

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K04853

研究課題名（和文）エネルギー代謝変化による水素駆動型バイオリファイナリープラットフォームの創成

研究課題名（英文）Development of hydrogen-driven biorefinery platform by modification of energy metabolism

研究代表者

中島田 豊（Yutaka, Nakashimada）

広島大学・統合生命科学研究科（先）・教授

研究者番号：10281164

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、水素（H₂）とCO₂からエタノールを生成しうる遺伝子組換え高温エタノール生産候補株の代謝ボトルネックの探索、及びその解消策を検討した。遺伝子工学的検討および代謝工学的検討の結果、細胞内酸化還元バランスとATP生成量を考慮することによりエタノールの高効率生産菌の製作が可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化石資源利用は近代文明構築に欠かせない役割を担った一方、二酸化炭素（CO₂）などの温室効果ガス増加による地球温暖化を引き起こし、また将来的には化石資源の枯渇が懸念される。本研究から、H₂およびCO₂からのエタノール発酵の高効率生産には酸化還元バランスとATP生成量を考慮した育種戦略が必要であることがわかった。本成果は、エタノールなどの化成品原料物質の高効率発酵生産菌の開発に活用でき、CO₂のリサイクル技術開発の基盤技術として貢献できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we looked for metabolic bottlenecks of a genetically engineered thermophilic microorganism that may produce ethanol from hydrogen (H₂) and CO₂. As a result of genetic engineering studies and metabolic engineering studies, it was suggested that highly efficient ethanol-producing bacteria can be produced by considering the intracellular redox balance and the amount of ATP produced.

研究分野：生物化学工学

キーワード：水素 二酸化炭素 合成ガス エタノール 発酵 好熱性微生物 遺伝子組み換え カーボンリサイクル

1. 研究開始当初の背景

化石資源利用は近代文明構築に欠かせない役割を担った一方、二酸化炭素 (CO₂) などの温室効果ガス増加による地球温暖化を引き起こし、また将来的には化石資源の枯渇が懸念される。このため再生可能エネルギー利用への転換が推進され、代表研究者は中でも課題解決に向けバイオプロセスの利用を提案した。具体的には、再生可能エネルギーから生産可能な水素 (H₂) をエネルギーとして CO₂ を固定し酢酸を生成する好熱性ホモ酢酸菌 *Moorella thermoacetica* を利用することである。宿主として代謝工学を適用することにより H₂ と CO₂ を原料として多様な有用物質を生産可能になり、革新的バイオリファイナリープロセスを作り出すことができる可能性がある。代表研究者は、基盤技術として未発達であった *M. thermoacetica* の遺伝子組み換え技術を開発し、エタノール生合成遺伝子の導入に成功した。このように、実現可能性の実証に向け着実な整備が進んでいた。しかしながら、構築株は H₂ と CO₂ からエタノールを生産しなかったため、原因となる代謝ボトルネックの解消が必要と考えられた。

2. 研究の目的

H₂ 経路による多様な再生可能エネルギーを活用した CO₂ 固定型革新的バイオリファイナリープロセスの実現が最終目的である。この実現性の実証として第 1 に、生産ターゲットとして選択したエタノールが、構築した改変株により目的の H₂+CO₂ を基質として生成されることが必要とされる。しかし培養実験による検討ではエタノールの生産には至らなかった。本来生体内のエネルギーを維持するために生成する酢酸を、別の化合物に変えることはエネルギーの損失を招き、また還元度の異なる化合物を生成するにはより多くの電子を代謝経路に投入する必要がある。これら想定される代謝ボトルネックを本研究では明らかにし、解消することで H₂ と CO₂ からエタノールを生成させることを目的とする。

3. 研究の方法

エタノール生産株として構築した *aldh ΔpduL1ΔpduL2* 株および *aldhΔpduL2* 株を用いて以下の検討を行った。両者ともエタノール生合成遺伝子が導入されているが、前者は完全に酢酸生合成経路が破壊されておりエタノール生産性が高く、後者は酢酸経路を部分的に残しておりエタノールとともに酢酸を副生、ボトルネックの効果は低くなるようデザインされている。これらの株を用いて、代謝ボトルネックの解明および解消をするため以下のような方法を計画し研究を進めたが、研究の進捗により目的達成のためにとった方法は適宜追加しており、それについても述べる。目的の項目にも記載した通り、代謝ボトルネックとしては生体内エネルギーである ATP の不足と酸化還元バランスの崩れを主に想定して実験を計画した。

(1) 代謝ボトルネックの解明

両株を糖 (フルクトース)、H₂+CO₂、合成ガスを基質として培養を行い、増殖や代謝産物を解析することによりボトルネック解明の手掛かりとする。また、ボトルネックを絞り込むために細胞内の ATP プール量の測定やメタボローム解析により代謝中間体の網羅的な定量解析を行う。それぞれの基質からエタノールを生成する場合の代謝量論式を作成することでボトルネックを予測する。予測したボトルネックの検証のために嫌気呼吸系などの別経路から ATP を補填することや、意図的に還元力を消費させ増殖能や物質生産を評価することを試みる。

(2) 代謝ボトルネックの解消

ATP が不足する場合、H₂+CO₂ 代謝経路で ATP を必要とする反応が十分に進行しない可能性がある。ホモ酢酸菌では H₂+CO₂ 代謝経路として Wood-Ljungdahl pathway を用いているが、経路の中

で ATP を要するのは唯一ギ酸テトラヒドロ葉酸リガーゼ (*formate tetrahydrofolate ligase*, FTHFL) の反応である。低 ATP 条件下で代謝を進めるためには、FTHFL 酵素の過剰発現が有効であると考えられるため、過剰発現株の構築とその評価を試みる。

一方、ATP が絶対的に不足している場合、 H_2+CO_2 代謝系での ATP 生産強化や別経路での ATP 供給が必要とされる。この方策として、エネルギー源である H_2 から ATP をより多く生成させるために内部ヒドロゲナーゼ HydABC を過剰発現し、*M. thermoacetica* においてイオン濃度勾配を利用した ATP 生成系の源となる還元型フェレドキシン (Fd^2) を余剰に生成させ ATP を増強することを試みる。また、糖をエネルギー源として用いることや、嫌気呼吸系により WLP 外からの ATP 供給を試みる。

酢酸に比べて還元度の高いエタノールを生成するため、酸化還元バランスが崩れている場合、十分な還元力を代謝経路に補填する必要がある。このためには、 H_2 からの還元力供給を増強するため、ヒドロゲナーゼの増強を行う。*M. thermoacetica* においては、HydABC 複合体が H_2 からの電子を NADH および Fd^2 の生成に用い、さらに NfnAB 複合体が NADH および Fd^2 を用いて NADPH を形成させる。このため、HydABC を過剰発現させることで H_2 利用を向上させる。また、還元バランスを整えるための別の方策として、異なる補因子間で電子を融通させることも検討する。例えば、フェレドキシン : NADH オキシドレダクターゼを外来好熱菌より導入、発現することが考えられる。

4. 研究成果

遺伝子組み換えによりアルデヒド脱水素酵素 Aldh を導入し構築したエタノール生産株 *aldhΔpduL2* 株、および *aldh ΔpduL1ΔpduL2* 株を用い、基質を糖 (フルクトース)、 H_2+CO_2 の 2 タイプで培養を行い増殖、エタノール生産性、および他の代謝物生産を詳細に比較、評価した。フルクトース培養ではいずれの場合も増殖の上エタノールを生産し、エタノール生産能の付与を確認した。しかし、 H_2+CO_2 培養では *aldh ΔpduL1ΔpduL2* 株の生産物はギ酸のみ、*aldhΔpduL2* 株はギ酸および酢酸を生産し、いずれもエタノールを生成しなかった。さらにいずれも全く増殖が見られなかった。

代謝物のなかでもボトルネック解明の糸口としてギ酸に注目した。ギ酸は H_2+CO_2 代謝の中間体であり、ATP を用いて次の反応が起こる。したがって、生体内での ATP 量低下がボトルネックの 1 つであることが強く示唆された。そこで、FTHFL の過剰発現株を作製しボトルネック解消を試みたが、改善は見られず ATP 不足以外にもボトルネックがあることが示唆された。

当初、これら 2 つの株の H_2+CO_2 培養菌体を用いて ATP 定量やメタボローム解析などを用いた生体内物質濃度の解析を計画していたが、増殖が全く起こらない細胞を用いた場合に正確な情報が得られない可能性が懸念されたため、複数の検討を組み合わせることで代謝ボトルネックの解明に取り組むこととした。

代謝量論計算を、糖、 H_2+CO_2 、合成ガスの 3 タイプで行い、増殖不能およびエタノール非生成の原因推定を行った。糖培養の場合、2 つの株はいずれも ATP 生産、酸化還元バランスに問題は発生しない計算になる一方、 H_2+CO_2 培養の場合、いずれも完全な ATP 不足と酸化還元バランス崩壊に陥り培養結果と一致した。合成ガス培養での代謝量論計算では、いずれの場合も ATP は不足しないが酸化還元バランスについては水素からの還元力供給が鍵となると考えられた。合成ガス培養を行うと、*aldh ΔpduL1ΔpduL2* 株は増殖せずエタノールを生成しない一方、*aldhΔpduL2* 株は増殖が回復しエタノール生成を行った。前者はエタノール生成能が高いために還元力が不足

しているが、後者はエタノール生成が抑えられ酢酸を生成するために還元力が必要量補われていると推測した。以上からボトルネックはATP不足と酸化還元バランスであると結論した。

ボトルネック解消の試みとして、嫌気呼吸系の利用可能性を検討した。培地に電子受容体としてジメチルスルホキシド(DMSO)を添加してNADHを介したATP生成によりATPを供給させることが可能となるが、NADHを消費するため酸化還元バランスには懸念がある。増殖とエタノール生成が見られたaldh Δ pduL2株の合成ガス培養にDMSOを添加してその効果を検討すると、増殖能が著しく上昇したのに対してエタノールは著しく減少し、主要な代謝産物は酢酸であった。この結果は、ATP生産増強がなされた一方、還元力が嫌気呼吸に主に用いられエタノール生産には供給できなくなったことを示唆しており、嫌気呼吸利用は同様にH₂+CO₂からのエタノール生産には利用できないと結論した。

ATP増強と同時に酸化還元バランスを整える方策として、内生のヒドロゲナーゼHydABCを過剰発現する試みを行った。aldh Δ pduL1 Δ pduL2株に恒常性の強いプロモーターであるG3PDプロモーターにHydABCをコードする遺伝子オペロンをつなぎ導入を試みたが、株の取得成功には至らなかった。遺伝子組み換え技術の難度が高いこと、目的株は細胞内生理状態が劇的に変わっており生育に著しい影響があったこと、などが原因として考えられ、今後より一層の遺伝子組み換えツールの整備および細胞内生理の解析が課題として挙げられた。また、酸化還元バランスを整える方策として計画していた、フェレドキシン:NADHオキシドレダクターゼなどの導入による異なる補因子間での還元力融通については、ATP不足が解決しない状態ではその効果の評価、およびエタノール生産回復は困難と考えられた。ATP生産性の回復が、aldh Δ pduL1 Δ pduL2株のH₂+CO₂培養でのエタノール生産にはまず必要である。

エタノールを高生産するaldh Δ pduL1 Δ pduL2株は上記の通り糖培養では増殖しエタノールを生産し、量論計算からもATP不足は生じず酸化還元バランスは合う。しかし本来ならCO₂固定に用いられる還元力を還元度の高いエタノール生産に充てており、そのためCO₂を発生する代謝系になっている。そこで、代謝ボトルネックを発生させずCO₂固定によるエタノール生産性を向上させる方策として、糖培養にH₂を添加する検討を試みた。十分なH₂添加量を検討するため、培養容器内のH₂分圧を0から0.08MPaまで変え培養実験を行った。その結果、H₂の添加0.04MPaまででH₂量依存的にフルクトース1モルあたりのエタノールの生産性は確かに向上し、CO₂固定が上昇したことを強く示唆していた(図1)。実際、培養中のCO₂濃度を測定すると、H₂添加時にはCO₂濃度の低下が見られた(図2)。このように、糖培養とH₂の利用を組み合わせることはCO₂からの物質生産に利用でき、ハイブリッド型発酵生産に資する成果と考えられる。

しかしながら課題も見出された。CO₂固定を一層向上させるためH₂添加量を増やすと、細胞増殖が阻害されエタノール生産性も低下した(図1および図3)。ATP供給は糖代謝により担保されているため、ボトルネックとして酸化還元バランスの崩れが考えられた。H₂の供給過剰はHydABCによるNADHとFd²⁻の生成過多を発生させていることが1つの可能性として考えられた。このため、DMSOを添加して過剰に生成したNADHを消化させる検討を行うと、増殖は回復した。以上から、酸化還元バランスを整えることの重要性があらためて確認され、ホモ酢酸菌によるH₂をエネルギー源とした有用物質生産株構築のためには、細胞内酸化還元バランスを適正に保つような代謝デザインが重要であることがわかった。

本研究で得られた知見を活用することで、カーボンリサイクルに資するバイオプロセス構築に向けた菌株育種が加速することが大いに期待される。

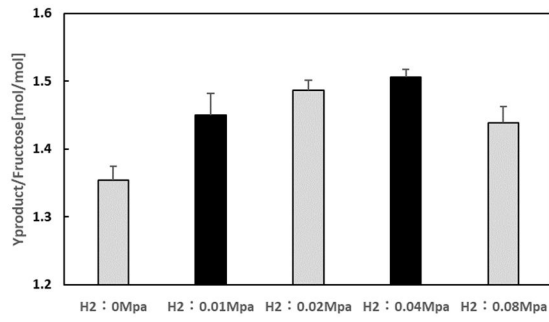


図1 H₂添加に応じたエタノール収率の変化

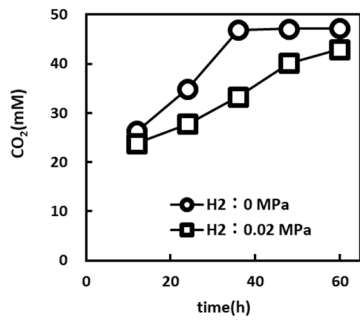


図2 H₂添加によるCO₂濃度の変化

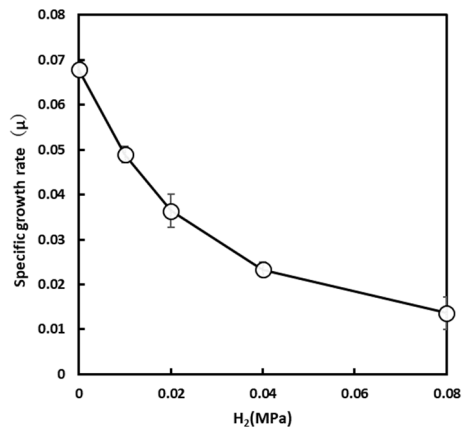


図3 H₂添加に応じた比増殖速度の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Rahayu Farida, Tajima Takahisa, Kato Junichi, Kato Setsu, Nakashimada Yutaka	4. 巻 129
2. 論文標題 Ethanol yield and sugar usability in thermophilic ethanol production from lignocellulose hydrolysate by genetically engineered <i>Moorella thermoacetica</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 160 ~ 164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2019.08.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林駿介、加藤淳也、竹村海生、加藤節、青井議輝、和田圭介、松鹿昭則、村上克治、中島田豊
2. 発表標題 好熱性ホモ酢酸菌 <i>Moorella thermoacetica</i> の エタノール生産株における H ₂ による増殖阻害の機構解明
3. 学会等名 化学工学会 第51回秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹村海生、吉田嵩一郎、岩崎裕樹、喜多晃久、加藤節、青井議輝、中島田豊
2. 発表標題 好熱性ホモ酢酸菌 <i>Moorella thermoacetica</i> 代謝改変株を用いたガス基質からのエタノール生産
3. 学会等名 第 14 回バイオマス科学会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹村 海生 , 岩崎 裕樹, 喜多 晃久, 中島田 豊
2. 発表標題 好熱性ホモ酢酸 <i>Moorella thermoacetica</i> 代謝改変株によるエタノール生産
3. 学会等名 日本生物工学会 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------