

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05811

研究課題名（和文）微生物が有する休眠酵素の活性化技術の構築と覚醒メカニズムの解明

研究課題名（英文）Activation of sleeping or weak expressing microbial enzyme genes and elucidation of the awakening mechanism

研究代表者

舟根 和美（Funane, Kazumi）

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：90353953

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：環状イソマルトオリゴ糖生産株であるPaenibacillus agaridevorans T-3040株のゲノム情報より2種類のキシラナーゼ遺伝子を有し、一方がキシロピオース、もう一方がキシロース生産酵素であると推定された。リボソーム工学法によりキシラナーゼ活性が上昇した変異株を2株得た。2株の2つのキシラナーゼ遺伝子とも野生株よりも発現量が増加していたことがリアルタイムPCRで確認された。一方、土壌などからキシラナーゼ、カラギーナーゼ、アガラーゼ、グルカンなどの生産株、ポリエチレンテレフタレート分解菌、ポリスチレン分解菌を分離し、それぞれ育種を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、放線菌の抗生物質生産目的に研究開発されてきたリボソーム工学法（リボソーム関連遺伝子の自然突然変異導入法）が、休眠している酵素遺伝子も覚醒させるのではないかと考え、複数の「休眠酵素遺伝子」の覚醒およびそれらの休眠・覚醒メカニズムの解明を目指した。リボソーム工学的育種により環状イソマルトオリゴ糖合成酵素と2種類のキシラナーゼの生産力が同時に高まった変異株を得ることができ、この方法を工業用酵素生産微生物にも適用できる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Paenibacillus agaridevorans T-3040 is a cyclic isomaltooligosaccharide-producing strain. From the genomic information of this strain, it was estimated that it has two types of xylanase genes. They are predicted to be xylobiose and xylose-producing enzymes, respectively. Two mutants with increased xylanase activity were obtained by the ribosome engineering method. It was confirmed by real-time PCR that the expression levels of the two xylanase genes in the mutant strains were higher than those in the wild strain. On the other hand, bacterial strains which produce xylanase, caraginase, agarase, and glucanase were isolated. Polyethylene terephthalate-degrading bacteria and polystyrene-degrading bacteria were also isolated from soil. They were bred by the ribosome engineering method.

研究分野：応用微生物学

キーワード：リボソーム工学 環状イソマルトオリゴ糖合成酵素 キシラナーゼ

1. 研究開始当初の背景

リボゾームの変化によって微生物の物質生産遺伝子が覚醒することが発見された最初の例は、放線菌 *Streptomyces lividans* および *S. coelicolor* の抗生物質生産関連遺伝子である。高濃度ストレプトマイシン耐性を獲得してリボゾーム **S12** タンパクに変異が入った *rpsL* 変異株が、アクチノロージンを過剰生産すると報告された (Shima J, et al. (1996) *J. Bacteriol.* **178**:7276–7284)。低濃度ストレプトマイシン耐性により、**30S** リボゾームのメチル化がされなくなる *rsmG* 変異が入ると、これも抗生物質の過剰生産を促すと報告された (Tanaka Y, et al. (2009) *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:4919–4922)。リファンピシン耐性により RNA ポリメラーゼの β サブユニットに変異が入った *rpoB* 変異株も二次代謝産物の生産を増加させた (Tanaka Y, et al. (2013) *J. Bacteriol.* **195**:2959–2970)。さらに希土類のスカンジウムが *Bacillus subtilis* においてアミラーゼやバシリシンの生産を高めると報告されている (Inaoka T and Ochi K. (2011) *Appl. Environ. Microbiol.* **77**:8181–8183)。以上のような休眠遺伝子の覚醒技術開発や研究は、従来は放線菌の二次代謝を対象に行われてきた。しかし、*B. subtilis* にも同様の例があることを受け、申請者のグループが土壌から分離した環状イソマルトオリゴ糖 (CI) 生産菌 *Paenibacillus agaridevorans* T-3040 株 (旧名 *B. circulans*) の菌体外酵素である環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼ (CITase) (EC 2.4.1.248) に適用した。その結果得られた *rsmG*、*rpsL*、*rpoB* 三重変異株が野生型の **1,000** 倍の CITase 生産量を示し、スカンジウムによる生産上昇もみられ、その成果を国際誌に発表した (Funane K, et al. (2018) *J. Bacteriol.* **200**: doi: 10.1128/JB.00188-18)。CITase は本来休眠酵素で、変異により覚醒して酵素タンパクの生産量が増大したことが示されたが、そのほかの酵素タンパクではアミラーゼの生産量が若干増えたものの、依然多くの酵素遺伝子が休眠状態のままであると考えられた。放線菌においても二次代謝産物関連遺伝子がこれらの変異で覚醒する現象はあるが、その理由は十分には解明されていない。微生物の休眠遺伝子の休眠原理とその覚醒原理の解明は、生命活動や進化の謎を解く鍵であると同時に実用酵素の工業生産につながる応用研究の発展にも貢献するものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、バクテリアを用いて標的とする複数の休眠酵素遺伝子を覚醒させ、様々な酵素生産実用菌株になり得る変異株のライブラリーを構築すると同時に、それら酵素遺伝子の休眠原理や覚醒原理の解明を目指すものである。リボゾームや RNA ポリメラーゼなどの転写・翻訳関連の変異による物質生産への影響についての研究は、ほとんどが放線菌の二次代謝産物を対象として研究が行われてきた。酵素に関してはアミラーゼで数倍の効果が見られた例があるものの、申請者らが最近発表した、*Paenibacillus agaridevorans* T-3040 株での野生型の **1,000** 倍もの CITase 生産上昇のような、劇的な効果を示したのは世界的に初めてであり、独自性のあるものである。本研究では放線菌ではなく、酵素生産用に使いやすい細菌を対象とし、菌体外酵素に着目することとした。工業用酵素はアミラーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、リパーゼ、プロテアーゼなどで多くは微生物の菌体外酵素である。野生株は通常活性が低く、変異処理による育種も広く行われてきたが、ニトロソグアニジンやエチルメタンスルホン酸 などの変異剤や紫外線照射を用いたランダム変異が主に用いられ、本研究で用いるリボゾーム工芸法はあまり利用されていない。抗生物質耐性獲得によるリボゾームや関連遺伝子の自然突然変異導入で複数種の細菌の複数の酵素を対象として休眠酵素覚醒を試みる。多くの成功例の異同性を解析することで、休眠と覚醒のメカニズムの解明も目指す。

3. 研究の方法

P. agaridevorans T-3040 株で野生株、CITase 高生産変異株においても休眠状態であると考えられる **2** 種類のキシラーナーゼ遺伝子の覚醒を試みる。方法は (1) *rpoB* 変異の導入 (2) *rpsL* 変異の導入 (3) *rsmG* 変異の導入 (4) 希土類元素添加の順に処理する。*rpoB* 変異株はリファンピシン耐性株、*rpsL* 変異株は高濃度のストレプトマイシン耐性株、*rsmG* 変異株は低濃度のストレプトマイシン耐性株、希土類についてはスカンジウム耐性株を選抜し、遺伝子解析で変異箇所を調べる。キシラーナーゼ生産の増加はキシランを唯一の炭素源とした培地で良好に増殖するか否かで判定する。キシラーナーゼが覚醒した変異株については液体培養して培養上清のキシラン分解活性を測定する。どのキシラーナーゼ遺伝子の発現が増えたかリアルタイム RT-PCR 解析で確認する。一方、県内や、国内の他県の土壌から、アミラーゼ、プルラーナーゼ、キシラーナーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ、デキストラナーゼ生産菌などをスクリーニングする。炭素源を澱粉、プルラン、キシラン、ペクチン、デキストランを唯一の炭素源とした最小培地でわずかに生育するものを選抜する。また、環境汚染の原因物質の分解菌としてポリエチレンテレフタレート分解酵素 (PETase) 生産菌なども同様にスクリーニングする。スクリーニングした菌株の同定を行い、これらについてもリボゾ

ーム工学法で休眠あるいは休眠状態に近い酵素を覚醒させた変異株を取得する。

4. 研究成果

環状イソマルトオリゴ糖 (CI) 生産株である *Paenibacillus agaridevorans* T-3040 株のゲノム情報より 2 種類のキシラナーゼ遺伝子を持つことが明らかになった。リボゾーム工学法によりこれらの酵素遺伝子を覚醒させるため、弱ストレプトマイシン耐性(*rsmG* 変異)、強ストレプトマイシン耐性(*rpsL* 変異)、およびリファンピシン耐性(*rpoB* 変異)を付与し、68 株の耐性株を得た。そのうち CI グルカノトランスフェラーゼ(CITase)の活性が上昇したものは 21 株で、野生株の 3 倍 ~ 200 倍の活性上昇がみられた。キシラナーゼ活性が上昇したものは *rsmG* 変異株が 1 株、*rpoB* 変異株が 1 株の合計 2 株で、活性の上昇はそれぞれ 2 倍、3 倍であった。いずれの変異株も CITase の活性上昇を伴っていた。これらの変異株にさらなる変異の付与を試みたが、これ以上顕著に活性が上昇した株は得られなかった。*P. agaridevorans* T-3040 株において、キシラナーゼと推定される遺伝子 PAT3040_04349 および PAT3040_06516 をそれぞれ pET28a にクローニングした。野生型、*rsmG* 変異株、*rpoB* 変異株ともキシランで培養すると菌体外にキシロースを蓄積することが明らかになった。大腸菌組換え PAT3040_06516 は、キシランをキシロピオース に分解することが明らかになったが、キシロースまでは分解しなかった。PAT3040_04349 遺伝子の発現は成功に至っていないが、これがキシロピオースをキシロースまで分解する可能性があると考えられるので、発現系の再構築を試みている。

一方、土壌から菌のスクリーニングを行い、キシラナーゼ、 α カラギーナーゼ、アガラーゼ、グルカン生産株および、ポリエチレンテレフタレート (PET) 分解菌、ポリスチレン (PS) 分解菌を分離することができた。これらの菌株の同定を行った結果、キシラナーゼ生産菌は植物の内部共生菌の 1 種 *Klebsiella varricola*、 α カラギーナーゼとアガラーゼ生産はいずれも *Bacillus cereus* または *Bacillus thuringensis* と同定された。PET 分解菌は *Acinetobacter baumannii*、PS 分解菌は *Stenotrophomonas maltophilia* であると同定された。PET 分解菌と PS 分解菌をそれぞれ PET または PS と少量の窒素源を加えて培養すると、培養液が褐色に変色した。また、培地中の PET と PS の残留物をデジタルマイクロスコープで観察した結果、PET の表面に溝が形成され、PS は辺縁に細い繊維が多数見られ、これらの菌は PET や PS を分解能を有することが示唆された。 α カラギーナーゼとアガラーゼ生産株として分離した菌株については食中毒菌と同定され、応用には不適切であると判断し、これらについての育種は行わないこととした。キシラナーゼ生産菌として分離された *Klebsiella varricola* を変異処理した結果、ストレプトマイシン耐性菌に野生株の 2 倍程度のキシラナーゼ活性の上昇がみられた。

環状イソマルトオリゴ糖に糖鎖を導入する性質を持つグルカンスクララーゼ活性を有する乳酸菌 2 株 *Leuconostoc citreum* S-32 株および同 S-64 株はゲノム解析の結果、互いによく似たグルカンスクララーゼ遺伝子と推定される遺伝子が 3 組ずつ存在した。これらの遺伝子についてリアルタイム RT-PCR で発現解析を行ったところ、S-32 株は 3 種類とも高い発現量を示したが、S-64 株はいずれの遺伝子の発現量も少なかった。S-64 株はグルカンスクララーゼ遺伝子が休眠遺伝子に近い状態である可能性があり、S-32 株はさらに酵素生産を高めるために、これらの菌株にストレプトマイシンやリファンピシン耐性の付与を試みた。

リボゾーム工学法による酵素活性の上昇を、キシラナーゼ、アガラーゼ、PET 分解酵素、グルカンスクララーゼを指標に試みたが、この中で顕著な活性上昇がみられたのは T-3040 株のキシラナーゼのみであった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Mizushima Daiki, Miyazaki Takatsugu, Shiwa Yuh, Kimura Keitarou, Suzuki Shiho, Fujita Nobuyuki, Yoshikawa Hirofumi, Kimura Atsuo, Kitamura Shinichi, Hara Hiroshi, Funane Kazumi | 4. 巻 103 |
| 2. 論文標題 A novel intracellular dextranase derived from <i>Paenibacillus</i> sp. 598K with an ability to degrade cycloisomaltooligosaccharides | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology | 6. 最初と最後の頁 6581 ~ 6592 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00253-019-09965-y | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 田中 千枝, 鈴木 結麻, 渡部 優斗, 舟根 和美 |
| 2. 発表標題 <i>Paenibacillus agaridevorans</i> T-3040株におけるキシラナーゼの解析 |
| 3. 学会等名 日本応用糖質科学会2022年度大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 舟根和美 |
| 2. 発表標題 多機能糖質素材「環状イソマルトオリゴ糖」 |
| 3. 学会等名 山梨県食品技術研究会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 岡田和之, 渡部優斗, 志波優, 藤田信之, 吉川博文, 舟根和美 |
| 2. 発表標題 <i>Paenibacillus</i> sp. 598K 株におけるサイクロデキストリン分解酵素様タンパク |
| 3. 学会等名 日本食品科学工学会 第 68 回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 舟根 和美、本多 智栄子、山内 茉依、坂井 真知、日野 志朗 |
| 2. 発表標題 環状イソマルトオリゴ糖含有品 CI-Dextran-mixを用いた難溶性物質可溶化法の開発 |
| 3. 学会等名 日本応用糖質科学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 渡部優斗, 志波優, 藤田信之, 吉川博文, 舟根和美 |
| 2. 発表標題 CI 生産菌Paenibacillus sp. 598K 株におけるCGTase 遺伝子の発見およびCIase とCGTase |
| 3. 学会等名 日本応用糖質科学会2019年度大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 稲木 舜, 増田 貴大, 志波 優, 藤田 信之, 吉川 博文, 舟根 和美 |
| 2. 発表標題 Leuconostoc citreum S-32株とL. citreum S-64株が保有するグルカンスクララーゼの解析 |
| 3. 学会等名 日本応用糖質科学会2022年度大会 |
| 4. 発表年 2022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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|