

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：35409

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05797

研究課題名（和文）枯草菌宿主での低毒性物質で誘導可能なタンパク質高発現系の開発

研究課題名（英文）Protein expression system inducible by low-toxic substances in Bacillus subtilis

研究代表者

広岡 和丈（HIROOKA, Kazutake）

福山大学・生命工学部・教授

研究者番号：20389068

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：枯草菌宿主で低毒性物質で誘導可能なタンパク質発現系の開発を行った。フラボノイド応答性プロモーター（PqdoI）とT7 RNAポリメラーゼ遺伝子（T7 pol）との連結を染色体に組み込み、T7プロモーター制御下の目的遺伝子をもつプラスミドを導入し、フラボノイド誘導型T7発現系を作製した。また、T7 pol制御を担うPqdoIを改良して誘導条件での発現量を向上させた。T7 pol制御領域をラムノースまたはペクチンに応答する各プロモーターに置換して、各糖で誘導されるT7発現系の作製を試みた。ペクチン誘導型では誘導までに長時間を要し、ラムノース誘導型では非誘導条件でも発現の漏れが認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

枯草菌は哺乳類に対して非病原性であり、本研究で用いたいずれの誘導物質も哺乳類への毒性が低いので、当該T7発現系によって目的タンパク質の有害物質フリーでの獲得が容易となる。フラボノイド誘導型発現系では、厳密な発現制御と高発現量を両立できており、目的タンパク質が宿主細胞の増殖に悪影響を及ぼす場合に有用となる。アグリコン形態のフラボノイドは疎水性が高いため、特定の輸送体を介さずに膜透過で細胞内に取り込み可能である。したがって、当該発現系の他の細菌宿主への移行が比較的容易であると考えられる。誘導物質の一つであるケルセチンが安価なこともこの発現系の産業利用の可能性を高めている。

研究成果の概要（英文）：Protein expression systems inducible by low-toxicity substances were developed in Bacillus subtilis. The fusion of a flavonoid-responsive promoter (PqdoI) with the T7 RNA polymerase gene (T7 pol) was integrated into the chromosome, and a plasmid carrying the target gene under the control of the T7 promoter was introduced to create a flavonoid-inducible T7 expression system. Improving the PqdoI responsible for T7 pol control enhanced the expression level upon induction.

T7 expression systems inducible sugars, such as rhamnose and pectin, were attempted to create by replacing the T7 pol control region with promoters responsive to those sugars. In the pectin-inducible system, induction required a long time, while in the rhamnose-inducible system, considerable expression leakage was observed even under the non-inducing condition.

研究分野：微生物学、分子生物学

キーワード：枯草菌 タンパク質発現 フラボノイド ラムノース ペクチン T7 RNAポリメラーゼ

1. 研究開始当初の背景

酵素などの有用タンパク質を得るために、当該遺伝子をクローニングし、微生物宿主で組換えタンパク質として生産する方法が広く用いられている。微生物宿主としては大腸菌が最も一般的であるが、グラム陰性細菌であるこの菌はヒトなどの哺乳類に炎症を起こす有害なリポ多糖類を含むので、目的タンパク質を医薬品・食品・飼料の原料とする、あるいはそれらの製造に利用する場合には、高度に精製して有害物質を除去しなくてはならない。

グラム陽性細菌である枯草菌 (*Bacillus subtilis*) は日本では納豆製造などに用いられ、米国食品医薬品局 (FDA) でも GRAS (generally recognized as safe) として安全性が認められている。また、枯草菌での遺伝子操作技術は確立されており、これを宿主としたプラスミドベクターも数種類開発されている。加えて、枯草菌はタンパク質分泌系が発達しており、それらを介して細胞外に分泌させることで目的タンパク質の回収・精製が容易となる。したがって、有害不純物を含まない目的タンパク質を取得するには枯草菌宿主がより適しているといえる。

目的タンパク質生産が宿主の生育を妨げる場合には、必要に応じた発現誘導が有効である。枯草菌での発現誘導系では誘導物質の種類が限定され、ベクターおよび誘導物質の種類の豊富さでは大腸菌宿主系の方が優れている。代謝ネットワークの解析あるいは物質生産を目的に、枯草菌で複数のタンパク質発現を多重的に制御するためには、さらに別の物質による発現誘導系の開発が必要とされる。

我々は、枯草菌におけるラムノース異化オペロン (*rhaEWRBMA*) とフラボノイドで誘導される遺伝子群 (*ImrAB* オペロン、*qdoI-yxaH* オペロン、および *qdoR* 遺伝子) の転写制御機構を明らかにしており^{1),2)}、安全性の高い枯草菌を宿主としてこれらの遺伝子群の制御領域を利用することで、ラムノースやフラボノイドといった低毒性物質で誘導可能なタンパク質発現系の作出を発想した。

枯草菌において、*yIbP* 遺伝子の SD 配列の翻訳効率が高いこと³⁾、*rrnB* 遺伝子のコアプロモーター上流域 (UP) の改良型 (UP_{NB}) を導入することで転写効率が高まることが報告されており⁴⁾、これらの知見をもとに各制御領域の改良を試みた。

2. 研究の目的

(1) ラムノース異化オペロンの制御領域 (*PrhaEW*) とフラボノール分解酵素 (*QdoI*) 遺伝子を含む *qdoI-yxaH* オペロンの制御領域 (*PqdoI*) のそれぞれにおいて、誘導条件での発現量の向上を目指して改変を加え、得られた各構築と目的遺伝子との連結を枯草菌染色体に組み込み、シングルコピー発現誘導系を作製して、各誘導物質に対する応答と発現量を評価した。

(2) *PrhaEW* と *PqdoI*、およびそれらの改良型のそれぞれと T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子 (*T7 pol*) を組み合わせて、ラムノースまたはフラボノイド誘導型 T7 発現系を枯草菌宿主で作製して、各誘導物質に対する応答と発現量を評価した。また、研究実施期間中にペクチン分解に関わり、ペクチンおよびその成分で誘導されるオペロン (*rhiLFGN-rhgR-yesTUVWXYZ*) の転写制御機構を明らかにしたので⁵⁾、このオペロンの制御領域 (*PrhiL*) を用いたペクチン誘導型 T7 発現系を作製し、ペクチンに対する応答と発現量を評価した。

3. 研究の方法

(1) *PrhaEW* と *PqdoI* のいずれも誘導条件での発現量が不十分であったので、SD 配列を高効率の *yIbP* 遺伝子のものに置換し、さらにコアプロモーター上流に UP_{NB} を導入して各ハイブリッド構築を作製した。目的遺伝子として改変型 GFP 遺伝子 (*egfp*) を用い、ハイブリッド構築と連結して枯草菌染色体に組み込み、各枯草菌レポーター株を作製した。これらを誘導物質の存在・非存在下で培養し、時間ごとに菌体を回収して蛍光強度を測定した。また、SDS-PAGE を用いて EGFP 発現量を評価した。*PqdoI* に関しては、コアプロモーターの改変も加え、レポーター株を作製して同様に評価した。

(2) *PrhaEW* と *PqdoI*、およびそれらの改良型をそれぞれ *T7 pol* と連結して枯草菌染色体に組み込み、T7 プロモーター制御下の目的遺伝子をもつプラスミドを導入して、フラボノイドまたはラムノース誘導型 T7 発現系を作製した。目的遺伝子として *egfp* 遺伝子をもつ各レポーター株を誘導物質の存在・非存在下で培養し、蛍光測定と SDS-PAGE で EGFP 発現を評価した。*PrhiL* を用いて同様の手法でペクチン誘導型 T7 発現系を作製し、ペクチン存在・非存在下で培養し、同様に解析した。

4. 研究成果

(1) 各制御領域の改変とシングルコピー発現系の作製と評価

シングルコピーのラムノース誘導型発現系

枯草菌ラムノース異化オペロン (*rhaE//RBMA*) は2つの転写因子 (*RhaR* と *CcpA*) で制御され、ラムノースで誘導され、グルコースで抑制される。この制御領域 (*PrhaE//*) のSD配列を高効率の *y1bP* 遺伝子のものに置換し、RNAポリメラーゼと相互作用することで転写効率の向上に寄与する UP_{NB} をコアプロモーター上流に導入した。このハイブリッド構築を *egfp* 遺伝子と連結して枯草菌染色体にシングルコピーで組み込み、得られたレポーター株を、*PrhaE//-egfp* の構築をもつレポーター株とともに炭素源としてラムノースまたはグルコースを含む合成培地で培養し、蛍光測定でEGFP発現量を評価した。その結果、ハイブリッド構築の発現系では、ラムノース特異的誘導能を維持しつつ、元の制御領域を用いた発現系よりも誘導条件での発現量は増加した。しかしながら、SDS-PAGE解析ではEGFPのバンドは認められず、発現量は不十分であった。

シングルコピーのフラボノイド誘導型発現系

枯草菌 *qdoI-yxaH* オペロンにはフラボノール分解酵素 (*QdoI*) がコードされる。このオペロンは2つのパラログスな転写因子 (*LmrA* と *QdoR*) で負に制御され、ケルセチンやフィセチン等の特定のフラボノイドによって脱抑制される。*qdoI-yxaH* オペロンの制御領域 (*PqdoI*) についても、上記と同様にSD配列を置換して UP_{NB} を導入したハイブリッド構築を作製した。これを *egfp* 遺伝子と連結してシングルコピーで染色体に組み込み、得られたレポーター株をLB培地でフラボノイド添加・未添加条件で培養して蛍光測定を行なったが、フラボノイド添加条件でも蛍光は検出されなかった。そこで、コアプロモーター配列 (-35および-10配列) の保存配列への置換も加えた改良型発現系を構築し、*egfp* レポーター株を作製して、培養と蛍光測定を行ったところ、フラボノイドによる発現誘導は認められたが、非誘導条件でもEGFPがある程度発現しており、当該転写因子による抑制の低下が考えられた。また、この改良型発現系でも発現量は不十分であった。

(2) 各制御領域を用いた T7 発現系の作製と評価

ラムノース誘導型 T7 発現系

PrhaE// とシングルコピーのラムノース誘導型発現系で作製したハイブリッド構築をそれぞれ *T7 pol* と連結し、各構築を枯草菌 168 株、または *RhaR* の直接の誘導物質であるラムヌロース-1-リン酸が蓄積するように代謝酵素遺伝子 (*rhaE//*) を欠失させた枯草菌株の染色体に組み込んだ。さらにそれらの菌株に、*T7* プロモーター制御下に配置した目的遺伝子をもつプラスミドを導入することで4種類のラムノース誘導型 *T7* 発現系を作製した。目的遺伝子として *egfp* 遺伝子をもつ各レポーター株を、炭素源としてグルコースまたはラムノースを含む合成培地で培養して蛍光測定とSDS-PAGEを行った結果、いずれの菌株もグルコース存在下でEGFPが高発現しており、ラムノース存在下でさらに発現量が増加することはなく、生育阻害を示した。*rhaE//* 欠失をもつ2種類のレポーター株をラムノース含有固体培地で培養することでEGFPを際立って高発現する自発変異株をそれぞれ単離した。これらを同様に培養して蛍光測定を行なった結果、ラムノース存在下で発現量のさらなる増加が見られた。全ゲノム解析で変異導入箇所を調べたところ、いずれにも *rhaR* 遺伝子に点変異が認められ、C末側の推定誘導物質結合ドメイン内に T103A と Q188L のいずれかのアミノ酸置換が生じていることがわかった。したがって、それぞれの置換によってラムヌロース-1-リン酸に対する感受性 (応答性) が低下し、ラムノース存在時の *T7 pol* の発現誘導がより緩やかとなり、生育阻害効果が緩和されたと考えられた。また、ラムノース異化オペロンの発現量も低下することで、誘導物質の供給も緩やかになったと考えられた。

ラムノース未添加でも目的遺伝子 (*egfp*) 発現が顕著に見られたのは、枯草菌が培養後期にわずかに生産する内在性ラムノースが一因であると考えられたので、*egfp* レポーター株に生合成遺伝子の1つ (*spsK*) の破壊を導入したが、EGFP発現への影響は認められなかった。

フラボノイド誘導型 T7 発現系

PqdoI の下流に *T7 pol* を連結して枯草菌 168 株の染色体に組み込み、さらに *T7* プロモーター制御下に配置した目的遺伝子をもつプラスミドを導入することでフラボノイド誘導型 *T7* 発現系を作製した。目的遺伝子として *egfp* 遺伝子をもつレポーター株をLB培地でフラボノイド添加・未添加条件で培養し、蛍光測定とSDS-PAGEによってフラボノイド応答能と発現量を評価したところ、フラボノイド非存在下でEGFP発現はほぼ完全に抑えられ、フラボノイド添加で得られた発現量はシングルコピーのフラボノイド誘導型発現系よりも著しく増加したが、大腸菌宿主での一般的な大量発現系の発現量には及ばなかった。そこで誘導条件下での発現量をさらに向上させるために、シングルコピー発現系の開発での知見をもとに *T7 pol* の発現制御を担う *PqdoI* の改良を試みた。

PqdoI のSD配列を *y1bP* 遺伝子のものに置換し、コアプロモーター上流に UP_{NB} を導入し、さらにコアプロモーター配列を保存配列になるように最適化した。その際にフラボノイド応答制御を担う *LmrA/QdoR* 両転写因子の結合に影響しないように、結合領域の保存塩基は変えない工夫

をした。このハイブリッド構築と *T7 pol* との融合を大腸菌を用いてクローニングしようとしたが、恐らく *T7 pol* の過剰発現が大腸菌の生育に悪影響を及ぼしたために成功しなかった。そこで、大腸菌内での *T7 pol* 発現を抑制するために、ハイブリッド構築の上流に *qdoR* 遺伝子を連結し、これと *T7 pol* との融合を大腸菌を用いてクローニングした。得られた *qdoR* 遺伝子-ハイブリッド構築-*T7 pol* の断片を枯草菌染色体に組み込み、さらに *T7* プロモーター制御下にある *egfp* 遺伝子をもつプラスミドを導入することで、改良型発現系を保持するレポーター株を作製した。この改良型発現系のレポーター株を元の発現系のレポーター株とともに LB 培地でフラボノイド添加・未添加条件で培養し、EGFP 発現を蛍光測定で評価した。その結果、フィセチンとケルセチンのいずれを添加しても両レポーター株で EGFP 発現の誘導が明確に確認されたが、改良型のレポーター株の方が高い蛍光強度を示し、最大値の比較で元の発現系の 6.6 倍となった。しかし、改良型発現系では非誘導条件でもわずかに EGFP 発現が認められ、これはプロモーター強度を高めたことで非誘導条件でも *T7 pol* 発現の漏れが生じることが原因であると示唆された。各発現系の特徴から、厳密に制御したい場合は改良前の発現系を、高い発現量を求める場合は改良型というように目的に応じた使い分けが考えられた。SDS-PAGE でも EGFP 発現量を評価したところ、蛍光測定の結果と概ね一致した。非誘導条件では改良型発現系においても EGFP のバンドは検出されなかったため、改良前には及ばないがこの発現系においても誘導特異性は高いと考えられた。また、改良型発現系での誘導条件での発現量は十分高く、大腸菌宿主での一般的な大量発現系に匹敵するレベルにまで改善された。

元の発現系とは対照的に、改良型発現系ではフィセチンよりもケルセチン添加の方が発現量が高くなった。ケルセチンは食品添加物等で広く利用されて安価であるので、改良型発現系のこの誘導物質特異性は産業利用する上での利点の 1 つであると考えられた。誘導物質に用いたフラボノイドの細菌細胞内への取り込みは特定の輸送体を介さず、膜透過で行われると考えられている。したがって、本研究で用いた発現誘導系を他の細菌宿主に比較的容易に移行可能であると期待される。

ペクチン誘導型 *T7* 発現系

枯草菌のペクチン分解に関わる *rhlLFGN-rhgR-yesTUVWXYZ* オペロンは、RhgKL 二成分制御系と CcpA 転写因子によって直接制御され、ペクチンおよびその成分で誘導され、グルコースで抑制される。この制御領域 (*PrhlL*) の下流に *T7 pol* を連結して枯草菌 168 株の染色体に組み込み、さらに *T7* プロモーター制御下に配置した目的遺伝子をもつプラスミドを導入することでペクチン誘導型 *T7* 発現系を作製した。目的遺伝子として *egfp* 遺伝子をもつレポーター株を LB 培地でペクチンまたはグルコースの存在・非存在下で培養して蛍光測定を行なった結果、他の *T7* 発現系とは異なり、ペクチン存在下での培養初期では EGFP 発現はわずかで、長時間 (18 h 程度) 培養することで顕著な発現誘導が認められた。したがって、この発現系を使用することで目的遺伝子発現を緩やかに誘導できると見込まれた。また、ペクチンもグルコースも含まない LB 培地で長時間培養するとある程度の EGFP 発現が見られたが、グルコース添加で発現を抑制できることが示された。

< 引用文献 >

- 1) Hirooka K, Kodoi Y, Satomura T, Fujita Y. Regulation of the *rhaE//RBMA* operon involved in L-rhamnose catabolism through two transcriptional factors, RhaR and CcpA, in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 2016;198(5):830-845.
- 2) Hirooka K, Fujita Y. Identification of aromatic residues critical to the DNA binding and ligand response of the *Bacillus subtilis* QdoR (YxaF) repressor antagonized by flavonoids. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011;75(7):1325-1334.
- 3) Hirooka K, Tamano A. *Bacillus subtilis* highly efficient protein expression systems that are chromosomally integrated and controllable by glucose and rhamnose. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2018;82(11):1942-1954.
- 4) Zhou C, Ye B, Cheng S, et al. Promoter engineering enables overproduction of foreign proteins from a single copy expression cassette in *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact.* 2019;18(1):111.
- 5) Hirooka K. RhgKL and CcpA directly regulate the *rhlLFGN-rhgR-yesTUV* operon involved in the metabolism of rhamnogalacturonan type I in *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2022;86(10):1383-1397.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Koreeda Ami, Taguchi Rina, Miyamoto Kanon, Kuwahara Yuna, Hirooka Kazutake	4. 巻 -
2. 論文標題 Protein expression systems combining a flavonoid-inducible promoter and T7 RNA polymerase in <i>Bacillus subtilis</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbad072	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 -

1. 著者名 Hirooka Kazutake	4. 巻 86
2. 論文標題 RhgKL and CcpA directly regulate the <i>rhlLFGN-rhgR-yesTUV</i> operon involved in the metabolism of rhamnogalacturonan type I in <i>Bacillus subtilis</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1383 ~ 1397
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac128	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 桑原佑奈、広岡和丈
2. 発表標題 枯草菌宿主でのT7 RNAポリメラーゼを利用したラムノース誘導型発現系の開発と評価
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 是枝亜実、田口梨愛、宮本佳音、広岡和丈
2. 発表標題 T7 RNA ポリメラーゼを利用した枯草菌宿主でのフラボノイド誘導型発現系の開発と評価
3. 学会等名 2022年度グラム陽性菌ゲノム機能会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桑原佑奈、広岡和丈
2. 発表標題 T7 RNA ポリメラーゼを利用した枯草菌宿主でのラムノース誘導型発現系の開発と評価
3. 学会等名 2022年度グラム陽性菌ゲノム機能会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 是枝亜実、小林衿花、亀田那波、尾村優太、広岡和丈
2. 発表標題 T7 RNAポリメラーゼを利用した枯草菌宿主での高効率フラボノイド誘導型発現系の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤田紘人、萩原利幸、広岡和丈
2. 発表標題 枯草菌宿主でのフラボノイドで誘導可能なハイブリッド型タンパク質高発現系の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021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
---------	---------