

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：32410

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07762

研究課題名（和文）食経験の豊富な納豆菌を利用した食品産業用酵素開発の超高速化

研究課題名（英文）Construction of enzyme development method for food industry using *Bacillus subtilis* var. natto.

研究代表者

秦田 勇二（HATADA, Yuji）

埼玉工業大学・工学部・教授

研究者番号：20399562

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）：納豆菌TH株より内在性のプラスミドDNA（pTHKと命名）を発見した。続いて、PCRによりpTHKの様々な領域のDNA断片を増幅し、抗生物質耐性遺伝子と連結して、納豆菌TH株への導入を試みた。この結果を元にして同プラスミドの小型化を図り、TH株が本来持つプラスミドの大きさの約60%の大きさにまで小型化したプラスミドの取得に成功した。好ましいことに、小型化したプラスミドは元のプラスミドよりも納豆菌への導入効率が向上した。続いて、最小化できたプラスミドと大腸菌由来のプラスミドを連結して納豆菌・大腸菌シャトルベクターを構築することにも成功した。アミラーゼ遺伝子などの外来遺伝子の導入にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

醗酵食品を古く（いにしえ）より食する日本において、納豆菌は食経験歴が長く、それ故に安全性も担保されている。納豆菌を用いて、食品産業用酵素の新生産システムを開発し、新規酵素の開発の高速化を目指す。本研究の研究成果は、その新生産システムの土台の構築に大きく貢献する多くの新たな有益な知見を含んでいる。

研究成果の概要（英文）：A plasmid DNA (named pTHK) was discovered from a *Bacillus subtilis* var. natto. Then, DNA fragments of various regions from pTHK were amplified by PCR, ligated with an antibiotic resistance gene, and introduced into the *Bacillus natto*. Based on these results, the plasmid was miniaturized, and we succeeded in obtaining a plasmid that was miniaturized to about 60% of the size of the original plasmid. Advantageously, the miniaturized plasmid had a higher efficiency of transformation of *Bacillus natto* than the original plasmid. By applying the minimized plasmid, we succeeded in constructing the shuttle vector of *Bacillus natto* - *E. coli*. We have also succeeded in introducing foreign genes into *Bacillus natto*.

研究分野：微生物応用

キーワード：納豆菌 プラスミドDNA 遺伝子 酵素生産 形質転換

1. 研究開始当初の背景

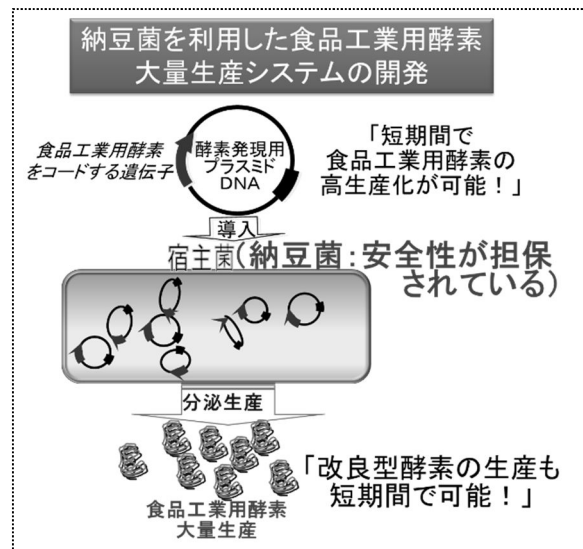
食品産業用酵素の市場規模は1,000億円を超えており、今後もその規模は拡大すると予測されている。食品産業分野のこれまでを振り返ると、企業に於いて(日々努力を重ねた結果、幸運にも)自然界の微生物から食品産業に有用な酵素を新たに発見できたとして、それ以降の実用化までの酵素開発期間を長期化させる律速段階となっているのは酵素の生産性向上化の検討過程や、酵素の欠点部分の改良過程である。食品工業用酵素は食品素材の生産に直接的に使用されることから、安全性の高い微生物を用いた酵素生産技術が必須であり、更にハードルを高くしているのが、食品安全基本法により酵素生産時に抗生物質が使用できない(通常のラボレベルの実験では遺伝子組換え微生物の培養に必ず抗生物質を添加する:培養中に目的酵素遺伝子を含有するプラスミドDNAを宿主微生物内に安定に存続させる為)ため、生産したい酵素をコードする遺伝子を宿主微生物が安定に保持できず、目的酵素が高生産されない。企業ではこれらの背景を考慮し(残された選択肢として)、自然界から発見した酵素生産微生物自体を長い年月をかけて(辛抱強く)育種(改変)し、目的酵素を高生産する微生物変異株を取得するという(伝統的な)手法を取らざるを得ないのが今日の現状である。

2. 研究の目的

本研究は、新規酵素の開発期間、即ち、新規酵素の高生産化と新規酵素の高機能化にかかる日数を極端に短期間化する目的で提案する。食経験の豊富(安全性が担保されている)な納豆菌を利用する食品産業用酵素の新生産システム開発し、新規酵素の開発の高速化を目指す。本研究はその土台を構築する。醗酵食品を古(いにしえ)より食する日本において、納豆菌は食経験歴が長く、それ故に安全性も担保されている。この頃は、醗酵食品関連微生物の積極的な摂取が腸内環境の改善に寄与するという、所謂「菌活」ブームも話題となり、納豆菌に対する国民の良いイメージは強い。納豆菌は取扱いが容易で、しかも安価な培地で高密度での培養が可能である。また更なる大きなメリットとして納豆菌は目的酵素を菌体外に効率良く分泌生産できる(例えば、比較対象としての大腸菌は目的酵素を菌体内に溜め込んでしまうため目的酵素の調製に対する企業のコスト負担が大きい)。

3. 研究の方法

安全性の担保された納豆菌を生産宿主として利用した酵素高生産ツールを構築する。この技術を用いることで食品産業用酵素の開発の高速化が期待できる。本研究はその土台に資する研究である。



先ず、市販されている複数の納豆菌より、それらに内在する核外遺伝子を探索した。その方法を詳しく説明すると、納豆菌を液体培地で増殖させ、市販のプラスミド調製キットを利用して、増殖させた納豆菌より内在するプラスミド DNA を探した。納豆菌 TH 株より発見できたプラスミド DNA (pTHK と命名) のサイズと塩基配列を調べ、本プラスミドの全領域の中で、納豆菌内でプラスミド自立複製に必要な領域(推定)と、複製には必須ではない領域(推定)とにグループ分けした。その情報を手掛かりにして同プラスミドの小型化を図ることとした(後々の実用で扱いやすくするため)。複製には必須ではない領域を少しずつ削除しながら小型化を進めた。遺伝子断片の調製には PCR 法を用いた。続いて、最小化できたプラスミドと大腸菌由来のプラスミドを連結して納豆菌 大腸菌シャトルベクターを構築することに挑戦した。構築できたシャトルベクターを応用して、2つのことに取り組んだ。1つは納豆菌染色体 DNA の改変、もう一つは有用酵素遺伝子の納豆菌への導入である。これらの検討により、食品工業用酵素生産ツールとしての納豆菌の利用が大きく期待できる。納豆菌染色体 DNA の改変には DNA-DNA 相同性組換え法を用いた。有用酵素遺伝子の納豆菌への導入には、先ず、外来 DNA の効率的導入法の検討から実施した。一方、構築したシャトルベクターだけではなく、pHY300PLK (市販プラスミド) をベクターとして用いた有用酵素遺伝子の納豆菌への導入も検討した。

4. 研究成果

納豆菌 TH 株より内在性のプラスミド DNA (pTHK と命名) を発見した。先ず、耐性度判定実験により納豆菌 TH 株自体はテトラサイクリン感受性であることを明らかにした。続いて、PCR により pTHK の様々な領域の DNA 断片を増幅し、これら DNA 断片とテトラサイクリン耐性遺伝子を連結させて、環状化し、納豆菌 TH 株への導入を試みた。一連の実験結果から、pTHK の全領域を、納豆菌内でのプラスミド複製に必要な領域と、複製には必須ではない領域とにグループ分けすることができた。さらにこの結果を元にして同プラスミドの小型化を図った。その結果、TH 株が本来持つプラスミドの大きさの約 60% の大きさにまで小型化したプラスミドに取得に成功した。好ましいことに、小型化したプラスミドは元のプラスミドよりも納豆菌への導入効率が向上した。続いて、最小化できたプラスミドと大腸菌由来のプラスミドを連結して納豆菌 大腸菌シャトルベクターを構築することにも成功した。これらの進捗をもとにして、本プラスミドのさらなる応用として2つのことに取り組んだ。1つは納豆菌染色体 DNA の改変、もう一つは有用酵素遺伝子の納豆菌への導入である。これらの検討により、納豆菌の食品工業用酵素生産ツールとしての利用が大きく期待できる。将来的に納豆菌の性質を改善することを見据えた納豆菌染色体 DNA の改変手段を検討した結果、DNA-DNA 相同性組換え実験により、染色体 DNA 上への目的遺伝子の導入に成功した。様々な遺伝子を遺伝子導入に用いたところ結果としては、抗生物質耐性遺伝子の利用によって染色体組換えに成功した。その効率を考えると導入した遺伝子の安定性というよりは寧ろ外圧要因が大きいものと判断できた。これらの研究成果を基盤として、構築したシャトルベクターだけではなく、汎用性の高いプラスミド DNA である pHY300PLK を用いた納豆菌への目的遺伝子の導入も試みた。様々な検討の結果から、納豆菌の形質転換にはプロトプラスチ法が有効であった。一連の実験の結果、アミラーゼ遺伝子などの外来遺伝子の導入にも成功した。興味深いことに pHY300PLK をベクターに用いると、納豆菌 TH 株に内在するプラスミド pTHK のコピー数が極端に低下することも明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 飯塚 怜, 牟田 幹悠, 斉藤 開, 川久保 渉, 尹 棟鉉, 関口 哲志, 庄子 習一, 伊藤 芽, 秦田 勇二, 船津 高志
2. 発表標題 微生物一細胞の酵素活性を見える化してその遺伝子を取得する
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mikihisa Muta, Kai Saito, Ryo Iizuka, Wataru Kawakubo, Dong Hyun Yoon, Tetsushi Sekiguchi, Shuichi Shoji, Mei Ito, Yuji Hatada, Takashi Funatsu
2. 発表標題 Deformability-based microfluidic droplet screening to obtain microbes producing macromolecule-degrading enzymes
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯塚 怜, 牟田 幹悠, 斉藤 開, 川久保 渉, 尹 棟鉉, 関口 哲志, 庄子 習一, 伊藤 芽, 秦田 勇二, 船津 高志
2. 発表標題 油中水滴内の微生物の酵素活性を見える化してその遺伝子を取得する
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryo Iizuka, Kai Saito, Eiji Shigihara, Wataru Kawakubo, Daiki Tanaka, Dong Hyun Yoon, Tetsushi Sekiguchi, Shuichi Shoji, Mei Ito, Yuji Hatada, Takashi Funatsu
2. 発表標題 Droplet-based microfluidic screening for obtaining microbes producing macromolecule-degrading enzymes
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田早紀、秦田勇二、本郷照久
2. 発表標題 米もみ殻から合成したアロフェンのリン酸イオン吸着特性
3. 学会等名 日本化学会 第98春季年会（船橋）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯塚 怜, 中村 和貴, 西 真郎, 吉田 尊雄, 秦田 勇二, 高木 善弘, 井口 彩香, 尹 棟鉉, 関口 哲志, 庄子 習一, 船津 高志
2. 発表標題 環境中の微生物を培養することなく「見える化」して酵素遺伝子を取得する
3. 学会等名 第26回日本バイオイメージング学会学術集会（東京）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kai Saito, Ryo Iizuka, Eiji Shigihara, Wataru Kawakubo, Dong Hyun Yoon, Tetsuji Sekiguchi, Shuichi Shoji, Yuji Hatada, Takashi Funatsu
2. 発表標題 Microdroplet-based screening method for microbes producing polymer-degrading enzymes.
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会（熊本）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 北本勝ひこ等編、秦田勇二、大田ゆかり等	4. 発行年 2017年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 512
3. 書名 食と微生物の事典	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----