

平成21年 6月 1日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19404020

研究課題名（和文） 低温物質生産システムの開発を目指した新規低温適応微生物の探索

研究課題名（英文） Exploration of novel cold-adapted microorganisms to develop a system for the production of useful compounds at low temperatures

研究代表者

栗原 達夫（KURIHARA TATSUO）

京都大学・化学研究所・准教授

研究者番号：70243087

研究成果の概要：アラスカ永久凍土やスイス高山土壌から低温での生育特性やタンパク質の分泌生産特性に優れた細菌を分離した。アラスカ永久凍土由来の低温適応微生物がヘモリシン共制御タンパク質のホモログを分泌高生産することを見だし、本タンパク質の分泌装置を利用した外来タンパク質分泌生産系構築に向けて分泌機構を解析した。一方、南極海水から分離した低温菌について、本菌を宿主としたタンパク質生産系構築において利用価値が高いと考えられる低温誘導性プロモーターを単離した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2008年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,100,000	3,930,000	17,030,000

研究分野：生物工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：低温適応微生物、低温菌、好冷菌、低温物質生産、低温誘導性遺伝子、タンパク質分泌生産

1. 研究開始当初の背景

0℃付近の低温で生育する微生物の酵素は一般に低温で高い活性を示し、加熱により容易に失活する。このような特性を有する好冷性酵素は、食品加工用酵素、皮革加工用酵素、繊維加工用酵素、洗剤添加用酵素、分子生物学研究用試薬などとして有用で、近年、大きな注目を集めている。しかしながら、常温性酵素や耐熱性酵素に比べ、好冷性酵素の開発は著しく遅れているのが実情である。研

究の歴史が浅いことが主要因の一つではあるが、好冷性酵素特有の熱安定性の低さにより、大腸菌などの微生物（比較的高い温度で培養される）を宿主とした酵素の高生産がしばしば困難を伴うことが、より大きな問題と考えられる。

本研究代表者らは、好冷性酵素の特性解明、好冷性酵素が低温で高い活性を示すための構造的基盤の解明、応用面の開発などを目的として研究を行ってきたが、その過程で、大

腸菌を宿主とした発現系では好冷性酵素の高発現が見られない、高発現しても封入体を形成し、機能を保持した可溶性タンパク質が得られないという状況をしばしば経験してきた。好冷性酵素は大腸菌の生育温度域では不安定な場合が多く、変性し、分解される可能性が考えられた。0°C付近で良好に生育する低温適応微生物を宿主とすれば熱安定性の低いタンパク質の高生産が容易になると考えられた。

2. 研究の目的

低温域での優れた生育速度と菌体収量、形質転換の容易さ、優れたタンパク質分泌能といった特性を兼ね備えた低温適応微生物を探索し、これらを宿主としたタンパク質生産系を開発することを目的として研究を実施した。このような生産系を利用することにより、産業的に利用価値の高い好冷性酵素などの生産性を向上させることが可能になると期待された。

3. 研究の方法

(1) アラスカ永久凍土およびスイス高山土壌をスクリーニング源とし、4°Cでの生育速度が速く、菌体収量の多い低温菌を選抜した。それらを液体培地で培養し、培養上清に分泌されたタンパク質を分析した。アラスカ永久凍土から分離された *Pseudomonas* sp. Ak26 が分泌高生産するタンパク質の部分アミノ酸配列を決定し、その情報に基づいて設計したプライマーを用いて遺伝子断片を取得した。得られた遺伝子断片の配列を解析し、その情報を元に inverse PCR 法によって全長の遺伝子配列を決定した。末端にタグ配列を持つタンパク質を発現させるためのプラスミドを構築し、本菌を宿主として発現させた。発現させたタンパク質と相互作用するタンパク質を、アフィニティークロマトグラフィーによる共精製などによって解析した。

(2) 南極海水から分離した低温適応微生物 *Shewanella livingstonensis* Ac10 について、低温適応機構の解明と低温物質生産システムへの応用を目的として、低温誘導性遺伝子群を同定した。広宿主域プラスミド pJRD215 をベクターとして、プロモーター領域をもたないβ-ラクタマーゼ遺伝子上流域に *S. livingstonensis* Ac10 のゲノム DNA 断片を挿入してライブラリーを構築した。*E. coli* S17-1 を宿主としたライブラリーを接合伝達によって *S. livingstonensis* Ac10 に導入し、アンピシリンを含む寒天培地上、4°Cでの生育速度を指標として高いβ-ラクタマーゼ活性を示すものを選抜した。得られた株を4°Cと18°Cで培養し、4°Cでβ-ラクタマーゼが誘導生産されるものを選抜した。それらが保持するプラスミドのβ-ラクタ

マーゼ遺伝子上流域配列を解析することにより、低温誘導性のプロモーター配列を同定するとともに、*S. livingstonensis* Ac10 ゲノムにおいてこれらのプロモーター配列の下流に存在する遺伝子を同定した。

(3) 極地由来の低温適応微生物の低温での生育特性や物質生産能の改良を目的として、これらの微生物の低温適応機構を解析した。南極海水由来 *S. livingstonensis* Ac10 について、トランスポゾンを用いた変異導入によって低温感受性変異株を取得し、低温での生育に重要な役割を果たす遺伝子を同定した。トランスポゾンの導入にはプラスミド pMiniHimar RB1 を用いた。構築した変異体ライブラリーから低温感受性株を分離するために4°Cでアンピシリン濃縮を行い、285株を選抜した。これらの変異体について4°Cと18°Cでの生育特性を比較し、4°Cでの生育速度が特異的に低下したものを選抜し、トランスポゾン挿入付近のゲノム配列を inverse PCR 法によって解析した。

4. 研究成果

(1) アラスカ永久凍土から分離した低温適応微生物 *Pseudomonas* sp. Ak26 (以下、Ak26株) について、本菌がほぼ単一の分泌タンパク質としてヘモリシン共制御タンパク質 (Hcp) ホモログを高生産することを見いだした。Ak26株を宿主としたタンパク質分泌高生産システムを開発すべく、Hcpの分泌機構を解析した。異種生物間で高度に保存されたHcpの配列に基づいてHcp遺伝子をクローニングし配列解析を行った。Inverse PCR法などにより、全長配列を決定した。

一方、Ak26株を宿主としたタンパク質発現系を開発した。本菌はエレクトロポレーションや化学的手法では形質転換されなかった。そこで接合伝達による形質転換を試みた。広宿主域ベクターである pJRD215 を有した *Escherichia coli* S17-1 株と接合させることにより、本菌の形質転換が可能であることを見いだした。接合後の Ak26 株形質転換体の選抜は、Ak26 株が本来持つアンピシリン耐性、ベクターによって付与されるストレプトマイシン耐性、及び 18°C における Ak26 株の良好な生育を指標として行なった。次にタンパク質の高発現に適したベクターの構築を試みた。Ak26 株の膜画分で大量に発現しているポーリントタンパク質 OprD の遺伝子のプロモーター及び SD 配列を pJRD215 に組み込むことで、Ak26 株でタンパク質を高発現させるベクターの構築に成功した。

このようにして構築したタンパク質発現系を利用して、末端に His-tag または myc-tag を付与した Hcp ホモログを高発現させるためのプラスミドを構築し、Ak26

株に導入して分泌特性を解析した。いずれの場合も分泌効率は著しく低く、特に N 末端にタグを付与した場合や C 末端に *myc-tag* を付与した場合は、分泌タンパク質が検出されなかった。また、いずれの場合も、ゲノムにコードされている野生型 Hcp ホモログの分泌効率が著しく低下することが見いだされた。タグを付与した Hcp ホモログが分泌装置に結合したまま細胞内にとどまり、野生型 Hcp ホモログの分泌を阻害した可能性が考えられた。タグを付与した Hcp ホモログと分泌装置が細胞内で結合している可能性が示されたので、His-tagged Hcp ホモログと共精製されるタンパク質を解析することとした。His-tagged Hcp ホモログを生産する細胞を可溶化し、ニッケルキレートカラムに供した結果、His-tagged Hcp ホモログと相互作用すると考えられるタンパク質が見いだされ、当該タンパク質が分泌装置を構成する因子の一つである可能性が示された。

(2) *S. livingstonensis* Ac10 のゲノムから、プロモーター探索ベクターを用いて低温誘導性プロモーターを見いだした。レポーターである β -ラクタマーゼ遺伝子上流の BamHI サイトに *S. livingstonensis* Ac10 ゲノム DNA の Sau3AI 部分消化産物を挿入することでライブラリーを作製した。このライブラリーを導入した *S. livingstonensis* Ac10 形質転換体の中から 4°C で高い β -ラクタマーゼ活性を示すクローンを選抜した。さらに、得られたプロモーターの下流に存在する遺伝子を、全ゲノム解析で得られた配列情報から特定した。

4°C と 18°C で生育した野生株におけるこれらの遺伝子の発現量を real-time RT-PCR で解析した結果、4°C において 3 倍以上転写量が増加する低温誘導性遺伝子として 13 個の遺伝子が同定された。その中には翻訳に関わる *fusA* と *proS* や、転写に関わる *sirB* と *dkxA* のホモログが含まれていた。*S. livingstonensis* Ac10 は低温での効率的な転写・翻訳のために、これらの発現を低温で誘導する機構をもつものと考えられ、これらの発現を増強することでタンパク質生産系を改良できる可能性が示された。また、低温での転写レベルが 10 倍以上誘導される遺伝子として *orf2*, *fadL*, *suhB* が同定され、これらのプロモーターは低温でのタンパク質発現用プロモーターとして有用と考えられた。

一方、同定された低温誘導性遺伝子を破壊して生育への影響を調べた結果、破壊によって菌が低温感受性になる機能未知遺伝子が見いだされた。この低温感受性株では酸化ストレスに対する耐性の低下も認められた。このような遺伝子産物の高発現や機能強化により、外来タンパク質低温生産用宿主の低温

における生育特性を改良できる可能性が考えられた。

(3) *S. livingstonensis* Ac10 のゲノムにトランスポゾンランダムに挿入し、低温感受性となった変異株を選抜した。選抜された変異株の中には、従来から欠損によって菌が低温感受性になることが報告されていた *secG* 遺伝子にトランスポゾンが挿入されたものも含まれ、本スクリーニング方法が妥当なものであることが裏付けられた。低温感受性株のうち CS17 株は 4°C での生育能をほぼ完全に消失していた。サザンブロット解析により、CS17 株ではトランスポゾンがゲノム内の一箇所にのみ挿入されていることが確認された。トランスポゾンに特異的なプライマーを用いた inverse PCR で解析した結果、細胞外多糖合成遺伝子クラスター中の *sugar transferase* ホモログをコードする *wcaJ* 遺伝子上流にトランスポゾンが挿入されていることが明らかになった。これらの結果は、*wcaJ* が低温での生育に重要であることを示唆している。このような遺伝子産物の高発現や機能強化により低温物質生産用宿主の生育特性を改良できる可能性が考えられた。

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 4 件)

- ① Kawamoto, J., Kurihara, T., Yamamoto, K., Nagayasu, M., Tani, Y., Mihara, H., Hosokawa, M., Baba, T., Sato, S. B., and Esaki, N., Eicosapentaenoic acid plays a beneficial role in membrane organization and cell division of a cold-adapted bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10. *J. Bacteriol.* **191**, 632-40 (2009) 査読有り
- ② Sato, S., Kurihara, T., Kawamoto, J., Hosokawa, M., Sato, S. B., and Esaki, N., Cold adaptation of eicosapentaenoic acid-less mutant of *Shewanella livingstonensis* Ac10 involving uptake and remodeling of synthetic phospholipids containing various polyunsaturated fatty acids. *Extremophiles* **12**, 753-61 (2008) 査読有り
- ③ Kawamoto, J., Kurihara, T., Kitagawa, M., Kato, I., and Esaki, N., Proteomic studies of an Antarctic cold-adapted bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, for global identification of cold-inducible proteins. *Extremophiles* **11**, 819-26 (2007) 査読有り

- ④ Miyake, R., Kawamoto, J., Wei, Y.-L., Kitagawa, M., Kato, I., Kurihara, T., and Esaki, N., Construction of a low-temperature protein expression system using a cold-adapted bacterium, *Shewanella* sp. strain Ac10, as the host. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 4849-56 (2007) 査読有り

[学会発表] (計 8 件)

- ① 古賀敬太郎、川本純、栗原達夫、江崎信芳、低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 のエイコサペンタエン酸合成調節に関わる遺伝子 *orf4* 及び *orfR* の機能解析. 日本農芸化学会 2009 年度大会. 2009 年 3 月 29 日 福岡市
- ② 栗原達夫、海洋性低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 における高度不飽和脂肪酸の機能. マリンバイオテクノロジー学会. 2008 年 5 月 25 日 京都市
- ③ Kurihara, T., Cold-adaptation mechanisms and applications of an Antarctic psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10. BIT Life Sciences' 1st Annual World Congress of iBio2008. 2008 年 5 月 19 日 中華人民共和国・杭州
- ④ 北山香織、三宅良磨、栗原達夫、江崎信芳、プロモーター探索ベクターを用いた低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の低温適応関連遺伝子の探索. 日本農芸化学会 2008 年度大会. 2008 年 3 月 28 日 名古屋市
- ⑤ 古賀敬太郎、川本純、栗原達夫、江崎信芳、低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 におけるエイコサペンタエン酸合成の制御遺伝子. 日本農芸化学会 2008 年度大会. 2008 年 3 月 28 日 名古屋市
- ⑥ 小山大、栗原達夫、江崎信芳、*Pseudomonas* sp. Ak26 における Hemolysin-coregulated protein ホモログの分泌機構の解析と応用. 第 80 回日本生化学会大会. 2007 年 12 月 14 日 横浜市
- ⑦ 川本純、栗原達夫、江崎信芳、低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の外膜透過性調節機構の解析. 第 59 回日本生物工学会大会. 2007 年 9 月 27 日 東広島市
- ⑧ Kurihara, T., Physiological role of phospholipids containing eicosapentaenoic acid in cold adaptation of an Antarctic psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10. Gordon Research Conferences: Molecular and Cellular Biology of Lipids. 2007 年 7 月 24 日 Waterville Valley, NH, USA

[図書] (計 1 件)

- ① Kurihara, T. and Esaki, N., Proteomic studies of psychrophilic microorganisms, *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology* (Edited by Margesin, R. et al., Springer) 333-44 (2008)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗原 達夫 (KURIHARA TATSUO)

京都大学・化学研究所・准教授

研究者番号：70243087

(2) 研究分担者

江崎 信芳 (ESAKI NOBUYOSHI)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：50135597

三原 久明 (MIHARA HISAAKI)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：30324693