

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450102

研究課題名(和文) 亜リン酸デヒドロゲナーゼを用いた微生物の選択的大量培養法の開発

研究課題名(英文) Application of a phosphite dehydrogenase gene as a dominant selection marker for a large-scale cultivation of microorganisms

研究代表者

廣田 隆一 (Ryuichi, Hirota)

広島大学・先端物質科学研究科・助教

研究者番号：90452614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：産業レベルの微生物大量培養において雑菌の混入を防止することは極めて重要である。コンタミネーション防止に利用される抗生物質はコストの問題や公衆衛生のリスクの観点から大量に使用することが困難である。本研究では低コストで安全な微生物の選択培養技術として、亜リン酸デヒドロゲナーゼ(PtxD)を用いた培養手法を開発した。出芽酵母、分裂酵母、および大腸菌にPtxD遺伝子を導入したところ、通常の生物は利用できない亜リン酸を唯一のリン源とした合成培地において増殖可能になることを確認した。亜リン酸は安価で安全であるため、本技術は工業レベルでの大規模微生物培養に有効である。

研究成果の概要(英文)：The use of antibiotic resistance markers in the commercial application of genetically modified microorganisms is limited due to restrictions on the release of antibiotics and their resistance genes to the environment. To avoid contamination by other microorganisms, the development of a dominant selection marker with low environmental risks is still required. In this study, we developed a novel selection system for microorganisms using a bacterial phosphite dehydrogenase gene (PtxD). Introduction of PtxD gene into a fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, a budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, and a Gram-negative bacterium *Escherichia coli* could confer the ability to grow on a minimal medium containing phosphite (Pt) as a sole source of phosphorus. Since Pt is a safe and inexpensive chemical, ptxD could be used as a novel dominant selection marker applicable to a large-scale cultivation of microorganisms.

研究分野：応用微生物学

キーワード：亜リン酸 選択マーカー 微生物 培養

1. 研究開始当初の背景

化石燃料から再生可能エネルギーへのエネルギーシフトの潮流を背景に、微生物の多様な能力を活用した有用物質生産が世界的に試みられている。しかし、産業スケールでの微生物の大量培養は、実験室条件とは異なる様々な問題がある。特に雑菌の混入は生産物損失と装置汚染、そしてその復旧に要する時間的損失などの甚大な経済的損失を与える。雑菌混入を防ぐための方策として培地・装置の滅菌や抗生物質の使用が考えられるが、産業スケールの培養においては莫大なエネルギーやコストを要する。さらに、抗生物質の使用は、廃液の漏出が耐性菌の出現などのリスクを高めるため厳重な処理が必要である。そのため、これらの問題を克服した微生物大量培養技術が求められている。

2. 研究の目的

リンは全ての生物の必須元素である。しかし一般的な生物が利用するリンはリン酸 (H_3PO_4) であり、ほとんどの生物は亜リン酸 (H_3PO_3) を利用することができない。申請者らはこれまでの研究により、高い熱安定性と異種発現に高い適合性を示す亜リン酸デヒドロゲナーゼ (PtxD) を土壌細菌 *Ralstonia* sp. 4506 株から発見した。PtxD は亜リン酸をリン酸に酸化するため、目的微生物に PtxD を導入し、亜リン酸を唯一のリン源とすれば選択的に増殖させることが可能になると考えられる。本研究では、亜リン酸デヒドロゲナーゼ (PtxD) を利用した選択的培養手法の実証を行い、その有効性を評価することを目的とした。

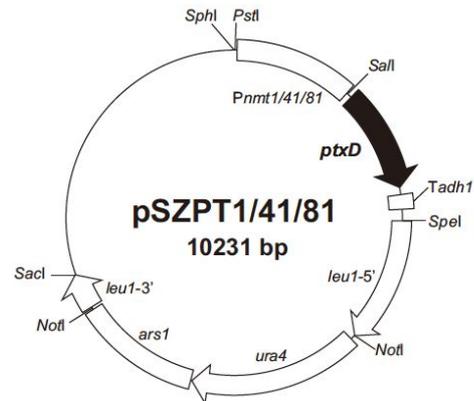
3. 研究の方法

3-1. *Schizosaccharomyces pombe* 用発現ベクターの構築

発現プラスミドの作製には、*Sz. pombe* 用の発現ベクター pDUAL を用いた (Matsuyama *et al.*, 2004 Yeast)。本ベクターは、*nmt* プロモーターの強度 (高: *Pnmt1*、中: *Pnmt41*、低: *Pnmt81*) が異なる 3 種類のプラスミドにより発現量をコントロールすることが可能である。これらを用いた発現株を構築することにより、PtxD 発現強度と増殖との関係を調べた。プラスミドの作製は、In-Fusion HD Cloning System (タカラバイオ) を用いて行った。*Ralstonia* sp. 4506 株の染色体をテンプレートとして *ptxD* をプライマー (3318-1: CACCATCATCATATGAAGCCAAAGTCGTCCTCAC, 3318-2: ATCATCCTTATAATCTCAGCCGCTTTACTCCG) を用いた PCR 反応により増幅した。また、ベクター-DNA の線状化に、pDUAL-HFF1、pDUAL-HFF41、pDUAL-HFF81 をテンプレートとしてプライマー (3318-5: CATATGATGATGGTGGTGATGCATAG, 3318-6: GATTATAAGGATGATGACGATAAAC) を用いた PCR 反応を行い、増幅した約 7 kb の DNA 断片を反応に用いた。得られた DNA 断片をライゲーションし、反応産物

を *Escherichia coli* DH5 α に形質転換し、アンピシリン (100 μ g/mL) を含む LB 固体培地上で選択した。得られたプラスミドを pSZPT1、pSZPT41、pSZPT81 (図 1) とした。

図 1: *Sz. pombe* 用 PtxD 発現プラスミド pSZPT



3-2. *Saccharomyces cerevisiae* 用発現ベクター pSCT の構築

S. cerevisiae では、コドン偏位の影響によって、菌体内での PtxD 発現が低いという問題があった。そこで、*Ralstonia* sp. 4506 株由来の *ptxD* を *S. cerevisiae* に最適化した OPT2*ptxD* を DNA 合成 (GenScript USA) により作製した。*Ralstonia* sp. 4506 株の染色体をテンプレートとしてプライマー (pAUR_RptxD-1Ffw: ATCATTCTTTGCGTATGAAGCCAAAGTCGTCCTCAC, pAUR_RptxD-1Frv: GCAGATAAAATACTCTCAAGCAGCCTTTACTCCCG) を用いて PCR を行った。また、ベクターの線状化に、pAUR112 (タカラバイオ) をテンプレートとしてプライマー (pAUR112_fw: ACGCAAAGGAA TGATTTAAAGC, pAUR112_rv: GAGTATTTTATCTGC AATTACG) を用いて PCR 反応を行い、増幅した DNA 断片を線状化ベクターとして用いた。得られた DNA 断片は、前述と同様にライゲーションした。作製したプラスミドを *ptxD*/pAUR とした。つぎに、*ptxD*/pAUR をテンプレートとし、PCR 反応により IPC (Inositol phosphorylceramido) 遺伝子のプロモーター部位 (*pIPC*)、ターミネーター部位 (*tIPC*)、及びその間に挿入した *ptxD* を増幅した。プライマー (YE24_RptxD-1F fw: AGTCAGGCAC CGTGATAGCGTAAGAACAACACTAGCGAC, YE24_RptxD 1F rv: GCCGCCGGCTTCCATTCACGCCGCTTTACTCCG) を使用し、同様に PCR 反応を行った。ベクターには、2 μ m (マイクロ) プラスミド複製起点を持つ YE24 を用いた。YE24 をテンプレートとしてプライマー (YE24_fw: ATGGAAGCCGGCGGCACCTCGC, Ep24_rv: ACACGGT GCCTGACTGCGTTAGC) を用い、増幅した DNA 断片を線状化ベクターとして用いた。得られた DNA 断片は、上記と同様に大腸菌 DH5 α で目的のクローンを取得し、作製したプラスミドを pSCT とした。

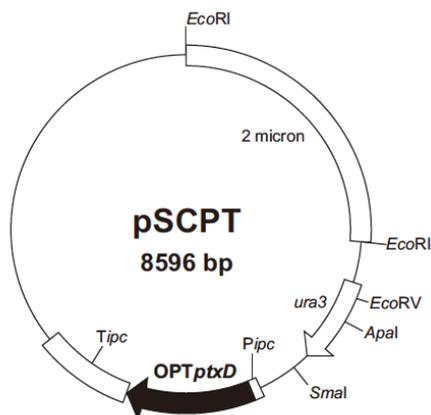


図 2 : 出芽酵母用 PtxD 発現プラスミド pSCPT

3-3. 酵母形質転換体の取得と培養条件

作製したプラスミドで *Sz. pombe*, *S. cerevisiae* W303 α をそれぞれ形質転換した。形質転換は酢酸リチウム法により行い、形質転換体は栄養要求性により取得した。得られた形質転換体をリン酸あるいは亜リン酸をリン源とする合成培地(下記)に植菌し、28で培養した。増殖速度の解析は経時的に OD600 を測定して行った。分裂酵母の合成培地には Edinburgh minimal medium (EM)培地、出芽酵母の培養には Synthetic Dextrose(SD)培地を用い、リン源を亜リン酸に変更したものをそれぞれ EM-Pt, SD-Pt とした。栄養要求性マーカーによる形質転換体の取得には、要求性アミノ酸を SD 培地に添加した固体培地を使用した。

3-4. 大腸菌における PtxD 発現と培養

大腸菌においては *ptxD* に加え、亜リン酸輸送体である *ptxABC* を共発現するコンストラクトを作製した(図 3)。4506 株のゲノムをテンプレートとして、プライマー (EcoPtxA(-186) fw: aagaattcTAGCAG GCGTCTATATTTGGCATAG, *ptxE*(+30)-XbaI rv: gctctagaACTCCCGCCAGAAGCAGGCATTCG)を用いて *ptxABCDE* を増幅し、pUC118 の EcoRI/BamHI サイトに挿入した。得られたプラスミド(*ptxABCDE*/pUC)を大腸菌 MG1655 に導入した。大腸菌の培養は MOPS-グルコース完全合成培地を用い、リン酸および亜リン酸を最終濃度 0.5mM になる様に添加した。

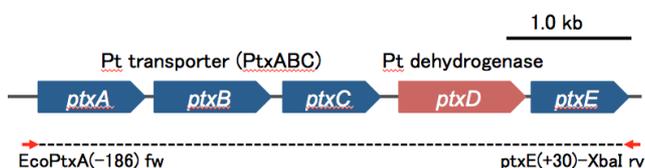


図 3 : *Ralstonia* sp. 4506 の *ptxABCDE* オペロン

3-5. 競合培養による選択性の評価

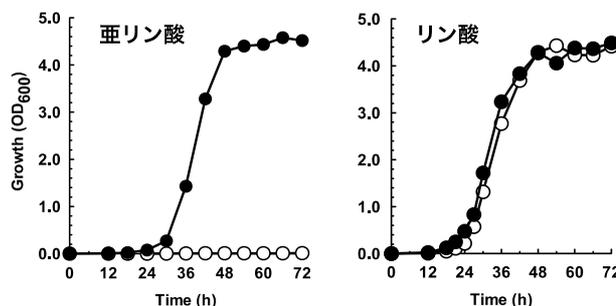
PtxD 導入大腸菌は MOPS-亜リン酸液体培地、競合株(*Bacillus subtilis* および *E. coli*-Km)は MOPS-リン酸液体培地を用いて前培養し、それぞれを滅菌水で洗浄し、MOPS-亜リ

ン酸液体培地に 2 種類の菌を混合植菌した。培養は 37 で振盪して行った。24 時間後と 48 時間後に培養液を 10^5 希釈し、アンピシリンを含んだ LB 培地に 0.1ml スプレッドすることで *ptxD* 導入大腸菌を計数した。また、培養液を 10^3 希釈し、カナマイシンを含んだ LB 寒天培地に 0.1ml スプレッドして野生型大腸菌を計数した。

4. 研究成果

4. 1. 酵母における PtxD の利用

出芽酵母として *S. cerevisiae* Kyokai No-6, -7, -9, Shochu SH-4 (実用酵母、多倍体)、*S. cerevisiae* W303 α (実験室酵母、単倍体)、分裂酵母として、*Schizosaccharomyces pombe* (単倍体)の亜リン酸利用能を調べたところ、全て亜リン酸をリン源として利用できないことが確認された。そこで、*ptxD* をマルチコピーベクターに導入したプラスミド (pSZPT1 : 図 1) を作製し、*S. pombe* に導入したところ、亜リン酸を単一のリン源とした合成培地で増殖し、最終到達菌体量はリン酸をリン源としたときとほぼ変わらないことが確認された(図 4)。また、合成培地プレート上における形質転換体の選択効率も、栄養要求性マーカーを利用した場合と遜色ないことが確認された他、染色体に導入して単一コピーでの選択も可能であるなど、非常に利



便性の高い選択マーカーとして利用できることが確認された。

図 4 : pSZPT を導入した *Sz. pombe* の増殖 (白丸 : コントロール株、黒丸 : pSZPT 導入株)

一方、*S. cerevisiae* においては、野生型 PtxD は機能せず、亜リン酸資化能を付与することはできなかった。この原因を調べたところコドン使用頻度に起因することが示唆されたため、コドンを *S. cerevisiae* に最適化した遺伝子 (OPT*ptxD*) を合成し、マルチコピープラスミドに挿入した。作製したプラスミド pSCPT (図 2) で実験室酵母 W303 α 、4 種類の実用酵母に導入した。その結果、形質転換株は亜リン酸依存的に増殖することができた。合成培地プレート上における直接選択の効率も栄養要求性マーカーとほぼ変わらず、形質転換の選択マーカーとして有効であった。しかしながら、液体培養における最終到達菌体量がリン酸使用時の 30% 程度であり、より多くの菌体収量を得る目的で PtxD を利用する場合は、この問題を解決する必要

があると考えられた。*S. cerevisiae* の培養液に亜リン酸を添加すると増殖が遅くなることが認められていることから、PtxD の発現量をさらに高め、取り込まれた亜リン酸の酸化速度を上げることが必要なのかもしれない。

4.2. 大腸菌における利用

大腸菌はバイオテクノロジーにおいて最も利用される事の多い宿主微生物のひとつであり、様々な生物に由来する遺伝子の異種発現系の宿主として利用されている。大腸菌には PtxD 以外にも亜リン酸の酸化経路が 2 種類存在することが知られている。一つは C-P リアーゼによる酸化経路 (Phn 経路) であり、もうひとつはアルカリホスファターゼ (PhoA) による経路である。前者は、ホスホン酸を代謝する 11 個の遺伝子からなる非常に複雑な反応で構成されており、亜リン酸もこの経路で酸化されると考えられている。後者は大腸菌の PhoA にのみ存在し、他の生物のアルカリホスファターゼにこの活性は存在しない。また、その活性は PtxD に比べると 100-1000 倍以上低い。実際に MG1655 株と ptxABCDE/pUC を導入した株の亜リン酸培地における比増殖速度を比較したところ、ptxABCDE 導入株は 0.524 h^{-1} 、野生株は 0.248 h^{-1} であった。

大腸菌において PtxD をマーカーとして利用するには、これらの内在性の亜リン酸酸化活性が存在しても、選択性を維持できるかどうか評価する必要がある。そこで、*Bacillus subtilis* および野生型大腸菌を混入菌のモデルとした競合培養を行った。まず、培養系に ptxD 導入大腸菌に対し 45 倍量の *B. subtilis* を同時に植菌した場合、培養終了時 (48 時間以降) に総菌体数の 99% 以上が ptxD 導入大腸菌によって占められていることが

て競合株が増殖することが懸念されたが、競合株の増殖は見られなかったためリン酸の放出は問題にならないこともわかった。さらに、72 時間培養後でも競合株が増殖を示すことはなかった (データ示さず)。従って、野生型大腸菌や C-P リアーゼを有する菌体が培養系に混入しても本手法は有効であると示唆された。今後、分子進化的手法などにより PtxD の活性を高めることなどで、より選択性を高めることができると考えている。

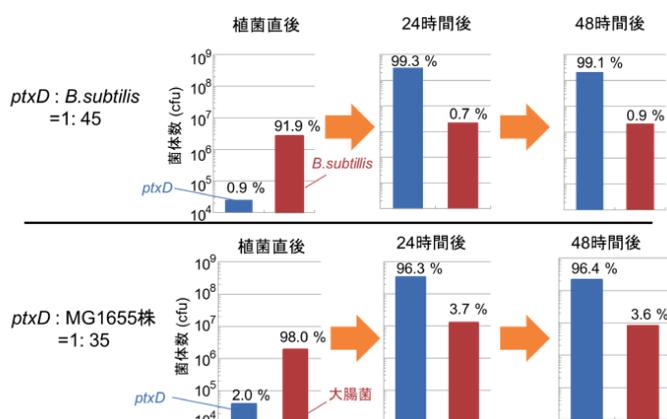
4.3. 今後の展望

現在のところ酵母と大腸菌以外の生物では、藻類 (*Synechococcus elongatus*)、植物 (シロイヌナズナ) において NAD⁺依存型の PtxD が機能することを確認している。これらの生物種における効果をみると、PtxD が異種宿主で機能するためには PtxD タンパク質の発現量が重要な要素の一つであるが、それに加えて宿主そのものの亜リン酸に対する感受性や亜リン酸の細胞内への取り込みも関係しているようである。今後、様々な生物において PtxD を広く利用するには、これらの関係を明確にする必要があると考えられる。また、使用する培地に関しては、今回の実験条件では、培地を滅菌しなくてもコンタミが起こることはほとんどなかった。よって、このシステムを使えば原料を未滅菌で使用するような大規模培養においても、抗生物質を利用しないで選択圧を与える培養が可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 6 件)

1. A. Saiki, Y. Ishida, S. Segawa, R. Hirota, T. Nakamura, A. Kuroda, A *Lactobacillus* mutant capable of accumulating long-chain polyphosphates that enhance intestinal barrier function, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 11, 1-7 (2016) doi:10.1080/09168451.2015.1135041 (査読有り)
2. K.-S. Ju, J. Gao, J. R. Doroghazi, K.-K. Wang, C. Thibodeaux, S. Li, E. Metzger, J. Fudala, J. Su, J. Zhang, J. P. Cioni, J. Lee, B. S. Evans, R. Hirota, D. P. Labeda, W. A. van der Donk, W. W. Metcalf, Discovery of phosphonic acid natural products by mining the genomes of 10,000 Actinomycetes, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 112(39), 12175-12180 (2015), doi: 10.1073/pnas.1500873112 (査読有り)
3. A. Kuroda and R. Hirota, Environmental biotechnology for efficient utilization of industrial phosphite waste. *Global Environ. Res.*, 19(1), 77-82 (2015) (査読有り)



分かった (図 5 上段)。

図 5: 競合培養による PtxD 導入菌の選択性評価

また、内在性の亜リン酸酸化活性を有する大腸菌の場合でも、植菌時に ptxD 導入株の 35 倍の菌が持ち込まれても培養終了時には ptxD 導入大腸菌が全体の 95% 以上を占めていた (図 5 下段)。長時間培養することで、死滅した菌体から放出されるリン酸によ

4. K. Kanda, T. Ishida, R. Hirota*, S. Ono, K. Motomura, T. Ikeda, K. Kitamura, A. Kuroda. Application of a phosphite dehydrogenase gene as a novel dominant selection marker for yeasts. J. Biotechnol., 182-183:68-73 (2014), doi:10.1016/j.jbiotec.2014.04.012 (査読有り)
5. K. Motomura, R. Hirota, M. Okada, T. Ikeda, T. Ishida, A. Kuroda. A new subfamily of polyphosphate kinase 2 (class III PPK2) catalyzes both nucleoside monophosphate phosphorylation and nucleoside diphosphate phosphorylation. Appl. Environ. Microbiol., 80(8), 2602-2608 (2014), doi: 10.1128/AEM.03971-13 (査読有り)

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 腸管保護成分ポリリン酸を高蓄積した乳酸菌菌体の生理活性評価 齋木 朝子、石田康晃、廣田 隆一、瀬川 修一、中村 剛、黒田 章夫 日本農芸化学会 2016 年度大会 (2016)、2016 年 3 月 28 日 (札幌コンベンションセンター、札幌市)
2. バクテリアの還元型リン化合物輸送機構の解析 廣田隆一、森部重彬、作田敦士、野口麗次、池田丈、黒田章夫 日本農芸化学会 2016 年度大会 (2016)、2016 年 3 月 30 日 (札幌コンベンションセンター、札幌市)
3. 次亜リン酸酸化酵素遺伝子を選択マーカーとした微生物培養法の開発 森部 重彬、廣田 隆一、石田 丈典、池田 丈、黒田 章夫 第 67 回日本生物工学大会(2015)、2015 年 10 月 28 日(城山観光ホテル、鹿児島市)
4. リン(+V)の新規微生物的還元経路の解析 廣田 隆一、池田 丈、黒田 章夫 第 67 回日本生物工学大会(2015)、2015 年 10 月 26 日 (城山観光ホテル、鹿児島市)
5. 亜リン酸デヒドロゲナーゼを利用した実用的微生物培養手法の開発、廣田隆一 公益社団法人新化学技術推進協会第 4 回新化学技術研究奨励賞受賞研究発表会、2015.5.27(新化学技術推進協会、東京都・千代田区)
6. 廣田隆一、神田圭輔、小野敏志、石田丈典、池田丈、黒田章夫 亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を用いた抗生物質を利用しない微生物の選択的培養、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015.3.27 (岡山大学津島キャンパス、岡山市)
7. 神田圭輔、廣田隆一、石田丈典、北村憲司、

池田丈、黒田章夫 亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を用いた酵母の選択的培養法の開発、第 66 回日本生物工学学会大会 (札幌コンベンションセンター・札幌市)、2014.9.9

8. 作田敦史、廣田隆一、池田丈、黒田章夫 耐熱性亜リン酸デヒドロゲナーゼの発見とその利用、日本農芸化学会 2014 年度大会 (明治大学生田キャンパス・川崎市) 2014.3.28

〔図書〕(計 4 件)

1. 加藤純一、田島誉久、黒田章夫、廣田隆一、本田孝介、大竹久夫 低炭素ケミカル生産のためのシンプル酵素触媒 ケミカルエンジニアリング、61(3) (2016)
2. 廣田隆一、黒田章夫 還元型リン化合物を利用したバイオテクノロジー 酵素工学ニュース、第 74 号、26-31 (2015)
3. 廣田隆一、黒田章夫 バイオ変換による貴重リン資源の回収・有効利用技術、バイオベース資源確保戦略(小西康裕監修)、CMC 出版、第 16 章、135-143、(2015)
4. 廣田隆一、黒田章夫 耐熱性亜リン酸デヒドロゲナーゼの発見と応用 環境バイオテクノロジー学会誌、14(1)、15-20 (2014)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子、および、当該遺伝子を用いた出芽酵母の選択的培養方法

発明者: 黒田章夫、廣田隆一

権利者: 国立大学法人広島大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-002024

出願年月日: 2014 年 01 月 08 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/akbio/>

受賞

第 4 回新化学技術研究奨励賞 2015 年 5 月 27 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣田 隆一 (Ryuichi HIROTA)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・助教
研究者番号: 90452614

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし