

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450105

研究課題名(和文) 好熱性桿菌の遺伝子工学技術を基盤とした耐熱性有用酵素群の新開拓

研究課題名(英文) Exploration of useful thermostable enzymes using *Geobacillus* spp. and their genetic engineering

研究代表者

鈴木 宏和 (Suzuki, Hirokazu)

鳥取大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80462696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：好熱菌を宿主としたDNAライブラリーの構築，ならびにその高温活性スクリーニングを通じた耐熱性酵素遺伝子の探索を目的とした。高性能なライブラリー宿主として好熱菌MK244を構築し，他好熱菌のゲノムライブラリーから耐熱性酵素遺伝子を活性スクリーニングすることに成功した。さらに，好熱菌で機能する新規薬剤耐性マーカーや好熱菌宿主OS27など，新たな遺伝学的ツールを開発した。OS27は非常に安定かつ高コピーにプラスミドを維持できたことから，耐熱性有用酵素の探索において，さらに有用と期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at facile construction of thermophile DNA libraries in thermophiles and efficient identification of thermostable enzyme genes via in vivo functional screening of the libraries. We established an efficient method to construct DNA libraries in the thermophile *Geobacillus kaustophilus* MK244, which lacks DNA restriction-modification systems. This method can be used to construct DNA libraries of some thermophiles and to identify the genes for orotidine-5'-phosphate decarboxylase via in vivo functional screening. We also examined functional screening for other enzyme genes but obtained false positives, probably due to instability of the cloning vector pUCG18T. Thus, we developed new host-vector systems and successfully identified *Geobacillus* spp. OS27, which can maintain the plasmid pUCG18T with higher copy numbers and higher stabilities than *G. kaustophilus*. This system may be further practical in constructing DNA libraries and identifying thermophile genes.

研究分野：応用微生物学，酵素工学，進化学

キーワード：ジオバチラス 活性スクリーニング 好熱菌 ゲノムライブラリー 高温機能性 宿主ベクター系

1. 研究開始当初の背景

- (1) 酵素は高い反応特異性や環境調和性を兼ね備えた優れた触媒である。とりわけ耐熱性酵素は、安定性に優れていることから、実用性が高い。また耐熱性酵素は、高温で進行するバイオプロセスにも利用できる。このような高温プロセスには、病原菌の増殖抑制、高化学反応性、および化合物水溶性の上昇などといった、常温プロセスにはない多くの長所が指摘されており、高温プロセス環境粗材を取り扱うバイオマス分解などにおいて特に有益である。これらの理由から、様々な耐熱性酵素が自然界から同定されており、その利用が広く研究されている。しかし、耐熱性酵素の同定は、一般的な常温酵素の同定と同様に容易ではなく、大腸菌を基盤とした活性スクリーニングがやりづらい点で、むしろ難しい。
- (2) セルラーゼやキシラナーゼなどの植物バイオマス分解酵素を探索・活用する研究は、古くから進展してきた。環境エネルギーに関する観点から、近年において植物バイオマスの再利用技術(バイオリファインリー)に高い注目が集まっていることが、その理由の一つとして挙げられる。背景(1)も関連して、耐熱性の植物バイオマス分解酵素についても、活発な探索研究が行われている。

2. 研究の目的

一般に耐熱性酵素は高温でより高い活性を示すことから、好熱菌を宿主としたライブラリーは、耐熱性酵素の活性スクリーニングに効率的と期待できる。そこで本研究では、研究代表者らが構築した好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 の遺伝子工学的技術を活用しながら、

- (1) *G. kaustophilus* を宿主とした DNA ライブラリーの効率的な構築法の確立
- (2) *G. kaustophilus* を宿主とした DNA ライブラリーを高温活性スクリーニングすることによる有用酵素遺伝子の探索

に取り組み、耐熱性有用酵素群の新たな開拓ならびにスクリーニングのための新手法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) *G. kaustophilus* を宿主とした DNA ライブラリーの効率的構築：*G. kaustophilus* の制限修飾系遺伝子群を網羅的に破壊し、MK244 株を構築した。その一方で、*E. coli*-*Geobacillus* シャトルプラスミド

pUCG18T と大腸菌 DH5 α を用いて、既知好熱菌 (*Bacillus caldolyticus* DSM 405 と *Geobacillus subterraneus* DSM 13552) および未知土壌好熱菌のゲノムライブラリーを構築した。つづいて得られた大腸菌ライブラリーの pUCG18T を *G. kaustophilus* MK244 に接合伝達で導入することで、MK244 を宿主とした好熱菌ゲノムライブラリーを構築した。さらに当該ライブラリー中のウラシル生合成遺伝子 *pyrF* を活性スクリーニングすることで、得られた好熱菌ゲノムライブラリーが耐熱性酵素のスクリーニングに有用であることを確認した。

- (2) 糖代謝酵素の活性スクリーニング：*G. kaustophilus* MK244 はフルクトース、セルロース、ラクトース、キシラン、およびガラクトマンナンを資化できない。そこで、これら炭素源を資化できる好熱菌 (*B. caldolyticus* DSM 405, *B. caldovelox* DSM 406, *G. subterraneus* DSM 13552, および *G. stearothermophilus* XL-56-6) のゲノムライブラリーを上記した手法にしたがい構築し、MK244 株にフルクトース、セルロース、ラクトース、キシラン、およびガラクトマンナン資化能を付与する DNA 断片をスクリーニングした。
- (3) 新たな宿主ベクター系の構築：実験(2)の結果から、*G. kaustophilus* をライブラリー宿主とするには、プラスミドを安定に維持するための工夫が必要と考えられた。そこで新たな好熱菌薬剤耐性マーカーの創出や、プラスミドを安定に維持する好熱菌の探索などによる、新規宿主ベクター系の開発に取り組んだ。
- (4) 異種好熱菌の任意遺伝子を *G. kaustophilus* 細胞を用いて機能評価する：ライブラリー化ではなく、任意遺伝子の機能を *G. kaustophilus* 細胞内で評価できるかどうかを検討した。評価する遺伝子を得るために、多様な糖質分解能力のある好熱菌を探索し、そのドラフトゲノム配列を解析した。ゲノム中に見出された候補遺伝子を MK244 株中で発現させ、発現する活性を評価した。

4. 研究成果

- (1) *G. kaustophilus* を宿主とした DNA ライブラリーの効率的構築：*G. kaustophilus* の制限修飾系を破壊した MK244 株を構築できた。MK244 を宿主とした複数の好熱菌ゲノムライブラリーも構築できた。MK244 株は制限修飾系を欠失していることから、大腸菌からのプラスミドを効率よく受容し、従来は不可能であった規模のライブラリーを構築することができた。得られ

た MK244 ライブラリーを用いて、ウラシル生合成遺伝子 *pyrF* を活性スクリーニングしたところ、推定 *pyrF* 遺伝子を含む DNA 断片がいずれのライブラリーからも首尾よく得られた。これら DNA 断片に含まれる *pyrF* 遺伝子は、大腸菌内では機能しなかった、もしくは機能しにくかったことから (図 1), *G. kaustophilus* を宿主としたライブラリーは、好熱菌遺伝子の活性スクリーニングに有用と考えられる。

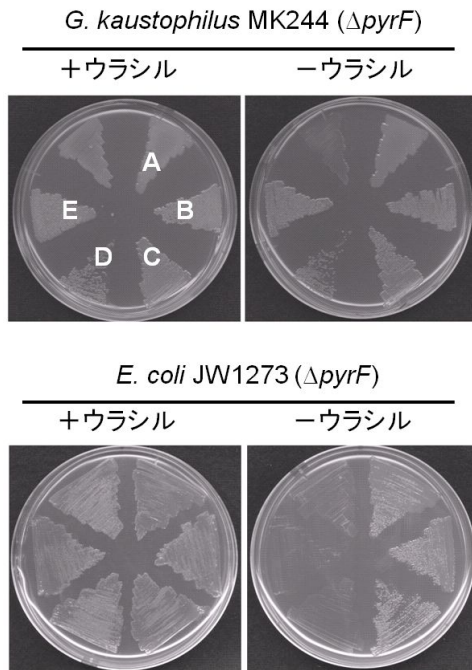


図 1 *G. kaustophilus* MK244 を宿主とした好熱菌 *pyrF* 遺伝子の活性スクリーニング。*pyrF* 遺伝子が機能すると、ウラシル欠失培地 (-ウラシル) でも効率よく生育できる。好熱菌 *pyrF* 遺伝子は *G. kaustophilus* MK244 中では効率よく機能したが (上), 大腸菌内では機能しにくかった (下)。A~C, 未同定好熱菌; D, *B. caldolyticus*; E, *G. subterraneus*。

- (2) 糖代謝酵素の活性スクリーニング：MK244 ゲノムライブラリーから、フルクトース、セルロース、ラクトース、キシラン、およびガラクトマンナンの代謝に関わる酵素遺伝子を活性スクリーニングしたところ、全スクリーニングにおいて陽性クローンが得られたが、それらが保有するプラスミドは全て挿入 DNA 断片を欠失していた。プラスミドが小型化したため、維持に要するエネルギーが減少し、生育速度が上昇したため、このようなクローンが得られたと思われる。このことから、*G. kaustophilus* をライブラリー宿主とするには、プラスミドを安定するための工夫が必要と考えられた。

- (3) 新たな宿主ベクター系の構築：成果(3)か

ら、*G. kaustophilus* をライブラリー宿主とするには、プラスミド安定維持の改善が必要と考えられたことから、新たな宿主ベクター系の開発に取り組み、以下の研究成果を得た。

プラスミドの新たな選択マーカーとして、高温機能性クロラムフェニコール耐性遺伝子を創出し、それを用いたプラスミドを作製した。クロラムフェニコール耐性遺伝子は、大腸菌と *G. kaustophilus* の両微生物中で機能するため、これを用いれば *E. coli*-*Geobacillus* シャトルプラスミドの小型化ができる。構築したプラスミドは、クロラムフェニコール選択によって大腸菌と *G. kaustophilus* の両方を形質転換できた。

高温機能性チオストレプトン耐性遺伝子を創出し、それを用いたプラスミドを作製した。構築したプラスミドはチオストレプトン選択によって、*G. kaustophilus* を形質転換できた。

G. kaustophilus が本来持っている大型プラスミド pHTA426 をキュアリングした。これにより、より多くの長鎖プラスミドが安定に維持されると期待できる。

別途単離した好熱菌 OS27 の遺伝子改変を検討したところ、本菌は非常に安定かつ高コピーにプラスミド pUCG18T を維持することを見出した (図 2)。本結果は、OS27 と pUCG18T がライブラリー構築のための優れた宿主ベクター系であることを示唆しており、今後の有用酵素遺伝子の探索における新たな可能性が拓かれたといえる。OS27 を汎用的宿主にするには、DNA 導入を容易にする工夫が必要であることから、OS27 の制限修飾系を破壊した派生株の開発が、ライブラリー構築の更なる効率化には重要である。

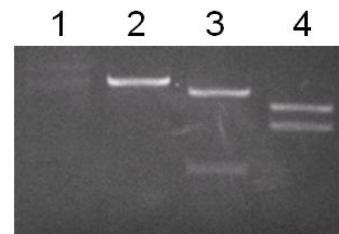


図 2 OS27 株はプラスミドを高コピーに維持する。レーン 1, *G. kaustophilus* 由来の pUCG18T (BamHI 消化); レーン 2, OS27 株由来の pUCG18T (BamHI 消化); レーン 3, OS27 株由来の pUCG18T (BamHI/NcoI 消化); レーン 4, OS27 株由来の pUCG18T (SphI 消化)。

(4) 異種好熱菌の任意遺伝子を *G. kaustophilus* 細胞を用いて機能評価する: OS27 株はアルギン酸やフコイダンといった特殊な多糖類も資化できることから、有用な耐熱性酵素の供給源としても有用である。好熱菌 OS27 株と、その標準株 DSM 465 のゲノム配列を比較したところ、OS27 に特徴的な糖分解酵素遺伝子を幾つか見出した。それらの機能を推定するために、当該遺伝子の発現系を MK244 に導入し、発現産物の活性をスクリーニングした。検討した基質については有意な活性が見られなかったが、同属の異種遺伝子発現は比較的容易であることから、本戦略は少なくとも *Geobacillus* 属細菌の遺伝子解析には有効と期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

- (1) Yurie Tominaga, Takashi Ohshiro, Hirokazu Suzuki. Conjugative plasmid transfer from *Escherichia coli* is a versatile approach for genetic transformation of thermophilic *Bacillus* and *Geobacillus* species. *Extremophiles* 20, 375-381 (2016) 査読あり
DOI: 10.1007/s00792-016-0819-9
- (2) Keisuke Wada, Jyumpei Kobayashi, Megumi Furukawa, Katsumi Doi, Takashi Ohshiro, Hirokazu Suzuki. A thiostrepton resistance gene and its mutants serve as selectable markers in *Geobacillus kaustophilus* HTA426. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 80(2), 368-375 (2016) 査読あり
DOI: 10.1080/09168451.2015.1079478
- (3) Jyumpei Kobayashi, Misaki Tanabiki, Shohei Doi, Akihiko Kondo, Takashi Ohshiro, and Hirokazu Suzuki. Unique plasmids generated via pUC replicon mutagenesis in an error-prone thermophile derived from *Geobacillus kaustophilus* HTA426. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 7625-7632 (2015) 査読あり
DOI: 10.1128/AEM.01574-15
- (4) Jyumpei Kobayashi, Megumi Furukawa, Takashi Ohshiro, and Hirokazu Suzuki. Thermodaptation-directed evolution of chloramphenicol acetyltransferase in an error-prone thermophile using improved procedures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 5563-5572 (2015) 査読あり
DOI: 10.1007/s00253-015-6522-4
- (5) Jyumpei Kobayashi, Misaki Tanabiki, Megumi Furukawa, Hisashi Yagi, Takashi Ohshiro, Hirokazu Suzuki. Generation of chloramphenicol resistance plasmids functional at high temperatures by using an error-prone thermophile. *Conference Proceedings of International Biotechnology, Chemical Engineering and Life Science Conference 2014 (IBCELC)*, 66-73 (2014) 査読あり
- (6) Hirokazu Suzuki, Keisuke Wada, Megumi Furukawa, Katsumi Doi, Toshihisa Ohshima. A ternary conjugation system for the construction of DNA libraries for *Geobacillus kaustophilus* HTA426. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 77(11), 2316-2318 (2013) 査読あり
DOI: 10.1271/bbb.130492

〔学会発表〕(計12件)

- (1) 鈴木宏和. 好熱菌細胞を利用した進化学が導く意外な遺伝子機能
国立大学法人九州大学 創立百周年記念 公益財団法人発酵研究所助成寄附講座 「極限環境微生物ゲノム機能開発学」最終成果報告会
九州大学(博多) 2016年3月8日
- (2) 水野 樹, 八木 寿梓, 大城 隆, 鈴木 宏和. 新たな好熱菌細胞工場を志向した *Geobacillus kaustophilus* HTA426 のプラスミドキュアリングと影響評価
2015年度 日本農芸化学会中四国支部第44回講演会(例会)
岡山県立大学(岡山) 2015年1月23日
- (3) 鈴木 宏和, 奥中 淳平, 藤井 健太, 八木 寿梓, 大城 隆. 海藻多糖類を資化する好熱菌の単離
2015年度 日本生物工学会大会
城山観光ホテル(鹿児島) 2015年10月27日
- (4) 田摩 実咲, 小林淳平, 八木 寿梓, 大城 隆, 鈴木 宏和. 好熱菌細胞内変異で創出された変異型 pUC レプリコンの大腸菌内特性
2015年度 日本農芸化学会中四国支部第42回講演会(例会)
鳥取大学(鳥取) 2015年6月13日
- (5) 富永 有里絵, 八木 寿梓, 大城 隆, 鈴木 宏和. 好熱性バチラス属細菌へのプラスミド導入における接合伝達法の汎用性
2015年度 日本農芸化学会中四国支部第42回講演会(例会)
鳥取大学(鳥取) 2015年6月13日
- (6) 水野 樹, 八木 寿梓, 大城 隆, 鈴木 宏和. 好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 が有する大型プラスミド pHTA426 の遺伝学的解析

2015 年度 日本農芸化学会中四国支部第
42 回講演会(例会)
鳥取大学(鳥取)2015 年 6 月 13 日

(7) 鈴木 宏和, 小林 淳平, 古川 恵, 八木 寿
梓, 大城 隆. *Geobacillus kaustophilus*
HTA426 高変異性株を利用した耐熱化変
異酵素遺伝子の創出法
2015 年度 日本農芸化学会年会
岡山大学(岡山)2015 年 3 月 27 日

(8) 小林 淳平, 田摩 実咲, 土井 奨平, 古川
恵, 八木 寿梓, 大城 隆, 鈴木 宏和.
Geobacillus kaustophilus HTA426 高変異性
株で派生した高温機能型クロラムフェニ
コール耐性プラスミドの解析
2015 年度 日本農芸化学会年会
岡山大学(岡山)2015 年 3 月 27 日

(9) 和田 圭介, 小林 淳平, 古川 恵, 土居 克
実, 八木 寿梓, 大城 隆, 鈴木 宏和.
Geobacillus kaustophilus HTA426 で機能す
るチオストレプトン耐性マーカーの創出
2015 年度 日本農芸化学会年会
岡山大学(岡山)2015 年 3 月 27 日

(10) 鈴木 宏和, 小林 淳平, 田摩 実咲, 古
川 恵, 八木 寿梓, 大城 隆. 好熱菌
Geobacillus kaustophilus HTA426 に高温
下クロラムフェニコ-ル耐性を付与す
る変異プラスミド
2014 年度 日本生物工学会(札幌コンベン
ションセンター)2014 年 9 月 10 日

(11) Jyumpei Kobayashi, Misaki Tanabiki,
Megumi Furukawa, Hisashi Yagi, Takashi
Ohshiro, Hirokazu Suzuki. Generation of
chloramphenicol resistance plasmids
functional at high temperatures by using an
error-prone thermophile
2014 International Biotechnology, Chemical
Engineering and Life Science Conference
(IBCELC)
Okinawa, Japan ; 2014 年 9 月 4 日

(12) 鈴木 宏和, 和田 圭介, 古川 恵, 土居
克己, 大島 敏久. 三者接合法による
Geobacillus kaustophilus HTA426 への高
効率プラスミド導入
2013 年度 日本生物工学会(広島)2013
年 9 月 19 日

〔その他〕

<http://www.bio.tottori-u.ac.jp/~kino1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 宏和 (Suzuki, Hirokazu)
鳥取大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 80462696

(2) 連携研究者

諸野 祐樹 (Morono, Yuki)
海洋研究開発機構・高知コア研究所・サ
ブリーダー
研究者番号: 30421845