

研究終了報告書

「人工進化実験による産業用酵素生産 *Bacillus* 株の耐酸性化」

研究期間： 2021年10月～ 2024年3月

研究者： 中西 貴士

1. 研究のねらい

酵素はあらゆる生命に存在する分子で、多種多様な化学反応を触媒する活性を持つことから、研究・産業への利活用が広く進められている。酵素は常温常圧の穏やかな条件下で働くため、各種産業で加工助剤として利用されることで、生産効率を改善しつつ、生産プロセスの省エネルギー化・低CO₂排出を実現してきた。これは Sustainable Developmental Goals (SDGs) が掲げる未来へ直結する成果であり、産業用酵素の活用を広げることは非常に重要である。加えて、近年の次世代シーケンサー(NGS)やバイオインフォマティクスの発展を受け、データベース上の酵素遺伝子数は増加の一途をたどり、これらの実産業への応用が強く期待されている。

多くの場合、産業用酵素は微生物による発酵生産で製造される。産業用酵素は安価に大量供給される必要があるため、酵素生産能力だけでなく、菌体外への分泌能力も高い微生物が利用される(Singh, R., *et al.*, *3 Biotech.* 2016)。例えば細菌では *Bacillus* 属、真菌では *Aspergillus* 属などが利用されているが、生産宿主の多様性は十分とは言えない。新規酵素の製品化を目指す場合、その酵素の特性に合った宿主を選択することが鍵となるが、細菌由来の微生物で、酸性条件下で生育・酵素生産できる宿主は未開拓である。今まで天然の多様な微生物から採取が試みられてきたが、遺伝子操作の簡便さ・異種酵素分泌能力の高さなどの必要条件を十分に満たす菌株が得られていない。細菌・アーキア由来の酵素は真菌宿主での生産性が低く、細菌宿主で生産性が高い傾向にあり、多様な宿主の開発は非常に重要である(Arnau, J., *et al.*, *Grand Challenges in Fungal Biotechnology.* 2019.)。以上を踏まえて、酵素発現能を維持したまま酸性条件下で生育できる *Bacillus* 株を開発すれば、産業用酵素として製品化できる酵素群がさらに広がると申請者は考えた。本研究では、人工進化実験のアプローチにより、弊社保有の酵素高生産 *Bacillus* 株を酸性条件下でも生育・発酵生産できるよう育種することを目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究は、弊社保有の産業用 *B. licheniformis* 株を酸性条件下でも生育・酵素生産できるように育種することを目的とした。大きく分けて、以下三つのテーマに取り組んだ。

A. 「*rpoBC* 変異株の樹立と評価」 本テーマでは、大腸菌を用いた先行研究で発見された、酸性条件の適応に重要と示唆される *rpoBC* 遺伝子の変異を弊社の *B. licheniformis* 株に導入し、どのような表現型の変化が見られるか調べた。この菌はレポータープロダクトとして酸性アルファアミラーゼを生産する(以下、Acid Alpha-amylase 生産株 = AA 株と呼ぶ)。結果として、5つの *rpoB* または *rpoC* 点変異株を作成した。そのうち、酵素生産性が保持されていた3つの変異株を次に続く研究に使用した。

B. 「オートメーションによる耐酸性株のスクリーニング系の確立と実施」 本テーマでは、上で樹立した *rpoBC* 変異株及び野生型株に化学変異原を用いてランダム変異を導入することで、酸性適応株の取得を目指した。大規模に変異株をスクリーニングするために、コロニーピッカー (Qpix420, Molecular Devices) を用いた固定培地での一次選抜、液体培地での二次選抜を半自動で行なう系を確立した。結果として、AA 株、AA *rpoBC* 変異株を変異原処理したプールからそれぞれ 60,000 株程度の変異株をスクリーニングし、それぞれ 4 つ、8 つの positive candidate を得た。いずれの変異株も、液体培養試験 (pH6.0) ではオリジナルの AA 株に比べて、15~50%程度アルファアミラーゼ発現量が向上していた。

C. 「得られた変異株の評価と考察」 本テーマでは、上で得られた 12 の変異株のうち、先行して得られた 4 株について表現型、遺伝子型を解析した。酵素生産性試験の結果、pH6.0 での酵素生産性が 20%程度向上していた株が二つ確認できた。NGS 解析の結果、これらの二つの変異株には共通して遺伝子 X にミスセンス変異が導入されたことがわかった。今後、遺伝子 X と酸性適応の関係を調べつつ、他の変異株についても同様に解析を進める。

(2) 詳細

研究テーマ A「*rpoBC* 変異株の樹立と評価」

本テーマでは、大腸菌を用いた進化実験で発見された、酸性条件の適応に重要と示唆される *rpoBC* 遺伝子の変異(表 1)を弊社の *B. licheniformis* 株に導入し、どのような表現型の変化が見られるか調べた。この菌はレポータープロダクトとして酸性アルファアミラーゼを生産する(以下、Acid Alpha-amylase 生産株 = AA 株と呼ぶ)。

表 1. *rpoBC* 遺伝子変異リスト

Gene	Code	<i>E. coli</i> 変異	<i>B. licheniformis</i> 対応する残基	Reference
<i>rpoB</i>	RNAP beta subunit	A679V	A637	Harden, M.M. <i>et al.</i> , 2015
<i>rpoC</i>	RNAP beta prime subunit	V507L	V496	Harden, M.M. <i>et al.</i> , 2015
<i>rpoC</i>	RNAP beta prime subunit	I774S	I778	Harden, M.M. <i>et al.</i> , 2015
<i>rpoC</i>	RNAP beta prime subunit	A397E	A386	Du, B. <i>et al.</i> , 2020
<i>rpoC</i>	RNAP beta prime subunit	G444A	G433	Du, B. <i>et al.</i> , 2020
<i>rpoC</i>	RNAP beta prime subunit	S539F	not reserved	Du, B. <i>et al.</i> , 2020

まず、ゲノム編集技術を用いて、表 1 中の *B. licheniformis* で保存されていない S539F を除く 5 つの点変異を *rpoB* または *rpoC* 遺伝子に導入を試みたところ、5 つすべての変異株の樹立に成功した。ゲノム編集に利用した外来 DNA(plasmid DNA)は、変異導入後、細胞から脱落させた。

本研究では酸性条件下での細胞増殖能だけでなく酵素生産能にも着目して有望な変異株を得る必要があるため、まず弊社で酵素生産性試験に使われる富栄養培地を用いて、変異株の酵素生産性を調べた。著しい酵素生産性の低下が見られた二株を候補から除外し、他の変異株を続く実験に利用することとした。

研究テーマ B「オートメーションによる耐酸性株のスクリーニング系の確立と実施」

本研究テーマでは、テーマ A で樹立した *rpoBC* 変異株および野生型株に対し、化学変異原 (NTG, nitrosoguanidine) でランダム変異を導入することで、酸性適応株の取得を目指した。NTG 処理済みの変異体プール中には、酸性培養条件への適応度が変化した株が含まれていると期待される。まず、予備実験で、pH5.5 に合わせた固体培地では pH7.0 と比べて AA 株の生育は非常に遅く、アミラーゼ生産性も低いことを確認した。この固体培地にはアミラーゼの基質であるスターチが含まれており、アミラーゼ生産性がコロニー辺縁のクリアゾーンで判定できる。そこで、一次スクリーニングとして、NTG 変異体プールを上述の固体培地に播種したのち、コロニーピッカー (Qpix420, Molecular Devices) を用いてコロニーサイズ・クリアゾーンサイズを定量することで、生育が良くアミラーゼ生産性も高い変異体を選抜した。選抜された変異株は、二次スクリーニングとして pH6.0 での液体培養試験 (96-well MTP) を行なうことで、さらに生育と酵素生産性を指標に酸性適応株を選抜した。

AA 株を NTG 処理した変異体プールから 60,000 株程度を Qpix で一次スクリーニングし、続いて二回の液体培養試験を経て 4 つの変異株を得た。さらに、AA *rpoBC* 変異株についても同様に、NTG 処理プールから 60,000 株程度をスクリーニングし、結果 8 つの変異株を得た。いずれの変異

株も、液体培養試験(pH6.0)ではオリジナルの AA 株に比べて、15~50%程度アルファアミラーゼ発現量が向上していた。

研究テーマ C「得られた変異株の評価と考察」

本研究テーマでは、テーマ B で得られた変異株について表現型・遺伝型を調べるとともに、pH6.0 への適応がどのようなメカニズムで起こったかについて考察した。まず、先だって得られた 4 株について、2 種類の培地(pH7.0, pH6.0)により酵素生産性試験を行なった。結果として、2 つの変異株は pH6.0 での酵素生産性が 20%程度向上していた。次に、それぞれの変異株にどのような変異が蓄積したかを調べるために、ゲノム DNA を精製し、NGS 解析を行なった。得られたリード情報は breseq (Barrick, J.E., *et al.*, *BMC Genomics*. 2014)パイプラインで処理することで、AA 株と比較して変異株に蓄積した変異(特に single nucleotide variations, SNVs)を調べた。興味深いことに、酵素生産性向上が確認できた二つの変異株に、共通した遺伝子 X にミスセンス変異が確認された。今後、遺伝子 X と酸性適応の関係を調べつつ、他の変異株についても解析を進める。

3. 今後の展開

今回の研究を通じて、neutrophil である産業用 *B. licheniformis* 株が、高い酵素生産性を保持しつつ弱酸性の生育環境に適応した変異株を複数樹立することができた。今後の展開として、(1) 適応に寄与した責任遺伝子(変異)の同定、(2) 複数の変異を重ねることで、さらに適応度が向上した変異株の作成、(3) 弱酸性に適応した変異株を用いたラボスケールでの酵素生産の実践、などが考えられる。既にこれまでの研究で得られた技術を応用することで、(1)-(3)まで 1-2 年の期間で検証していきたい。また、(1)で見つかった責任遺伝子(変異)から、細菌が弱酸性環境に適応する未知のメカニズムについても研究を進めていきたい。

4. 自己評価

本研究は、弊社保有の産業用 *B. licheniformis* 株を酸性条件下でも生育・酵素生産できるよう育種することを目的とした。その際、1. 酸性条件に適応した変異株を得る、2. 変異株の生産性をラボスケールで検証する、3. 実生産設備でのテスト生産を行なう、の三つをマイルストーンとして設定した。結果として、通常中性で培養・発酵生産を行なう菌株について、変異株のスクリーニングにより、pH6.0 での酵素生産性を高めた変異株を得ることができたので、本研究の一つめのマイルストーンは達成できたと考えている。二つめのマイルストーンは、複数の変異株から得られた変異をひとつの菌株にまとめて導入することでクリアできると期待され、三つめのマイルストーンはその後に検証できる。neutrophile である産業用 *B. licheniformis* 株を pH6.0(あるいはさらに低い pH)で培養できるようになれば、分泌型プロテアーゼによるプロダクトの分解を相当抑えることができ、実生産における大きなメリットがある。そのため、これまで生産が難しかった酵素も社会実装できる可能性があり、本研究はその道筋の最初の一步を進めることができたと考えている。また、ACT-X では新進気鋭の若手研究者の方々と交流することができたので、得られた変異株が酸性条件に適応したメカニズムについても、今後様々な形で共同して研究が進められると期待している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 0件

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

特になし