

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32658

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23669

研究課題名(和文) ポリエステル合成微生物における3HBオリゴマー分泌の機構解明

研究課題名(英文) Investigation on the mechanism of 3HB oligomer secretion in polyester producing bacterial strain

研究代表者

後藤 早希 (Goto, Saki)

東京農業大学・生命科学部・研究員

研究者番号：70845651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：ポリエステル生産菌である*Bacillus megaterium*の3HBオリゴマー生産機構を調査した。*B. megaterium*の3HBオリゴマー生産の経時的变化の分析の結果、3HBオリゴマーの生産機構はi) 重合酵素によるP(3HB)の重合、ii) 分解酵素による3HBオリゴマーへの分解、iii) 3HBオリゴマーの菌体外への分泌の3ステップであることが分かった。*B. megaterium*の培養液上清中には、3-20量体のオリゴマーの存在が確認された。また、大腸菌による*in vivo*での分解実験により、3HBオリゴマー生産には2つの分解酵素が関与している可能性があることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、一部のポリエステル合成微生物において、付加価値の高い3HBオリゴマーが細胞外へ分泌されていることが確認されていたが、その詳細は明らかになっていなかった。本研究により、P(3HB)生産菌の*Bacillus megaterium*の3HBオリゴマーの合成・分泌系に関する知見が得られた。中分子の3HBオリゴマーは、細胞の外に分泌されるため、連続的な発酵生産が可能であり、*Bacillus*属細菌はエンドトキシンを生産しないグラム陽性菌である。したがって、本菌を宿主にすれば、効率的かつ安全な3HBオリゴマー生産システムの開発に発展することができると思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, the mechanism of 3HB oligomer production by *Bacillus megaterium* was investigated. The time course data of the cultivation showed lower P(3HB) accumulation and higher 3HB0 production in the later phase of cultivation, indicating the 3HB oligomer production mechanism consists of three steps: i) polymerization of P(3HB) by synthase, ii) degradation to 3HB oligomers by depolymerase, and iii) secretion of 3HB oligomers out of the bacterial cells. In the supernatant of the culture medium of *B. megaterium*, 3- to 20-mer oligomers were present. *In vivo* degradation experiments using recombinant *Escherichia coli* indicated that two depolymerases were involved in 3HB oligomer production.

研究分野：応用生物学

キーワード：3HBオリゴマー 3-ヒドロキシブタン酸 ポリエステル合成微生物 *Bacillus* 分泌生産

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ポリ-3-ヒドロキシブタン酸 [P(3HB)] は、細菌のエネルギー貯蔵物質であり、生分解性ポリマーとして知られている。最初に、P(3HB)が発見されたのは、*Bacillus megaterium* であり (Lemoigne, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1926)、今日までに P(3HB) について多くの研究が行われてきた。一方で、*B. megaterium* を培養すると、培地中に 3HB オリゴマーが分泌されたことが確認されている (Kato *et al.*, *J. Ferment. Bioeng.*, 1992)。3HB オリゴマーは、化成品素材として利用でき、抗酸化作用を有する (Koskimäki *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2016) ため、高生産システムの開発が望まれる。これまでに、一部のポリエステル合成微生物において、3HB オリゴマーの細胞外への分泌が確認されているが、その詳細は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、3HB オリゴマーに焦点を当て、その合成・分泌の機構を明らかにすることを目的とし、天然の P(3HB) 生産菌であり、微生物ポリマー研究のさきがけとなった *B. megaterium* の生産機構を解明することを目指した。

3. 研究の方法

P(3HB) 生産菌において、重合酵素により 3HB モノマーが重合され、菌体内に P(3HB) が合成される。さらに、分解酵素により P(3HB) はより短いオリゴマーに変換されることが知られている。*B. megaterium* においても P(3HB) の重合酵素と分解酵素が存在するため、3HB オリゴマーの生産機構は、重合酵素による P(3HB) の重合、分解酵素による 3HB オリゴマーへの分解、3HB オリゴマーの菌体外への分泌、の 3 ステップであると予測された (図 1)。そのため、3HB オリゴマー生産の経時的変化、分解酵素の特性解析、3HB オリゴマーの分泌機構について調べた。

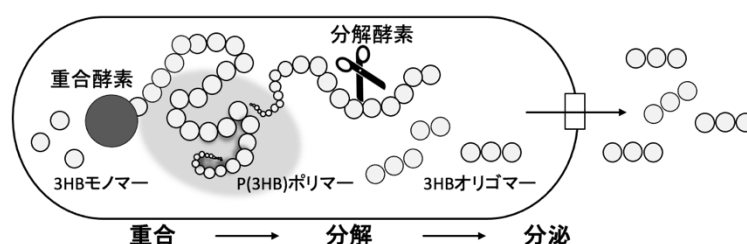


図 1 予測された *B. megaterium* の 3HB オリゴマーの生産機構

(1) 3HB オリゴマー生産の経時的変化

B. megaterium NBRC 15308 を前培養培地である 1.5 mL の LB 培地に植菌し、30°C で振とう培養を行った。約 8 時間培養後、本培養培地である 100 mL MSB 培地 (40.0 g/L Sucrose, 4.0 g/L NH₄Cl, 3.0 g/L NaCl, 4.0 g/L K₂HPO₄, 2.0 g/L KH₂PO₄, 1.0 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 1.0 g/L Corn steep liquor, pH 7) に前培養液 1% (v/v) を接種し、30°C で振とう培養 (130 strokes/min) を行った。培養開始後、12、24、48、72、96 時間に集菌し、細胞内に蓄積した P(3HB) 量と、細胞内・外の 3HB オリゴマー量をガスクロマトグラフィーおよび酵素法を用いてそれぞれ分析した。また、蓄積した P(3HB) の分子量と細胞内・外の 3HB オリゴマーの重合度をゲル浸透クロマトグラフィーおよび ESI-TOF-MS 分析により測定した。

(2) 分解酵素の特性解析

B. megaterium NBRC 15308 の分解酵素の特性を調べるため、分解酵素遺伝子を大腸菌に導入して、*in vivo* における分解実験を行った。*B. megaterium* NBRC 15308 の “esterase, PHB depolymerase family protein” と推定された 3 つの分解酵素 (KEGG 番号; BG04_2768, BG04_4177, BG04_5525) のうち、BG04_2768 について、すでに報告されている *B. megaterium* N-18-25-9 細胞外分解酵素と 95% の相同性を示した。細胞内において、P(3HB) がオリゴマーまで分解されていると考えられたため、BG04_4177 および BG04_5525 について、分解酵素としての機能を確認した。P(3HB) 合成関連酵素遺伝子とともに、推定分解酵素遺伝子をそれぞれ大腸菌に導入した組換え株を作製し、培養後、P(3HB) 蓄積量とその分子量およびオリゴマー生産量とその重合度を調べた。

(3) 3HB オリゴマーの分泌機構

3HB オリゴマーの分泌機構を解明するため、*B. megaterium* NBRC 15308 と大腸菌の分泌されたオリゴマーの重合度の比較を行った。さらに、*B. megaterium* NBRC 15308 は、親水性の物質 (タンパク質など) と共にオリゴマーが細胞外へと分泌されている可能性が考えられた。そのため、培養液上清を分画分子量 100,000 の限外ろ過膜を使用して分画を行い、通過画分および非通過画分について、オリゴマー量と重合度を確認した。

4. 研究成果

(1) 3HB オリゴマー生産の経時的変化

図2は、細胞内・外の3HBオリゴマー量および細胞外の3HBモノマー量を示している。培養24時間目までは、微量の3HBオリゴマーの分泌しか確認されなかったが、培養48、72時間目では、細胞外オリゴマー量が増加し、細胞内オリゴマー量の存在も確認された。培養96時間目では、細胞外オリゴマー量はわずかに増加したが、細胞内オリゴマーは確認されなかった。また、蓄積したP(3HB)量、3HBオリゴマー量、菌体量の比較を図3に示した。培養24時間目では、約0.5 g/LのP(3HB)の蓄積と微量の3HBオリゴマーの分泌が確認されたが、培養48時間目では、P(3HB)量は減少し(約0.2 g/L)、3HBオリゴマー分泌量は増加した(約0.2 g/L)。また、蓄積したP(3HB)の分子量を測定した結果、二峰性の分子量分布を示した。平均分子量は、培養24時間目で最大となり(M_n ; 4.9×10^3 , M_w ; 8.5×10^5) それ以降は減少していた(M_n ; 0.6×10^3 - 1.4×10^3 , M_w ; 2.0×10^5 - 5.0×10^5)。さらに、細胞内・外の3HBオリゴマーの重合度を比較した。その結果、細胞内では、培養48、72、96時間目において、8-20量体のオリゴマーが確認された。細胞外では、培養48、72時間目に3-17量体、培養96時間目に3-20量体のオリゴマーが確認され、培養後半では、より重合度の高いオリゴマーが分泌されていた。これらの結果から、菌体内に合成されたP(3HB)が分解酵素によりオリゴマーに分解され、菌対外に分泌されたと示唆された。

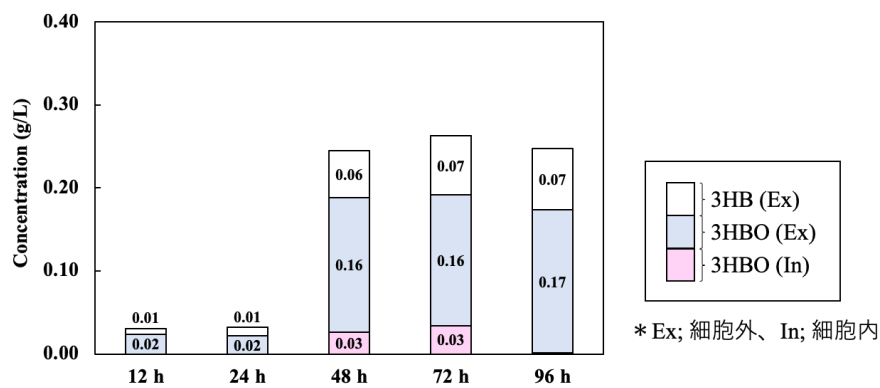


図2 *B. megaterium* の3HBオリゴマー・3HBモノマー量

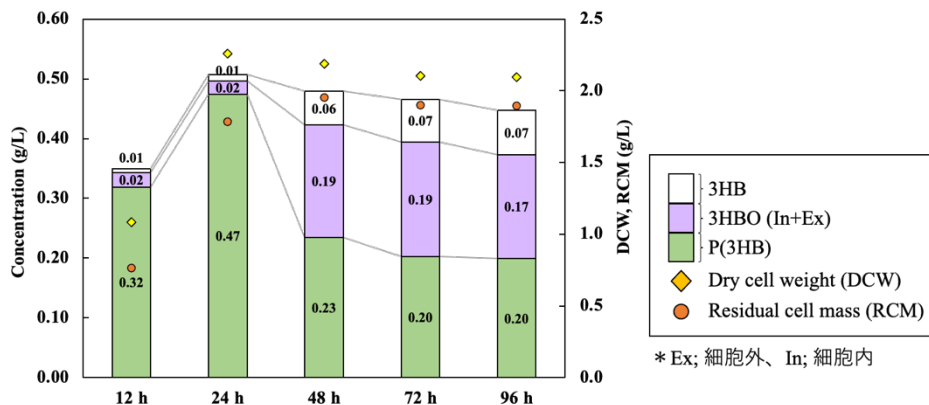


図3 *B. megaterium* の生産物

(2) 分解酵素の特性解析

組換え大腸菌による分解実験 (*in vivo*) の結果を図4に示す。コントロールとしてP(3HB)合成関連酵素遺伝子のみを導入した大腸菌はP(3HB)を6.58 g/L蓄積したが、分解酵素遺伝子(BG04_4177およびBG04_5525)を導入した株は、それぞれP(3HB)量が減少した(1.27および1.87 g/L)。一方で、コントロールでは、オリゴマーがほぼ生産されなかったが、BG04_4177およびBG04_5525を導入した株は、オリゴマー量が増加した(4.55および1.42 g/L)。蓄積したP(3HB)の分子量を測定した結果、コントロールの平均分子量(M_n ; 6.3×10^5 , M_w ; 1.3×10^6)と比較して、BG04_4177導入株(M_n ; 1.1×10^4 , M_w ; 7.2×10^4)とBG04_5525導入株(M_n ; 2.1×10^4 , M_w ; 7.2×10^4)の平均分子量は減少していた。BG04_4177およびBG04_5525導入株において、P(3HB)量と分子量が減少し、オリゴマー量が増加したため、この2つの推定分解酵素はオリゴマーの生産に関連していると考えられた。さらに、オリゴマーの重合度を測定した結果、BG04_4177導入株において、細胞外では4-8量体のオリゴマー、細胞内では4-10量体のオリゴマーが確認されたことか

ら、BG04_4177は、ポリマーを4-10量体で分解することが考えられた。一方で、BG04_5525 導入株は、細胞外では4-8量体のオリゴマー、細胞内では8-15量体のオリゴマーが確認され、BG04_4177 導入株と比較して長いオリゴマーが生産されていた。BG04_5525 導入株は、他の株と比較して3HBモノマーの生産量が高かった(2.11 g/L)ことから、BG04_5525は、ポリマーを末端から分解している可能性が考えられた。それぞれの分解酵素の特性を解明するためには、*in vitro* における分解実験などの検討が必要である。

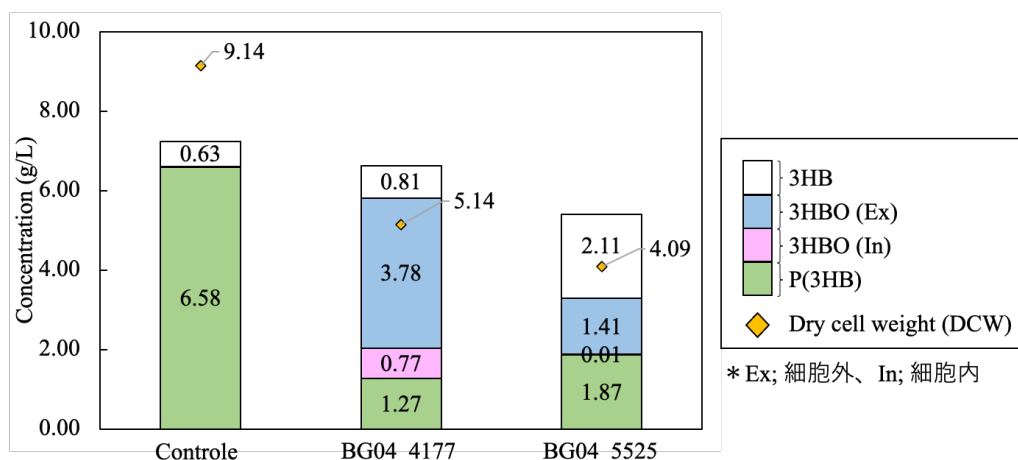


図4 組換え大腸菌の生産物

(3) 3HB オリゴマーの分泌機構

これまでの研究で、大腸菌は3-8量体の3HBオリゴマーを分泌することが分かっている。*B. megaterium* NBRC 15308で分泌されたオリゴマーは3-20量体であり、大腸菌と比較して2倍以上長いことが明らかとなった。大腸菌はグラム陰性菌であり、*B. megaterium*はグラム陽性菌であることから、分泌可能なオリゴマーの長さは細胞構造が関与している可能性がある。また、一般的に10量体以上のオリゴマーは疎水性が高いが、*B. megaterium* NBRC 15308培養後の上清中には10量体以上のオリゴマーが存在していた。オリゴマーがタンパク質などの親水性の物質と共に存在する可能性があったため、限外ろ過膜を使用して分画を行った。その結果、約80%のオリゴマーが分画膜を通過し、3量体オリゴマーの存在が確認された。約20%のオリゴマーは分画膜を通過せず、分子量2,000以下の9-20量体のオリゴマーが確認された。このことより、非通過画分のオリゴマーは分子量10万以上の物質と共に存在する可能性が示唆された。今後、結合物質の同定や詳細な分泌機構の解明を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Goto, Saki; Miyahara, Yuki; Yamada, Mariko; Tsuge, Takeharu; Hiroe, Ayaka
2. 発表標題 Production of 3-hydroxybutyrate oligomer in recombinant Escherichia coli by co-expression of polyhydroxyalkanoate synthase and molecular chaperones
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------