

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22780078

研究課題名（和文）枯草菌の分泌・代謝機能を改変する変異の探索とその活用

 研究課題名（英文）Search, identification and investigation of the useful mutations for improvement of the function for secretion or metabolism in *Bacillus subtilis*

## 研究代表者

稲岡 隆史（INAOKA TAKASHI）

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品バイオテクノロジー研究領域・主任研究員

研究者番号：40391205

研究成果の概要（和文）：枯草菌においてウンデカプレニル2リン酸合成酵素遺伝子内の変異が希土類元素の一種であるスカンジウムや細胞壁合成阻害剤バシトラシンに対する耐性を付与し、アミラーゼ生産を高めることを発見した。この変異株におけるアミラーゼ遺伝子の発現は野生株と同レベルであり、アミラーゼ生産活性化が転写後段階で起こっていることが判明した。これらの結果から、この変異は枯草菌のアミラーゼ分泌能を向上させる変異であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In *B. subtilis*, a undecaprenyl pyrophosphate synthase mutation was found to give rise to increased resistance to both a rare earth element scandium and bacitracin, which prevents cell wall synthesis, in addition to enhanced amylase production. Transcriptional analysis revealed no significant difference in the amylase gene expression, indicating that the effect of this mutation on amylase overproduction was exerted at the posttranscriptional level. This mutation thus has a potential to stimulate the amylase secretion.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2600000	780,000	3,380,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：スカンジウム、ウンデカプレニル2リン酸合成酵素、アミラーゼ、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ、NADPH、メタボローム

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、これまでに転写および翻訳段階の機能強化に基づく潜在機能開発手法（転写工学及びリボゾーム工学）を発展させてきた。本手法は、転写または翻訳段階を阻害する抗生物質の耐性変異株を選抜することによりRNAポリメラーゼやリボゾームの機能を選択的に

に改変する手法であり、微生物の潜在機能を覚醒させるなど大きな成果を上げている。潜在機能開発手法は既に微生物育種法として実用可能なレベルにまで到達しているが、更なる物質生産の効率化を図るためには、分泌能や代謝制御ネットワークを合目的的に調節することが重要である。即ち、転写・翻訳機能の強化だけで

なく、有用産物の分泌機能強化と代謝フロー改変に伴う有用産物の効率的生産を促す新たな変異を探索・同定し、活用することである。これにより、潜在機能開発手法は、全ての物質生産プロセスを効率的に改変する戦略的微生物育種法へと昇華させることができる。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞膜機能阻害剤や細胞壁合成阻害剤、代謝阻害剤等の耐性変異の中から物質生産向上に寄与する新たな変異を探索・同定することを目的としている。これら変異に期待される効果として、細胞膜機能阻害剤及び細胞壁合成阻害剤に対する耐性変異には有用産物の分泌機能強化を、代謝阻害剤に対する耐性変異には代謝フロー改変に伴う栄養源から有用産物への効率的変換を促すことを想定している。

## 3. 研究の方法

### (1)使用菌株

本研究に使用した菌株は表1に示した。SC26株は168株のスカンジウム耐性変異株の中からアミラーゼ高生産株を選抜することによって得られた。TI392株はYO-005株をSC26株のゲノムDNAで形質転換することによって得られた。TI393株は*bcrC*遺伝子にpMutinT3を挿入することにより作製した。TI403( $\Delta yubB::neo$ )は、*yubB*遺伝子のORF内にネオマイシン耐性遺伝子(*neo*)を挿入して作製した。TI408及びTI409株は*uppS*又は*yubB*遺伝子にpHASH120プラスミドを挿入することにより作製した。これらの株ではpHASH120が挿入された遺伝子が強力なプロモーターによって発現する。*zwf::neo*破壊株はUwe Sauer博士より頂いた株のDNAを用いて168株を形質転換することにより作製した。TI444及びTI445株は、以前作製した*glcP::spc*株及び*ntdABC::cat*株をTI443株のDNAを用いて形質転換することにより得られた。TI351及びTI416株は*ywfB*又は*amyE*遺伝子プロモーター活性を測定する為に構築した。

表1 使用菌株

Strain	Genotype
168	<i>trpC2</i>
YO-005	<i>hisC101</i>
SC26	<i>trpC2 yufQ38 uppS86</i>
TI351	<i>trpC2 amyE::(P<sub>ywfB</sub>-lacZ, cat)</i>
TI392	<i>trpC2 uppS86</i>
TI393	<i>trpC2 bcrC::pMutinT3</i>
TI403	<i>trpC2 <math>\Delta yubB::neo</math></i>
TI408	<i>trpC2 uppS::pHASH120 (P<sub>S10</sub>-uppS)</i>
TI409	<i>trpC2 yubB::pHASH120 (P<sub>S10</sub>-uppS)</i>
TI416	<i>trpC2 amyE::(P<sub>amyE</sub>-lacZ, cat)</i>

TI443	<i>trpC2 <math>\Delta zwf::neo</math></i>
TI444	<i>trpC2 <math>\Delta zwf::neo \Delta glcP::spc</math></i>
TI445	<i>trpC2 <math>\Delta zwf::neo \Delta ntdABC::cat glcP::spc</math></i>

### (2)培地

枯草菌の培養にはLB培地(10 g/L トリプトン、5 g/L 酵母エキス、5 g/L NaCl)を用いた。物質生産用培地としてNG培地(10 g/L Nutrient Broth、10 g/L グルコース、2 g/L NaCl、5 mg/L CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O、7.5 mg/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、3.6 mg/L MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O、15 mg/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、9 mg/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)を用いた。*zwf::neo*破壊株の特性解析にはS7N培地[10 mM 硫酸アンモニウム、5 mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.0)、100 mM MOPS緩衝液(pH7.0)、20 mM グルタミン酸ナトリウム、2 mM MgCl<sub>2</sub>、0.7 mM CaCl<sub>2</sub>、50  $\mu$ M MnCl<sub>2</sub>、5  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub>、2  $\mu$ M チアミン、1% グルコース、0.1% Nutrient Broth]を用いた。

### (3)アミラーゼ活性測定

枯草菌をNG培地で30°C、72時間培養し、その培養上清をサンプリングした。この培養上清50  $\mu$ Lに0.1 mLの可溶性澱粉溶液(0.5%可溶性澱粉を含む50 mM Tris-HCl, pH6.8)を加え40°Cで1分間保温した。その後、4  $\mu$ Lの反応液を0.1 mLのLugol液(MP Biomedicals)と混合し、700nmの吸収を測定した。アミラーゼ活性は以下の式で計算した。

$$\text{Activity} = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) \cdot A_{\text{blank}}^{-1} \cdot t^{-1} \cdot 100$$

### (4)リアルタイム定量PCRによる発現解析

枯草菌から抽出した全RNAを用いてランダムヘキサマーにより逆転写反応を行なった後、対象遺伝子の特異的プライマーによる定量PCRを行なった。16S RNAを内部標準として利用し、各遺伝子の相対発現量を比較した。

### (5)メタボローム解析

枯草菌168及びTI443(*zwf*)、TI444(*zwf glcP*)、TI445(*zwf ntdABC glcP*)株をLB培地で16時間培養後、S7N培地に2%植菌して、対数増殖期(OD<sub>650</sub>=0.3)の細胞内代謝産物を比較した。

## 4. 研究成果

### (1)アミラーゼ生産を向上させる新たな変異株の同定

枯草菌の物質生産を活性化する新規な変異を探索するため、アミラーゼ活性を指標としたスクリーニングを実施した結果、希土類元素の一種であるスカンジウムに対する耐性変異がアミラーゼ生産を高めることを発見した。この変異株は細胞壁合成阻害剤であるバシトラシンに対する耐性も獲得していることがわかった。バシトラシン

はウンデカプレニル2リン酸に結合して細胞壁合成に必要なウンデカプレニルリン酸の合成を阻害することが知られている。そこで、ウンデカプレニル2リン酸合成酵素遺伝子 (*uppS*) およびウンデカプレニル2リン酸脱リン酸化酵素遺伝子 (*bcrC*, *yubB*) の塩基配列を解析したところ、*uppS* 遺伝子内に1アミノ酸置換をもたらす変異 (*uppS86*) を発見し、この変異がスカンジウムおよびバシトラン耐性、アミラーゼ生産の活性化を与える原因変異であることが判明した。

この変異株におけるアミラーゼ遺伝子の発現を野生株と比較したところ、アミラーゼ遺伝子発現は野生株と同程度であった。この変異によるアミラーゼ生産の活性化が転写後段階で起こっており、この変異が細胞壁合成に影響を及ぼすと考えられることなどから、この変異株ではアミラーゼ分泌能が向上していると思われた。

#### (2) *uppS* および *bcrC*, *yubB* 遺伝子発現の効果

*uppS86* 変異株および *uppS* 過剰発現株、*yubB* 破壊株、*yubB* 過剰発現株、*bcrC* 破壊株を作製し、これら変異株のスカンジウム及びバシトラン耐性を比較した(図1)。その結果、*uppS* 過剰発現株では感受性が著しく増大した。*yubB* 破壊株では感受性に大きな変化は起こらなかったが、*yubB* 過剰発現株は *uppS86* 変異株と同様に耐性となった。*bcrC* 破壊株ではこれらに対する感受性が増大した。これらの結果は、ウンデカプレニル2リン酸の蓄積がスカンジウム及びバシトランに対する感受性を増大させることを示唆している。

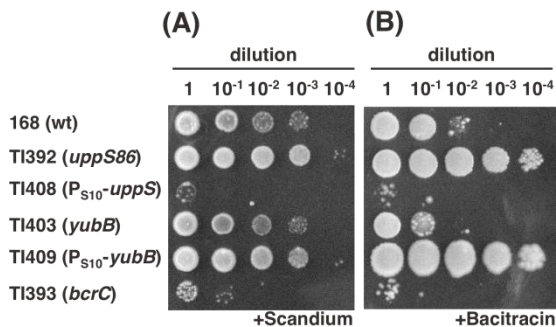


図1 各変異株のスカンジウム及びバシトラン耐性

これら変異株のアミラーゼ生産能を野生株と比較した結果、*bcrC* 又は *yubB* のいずれかの破壊株でもアミラーゼ生産能が向上することがわかった(表2)。*uppS* の過剰発現株ではアミラーゼ生産が向上しないことから、これら変異によるアミラーゼ生産の向上効果は、ウンデカプレニル2リン酸量に依存したものではないと考えられた。

表2 各変異株のアミラーゼ生産能

Strain	Amylase produced
168 ( <i>wt</i> )	1.99 ± 0.26
TI392 ( <i>uppS86</i> )	3.36 ± 0.42*
TI408 ( $P_{S10}$ - <i>uppS</i> )	2.48 ± 0.53
TI403 ( <i>yubB</i> )	2.88 ± 0.48*
TI409 ( $P_{S10}$ - <i>yubB</i> )	2.12 ± 0.32
TI393 ( <i>bcrC</i> )	2.73 ± 0.45*

\*  $P < 0.05$

#### (3) 枯草菌の物質生産におけるスカンジウム添加効果

枯草菌のアミラーゼ及びプロテアーゼ、抗生物質生産における培地へのスカンジウム添加効果を調査した。その結果、スカンジウムを終濃度 10 µg/mL で培地に添加することにより、これらの生産能が増大することが判明した(図2)。

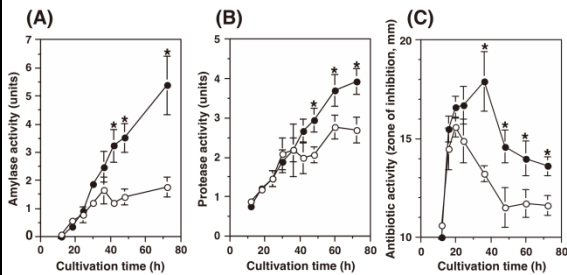
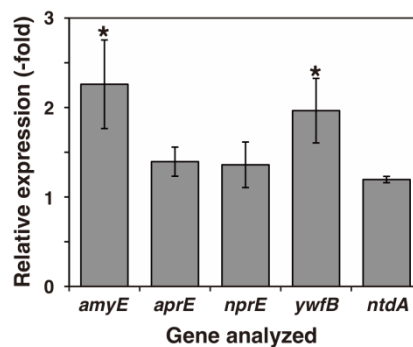


図2 枯草菌の物質生産におけるスカンジウム添加効果

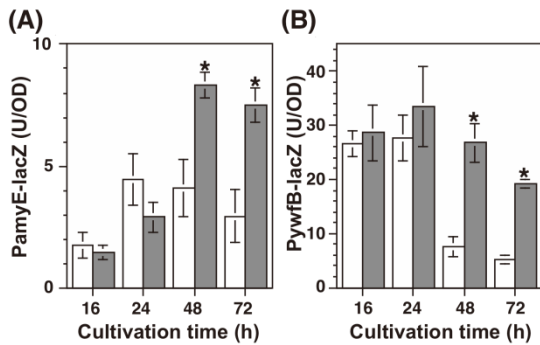
スカンジウム添加(●)、無添加(○)

リアルタイム定量 PCR(図3)及び *lacZ* 遺伝子を用いたレポーターアッセイ(図4)の結果、スカンジウム耐性変異による効果とは異なり、スカンジウムは定常期に転写レベルでアミラーゼやバシトランの生産を活性化することが判明した。



**図3 各遺伝子発現におけるスカンジウム添加効果**

スカンジウム無添加時の各遺伝子発現量を1とした時の相対発現量を示す。\*  $P < 0.05$

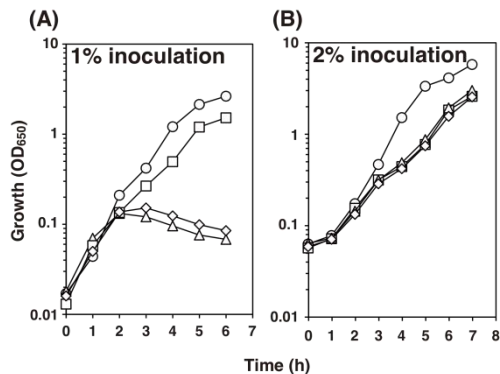


**図4 P<sub>amyE</sub>及びP<sub>pywB</sub>-lacZの発現におけるスカンジウム添加効果**

スカンジウム添加(グレー)、無添加(白)。\*  $P < 0.05$

(4) 枯草菌のグルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ破壊株の増殖特性

ペントースリン酸(PP)経路は NADPH や核酸合成に必要であり、多くの二次代謝生成にも関与していることが知られている。そこで枯草菌の PP 経路の各破壊株の特性を解析していたところ、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼをコードする *zwf* 遺伝子破壊株(TI443)がLB天然培地では野生株と同様に増殖するにも拘らず、グルコースを含む半合成培地(S7N)で顕著な増殖能の低下を示すことを発見した。さらに検討した結果、LB培地で16時間培養した菌体をS7N培地に2%植菌した場合には、増殖が可能となることがわかった(図5B)。興味深いことに、この *zwf* 破壊株の増殖能の低下はグルコーストランスポーターをコードする *glcP* 遺伝子の破壊(TI444)によって回復した(図5A)。 *glcP* 遺伝子の破壊は枯草菌の潜在的二次代謝経路であるネオトレハロサジアミン(NTD)合成経路を活性化することからNTD合成遺伝子(*ntdABC*)破壊株(TI445)でも検証した結果、TI445株はTI443株と同様に1%植菌時には増殖できないことがわかった(図5A)。



**図5 *zwf* 欠損株の増殖特性**

168(*wt*, ○)、TI443(*zwf*, △)、TI444(*zwf glcP*, □)、TI445(*zwf ntdABC glcP*, ◇)

(5) メタボローム解析

これら破壊株における代謝変化を観察するため、メタボローム解析を行なった(図6)。TI443(*zwf*)株では予想通り、PP経路の代謝産物や NADPH 量が顕著に低下していた。一方、TI444(*zwf glcP*)株ではPP経路の代謝産物は依然として低下していたが、TCAサイクルの代謝産物が顕著に増加しており、細胞内 NADPH 量も野生株レベルに回復していることがわかった。GlcPタンパク質は *ntdABC* 遺伝子の発現を抑制していることから、*zwf ntdABC glcP* 三重破壊株(TI445)で同様の実験を行なったところ、*zwf glcP* 二重破壊株(TI444)で観察された代謝産物量の変化は観察できなかった。NTDは抗菌剤として知られるカノサミン2分子からなるが、TI444株ではカノサミンと一致する代謝産物が蓄積していることからNTD合成が活発に行なわれているものと推測できる。カノサミン合成にはアミノ基転移反応が関わっていると予想されるが、グルタミンやグルタミン酸がアミノ基の供与体として働き、2-オキソグルタル酸が蓄積する可能性がある。また、リンゴ酸は *ptsJ* 遺伝子産物によりピルビン酸へ変換される際に NADPH を生じることが知られている。TI444株では NADPH レベルが野生株レベルに回復していることから、*glcP* 遺伝子破壊による *zwf* 破壊株の増殖回復効果は NTD 合成を活性化することにより TCA サイクルの代謝中間体が蓄積し、細胞内 NADPH 量を増加させたことに起因しているものと考えられた。

(6) *zwf* 株の増殖におけるリンゴ酸添加効果

メタボローム解析の結果から、TI444株において観察された増殖能の回復は、NTD合成の活性化によりTCA中間体のリンゴ酸が蓄積し、NADPHが合成された事によるものと推察された。そこで、TI443(*zwf*)株の増殖におけるリンゴ酸の効果を検討した結果、予想通りリンゴ酸添加によりTI443株の増殖は回復した(図7)。

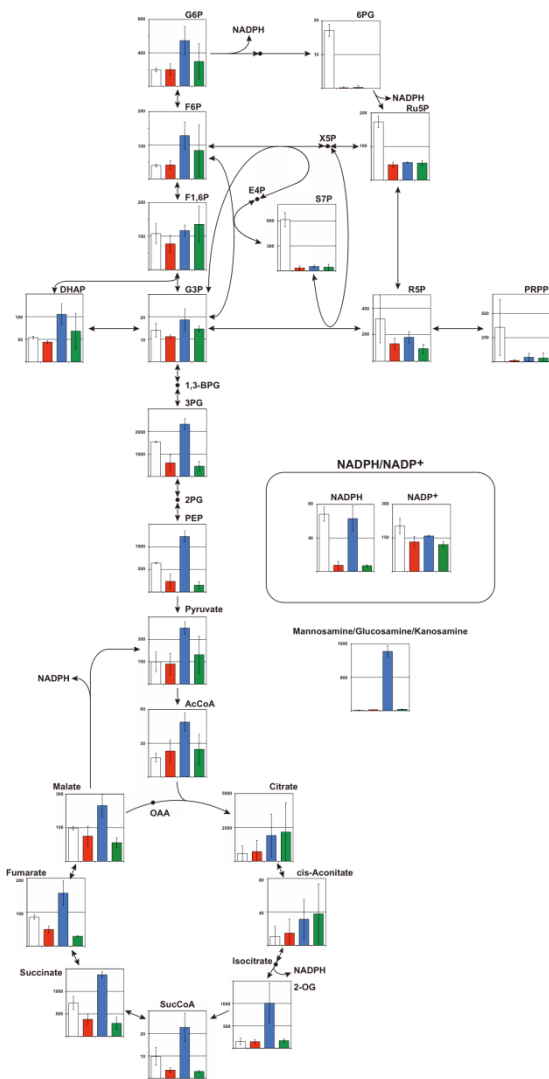
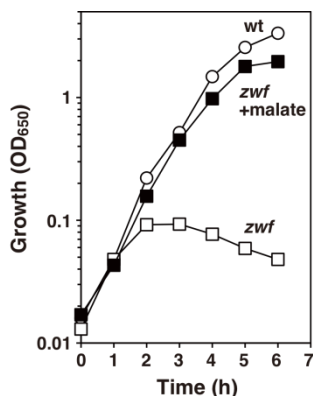


図6 各欠損株におけるメタボローム解析  
168(wt;白)、TI443(zwf;赤)、TI444(zwf glcP;青)、  
TI445(zwf ntdABC glcP;緑)



## 図7 zwf 欠損株の増殖におけるリンゴ酸の添加効果

168(wt リンゴ酸無添加;○)、TI443(zwf リンゴ酸無添加;□)、TI443(zwf リンゴ酸添加;■)

### 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4件)

- (1) Kubo, Y., Inaoka, T., Hachiya, T., Miyake, M., Hase, S., Nakagawa, R., Hasegawa, H., Funane, K., Sakakibara, Y., and Kimura, K. Development of a rifampicin-resistant *Bacillus subtilis* strain for natto-fermentation showing enhanced exoenzyme production. *J.Biosci.Bioeng.* in press. 査読有
- (2) Inaoka, T., and Ochi, K. Undecaprenyl pyrophosphate involvement in susceptibility of *Bacillus subtilis* to rare earth elements. *J. Bacteriol.* 194: 5632-5637 (2012) 査読有
- (3) Inaoka, T., and Ochi, K. Activation of dormant secondary metabolism neotrehalosadiamine synthesis by RNA polymerase mutation in *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75: 618-623 (2011) 査読有
- (4) Inaoka, T., and Ochi, K. Scandium stimulates the production of amylase and bacilysin in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 8181-8183 (2011) 査読有

[学会発表] (計2件)

- (1) Inaoka, T. and Ochi, K. Scandium stimulates the production of amylase and bacilysin in *Bacillus subtilis*. International Union of Microbiological Society 2011 Congress 札幌 2011年9月10日
- (2) 稲岡 隆史, 越智幸三. 「枯草菌の物質生産におけるスカンジウムの効果」グラム陽性菌ゲノム機能会議 福山 2011年8月25日

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

稲岡 隆史 (INAOKA TAKASHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品バイオテクノロジー研究領域・主任研究員

研究者番号：40391205