

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26340102

研究課題名(和文) 太陽エネルギーによりCO<sub>2</sub>からアルカン系燃料を高生産する細菌の開発研究課題名(英文) Toward construction of a bacterium which can produce high amounts of fatty compounds from CO<sub>2</sub> using sunlight

研究代表者

寺本 真紀 (Teramoto, Maki)

高知大学・教育研究部総合科学系複合領域科学部門・准教授

研究者番号：60545234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、再生可能エネルギーの高生産を目的に、理想的な原油系燃料であるアルカン系炭化水素を高生産できる高増殖性細菌を開発した。

既に取得していた"アルカン系炭化水素を菌体あたりで高生産できる"新規細菌から、アルカン系炭化水素を高生産させる新たな遺伝子群の同定に成功した。さらに、この遺伝子群を高発現させるDNA領域(プロモーター)や、周辺遺伝子の共発現や、遺伝子発現の宿主菌(大腸菌)の培養条件を検討し、炭化水素を高生産する条件を検討した。そして、バイオマスをエネルギー源として(間接的にCO<sub>2</sub>を原料に太陽エネルギーを用いて)アルカン系炭化水素を高生産できる高増殖性細菌(大腸菌)の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Fatty compounds can be various commercial products, such as fuels. In this research, a genetically engineered microbe that can accumulate high amounts of fatty compounds was constructed towards the low-cost and renewable fuel production from renewable feedstocks. A novel bacterium that accumulates conspicuous amounts of fatty compounds (C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub>) has been obtained. In this study, a novel gene cluster for the fatty compound synthesis was identified from this bacterium. Moreover, promoters, surrounding genes and growth conditions of the host for gene expression were investigated for high expression of the novel gene cluster and high accumulation of the fatty compounds in a cell. Finally, the genetically engineered microbe (*Escherichia coli*), which can indirectly utilize CO<sub>2</sub> as a carbon source and sunlight as an energy source, was obtained.

研究分野：分子微生物学

キーワード：脂肪族化合物合成遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

鎖状飽和炭化水素であるアルカンが原油の主成分で、理想的な原油系燃料である。申請者は、アルカン系炭化水素を菌体あたりで高生産する新規細菌の取得に成功していた(図1, 2)。そして、この新規細菌からアルカン系炭化水素を高生産させる新たな遺伝子が得られると考えた。

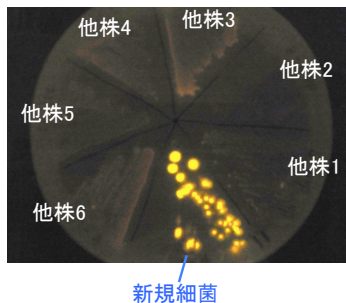


図1 蓄積した炭化水素油を染色

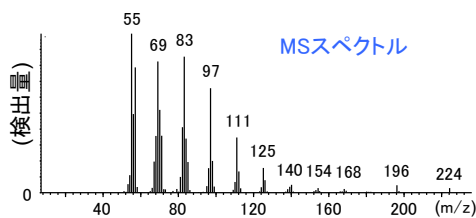


図2 新規細菌の油をGC-MS解析

## 2. 研究の目的

そこで、この新規細菌からアルカン系炭化水素を高生産させる遺伝子を取得し、再生可能エネルギーからアルカン系炭化水素を高生産できる高増殖性細菌を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

アルカン系炭化水素合成遺伝子群の同定は、新規細菌の全ゲノムシーケンスをおこない、塩基配列の相似性から合成遺伝子を推定し、大腸菌で発現させ、生産物をGC-MSで解析することで同定した。

アルカン系炭化水素の生産の解析は、GC-MSを用いて、化合物のMSライブラリー(WileyやNIST)や炭化水素標品のMS・検出時間・検出量と比較することで、定性・定量した。

炭化水素油の染色は、炭化水素油を蛍光染色する色素を寒天培地に塗布し、この培地上で細菌を増殖させることで、細胞内の炭化水素油を染色した。

## 4. 研究成果

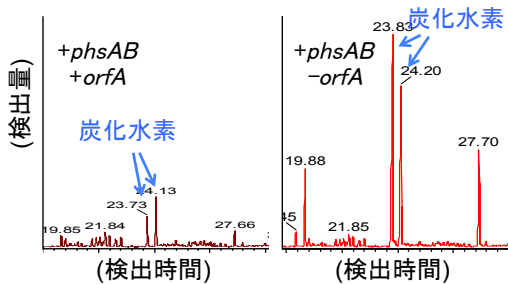
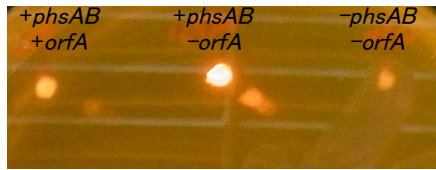
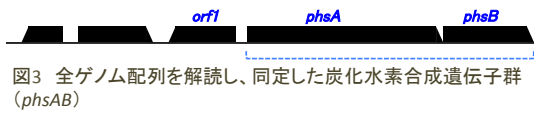
まず、この炭化水素高生産遺伝子を取得するために、申請者のもつアルカン系炭化水素高生産菌のDNAライブラリーを、コスミドベクターを用いて大腸菌を宿主に作製した。そして、この大腸菌ライブラリー(約1000クローン)から、炭化水素を高生産するようになったものを、蛍光色素による染色で、選択しようとしたが、導入した遺伝子がうまく発現しなかったためか、炭化水素を高生産するようになったものは見出せなかった。

そこで、次世代シーケンサーにより、ほぼ全ゲノムの塩基配列を決定し、炭化水素生産遺伝子と考えられる候補遺伝子の情報を得たが、既知の炭化水素生産遺伝子と相似性の高い遺伝子は見出せず、有力な候補遺伝子を絞ることは難しかった。

申請者の菌の生産するアルカン系炭化水素の構造を明らかにした。この構造から合成反応を推定し、この反応と類似の反応をおこなう酵素とその遺伝子情報から、有力な候補遺伝子群を特定することに成功した。そして、この候補遺伝子群を大腸菌で発現させることで、これらが炭化水素を高生産する遺伝子であることを確認した。この遺伝子群は、隣接した2つの遺伝子(*phsAB*; 図3)からなり、生産物の解析と併せて、それぞれの機能を推定できた。

また、この遺伝子群のすぐ上流のDNA領域(*orf1*; 図3)に炭化水素の生産を抑える作用があることも明らかにした(図4,5)。この領域の欠失により、炭化水素の生産量が細胞当たりで5-9倍増加した。

さらに、これら遺伝子群の下流には、細胞の増殖を遅くする作用があることが示唆された。このように、炭化水素を高生産させるDNA領域を特定できた(図3)。



そして、大腸菌で、上述の 2 つの遺伝子 *phsAB* の欠失・発現解析をおこない、アルカン系炭化水素を高生産させるためには、この 2 つの遺伝子のうちの 1 つの遺伝子 (*phsA*) の発現のみでも十分であることを示唆するデータを得た。しかし、もう一方の遺伝子 (*phsB*) が共存すると、炭化水素合成活性がさらに高まることも発見した。このように、炭化水素を高生産させるために必要な最小限の DNA 領域を特定した。

さらに、この遺伝子をもちいて大腸菌でアルカン系炭化水素を高生産させるための大腸菌の培養条件 (炭化水素を高生産する菌体の増殖時期や遺伝子発現の誘導剤の添加時期など) の検討もおこなった。検討した条件の中で最も炭化水素を生産した培地条件では、これまでに報告された大腸菌でのアルカン系炭化水素の生産量の中で、菌体あたりで生産されたアルカン系炭化水素の量が最も多いことが示唆された。

また、遺伝子の由来するもとの新規細菌が、アルカン系炭化水素を菌体あたりで最も高生産する条件も検討した。そして、培養液容量や増殖時期により生産されるアルカン系炭化水素の種類が変化することを発見した。

さらに、大腸菌でのアルカン系炭化水素のさらなる高生産をめざして、アルカン系炭化水素を高生産させる遺伝子のプロモーターなども検討した (T7 プロモーターに付け替えるなど)。

また、アルカン系炭化水素が (溶菌などにより) 培地中で検出されるかどうかの実験もおこない、アルカン系炭化水素のより簡易な抽出方法の検討もおこなった。

また、アルカン系炭化水素を高生産させる遺伝子の周辺遺伝子の機能解析もおこなった。この機能として、塩基配列の相似性から、アルカン系炭化水素を基質にする酵素やアルカン系炭化水素の前駆体を生産する酵素をコードすると考えられた。この解析では、この周辺遺伝子の発現に最適なプロモーターを検討したり、遺伝子が由来したもとの新規細菌の培養液に予想される基質を添加したりして、遺伝子の機能検出を試みた。しかし、この周辺遺伝子の機能を確認・同定することは出来なかった。

#### (結語)

本研究では、以上のようにして、再生可能エネルギーの高生産を目的に、理想的な原油系燃料であるアルカン系炭化水素を高生産できる高増殖性細菌を開発した。既に取得に成功していた"アルカン系炭化水素を菌体あたりで高生産できる"新規細菌から、アルカン系炭化水素を高生産させる新たな遺伝子群を同定することに成功した。さらに、この遺伝子群を高発現させる遺伝子 (プロモーターや周辺遺伝子など) や、遺伝子を発現させた宿主細菌 (大腸菌) が炭化水素を高生産する培養条件などを検討した。そして、バイオマスをエネルギー源としてアルカン系炭化水素を高生産できる高増殖性細菌 (大腸菌) の開発に成功した。

#### (今後の予定など)

本研究で開発された細菌は、バイオマスをエネルギー源として利用できることから、間接的に CO<sub>2</sub> を原料に太陽エネルギーを用いてアルカン系燃料を高生産できる。今後は、本研究成果を用いて、CO<sub>2</sub> と太陽エネルギーを直接的に用いて、アルカン系燃料を高生産できる細菌を構築することを試みる予定である。

( )

## 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 0 件)  
投稿中です。

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：脂肪族アルコール合成細菌及び脂肪族アルコールの製造方法

発明者：寺本真紀 小松あゆみ

権利者：高知大学

種類：特許

番号：特願 2018-83292

出願年月日：2018 年 4 月

国内外の別：国内

○取得状況 (計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://deepsea.jimdo.com>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

高知大学・教育研究部 総合科学系・准教授  
(寺本 真紀)

研究者番号：60545234

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

独立行政法人国立環境研究所・生物生態系環境研究センター・室長

(河地 正伸)

研究者番号：50260469

(4) 研究協力者