

機関番号：14501
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2009 ~ 2010
 課題番号：21760640
 研究課題名 (和文) 放線菌における細胞表層工学を用いたバイオプロダクト生産プラットフォーム構築
 研究課題名 (英文) Construction of protein displaying system on the cell surface of *Streptomyces* species for bio-refinery
 研究代表者
 荻野 千秋 (OGINO CHIAKI)
 神戸大学 大学院工学研究科・准教授
 研究者番号：00313693

研究成果の概要 (和文)：本研究では、我々が開発した放線菌の遺伝子組み換えシステムをベースに[1] タンパク質の培養上清への分泌生産、[2] タンパク質の菌体表層への表層提示、[3] 放線菌”自体”を化学品合成の生体触媒に利用するシステム(放線菌セルフファクトリー)、の構築を行った。結果、[1]に関しては多様なタンパク質(トランスグルタミナーゼやセルラーゼ)の発現に成功した。[2]に関しては、表層提示用のアンカーたんぱく質の探索を完了した。そして「3」に関しては、安息香酸系の化合物である桂皮酸のグルコースからの直接生産に成功した。

研究成果の概要 (英文)： In this study, by using these functions in *Streptomyces*, we undertook following three kinds of research topics:

- [1] Secretory protein production in culture medium
- [2] Protein displaying system on the cell surface of *Streptomyces* strain
- [3] Construction of cell factory for building block production

In first topic, several secretory enzymes such like a transglutaminase and cellulases were well produced by our constructed platform. In second topic, among the membrane protein library from three kinds of *Streptomyces* genome sequence, we found one kind of anchor protein for protein display. In final topic, we could perform the cinnamic acid production form glucose. In addition, this production level from glucose was attained at 500 mg/L of cinnamic acid, and this level is highest production among the previously reported papers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物化学工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・

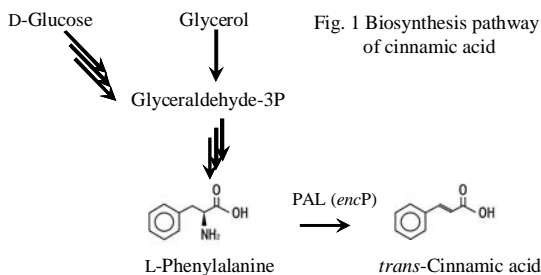
キーワード：放線菌、細胞工場、タンパク質生産

1. 研究開始当初の背景

近年、石油資源の枯渇、地球温暖化などからの脱却を目指した循環型社会の構築に向けて、微生物を用いた既存の石油由来ポリマー原料のバイオマス資源からの合成が注目されている。

2. 研究の目的

放線菌 *Streptomyces* 属は、『抗生物質生産菌であるため芳香環をもつ様々な化合物の生合成を示唆する代謝経路を保有している』、『異種タンパク質を大量分泌生産できる』、という2つの特徴を有している。本研究においてはこれら2つの特徴をそれぞれ用い、『放線菌による芳香族ビルディング化合物の合成』、『バイオマス糖化に向けたタンパク質の大量分泌生産系の構築』、という2つの視点からの研究を行った。まず、本研究で開発した *S. cinnamoneum* 由来ホスホリパーゼ D (PLD) の分泌生産系を他の様々なタンパク質の生産に応用することにより、3種の木質系バイオマス糖化酵素を含めた多種の新規タンパク質の分泌生産に成功した。更に、放線菌 *S. maritimus* が持つ植物特有の酵素であるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) をコードした遺伝子 *encP* を宿主株 *S. lividans* に導入することにより、化石資源由来ポリマー原料であるケイ皮酸のグルコース及び、バイオディーゼル燃料生産における副産物であるグリセロールからの生産に成功した (Fig. 1)。



3. 研究の方法

タンパク質および化成品の生産システムの開発

タンパク質の大量分泌生産系を構築するために、*S. cinnamoneum* 由来ホスホリパーゼ D (PLD) をコードした *pld* 遺伝子の下流に存在するプロモーター領域、分泌シグナル配列領域をクローニングし、このシグナル領域下流に *S. cinnamoneum* 由来トランスグルタミナーゼ (StvcMTG)、木質系バイオマス糖化に必須の酵素である *Thermobifida fusca* YX 由来 β -グルコシダーゼ (BGL)、エンドグルカナーゼ (EG)、セロビオヒドロラーゼ (CBH) をコードした遺伝子をそれぞれ導入し、これら大腸菌と放線菌のシャトルベクターである pUC702 にそれぞれ組み込み各種遺伝子発

現ベクター pUC702-*psmtg*、pUC702-*psbgl*、pUC702-*pseg*、pUC702-*pscbh* を構築した。それぞれのベクターをプロトプラスト-PEG 法を用いて宿主株である *S. lividans* に導入することにより、本分泌生産系の汎用性及び有用性の確認を行った。各酵素の分泌生産を SDS-PAGE により確認し、タグを付加した各酵素を精製し、各種活性測定により酵素の特性解析を行った。また、タンパク質の分泌生産に用いた *pld* プロモーターの下流に *encP* を導入し、pUC702-*pencP* を構築した。同様に形質転換を行い、ケイ皮酸生産放線菌を取得した。この形質転換体を様々な培地条件で培養を行い、培養上清を高速液体クロマトグラフィーで分析した。

遺伝子工学的手法を用いたタンパク質分泌生産強化

これまでに *S. cinnamoneum* 由来 *pld* プロモーター・分泌シグナル配列の下流に mature *mtg* 遺伝子を組み込み、プラスミド pUC702 に導入し、プロトプラスト-PEG 法で *S. lividans* に形質転換した結果、MTG の分泌生産に成功している。今回、分泌生産に重要な役割をなすと言われる prepro 配列を様々な組み合わせで *mtg* 遺伝子の下流に導入し、MTG の分泌生産を検討した。また、接合伝達法を用いて *mtg* 遺伝子の *S. lividans* への染色体組み込み型での導入についても検討を行った。更に、MTG 生産を様々な炭素源 (グルコース・グリセロール・生デンプン・キシラン・キシロース) を用いて検討した。また、窒素源として従来までのトリプトンではなく、より安価で工業的利用価値の高い硫酸アンモニウムからの発酵についても検討した。

4. 研究成果

新規タンパク質大量分泌生産

4種類の新規タンパク質の分泌生産及び精製に成功した。Fig. 2には StvcMTG と BGL の培養上清画分及び精製画分の SDS-PAGE の結果を示しておく。StvcMTG には ImageQuant TL を用い、BGL 及び EG については比活性と培養上清の活性値を用いることにより、それぞれ培養上清中のタンパク量を測定した。その結果、培養上清に分泌されたタンパク量は 230、114.4、64.3 mg/L であった。新規トランスグルタミナーゼ StvcMTG については、pH6.0、45°C での比活性が 12.02 U/mg であり、現在報告されているトランスグルタミナーゼに匹敵するものであり、今後、基質特異性についての分析が期待される。BGL、EG については 60°C においても高い活性を有しており、耐熱性セルラーゼであるといえる。EG については結晶性セルロースである Avicel に対しての活性もあり、今後、バイオマスの糖化

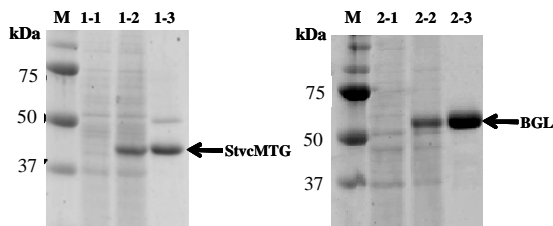


Fig. 2 novel proteins expression and purification

M : Molecular marker
 Lane 1-1 : control
 Lane 1-2 : culture supernatant of *S. lividans*/pUC702-psmtg
 Lane 1-3 : purified StvcMTG
 Lane 2-1 : control
 Lane 2-2 : culture supernatant of *S. lividans*/pUC702-psbgl
 Lane 2-3 : purified BGL
 についても検討していく予定である。

MTGの効率的生産システムの構築

pre、pro 配列を様々な組み合わせで導入した結果、特に目立った MTG 分泌生産の向上は見られず、mature mtg 遺伝子のみを導入したものが最も分泌生産に適しているということが示唆された。今後、接合伝達法を用いた染色体組み込み型についても評価する予定である。

更に、炭素源としてグルコース・グリセロール・生デンプン・キシラン・キシロースを用いて行った。この結果から木質系バイオマスであるキシランからの MTG 分泌生産が最も顕著であることが分かった。以上より *S. lividans* は様々な炭素源、特に木質系バイオマスであるキシランの資化能が高く、大量の MTG の分泌生産に成功した。

ケイ皮酸生合成

まず、TSB 培地に 15 g/L グルコース及びトリプトンを添加し、グルコースを単一炭素源にして発酵を行ったところ、培養 6 day で 90 mg/L のケイ皮酸生産を確認できた。窒素源であるトリプトン濃度の最適化により培養 8 day で 260 mg/L、炭素源にグルコースではなくグリセロールを用いることにより、培養 3 day で 240 mg/L のケイ皮酸の生産に成功した

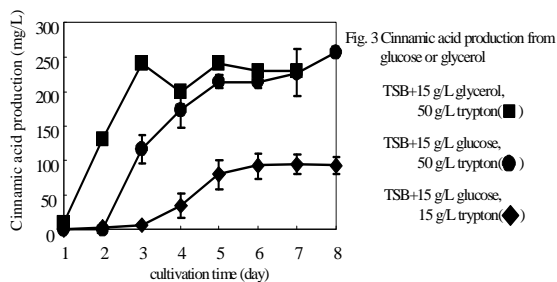


Fig. 3 Cinnamic acid production from glucose or glycerol

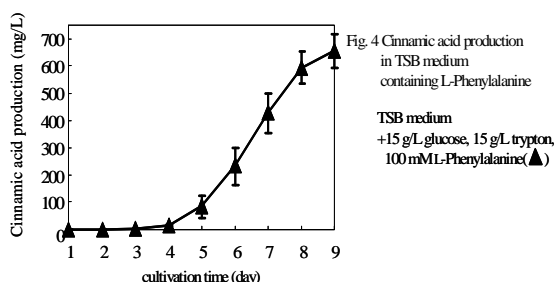


Fig. 4 Cinnamic acid production in TSB medium containing L-Phenylalanine

(Fig. 3)。また、培地中にケイ皮酸の前駆体である L-フェニルアラニン を 100 mM 仕込んでおくことにより、650 mg/L のケイ皮酸を生産することに成功した (Fig. 4)。

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 3 件)

①Noda, S., Miyazaki, T., Miyoshi, T., Miyake, M., Okai, N., Tanaka, T., Ogino C., Kondo, A. (2011) Cinnamic acid production using phenylalanine ammonia lyase expressing *Streptomyces lividans.*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.*, 38(5), 643-648

②Sugimori, D., Tomita, Y., Matsumoto, Y., Ogino, C. (2011) Extracellular production of a sphingomyelinase from *Streptomyces griseocarneus* using *Streptomyces lividans.*, *Biotechnology Letters*, 33(4), 727-731

③Noda, S., Ito, Y., Shimizu, N., Tanaka, T., Ogino, C., Kondo, A. (2010) Overproduction of various secretory-form proteins in *Streptomyces lividans.*, *Protein Expression and Purification*, 73, 198-202

[学会発表] (計 2 件)

①Shuhei Noda, Miyoshi Takanori, Naoko Okai, Tsutomu Tanaka, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo. Cinnamic acid production from various carbon sources using phenylalanine ammonia lyase expressing *Streptomyces lividans.* 33rd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Seattle, WA, USA, 2011.5

②Shuhei Noda, Tsutomu Tanaka, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo. Overproduction of various secretory-form proteins in *Streptomyces lividans.* YABEC 2010, Taipei, Taiwan, 2010.11

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 桂皮酸の製造方法

発明者: 近藤昭彦, 荻野千秋, 岡井直子, 三好孝則, 野田修平

権利者: 神戸大学、帝人

種類: 特許

番号: 2010-287418

出願年月日: 2010年12月24日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

日本語:

<http://www2.kobe-u.ac.jp/~akondo/index.html>

ENGLISH:

http://www2.kobe-u.ac.jp/~akondo/index_English.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荻野 千秋 (OGINO CHIAKI)

神戸大学・工学研究科・准教授

研究者番号：00313193