

メタノール資化性細菌によるエルゴチオネインの発酵生産

谷 明生

岡山大学 資源植物科学研究所

研究の目的

Methylobacterium 属細菌は α プロテオバクテリアに属するメタノール資化性細菌であり、これまで細菌におけるメタノール資化のモデルとして研究されてきた。一方で植物が著量のメタノールを放出していることやその葉面に本属細菌が多く存在すること⁽¹⁾、また本属細菌の接種によって植物の成長が促進されることが分かってきた⁽²⁾。私たちはこの生育促進メカニズムを研究している過程で、本属細菌が菌体内に大量のエルゴチオネイン (EGT、図1) を蓄積していることをメタボローム解析によって発見した。本研究では本属細菌における EGT 蓄積の生理学的役割、またメタノールからの EGT 発酵生産に向けて基礎的な知見を得ることを目的とした。

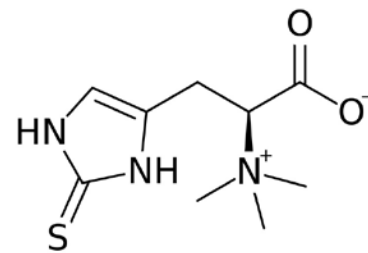


図1. エルゴチオネイン

方法

エゾスナゴケから分離され、その生育を促進する *Methylobacterium aquaticum* 22A 株をモデルとして用いた⁽³⁾。そのゲノムはすでに解析済みである⁽⁴⁾。遺伝子破壊株の構築には pK18mobSacB ベクターを用いた。EGT の定量には HPLC を用いた。アミノ酸の定量にはアミノ酸アナライザーを用いた。

結果

メタノールに生育した 22A 株菌体をサンプルとして、キャピラリー電気泳動質量分析計を用いてメタボローム解析を行った結果、通常のアミノ酸であるセリン、グルタミン、リジンなどに加えて EGT が最も高いピークとして見つかった。HPLC での定量系を確立し、メタノールやエタノール、コハク酸、グルコースなどと炭素源を変更した結果、メタノールで最も高い生産性が見られた。

アミノ酸アナライザーで細胞内のアミノ酸を定量したところ、EGT が他のアミノ酸に比べて最も高蓄積していた (図2)。本属別種の基準株を用いて EGT 生産能を比べた結果、本属細菌のほとんどは EGT を生産することができ、中でも 22A 株は生産性が高かったため今後のモデルとして用いた。窒素源、アミノ酸、鉄、ランタノイドの添加等を検討して培養条件を最適化した。その結果 2%メタノールを炭素源として約1ヶ月の培養で 1 mg/100 ml 培養液(1.2 mg/g 湿重量菌体、6.3 mg/g 乾燥重量菌体)の生産性を得

た。この生産性は論文として報告されているヒラタケの生産性を上回った⁽⁵⁾。

EGT の生合成遺伝子は遺伝子クラスター (*egtABCDE*) として *Mycobacterium* 属細菌において初めて見つかった⁽⁶⁾。その遺伝子ホモログが 22A 株ゲノムにも存在したが、その構成は *egtBD* のみがクラスターとして存在し、他の遺伝

子はゲノム上に散在していた。*egtBD* 遺伝子を破壊したところ、遺伝子破壊株 Δegt は全く EGT 合成能を失った。野生株に比べて Δegt は熱ショックと UV 処理に感受性を示し、また過酸化水素ストレスに強くなった。実際 EGT は UV 処理により分解し、菌体内の EGT も UV によって分解されることが分かった。さらに太陽光に曝した Δegt はやはり野生株よりも高い感受性を示した。しかし Δegt はメタノールには生育し、野生株よりも良好な生育を示したことから、メタノールの代謝には EGT は全く関与していないことが分かった。

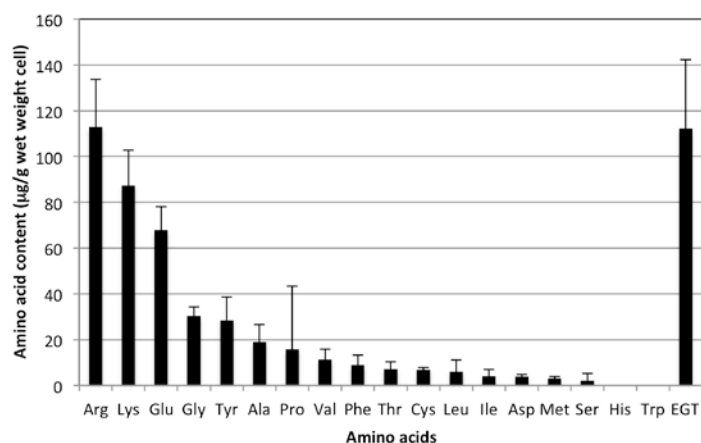


図 2. 22A 株の細胞内アミノ酸蓄積量

結論

以上のことから *Methylobacterium* 属細菌とメタノールを用いて EGT 生産につなげることができると示した。本属細菌はメタノールを炭素源とした高密度培養が可能であり、その収量は 100 g 乾燥菌体/リットルにも及ぶ⁽⁷⁾。今後そのような高密度培養の検討、高生産性菌のスクリーニング、培養条件の最適化、遺伝子発現の強化などにより、高い生産性を目指して研究を進めている。また EGT はメタノール生育時に高蓄積するがメタノールの代謝には関与していない。 Δegt が太陽光に弱くなることから、本属細菌が太陽光の元で、植物上で生育するために重要なアミノ酸であることが示された⁽⁸⁾。

文献

- (1) Vorholt, J. A. (2012) Microbial life in the phyllosphere. *Nat. Rev. Micro.* **10**: 828–840.
- (2) Abanda-Nkpwatt, D., Müsch, M., Tschiersch, J., Boettner, M., and Schwab, W. (2006) Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. *J. Exp. Bot.* **57**: 4025–4032
- (3) Tani, A., Takai, Y., Suzukawa, I., Akita, M., Murase, H., and Kimbara, K. (2012) Practical application of methanol-mediated mutualistic symbiosis between *Methylobacterium* species

- and a roof greening moss, *Racomitrium japonicum*. *PLoS ONE* **7**: e33800.
- (4) Tani, A., Ogura, Y., Hayashi, T., and Kimbara, K. (2015). Complete genome sequence of *Methylobacterium aquaticum* strain 22A, isolated from *Racomitrium japonicum* moss. *Genome Announc.* **3**: e00266–15.
- (5) Woldegiorgis, A. Z., Abate, D., Haki, G. D., and Ziegler, G. R. (2014). Antioxidant property of edible mushrooms collected from Ethiopia. *Food Chem.* **157**: 30–36.
- (6) Seebeck, F. P. (2010). In vitro reconstitution of Mycobacterial ergothioneine biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **132**: 6632–6633.
- (7) Bourque, D., Pomerleau, Y., and Groleau, D. (1995). High-cell-density production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens*: production of high-molecular-mass PHB. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 367–376.
- (8) Alamgir, K. Masuda, S., Fujitani, Y., Fukuda, F., Tani, A. (2015). Production of ergothioneine by *Methylobacterium* species. *Front. Microbiol.* **6**: 1185