

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22404021

研究課題名(和文)新規低温生物学プロセスの確立を目指した低温特殊環境微生物の探索

研究課題名(英文)Exploration of cold-adapted microorganisms for development of new low-temperature biotechnological processes

研究代表者

栗原 達夫(Kurihara, Tatsuo)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：70243087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円、(間接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：新しい低温適応微生物を探索・取得するとともに、低温適応微生物を利用した物質生産・環境浄化システムの構築に寄与する基盤技術の開発を行った。特に南極海水由来の低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 について、本菌の育種技術として、ゲノム上の任意の遺伝子を削除したり、任意の箇所に任意の DNA 断片を挿入する手法を確立した。また、健康補助食品として注目されるエイコサペンタエン酸を本菌が生合成する機構の一端を明らかにした。さらに本菌が低温環境で種々の金属イオンを還元することを示し、メタルバイオテクノロジーへの応用に向けて、本プロセスに関するタンパク質を同定した。

研究成果の概要(英文)：New cold-adapted microorganisms were isolated from cold environments, and biochemical and biotechnological studies on cold-adapted microorganisms were performed for development of new low-temperature bioprocesses. In particular, a genetic engineering method to modify the genome of *Shewanella livingstonensis* Ac10, a cold-adapted bacterium isolated from Antarctic seawater, was established for its molecular breeding. Eicosapentaenoic acid, which is beneficial to human health, was found to be produced by this strain, and the mechanism of its biosynthesis was elucidated. In addition, the strain was shown to reduce various metal ions, and a protein involved in this process was identified for metal biotechnological application of this strain.

研究分野：分子微生物科学

科研費の分科・細目：プロセス工学 生物機能・バイオプロセス

キーワード：特殊環境微生物 低温菌 好冷性酵素 分子育種

1. 研究開始当初の背景

0 付近の低温で生育する微生物の酵素は一般に低温で高い活性を示し、加熱により容易に失活する。このような特性を有する好冷性酵素は、食品加工用酵素、皮革加工用酵素、繊維加工用酵素、洗剤添加用酵素、分子生物学研究用試薬等として有用で、近年、大きな注目を集めている。しかし、常温性酵素や耐熱性酵素に比べ、好冷性酵素の開発は著しく遅れているのが実情である。その一因として、好冷性酵素特有の熱安定性の低さにより、大腸菌などの微生物(比較的高い温度で培養される)を宿主とした酵素の高生産がしばしば困難を伴うことがあげられる。

本研究代表者は、好冷性酵素の特性解明、好冷性酵素が低温で高い活性を示すための構造的基盤の解明、応用面の開発などを目的として研究を行ってきたが、その過程で、大腸菌を宿主とした発現系では好冷性酵素の高発現が見られない、高発現しても封入体を形成し、機能を保持した可溶性タンパク質が得られないという状況をしばしば経験してきた。好冷性酵素の熱安定性の低さがその一因である可能性が考えられた。0 付近で良好に生育する低温適応微生物を宿主とすれば熱安定性の低いタンパク質の高生産が可能になると期待された。低温域での優れた生育速度と菌体収量、形質転換の容易さといった観点で低温特殊環境微生物の探索を行い、さらに分子育種を行えば、より優れた生産システムの構築が可能になると考えられた。

一方、低温適応微生物は低温での物質生産や環境浄化にも有用であり、そのような応用を目指した研究開発にも期待が寄せられていた。

2. 研究の目的

極限的低温環境に棲息する新しい低温適応微生物を調査、採集するとともに、これらが生産する有用好冷性酵素や有用遺伝子資源を開発する。また、それらの開発に資する基幹技術、すなわち熱安定性の低いタンパク質や各種化合物の生産に適した低温物質生産システムを開発する。宿主として優れた性質をもつ低温適応微生物の探索およびそれらの分子育種に取り組む。一方、低温適応微生物を用いた有用物質生産や環境浄化に向けた研究開発にも取り組む。これらの取り組みにより物質生産や環境浄化に資する低温生物工学の新しい基盤を築く。

3. 研究の方法

(1) 低温菌のスクリーニングと同定: 低温環境から採取したサンプルについて、適宜、培地などで希釈した上で LB 寒天培地に塗布し、4 で培養してコロニーを形成させた。得られたコロニーについて PCR で 16S rRNA 遺伝子を増幅させて配列解析を行い、データベースと照合することで菌株を同定した。

(2) Shewanella livingstonensis Ac10 のゲノム改変: pyrF 遺伝子の上流と下流のそれぞれ約 200 bp を PCR で増幅し、連結した後、S. livingstonensis Ac10 での自律複製能をもたないプラスミド pKNOCK-Km に導入した。得られたプラスミドを S. livingstonensis Ac10 に導入し、相同組換えによって生じた pyrF 遺伝子欠損株を 5-フルオロオロチン酸(5-FOA) 耐性を指標として選抜した。一方、pyrF 遺伝子を pKNOCK-Km に挿入したプラスミドを構築した。ゲノムから削除したい領域の上流と下流のそれぞれ約 500 bp を PCR で増幅し、連結した後、上述の pyrF 遺伝子を挿入したプラスミドを導入した。このプラスミドを S. livingstonensis Ac10 の pyrF 欠損株に導入し、相同組換えによってプラスミドがゲノムに組み込まれることでカナマイシン耐性を獲得した株を分離した。続いて、プラスミドの挿入によってゲノム上に生じた相同領域間で再度、相同組換えが起こることで pyrF を含むプラスミド由来配列が脱離した 5-FOA 耐性株を選抜した。選抜には、カナマイシンを含まず、ウラシルと 5-FOA を含む培地を用いた。得られた株の中から、目的の遺伝子欠損が生じたものを、PCR 法で選抜した。

(3) EPA および EPA 含有リン脂質の生合成機構の解析: EPA 生合成に関与する Orf2、および Orf5 の 5 つのアシルキャリアータンパク質ドメインを、それぞれ大腸菌で発現させ、精製した。Orf2 の存在下、各アシルキャリアータンパク質ドメインを個別に CoA とインキュベートし、反応産物を HPLC と MALDI-TOF/MS で解析し、ホスホパントテイン化の有無を調べた。一方、EPA 含有リン脂質の生合成に関与する可能性が考えられた PlsC1 ~ PlsC5 の遺伝子を pKNOCK-Km を利用した相同組換え法で破壊し、得られた破壊株それぞれのリン脂質組成を ESI-MS によって解析した。また、plsC の温度感受性変異株 Escherichia coli JC201 にこれらの遺伝子を導入し、非許容温度における本変異株の生育を調べることで、各遺伝子産物の機能を調べた。

(4) S. livingstonensis Ac10 の金属代謝機構の解析: 電子受容体として三価鉄(15 mM クエン酸鉄)、三価コバルト(5 mM コバルト()アセチルアセトナート)、フマル酸(15mM)のいずれかを含む合成培地を用い、18 と 4 で嫌氣的に静置培養した。クエン酸鉄含有培地とフマル酸含有培地で生育した菌体について、膜画分を調製し、二次元電気泳動でタンパク質を比較した。クエン酸鉄含有培地で誘導されていたタンパク質をペプチドマスフィンガープリンティング法で同定した。

4. 研究成果

(1) オーストリアのインスブルックを拠点として、周辺の標高 3000 メートル付近の高山地帯を調査し、年間を通して 0 付近以下の低温に保たれた土壤などを採取した。採取したサンプルについて、低温で生育する微生物のスクリーニングを行った。その結果、シャウフェルシュピッツェ 2900 m 地点の氷河において採取したサンプルから 4 で良好に生育する 2 種類の微生物が得られた。これらについて 16S rRNA の塩基配列解析を行った結果、*Janthinobacterium lividum* および *Cryobacterium psychrotolerans* と同定された。

(2) 南極海水から分離した低温適応細菌 *S. livingstonensis* Ac10 を利用した低温生物学プロセスの構築を目的として、本菌の分子育種法を開発した。遺伝子操作における選択マーカーとしてウラシル生合成系の酵素であるオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼの遺伝子 (*pyrF*) を用い、本菌のゲノム上の任意の遺伝子を特異的に削除する方法および本菌のゲノムに外来遺伝子を挿入する方法を確立した。オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼはオロチジン-5'-リン酸のアナログである 5-FOA を本菌に対する毒性の高い 5-フルオロウラシルに変換する。このことを利用して、まず、ウラシル要求性と 5-FOA 耐性を指標として *pyrF* 遺伝子削除株を相同組換えによって取得した。一方、本菌体内で自律複製しないプラスミドに *pyrF* とカナマイシン耐性遺伝子を選択マーカーとして導入し、ゲノム改変用プラスミドを構築した。このプラスミドに本菌のゲノム配列と相同性をもつ DNA 断片、および、ゲノムに導入したい DNA 断片を挿入して本菌に導入し、相同組換えによってゲノムを改変した。ゲノムが改変された組換え体は、ウラシル非要求性およびカナマイシン耐性の株として選抜することができた。このようにして得られた組換え体はゲノム内に *pyrF* をもち、5-FOA 感受性となったが、相同組換えによってゲノム上に形成された相同領域間で、再度、相同組換えを起こさせることによって *pyrF* が除去されたゲノム改変体を、5-FOA 耐性株として取得することができた。これにより、*pyrF* を選択マーカーとして繰り返し使用してゲノムを改変することが可能になった。この方法により、エイコサペンタエン酸 (EPA) 生合成系遺伝子の *orf5* や *orf6* の部分配列を削除したゲノム改変体などが得られた。本システムは、本菌ゲノム上の特定遺伝子上流に強力なプロモーターを挿入することや、特定遺伝子にタグ配列を挿入することをも可能にするものであり、本菌を低温生物学プロセス用の宿主細胞として開発するための基盤技術として有用である。

(3) 低温菌 *S. livingstonensis* Ac10 は 0 付近の低温環境において、健康補助食品などとして注目される 3 系高度不飽和脂肪酸 EPA を生産する。本菌の EPA 生産への応用に向けて、本菌における EPA の生合成を担う 5 つの遺伝子にコードされるタンパク質の特性を解析した。その結果、5 つのタンパク質のうち Orf2 がホスホパンテティニルトランスフェラーゼ活性をもつことが見いだされた。また、Orf5 に存在するアシルキャリアータンパク質と相同性をもつ 5 つのドメインが、Orf2 によってホスホパンテティニル化されることが見いだされた。ホスホパンテティニル化された Orf5 が EPA 合成反応における足場として機能することが推定された。一方、EPA 生合成を担う 5 つのタンパク質間の相互作用を調べた結果、これらのうち Orf5 と Orf6 が複合体を形成していることが示され、複数のタンパク質が関与する生合成反応が複合体形成によって効率よく進行していることが示唆された。

一方、EPA を含有するリン脂質は本菌の細胞膜に存在し、低温環境での生育において重要な役割を果たす。本菌を利用した様々な低温生物学プロセスを開発するためには、外界との物質交換などを担う膜タンパク質の構造形成や機能発現のメカニズムを理解することがきわめて重要であり、これらのプロセスに関与することが推定される EPA 含有リン脂質の生合成機構や機能発現機構の解明は重要な意味をもつ。そこで、本菌における EPA 含有リン脂質の生合成機構を解析した。*S. livingstonensis* Ac10 のゲノムには、EPA 含有リン脂質の生合成への関与が推定される 1-アシル-*sn*-グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (PlsC) のホモログ遺伝子が 5 つ存在する (*plsC1*~*plsC5*)。これらの遺伝子を破壊して得られた変異株のリン脂質組成を調べた結果、*plsC1* において、EPA 含有リン脂質の生産能が顕著に低下することが示された。また、*plsC* の条件致死変異株 *E. coli* JC201 の生育不全が、*plsC1* の発現によって抑制されたことから、PlsC1 が *E. coli* 内で PlsC 活性をもつことも示された。以上の結果から、PlsC1 が *S. livingstonensis* Ac10 において EPA をリン脂質に導入する役割を担っていると考えられた。

(4) *S. livingstonensis* Ac10 が、低温の嫌気環境で種々の金属を還元することを見いだした。低温環境での環境汚染金属の除去や、有用金属の回収に有用と期待された。本菌が 39 種の cytochrome c をもつことが全ゲノム解析によって示され、それらの関与によって多様な金属の酸化還元能をもつことが推定された。嫌気条件下で三価鉄 (クエン酸鉄) と三価コバルト (コバルトアセチルアセトナート) を電子受容体として生育することを見いだし、それらのうちクエン酸鉄の還元に関与

することが推定されるタンパク質をプロテオーム解析により網羅的に解析・同定した。クエン酸鉄存在下で培養した菌体から不溶性の膜結合タンパク質を調製し、二次元電気泳動に供した結果、クエン酸鉄依存的に生産量が増加するタンパク質が 8 種同定された。これらのうち、リン酸イオンの選択的取り込みに関与するポーリンタンパク質 PhoE のホモログについて、遺伝子破壊株を作製し、機能を解析した。その結果、PhoE の遺伝子欠損株がクエン酸鉄やコバルトアセチルアセトナートを還元しないことが見いだされた。本欠損株にプラスミドを用いて PhoE 遺伝子を導入すると還元能が回復したことから、本菌による三価鉄や三価コバルトの還元には PhoE が関与するものと考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Hyun-Nam CHO, Wataru KASAI, Jun KAWAMOTO, Nobuyoshi ESAKI, and Tatsuo KURIHARA “Characterization of 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase from a polyunsaturated fatty acid-producing bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10” *Trace Nutrients Research*, 査読有, **29**: 92-99 (2012)

<http://www.jtnrs.com/sym29/19-No-P-14.pdf>
Chunjie GONG, Jun KAWAMOTO, Nobuyoshi ESAKI, and Tatsuo KURIHARA “Functional analysis of an eicosapentaenoic acid biosynthesis protein Orf2 from a psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10” *Trace Nutrients Research*, 査読有, **29**: 84-91 (2012)

<http://www.jtnrs.com/sym29/18-No-P-13.pdf>
Jungha PARK, Jun KAWAMOTO, Nobuyoshi ESAKI, and Tatsuo KURIHARA “Identification of cold-inducible inner membrane proteins of the psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, by proteomic analysis” *Extremophiles*, 査読有, **16**: 227-236 (2012)

DOI: 10.1007/s00792-011-0422-z
Jun KAWAMOTO, Takako SATO, Kaoru NAKASONE, Chiaki KATO, Hisaaki MIHARA, Nobuyoshi ESAKI, and Tatsuo KURIHARA “Favourable effects of eicosapentaenoic acid on the late step of the cell division in a piezophilic bacterium, *Shewanella violacea* DSS12, at high-hydrostatic pressures” *Environmental Microbiology*, 査読有, **13**: 2293-2298 (2011)
DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02487.x

[学会発表](計 5 件)

丸山沙織、川本純、樽井淳、王玉、江崎信芳、栗原達夫 「*Shewanella livingstonensis* Ac10 の金属呼吸における外膜タンパク

質 PhoE の機能」日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 29 日、川崎市
栗原達夫、川本純 「低温菌の環境適応を担う細胞膜脂質」第 29 回日本微生物生態学会大会、2013 年 11 月 25 日、鹿児島市
丸山沙織、樽井淳、王玉、川本純、栗原達夫 「低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 による金属還元機構の解析」極限環境生物学会 2013 年度(第 14 回)年会、2013 年 10 月 26-27 日、川崎市
栗原達夫 「地球環境と微生物」京都化学者クラブ 2012 年 10 月 6 日、京都市
Tatsuo KURIHARA “Function of phospholipids containing eicosapentaenoic acid in the bacterial cell membrane” Wageningen University and Research Centre/Kyoto University Joint Workshop, 2012 年 4 月 26 日、京都市

6. 研究組織

(1)研究代表者

栗原 達夫 (KURIHARA, Tatsuo)
京都大学・化学研究所・教授
研究者番号：70243087

(2)研究分担者

川本 純 (KAWAMOTO, Jun)
京都大学・化学研究所・助教
研究者番号：90511238