acid Conjugates as a Tool for Protein Functional Elucidation in the Native Bacterium	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 8944 ~ 8944
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules27248944	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Y. Kawabuchi, Y. Yokoi, A. Zulmadji, R. Tanaka, T. Shibata, T. Muraoka, T. Mori
2. 発表標題 Cell penetrating peptides-protein nucleic acid conjugates as a tool for characterization of unknown protein
3. 学会等名 IUMS2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 A. Kinoshita, D. Toyohara, G. Inoue, T. Okazaki, Y. Yokoi, Y. Kawabuchi, T. Muraoka, T. Mori
2. 発表標題 Application of cell-penetrating peptides in diverse bacterial strains for biomolecule delivery
3. 学会等名 IUMS2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 T. Mori, D. Toyohara, G. Inoue, Y. Yokoi, A. Kinoshita, T. Okazaki, Y. Kawabuchi, T. Muraoka
2. 発表標題 Cell-penetrating peptides as biomolecule carriers and its application in bacteria
3. 学会等名 ISME18（国際学会）
4. 発表年 2022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	村岡 貴博 (MURAOKA TAKAHIRO) (70509132)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授 (12605)	
研究分担者	浅野 竜太郎 (ASANO RYUTARO) (80323103)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授 (12605)	

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