

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 8 日現在

機関番号：10106  
研究種目：若手研究(A)  
研究期間：2012～2014  
課題番号：24681013  
研究課題名(和文)微生物由来界面活性物質の分子デザイン  
  
研究課題名(英文)Molecular design of microbial surfactants  
  
研究代表者  
小西 正朗(Konishi, Masaaki)  
  
北見工業大学・工学部・准教授  
  
研究者番号：90533860  
  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,400,000円

研究成果の概要(和文)：糖脂質合成経路に関与する遺伝子を特定するため、糖脂質生産菌*Pseudozyma hubeiensis* SY62株のドラフトゲノム解析を実施した。約6千万リードのシーケンスをアッセンブルし、74個のscaffoldを得た。全長約18Mbのシーケンスが得られた。*U. maydis* 521株との比較解析により、MEL合成代謝関連遺伝子を特定することができた。次に*Ustilago*-大腸菌シャトルベクターpUXV1に緑色蛍光タンパク質(GFP)を導入したベクターを用いて、形質転換法を開発した。新規糖脂質生産菌の分離にも成功した。

研究成果の概要(英文)：To identify glycolipid-synthesizing genes, draft genome sequencing was carried out for a glycolipid producing fungi, *Pseudozyma hubeiensis* SY62. Seventy four scaffolds were obtained from approximately 60,000,000 read of raw data. The total length of scaffolds reached to approximately 18 Mb. MEL synthetic genes were identified by comparing of genome sequences between SY62 and *Ustilago maydis* 521. Then, transformation method was developed using a vector including green fluorescent protein constructed from *Ustilago*-*Escherichia coli* shuttle vector, pUXV1.

研究分野：生物化学工学

キーワード：糖脂質 酵母 真菌 ゲノム解析 培養 バイオプロダクション

### 1. 研究開始当初の背景

石油由来の化学合成品から、より環境にやさしい化合物の利活用が求められている。*Ustilago* 属、*Pseudozyma* 属に含まれる真菌はマンノシルエリスリトールリピッド(MEL)(図 1)と呼ばれる糖脂質を効率的に分泌生産することが知られている。MEL は優れた界面活性物質の一つであり、次世代の環境調和型界面活性剤として注目されている。また MEL は化粧品基材として利用されている。しかし、幅広い産業応用するには生産効率が十分でなく、目的に応じた分子構造・機能を持つ分子種を意図的につくらせることが困難である。MEL は水溶液中で容易に自己集合し、液晶を形成する。さらに固体表面に配向吸着した MEL はヒト抗体やレクチンを選択的に吸着できることから、抗体アフィニティー分離基材としても注目されている。また、炭化水素汚染土壌の微生物浄化の促進にも寄与できることがわかっている。このように魅力的な機能を持つ MEL をさらに高性能化し、応用分野を拡充するには、任意の分子種の MEL の選択的製造技術を確立すること、生産効率を高め製造コストを低減することであると考え、自然界からのスクリーニングにより、近縁種のうち、糖脂質生産性が高いものを収集し、その構造・機能について調査してきた。また、1 週間で 129g/L の MEL を生産する株などを分離することができ、その高い生産ポテンシャルについて、明らかにしてきた。しかしながら、スクリーニングに頼った研究では、得られる MEL の分子種に限られることが問題であることがわかってきた。

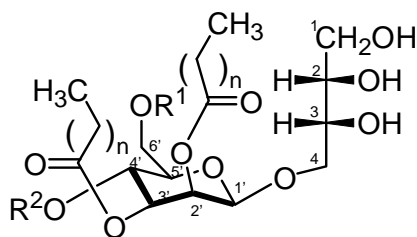


図 1. マンノシルエリスリトールリピッドの分子構造,

### 2. 研究の目的

MEL 合成に関与する遺伝子を特定し、セルフクロニングにより、破壊株を作成できれば、理論上、最大 12 種類の MEL を選択的に製造できる。それらの分子構造と機能の関係を詳細に明らかにすることができる。そこで、最近進歩が目覚ましいゲノム解析技術を活用して MEL 合成遺伝子の機能を解明することで、分子生物学を活用した育種により生産されるデザインド(Designed) MEL の生産技術の創出と物性・機能について検討することを目的とした。

また、更なるバイオサーファクタントの分

子種の多様性の拡充を促進するため、新規バイオサーファクタント生産菌の探索も同時に実施した。

### 3. 研究の方法

#### (1) ゲノム解析

次世代シーケンサーを用いたドラフトゲノム解析によって SY62 株遺伝子情報の解析を試みた。今回用いたドラフトシーケンスには Illumina 社の HiSeq を使い、タカラバイオ株式会社へ委託しデータを得た。コーディング領域と機能の推定には MetaGeneAnnotator 1.0 ならびに NCBI BLAST 2.2.18 を用いた。rRNA ならびに tRNA の予測には RNAmmer と tRNA scan をそれぞれ用いた。そのデータを元に国立遺伝学研究所の MigGap システムを用いて自動遺伝子予測を行った。

#### (2) 遺伝子導入法の開発

*Ustilago-Escherichia* シャトルベクター pUXV1 の BamHI サイトに pRSET-emGFP 由来の emGFP 遺伝子を導入した pUXV1emGFP を構築し遺伝子導入実験に用いた。emGFP 遺伝子は GFP-F-BamHI プライマー (AAAAAGGATCCATGGTGAGCAAGGG) ならびに GFP-R-BamHI プライマー (AAAAAGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCA) を用いて PCR 増幅した。PCR 反応液は LA-taq(タカラバイオ)による標準法を用いた。サーマルサイクル反応は、94°C, 5 分間変性反応を行った後、97°C, 10 秒、55°C, 30 秒、72°C, 1 分間の反応を 28 回繰り返した。さらに 72°C, 7 分間の伸長反応を行った。PCR 産物は市販のカラム精製キットで精製した後、BamHI で制限酵素処理した。同様に pUXV1 を BamHI で制限酵素処理した後、カラム精製し、アルカリフォスファターゼ処理した。ライゲーション反応は Takara Ligation kit mighty mix を用いた。ligation 反応後、TOP10F'(Invitrogen)に形質転換した。得られた形質転換体の中から設計どおりの pUXV1emGFP を選択した。

SY62 への形質転換は以下に示す方法で行った。形質転換に用いる SY62 株は 200 ml 容量のフラスコに準備した 40 ml の YPD 培地で OD<sub>600</sub> が 0.5 に達するまで、200 rpm、25°C で培養した。80 ml の培養液を遠心分離で回収し、80 ml の氷冷した水、40 ml の氷冷した水、10 ml の氷冷した 1M ソルビトールで順に洗浄し、400 μl の氷冷した 1M ソルビトールに懸濁した。40 μl の懸濁液を 2 mm ギャップのキュベットに移し、5 μg の SacI で直線化処理したベクター DNA を加えた。エレクトロポレーションは特に記載がない限り、GenePulserXcell(BioRad)を用い、1850 V、25 μF、1000 Ω の条件で電圧を印加した。形質転換体は 300 μmol/ml のハイグロマイシンを含む YM 寒天培地で薬剤セレクションした。

得られた形質転換体中でベクターに含まれる GFP が機能していることを確認するた

め、蛍光顕微鏡で緑色蛍光を観察した。

### (3) 新規バイオサーファクタント生産菌の分離

沖縄トラフ伊平屋北フィールド (27°47.457'N, 126°53.805'E, depth=982 m) で採取した海底堆積物から微生物を分離した。NB 寒天培地に 0.01g のサンプルを 100  $\mu$ l の培地に懸濁し播種した。25°C で1週間好気培養し、得られたコロニーを 20 ml のバイオサーファクタント生産培地へ播種した。20°C、200 rpm の条件で 4 日間培養した後、液滴崩壊活性を調べた。液滴崩壊活性が認められたサンプルに酢酸エチルを添加し、バイオサーファクタントを抽出した。抽出したサンプルは薄層クロマトグラフィー(TLC)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて、バイオサーファクタントを分析した。得られたバイオサーファクタントの構造解析はマトリックス支援レーザーイオン化質量分析法(MALDI-TOF/MS)、核磁気共鳴スペクトル(NMR)、ガスクロマトグラフィー質量分析法(GC-MS)を用いた脂肪酸エステル分析により構造決定した。

菌株の同定には 16S rRNA 遺伝子を標的とした系統解析法を用いた。

表面張力の測定には、ウィルヘルミ式自動表面張力計を用いた。

植物病原性に関する遺伝子の解析には特異的プライマーを使用した PCR 法ならびに Ion Torrent システムを用いたドラフトゲノム解析法を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) ゲノム解析

Hiseq によって、約 400bp の鎖長をもつ 62,228,512 reads のシーケンスを得た。得られた read は 160 contig、74 scaffold にアセンブルされた。全ゲノムサイズは 18,442,938 bp に達した。G+C 含量は 56.5% であり、近縁種の *U. maydis* や *P. antarctica* と同等であった。7523 個の cording DNA sequence (以下、CDS) が存在すると推測された。この推測された CDS の中から、アミノ酸配列を用いた相同性解析を行い *U. maydis* 521 株の *mat1* (Genbank accession no.EAK83922), *mac1* (EAK83924), *mac2* (EAK83927), *emt1* (EAK83925), *mmf1* (EAK83923) と相同性が高い CDS を探索した結果、それぞれの遺伝子に対応する CDS を特定できている。*U. maydis* 521 株ならびに MEL-A 生産菌として知られる *Pseudozyma antarctica* T-34 株の MEL 合成代謝遺伝子との相同性解析の結果、特にアセチル化に関する *mat1* の相同性が低いことが明らかとなった。

全ゲノム解析データは DDBJ/EMBL/GenBank データベースに entry として BAOW01000001 から BAOW01000160, scaffold として DF238764 から DF238837 の Accession No. で登録されている。

### (2) 遺伝子導入法

*P. hubeiensis* SY62 株への遺伝子導入方法を確立するため、コンピテントセルの培養条件、エレクトロポレーションの条件、前処理条件を検討した。検討当初、一般的な酵母に適用する条件 (25  $\mu$ F, 1500V, 200 $\Omega$ ) で遺伝子導入したが、形質転換効率は 0.27 colonies /  $\mu$ g であった。電圧、回路抵抗、前処理などの条件を検討した結果、100 mM 酢酸リチウムによる前処理、25  $\mu$ F, 1850V, 1000 $\Omega$  でのエレクトロポレーション処理により 20-45 colonies /  $\mu$ g の形質転換効率が得られることがわかった。得られた形質転換体は図 1 に示すように、顕微鏡下で緑色蛍光を発することが確認できた。

バイオサーファクタント生産菌 SY62 株への遺伝子導入法を確立できた。これによりデザインド MEL の生産技術基盤が確立した。

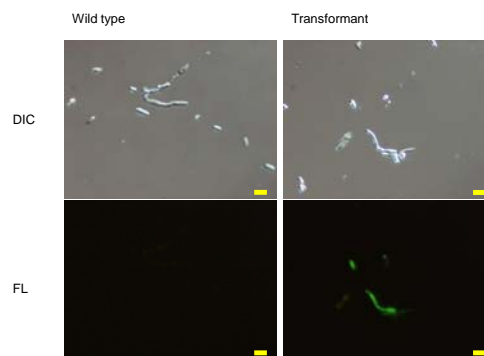


図 2. 形質転換体の顕微鏡写真。DIC: 微分干渉像, FL: 落射蛍光像, バーは 10  $\mu$ m

### (3) 新規バイオサーファクタント生産菌の分離

スクリーニングにより、得られた株のうち、BS-15 株が糖脂質を生産していることが明らかとなった。糖脂質の生産量は 9.57 g/l (20°C、4 日間) であった。得られた糖脂質の分子構造を明らかとするため、各種機器分析をおこなった結果、図 3 に示すような 3 分子のグルコースを含む糖鎖を持つ新規物質である可能性が高いことがわかった。グルコトリオースリピッド(GTL)と名付けた。BS-15 株の最適生育温度は一般的な細菌と比べて若干低く、低温の深海環境由来であることが示唆された。

GTL の臨界ミセル濃度は  $2.3 \times 10^{-6}$  M と小さく、表面張力は 29.5 mN/m まで低下した。優れた界面活性剤として機能することが明らかとなった。

BS-15 株の系統解析をしたところ、植物病原菌として知られる *Rhodococcus facians* と近縁であることがわかったため、当該株を *Rhodococcus* sp. BS-15 株と名付けた(図 4)。植物への毒性を示す植物ホルモン様サイトキ

ニンの生産に關与する遺伝子(*fasA*, *fasB*, *fasC*, *fasD*, *fasE*, *fasF*)に対する特異的プライマーを設計し、ゲノム DNA からの PCR 増幅試験をした結果、これらの遺伝子が存在しないことが示唆された。さらに Ion Torrent システムによるドラフトゲノム解析を行った結果、植物ホルモン様サイトキニン生産に關与する遺伝子は存在しないことが強く示唆された。

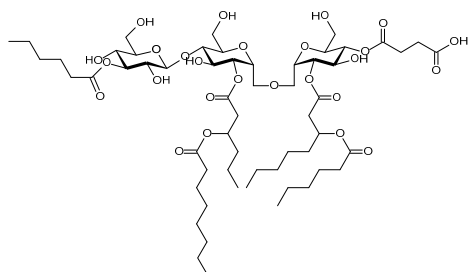


図 3. トリグルコースリピッドの分子構造

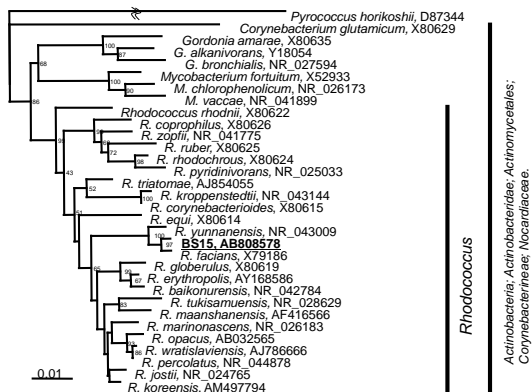


図 4. BS-15 株とその近縁種の系統樹

本研究を基盤にさらなる微生物界面活性物質の多様化とデザイン化を進める予定である。

### 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)

- ① Konishi M.\*, Yoshida Y., Horiuchi J., Efficient and simple electro-transformation of intact cells for the basidiomycetous fungus *Pseudozyma hubeiensis*. *Biotechnol. Lett.* [accepted]
- ② Konishi M.\*, Yoshida Y., Horiuchi J.: Efficient production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* using a corn cob hydrolysate medium. *J. Biosci. Bioeng.* 119, 317-322 (2015)
- ③ Konishi M.\*, Nishi S., Fukuoka T., Kitamoto D., Watsuji T., Nagano Y., Yabuki A., Nakagawa S., Hatada Y., Horiuchi J.: Deep-sea *Rhodococcus* sp. BS-15 lacking the phytopathogenic *fas* genes, produces a

novel glucotriose lipid biosurfactant. *Mar Biotech.* 16: 484-493 (2014)

- ④ 小西正朗, “深海由来酵母が生産する糖脂質の分子デザイン”, 環境バイオテクノロジー学会誌, 14: 9-14 (2014)
- ⑤ 小西正朗, “Non-conventional yeast の特異的二次代謝反応のデザインブル化”, 化学工学会バイオ部会 News letter, 35: 7-9 (2014)
- ⑥ Konishi M.\*, Hatada Y., Horiuchi J.: Draft genome sequence of basidiomycetes yeast-like fungus, *Pseudozyma hubeiensis* SY62, which produces an abundant amount of biosurfactant, mannosylerythritol lipids. *Genome Annouc.* 1(4) e00409-13 (2013) doi: 10.1128/genomeA.00409-13

[学会発表] (計 5 件)

- ① 小西正朗 “深海生態系の解明とバイオ資源としての活用に関する研究—プロセス制御技術の活用による飼育培養技術開発を中心として” 平成 24 年度技術士会生物工学会部会業績発表会, 東京, 葺手第 2 ビル, 2012 年 6 月 2 日
- ② 小西正朗, 長野由梨子, 矢吹彬憲, 和辻智郎, 中川聡, 秦田勇二 “深海からの新規バイオサーファクタント生産菌の分離” 2012 年度日本生物工学会大会, 神戸, 神戸国際会議場, 2012 年 10 月 24 日
- ③ 小西正朗, 西真郎, 長野由梨子, 矢吹彬憲, 和辻智郎, 中川聡, 秦田勇二, 堀内淳一 “深海から分離した *Rhodococcus* sp. BS15 株によるバイオサーファクタントの生産” 第 13 回極限環境生物学会, 東京, 日本大学文理学部 2012 年 12 月 1 日
- ④ 五十嵐瑞樹, 小西正朗, 長濱統彦, 秦田勇二, 堀内淳一 “*Pseudozyma hubeiensis* による新規バイオサーファクタントの分子設計”, 化学工学会第 45 回秋季大会, 平成 25 年 9 月 17 日, 岡山, 岡山大学
- ⑤ 小西正朗 “深海由来酵母が生産する糖脂質の分子デザイン” 第 65 回日本生物工学会大会, 平成 25 年 9 月 19 日, 広島, 広島国際会議場(招待講演)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem.kitami-it.ac.jp/laboratory/konishi/bioprocess/Main.html>

### 6. 研究組織

(1)研究代表者

小西 正朗 (KONISHI, Masaaki)

北見工業大学・工学部・准教授

研究者番号: 90533860

(2)研究分担者  
該当なし

(3)連携研究者  
該当なし