

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07731

研究課題名(和文) ユビキノン生合成系に着目した高度有機溶媒耐性大腸菌の創製

研究課題名(英文) Construction of organic solvent-tolerant Escherichia coli based on quinone biosynthesis

研究代表者

道久 則之 (Doukyu, Noriyuki)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：60302957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌の有機溶媒耐性の改善は、有機溶媒様化合物などの様々な物質の生産に有用である。本研究により、メナキノン(ビタミンK)の生合成中間体である1,4-ジヒドロキシ-2-ナフト工酸(DHNA)が大腸菌の有機溶媒耐性を向上させることが示された。また、DHNA添加における大腸菌の有機溶媒耐性化はAcrAB-ToIC多剤排出ポンプの増加が要因の一つとなっていることが示された。さらに、MarAやSoxSなどの転写活性因子によってAcrAB-ToICの発現が促進されることも示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオ燃料や化学製品等の有用物質生産の効率化のため、微生物の有機溶媒耐性機構が注目されている。化学製品の製造プロセスにおいて一般的に使用されている有機溶媒の存在下では、有機溶媒の細胞毒性のため、生産効率が著しく低下する。このため、用いる細胞に有機溶媒耐性を付与することが重要な課題である。本研究の成果はバイオ燃料や化学製品を製造する幅広い産業分野に普及することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Biotechnological applications for the synthesis of various valuable chemicals can reduce wastes, save raw materials, and conserve energy. Enhancement of organic solvent-tolerance in microorganisms is expected to enhance the production level of valuable chemicals in the presence of organic solvent. AcrAB-ToIC efflux pump plays an important role in organic solvent-tolerance in E. coli. Three homologous transcription activators MarA, SoxS, and Rob regulate a common set of genes known as the mar-sox-rob regulons such as acrAB, and tolC involved in organic solvent-tolerance in E. coli. In this study, we found that 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA) increases organic solvent-tolerance in E. coli. AcrAB-ToIC pump was found to be involved in the improvement of organic solvent tolerance by DHNA. In addition, it was found that homologous transcription factors MarA and SoxS are involved in the expression of AcrAB-ToIC efflux pump.

研究分野：応用微生物学

キーワード：有機溶媒 大腸菌 キノン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

資源の枯渇や環境汚染などの社会問題を背景に、石油物質の代替資源の開発や環境修復の研究が盛んになり、新たな微生物機能の開発や微生物の工学的利用が着目されている。これまでに、石油を炭素源として微生物由来のタンパク質を生産する目的や、環境中に流出した有害な有機溶媒を分解する目的から有機溶媒を単一炭素源として生育する微生物が数多く分離されている。しかし、トルエンやベンゼンといった有毒な有機溶媒を多量に培地に添加した場合に、生育できる微生物は報告されていなかったが、1980年代後半に、培地と等量のトルエンが存在する環境において良好な生育を示す *Pseudomonas putida* IH-2000 株が報告された。この発見を契機に有機溶媒耐性菌を用いた有機溶媒存在下における有用物質の生産などの非水系バイオプロダクションの研究が盛んに実施されるようになった。

大腸菌や *Pseudomonas* 属細菌の主要な有機溶媒耐性機構として、薬剤排出ポンプによる溶媒分子の排出が知られている [1]。大腸菌の場合には AcrAB-TolC 排出ポンプが溶媒耐性に関与する。AcrAB-TolC ポンプは、内膜に存在するトランスポーター (AcrB)、外膜のチャネル (TolC) およびそれらを繋ぐアダプタータンパク質 (AcrA) からなる (図 1)。これら 3 者複合体は膜貫通型の薬剤排出ポンプを形成し、プロトン駆動力をエネルギー源として抗生物質や有機溶媒などを菌体外へ排出する。我々は、*acrAB* や *tolC* 遺伝子の発現に関与する転写制御因子である *marR* と *acrR* の両遺伝子に変異を導入すると、AcrAB-TolC ポンプが高発現化し、大腸菌が高度に有機溶媒耐性化することを見出した。この研究で構築された変異株は、強毒性の *p*-キシレンを含む有機溶媒存在下で生育可能であり、国内外のグループから報告されている溶媒耐性大腸菌よりも非常に高いレベルの溶媒耐性を示した。この他に、申請者は、浸透圧調節に関与する *proV* 遺伝子や *lon* 遺伝子を欠失させた大腸菌の有機溶媒耐性が、顕著に向上することも見出していた [2,3]。

*acrAB* や *tolC* は *mar-rob-sox* レギュロンに属しており、MarA、Rob、SoxS などの転写活性化因子によって AcrAB-TolC の発現が促進される (図 2) [4]。そのため、MarA や Rob および SoxS の発現量は、大腸菌の AcrAB-TolC ポンプの発現量ならびに有機溶媒耐性に大きく影響する。*mar* オペロンは MarR、MarA、MarB の 3 つのタンパク質をコードしている [5]。MarA は標的遺伝子の発現を向上させるアクチベーターとして作用する。MarA の発現はリプレッサーの MarR によって抑制されている。MarA の発現誘導物質としてサリチル酸が知られているが、サリチル酸は MarR に結合して、MarR のリプレッサーとしての作用を抑制することにより、MarA の発現を向上させる。

*sox* オペロンは酸化ストレス応答に関与することが報告されている。スーパーオキシドなどの酸化ストレスから細胞を保護する役割がある。*sox* オペロンは SoxR、SoxS の 2 つのタンパク質をコードしている [6]。SoxR は通常はリプレッサーとして働くが、細胞内でスーパーオキシドなどの酸化ストレスが発生すると活性型となり、SoxS の発現を向上させる。SoxS の誘導物質として酸化剤のパラコートやブルンバギンが報告されている。

*rob* の発現は構成的である [7]。Rob の C 末端にピピリジルやデカン酸のような誘導物質が結合すると、重合体から単量体の Rob 分子に変化する。単量体となった Rob 分子は活性型であり、標的遺伝子の発現を誘導する。

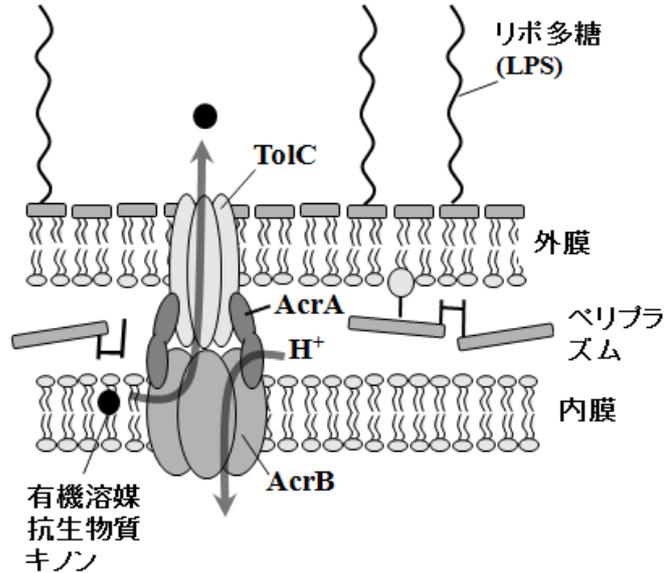


図 1. 大腸菌の細胞表層構造と AcrAB-TolC 排出ポンプによる様々な物質の排出

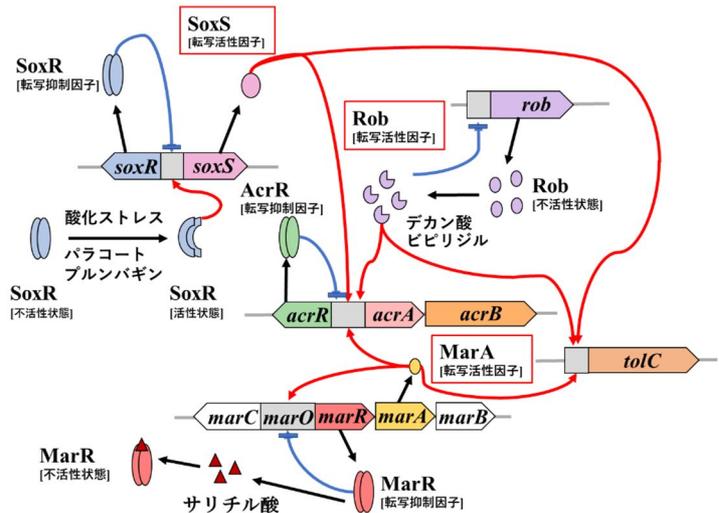


図 2. 大腸菌の AcrAB-TolC の発現制御

転写活性化因子である MarA や Rob および SoxS は、AcrAB-TolC の発現を促進させる。赤矢印は、転写活性化因子として転写を活性化することを表し、青矢印は、転写抑制化因子として転写を抑制することを表している。

## 2. 研究の目的

これまでの研究によって、メナキノン（ビタミン K）の生合成中間体である 1,4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸（DHNA）が大腸菌の有機溶媒耐性を向上させることが示された。メナキノンは原核生物の呼吸鎖における電子伝達体として重要な役割を果たしている。本研究では、大腸菌のキノンと有機溶媒耐性の関係を明らかにするとともに、キノンによる溶媒耐性化機構への AcrAB-TolC ポンプの関与について調べ、そこで得られた知見を基に高度な有機溶媒耐性を示す大腸菌を構築することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 有機溶媒耐性度評価

大腸菌の有機溶媒耐性度評価はスポット法により行った[1]。

### (2) AcrAB-TolC 多剤排出ポンプの発現量の測定

*acrAB* や *tolC* のプロモーター領域を含む標的遺伝子を pMC1403 に導入したプラスミドを用いて、発現した  $\beta$  ガラクトシダーゼの酵素活性を測定するレポータージーンアッセイを行った。

### (3) MarA、Rob、SoxS の発現量の測定

MarA、Rob、SoxS の発現量の測定のため、プロモーター領域を含む標的遺伝子を pMC1403 に導入したプラスミドを用いて、発現した  $\beta$  ガラクトシダーゼの酵素活性を測定するレポータージーンアッセイを (3) と同様に行った。

## 4. 研究成果

### (1) DHNA による有機溶媒耐性度の向上化

大腸菌 BW25113 株の有機溶媒耐性度評価をスポット法により行った (図 3)。*n*-Hexane : Cyclohexane (9:1) 混合溶媒を重層した LBGMg 寒天培地を用いて、DHNA の最適添加量を調べた。有機溶媒を重層しない場合、平板培養において DHNA を培地に添加しても大腸菌の生育への影響は認められなかった。*n*-Hexane : Cyclohexane (9:1) を用いた場合、DHNA を添加することにより有機溶媒耐性度が向上し、DHNA の終濃度 0.25 mM において最も高い生育頻度が認められ、無添加時に比べて 100 倍ほど生育頻度が向上した。液体培養による大腸菌の有機溶媒耐性度評価を行ったところ同様な結果が得られた。

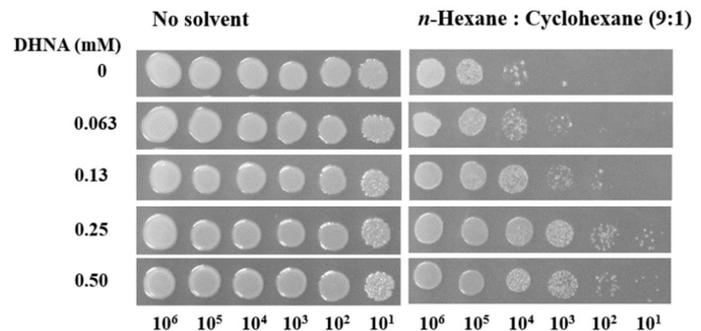


図 3. 大腸菌の有機溶媒耐性に対する有機溶媒の影響

### (2) DHNA の AcrAB-TolC ポンプへの影響

DHNA による有機溶媒耐性化に AcrAB-TolC 多剤排出ポンプが関与するかを調べるため、AcrAB-TolC ポンプを構成している *acrB* が欠失した  $\Delta$ *acrB::Km* 株を用いて有機溶媒耐性度評価を行った。この結果、有機溶媒[*n*-Nonane:*n*-Octane (1:1)] 重層下において、 $\Delta$ *acrB::Km* 株は DHNA を添加しても有機溶媒耐性度は向上せず、有機溶媒を重層しない場合と同様に  $10^1$  倍希釈程度の生育しか示さなかった。したがって、DHNA 添加による有機溶媒耐性化は AcrAB-TolC ポンプに依存することが示された。

### (3) AcrAB-TolC の発現

#### レベルの測定

DHNA の添加により、AcrAB-TolC の発現量が向上するかを調べた。標的遺伝子のプロモーターの発現を  $\beta$  ガラクトシダーゼの酵素活性を調べることにより測定する方法であるレポータージーンアッセイを行った (図 4)。レポーター

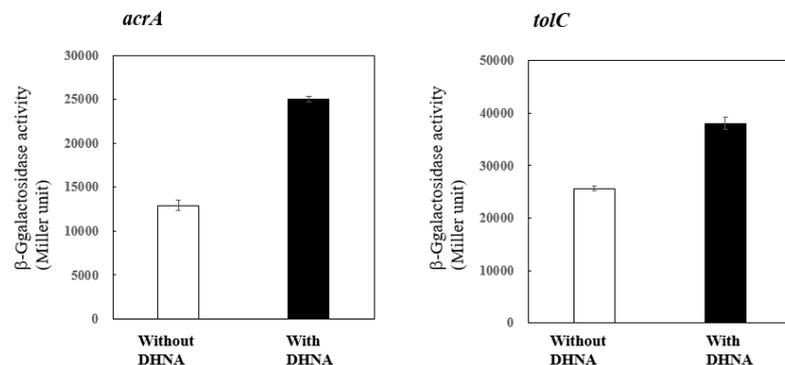


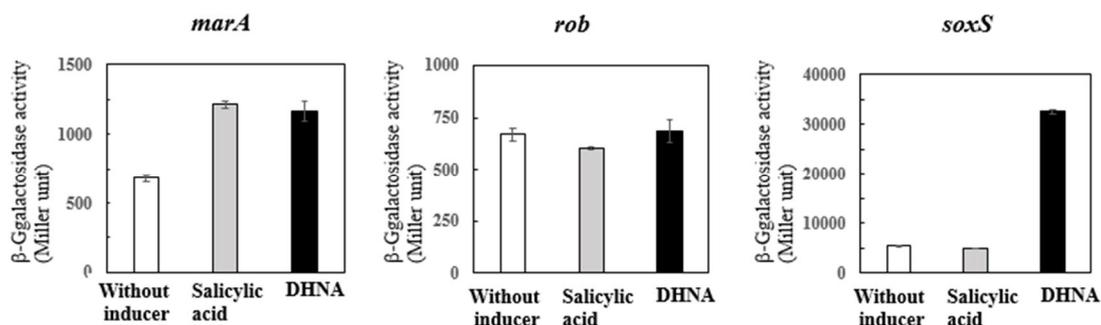
図 4. AcrAB-TolC の発現レベルの測定

ジーンアッセイにより BW25113 株の

AcrAB および TolC の発現レベルを測定した。DHNA を添加することにより、AcrAB および TolC の発現レベルは、約 2 倍増加していることが示された。以上から、DHNA 添加における大腸菌の有機溶媒耐性化は AcrAB-TolC 多剤排出ポンプの増加が要因の一つとなっていることが示唆された。

#### (4) DHNA による MarA、Rob、SoxS の発現誘導

培地に DHNA や、対照として Mar 系の誘導物質であるサリチル酸を添加し、MarA、Rob、SoxS の発現レベルを調べた (図 5)。レポーター遺伝子アッセイの結果、サリチル酸と DHNA の両方が MarA の発現に関与することが示された。また、SoxS の発現に関与したのは、DHNA のみであった。本実験で用いた物質において Rob の発現に関与する物質はなかった。この結果から、DHNA はサリチル酸とは異なり Mar 系と Sox 系の両方を活性化することが示された。DHNA はプロバイオティクス分野において注目されているが、有機溶媒耐性化を誘導する新たな物質として、活用できることが期待される。



**図 5. DHNA とサリチル酸による MarA、Rob、SoxS の発現量の変化**

AcrAB-TolC ポンプの発現に関与する転写活性化因子の MarA、Rob、SoxS の発現量を、DHNA およびサリチル酸を添加して比較した。エラーバーは標準偏差を示す (n=3)。

#### 引用文献

1. Tsukagoshi N, Aono R. Entry into and release of solvents by *Escherichia coli* in an organic-aqueous two-liquid-phase system and substrate specificity of the AcrAB-TolC solvent-extruding pump. *J Bacteriol.* 2000;182(17):4803-4810.
2. Doukyu N, Ishikawa K, Watanabe R, et al. Improvement in organic solvent tolerance by double disruptions of *proV* and *marR* genes in *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol.* 2012 Mar;112(3):464-74.
3. Watanabe R, Doukyu N. Improvement of organic solvent tolerance by disruption of the *lon* gene in *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng.* 2014 Aug;118(2):139-44.
4. Barbosa TM, Levy SB. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. *J Bacteriol.* 2000 Jun;182(12):3467-74.
5. Cohen SP, Hächler H, Levy SB. Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (*mar*) locus in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1993;175(5):1484-1492.
6. Gu M, Imlay JA. The SoxRS response of *Escherichia coli* is directly activated by redox-cycling drugs rather than by superoxide. *Molecular microbiology.* 2011;79(5):1136-1150.
7. Rosenberg EY, Bertenthal D, Nilles ML, et al. Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein. *Mol Microbiol.* 2003 Jun;48(6):1609-19.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 藤澤 秀之、道久則之
2. 発表標題 キノン合成中間体による大腸菌の有機溶媒耐性化機構
3. 学会等名 極限環境生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三木 護、道久則之
2. 発表標題 高度な有機溶媒耐性を有する大腸菌変異株の解析
3. 学会等名 極限環境生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Fujisawa and N. Doukyu
2. 発表標題 Involvement of a metabolite of menaquinone biosynthesis in organic solvent tolerance in Escherichia coli.
3. 学会等名 The 12th International Congress on Extremophiles (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Miki and N. Doukyu
2. 発表標題 Organic solvent tolerance of Escherichia coli mutant that is tolerant to a mixture of p-xylene and toluene
3. 学会等名 The 12th International Congress on Extremophiles (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤澤 秀之、道久則之
2. 発表標題 メナキノン合成中間代謝物による大腸菌の有機溶媒耐性化
3. 学会等名 極限環境生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三木 護、道久則之
2. 発表標題 高度に有機溶媒耐性化した大腸菌変異株の解析
3. 学会等名 極限環境生物学会
4. 発表年 2017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
---------------------------	-----------------------	----