

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 30 年度博士課程入学

氏名 松原 寛敬
指導教員 大西 康夫

論文題目 産業用酵素生産株 *Bacillus amyloliquefaciens* LA 株を用いた
高生産因子の探索とその応用

工業用酵素生産株 *Bacillus amyloliquefaciens* LA 株（以下 LA 株と略す）は、伝統的な変異育種を 40 年にわたって繰り返した結果、 α -アミラーゼを菌体外に著量生産する能力を獲得した株である。この LA 株には変異育種の結果、酵素生産に関する有用変異点が蓄積されており、その高生産要因を解明することで酵素生産に関する新しい知見が得られると予想した。また、この高い酵素分泌生産能を他の酵素生産に応用することができれば、酵素生産用汎用宿主として利用できると期待される。そこで、LA 株の酵素高生産性の要因を解明し、それを異種酵素生産に応用することを目指した。

1. LA 株の形質転換法の改良

Bacillus amyloliquefaciens は、複数の文献で形質転換困難株、形質転換不可能株と報告され、形質転換が困難な株として知られていた。LA 株においては、変異育種により形質転換能を付与した LA33 株がすでに作製されていたが、その形質転換効率は 10^{-1} cfu/ μ g DNA と非常に低く、ルーチンワークで用いるにはより効率を上げる必要があった。そこで LA 株の形質転換法の改良を行った。プロトプラスト作製条件および再生条件の最適化によって、従来法と比べて形質転換効率は約 1,000 倍、バッチあたりの形質転換体取得数が約 10,000 倍に再現性良く上昇する条件を見出した。この新しい形質転換法の確立により、低効率のため非常に困難だった遺伝子改変実験を効率よく行うことが可能になった。

2. LA 株の異種酵素発現

LA 株の形質転換効率が大幅に改善した結果、さまざまな遺伝子の導入・破壊が可能になった。そこで、本菌の持つ高い酵素分泌生産能が異種酵素生産でも発揮されるかどうかを調べた。異種酵素組み換え発現では、 α -アミラーゼ遺伝子を相同組換えにより破壊した LA33_Amy-株を発現ホストとして用いた。産業応用が期待される延べ 97 遺伝子を発現ベクターにより、LA33_Amy-株に導入し、誘導発現した。発現カセットには自身の *amyA* プロモーターと（後述の理由から）*Bacillus circulans* プルラナーゼ由来の分泌シグナル配列とターミネーター配列を用いた。このキメラ発現カセットを持ったプラスミド（pUBCM21）により異種酵素遺伝子の発現検討を行った。その結果、類縁菌由来遺伝子では約 3 割の分泌生産成功率を示し、また糖質関連酵素の分泌生産成功率が高いことがわかった。最も生産量が多かった異種酵素は *Bacillus* 属由来 β -アミラーゼで、LA 株の α -アミラーゼ生産性に迫る著量の分泌生産が見られた。なお、この実験で見出した高発現および低発現酵素遺伝子ならびに発現が見られなかった酵素遺伝子は、後述する発現カセットの改良や汎用宿主構築を目指した実験において、モデル酵素遺伝子として用いた。

3. LA 株の発現カセットの改良

LA 株の高い α -アミラーゼ分泌生産能力の要因の 1 つは、強力な発現カセットすなわち *amyA* のプロモーター、シグナル配列、ターミネーター配列によるものであると考えられていた。しかしながら、これらのネイティブな発現カセットを用いると、大腸菌、枯草菌が致死性を示すため、これらの菌株を用いた通常のサブクローニングができないことが報告されていた。実際に本研究でも発現カセット部分が欠質やフレームシフトを起こして機能しなくなったものしか形質転換体として得られないことが確認された。

そこで、種々検討した結果、菌株を用いたサブクローニングを行わずに、環状プラスミドを PCR のみで Double Nicked Circular Plasmid（以下 DNCP と略す）として増幅したものを用いれば、直接 LA 株を形質転換できることがわかった。この方法で *amyA* 発現カセット全長を含むプラスミドを作製・増幅し、LA 株に直接導入することで、従来構築不可能だった発現ベクターの構築に成功した。作製した発現用プラスミドは pLAM1 と名付けた。DNCP 法で pLAM1 に異種酵素遺伝子を組み込んで発現を試みたところ、pUBCM21 プラスミドでは発現できなかった *Chryseobacterium* 由来プロテイングルタミナーゼの分泌生産に成功した。また放線菌由来 α -アミラーゼでは、分泌生産量が従来型コンストラクトと比較して、約 5 倍に増加した。

4. LA 株の歴代変異育種株のゲノム解析と、有用変異点の同定解析

次に LA 株の歴代変異育種株 8 株のゲノム配列を決定し、その蓄積された変異点を同定・比較解析した。変異点は歴代株で延べ 2,800 あまり同定されたが、この変異点は酵素生産性への寄与度から考えると、3 つに分けられると考えた。1 つめは酵素生産性に寄与する変異、2 つめは酵素生産性を低下させる変異、3 つめは酵素生産性に影響を及ぼさない変異である。このうち、酵素生産性に寄与する変異を見出す方法として、育種が浅く酵素生産性の低い株には見られず、育種の進んだ酵素生産性の高い株に保存されている変異点に着目し、絞り込みを行うことにした。2,800 余りの変異点の中から遺伝子機能への影響が大きいナンセンス変異、塩基挿入・欠失によるフレームシフト変異、合わせて 297 を選択し、さらに上述の絞り込みを行った結果、高生産株特異的な変異を有する遺伝子として 64 遺伝子を見出した。これらは高生産株で変異により遺伝子機能を失っている可能性が高く、遺伝子破壊によってその変異の効果を再現できると考えた。そこで、これらの全 64 遺伝子の相同組換えによる破壊コンストラクトを構築し、それぞれ遺伝子破壊を試みたところ、24 遺伝子について、破壊株の構築に成功した。

取得した遺伝子破壊株について、 α -アミラーゼ生産性を確認したところ、特に No. 30 と名付けた遺伝子 (ABC transporter ATP-binding protein とアノテーションされた) を破壊した株 (以下 $\Delta 30$ 株と略す) において、再現性良く 2 倍程度の α -アミラーゼ生産性を示すことがわかった。また、相同組換えにより、 $\Delta 30$ 株に当該遺伝子を再び導入した相補株では、 α -アミラーゼ生産性は元株の 7 割程度にまで下がり、当該遺伝子導入によって酵素生産増強効果が失われることが示された。よって、この No. 30 遺伝子破壊が高生産の原因の 1 つであることが強く示唆された。この結果は、LA 株のもつ高い酵素生産能力の要因の 1 つが No. 30 遺伝子の変異であることを示唆するものである。

5. LA33_Amy- $\Delta 30$ 株を用いた異種酵素発現増強効果の確認

次に、この No. 30 遺伝子破壊の効果が異種酵素発現でも見られるか確認するため、LA33_Amy-株で No. 30 遺伝子を破壊した。構築した株を LA33_Amy- $\Delta 30$ 株と名付け、異種酵素遺伝子発現に用いた。その結果、LA33_Amy- $\Delta 30$ 株に *Chryseobacterium* 由来プロテイングルタミナーゼを pLAM1 プラスミドで導入した際には、非破壊株に比べて約 4.9 倍の酵素生産が見られた。また、pUBCM21 プラスミドで最も著量分泌生産した *Bacillus* 由来 β -アミラーゼでは、LA33_Amy- $\Delta 30$ 株への同プラスミド導入で約 1.2 倍の生産性を示した。これらの結果から、No. 30 遺伝子の破壊効果は、元株の α -アミラーゼ生産にとどまらず、異種酵素遺伝子発現においても酵素生産性増強効果を示すことが明らかになった。

6. まとめと総合討論

本研究では、工業用酵素生産株である *Bacillus amyloliquefaciens* LA 株の高効率形質転換系を新たに確立し、それによって LA 株の組換え酵素遺伝子発現ホストとしての汎用性を示した。分泌生産に成功した酵素は機能別に糖質関連酵素が最も多く、次いで油脂関連酵素、タンパク質関連酵素であった。おそらく生産した酵素自体が細胞の生育などに影響していることが考えられ、実際にタンパク質関連酵素の組み換え生産では、培養上清中のタンパク質が部分分解されていたり、また顕微鏡観察下での菌の形態に異常をきたしたりしていることが観察された。糖質関連酵素の成功率が高かったのは LA 株内に酵素活性の影響を受けるような糖質成分が少なかったためか、 α -アミラーゼを著量発現するために、大量の糖質関連酵素発現に対するなんらかの防御機構が備わっている可能性が考えられる。

発現カセットの応用では、pUBCM21 でもっとも著量発現した *Bacillus* 属由来 β -アミラーゼを、pLAM1 に載せ替えて LA 株に導入しようと何度も試みたが、うまくいかないことから、*amyA* カセットからの過度の遺伝子発現が生育に影響することが示唆された。大腸菌、枯草菌で *amyA* カセットのサブクロニングがうまくいかなかったことも *amyA* プロモーターの強力な転写能と、それに伴う主要シグマ因子 (σ^A) の占有化が生育に影響していることが考えられる。

歴代生産菌のゲノム解析では、歴代株のうち 8 株のゲノム配列を決定し、さらにショートリードによるエラー修正を繰り返して、できる限りエラーのないゲノム配列決定を目指した。得られたゲノム配列を用いて変異点を決定したところ、2,800 を超える変異点が同定された。変異の中には ORF 以外の領域に入ったものや、アミノ酸変化を起こさないサイレント変異なども多数見出されたが、今回これらの評価は行わなかった。今後ゲノムシヤッフリング法や、接合伝達による長鎖 DNA 組換えなどを用いてこれらの酵素生産への寄与度を評価したいと考えている。

変異点情報から遺伝子破壊株を構築し、酵素生産性に影響のある No. 30 遺伝子を見出した。この遺伝子は ABC transporter ATP-binding protein とアノテーションされているものの、その機能が詳細に調べられた文献は見出せなかった。またモデル生物である *B. subtilis* には十分な相同性を示すホモログはなく、そこから情報は得られなかった。一方で、No. 30 遺伝子破壊によって、LA 株において α -アミラーゼの分泌生産増強、相補によって分泌生産増強効果の消失が見られたことから、酵素生産性にかかわる 1 因子であることが示唆された。また、No. 30 遺伝子破壊は異種組換え酵素遺伝子発現においても分泌生産増強効果を示したことから、その効果が α -アミラーゼに特化したものではないことが示唆された。今後、ホモログを持つ他の株での遺伝子破壊や、LA 株内での過剰発現株作製などを通じて、本遺伝子がどのようなメカニズムで酵素分泌の生産性に関係しているかを解明していきたいと考えている。