

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25701017

研究課題名(和文) Clostridium属細菌を用いた未利用バイオマスからのブタノール生産系の開発

研究課題名(英文) The development of biobutanol system from plant biomass using Clostridium species

研究代表者

中山 俊一 (Nakayama, Shunichi)

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：90508243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,100,000円

研究成果の概要(和文)：稲わら等の植物バイオマスからの高効率ブタノール生産系の開発を目的とし、より高温域でブタノール生産が行えるよう Clostridium saccharoperbutylacetonicum の熱感受性機構の解明、耐熱性ブタノール生産菌への育種、育種株を用いた培養条件の検討を行った。熱感受性機構は細胞内のATP量の低下や孢子形成によることを明らかとした。また、より高温域でブタノール発酵可能な変異株を取得しその特性を解明した。

研究成果の概要(英文)：This study revealed that adenine addition enhances butanol production in Clostridium saccharoperbutylacetonicum cultivated at 37 °C. When strain N1-4 cultivated at 37 °C with the addition of adenine, the intracellular ATP level was improved. In addition, although strain N1-4 cultivated at 37 °C without the addition of adenine sporulated since 6 hours, spore formation was inhibited until 24 hours with the addition of adenine at even 37 °C. We isolated heat resistant mutant RIFR91 using rifampicin as an inhibitor and analyzed characteristic of the strain.

研究分野：農芸化学・応用微生物学

キーワード：バイオブタノール Clostridium属細菌 耐熱性 メタボローム解析 孢子形成 育種

## 1. 研究開始当初の背景

嫌気性グラム陽性 *Clostridium* 属細菌によって生産されるバイオブタノールは、ガソリンと性質が類似しており石油代替バイオ燃料として、また各種化成品の出発原料として利用可能であり、循環型社会の形成に大きく貢献することが期待される。しかしながら、ブタノール生産菌はグルコース等の糖質からの生産は可能であるが、セルロースを分解するセルラーゼ活性を有さないため食料と競合しないセルロース系基質からは単独では生産できず、食料との競合が新たな問題として起こりうる。そのため、循環型社会形成のためセルロース等の非食料資源からの生産が求められていた。

これまでに、当研究室ではブタノール生産菌 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* と高温性セルロース分解菌 *Clostridium thermocellum* を混合培養することで結晶性セルロースを基質にしたブタノール生産を報告していた。

しかしながら、本培養系でのブタノール生産は糖化工程に時間を要しグルコースを炭素源とした場合よりも3倍発酵時間がかかること、実用的な稲わらを基質として用いる場合セルラーゼ活性の向上が必須なこと、高温性セルロース分解菌を用いており高温での培養を必要とするためコスト高・発酵プロセスが複雑化することが新たな解決すべき課題であった。

## 2. 研究の目的

セルラーゼ活性はより高温域で活性が高いことが知られているが、本研究で扱う高ブタノール生産菌は37℃で培養するとブタノール生産量が顕著に低下する。そこで、まずブタノール生産菌の熱感受性機構の解明とともに耐熱性を向上させる方法の開発を行った。また、変異処理を行うことで耐熱性が向上した変異株を取得した。さらには、この変異株を用いてスケールアップ時の最適な培養条件を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) ブタノール生産菌 N1-4 株の熱感受性機構の解明

ブタノール生産菌として *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* strain N1-4 (ATCC13564)(以下N1-4株)を用いた。N1-4株はTYA培地にて嫌氣的に培養した。メタボローム解析のための試料調製は、Human Metabolome Technologies社のプロトコールに従いCE-TOFMSによる解析を依頼した。発酵産物はAminex HPX-87Hカラムを用い液体クロマトグラフィーにて測定した。細胞内ATP量はBac Titer-glo Microbial cell viability Assay (Promega社)を用いて測定した。栄養細胞と胞子はSyto9とPropidium iodideで染色し蛍光位相差顕微鏡(Biozero BZ-8000; Keyence)により観察した。

### (2) 変異処理による耐熱性ブタノール生産菌への育種

耐熱性ブタノール生産変異株の取得には抗生物質リファンピシンに耐性を示す変異株の中から37℃での増殖能に優れた株を選別することで取得した。変異の導入には、UVクロスリンカー(UVP社)を用いた。

Xylanase 活性には xylan, xyloglucanase 活性にはタマリングム、endo-1,3-β-glucanase 活性にはβ-グルカンをそれぞれ基質として用い、遊離の還元糖量をDNS法にて測定した。1Uは1分間に1μmolのグルコースを生成する量として定義した。

### (3) 変異株を用いたスケールアップ時の最適培養条件の検討

セルロース分解菌として *Clostridium thermocellum* NBRC103400 (=ATCC 27405)を用い、NBRC979培地にて培養した。ジャーファーマンターはBME-01NC-M型(ABLE社)を使用した。

## 4. 研究成果

### (1) ブタノール生産菌 N1-4 株の熱感受性機構の解明

セルラーゼ活性は60℃のようなより高温域が酵素の至適温度であるものが多く、高温性セルロース分解菌による糖化工程とその後のブタノール生産菌N1-4株による30℃でブタノール発酵を行う混合培養系ではセルラーゼ活性は低い状態で並行副発酵をしている可能性が高い。そのため、ブタノール発酵時の培養温度を向上させることができれば、培養系のセルラーゼ活性を向上させることが可能となりブタノール生産速度が向上することが期待される。しかしながら、N1-4株は温度感受性が高く、グルコース40g/Lで単独培養を行った場合においても、30℃から37℃へ培養温度を上げると菌体量(OD<sub>600nm</sub>)は7.1から3.6へ低下し、ブタノール生産量も10.3g/Lから2.1g/Lへ低下する。この傾向は混合培養においても同様であった。このため、混合培養系の温度上昇にはN1-4株の熱耐性の獲得が必要とされるが、N1-4株の熱感受性機構は不明であった。37℃では生育能が低下することから、N1-4の37℃培養では代謝経路の一部の反応が停滞することによって代謝の流れが滞り、増殖やブタノール生産量の低下を引き起こしていると予想し、30℃または37℃で培養したN1-4のブタノール発酵初期、中期、後期で細胞内代謝物量を比較し、律速となる代謝経路を推定した。その結果、37℃培養においては解糖系をはじめとして、アミノ酸や核酸などの生育に必須となる一次代謝物の量がブタノール発酵初期から総じて低下していることが明らかになった。さらに、37℃培養時に不足しているこれら一次代謝物であるアミノ酸、核酸塩基、ピリジンヌクレオチドなどを培養液中へ添

加し N1-4 を 37°C で培養したところ、核酸 5 種類 (アデニン、グアニン、チミン、シトシンおよびウラシルそれぞれ 100 mg/L) を添加したものであるのみ菌体数とブタノール生産量が向上した。そこで添加した核酸塩基 5 種類の培養上清における残存量を測定したところ、アデニンのみが培養初期から急激に低下し、9 時間で完全に消費していた。そこで、添加した核酸塩基 5 種類から 1 種類ずつ核酸塩基を除いた 4 種の核酸塩基を添加し 37°C で培養をしたところ、アデニンを添加しなかったサンプルのみが無添加のサンプルと同等の低い生育量とブタノール生産量を示す一方、他の 4 種類を除いたサンプルは 5 種類を添加したサンプルと同様に高いブタノール生産量を示した。このことから、N1-4 株はアデニンの添加によって 37°C における熱耐性を獲得することが明らかになった。また、その熱耐性の付与は最大 39°C までであり、40°C 以上ではアデニン添加による増殖とブタノール生産量の向上は確認できなかった。以上のことから、N1-4 の熱感受性機構はアデニンを分子構造に有する化合物が低下することで引き起こされる可能性が示唆された。

次にアデニン添加による耐熱性向上機構について解析を試みた。多くの生物においては、細胞外のアデニンは細胞内に取り込まれると AMP として利用されることから、アデニン添加によって N1-4 の細胞内アデニンヌクレオチド量が増加していることが予想される。そこで、アデニン添加時の細胞内の ATP 量を測定した。30°C 培養時の細胞内 ATP 量は 36 時間まで培養時間が進むにつれて増加したが、37°C 培養時でのアデニン非添加では 12 時間から ATP 量は減少した。しかしながら、37°C 培養時でもアデニン添加により 16 時間までは ATP 量は維持され ATP の減少は抑制されていたことからアデニン添加により ATP 量が維持されることが明らかとなった。次に ATP 量の向上が細胞の恒常性を維持していると推察し、生菌数の経時変化を測定した。その結果、アデニン非添加の 37°C 培養では 8 時間から CFU が急激に低下し、20 時間でコロニーは形成されなくなった。一方、アデニン添加では CFU 低下の開始は 24 時間まで抑えられ、培養 48 時間までコロニーの形成がみられた。

*Clostridium* 属細菌の特徴の一つは孢子形成能を有することであり、ATP 量や生菌数の低下以外に孢子形成によって増殖と発酵が停止する可能性も考えられる。そこで、細胞内のゲノム DNA を蛍光染色することにより芽胞形成の経時変化を観察した (図 1)。アデニン非添加の 30°C 培養では培養 24 時間後も栄養細胞のみが存在したのに対して、37°C 培養では培養 12 時間から芽胞が形成され培養 24 時間後には図 1 に示す様に 90% 以上の細胞で孢子が観察された。一方、アデニン添加時には芽胞形成は 20% でありアデニン添加に

よって芽胞形成が抑制されていた。以上の様に、アデニン添加の効果は ATP 量や制菌数の維持、さらには芽胞形成率の低下によって増殖と発酵が可能な栄養細胞が多数存在することによることが明らかとなった。

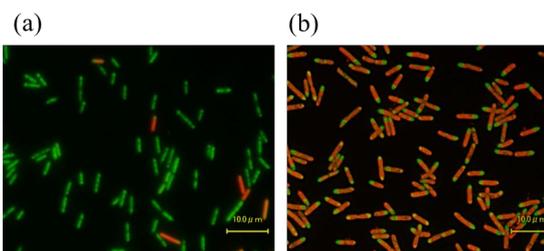


図 1 培養 24 時間目の菌体の蛍光顕微鏡観察結果。(a)アデニン非添加 30°C 培養。(b) アデニン非添加 37°C 培養。

## (2) 変異処理による耐熱性ブタノール生産菌への育種

UV 照射により変異を誘発し高温域でもブタノール生産可能な変異株(RIFR91)を取得した。親株である N1-4 は 30°C において 40 g/L のグルコースから 11.0 g/L のブタノールを生産可能であるが、32°C、34°C、36°C、38°C と培養温度を上昇させるとそれぞれ 6.9 g/L、3.3 g/L、1.7 g/L、0 g/L と減少した。一方、変異株である RIFR91 の 30°C、32°C、34°C、36°C、38°C でのブタノール生産はそれぞれ 11.2 g/L、11.9 g/L、10.8 g/L、9.5 g/L、2.3 g/L と 36°C という高温域でもブタノール生産が可能であった。興味深いことに、ブタノール生産速度も RIFR91 では高く、親株では至適温度である 30°C で 0.18 g/L/h であったのに対し、RIFR91 では 34°C において 0.39 g/L/h と 2 倍以上高い生成速度を示した。さらには、セルロース分解菌である *C. thermocellum* と混合培養し稲わらを基質に培養したところ、34°C においても親株と比較して 1.5 倍高い生成量を示し 40 g/L の稲わらから 6.2 g/L のブタノールを生産し、その生産速度も向上していた。

セルロース分解菌と混合培養し稲わらを基質にした場合、ブタノール生成量が増加した原因を明らかにするため RIFR91 の特性について解析した。稲わらはセルロースのみならずヘミセルロースからも構成されている。一方、本研究で使用したブタノール生産菌のゲノム情報からはこれらヘミセルロース分解に関与する遺伝子も確認されている。そのため、ブタノール生成量が増加した要因の一つは RIFR91 においてはこれらヘミセルロース分解に関与する遺伝子群が機能することで稲わらの分解率が向上し生成量が向上することが予想された。そこで、親株である N1-4 株と RIFR91 の培養上清から粗酵素液を回収し、ヘミセルロース分解に関与する酵素活性を測定するとともに、ショットガン解析によって分泌されるたんぱく質に差異があるかを確認した。その結果、RIFR91 の xylanase 活性、xyloglucanase 活性、endo-1,3-β-glucanase 活性は親株と比較してそれぞれ 2.4

倍、1.7 倍、3.4 倍に増加していた。また、培養上清からは RIFR91 においてのみ  $\beta$ -1,4-xylanase、 $\beta$ -glucanase、glycosyl hydrolases family 39 などのタンパク質が検出された。これらのことから、RIFR91 は耐熱性が向上するとともに、ヘミセルロース分解に関与する酵素群の発現や分泌量も向上しており、このことがブタノール生成量と速度の向上に寄与している可能性が示唆された。

### (3) 変異株を用いたスケールアップ時の最適培養条件の検討

取得した変異株である RIFR91 を用いて 1L ジャーファーマンターを用いた高効率な培養条件を探索した。窒素ガスを供給しながら 500 mL の培地を張り込み攪拌をせずセルロース分解菌 NBRC103400 とブタノール生産変異株 RIFR91 を混合培養に供し、セルロース系基質であるろ紙を基質として混合培養に供したところ、5.0 g/L のブタノールを生産した。攪拌の回転数を 100 rpm と 1,000 rpm に変更した結果、それぞれ 1.2 g/L と 0.8 g/L しかブタノールを生産しなかった。一方、攪拌に使用していた羽を外して剪断応力を低下させ、80 rpm で回転し混合培養に供したところ、4.2 g/L のブタノール生産をしたことから、攪拌がブタノール生成に大きく関与していることが示唆された。RIFR91 培養時の pH を 5.0、5.5、6.0 に制御し混合培養に供したところ、pH 6.0 においては pH 無調整の条件と比較して 1.4 倍高く酪酸を生産したが(3.3 g/L)、ブタノール生産量はそれぞれ 1.8、5.0、3.2 g/L しか生産せず、いずれの条件においても pH 無調整の条件よりも高いブタノール生産はみられなかった。以上の結果から、500 mL スケールの混合培養において攪拌はブタノール生産量を低下させる原因であること、RIFR91 培養時の pH の固定化ではブタノール生産に対して有意的な効果を与えることができないことが示唆された。このことは、攪拌や pH 調整のコストがかからないことを示しており、低コストなブタノール生産が可能であることが明らかとなった。

### 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 3 件)

Kiyoshi K., Kawashima S., Nobuki K., Kadokura T., Nakazato A., Suzuki KI., Nakayama S. Adenine Addition Restores Cell Viability and Butanol Production in *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564) Cultivated at 37°C. Appl. Environ. Microbiol. 査読あり. Vol: 83 doi: 10.1128/AEM.02960-16. (2017)

Kubota E., Kiyoshi K., Nobuki K., Kadokura T., Nakazato A., Nakayama S. Identification of Xylanase Signal Peptide in

Culture Supernatant of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* Strain N1-4 Cultured on Delignified Rice Straw. J. Microb. Biochem. Technol. 査読あり. Vol: 7, p: 394-397. (2015) doi:10.4172/1948-5948.1000244

Kiyoshi K., Furukawa M., Seyama T., Kadokura T., Nakazato A., Nakayama S. Butanol production from alkali-pretreated rice straw by co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. Bioresour. Technol. 査読あり. Vol: 186, p: 325-328. (2015) doi: 10.1016/j.biortech.2015.03.061.

#### 〔学会発表〕(計 9 件)

信木公介, 清啓自, 川嶋草平, 門倉利守, 鈴木健一郎, 中山俊二. ブタノール生産菌におけるリファンピシン耐性変異株の特性解析. 第 68 回日本生物工学会大会 2016 年 9 月 28 日~30 日 富山国際会議場(富山県・富山市)

信木公介, 清啓自, 川嶋草平, 門倉利守, 中山俊二. セルラーゼ高発現ブタノール生産菌への育種. 第 67 回日本生物工学会大会 2015 年 10 月 26 日~28 日 城山観光ホテル(鹿児島県・鹿児島市)

清啓自, 信木公介, 川嶋草平, 門倉利守, 中山俊二. ブタノール生産菌におけるアデニン添加高温培養時の解糖系遺伝子群の転写解析. 第 67 回日本生物工学会大会 2015 年 10 月 26 日~28 日 城山観光ホテル(鹿児島県・鹿児島市)

川嶋草平, 清啓自, 門倉利守, 中里厚実, 中山俊二. リファンピシン耐性株による至適発酵温度の高温化. 日本農芸化学会 2015 年度大会 2015 年 3 月 26 日~29 日 岡山大学(岡山県・岡山市)

Kiyoshi K., Kawashima S., Kadokura T., Nakazato A., Nakayama S. Improvement of butanol production at higher temperature of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sstrain N1-4 by the addition of adenine. *Clostridium* XIII. 2014 年 9 月 19 日~21 日 上海

齋藤香帆, 清啓自, 古川雅崇, 中山俊二. 門倉利守, 中里厚実. ブタノール生産性 *Clostridium* 属細菌におけるセルラーゼ高分泌のための基盤技術開発. 第 66 回日本生物工学会大会. 2014 年 9 月 9 日~11 日 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

清啓自, 川嶋草平, 門倉利守, 中里厚実, 中山俊二. アデニン添加によるブタノール発酵性 *Clostridium* 属細菌の至適発酵温度の向上. 第 66 回日本生物工学会大会 2014 年 9 月 9 日~11 日 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

清啓自, 川嶋草平, 門倉利守, 中里厚実, 中山俊二. ブタノール生産性 *Clostridium* 属細菌における至適発酵温度の改変. 日本農芸化学会 2014 年度大会 2014 年 3 月 27 日~

30日 明治大学生田キャンパス(神奈川県・川崎市)

古川雅崇, 中山俊一, 門倉利守, 中里厚実.  
ブタノール生産菌の高発現プロモーターの探索. 第65回日本生物工学会 2013年9月18日~20日 広島国際会議場(広島県・広島市)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: クロストリジウム属細菌を用いたブタノール生産方法

発明者: 清啓自, 中山俊一

権利者: 清啓自, 中山俊一

種類: 特許

番号: 特願 2014-179819

出願年月日: 2014年9月5日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中山 俊一 (NAKAYAMA SHUNICHI)

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号: 90508243