

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2016

課題番号：25303028

研究課題名(和文)低温バイオプロセス構築の基盤となる低温適応微生物の探索

研究課題名(英文) Exploration of Cold-Adapted Microorganisms to Develop Low-Temperature Bioprocessing Systems

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) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：種々の低温環境の探索により、低温生育能に優れた *Pseudomonas mandelii*、鉄還元能に優れた *Paenibacillus odorifer* や *Bacillus circulans* と近縁の細菌、タンパク質分泌能に優れた *Pseudoalteromonas* 属細菌などを得た。また、膜小胞高生産性 *Shewanella* sp. HM13 の遺伝子操作法を構築した。南極海水由来 *Shewanella livingstonensis* Ac10 については異種タンパク質生産に有用な低温誘導性プロモーターを同定し、外膜タンパク質 PhoE の鉄代謝への関与と機能性アミノ酸残基を見いだした。

研究成果の概要(英文)：From various cold environments, we obtained *Pseudomonas mandelii* that grows well at low temperatures, bacteria closely related to *Paenibacillus odorifer* and *Bacillus circulans* that efficiently reduce iron, and *Pseudoalteromonas* bacterium that secretes a particular protein in large quantities. For *Shewanella* sp. HM13, which abundantly produces extracellular membrane vesicles, we established genetic engineering methods. As to *Shewanella livingstonensis* Ac10 isolated from Antarctic seawater, we found cold-inducible promoters that may be useful for expression of foreign proteins in this strain. We confirmed that PhoE, an outer membrane protein, is involved in iron metabolism of this bacterium and identified functionally important amino acid residues of this protein.

研究分野：分子微生物科学

キーワード：低温適応微生物 バイオプロセス タンパク質生産 金属代謝 国際研究者交流 国際情報交換

1. 研究開始当初の背景

地球上の生命圏のおよそ8割は、極地や深海、高山など一年を通して温度が5℃を上回ることはない低温環境である。生物は進化の過程でこのような環境にも適応し、棲息域を広げてきた。0℃付近の低温で生育する低温適応微生物は、優れた触媒能をもつ好冷酵素を生産する。そのため低温適応微生物においては、化学反応が進行しにくい低温環境でも種々の代謝反応が滞りなく進行する。好冷酵素は、低温での高い触媒能が期待される食品加工用酵素、洗剤添加用酵素、分子生物学研究用試薬等として有用で、大きな注目を集めている。しかし、好冷酵素の多くは熱安定性が低く、容易に失活してしまうことや、汎用されるタンパク質生産系(常温以上の比較的高い温度で利用可能)での生産が困難であることなどにより、常温性酵素や耐熱性酵素と比べると、開発が著しく遅れている。

本研究代表者らは、本研究開始以前の研究により、低温適応微生物を宿主としたタンパク質生産系を構築し、本生産系によって、大腸菌を宿主とした場合よりも良好な好冷酵素の発現が可能であることを見いだしていた(Miyake *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 4849 (2007))。0℃付近での優れた生育速度、菌体収量、タンパク質分泌能といった観点で、低温適応微生物の探索を行い、宿主として開発することにより、より優れた生産システムの構築が可能になると考え、本研究を計画するに至った。

一方、低温適応微生物は寒冷地での環境浄化などのバイオプロセスに有用であることが期待されていた。そこで、取得した低温適応微生物を種々の低温バイオプロセスに利用するための基盤的知見を得ることも計画した。また、低温適応微生物に特徴的な有用物質(機能性脂質として知られる高度不飽和脂肪酸など)の生産系開発に向けた研究も計画した。

2. 研究の目的

各地の低温環境から0℃付近で良好に生育する低温適応微生物を取得する。熱安定性の低いタンパク質などを生産する宿主としてそれらの低温適応微生物を開発する。また、寒冷地での金属汚染環境の浄化や希少金属資源の回収に微生物を利用するための基盤的知見を得ることを目的として、これらの低温適応微生物の金属代謝を担う分子基盤を明らかにする。さらに、低温適応微生物に特徴的な有用物質の生産に関与する酵素の機能解析を行う。特に、機能性脂質として知られる高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の生合成機構を明らかにする。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バイオプロセスの基盤を築く。

3. 研究の方法

(1) 低温適応微生物のスクリーニング: 低温

環境から採取した土壌サンプルなどをLB培地に懸濁後、寒天培地にプレティングし、低温でインキュベーションした。良好な生育が見られたコロニーから菌体を採取し、液体培養によって低温での生育速度、菌体収量、培養上清に回収される分泌タンパク質などの分析を行った。優れた特性が認められた菌株について、16S rRNAをコードする遺伝子を増幅し、配列解析によって種を同定した。

(2) Shewanella 属細菌の遺伝子破壊: 以前報告した相同組み換えに基づく手法(Kawamoto *et al.*, *J. Bacteriol.* **191**, 632 (2009))で遺伝子破壊株を取得した。まず、Shewanella 属細菌内で自律複製能をもたない pKNOCK 系プラスミドに、破壊対象とする遺伝子の部分配列を導入した。これを *Escherichia coli* S17-1/ pir からの接合伝達によって Shewanella 属細菌に導入し、相同組み換えによって生じる遺伝子破壊株を、薬剤耐性を指標として単離した。

(3) タンパク質の部位特異的変異実験: 鉄代謝に関与する外膜タンパク質 PhoE の機能性アミノ酸残基の同定においては、部位特異的変異実験を行った。具体的には、部位特異的変異を導入した PhoE 遺伝子をコードする発現プラスミドを、PhoE 遺伝子破壊株に導入し、三価鉄を電子受容体とする嫌気培養での生育能や鉄還元能を調べることで、各アミノ酸残基の機能を評価した。

4. 研究成果

(1) 中国の内モンゴル寒冷地域で採取した土壌サンプルについて、低温適応微生物をスクリーニングした。その結果、4℃においてLB寒天培地で良好に生育する微生物が得られた。16S rRNAをコードする遺伝子の配列解析を行った結果、本菌は *Pseudomonas mandelii* と同定された。さらに、金属汚染低温環境の浄化などに有用な微生物の探索を目的として、スクリーニングを行った。鉄還元能に優れた低温菌を取得するため、最終電子受容体として30 mM クエン酸鉄を含む合成培地に各種土壌を添加し、嫌気条件下、4℃でインキュベートした。その結果、鉄還元能に優れた微生物として、16S rRNAの配列上、*Paenibacillus odorifer* や *Bacillus circulans* と近縁の細菌が取得された。

(2) 低温環境に生息する魚類の腸内から低温での増殖能とタンパク質分泌生産能に優れた低温適応微生物を探索した。その結果、菌体外に70 kDaのタンパク質を分泌高生産する細菌 *Pseudoalteromonas* sp. Hpa2 が得られた。本菌はタンパク質低温生産系の宿主として有用と期待された。全ゲノム解析を行い、分泌高生産される70 kDaのタンパク質の遺伝子を同定した。

(3) 低温でタンパク質を生産するシステムの開発を目的として、低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 で機能する高発現用プロモーターや、培養条件で発現制御が可能なプロモーターの探索を行った。4 と 18 で生育させた本菌のプロテオーム比較から見いだされた低温誘導性タンパク質について、転写レベルでの発現量を解析した結果、*sdhB*、*aldF*、*atoS*、*rib_ppkin* の 4 種について、4 において 18 の 15 倍以上の誘導が見られた。これらのプロモーターは低温誘導的なタンパク質の生産系を構築する上で有用と考えられた。また、本菌が菌体外に膜小胞を生産することを見いだすとともに、膜小胞に含まれるタンパク質を同定した。さらに、遺伝子操作により膜リン脂質組成を改変することで膜小胞の生産性を向上できることを見いだした。これらの知見は、本菌の膜小胞を利用した低温でのタンパク質分泌生産系の構築に有用と考えられる。

(4) 低温環境に生息する魚類腸内から低温増殖性とタンパク質分泌生産能に優れた低温菌 *Shewanella* sp. HM13 を取得し、本菌のゲノムの特定部位に任意の DNA 断片を導入する手法を確立した。この系は、熱安定性の低い低温活性酵素などの低温での生産に有用と期待される。

(5) 多様な金属代謝能をもつことが知られる *Shewanella* 属細菌について金属代謝機構の解析を進めた。低温環境での環境浄化への応用が期待される南極海水由来の低温菌 *S. livingstonensis* Ac10 による鉄還元、リン酸欠乏時の誘導生産が知られるポーリンタンパク質 PhoE のホモログが関与することを示した。三価鉄を電子受容体とする嫌気培養では、リン酸濃度が高い場合にも PhoE ホモログ欠損株の生育速度が低下することを見だし、本菌が三価鉄を電子受容体として利用する上で PhoE ホモログが重要な働きをすることを明確にした。リン酸の輸送に関与する *Escherichia coli* の PhoE については、親水的な筒型構造を膜内で形成し、そこに含まれる正電荷を有するアミノ酸残基がリン酸の輸送に関与することが知られている。*S. livingstonensis* Ac10 の PhoE について立体構造予測を行ったところ、13 個のリジン残基と 5 個のアルギニン残基がポーリン孔内に存在することが示唆された。これらの残基をそれぞれグルタミン酸残基に置換し、本菌の鉄呼吸能への影響を解析した結果、Lys313 がクエン酸鉄 (III) の取り込みに重要な役割を果たすことが示された。

(6) 低温菌 *S. livingstonensis* Ac10 と、近縁の常温菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 の鉄取り込み系を比較した。多くの細菌の鉄輸送に、TonB や ExbD で構成される膜タンパク質複合体 (TonB 依存型輸送体) が関与するこ

とが知られている。両菌株について、これらのタンパク質の欠損株を作製した結果、MR-1 株では鉄還元能の低下が見られたのに対し、Ac10 株では鉄還元能に変化は見られなかった。一方、PhoE の欠損は Ac10 株では鉄還元能の低下をもたらしたのに対し、MR-1 では鉄還元能への影響は見られなかった。これらの結果から、両菌株は異なる鉄取り込み系を利用しているものと考えられた。

(7) 南極海水由来の低温適応細菌 *S. livingstonensis* Ac10 は 0 付近の低温条件下で、高度不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA) を含むリン脂質を生産する。機能性脂質として注目される EPA 含有リン脂質の生産系構築に向けて、本菌における EPA 含有リン脂質の生合成機構を解析した。本菌はリゾホスファチジン酸の *sn*-2 位にアシル鎖を導入する酵素 PlsC のホモログを 5 つもつが、このうち PlsC1 が EPA 含有リン脂質の生合成を担うことが示された。PlsC1 の細胞内局在性を解析した結果、分裂途中の細胞の中央部に本酵素が局在することが示された。一方、EPA の生合成に關与するタンパク質 Orf5 も類似した局在性を示した。PlsC1 の細胞中央部への局在は、Orf5 を欠損した変異株では見られなくなったことから、PlsC1 と Orf5 の間に相互作用のあることが示唆された。EPA 含有リン脂質の生合成において、EPA 生合成酵素から EPA 含有リン脂質生合成酵素に効率よく基質が供給される仕組みのあることが考えられた。

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 6 件)

Characterization of extracellular membrane vesicles of an Antarctic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, and their enhanced production by alteration of phospholipid composition, Yokoyama F, Kawamoto J, Imai T, Kurihara T (2017) *Extremophiles* 印刷中 査読有 DOI: 10.1007/s00792-017-0937-z

A phosphoprotein homolog plays a critical role in the dissimilatory iron-respiration linked to iron (III) reduction by a cold-adapted bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, Ohke Y, Maruyama S, Tarui J, Wang Y, Kawamoto J, Kurihara T (2016) *Trace Nutr Res* **33**: 63-72 査読有

Development of a versatile method for targeted gene deletion and insertion by using the *pyrF* gene in the psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, Ito T, Gong C, Kawamoto J, Kurihara T (2016) *J Biosci Bioeng* **122**: 645-651 査読有

低温菌の低温環境への適応メカニズム, 川本純, 栗原達夫 (2015) *生物工学会誌* 93: 477-480 査読無

Alkyl hydroperoxide reductase enhances the growth of *Leuconostoc mesenteroides* lactic acid bacteria at low temperatures, Goto S, Kawamoto J, Sato SB, Iki T, Watanabe I, Kudo K, Esaki N, Kurihara T (2015) *AMB Express* 5: 11 査読有
DOI: 10.1186/s13568-015-0098-3

低温菌のタンパク質と脂質, 川本純, 栗原達夫 (2014) *CSJ カレントレビュー* 17 極限環境の生体分子 55-61 査読無

[学会発表](計 18 件)

陳晨, 河合総一郎, 川本純, 今井友也, 栗原達夫, Analysis of a protein secretion mechanism via the membrane vesicle production of a cold-adapted bacterium, *Shewanella* sp. HM13, 日本農芸化学会 2017 年度大会 平成 29 年 3 月 18 日 京都女子大学 (京都府 京都市)

大毛淑恵, 丸山沙織, 樽井惇, 王玉, 川本純, 栗原達夫, 低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の鉄呼吸における Phosphoporin ホモログの生理機能, 第 17 回極限環境生物学会年会 平成 28 年 11 月 26 日 東京工業大学 (神奈川県 横浜市)

横山文秋, 川本純, 今井友也, 小川拓哉, 栗原達夫, 低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 による菌体外膜小胞の生産とエイコサペンタエン酸生産能の欠損が膜小胞分泌におよぼす影響, 第 89 回 日本生化学会大会 平成 28 年 9 月 27 日 仙台国際センター (宮城県 仙台市)

Chen C, Kawai S, Kawamoto J, Imai T, Kurihara T, Analysis of protein secretion system of a membrane-vesicle producing cold-adapted bacterium, *Shewanella* sp. HM13, Extremophiles 2016 平成 28 年 9 月 15 日 京都大学 (京都府 京都市)

Yokoyama F, Kawamoto J, Imai T, Ogawa T, Kurihara T, Molecular characterization of eicosapentaenoic acid-containing membrane vesicles produced by a psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, Extremophiles 2016 平成 28 年 9 月 13 日 京都大学 (京都府 京都市)

Kawamoto J, Kurihara T, Physiological function of polyunsaturated fatty acids in microbial cold and high-pressure adaptation, 5th International Workshop on Deep-Sea

Microbiology 平成 28 年 9 月 10 日 京都大学 (京都府 京都市)

大毛淑恵, 丸山沙織, 樽井惇, 王玉, 川本純, 栗原達夫, *Shewanella livingstonensis* Ac10 における三価鉄還元機構の解析, 第 33 回 日本微量栄養素学会学術集会 平成 28 年 6 月 25 日 京都リサーチパーク (京都府 京都市)

横山文秋, 川本純, 今井友也, 小川拓也, 栗原達夫, 低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の菌体外膜小胞の特性とエイコサペンタエン酸が小胞形成に与える影響の解析, 第 63 回 日本生化学会 近畿支部例会 平成 28 年 5 月 21 日 神戸薬科大学 (兵庫県 神戸市)

小倉隆太郎, 趙賢南, 川本純, 栗原達夫, 低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 のエイコサペンタエン酸生成酵素の細胞分裂部位への局在性と複合体形成の解析, 日本農芸化学会 2015 年度大会 平成 27 年 3 月 28 日 岡山大学津島キャンパス (岡山県 岡山市)

小倉隆太郎, 趙賢南, 川本純, 栗原達夫, 低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 における EPA 生成酵素の局在性と相互作用解析, 第 15 回極限環境生物学会年会 平成 26 年 11 月 2 日 今帰仁村コミュニティセンター (沖縄県 国頭郡)

丸山沙織, 樽井惇, 王玉, 川本純, 栗原達夫, 低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の金属呼吸に關与する外膜輸送タンパク質の解析, 第 15 回極限環境生物学会年会 平成 26 年 11 月 2 日 今帰仁村コミュニティセンター (沖縄県 国頭郡)

豊竹洋佑, 趙賢南, 川本純, 江崎信芳, 栗原達夫, 低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の飽和脂肪酸含有リン脂質合成に關与する新規アシルトランスフェラーゼの解析, 第 87 回日本生化学会大会 平成 26 年 10 月 18 日 国立京都国際会館 (京都府 京都市)

小倉隆太郎, 趙賢南, 川本純, 栗原達夫, 低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の細胞分裂サイトへのエイコサペンタエン酸生成酵素の局在, 第 87 回日本生化学会大会 平成 26 年 10 月 18 日 国立京都国際会館 (京都府 京都市)

Kurihara T, Membrane microdomain enriched in eicosapentaenoic acid-containing phospholipids in *Shewanella livingstonensis* Ac10, Japan-Italy Joint Symposium 平成 26 年 11 月 5 日 東大寺総合文化センター (奈良県 奈良市)

小倉隆太郎, 趙賢南, 川本純, 栗原達夫, 低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 のエ

イコサペンタエン酸生合成酵素の局在性解析, 日本農芸化学会 2014 年度大会 平成 26 年 3 月 29 日 明治大学生田キャンパス (神奈川県 横浜市)

趙賢南, 笠井涉, 川本純, 江崎信芳, 栗原達夫, Subcellular localization of 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase responsible for the synthesis of EPA-containing phospholipids in *Shewanella livingstonensis* Ac10, 日本農芸化学会 2014 年度大会 平成 26 年 3 月 29 日 明治大学生田キャンパス (神奈川県 横浜市)

Cho HN, Kasai W, Kawamoto J, Esaki N, Kurihara T, Localization of 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase (PlsC1) of a psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, at the middle of cells and its physiological role in cell division, EMBO/EMBL Symposium New Approaches and Concepts in Microbiology 平成 25 年 10 月 14 日 -16 日 EMBL Advanced Training Centre (Heidelberg, Germany)

趙賢南, 笠井涉, 川本純, 江崎信芳, 栗原達夫, Physiological role of 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 (PlsC1) in cell division of a psychrotrophic bacterium in *Shewanella livingstonensis* Ac10 at low temperatures, 第 86 回日本生化学会大会 平成 25 年 9 月 11 日 パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市)

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：7 0 2 4 3 0 8 7

(2) 研究分担者

川本 純 (KAWAMATO, Jun)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：9 0 5 1 1 2 3 8