

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19580090
 研究課題名 (和文) バイオエタノール発酵細菌のトランスクリプトーム解析とセルロース利用への育種
 研究課題名 (英文) Metabolic engineering of ethanologenic bacteria based on transcriptome analysis
 研究代表者
 築瀬 英司 (YANASE HIDESHI)
 鳥取大学・工学研究科・教授
 研究者番号：20158033

研究成果の概要 (和文)：

世界に先駆けて、セルロースから直接バイオエタノールを生産できる遺伝子組換え発酵細菌を開発するために、セルロース系バイオエタノール生産のキーとなる遺伝子群の解析を実施した。まず、我が国独自の発酵細菌である *Zymobacter palmae* の全ゲノムを完全解読し、そのゲノム情報に基づき作製した DNA マイクロアレイを用いてエタノール発酵時に発現する遺伝子群の挙動を詳細に解析した。その結果、高効率なエタノール生合成代謝のキー遺伝子群、糖質の細胞内取り込みに働くキー遺伝子群、およびストレスに応答遺伝子群を初めて明らかにした。

研究成果の概要 (英文)

The purpose of this study is the development of genetically engineered ethanologenic bacteria, *Zymobacter* and *Zymomonas* strains, capable of producing bioethanol from lignocellulosic biomass directly. We have been clarifying the important genes taking part in an efficient production of bioethanol in these bacteria. First of all, the whole genome sequences of the strains were analyzed completely, and then the DNA microarray was constructed based on our genome information. By the DNA microarray analyses of recombinant strains during ethanol fermentation, we have found several important genes functioning in the ethanol production and in sugar transport.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：代謝工学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：バイオマスエネルギー、微生物遺伝学、代謝工学

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化ガス削減を可能にするために、未利用リグノセルロース系バイオマス資源からバイオエタノールを高効率で生産する研究が国際的にクローズアップされている。これまで、エタノール発酵は伝統的な醸造に基礎をもち、学術的には確立されていると理解されてきた。しかし、自然界にはリグノセルロースから直接、バイオエタノールを効率よく発酵生産する微生物の報告例は無く、従来の発酵菌を凌駕する新規なリグノセルロース糖化並行発酵性菌のメタボリック・エンジニアリングが国の内外の多く研究者の関心を集めるようになった。

Zymobacter palmae は、1995年に沖縄の椰子汁発酵液から分離した新種のエタノール発酵細菌である。本研究では、*Zb. palmae* に対して集中的に育種を加えることにより、リグノセルロース連続糖化並行発酵性を付与するための研究を世界に先駆けて実施してきた（図1参照）。これまでに、*Zb. palmae* の宿主・ベクター系を独自に開発し、セロオリゴ糖糖化発酵性やヘミセルロースに由来するキシロース発酵性の付与に成功している。

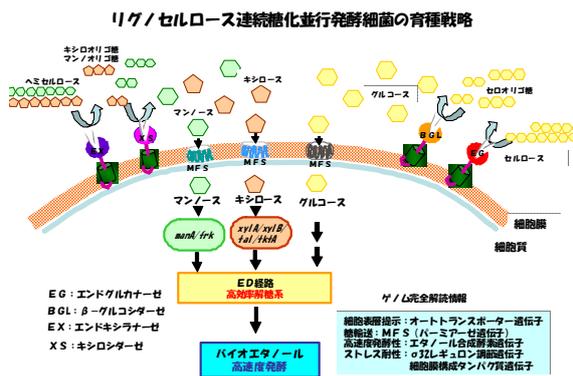


図1 リグノセルロース糖化並行発酵性の付与

2. 研究の目的

本研究では、新規エタノール発酵細菌である *Zb. palmae* のエタノール発酵条件下における糖輸送、糖代謝、エネルギー代謝、およびストレス応答に対して密接に関連する遺

伝子群とその発現制御の全容を解明し、特定した遺伝子群の調和のとれた発現制御を可能にする。すなわち、育種研究においては、対象とする菌株の遺伝子情報量が律速となることに着目し、1) *Zb. palmae* の全ゲノムの完全解読、2) ゲノム情報を利用したカスタムDNAチップの構築とマイクロアレイ解析条件の設定、3) エタノール生合成経路の予測とキー酵素遺伝子の予測、4) 高効率発酵のためのストレス応答遺伝子群の解析を検討した。

3. 研究の方法

1) 全ゲノム解読

Zb. palmae 細胞からゲノムDNAを抽出した後、物理的剪断を加えて、約2kbp断片に切断した。次に、切断片をpUC118に挿入して大腸菌内でゲノムライブラリーを作製し、挿入断片の塩基配列を解析した。

2) マイクロアレイ解析

カスタムDNAマイクロアレイは、ゲノム情報から推定した約2400遺伝子に対応する60baseのプロンプDNAを合成して、スライドガラス上にスポットして作製した。

4. 研究成果

1) 全ゲノム解読

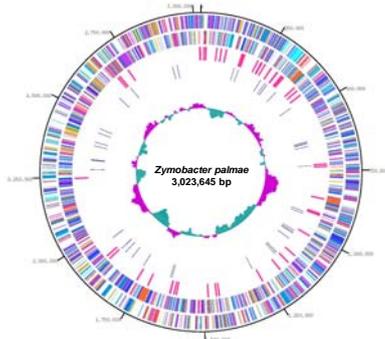
大腸菌ライブラリーの約45000クローンのショットガンシーケンシングを行いドラフトシーケンシングを決定した。得られたドラフトシーケンシングをもとに、オプティカルマッピング、プライマーウオーク、コスミドライブラリー解析を行い、さらにコンティグ間のギャップクローズを行って、ゲノムの完全解読に成功した。その結果、ゲノムサイズは、3023645 bpで、2247のORFがコードされており、エタノール生合成系に関するエネルギー代謝、糖質輸送と解糖代謝が、また、機能未知遺伝子、固有遺伝子を推定した（図2参照）。

2) エタノール生合成経路の予測とキー酵素遺伝子の予測

アノテーション結果を基に、*Zb. palmae* の大凡の代謝経路を推定することが可能になった。*Zb. palmae* では、グルコースは酵母に報告されている一般的な解糖経路であるEMPを経ることなく、*Pseudomonas* 等の酸化

的な菌株に存在する Entner-Doudoroff 経路により代謝されると推定した。そのために、ATP 生成量は EMP 経路に比べて 1/2 になることで、グルコースは菌体生成に利用されず、理論収率に近いエタノール生成が可能となる。一方、キシロースやマンノースの代謝に関する赤の波線で示した酵素系が欠損していることで、キシロースやマンノースの発酵を示さないことを明らかにした (図 3 参照)。

Zymobacter palmae の全ゲノム地図



最も外側の円：プラスストランドORFs, 2番目の円：マイナスストランドORFs, 3番目の円：rRNA, 4番目の円：tRNA, 内側の円：GC含量

図 2 Zb. palmae のゲノムマップ

ザイモバクターのエタノール生成経路

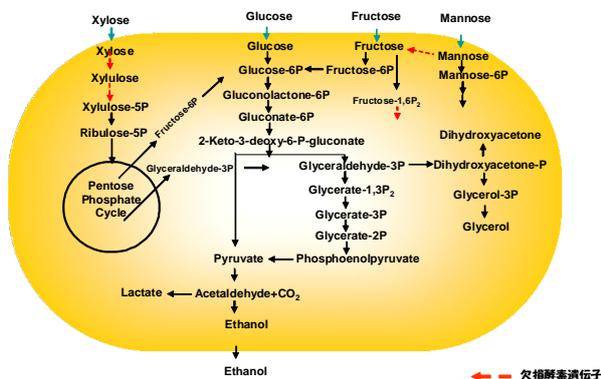


図 3 推定エタノール生成経路

3) ストレス耐性応答遺伝子群のマイクロアレイ解析

バイオエタノール生産には、更なる省エネルギー化および低コスト化が必要とされている。エタノール発酵の効率化を図るための課題としては、高温発酵性、酸性下発酵性、高濃度エタノール発酵性、リグニン耐性などをクリアする事であり、これらストレス耐性を向上させることによりシステム維持費のコストダウンが可能になる。そこで、Zb. palmae のストレス耐性向上を目標として、ストレス条件下での Zb. palmae の挙動と発現する遺伝子群を解析し、ゲノム解析から得られた情報をもとに作成した DNA マイクロアレイ

によりストレス耐性を獲得する機構を検討した。

先ず、紫外線誘発突然変異、化学薬剤誘発突然変異、および馴養を組み合わせることで高温発酵性、高濃度エタノール耐性、高濃度酢酸耐性、酸耐性を獲得した Zb. palmae を取得した (図 4 参照)。変異処理により、ある一定の耐性の獲得は可能であるが、その耐性が不安定で、すぐにリバースする現象が観察された。そこで、ストレス耐性の獲得機構を解明して、安定な耐性菌を育種するために、様々なストレスに応答して発現する遺伝子群の網羅的な発現解析を検討した。

取得したストレス耐性株

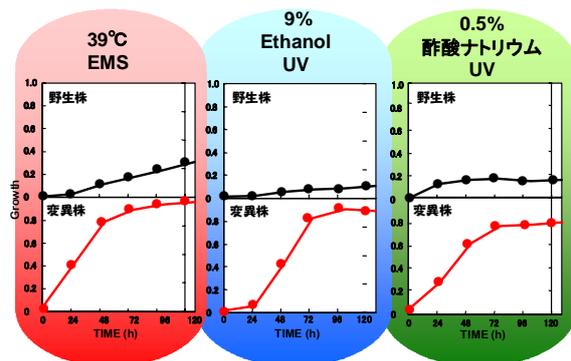


図 4 高温耐性、高濃度エタノール耐性、酢酸耐性を取得した Zb. palmae

その結果、高温ストレスでは DNA 合成やタンパク質合成系の遺伝子群の発現が増加することが明らかになった。高濃度エタノールストレスでは、細胞膜やその構成成分である脂質の合成系遺伝子の増加が、酸ストレスでは物質の取り込み系遺伝子の増加が観察された (表 1 参照)。今後は、より詳細なストレス応答遺伝子群の発現挙動解析とキー遺伝子の特定が課題となる。

ストレス応答遺伝子群の発現挙動

Pathway	Numbers of stress-inducible genes								
	High temp.			High EtOH			High Acetate		
	Up	Down	N.C.	Up	Down	N.C.	Up	Down	N.C.
DNA polymerase	3	1	5	2	4	3	0	1	5
Ribosome	17	0	18	2	0	33	0	0	35
Purine metabolism	18	15	50	11	13	60	7	20	48
Pyrimidine metabolism	14	2	32	6	6	34	4	7	36
LippSacch. Biosynthesis	7	1	14	3	2	17	2	9	12
Inositol-P metabolism	3	0	1	5	0	1	0	0	4
Flagella assembly	1	6	24	5	3	23	0	3	29
ABC transporter	12	22	62	7	23	67	14	21	62
Starch/sucrose metab.	1	2	7	2	0	8	5	0	5

Up: 発現増加
Down: 発現低下
N.C.: 変化なし

表 1 ストレス応答遺伝子群の発現挙動解析

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ①築瀬英司、セルロース系バイオエタノール高速発酵細菌のメタボリックエンジニアリング、JARUS、査読有、No. 4、2010、24-30
- ②Matsushita, I., and Yanase, H., The Genomic Structure of Thermus Bacteriophage IN93, J. Biochem., 査読有 146(6), 2009, 775-785
- ③Matsushita, I., and Yanase, H., A Nobel Insertion Sequence Transposed to Thermophilic Bacteriophage IN93, J. Biochem., 査読有, 146(6), 2009, 797-803.
- ④孫孝政、山名伸樹、築瀬英司、スイートソルガムの搾汁に関する研究、農業機械学会誌、査読有、71(4), 2009, 69-73
- ⑤Matsushita, I., and Yanase, H., A novel thermophilic lysozyme from bacteriophage IN93, Biochem. Biophys. Res. Com., 査読有, 377, 2009, 89-92
- ⑥Oka, K., Matsumoto, N., and Yanase, H., Decrease in hydrogen sulfide content during the final stage of beer fermentation due to involvement of yeast and not carbon dioxide gas purging, J. Biosci. Bioeng., 査読有, 106, 2008, 253-258
- ⑦Yanase, H., and Okamoto, K., Genetic engineering of *Zymobacter palmae* for production of ethanol from xylose, Appl. Environ. Microbiol., 査読有, 73, 2007, 2592-2599
- ⑧Yanase, H., Stabilized production of highly concentrated bioethanol from fermentation broths by *Zymomonas mobilis* by pervaporation using silicone rubber-coated silicalite membrane, J. Chem. Technol. Biotechnol., 査読有, 82, 2007, 745-751

[学会発表] (計 20 件)

- ①築瀬英司、ゲノム情報に基づく木質バイオエタノール高速発酵細菌のメタボリックエンジニアリング、生化学会中四国支部大会シンポジウム、2005年5月15日、鳥取市
- ②奥田洋、幡部賢、岡本賢治、築瀬英司、*Zymomonas mobilis*におけるセロオリゴ糖・糖化発酵代謝の改変、生化学会中四国支部大会、2005年5月15日、鳥取市

- ③小島基、岡本賢治、築瀬英司、リグノセルロース糖化並行発酵細菌の代謝工学的育種、日本バイオマス科学会議、2010年1月20日、東京都文京区

- ④Watanabe, T. and Yanase, H., Bioethanol production process from woody biomass using fungal and microwave irradiation pretreatments and genetically engineered bacteria, SIM Annual Meeting & Exhibition(招待講演)、2009年7月28日、カナダ
他16件

[図書] (計 4 件)

- ①築瀬英司、産業用酵素の応用技術と最新動向(監修:井上國世)、「多機能転移酵素による新規配糖体の合成」、2009、P308-319、シーエムシー出版
- ②渡辺隆司、築瀬英司、次世代バイオエタノール生産の技術革新と事業展開(監修:鮫島正浩)「担子菌・マイクロ波照射前処理と高速発酵細菌を用いる高効率バイオエタノール生産システム」、2009、p.287-294、フロンティア出版
- ③築瀬英司、バイオリファイナー技術の工業最前線(監修:湯川英明)「ザイモナス菌によるエタノール発酵」、2008、p246-262、シーエムシー出版
- ④築瀬英司、バイオ液体燃料(監修:鮫島正浩)、「木質系バイオマスからの高速度バイオエタノール製造技術」、2007、115-125、エヌ・ティー・エス

[産業財産権]

○出願状況(計 3 件)

- ①名称:グルコース・マンノース・キシロース並行発酵細菌およびそれを用いるバイオエタノールの製造方法

発明者:築瀬英司、岡本賢治

権利者:鳥取大学

種類:

番号:PCT/JP2008/068073

出願年月日:2008年3月10日

国内外の別:国外

- ②名称:木質系および草本系バイオマス糖化液からのバイオエタノール並行発酵菌

発明者:築瀬英司、岡本賢治

権利者:鳥取大学

種類:

番号:PCT/JP2008/073448

出願年月日:2008年12月24日

国内外の別:国外

- ③名称:グルコース・マンノース・キシロース並行発酵性菌およびそれを用いるバイオエタノールの製造技術

発明者：築瀬英司、岡本賢治
権利者：鳥取大学
種類：
番号：P214020
出願年月日：2007年10月5日
国内外の別：国内

○取得状況（計1件）

①名称：グルコース・マンノース・キシ
ロース並行発酵細菌およびそれ
を用いるバイオエタノールの製
造方法

発明者：築瀬英司、岡本賢治
権利者：鳥取大学
種類：
番号：4124270
取得年月日：2008年5月16日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

築瀬 英司 (YANASE HIDESHI)
鳥取大学・工学研究科・教授
研究者番号：20158033

(2) 研究分担者

岡本 賢治 (OKAMOTO KENJI)
鳥取大学・工学研究科・准教授
研究者番号：80283969