

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18275

研究課題名(和文) 微小反応場としての大腸菌フロックの形成制御と機能化

研究課題名(英文) Control and functionalization of Escherichia coli flocs as a reaction field

研究代表者

尾島 由紘(OJIMA, Yoshihiro)

大阪市立大学・大学院工学研究科・講師

研究者番号：20546957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、bcsBの過剰発現によって誘導される大腸菌の自発的なフロック形成が、外膜小胞と呼ばれる細胞外小胞の産生と関連していることを明らかにした。続いて、エタノール発酵をモデルケースとして、大腸菌のフロック形成を利用した菌体濃縮操作が発酵プロセスにおける生産性を向上できることを実証した。さらに、フロックの構成成分はタンパク質性であり、質量分析の結果から同定されたTsfタンパク質と融合発現させることで、組換えタンパク質を大腸菌のフロック上に修飾できることを示し、更なる機能化への足掛かりを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, the mechanism of flocculation by bcsB-overexpressed Escherichia coli cells was investigated. Mass spectrometry determination of floc proteins and TEM observation strongly suggested the involvement of outer membrane vesicles (OMVs) during the flocculation. From this point, E. coli flocculation by bcsB overexpression was significantly repressed in hypovesiculation phenotypes. Furthermore, we endowed an ethanol producer, E. coli K011 strain, with floc-forming ability. During the repeated batch operation, the amount of deposited cells in the flocs from the culture of K011/bcsB strain was about two times greater than that of K011 strain, led to the significant increase of ethanol productivity. Finally, a fused protein composed of an elongation factor Ts and GFP successfully expressed on the Escherichia coli flocs. Construction of fused protein with Tsf could be the tool to display heterologous protein on the E. coli floc structure.

研究分野：生物化学工学

キーワード：大腸菌 フロック 外膜小胞 エタノール生産 Tsf

1. 研究開始当初の背景

微生物凝集体であるフロックは、これまで活性汚泥法による水処理技術において、産業利用されてきた。フロック形成能力は活性汚泥の性質を左右するが、その自己凝集メカニズムは明らかとなっていない点が多く、活性汚泥等から単離された一部の環境微生物に限られている。一方で大腸菌はアミノ酸や組み換えタンパク質生産の宿主細胞として広く利用され、遺伝子組換えおよび培養工学技術が最も進んだ微生物の1つである。大腸菌のフロック形成を誘導する技術としては、カチオン性のポリマーや、ポリ塩化アルミニウムなどの凝集剤が利用されるが、菌体生存率を著しく低下させるなど、不要な微生物の回収・除去を目的とするものである。

代表者はこれまで、大腸菌のセルロース合成関連遺伝子である *bcsB* を過剰発現すると、グルコース存在下の懸濁培養において、直径数 mm 程度の大腸菌の自発的なフロックが形成されることを発見した。この大腸菌フロックは、高い生存率を保っていることから死菌の凝集体などではない。

本研究では、大腸菌のフロック形成機構の解明と形成過程の制御ならびに機能化によるバイオプロセスへの応用を目指した。

2. 研究の目的

本研究の目標は、大腸菌のフロック形成機構の解明と分子修飾に基づいた機能化の設計開発指針の確立である。大腸菌フロックを微生物集合体として用いることで、細胞内・細胞間の活性化を行う反応場として捉えることができる。具体的には、(1)*bcsB* 過剰発現による大腸菌フロック形成メカニズムの解明、(2)フロック形成現象の物質生産への応用、(3)表面修飾による微小反応場としてのフロック機能化、の3項目について検討する。微生物フロック形成の自在な制御が可能になれば、廃水処理、有用物質生産、感染症対策など、微生物が関与する分野・産業への波及効果は大きい。

3. 研究の方法

(1)大腸菌フロックの分解性の検討と構成成分の分析

大腸菌 K-12 株である BW25113 株と *bcsB* 遺伝子を導入した株 BW25113/*bcsB* を 2 g/L のグルコースを含む LB 培地 (LB-G) を用いて 37 °C で 24 時間培養し、観察によりフロック形成の有無を確認した。さらに形成されたフロックを回収し、セルラーゼ、プロテアーゼ、ヌクレアーゼなどで処理し、分解性を調べた。さらに、大腸菌フロックそのものをポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により解析し、37 kDa 付近に確認された特異的な濃いバンドに含まれるタンパク質を nanoLC-MS/MS 解析により同定した。

(2)電子顕微鏡によるフロックの観察

回収した大腸菌フロックをエポキシ樹脂に包埋した後に切片を作製し、透過型電子顕微鏡 (TEM) により観察した。

(3)外膜小胞の回収と評価

大腸菌を LB 培地 80 ml で培養した培養液に対して、遠心分離と孔径 0.45 μm のフィルター処理により、菌体を完全に取り除いた。そこに濃度が 400 g/L となるように硫酸アンモニウムを添加して塩析させ、遠心分離により外膜小胞を濃縮した。さらに、超遠心分離 (109,000 g, 1 時間, 4 °C) により外膜小胞を回収し、産生量を SDS-PAGE で確認した。大腸菌の外膜小胞産生量は、37 kDa 付近に現れる OmpC, F, A のバンドの濃淡により評価した。

(4)エタノール生産大腸菌 K011 株のフロック形成とエタノールの連続回分生産

微生物凝集体のバイオプロセスへの応用例として、凝集性酵母では短時間に菌体の自然沈降が起きるため、遠心分離を行わずとも菌体回収が可能となり、連続回分生産における時間とコストが削減できるとの報告がある。このような菌体濃縮操作に関するモデルケースとして、エタノール生産大腸菌である K011 株に *bcsB* 遺伝子を過剰発現させることでフロックを形成し、連続回分反応を行った。

(5)フロック上での Tsf - GFP 融合タンパク質の発現

フロックのタンパク質質量分析の結果から、細胞外膜タンパク質の他に、伸長因子 *tsf* タンパク質が多量に発現していることを突き止めた。そこで BW25113/*bcsB* 株に、さらにプラスミド ASKA-*tsf-gfp* を導入し、LB-G 培地で培養することで、フロック上での Tsf - GFP 融合タンパク質の発現を試みた。培養後、フロックを生理食塩水で洗浄し、2.5% グルタルアルデヒド溶液で固定した後に 50 μg/mL propidium iodide で DNA を染色し、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。

4. 研究成果

(1)大腸菌フロックの分解性の検討と構成成分の分析

形成された大腸菌フロックについて、種々の加水分解酵素に対する分解性を確認したところ、プロテアーゼ処理によって速やかに分解されることが明らかとなった。さらに、強アルカリである水酸化ナトリウム水溶液に対しても分解性を示したため、大腸菌のフロックを形成する基本成分はタンパク質性であると考えられた。さらに、フロックそのものを SDS-PAGE とそれに続く質量分析によって同定したところ、10 種類程度のタンパク質の存在が確認され、特に2つの細胞外膜タンパク質 OmpA と OmpC が高い存在比率を示すことが明らかとなった。文献等の調査を進める

内, OmpA と OmpC に関しては, 大腸菌が産生する外膜小胞 (Outer Membrane Vesicles; OMVs) と呼ばれる細胞外小胞に特徴的なタンパク質であり, 分離されたベシクルの定量評価指標として用いられていることなどから, フロック形成における OMVs の関与が示唆された。

(2) 電子顕微鏡によるフロックの観察

TEM 観察画像から, フロックを構成するポリマー構造体と大腸菌の存在がはっきりと確認された (図 1)。さらに拡大して観察したところ, ポリマー構造体の内外に脂質二重層様構造をもつ小胞体の存在が多数確認され, これらが OMVs である可能性が示された。

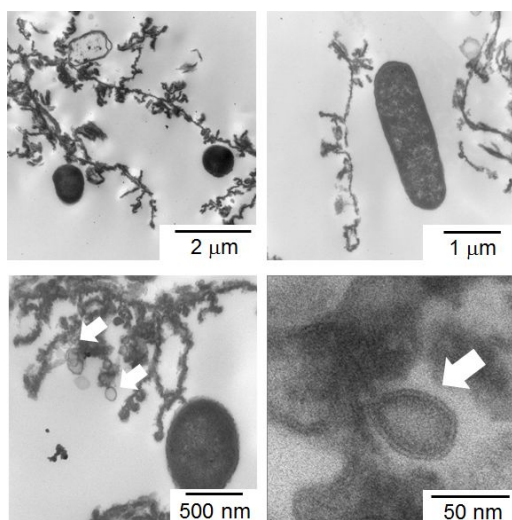


図 1 大腸菌フロックの TEM 画像。矢印は OMVs 様構造体を示す。

(3) 外膜小胞の回収と評価

OMVs は, 微生物の外膜から遊離した直径 20 ~ 250 nm の細胞外小胞であり, 外膜タンパク質やリポ多糖類, リン脂質によって構成される。これまで OMVs は, 細胞から不要物を排出する機構であると考えられてきたが, 近年になって細胞外に排出された OMVs が周囲の細胞に融合することで, 様々な物質の運搬に関わっていることが明らかとなってきた。OMVs 内には DNA, RNA やペリプラズムタンパク質などが含まれ, 表面には細胞外タンパク質が多数存在する。現在までのところ, OMVs の生理的な機能としては, 不要タンパク質などの細胞外への排出, 細胞間コミュニケーションに与するシグナル物質やプラスミド DNA の伝搬, バイオフィーム構造の安定化, 他種の微生物や宿主細胞への毒性物質の輸送, が考えられている。バイオフィームと OMVs の関連性に関しては, これまで多くの微生物のバイオフィーム構造内に OMVs が存在することが確認されている。以上のように, バイオフィーム形成と OMVs の関連性については多くの報告があるが, 広義のバイオフィームとしてのフロックと OMVs の関連性に関しては, ほとんど報告がない。

そこで, 各種欠損株を用いた裏付け試験を行った。これまでに OMVs の産生が促進 (*degP*) または抑制される (*dsbA*) と報告されている大腸菌の遺伝子欠損株を使用して, フロック形成との相関性について検討した。*degP* 遺伝子は, ペリプラズムに局在するセリンプロテアーゼをコードしており, その欠損によってペリプラズム中に不要タンパク質が蓄積することから, OMVs の産生量を促進すると報告されている。一方で, *dsbA* 遺伝子はペリプラズム内でジスルフィド結合を形成する機能を持ち, 詳細な機構は明らかとなっていないが, その欠損により OMVs 産生量が減少することが確認されている。

結果として, フロック形成に関しては, *bcsB* 過剰発現株に加え, *degP* 株においても形成が確認された (図 2A)。一方で, *dsbA* 株では, *bcsB* 遺伝子を過剰発現させてもフロックを形成せず, *dsbA* が大腸菌のフロック形成に必須であることが明らかとなった。この他, 凝集などに係る *flu* 遺伝子や細胞外小器官であるべん毛や線毛などのバイオフィーム形成に関連する様々な遺伝子欠損株に対して, *bcsB* 遺伝子の過剰発現を試みたが, 調査した範囲では *dsbA* とその関連遺伝子である *dsbB* の欠損株のみ, フロック形成の抑制を示した。続いて, OMVs 産生量に関しては, *degP* 株は予想通り野生株 (BW25113) と比較して OMVs 産生量が増加した (図 2B)。さらに興味深いことに, フロックを形成する *bcsB* 過剰発現株では顕著な OMVs 産生量の増加が見られた。一方で, *dsbA* 遺伝子を欠損することで *bcsB* 過剰発現株の産生量が大きく低下することも同時に確認された。

以上の結果より, 大腸菌のフロック形成と OMVs 産生量との間に正の相関が確認され, 大

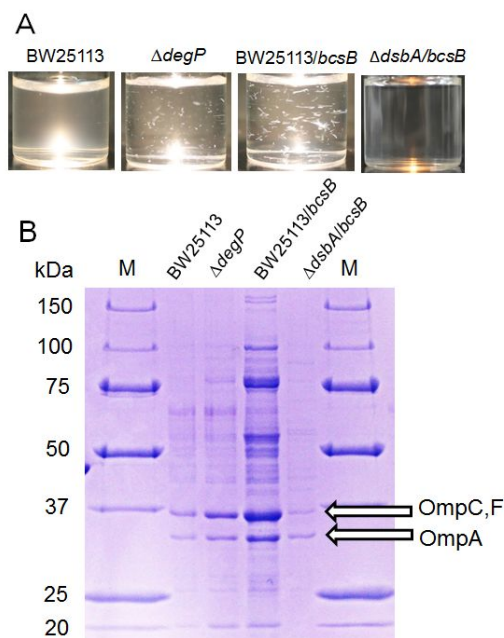


図 2 (A) 各大腸菌株のフロック形成, (B) OMVs 由来のタンパク質の SDS-PAGE 解析

腸菌の自発的なフロック形成においては、OMVs の産生が関与していることが示唆された。

(4) エタノール生産大腸菌 K011 株のフロック形成とエタノールの連続回分生産

K011/*bcsB* 株は、BW25113/*bcsB* 株と同様に肉眼で確認できる程度の大きさのフロックを形成した。顕微鏡による観察結果から 100 ~ 500 μm 程度の大きさであることが分かった。また、*bcsB* 遺伝子を導入することによるエタノール生産への影響は無かったことから、K011/*bcsB* 株はエタノール生産能力を維持した状態でフロックを形成していることが分かった。さらに 1 回目の回分反応によるエタノール生産の後に、自然沈降により菌体濃縮操作を行い、2 回目の回分反応を行うことで、フロックを形成する K011/*bcsB* 株は、形成しない K011 株と比較して、約 2 倍のエタノール生産性を示すことを実証した(図 3)。以上の結果から、自発的に形成された大腸菌フロックを物質生産の系へと展開できる可能性が示された。また大腸菌 K-12 株のみならず、B 株や O 株においても同様にフロック形成を確認しており、この現象が幅広く大腸菌に適用可能であると考えている。

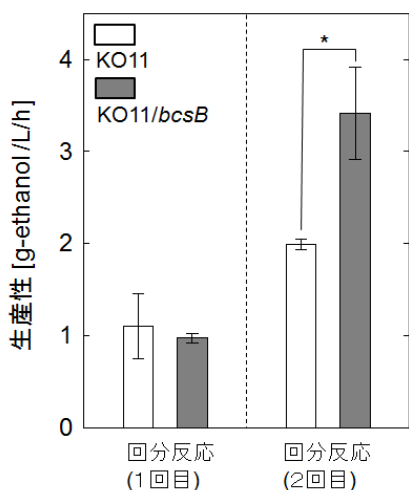


図 3 連続回分反応における各大腸菌株のエタノール生産性の比較。*は有意差を示す ($p < 0.05$)。

(5) フロック上での Tsf - GFP 融合タンパク質の発現

図 4A に示すように ASKA-*tsf-gfp* を導入した大腸菌に関してフロック形成が確認された。続いて、共焦点レーザー顕微鏡によって、Tsf-GFP と菌体を観察した結果、フロック上に融合タンパクの発現が確認できた(図 4B)。フロック上における GFP と菌体の局在性をさらに詳しく確認したところ、GFP の緑色蛍光は菌体が存在しない領域も含めたフロック構造全体にわたって確認された。このことから、Tsf-GFP は菌体の外側にも排出され、フロック表面上に固相分泌発現されてい

ると考えられた。一方で、*tsf* を融合せず GFP のみを発現した場合には、菌体内のみに GFP が局在している様子が確認された(データ未掲載)。この結果は、フロックの主構成成分であるタンパク質について、伸長因子である Tsf タンパク質が高い割合を占めることを裏付けるものであると同時に、Tsf と融合発現させることで組換えタンパク質を大腸菌のフロック上に修飾できることを示すものであり、自発的に形成されるフロックの更なる機能化へと展開可能である。

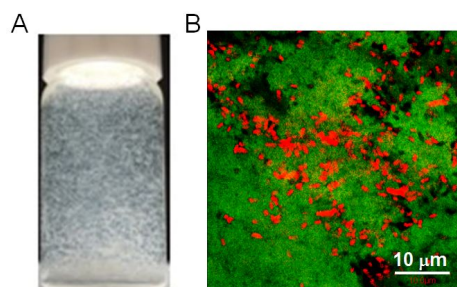


図 4 (A) フロック形成の様子、(B) 共焦点顕微鏡による観察像 (緑色: Tsf-GFP タンパク質, 赤色: 菌体)

(6) まとめ

本研究では、*bcsB* の過剰発現によって誘導される大腸菌の自発的なフロック形成が、外膜小胞と呼ばれる細胞外小胞の産生と関連していることを明らかにした。続いて、エタノール発酵をモデルケースとして、大腸菌のフロック形成を利用した菌体濃縮操作が発酵プロセスにおける生産性を向上できることを実証した。さらに、フロックの構成成分はタンパク質性であり、質量分析の結果から同定された Tsf タンパク質と融合発現させることで、組換えタンパク質を大腸菌のフロック上に修飾できることを示し、更なる機能化への足掛かりを得ることができた。

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 3 件)

Yoshihiro Ojima, Shota Nunogami, Masahito Taya, Antibiofilm effect of warfarin on the biofilm formation of *Escherichia coli* promoted by antimicrobial treatment. 査読有, Journal of Global Antimicrobial Resistance, Vol. 7, 2016, 102-105 DOI: 10.1016/j.jgar.2016.08.003.

Yoshihiro Ojima, Shota Takeda, Masahito Taya, Floc formation of ethanol producing *Escherichia coli* K011 cells and its application to repeated batch operation, 査読有, Journal of Chemical

Engineering of Japan, Vol. 49, No. 8, 2016, 793-798

DOI: org/10.1252/jcej.16we040

尾島由紘, 田谷正仁, 大腸菌のフロック形成現象におけるメンブランベシクルの関与, 査読無, バイオサイエンスとインダストリー, Vol. 74, No. 2, 2016, 120-123

[学会発表](計 11 件)

尾島由紘, 布上翔太, 東 雅之, 田谷正仁, 大腸菌フロック表面での組換えタンパク質固相発現, 化学工学会第 82 年会, C115, 東京都(江東区), 2017 年 3 月 6 日 (口頭発表)

Kashiwagi Miyuki Fernanda, 尾島由紘, 田谷正仁, Ethanol production by changing the redox status in *Escherichia coli*, 化学工学会第 82 年会, PB206, 東京都(江東区), 2017 年 3 月 7 日 (ポスター発表)

尾島由紘, 布上翔太, 東 雅之, 田谷正仁, 大腸菌フロック上での組換えタンパク質固相発現系の構築, 日本生物工学会大会平成 28 年度大会 3P-2p149, 富山県(富山市), 2016 年 9 月 30 日 (ポスター発表)

武田 祥太郎, 尾島由紘, 田谷正仁, 沈降性大腸菌を用いたファーメンターでのエタノール生産, 化学工学会第 48 回秋季大会, LQ282, 徳島県(徳島市), 2016 年 9 月 7 日 (ポスター発表)

Kashiwagi Miyuki Fernanda, 尾島由紘, 田谷正仁, Metabolic engineering of *Escherichia coli* with cofactor regeneration system for ethanol production, 化学工学会第 48 回秋季大会, LQ262, 徳島県(徳島市), 2016 年 9 月 7 日 (ポスター発表)

布上翔太, 尾島由紘, 田谷正仁, 大腸菌フロックを利用した新規組み換えタンパク質分泌生産, 化学工学会第 48 回秋季大会, LQ258, 徳島県(徳島市), 2016 年 9 月 7 日 (ポスター発表)

尾島由紘, 布上翔太, 武田祥太郎, 田谷正仁, メンブランベシクル現象に着目した大腸菌集合体の形成制御, 化学工学会第 81 年会, H304, 大阪府(吹田市), 2016 年 3 月 15 日 (口頭発表)

尾島由紘, Nguyen Hong Minh, 矢嶋黎輝, 田谷正仁「大腸菌のフロック形成とメンブランベシクル産生の関連性」日本生物工学会大会平成 27 年度大会, 3P-146, 鹿児島県(鹿児島市), 2015 年 10 月 28 日 (ポスター発表)

布上翔太, 尾島由紘, 田谷正仁, 抗菌剤暴露により誘引される大腸菌バイオフィーム形成促進とメンブランベシクル産生の関連性」化学工学会第 47 回秋季大会, ZB1P04, 北海道(札幌市), 2015 年 9 月 9 日 (ポスター発表)

武田 祥太郎, 尾島由紘, 田谷正仁, エタノール生産大腸菌へのフロック形成能の

付与, 化学工学会第 47 回秋季大会 ZB1P12, 北海道(札幌市), 2015 年 9 月 9 日 (ポスター発表)

Yoshihiro Ojima, Minh Hong Nguyen, Reiki Yajima, Masahito Taya, Promoted flocculation of *Escherichia coli* cells in association with outer membrane vesicle production, EUROBIOPILMS 2015, PS02.62, Brno, Czech, June, 25, 2015 (poster presentation)

[その他]

ホームページ等

<http://rdbsv02.osaka-cu.ac.jp/profile/ja.ZmQMwiZkv1fgkuVwgb80nA==.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾島 由紘 (OJIMA, Yoshihiro)
大阪市立大学・大学院工学研究科・講師
研究者番号: 20546957

(2) 研究分担者

()

研究者番号: