

令和 2 年 11 月 30 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18683

研究課題名(和文)非可食バイオマスの直接発酵を可能とする宿主微生物の開発

研究課題名(英文) Develop of a host microorganism that enables the direct fermentation of non-edible biomass

研究代表者

秋田 紘長 (Akita, Hironaga)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・機能化学研究部門・研究員

研究者番号：10738024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：研究を開始した当初、好熱菌 *Ureibacillus thermosphaericus* のリグニン分解能を利用して遺伝子発現システムを開発することを計画していた。しかしながら、*U. thermosphaericus* が有するリグニン分解活性は低く、宿主微生物としての利用が困難であった。そこで、自然界より採取した種々の環境土壌を利用して広範なスクリーニングを実施した。その結果、リグニン分解活性は有していないが、貧栄養条件下で優れた増殖能を有する細菌を新たに分離した。さらに、本分離株の統学的解析や生化学的解析等を進め、本分離株が腸内細菌科に属する新属新種細菌であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で新たに単離した CCA6 株は、貧栄養条件下でも良好な生育能を示す。また、栄養要求性が低く、廃糖蜜等の非可食バイオマスを利用して容易に増殖可能なことから、製造コストの大幅な削減につながる等、バイオものづくり用の宿主としての資質を有している。

これまでに20種程度の貧栄養細菌が単離されており、それら細菌の貧栄養適応能が報告されているが、詳細なメカニズムは解明されていない。今後の研究により、貧栄養適応メカニズムを分子レベルで解明できれば、知的財産の取得や学術論文の公表などを世界に先駆けて実施できる。

研究成果の概要(英文)： To develop a novel gene expression system, we were planning to use lignin-degrading capability of *Ureibacillus thermosphaericus*. However, because *U. thermosphaericus* showed low the degrading capability, it was not suitable as a host bacterium.

We therefore screened for lignin-degrading bacteria with a high capacity for lignin degradation. To obtain the bacteria, filtrates were prepared from several soil samples and then plated onto M9 plates (pH 7.2) containing alkali lignin as the sole carbon source. When the plate was incubated aerobically, individual colony was obtained from the leaf soil filtrate, and which named as strain CCA6. Although the degrading capability did not detected, strain CCA6 exhibited cell growth in oligotrophic condition. To identify the phylogeny strain CCA6, we performed the phylogenetic, phenotypic and biochemical characterization. As the result, strain CCA6 was considered to represent a novel species of a new genus in the family Enterobacteriaceae.

研究分野：応用微生物学

キーワード：バイオマス リグニン分解 *Ureibacillus* 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

(1) 学術的背景

近年、石油資源の供給リスクを克服し、低炭素化に資する技術として、再生可能資源であるバイオマスから化学品を生産する技術が鋭意研究されている。可食性バイオマスを原料とする化学品生産技術の一部は既に実用化されているが、非可食性バイオマスを原料とする場合は、技術・コストなどの問題から実用化された例はわずかである。例えば、糖化酵素を利用して、非可食性バイオマスの主成分であるセルロースやヘミセルロースからグルコースやキシロース等の単糖に糖化し、得られた糖化液を原料にして酵母を利用するバイオエタノールの生産や大腸菌を利用する有機酸の生産が典型的な例として挙げられる。これらの方法は、食糧と競合しない非可食性バイオマスを有効利用できる点で優れた方法である。

(2) 問題点

その一方で、産業利用されている宿主微生物の多くは、非可食性バイオマスを直接分解できないため、発酵の前段階として、糖化酵素を利用した糖化液の調製が必須とされる。また糖化酵素は、非可食性バイオマスの約3割を占めるリグニンを分解できないため、全主成分を有効利用できない(図1)。さらに、非可食性バイオマスの主成分の1つであるリグニンは、数種のフェノール化合物が高度に重合しているため分解が難しく、リグニンを分解できる微生物はキノコなどの木材腐朽菌を含めた数種の微生物に限られると考えられてきた。一方、それら微生物の増殖速度は低いため、宿主微生物への利用は困難な状況にある。

2. 研究の目的

(1) リグニン分解物誘導型外来遺伝子発現システムの開発

上述の問題を解決するため、申請者は、好気性好熱性細菌 *Ureibacillus thermosphaericus* 内に、従来困難であったリグニン利用を可能とするリグニン分解物誘導型外来遺伝子発現システムを構築し、非可食性バイオマスの全主成分から発酵生産が可能な宿主微生物の開発を目指した(図1)。本法は、T7 RNAポリメラーゼ遺伝子とT7プロモーターを菌体に内在させるため、これまで外来遺伝子の発現に必要とされていたプラスミドDNAと高価な遺伝子発現誘導剤を必要としない。また本システムの応用として、イソブタノール生産株の作製を計画した。

3. 研究の方法

(1) リグニン分解活性の解析

*U. thermosphaericus* が有するリグニン分解活性を詳細に解析するため、水熱処理により試薬リグニンを単一炭素原として可溶化させた培地中で *U. thermosphaericus* A1 株を培養し、培養液を分析してリグニン分解物の同定を行った。分解物の同定は、液体クロマトグラフ質量分析の結果と所属研究グループで過去に得られた知見を基に行った。またゲノムDNAの配列情報とリグニン分解活性の解析結果を基に、*U. thermosphaericus* が有するリグニン分解活性について考察した。

(2) 新規微生物のスクリーニング

より高いリグニン分解活性を有する微生物を新たに分離するため、自然界より採取した種々の環境土壌1gを滅菌水10mLで懸濁し、それらの濾液をリグニンを主成分とする寒天培地に塗布し、スクリーニングを実施した。

(3) 新規分離微生物の同定

新規分離微生物を普通ブイオン培地で好氣的に培養し、遠心分離後に得られる培養菌体からゲノムDNAを抽出した。次いで、ゲノムDNAを鋳型に利用して16S rRNAとatpD遺伝子をそれぞれ増幅した。同様に培養菌体を利用して、Voges-Proskauer試験を実施した。atpD遺伝子の配列相同性とVoges-Proskauer試験の結果に基づいて系統解析を実施した。

新規分離微生物の分子生物学的性質を明らかにするため、炭素資化性や細胞壁組成、キノキシシステム等の解析を実施した。

4. 研究成果

(1) リグニン分解活性の解析

*U. thermosphaericus* を試薬リグニンを単一炭素原として可溶化させた培地中で培養すると、増殖が確認された。しかしながら、その増殖速度は、リグニン分解能を有する既知の微生物のそれと比べて、著しく低くなることが明らかになった。そこで、*U.*

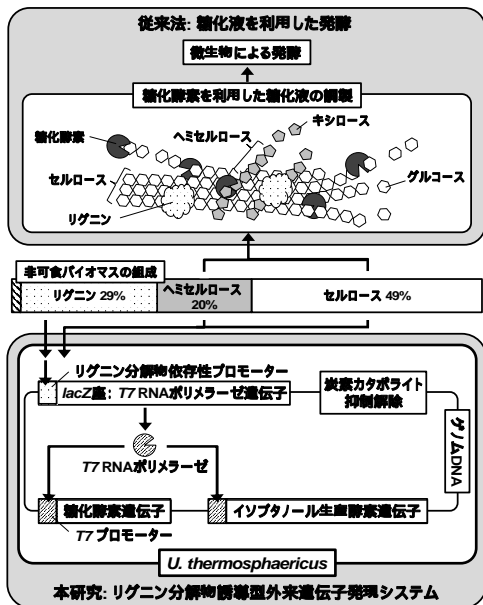


図1 本研究と従来法の比較

*thermosphaericus* のリグニン分解活性を酵素・遺伝子レベルで解析するためゲノムシーケンス解析を行った。その結果、*U. thermosphaericus* には、リグニン分解に必要なとされる酵素遺伝子群の一部が備わっていないため十分な分解活性を示さないことを明らかにした。これらのことから、*U. thermosphaericus* 内に、リグニン分解活性を応用した外来遺伝子発現システムを構築することを断念した。

## (2) 貧栄養耐性微生物の分離

次に、より高いリグニン分解活性を有する微生物を新たに分離するため、上述のスクリーニングを実施した。その結果、リグニン分解活性は確認されないが、栄養素が乏しい貧栄養条件下で増殖能を有する細菌を1株分離し、CCA6 株と命名した。CCA6 株は、アガロース粉末中に含まれる数 ppm の脂肪酸やカルシウム、マグネシウム等のミネラルを利用して増殖可能であった (図2)。



図2 分離株の培養

また、既知の貧栄養耐性細菌の多くは、栄養源が豊富に存在する栄養条件下では著しい増殖阻害を受けるのに対し、CCA6 株は優れた増殖能を示した (図3)。

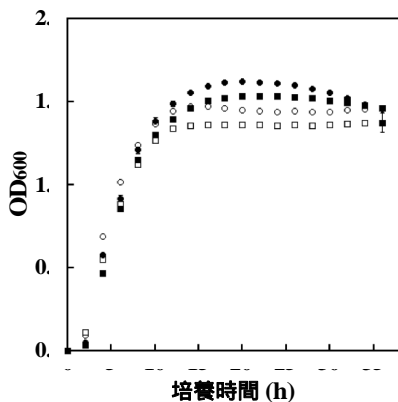


図3 CCA6 株と大腸菌の増殖速度の比較  
CCA6 株 (黒塗り) と大腸菌 MG1655 株 (白塗り) を普通ブイヨン培地 (丸) と LB 培地 (四

角) 中で培養した結果を示した。

産業利用されている大腸菌や酵母は、機能性化学品を発酵生産するためには豊富な栄養源を必要とするが、その生産能は栄養素が欠乏すると著しく低下する。しかしながら、CCA6 株は栄養要求性が低いため、発酵生産用の宿主としての利用可能性を示した。

## (3) 分離株の同定

CCA6 株の分類を明らかにするため、16S rRNA 遺伝子の相同性を確認した。その結果、本分離株は、腸内細菌科に属し、*Enterobacter hormaechei* ssp. *oharae* DSM16687<sup>T</sup> (相同性: 97.4%)、*E. hormaechei* ssp. *hormaechei* ATCC49162<sup>T</sup> (97.2%)、*E. xiangfangensis* LMG27195<sup>T</sup> (96.9%)、*E. hormaechei* ssp. *steigerwaltii* DSM16691<sup>T</sup> (95.5%) 等と類縁であった。より詳細な系統学的位置を決定するために、*atpD* 遺伝子の相同性と Voges-Proskauer 試験結果に基づいて、系統樹を作製した (図4)。系統解析の結果、CCA6 株は、*Enterobacter* 属の公知の基準株とは明確な差異を示した。

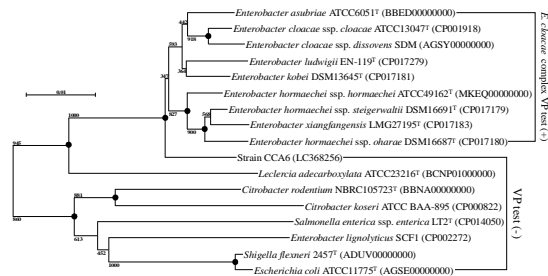


図4 *atpD* 遺伝子の相同性と Voges-Proskauer 試験の結果に基づいた系統解析

CCA6 株と最も類縁性の高いとされた *E. hormaechei* ssp. *hormaechei* ATCC49162<sup>T</sup> と、同様に類縁な *E. hormaechei* ssp. *steigerwaltii* DSM16691<sup>T</sup> 等の5種の細菌を選び、各種炭素源に対する資化性の有無を比較した。その結果、上述の6種では、D-スクロースとD-ツラノース等の二糖類の資化性が確認されたのに対し、CCA6 株はそれら糖類の資化性が確認されなかった。一方で、細胞壁を構成する飽和脂肪酸 C<sub>10:0</sub> と C<sub>11:0</sub>、不飽和脂肪酸 C<sub>15:1</sub> 6c と C<sub>17:1</sub> 8c は、CCA6 株のみに確認された。

上述のとおり、CCA6 株は、*atpD* 遺伝子の相同性解析及び Voges-Proskauer 試験の結果、種々の分子生物学的性質の結果から、*Enterobacter* 属の公知の種とは区別された。これらのことから、CCA6 株を腸内細菌科に属する新属新種の細菌と判定し、*Oligoenterobacter oligotrophica* CCA6 株として特許出願した。

本研究を開始した当初、*U. thermosphaericus* の菌体内にリグニン分解

物誘導型外来遺伝子発現システムを構築し、非可食性バイオマスの全主成分から発酵生産が可能な宿主微生物の開発を目指した。しかしながら、*U. thermosphaericus* の有するリグニン分解活性が低いため、システムの開発を断念せざるを得なかった。一方で、新たにスクリーニングを実施し、新属新種細菌 *O. oligotrophica* CCA6 株を分離した。*O. oligotrophica* CCA6 株は、栄養要求性が低く、また栄養条件下では大腸菌と同様の優れた増殖能を示した。これらのことから、*O. oligotrophica* CCA6 株は、食品残渣や廃糖蜜等の有効利用が進んでいない非可食性バイオマスから機能性化学品を発酵生産する宿主微生物としての利用が期待できる。

化学研究部門・研究員

研究者番号：10738024

#### <引用文献>

Islam ZU, Zhisheng Y, Hassan el B, Dongdong C, Hongxun Z, Microbial conversion of pyrolytic products to biofuels: a novel and sustainable approach toward second-generation biofuels. *J Ind Microbiol Biotechnol* 42, 2015, 1557 - 1579

Ahmad M, Taylor CR, Pink D, Burton K, Eastwood D, Bending GD, Bugg TD, Development of novel assays for lignin degradation: comparative analysis of bacterial and fungal lignin degraders. *Mol Biosyst* 6, 2010, 815 - 821

古畑 勝則、福山 正文、大仲 賢二、病院内水道水における貧栄養細菌の生息状況、麻布大学雑誌、15・16、2007、243-247

#### 5 . 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計1件)

Akita H, Kimura Z, Matsushika A, Complete genome sequence of *Ureibacillus thermosphaericus* A1, a thermophilic bacillus isolated from compost, *Genome Announc*, 5(38), 2017, e00910-17, DOI: 10.1128/genomeA.00910-17.

##### 〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：新規微生物

発明者：秋田 紘長、木村善一郎、星野保

権利者：産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願 2017-142847

出願年月日：平成29年7月24日

国内外の別：国内

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

秋田 紘長 (AKITA Hironaga)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・機能