

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2018～2022

課題番号：18H05360・20K20371

研究課題名（和文）L体およびD体のホモポリ- γ -L-グルタミン酸の合成とメカニズム解明研究課題名（英文）Synthesis and mechanistic elucidation of homo poly- γ -L- and -D- glutamic acids

研究代表者

石川 周（Ishikawa, Shu）

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・准教授

研究者番号：30359872

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：DL-PGAおよびL-PGA合成の分子メカニズムを解明し、野生型PgsAよりも高い生産性を示す変異体の獲得に成功した。また、PGA生産性向上につながる、増殖阻害が見られないアセトイン・酢酸合成経路欠損株の作成、繊維状化細胞の開発にも成功した。D-PGA合成が亢進した株のスクリーニング法を構築したが、D-PGA生産変異株は取得できなかった。しかし、D-PGA合成変異株の取得方法を新たに考案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は信頼性の高いPGA合成の分子メカニズムのモデル提唱に至り、その学術的意義は計り知れない。特に、L-PGA高生産変異株の取得、超高分子L-PGA生産技術開発は画期的である。さらに新規代謝システム構築と繊維状細胞構築の成功は、工業スケールの生物生産プロセス改良へと繋がる。これらの成果は社会全体に影響を及ぼす可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The molecular mechanism of the synthesis of DL-PGA and L-PGA was elucidated, and a mutant strain with higher productivity was successfully obtained than wild-type PgsA. We also succeeded in creating a strain deficient in the acetoin-acetate synthesis pathway without growth inhibition, which leads to improved PGA productivity, and in developing fibroblasts. We established a screening method for strains with enhanced D-PGA synthesis, but we could not obtain a D-PGA-producing mutant strain. However, we developed a new method to obtain mutant strains of D-PGA synthesis.

研究分野：応用微生物学

キーワード：-L-PGA 枯草菌 オーバーフロー代謝 繊維状化細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、枯草菌がもつ「自然界で生き残るために獲得した細胞分化の能力」の抑制により、物質生産に必要な高い代謝を維持させ、様々な化学物質を効率的に生産できる「バイオプロダクション細胞」を開発した。ポリ- γ -グルタミン酸 (PGA) は、枯草菌などが生産する化粧品からドラッグデリバリーに至るまでの多様な用途を持つ化学物質であるが、高価な原料を必要とするため高価となってしまうことが課題となっていた。「バイオプロダクション細胞」を活用したところ、グルコース・アンモニアを唯一の炭素源とした培地で 1 g/L/h で 10 g/L/day 以上の生産能力を有する株の開発に成功した。その PGA は L 体と D 体のグルタミン酸からなる高分子 LD-PGA だったが、特殊なスクリーニングを通じて、高分子 L-PGA を生産する変異株の取得に成功した。この変異株は親株と同等の生産性を維持し、多くの変異は PGA 合成酵素複合体 PgsBCA の PgsA の C 末端領域の欠損であったことから、PGA の合成メカニズム、生産性の効率化についての新たなアイデアを得た。

2. 研究の目的

L-PGA はプラスチック原料としても注目されており、安価に生産できれば石油に代替する原料として低炭素化に貢献でき、さらに、多様なプラスチック開発にも繋がるポテンシャルがある。そこで「高分子 L-PGA の生産メカニズムの解明」と「バイオプロダクション細胞の最適化」により、「高分子 L-PGA を安価に生産する方法を確立する」ことを第一の目的とする。

純粋な D-PGA (D 体のホモポリマー) の生産は、炭疽菌だけで確認されているが高い病原性のために生産の実用化は難しい。面白いことに、炭疽菌の D-PGA 合成酵素は枯草菌の PGA 合成酵素複合体 PgsB/PgsC/PgsA (PgsBCA) と高い相同性を有する。このことから、枯草菌の PgsBCA も炭疽菌のように D-PGA を合成できる能力を有すると考えられる。そこで、「高分子 D-PGA を生産する方法を枯草菌で確立する」ことを第二の目的とする。

3. 研究の方法

(1) PGA の合成メカニズムの解明

L-PGA 生産株の変異は全て C 末端領域の欠損を含む PgsA に存在していたことから、PgsBC のみでも PGA を生産する可能性があった。検証と合成メカニズム解明のため以下の実験を行った。

プラスミドあるいはゲノムから、PgsBC のみを発現した場合に生産される PGA を評価した。N 末端あるいは C 末端を様々な長さで欠損した PgsA 変異株から生産される PGA を評価した。PgsA へのランダム変異を導入後、L-PGA 生産変異株をスクリーニング・変異を特定し、予測した PgsBCA 複合体立体構造に、特定した変異点をマッピングした。過去の論文を詳細に調査し、得られた結果と比較・検証することにより PGA 合成分子メカニズムの解明に取り組んだ。

(2) バイオプロダクション細胞の最適化

細胞分化の厳密な抑制：枯草菌ベースのバイオプロダクション細胞は、細胞分化に関わる遺伝子群を直接抑制する AbrB を常時高発現させることにより、細胞分化を抑制し、高い代謝活性を維持する。より厳密に細胞分化を制御するため、AbrB の上位に位置する Spo0A の欠損を行い評価した。

増殖阻害が見られないアセトイン・酢酸合成経路欠損株の作成：グルコースなどの糖は細胞に取り込まれた後、過剰な場合、アセトイン・酢酸として細胞外に排出される (オーバーフロー代謝)。これは、素材を無駄に消費するだけでなく、細胞増殖阻害や PGA 合成阻害にも働く。しかし、酢酸合成、アセトイン合成経路を破壊した株では、増殖阻害が見られ、物質生産の阻害も見られる。そこで、これら経路を欠損しても増殖が阻害されない代謝改変株の作成に取り組んだ。

繊維状化細胞の開発：高分子 PGA を大量に生産すると、通常の液体培養法では高い粘性のため通気が悪くなり増殖阻害・生産性低下が見られ、細胞の分離も難しくなる。細胞をカビのように繊維状化し担体に固定化できれば、通気性を確保しつつ、細胞からの PGA 分離を効率的に行える新規培養法・精製法の開発につながる。栄養豊富な培地で繊維状化する方法は開発済みであったので、安価な最小培地でも繊維状化する株の開発に取り組んだ。

(3) D-PGA を生産する方法を枯草菌で確立

2 つの D 体グルタミン酸間の結合を切断する YozZ を過剰発現させた場合でも、高い粘性を回復する変異株は、D-PGA 生産変異株であると思われる。この原理に基づき、D-PGA 生産変異株をスクリーニングするシステムを構築し、D-PGA 生産変異株の取得に取り組んだ。

4. 研究成果

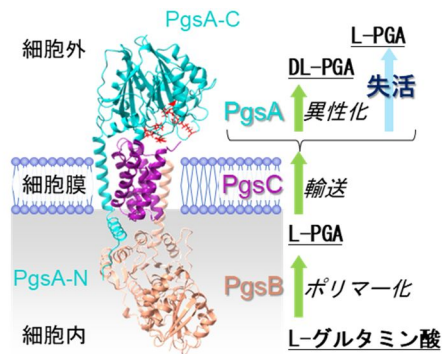
「研究の方法」の番号と対応させ研究成果を以下にまとめた。

(1) PGA の合成メカニズムの解明

PgsBC のみでは PGA は生産されない、つまり PgsA が PGA 生産に必須であることを確認した。以下のことがわかった。・PgsA の C 末端の十分な欠損は L-PGA 生産株となる、・N 末端の細胞内領域と膜貫通領域だけでも L-PGA を生産する、・N 末端あるいは膜貫通領域の欠損では PGA は生産しない、・部分欠損は生産性が激減する。

AlphaFold2 により PgsBCA 複合体の構造を精度良く予測できた。それに、L-PGA 生産変異となる 1 アミノ酸置換変異をマッピングすると、エピメラーゼの活性中心と思われる箇所に集中していた (図 1、側鎖を赤く表示)。点変異の多くは生産性低下が限定的であり、さらに DL-PGA 生産する野生型 PgsA よりも高い生産性を示す変異の獲得にも成功した。

本研究の成果と過去の文献情報を統合すると、DL-PGA 生産は、(1) 細胞内で PgsB が L-グルタミン酸を連結し L-PGA を合成 (Urushibata et al, 2002) (2) PgsC に加え PgsB と PgsA の膜貫通領域で形成されるトランスポーターが L-PGA を細胞外へと輸送、(3) 細胞外で PgsA が L-PGA の一部を D-グルタミン酸に変換 (Ogasawara et al, 2019) というプロセスで行われると考えられる。また、L-PGA 生産に必須である PgsA の N 末端領域は、細胞質で PgsB と、膜貫通領域で PgsC と相互作用しており、その必須性をうまく説明していた。このため、これら N 末端領域が存在する限り、PgsA の酵素活性を失うような変異は、L-PGA 生産株になると考えられる。さらに PgsA の細胞外ドメインは広く PgsC と相互作用しており、複合体の安定化にも寄与しており、そのため PgsA の C 末端欠損では生産性が激減すると考えられる。点変異の場合、構造を維持できれば生産性の減少はほとんどなく、場合によっては生産性が上昇したと予想される。



(2) バイオプロダクション細胞の最適化

Spo0A 欠損株は最小培地において増殖阻害が見られたので、抑制変異を取得、特定したが、この株でも PGA 生産の向上は見られなかった。一方、詳細なトランスクリプトーム解析、代謝フラックス解析により、バイオプロダクション細胞の物質生産性が亢進している理由を解明できた (Yamamoto et al, 2022)。

1) オーバーフローが必要な代謝状態を感知するとグルコースの取り込みを抑制する新規代謝システムを構築し、それにより酢酸合成、アセトイン合成経路を破壊しても増殖が阻害されない株の作成に成功した。

2) 基質となるグルタミン酸の生産量は、TCA 回路の 2-oxoglutarate dehydrogenase 遺伝子の破壊により上昇することがコリネバクテリアや大腸菌で報告されているが、増殖阻害や生産安定性が低いなどの問題がある。枯草菌でもそれをコードする *odhAB* の欠損株は栄養豊富な LB 培地、最小培地で増殖阻害が見られるが、我々はその原因を解明し、グルタミン酸・PGA 生産に利用できる方法を考案した。

細胞壁溶解酵素を複数欠損させることにより、最小培地で繊維状化が維持できる株の作成に成功した。

(3) D-PGA を生産する方法を枯草菌で確立

D-PGA 合成が亢進した株をスクリーニングするシステムを構築したが、D-PGA 生産変異株を取得することはできなかった。面白いことに、非常に増殖の遅いクローンが見つかり、解析の結果、DL-PGA を生産していたが、PGA 分解酵素により分解されたプロダクトが細胞の増殖を著しく阻害することがわかった。解明した PGA 合成メカニズムに基づき、D-PGA 合成変異株の取得方法を新たに考案した。

参考文献

- Ogasawara Y., et al. (2019) Involvement of Peptide Epimerization in Poly- γ -glutamic Acid Biosynthesis. *Organic letters* 21: 3972-3975
- Urushibata Y., et al. (2002) Characterization of the *Bacillus subtilis* *ywsC* gene, involved in gamma-polyglutamic acid production. *J. Bacteriol.* 184: 337-343
- Yamamoto J., et al. (2022) Constitutive expression of the global regulator AbrB restores the growth defect of a genome-reduced *Bacillus subtilis* strain and improves its metabolite production. *DNA Res.* 29(3): p. dsac015.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Yamamoto Junya, Chumsakul Onuma, Toya Yoshihiro, Morimoto Takuya, Liu Shenghao, Masuda Kenta, Kageyama Yasushi, Hirasawa Takashi, Matsuda Fumio, Ogasawara Naotake, Shimizu Hiroshi, Yoshida Ken-ichi, Oshima Taku, Ishikawa Shu	4. 巻 29(3)
2. 論文標題 Constitutive expression of the global regulator AbrB restores the growth defect of a genome-reduced <i>Bacillus subtilis</i> strain and improves its metabolite production	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 DNA Research	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/dnares/dsac015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 桂川晴日、中辻美咲、吉田健一、石川周
2. 発表標題 枯草菌における繊維状化細胞の制御技術の開発
3. 学会等名 2021年度グラム陽性菌ゲノム機能会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村瑞希、片野亘、吉川博文、朝井計、吉田健一、石川周
2. 発表標題 高頻度に転移する好熱性細菌由来のISの発見
3. 学会等名 グラム陽性細菌ゲノム機能会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本 純也、吉田 健一、石川 周
2. 発表標題 クエン酸の殺菌メカニズムの解明とそれを利用した新規プロトプラスト形質転換法の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会関西・中部支部2019年度合同神戸大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川周
2. 発表標題 最少培地における枯草菌による PGA生産
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部大会 (第505回講演会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 枯草菌を用いた超高分子のL ポリグルタミン酸の製造方法	発明者 石川周、山本純也、 Chumsaku I Onuma	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-159018	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	戸谷 吉博 (Toya Yoshihiro) (70582162)	大阪大学・大学院情報科学研究科・准教授 (14401)	

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
---------	---------