

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21150

研究課題名(和文)メタン発酵による組換え微生物の有効利用に向けた導入遺伝子の動態研究

研究課題名(英文) Dynamics of transgene for effective utilization of recombinant microorganisms by methane fermentation

研究代表者

佐々木 大介 (Sasaki, Daisuke)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・特命助教

研究者番号：00650615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：高温メタン発酵槽に、組換え遺伝子(緑色蛍光タンパク質)を恒常発現する酵母を投入することで、外来遺伝子が廃棄物処理を行う微生物群集へ水平伝播・環境拡散する可能性について検討を行った。長期間の発酵槽の運転と分子生物学的・微生物学的解析の結果、組換え遺伝子を保持する酵母の死菌・生菌をメタン発酵槽に投入して処理する場合、その遺伝子は直ちに分解され、伝播も拡散も起こらないことを示唆する結果を初めて明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：The possibility of horizontal gene transfer and environmentally spread of an exogenous gene into microbial communities was investigated by introducing yeast which constantly expresses recombinant gene (green fluorescent protein) in thermophilic methane fermentation reactor. As a result of operation of the fermenter for a long period and molecular biological analysis and microbiological analysis, when dead or living yeast holding the recombinant gene were introduced into the reactor, the gene was immediately degraded. Therefore, it was revealed for the first time that neither horizontal gene transfer nor spread of exogenous gene occurs.

研究分野：応用微生物学

キーワード：高温メタン発酵 組換え遺伝子 水平伝播 環境拡散 廃菌処理 廃棄物処理 GFP遺伝子

1. 研究開始当初の背景

メタン発酵に代表される嫌気性消化は、異なる3つの分解過程を担う嫌気性微生物群集の働きにより、高分子有機化合物がメタンにまで分解される発酵法である。この技術はバイオマスリファイナリーやカーボンニュートラルの観点から、下水汚泥や生ごみ、家畜排泄物の減容・バイオガス化で実用化されており、ガスタービンを使用した発電で電気エネルギーが獲得されている。しかしながら、籾殻や稲藁、廃木材に代表される非可食性植物バイオマスのメタン発酵処理は、無機栄養素の欠如(特に窒素)という問題がある。そのため、微生物群集の最適化と高効率分解のためには別途添加が必要であり、コストの面からも実用化が難しい。

一方、遺伝子組換えの技術が進むことで、近年では目的酵素を菌体表層に提示する酵母の開発など、微生物による有用物質生産の研究が活発化している。また近い将来、組換えに該当しない新規ゲノム編集技術も開発される可能性が世界的にも高まっており、廃棄組換え微生物を用いた有用物質生産の事業化は十分考えられる。将来的にも組換え遺伝子の環境への拡散は防ぐべき課題であると考えられ、廃棄される組換え体の有効利用と遺伝子の伝播・拡散に関する新規知見が求められることが予想される。微生物の接合や輸送による外部遺伝子の取り込みは水平伝播と呼ばれ、真核・原核生物への遺伝子の伝播・影響について、特に群集を対象にした報告はされていない。

ゲノム編集技術の進歩と有用物質を遺伝子組換え微生物で生産しようとする研究は、今後さらに加速していくことが予想される。また、廃棄される微生物を廃棄植物バイオマスの嫌気性消化に栄養源として添加することで、微生物による分解で問題となっている無機栄養素の欠如が解決され、嫌気発酵微生物群集による安定分解が可能になることが予想される。したがって本研究では、事業化の際に廃棄物となり得る組換え微生物を対象に、メタン発酵法による有効利用を目指し、導入された組換え遺伝子がメタン発酵微生物群集のゲノムに水平伝播する可能性とその範囲を明らかにすることを目的としている。次いで、実際の廃棄物バイオマスに組換え微生物を添加した際の発酵性能と環境拡散への影響を明らかにする。これらの研究から、菌体を含む廃棄物バイオマスの有効利用とエネルギー回収及び環境保全の重要な知見が得られると考えられる。

2. 研究の目的

これらの背景をもとに本研究計画では、プラスミドや染色体上の組換え遺伝子が、微生物群集のゲノムへ水平伝播する可能性を明らかにするため、大きく分けて以下の2つの目的で研究を展開する。(1)有用物質生産の組換え微生物として研究が進んでおり、実用化が想定される酵母を対象に、水平伝播の動態を追うマーカーとして Green Fluorescent Protein (GFP; 緑色蛍光

タンパク質) 遺伝子を選択し、模擬排水を分解するメタン発酵に栄養補助源として添加する。培養定常状態に達するまで連続的に基質の添加を行い、発酵液を微生物学的及び分子生物学的手法を用いて多角的に解析していく。もう一つは、(2)非可食性植物バイオマスとして稲藁を選択し、実際の研究に使用した後の組換え酵母を、主に窒素源として添加したメタン発酵において、組換え遺伝子の環境拡散の可能性を明らかにすることで、実用化を視野に入れた研究を目的としている。

これまで、物質生産(醸造や発酵・機能性食品)に使用した微生物(酵母や藻類)を基質としたメタン発酵により、エネルギー回収を行った研究は僅かに報告されている。しかしながら、組換え微生物を基質としてまたは栄養補助剤として用い、その組換え遺伝子の伝播・拡散について評価した報告はまだされていない。今後、大量に廃棄される可能性が高い組換え微生物の廃棄物としての有効利用に関して早期に検証すること、またその組換え遺伝子の伝播の可能性と範囲を明らかにすることで、エネルギーおよび環境保全の観点から本研究は非常に重要な研究となり、得られる知見はこれまで報告がないために獨創性・新規性がある。

3. 研究の方法

(1)メタン発酵槽の構築と運転

容量 1.0 L のファーメンター(丸菱バイオエンジニアリング MDL-100)を基本ユニットとして、メタン発酵システムの構築を行なった(図1)。具体的には、pH調整、攪拌スピード、ガス回収、基質の流入出のモニタリングと調節を自動で行う発酵槽(発酵容量:800 mL)を作成した。この槽内に、家畜由来とする堆肥の10%溶液を種汚泥として加え、模擬排水として1%のグルコースを炭素源とする一般的な嫌気微生物培地を用いて運転を開始した。運転パラメーターは、発酵温度 55℃、攪拌スピード 100 rpm、水理学的滞留時間(HRT)10日 で試運転を行った。



図1: 高温メタン発酵装置の写真

(2) GFP 酵母の培養

GFP 遺伝子を保持して恒常発現する酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* YPH499 株) は、研究代表者が所属する研究室で構築された GFP 発現酵母を参考にして作成された株を使用した (参考文献: Kaishima et al. (2016) *Scientific Reports*, 6:35932)。Aureobasidin A と各種メーカー物質を添加した YPD 培地を用いて、ウミキノコ由来し、コドンが酵母に最適化された GFP 遺伝子 (*yUkG1*) がゲノムに挿入されている酵母とプラスミドで保持している酵母をそれぞれ大量培養して菌体回収し、添加試験に用いた。

(3) 組換え遺伝子投入試験

組換え遺伝子の変遷を明らかにするため、酵母のゲノム中またはプラスミド中に GFP 遺伝子を保有して恒常発現する 2 種類の株を用い、さらにそれらを滅菌処理あり (オートクレーブ: 121 °C, 20 min) / なしの添加試験を 30 日ずつ、最後に 30 日間の washout 試験 (非添加) の合計 6 ヶ月間の試験を部分的に 2 連で実施した。投入試験は、模擬排水の Total organic carbon (TOC: 4315 mg-C/L) に対し、1 日に発酵槽内に投入される TCO (345.2 mg-C) の 10% 当量の酵母菌体 (34.5 mg-C) を PBS に懸濁して 1 日 1 回、毎日添加した。

(4) PCR-ゲル電気泳動

発酵液からのゲノム抽出は PowerFecal DNA Isolation kit、プラスミド抽出は Labopass Plasmid Mini Purification kit を使用した。組換え遺伝子の残存確認は、投入した GFP 遺伝子を 5 つの領域に分割した PCR プライマーを作成し (図 2)、それぞれの投入試験の 1 日目と最後の 30 日目の発酵液から抽出した全ゲノム DNA を鋳型とした PCR-ゲル電気泳動によって行なった。PCR 反応は AmpliTaq gold キットを用い、アニーリング温度 58 °C で 30 サイクル行なった。アガロースゲルは TBE にて作成した。

(5) 酵母生存確認と GFP 発現確認

それぞれの投入試験の 1 日目と最後の 30 日目の発酵液を YPD 寒天培地上に塗布して、30 °C で 2 日以上培養し、コロニーを形成した菌体の GFP 蛍光を目視で確認した。発現が疑われる菌体については PBS に懸濁し、蛍光顕微鏡で確認した。また、投入試験 30 日目の発酵液を希釈し、フローサイトメトリー (FACS; fluorescence activated cell sorting) にて、GFP 蛍光 (励起波長: 483nm, 蛍光波長: 500nm) を発する菌体・物質の分取を行なった。

(6) メタ 16S 解析

投入試験及び投入の前後のそれぞれの発酵液から抽出した全ゲノム DNA を鋳型とし、細菌・古細菌の 16S rRNA 遺伝子の v3-4 領域を標的としたユニバーサルプライマーを用いて PCR 増幅した。これらにイルミナ社の Index primer kit を用いて別々に標識し、濃度を揃えて Miseq に

よる配列の網羅的解読を実施した。得られたシーケンス情報は、本助成で構築したマルチオミクス解析システムを用い、Mac-QIIME、Basespace によって解析した (他のオミクスデータ解析 [代謝解析・環境メタゲノム・発現解析] のセットアップ済み)。

4. 研究成果

初年度は、高温メタン発酵槽の設置およびその安定運転を重点的に実施した。メタン発酵の研究において、研究対象であるサンプル (微生物群集) が安定して得られることが最も重要である。そこで、安定的な連続運転を目的にして、自動化システムの構築を行なった。メタン発酵の安定運転の評価については、最低でも 1 ヶ月以上のメタン発酵微生物群集の馴養が必要である。その間に生じたシステムの不具合を調整し、何度かの運転を実施して問題を解決し、高温メタン発酵の安定運転を可能とした。

高温メタン発酵の運転パフォーマンスとしては、発酵の良し悪しを判断する上で重要なファクターである揮発性低級脂肪酸 (有機酸) が挙げられる。組換え微生物を添加する前のリアクターではその蓄積がほとんど起っておらず (> 5 mM 以下)、150-250 mL/d の安定したガス発生量が見られ、TOC 除去率 90 % 以上の安定なシステム構築および運転パフォーマンスの獲得に成功した。最終年度からは、この安定したパフォーマンスを発揮している高温メタン発酵槽に遺伝子組換え菌として、GFP 遺伝子をゲノムまたはプラスミドに保持する酵母を滅菌した状態・生菌の状態、別々に投入し、組み換え遺伝子がメタン発酵微生物群集に水平伝播する可能性と環境拡散の範囲について評価を行なった。

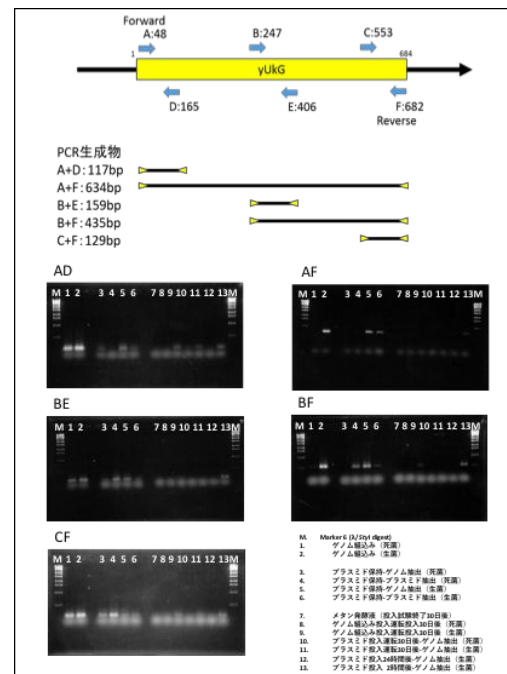


図 2: GFP 遺伝子 (*yUkG*) プライマーセットと PCR-ゲル電気泳動像

投入試験は、1日に発酵槽内に投入される模擬排水のTCOの10%当量の酵母菌体をPBSに懸濁して1日1回、運転期間中、ほぼ毎日添加した。GFP遺伝子を5つの領域に分割したPCRプライマーを作成し、それぞれの投入試験の1日目と30日目の発酵液から抽出した全ゲノムを鋳型としたPCR-ゲル電気泳動により、組換え遺伝子の発酵槽中での残存を確認した(図2)。ゲノム組込み・プラスミド保持の生菌の酵母はすべてのプライマーの組み合わせでバンドが検出された(図2、AD、AF、BE、BF、CF-2、5、6レーン)が、それらを滅菌処理した後にGFP遺伝子全長のバンドは消失した(図2、AF-1、3、4レーン)。ただし、滅菌処理した場合にもバンドが確認される場合があったため、投入された組換え遺伝子は断片化していることが明らかになった。これらの結果から滅菌処理した菌液には、元の遺伝情報を保持したままの組換え遺伝子の水平伝播や拡散の可能性がないことが予測され、実際にタン発酵槽に投入してもGFP遺伝子の全長および断片の発酵液中での残存は、解析期間中に確認されなかった(図2、AD、AF、BE、BF、CF-8、10レーン)。

生菌投入の試験においては、プラスミド保持の生菌を直接発酵液に投入した2時間後にはまだ全長・断片化した遺伝子は残存していたが、24時間後にはそのGFP遺伝子はすべて断片化しており、全長をPCR増幅できない状態になっていることが明らかになった(図2、AD、AF、BE、BF、CF-12、13レーン)。ゲノム組込みの酵母の投入試験にてもGFP遺伝子はメタン発酵処理によって分解されて断片化し、機能を保有したままの全長の遺伝子が発酵液に残存する可能性は極めて低いことが予測された(図2、AD、AF、BE、BF、CF-9レーン)。

さらに、蛍光顕微鏡やFACSを用いた発酵液中のGFP蛍光の検出、投入後の発酵液のYPD培地での培養を試みたが、蛍光・菌体は全く検出されなかった。したがって、組換え遺伝子を保持する酵母の生菌をメタン発酵槽に投入して処理する場合、その遺伝子は直ちに分解され、環境中への拡散が起らないことを示唆する結果を初めて明らかにすることができた。

また、投入した酵母を廃棄バイオマスとして捉えたと、高温メタン発酵への投入処理により、1日当たり発生するガスは280-520 mL/dに増加し、TOC除去率は同じく90%以上を維持した。また、上記のように生菌投入後、30日目の発酵液をYPD培地に塗布しても、酵母の生育は全ての試験において見られなかった。つまり、発酵液内で酵母細胞が死滅し、メタン発酵細菌群の基質になっていると考えられた。そこで、次世代シーケンサーを用いた16S rRNA遺伝子の網羅的解析を行い、網羅的なオミクスデータの解析を行ったところ、メタン生成に関わるメタン生成古細菌の構造や検出された発酵性細菌群の構造は、投入試験最中とその前後で若干の遷移は見られるものの、菌種が大きく変わることはないことが明らかとなった(図3)

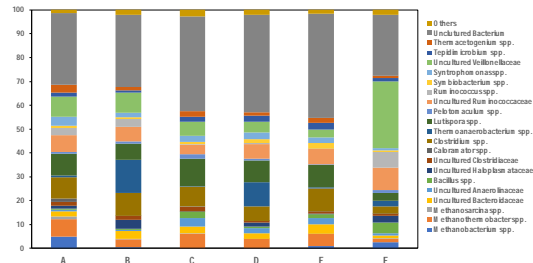


図3: NGSによるメタ16Sの結果
(属レベルでの分類)

- A: 高温メタン発酵;組換え遺伝子菌体投入前
- B: ゲノム組込み投入30日後(死菌)
- C: ゲノム組込み投入30日後(生菌)
- D: プラスミド保持投入30日後(死菌)
- E: プラスミド保持投入30日後(生菌)
- F: 高温メタン発酵投入試験30日後

今回の解析で得られた結果は、組換え菌体の投入量を固定かつ一定の滞留時間の下で検討したものである。生菌の投入量が増加され、滞留時間も短くなった場合には流出液中に組換え菌体が混入している可能性が高いため、より条件を厳しくした検討も行うべきである。最終年度に予定していた実バイオマスを用いた検討試験は実行できなかったが、遺伝子組換え菌の水平伝播や環境拡散が無いということを完全に証明するのは難しく、運転や解析に時間がかかる。それでも本研究はさらに検討を続けていくべきであると考え。また、遺伝子組換え菌体として用いた菌種は真核生物の酵母であった。そのため、酵母の遺伝子コドンに最適化された機能遺伝子が、原核生物のゲノムに取り込まれてさらに発現する可能性は極めて低い。しかしながら、断片化した酵母の組換え遺伝子の所在を完全に解明したとは言えないため、今後、詳細な研究が必要である。さらに、原核生物の組換え微生物を用いて同じ試験を行う必要性もある。

最後に、最終年度中の解析の実施はできなかったが、投入試験中の代謝解析(LC-MS/MS、GC-MS)および環境メタゲノム(NGS-Miseq)の準備を進めており(必要な消耗品は購入済み)、メタ16S解析を実施する際に構築したマルチオミクス解析PC環境も整えている。これらの結果とともに遺伝子組換え菌体を廃棄物として捉えた際の微生物群集構造の変遷についてNGSによる網羅的な結果を蓄積しつつ、研究成果の論文化を進めている。

- 5. 主な発表論文等
- (雑誌論文)(計0件)
- (学会発表)(計0件)
- (図書)(計0件)

- (産業財産権)
- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 大介 (SASAKI, Daisuke)
神戸大学大学院・科学技術イノベーション研
究科・特命助教
研究者番号: 00650615

(2) 研究分担者

-

(3) 連携研究者

-

(4) 研究協力者

-