

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月16日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580084

研究課題名（和文） 包括的高感度遺伝子発現プロファイリングに基づく高効率エタノール発酵細菌の育種

研究課題名（英文） Pathway engineering of ethanologenic bacteria based on HiCEP (High Coverage Expression Profiling) analysis

研究代表者

築瀬 英司（YANASE HIDESHI）

鳥取大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：20158033

研究成果の概要（和文）：石油代替輸送用液体燃料であるセルロース系バイオエタノールの発酵生産に最適な新規のエタノール発酵性細菌 (*Zymobacter palmae*) の発酵ストレス耐性強化を目的とした。HiCEPとDNAマイクロアレイの解析技術をもちいて、*Zb. palmae*細胞内でストレスに応答して発現する遺伝子群のプロファイリングを行い、ストレス耐性獲得に働く代謝経路を探索した。その結果、*Zb. palmae*にアミノ酸合成代謝系酵素群の活性発現を伴う酸性ストレス応答機構を初めて見いだした。

研究成果の概要（英文）：To improve the tolerance of *Zymobacter palmae* to various stress during cellulosic bioethanol fermentation, we have been engineering genetically a robust *Zb. palmae* based on the gene expression profiling responding to fermentation stress by HiCEP and DNA microarray analyses. We found the first mechanism acquiring the acid tolerance depended on the amino acid biosynthetic pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012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：農学

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（コーンストローバ、サトウキビバガス、稲わら、廃木材、林地残材、間伐材など）から石油に代替できる輸送用液体燃料として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セル

ロースから直接エタノールを生産できるリグノセルロース糖化並行発酵性菌の開発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、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* のゲノム DNA の完全解読を終了し、得られたゲノム情報に基づいて糖代謝とエタノール生合成経路を予測して育種改良のためのターゲットを特定し、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賦与に成功しており、実証レベルでのセルロース系バイオエタノール製造プロセスに使用されている。

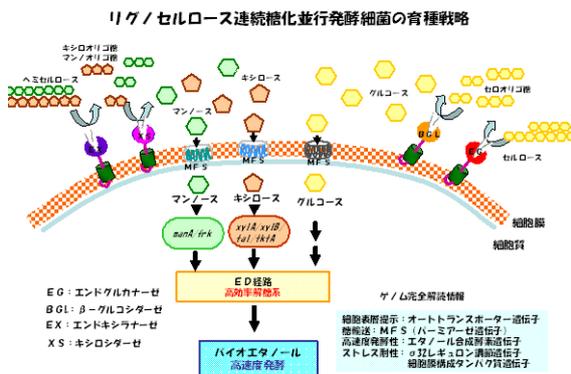


図1 リグノセルロース糖化並行発酵性の付与

2. 研究の目的

リグノセルロース糖化並行発酵菌に求められる能力としては、セルロース系バイオマスの主要な構成糖であるグルコース、キシロース、マンノースの全ての糖成分をエタノールに変換できる同時並行発酵性に加え、発酵速度の低下の原因となる様々な発酵ストレス(発酵温度上昇、高濃度エタノール蓄積、酢酸副生、酸性低下等)に対する耐性を強化して高速発酵を可能にすることが重要な課題である。

本研究では、HiCEP (High Coverage Expression Profiling) 解析と DNA マイクロアレイ解析を組み合わせることにより、*Zb. palmae* 細胞内でストレスに応答して発現する遺伝子群を特定し、ストレス耐性獲得にキーとなる遺伝子を発現強化することにより高速発酵を可能にすることを目的とした。

3. 研究方法

(1) HiCEP 解析: ストレス負荷細胞から抽出した mRNA を cDNA に変換して制限酵素切断し、得られた切断片ライブラリーにアダプター配列を付加して PCR にて DNA を増幅後、高解像度の電気泳動で展開、蛍光検出により mRNA 発現レベ

ルを網羅的に解析する。発現遺伝子のプロファイリングにより、ストレスに応答して発現する遺伝子の特定を行った。

(2) DNA マイクロアレイ解析: ストレス負荷細胞から抽出した total RNA から蛍光標識 cDNA を増幅し、ゲノム情報に基づいて作製したカスタム DNA チップにハイブリダイズ後、チップ上の蛍光をスキャナーで読み取った。発現遺伝子のプロファイリングにより、ストレスに応答して発現する遺伝子を特定した。

4. 研究成果

(1) *Zb. palmae* のストレスに対する挙動解析と耐性株の取得

まず、発酵工程で想定される様々なストレス、特に温度、エタノール濃度、およびリグノセルロース系バイオマスの前処理糖化工程でヘミセルロースやリグニンから副生する発酵阻害物質である酢酸やフルフラールに対する挙動を検討した。その結果、野生株や組換え株の生育限界は発酵温度が 37°C、エタノール濃度は 7%、酢酸濃度は 0.2%、フルフラールが 0.1%であった。特に酢酸耐性は発酵用酵母よりも優れた耐性を示した。さらに、ストレス耐性獲得に対する馴養の有効性を検討したところ、39°C、9%エタノール存在下、0.5%酢酸存在下で生育する耐性株の取得が可能で、ストレスに応答する機構の存在が示唆された。

(2) HiCEP によるストレス応答挙動解析

Zb. palmae などの原核細胞を対象とした HiCEP 解析の事例はない。そこで、原核細胞での HiCEP 解析条件の設定から開始した。ストレス負荷細胞から抽出した total RNA からの rRNA 除去条件と mRNA 回収条件、回収した mRNA を鋳型とした cDNA 増幅条件と増幅 cDNA 断片化のための制限酵素最適化を行った。さらに、断片へのアダプター付加に最適な塩基配列を検討して、HiCEP 解析条件を設定した。

HiCEP を用いて、*Zb. palmae* の酸ストレスに応答して発現する遺伝子群を解析した。発現上昇が観察された DNA 断片を抽出して、その塩基配列解析結果を完全解読したゲノム DNA 情報に検索して、特徴的な 5 種の遺伝子 (CR000247, CR000569, CR000721, CR000291, CR000881) を特定した。現在、これら遺伝子の機能を解析している。

(3) DNA マイクロアレイによるストレス応答挙動解析

HiCEP の解析条件最適化検討と併行して、代表的なトランスクリプトーム解析技術である DNA マイクロアレイ解析を併行して行った。ストレス条件下における発現遺伝子の網羅的な解析をするため、取得したストレス耐性菌株に加え、高温、エタノール存在下、酢酸存在下、さらに酸性条

件下で継時的にストレスを与えた野生株から total RNA を調製し、*Zb. palmae* の全ゲノム情報をもとに作製した DNA チップを用いて遺伝子発現解析を行った。

解析結果より、酸性条件下でのストレス負荷菌体において、グルタミン酸代謝経路上の遺伝子が多く発現上昇していることが明らかになった(表1参照)。その中でも、大腸菌の酸耐性関連遺伝子として報告されている *gadB* 遺伝子ホモログは *Zb. palmae* において pH 6.0 のインキュベーションや pH 4.5 培養では発現量は変化せず、pH 3.5 の酸ストレスで発現が上昇したことから、*gadB* 遺伝子は *Zb. palmae* において酸耐性の獲得に重要な働きをする遺伝子であることが示唆された。大腸菌の酸耐性については、病原性大腸菌 O157 が酸耐性を獲得することから解析が進んでいる。酸耐性 (AR) システムには、4種類が報告されている。AR1はストレス応答 σ 因子の発現により細胞内酸化が抑制される機構で、発現した σ 因子はアミノ酸代謝が関与する AR2,3,4 の促進にも関与するとされている。AR2は、グルタミン酸の脱炭酸反応、AR3はアルギニンの脱炭酸反応、AR4はリジンの脱炭酸反応が関与する。AR2では、酸ストレスにより *gadA*, *gadB* がコードするグルタミン酸脱炭酸酵素が活性化され、細胞内グルタミン酸を γ -アミノ酪酸 (GABA) へと脱炭酸し、生成した GABA が細胞外に輸送されるとともに、グルタミン酸が取り込まれる。グルタミン酸の細胞内取り込みには *gadC* がコードするアンチポーターが関与し、細胞内のプロトンを排出して細胞内プロトン濃度を低く設定するようになり、酸耐性を獲得する。AR3も同様に、アルギニンがアグマチンに脱炭酸されて、細胞外に排出される。AR4についても脱炭酸反応とリンクしたプロトン・アンチポーターの関与が推定されている。*Zb. palmae* での酸ストレス下に発現する *gadB* 遺伝子の結果から、大腸菌と類似の酸ストレス耐性機構が存在すると考察した。

表1 *Zb. palmae* における酸ストレス応答遺伝子群のマイクロアレイ解析

関連代謝	ストレス応答遺伝子数									
	野生株 (pH6.0)		pH 6.0 0分		pH 6.0 30分		pH 3.5 0分		pH 3.5 30分	
	増加	減少	増加	減少	増加	減少	増加	減少	増加	減少
ステロイド合成系	7	0	2	0	2	0	1	0	2	0
硫黄原子代謝系	0	0	1	0	6	0	0	0	5	1
脂肪酸合成系	4	3	0	0	5	0	1	0	4	0
プリン代謝系	16	1	6	1	3	2	6	0	21	0
ピリミジン代謝系	12	0	3	0	4	3	7	0	23	0
グルタミン酸代謝系	8	1	1	1	6	0	0	0	10	1
輸送系	51	3	4	1	12	1	5	0	24	2

(4) *Zb. palmae* への酸耐性関連遺伝子の導入
*Zb. palmae*の酸耐性の向上を目指し、大腸菌で報告されている *gadB* 遺伝子を含む酸耐性関

連遺伝子を調節する *rpoS* 遺伝子(ストレス応答シグマ因子 σ^S)の *Zb. palmae* への導入を行った。

Zb. palmae のゲノム DNA から大腸菌 *rpoS* ホモログをクローニングした *rpoS* を *Zm. mobilis* 由来の高発現プロモーターであるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター (Pgap) の制御下に挿入して組換えプラスミドを構築した。また、大腸菌由来 RpoS 遺伝子も同様にクローン化した。大腸菌 *rpoS* と *Zymobacter rpoS* を *Zb. palmae* へ形質転換により導入し、pH 3.0~6.0 に調製した培地で生育を測定した。

酸性条件下での *rpoS* 導入株の生育を観察した結果、大腸菌 *rpoS* 導入株では酸性条件下での著しい生育促進が観察された。一方、*Zb. palmae* のゲノム情報に対して BLAST 検索により相同性が認められた *rpoS* 導入株では顕著な生育促進は観察されなかったことから、再度、*in silico* での *rpoS* ホモログ遺伝子の検索を行っている。大腸菌 *rpoS* 導入が *Zb. palmae* の酸耐性獲得に有効であることが示されたことから、現在、大腸菌由来 *rpoS* の導入により、グルタミン酸代謝系および周辺代謝系に關与する遺伝子群の発現挙動を検討している(図2参照)。

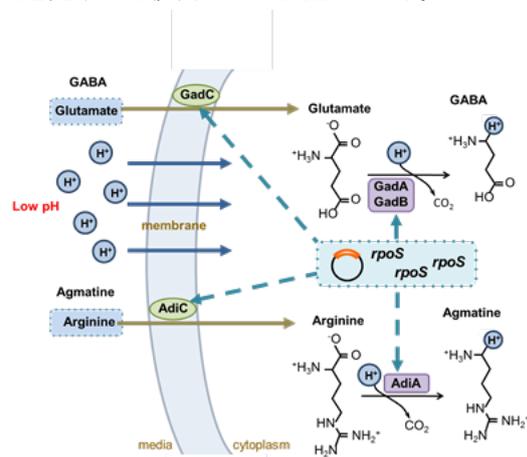


図2 推定酸耐性獲得機構

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

- ① Kojima, M., Okamoto, K., and Yanase, H.; Direct ethanol production from cellulosic materials by *Zymobacter palmae* carrying *Cellulomonas* and *Ruminococcus* α -glucosidase, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, in press, DOI 10.1007/s00253-013-4874-1, 査読有り
- ② Kojima, M., Akahoshi, T., Okamoto, K., and Yanase, H.; Expression and surface display of *Cellulomonas* endoglucanase in the ethanologenic bacterium *Zymobacter palmae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 96, 1093-1104 (2012), 査読有り
- ③ Yanase, H., Miyawaki, H., Sakurai, M.,

Kawakami, A., Matsumoto, M., Haga, K., Kojima, M., and Okamoto, K.; Ethanol production from wood hydrolysate using genetically engineered *Zymomonas mobilis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 94, 1667-1678 (2012), 査読有り

- ④ Matsushita I., and Yanase H., Characterization of the protein gpl from bacteriophage Φ N93. *Bio logical Lett.* 48(1), 47-56 (2011), 査読有り

他3件

[学会発表] (計29件)

- ① 滝上、近藤、奥田、岡本、原田、築瀬; C5・C6糖並行発酵性 *Zymobacter palmae* のキシロース発酵性強化、第64回日本生物工学会大会、2012/10/26、神戸国際会議場
- ② 伊原、高橋、杉岡、岡本、原田、築瀬; ラッカーゼ処理によるリグニン過分解物発酵阻害の低減効果、第64回日本生物工学会大会、2012/10/26、神戸国際会議場
- ③ 小島、幡部、玉井、岡本、原田、築瀬; *Cellvibrio japonicus* 由来セルラーゼ遺伝子のクローニングと発酵細菌内での分泌発現、第64回日本生物工学会大会、2012/10/26、神戸国際会議場
- ④ 築瀬英司、バイオマスエネルギー技術の現状と将来、日本機械学会中国四国支部第114 講習会(招待講演)、2012 年、1 月 20 日、鳥取
- ⑤ Matsushita H, Yanase H., Daidai M, Sego H, Yasutani N, Habu K, Kikuta H, Yasue Y, Watanabe T. Ethanol production from pretreated eucalyptus wood chips by simultaneous saccharification and fermentation RAFT(Recent Advances in Fermentation Technology) 2011 年, 11 月 8 日, 米国
- ⑥ Yanase,H., Metabolic engineering of ethanologenic bacteria capable of producing cellulosic bioethanol. International Union of Microbiological Soceities 2011 Congress(招待講演) 2011 年, 9 月 9 日, 札幌

他23件

[産業財産権]

○取得状況(計2件)

名称:マンノース発酵性ザイモバクター属形質転換微生物

発明者:築瀬英司、岡本賢治

権利者:国立大学法人鳥取大学

種類:

番号:特許第 4686709 号

取得年月日:2011 年 2 月 25 日

国内外の別:国内

名称:染色体組み込みマンノース発酵性ザイモ

モナス属細菌

発明者:

権利者:国立大学法人鳥取大学

種類:築瀬英司、岡本賢治

番号:特許第 4528972 号

取得年月日:2010 年 6 月 18 日

国内外の別:国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

築瀬 英司(YANASE HIDESHI)

鳥取大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号:20158033