

令和元年6月14日現在

機関番号：23201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15248

研究課題名(和文) 有機溶媒耐性コクリア属細菌を用いたキラル化合物生産バイオプロセスの開発

研究課題名(英文) Development of bioprocess for producing various chiral compounds using organic solvent-tolerant microorganism *Kocuria rhizophila* DC2201

研究代表者

戸田 弘 (Toda, Hiroshi)

富山県立大学・工学部・講師

研究者番号：60608321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：1)有機溶媒耐性菌*Kocuria rhizophila* DC2201で利用可能な新規シャトルベクター pKITE301およびその派生ベクターを構築し、様々な酵素遺伝子の異宿主発現および有用化合物生産への応用について検討した。スチレン酸化酵素、アルコール脱水素酵素、フラボノイドメチル化酵素等の発現を行い、各種化合物生産を行った。

2)*K. rhizophila* DC2201を有機溶媒存在下で培養し、転写されたmRNAを次世代シーケンスにより網羅的に解析した。各種レギュレーターやトランスポーターに加え、細胞外多糖類の合成に関与すると思われる遺伝子群の転写量が上昇することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有用化合物生産の宿主として有望な有機溶媒耐性菌*K. rhizophila* DC2201で利用可能な新規シャトルベクターを開発し、様々なバイオプロセスへの応用の可能性が見出された。特に細胞毒性が強い各種有機化合物の生産に応用可能なことから、医薬品中間体等の効率的な生産への応用が期待される。次世代シーケンスを利用したRNA転写解析を行った結果、*K. rhizophila* DC2201を有機溶媒に曝露した時に複数の糖転移酵素やマンノース生合成酵素の転写量が増加した。これらは細胞外多糖の合成に関与すると予測されることから、これらの機構を利用した有機溶媒耐性宿主の創製に応用可能であると期待される。

研究成果の概要(英文)：1) We constructed novel *E. coli*-*Kocuria* shuttle vector pKITE301 and its derivatives using cryptic pKPAL3 plasmid from *K. palustris* IPUFS-1. Various enzymes including styrene monooxygenase, alcohol dehydrogenase, and flavonoid methyltransferase were expressed in *K. rhizophila* DC2201 using pKITE301 for producing chiral compounds and methylated flavonoids.

2) *K. rhizophila* DC2201 was cultured in the presence of an organic solvent, and the transcribed mRNA was comprehensively analyzed by next-generation sequencing. When *K. rhizophila* DC2201 cells were cultured in the presence of organic solvent, transcription level of several genes coding response regulator and transporter were markedly increased. Additionally, transcription level of several glycosyl transferases and mannose biosynthesis genes also increased. It was suggested that these genes were involved in synthesis of extracellular polysaccharide to improve organic solvent tolerance of *Kocuria* cells.

研究分野：遺伝子工学、代謝工学、応用微生物学、酵素工学

キーワード：有機溶媒耐性菌 *Kocuria rhizophila* キラル化合物 シャトルベクター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

放線菌属細菌である *Kocuria rhizophila* DC2201 は高い有機溶媒耐性および耐塩性を有し、難水溶性化合物を対象とする物質生産バイオプロセスへの利用が期待される。我々はこれまでの研究において、コクリア属細菌 *K. rhizophila* DC2201 を宿主としたスチレン酸化酵素(SMO)の発現と光学活性エポキシ化合物生産を試み、本菌株が毒性の高いアルケン化合物を効率よくエポキシ化できる有望な宿主であることを見出している。しかしながら本菌株で利用可能な遺伝子発現ツールがほとんどなく、遺伝子破壊や挿入などのゲノム改変技術も未整備である。また遺伝子発現解析などの情報もほとんどないため、高発現プロモーターや誘導プロモーターなども明らかになっていない。そこで我々は本菌株の高度利用を目指し、本菌で利用可能な遺伝子発現ツールの構築を行ってきた。同族の菌種である *K. palustris* IPUFS-1 より内在性プラスミドを単離し、それらを利用したシャトルベクター構築や組換えタンパク質発現、物質生産への応用について検討してきた。

2. 研究の目的

(1)有機溶媒耐性菌 *K. rhizophila* DC2201 で利用可能なシャトルベクターの開発を継続して進める。新規に作成したシャトルベクターを用いて各種有用酵素遺伝子を *K. rhizophila* DC2201 内で発現させ、有用物質生産への応用を試みる。

(2)*K. rhizophila* DC2201 を有機溶媒に曝露した際にどのような遺伝子で発現変動が起こるか、またどの遺伝子が有機溶媒耐性に寄与するかを明らかにするために、RNA シーケンスによる遺伝子転写発現の網羅的解析を行う。変動幅の大きい遺伝子群からストレス応答に関与するとと思われる遺伝子を選抜し、そのメカニズムを検証する。

3. 研究の方法

(1)**大腸菌-Kocuria シャトルベクター開発**:魚醬から単離したコクリア属細菌 *K. palustris* IPUFS-1 から内在性プラスミドを抽出、精製し、トランスポゾンを利用したプラスミドレスキューを行った。新たに得られたプラスミドの塩基配列を決定し、複製保持に寄与する領域を決定した。大腸菌用ベクター-pHSG298 および pUC118 に複製最小領域を導入し、*K. rhizophila* DC2201 への形質転換を行いシャトルベクター化を行った。また構築したシャトルベクターにスチレン酸化酵素(SMO)やフラボノイドメチル化酵素(FOMT)を導入して *K. rhizophila* DC2201 における異種発現を行い、物質生産への応用を検討した。

(2)**有機溶媒曝露時における *K. rhizophila* DC2201 の遺伝子発現変動解析**:*K. rhizophila* DC2201 を様々な濃度の極性有機溶媒(DMF, DMSO, アルコール類など)存在下で培養し、各有機溶媒に対する生育可能な濃度を検討した。生育可能濃度な有機溶媒に曝露後 30 分間および 2 時間後の菌体から全 RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた mRNA の発現解析を行った。通常の培地で生育したサンプルとの mRNA の転写量を比較し、有機溶媒曝露時に著しく発現量が変動する遺伝子の探索を行った。

4. 研究成果

(1)大腸菌シャトルベクター開発

K. palustris IPUFS-1 より抽出精製した内在性プラスミドのプラスミドレスキューによるクローニングを行い、新たに pKPAL3 を得た。このプラスミドの複製最小領域を決定し、pHSG298 および pUC118 にクローニングし *E. coli*-*Kocuria* シャトルベクターを構築した(図 1)。このシャトルベクターを用いて各種 *Kocuria* 属細菌に件室転換を試みた結果、*K. rhizophila* をはじめとする各種 *Kocuria* 属細菌に対して形質転換能を有することが確認された。また、本ベクターの複製保持安定性を検討した結果、選択薬剤非存在下における安定性が低く、数回の継代培養により 90%以上脱落することが明らかとなった(論文 および学会発表、)。

構築したシャトルベクターに各種酵素遺伝子(スチレン酸化酵素、アルコール脱水素酵素、フラボノイドメチル化酵素)をクローニングし、*K. rhizophila* DC2201 における異宿主タンパク質発現を行った。これらの形質転換菌体を用いて各種化合物の生産試験を行い、キラルエポキシ化合物、キラルアルコール、メチル化フラボノイドなどの生産試験を行った(学会発表、)。今後さらに、様々な酵素の発現への応用およびプロモーターの改良等を行う予定である。

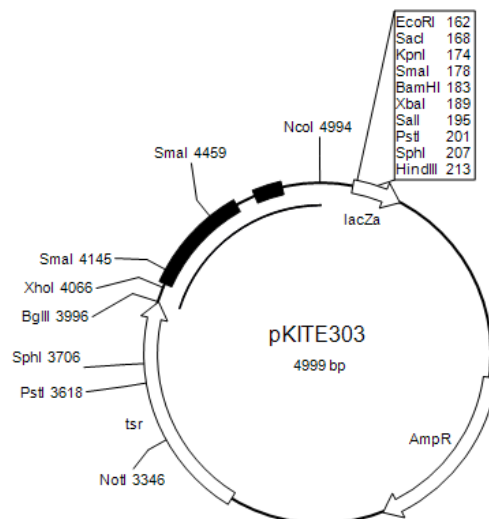


図1 シャトルベクター-pKITE303

(2) 有機溶媒曝露時における *K. rhizophila* DC2201 の遺伝子発現変動解析

K. rhizophila DC2201 の有機溶媒耐性機構を明らかにするために、次世代シーケンスによる転写発現解析を行った。RNA の調製条件を決定するため、まず *K. rhizophila* DC2201 の溶媒耐性について検討した。各種極性有機溶媒を任意の濃度で添加した培地で培養した結果、10%(v/v) の DMF 添加した培地において、生育速度が若干低下するものの問題なく生育することが明らかとなった。また、15%DMF 添加条件では生育が著しく阻害されたことから、10%DMF で菌体を処理後 RNA を抽出することとした。DC2201 液体培地にて *K. rhizophila* DC2201 を培養し、OD₆₆₀=2 に到達した時点で終濃度 10%になるように DMF を添加し、30 分間および 2 時間処理を行った。処理後の菌体を回収し、市販のキットを用いて total RNA を抽出後、次世代シーケンスによる mRNA 配列解析を行った。なおシーケンスは日本ジーンウィズ株式会社に外注し行った。

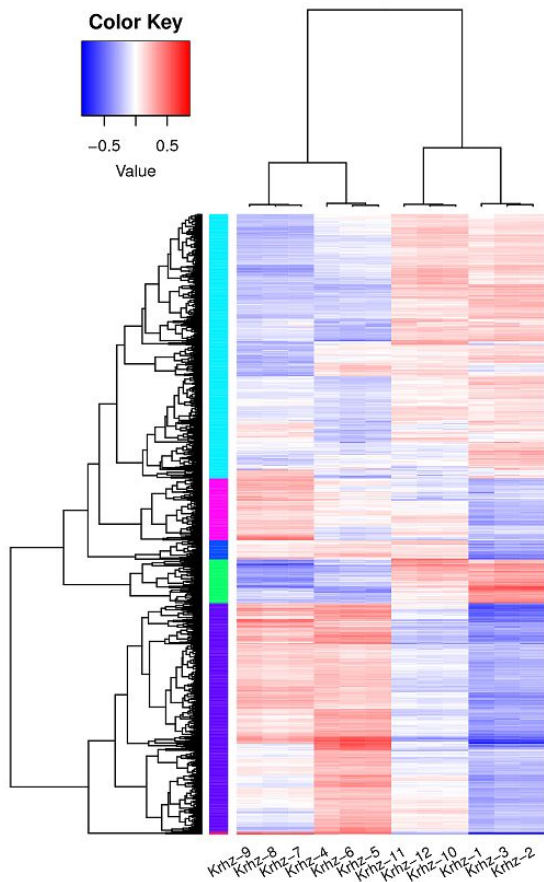


図 2 ヒートマップ解析結果

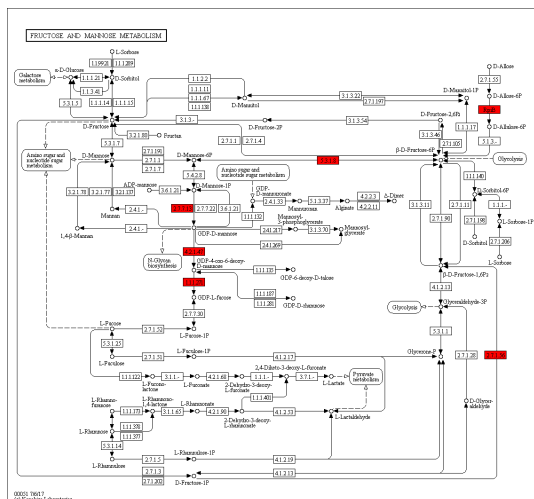


図 3 有機溶媒曝露時に転写量が上昇する遺伝子の KEGG パスウェイ解析

RNA 転写量の変化を統計学的手法により解析した結果、約 300 の遺伝子で顕著な発現量の上昇もしくは低下が見られた(図 2)。それらの遺伝子の中には Two component system を構成するレスポンスレギュレーターおよび 因子などのグローバルレギュレーター、薬物等の輸送等に関与すると思われるトランスポーター遺伝子が含まれていた。特徴的な点として、いくつかの糖転移酵素およびマンノース代謝に関与する遺伝子群の発現量が著しく向上していること明らかとなった(図 3)。これはおそらく、菌体外多糖(EPS)の構成糖成分を変化させて細胞表面の親水性を向上させ、有機溶媒の侵入を防ぐためではないかと推測される。*K. rhizophila* とおなじグラム陽性細菌である *Rhodococcus* 属細菌において EPS の成分および量の違いによりラフ型、ムコイド型の形態が著しく異なるコロニーを形成し、またその有機溶媒に対する耐性が大きく異なることが報告されている¹⁾。この EPS の主要成分としてマンノースが含まれることが明らかとなっていることから、*K. rhizophila* DC2201 においても同様の機構がその有機溶媒耐性に寄与していることが示唆される。今後、これらの遺伝子の破壊株や EPS 構成糖成分の詳細な解析を通し、*K. rhizophila* DC2201 が示す有機溶媒耐性メカニズムの解明を行っていく予定である。

参考文献

1) Journal of Environmental Biotechnology, 7, 11-17 (2007)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

H. Toda, N. Itoh, Development of a Novel *Escherichia coli*-*Kocuria* Shuttle Vector Using the Cryptic pKPAL3 Plasmid from *K. palustris* IPUFS-1 and Its Utilization in Producing Enantiopure (S)-Styrene Oxide, *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8, 2313 (peer review)

〔学会発表〕(計 4 件)

戸田 弘、物質生産プラットフォームとしての有機溶媒耐性菌の利用および分子育種ツールの開発、2017年度 日本生物工学会中部支部例会、2017

戸田 弘、伊藤伸哉、新規 *E. coli*-*Kocuria* シャトルベクターの開発と有用物質生産への応用、第19回生体触媒化学シンポジウム、2017

高木大輔、戸田 弘、伊藤伸哉、有機溶媒耐性菌を用いたメチル化フラボノイドの生産、第19回生体触媒化学シンポジウム、2017

H. Toda, N. Itoh, Isolation of diverse styrene monooxygenase genes from soil metagenomes by S-GAM (Screening of Gene-Specific Amplicons from Metagenomes) method, 15th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, 2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。