

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102
 研究種目：基盤研究(B) (一般)
 研究期間：2016～2019
 課題番号：16H04895
 研究課題名(和文)"A Sweet and Calorie-free Bacillus!": Production of L-glucose in *B. subtilis*
 研究課題名(英文)"A Sweet and Calorie-free Bacillus!": Production of L-glucose in *B. subtilis*

研究代表者
 中村 顕 (Nakamura, Akira)
 筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：10207863
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は新規イノシトール代謝経路とL-グルコース代謝経路を組み合わせることにより、安価なmyo-イノシトールを原料として非消化性のL-グルコースを醗酵生産する系を、枯草菌を宿主に確立することを目指した。自身が持つイノシトール代謝経路を破壊した枯草菌を宿主に*iolM*, *iolN*, *IgnH*を発現させ、L-グルコン酸を生産する系の構築を目指したが、導入遺伝子の発現量不足のため、産物の検出には至らなかった。並行してL-グルコースデヒドロゲナーゼの立体構造解析と改変に取り組み、R178残基がイノシトールに対する活性に必須であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
 当初予定していた、枯草菌を宿主としたL-グルコース醗酵生産系の確立には至らなかったが、本研究成果をもとにさらに検討を加えることにより、達成は可能であると考えている。将来的にはmyo-inositolという安価な材料からL-グルコースを生産することが可能になると期待される。また、新規酵素LgdAの立体構造を明らかにし、その構造・機能相関を解析した点、特にR178残基の変異によりL-グルコースにのみ活性を有する酵素が創出できた点は、学術的に意義がある。

研究成果の概要(英文)：In this study we aimed to construct an L-glucose production system in *Bacillus subtilis* by heterologous expression of *iolM*, *iolN* and *IgnH* genes to produce L-gluconate from myo-inositol. By using synthetic genes optimized for the codon usages of *B. subtilis* and a strong promoter, these genes can be expressed in *B. subtilis* at some extent. We introduced these three genes as an operon on a plasmid to *B. subtilis* strain deficient for intrinsic inositol catabolic genes, however, conversion of myo-inositol to L-gluconate was not observed. It may be due to low expression of these genes. On the other hand, to obtain a mutant protein of LgdA (L-glucose dehydrogenase) having reverse reaction activity, we have determined its three-dimensional structure. We identified several residues for substrate binding, of which R178 was proven to be essential for inositol dehydrogenation activity, but not for L-glucose dehydrogenation.

研究分野：応用微生物学

キーワード：L-glucose L-gluconate 枯草菌 イノシトール 醗酵生産 結晶構造解析 部位特異的変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

L-グルコースは自然な甘味を持ちヒトが代謝できないことから、非消化性甘味料としての利用が期待されるうえ、その pentaacetate 体がインシュリン分泌促進能を有しているとされ、糖尿病の治療薬としての利用も期待されている。ところがL-グルコースは自然界には存在しないため、酵素反応あるいは化学反応を用いて合成する必要があるが、実用化には至っていない。

2. 研究の目的

研究代表者は以前に *Paracoccus laeviglucoosivorans* 43P 株の L-グルコース代謝経路を明らかにしている(図 1)が、この代謝経路では中間体として 5-keto-L-gluconate が生じる。この化合物は *Thermotoga maritima* の新規 inositol 代謝経路の中間体でもある。そこでこれらの代謝経路を組み合わせて、安価な myo-inositol (MI) から L-gluconate を経て L-グルコースの生産が可能であると考えた。そこで本研究では、GRAS として安全性が担保され、inositol 代謝経路を有している枯草菌の inositol 代謝経路欠損株を作製し、それを宿主として上記の代謝酵素遺伝子を発現させることにより、MI から L-gluconate、または L-グルコースを醗酵生産する系を確立することを目的とした(図 2)。

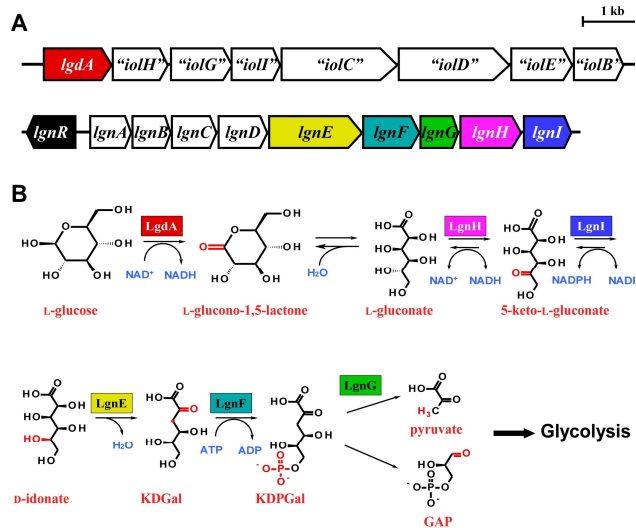


図 1 *P. laeviglucoosivorans* の L-glucose 代謝経路
A, 代謝酵素の遺伝子配置
B, L-glucose 代謝経路

3. 研究の方法

(1) 枯草菌宿主の改良

枯草菌は MI の代謝能を有しているため、MI 取り込み系および初発酵素の IolG が利用可能だが、野生株では MI を代謝してしまう。そこで IolG 以降の代謝酵素遺伝子を破壊した株を作製し、これを宿主として用いた。さらにこの株を元に *iolG* を高発現させることにより、効率的に MI を inosose へ変換する活性を高めた株を作製し、これを L-gluconate 生産宿主として用いた。

(2) IolM, IolN オルソログの選定と枯草菌を宿主とした高発現条件の検討

T. maritima は超好熱菌のため、同株の IolM, IolN は枯草菌が生育する常温では活性が低いことが予想された。そこでゲノムデータベースより IolM, IolN オルソログを検索し、それらを大腸菌で発現・酵素精製を行い、所定の活性を有しており、かつ常温でより強い活性を示すものを選抜した。

これらの遺伝子を pHT255 上に導入し、発現を確認するとともに、より強発現を目指して、プロモーターの変更及び枯草菌コドン使用頻度に最適化した合成遺伝子の使用を検討した。

(3) L-gluconate 醗酵生産系の構築

上記の検討の後、*iolMN* オルソログ及び *lgnH* をオペロンの形で pHT255 にクローン化し、これを枯草菌宿主に導入して、MI を変換基質として培養し、L-gluconate 生産が可能かどうかを検討した。また、導入遺伝子の安定保持を考慮して、枯草菌宿主のゲノムへの導入も検討した。

(4) 酵素改変による L-gluconate reductase の創製

P. laeviglucoosivorans の L-グルコース代謝初発酵素 LgdA (L-glucose dehydrogenase) は、逆反応が認められないため、野生型 LgdA は L-gluconate を L-グルコースへ変換するのに用いることはできない。そこで結晶構造解析により LgdA の立体構造を明らかにし、基質結合部位に変異を導入することにより、逆反応である L-gluconate reductase 活性を有する変異酵素の創製を目指した。

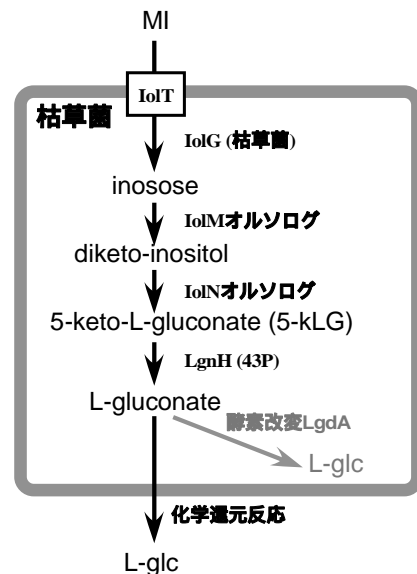


図 2 本研究のコンセプト

4. 研究成果

(1) 枯草菌宿主の改良

枯草菌 inositol 代謝系遺伝子のうち、*iolG*, *iolT* 及び *scyllo*-inositol dehydrogenase をコードする *iolW* 以外の遺伝子をすべて破壊した株(MYI04)をベースに、*iolW* を破壊した株を作製した(MYI04 *ΔiolW::neo*)。さらにこの株に対して、枯草菌強力プロモーター *PrpsO* の下流に *iolG* を接続し、*amyE* locus に導入した株(ΔW *PrpsO-iolG*)を作製した。 ΔW *PrpsO-iolG* 株を L-gluconate 醗酵生産系の構築の際の宿主として用いることとした。

(2) *IolM*, *IolN* オルソログの選定と枯草菌を宿主とした高発現条件の検討

T. maritima iolM, *iolN* (*TmaiolM*, *TmaiolN*) オルソログをゲノムデータベースで検索したところ、常温菌・中等度好熱菌 5 種が相同性 40% 以上のものを有していることが示された。そこでこれらの遺伝子を pET system を用いて大腸菌で発現させ、精製酵素について検討した結果、*Desulfotomaculum nigrificans* 由来 *IolM* (*DniIolM*) が *TmaiolM* と同様の活性を有し、さらに 37 で約 7 倍の比活性を示した。*IolN* については直接酵素活性を測定するのは困難であったため、*TmaiolM* とのカップリング反応により酵素反応を行い、生成物の 5-keto-L-gluconate を HPLC で検出することとした。その結果、*Acetomicrobium hydrogeniformans* 由来のもの(*AhyIolN*) が *TmaiolN* と同様の活性を有していることが明らかになった。この結果から *DniIolM* 及び *AhyIolN* を枯草菌内での発現候補とした。

次に *DniiolM*, *AhyiolN* 及び 43*PlgnH* の枯草菌内での発現を確認するために、各遺伝子を単独で pHT255 に導入し、*Pgrac100* プロモーターの制御下で C 末端に Strep-tag を付加する形で枯草菌に導入した。Strep-tag に対する Western-blotting の結果、*DniiolM* はある程度の発現量が確認できたが、*AhyiolN*, 43*PlgnH* はかろうじてバンドが確認できる程度の発現しか認められなかった。そこで *DniiolM* を例として、より高発現が可能な条件の検討を行った。その結果、発現用プロモーターを *Pgrac100* から *PrpsO* に変更し、さらに *DniiolM* を枯草菌コドン使用頻度に最適化した合成遺伝子(*DniiolM*(*Bs*))に変更することにより、高発現が可能になったことが明らかになった。

(3) L-gluconate 醗酵生産系の構築

上記の結果より、枯草菌宿主及び導入遺伝子の発現系の検討が終了したので、pHT255 上に *DniiolM*(*Bs*), *AhyiolN*(*Bs*), 43*PlgnH*(*Bs*) をオペロン状に連結して導入し、これを枯草菌 ΔW *PrpsO-iolG* 株に導入した。この株を 10 mM MI を添加した LB 培地で培養し、培養上清を LC-MS で分析したが、培地由来の夾雑物などの影響もあり、基質の MI 以外の酵素反応産物は検出されなかった。そのため、inosose 以降の反応産物が菌体内に蓄積されているか、あるいは反応産物が微量のため検出できない可能性が考えられた。

そこで同株の細胞抽出液を用いて、MI を基質として 37、12 時間反応させ、LC-MS で分析したところ、*IolG*, *IolM* の反応産物である inosose, diketo-inositol は検出されたが、*IolN* 以降の反応産物は検出されなかった。このことから、*iolN*, *lgnH* の発現量を増強させる必要があることが明らかになった。

以上のように、当初目的としていた L-gluconate 醗酵生産系の構築は、研究期間内に達成することができなかった。今後は *iolN*, *lgnH* の発現の増強

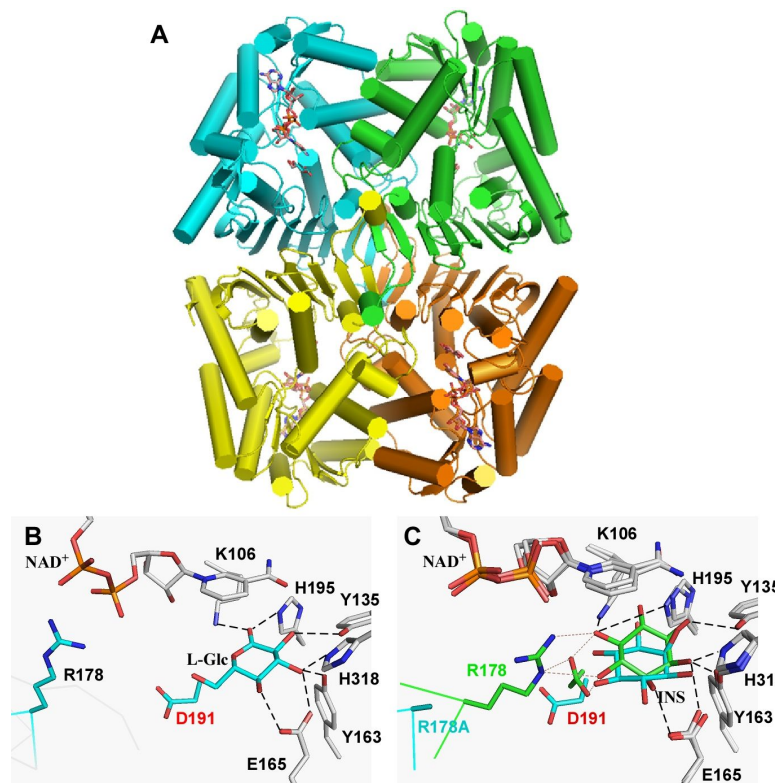


図3 LgdAの立体構造

A, LgdAの全体構造。各サブユニットを異なる色で示した。

B, L-glucose (L-Glc)の野生型酵素との結合部位。水素結合を点線で示した。

C, myo-inositol (INS)と野生型(緑)及び R178A 変異体(シアン)との結合部位。D191の側鎖の向きが変わっている点に注意。

や、培養条件・反応条件の検討を行っていきたい。

(4) 酵素改変による L-gluconate reductase の創製

野生型 LgdA の結晶構造解析を行い、1.75Å の解像度で立体構造を明らかにした。同酵素の構造は、*Rhizobium etli* 由来の機能未知 oxidoreductase (4FB5) を筆頭に、いくつかのバクテリア由来の機能未知 oxidoreductase と高い構造類似性を示したが、機能既知の酵素との類似性は低かった。さらに、同酵素とその基質である L-glucose, *scyllo*-inosose, *myo*-inositol それぞれとの共結晶についても構造解析を行い、それぞれの基質がほぼ同様の形態で LgdA と結合し、K106, Y135, Y163, E165, R178, D191, H195 及び H318 が inositol 類の水酸基と水素結合を形成するが、D191, R178 は L-glucose との結合にはかかわらないことが判明した。特に D191 は、L-glucose の C6 炭素との立体障害により、その側鎖の向きが変わっていることが明らかになった。これらの基質結合残基のうち、K106, H195 は反応中心に位置しており、これらの Ala 置換体は酵素活性を完全に消失したので、活性中心を形成していると結論した。

その他の基質結合残基のうち、R178 と H318 は、他の類縁酵素と比較してユニークであったので、これらの残基の Ala 置換体を作製して酵素活性について検討したところ、H318A 変異体では *scyllo*-inositol, L-glucose のどちらに対しても酵素活性が低下し、特に L-glucose に対する活性はほとんど検出されない程度まで低下した。それに対して R178A 変異体では、L-glucose に対する活性は保持したまま *scyllo*-inositol に対する活性をほぼ失っていることが明らかになった。R178A 変異体について結晶構造解析を改めて行ったところ、この変異体では D191 の側鎖が flip out しており、そのために inositol 類に対する酵素活性を失ったことが明らかになった。また、R178 は D191 の側鎖を基質側に向けるのに重要な役割を担っていることが判明した。

以上のように、L-gluconate reductase の創製には至らなかったが、LgdA の構造・活性相関について重要な知見を得ることに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 K. Fukano, K. Ogawa, M. Kokubu, T. Shimizu, S. Ito, Y. Sasaki, A. Nakamura, and S. Yajima	4. 巻 13
2. 論文標題 Structural basis of L-glucose oxidation by scyllo-inositol dehydrogenase: implications for a novel enzyme subfamily classification.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS One	6. 最初と最後の頁 e0198010
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） journal.pone.0198010	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 -

1. 著者名 Suzuki Mayu, Koubara Kairi, Takenoya Mihoko, Fukano Kazuhiro, Ito Shinsaku, Sasaki Yasuyuki, Nakamura Akira, Yajima Shunsuke	4. 巻 84
2. 論文標題 Single amino acid mutation altered substrate specificity for L-glucose and inositol in scyllo-inositol dehydrogenase isolated from <i>Paracoccus laeviglucoisivorans</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 734 - 742
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2019.1702870	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木麻佑、小澤国生、深野和紘、伊藤晋作、佐々木康幸、中村顕、矢嶋俊介
2. 発表標題 L-glucoseを基質としうるscyllo-inositol dehydrogenaseの結晶構造解析
3. 学会等名 2019年度日本農芸化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Natsuki Kusumi, Tetsu Shimizu, Ken-ichi Yoshida and Akira Nakamura
2. 発表標題 An Approach to Produce L-Gluconate in <i>Bacillus subtilis</i>
3. 学会等名 19th International Conference on Bacilli & Gram-positive Bacteria (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 久住 夏紀、清水 哲、吉田 健一、中村 顕
2. 発表標題 枯草菌を用いたL-glucose生産系構築に向けた試み
3. 学会等名 2016年度グラム陽性菌ゲノム機能会議
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 久住夏紀、清水哲、吉田健一、中村顕
2. 発表標題 枯草菌を宿主としたL-gluconate生産系の開発
3. 学会等名 2017年度日本農芸化学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木麻佑、佐々木康幸、伊藤晋作、中村顕、矢島俊介
2. 発表標題 scyllo- inositol dehydrogenaseアラニン変異体の基質特異性解析
3. 学会等名 2020年度日本農芸化学会大会
4. 発表年 2020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	吉田 健一 (Yoshida Ken-ichi) (20230732)	神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授 (14501)	

6. 研究組織（つづき）

	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	矢嶋 俊介 (Yajima Shunsuke) (90301548)	東京農業大学・生命科学部・教授 (32658)	