

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2020

課題番号：16H04897

研究課題名(和文) 超低栄養性細菌による革新的バイオ燃料生産プロセスの構築を目指した基盤的研究

研究課題名(英文) Basic studies on innovative production process of biofuel by an extreme oligotroph

研究代表者

吉田 信行 (Yoshida, Nobuyuki)

静岡大学・工学部・准教授

研究者番号：10273848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：Rhodococcus erythropolis N9T-4株は、生物が生きていくために必要な炭素・窒素・硫黄源を培地中に加えなくても生育する超低栄養性細菌である。それらの栄養源は全て大気中から利用していると予想しており、CO₂を炭素源として取り込んでいることは明らかであるがその詳細は明らかではない。そこで、本研究の前半では、本菌のゲノム解析を詳細に行い、その低栄養生育の謎に迫った。さらに研究の後半では、N9T-4株の低栄養性を利用した低炭素・低コストなバイオ燃料生産プロセスの実現に向けた基盤的研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超低栄養性細菌は本研究代表者が発見した微生物であり、世界でもほとんど研究例がない。本研究において、その低栄養性に関与するいくつかの遺伝子の機能を明らかにできたが、それらは全く新しい知見であり学術的意義は非常に高い。また、本菌の低栄養性を用いた低炭素・低コストなバイオ燃料生産プロセスの構築に向けた基礎的な知見も得られ、これらはSDGs(持続可能な開発目標)の目標のうちの1つ、「エネルギーをみんなにそしてクリーンに」の達成に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：Rhodococcus erythropolis N9T-4 is a super oligotroph, which can grow on a minimum medium without any additional carbon, nitrogen, and sulfur sources. This bacterium can incorporate such nutrients from the atmosphere including CO₂, while the mechanisms are still unclear. In the first part of this study, we identified some genes involved in the oligotrophic growth of N9T-4. In the second part, we attempted to construct low-carbon and low-cost bioprocess for biofuel, such as ethanol and triacylglycerol using the oligotrophy of N9T-4.

研究分野：応用微生物学

キーワード：低栄養性細菌 Rhodococcus erythropolis biofuel triacylglycerol bioethanol aldehyde dehydrogenase methanol dehydrogenase

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

地球規模で資源問題が注目されているなか、現大気中の CO₂ を由来とするバイオマス資源の重要性が至る所で強調されている。しかしながら、資源の乏しい我が国にとっての至上命題は「バイオマス資源の有効利用」ではなく、「効率的なバイオマスの生産」あるいは「CO₂ そのものの有効利用」にあると考えている。例えば、昨今注目されているバイオエタノールは、サトウキビなど現存の植物系バイオマスを糖質原料とし、酵母がエタノールを発酵するという工程で製造されており、カーボンニュートラル的な燃料生産プロセスとして期待されている。しかしながら、食糧資源としてのバイオマスとの競合、それを回避するための農地の拡大、と言った問題が生じている。何よりも、我が国におけるこれらのバイオマスの生産性は低く、輸入コストを考えると国内でバイオエタノールを生産することは極めて困難である。研究代表者は、新しい CO₂ 固定微生物の検索を試みており、より効率的な CO₂ の生物的有効利用を目指している。

研究代表者が自然界から見いだした *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株は、炭素源を全く含まない無機塩培地に良好に生育する超低栄養性細菌である。本菌は CO₂ を制限した環境にすると生育を示さないが、培地中に炭酸水素ナトリウムを加えたり、CO₂ ガスを吹き込むと、そのような環境においても良好な生育を示す。従って、CO₂ を固定して生育する、いわゆる独立栄養的な生育を示すようであるが、既知の独立栄養性細菌の CO₂ 固定系に重要な役割を果たす鍵酵素の活性は本菌には検出できない。また、生物学的 CO₂ 固定に必須である光、金属などのエネルギー源の添加を全く必要としないことが最も特徴的な点である (*J. Bacteriol.*, **189**, 6824-6831, 2007)。さらに興味深いことに、本菌は窒素源、硫黄源を培地中から取り除いても同程度の生育を示すことが分かった。このうち窒素源については、大気中の微量アンモニアを窒素源として利用できるものと考えられる (*J. Biosci. Bioeng.*, **117**, 28-32, 2014)。おそらくは硫黄源についても同様に、二酸化硫黄などの大気中硫黄化合物を取り込んでいるものと予想している。すなわち本菌は、炭素・窒素・硫黄という生物にとって必須な主要三元素を全て大気中から取り入れることができる、大気資化菌であると言える。本研究ではこのような非常にユニークな性質を有する N9T-4 株をバイオ燃料生産へと応用するための基盤的研究を展開した。

2. 研究の目的

本菌の CO₂ 固定系の有効利用、あるいはその改良を考えると、どのようなメカニズムで CO₂ が固定されるかを明らかにすることは重要である。本菌のドラフトゲノム解析(ギャップを含む不完全な解読)は終了しており、それを基に分子遺伝学的な研究を展開してきたが、詳細な検討を行うためには、やはりゲノムの完全解読が必要である。これを本研究における前半の課題とし、比較ゲノム的な方法論による CO₂ 固定系の解明を試みた。

次に本研究の主軸となる N9T-4 株のバイオ燃料生産への応用可能性を探る研究を行った。N9T-4 株の親株自体については、バイオ燃料となり得る物質を生産、蓄積している知見はない。しかしながら、*Rhodococcus* 属細菌にはトリアシルグリセロール(TAG)やポリヒドロキシアルカン酸など、バイオ燃料・バイオ素材を顕著に蓄積するものが多数存在する。つまり、N9T-4 株もこれらの物質を蓄積する潜在能力を有する可能性がある。上記ゲノムを完全解読することによって、その可能性をさらに確実なものにすることができる。これらを踏まえ、(1)N9T-4 株を「微生物バイオマス」として利用する新規バイオエタノール生産法の提案、(2)既存の TAG 生産菌への低栄養性の付与、(3)代謝工学的改変を加えた N9T-4 株による TAG の生産、の3つを課題として、それぞれの可能性について検討した。将来的には N9T-4 株を低栄養性プラットフォーム、あるいは低コスト原料とする革新的なバイオ燃料生産プロセスの実現を目指すものである。

3. 研究の方法

(1)N9T-4 株ゲノムの完全解読と比較ゲノム解析

N9T-4 株からゲノム DNA を抽出し、断片化ライブラリーを構築後、本学グリーン科学技術研究所に設置されている次世代シーケンサー (MiSeq) によって塩基配列を決定した。過去に行ったドラフトゲノム解析結果とも統合し、新たなドラフト配列を得た。また、様々な *Rhodococcus* 属細菌との比較ゲノム解析、これまでにを行った N9T-4 株のトランスクリプトーム解析結果と統合し、新たな遺伝子情報の取得を試みた。

(2)N9T-4 株を「微生物バイオマス」として利用するバイオエタノール生産法の提案

本研究項目では、N9T-4 株の細胞あるいは細胞抽出物が、バイオエタノール生産の原料になり得るかどうかを検討する。つまり、N9T-4 株細胞内に酵母がアルコール発酵を行う際に利用可能な糖質が含まれているか？その含量はどれくらいか？を解析した。さらに、N9T-4 株の細胞、あるいはその抽出物を主成分とした培地で酵母(実験室酵母、バイオエタノール生産用酵母)を培養し、アルコール発酵試験を試みた。

(3)トリアシルグリセロール (TAG) 生産株への低栄養性の付与

Rhodococcus 属細菌の中で、*R. wratislaviensis* DSM 44193 株は細胞中に TAG を顕著に蓄積

することが知られており (*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**, 367-376, 2002), バイオ油脂生産の有望株である。まず, DSM 44193 株が N9T-4 株と同様に炭素源無添加の低栄養培地に生育可能か確かめた。さらに, N9T-4 株の低栄養性に関与する遺伝子の導入を試み, 低栄養条件での TAG の蓄積を解析した。

4. 研究成果

(1) N9T-4 株のゲノム解析

低栄養性遺伝子クラスター領域の同定

本菌が低栄養条件で生育する際, メタノール脱水素酵素およびアルデヒド脱水素酵素をコードする 2 つの遺伝子 (*mnoA* および *aldA*) が高発現することが分かっている。このうち, *aldA* 欠損株は低栄養生育能を失うが, *mnoA* についてはその欠損株が低栄養生育を示す結果が得られていたので, 詳細な検討を行っていなかった。今回改めて欠損株を作成したところ, 低栄養生育能が極端に低下することが初めて明らかとなった。また, N9T-4 株ゲノム上の *mnoA*~*aldA* 間には, グラム陽性菌の新しい電子受容体であることが予想されているマイコファクトシン (MFT) 生合成系の遺伝子クラスターが存在していた。それらの遺伝子のいくつかを欠損させると低栄養生育を全く示さなくなった。さらに, *aldA* 近傍に存在する推定転写因子 (*aldR1* および *aldR2*) の解析を行った。その結果, *aldR1* を欠損させると低栄養生育能が極端に悪くなることが判明した。また, *aldR1* が *mnoA* および *aldA* の上流調節領域に結合し, それぞれの転写を調節していることが明らかとなった。その他にも本菌の低栄養生育と関連性が深いと思われる遺伝子がいくつか存在し, 本領域が低栄養性遺伝子クラスターであることが示された。

低栄養生育に必須なトランスポーターの解析

本菌は低栄養生育時に大気中の二酸化炭素を利用することは明らかであるが, 二酸化炭素固定の際に必要なエネルギーをどこから得るのかは不明である。そこで, 低栄養生育時に必要なものを特異的に取り込むトランスポーターが存在していると仮定して, 低栄養条件で特異的に発現するトランスポーター遺伝子の検索および機能解析を試みた。これまでに行ったトランスクリプトーム解析結果を改めて精査すると, 低栄養条件で 3 つの ABC トランスポーター遺伝子 (群) が特異的に発現していることを見いだした。このうち基質結合タンパク質が低栄養生育を解析するに当たり最も重要であると考え, 3 つの基質結合タンパク質をコードする遺伝子 (*sbp1*, *sbp2*, *sbp3*) の破壊を試みた。その結果, *sbp1* 破壊株が低栄養条件での生育が親株と比べ低下していることが明らかとなった。様々な検討の結果, 検討した 3 つのトランスポーターはトレハロースの取り込みに関与し, 特に *Sbp1* は細胞壁を合成する際のトレハロースリサイクリングシステムに関与することが予想され, 低栄養生育と細胞壁合成との関係が明らかとなった。

他の *Rhodococcus* 属細菌との比較ゲノム解析

N9T-4 株以外の 8 種の *Rhodococcus* 属細菌の BM 培地における生育を調べ, 比較ゲノム解析により N9T-4 株の低栄養性を考察することを試みた。試験した 8 株のうち, 3 株 (*R. erythropolis* C 株, *R. erythropolis* PR4 株) は BM 培地上で比較的良好な生育を示したが, その他の株の生育は極めて悪いものであった。N9T-4 株の低栄養生育に必須な *aldA* とその上流領域を比較したところ, 低栄養生育を示した株のそれぞれの領域は N9T-4 株のものと 96% 以上の相同性を示したが, その他の株のものは上流領域で 68% 程度, *aldA* で 88% の相同性しか示さなかった。

(2) N9T-4 株を「微生物バイオマス」として利用するバイオエタノール生産法の提案

N9T-4 株は低栄養固体培地には良好に生育するが, 液体培地での生育が極めて悪い。N9T-4 株の細胞あるいはその抽出物を基質に, 酵母によってアルコールを発酵させることを目的として, N9T-4 株の液体培地での効率的な培養法を確立し, 大量のバイオマスを得ることを目的とした。スポンジを支持体とした半固体培養系を構築し, 液体培地に比べ, 約 10 倍の菌体を得ることに成功した。次に N9T-4 株の細胞あるいはその抽出物を培地に加え, バイオエタノール生産用酵母を培養し, アルコール発酵試験を行った。しかしながら, 生産量は極めて低く, その後の進展が望めないことから, 本研究項目の検討はここで終了し次の検討に移った。しかしながら, 大量の菌体を得る培養法を構築できたことは, その後の研究の効率を非常に高めている。

(3) トリアシルグリセロール (TAG) 生産株への低栄養性の付与

まず, TAG 生産菌である DSM 44193 株の低栄養性を調べた結果, 低栄養固体培地では N9T-4 株と同様の生育を示すが, 低栄養スポンジ培養では全く生育しないことが明らかとなった。また, N9T-4 株の TAG 生産性も調べた結果, DSM 44193 株の 1/5 程度であった。そこで, まず N9T-4 株の *aldA*, *mnoA* のそれぞれ, あるいはそれらをタンデムにつなげ, 低栄養応答性プロモーターの下流に導入した発現プラスミドの構築を試みた。それらは N9T-4 株内で良好に機能することを確かめた後, DSM 44193 株に導入し, 低栄養化を試みた。その結果, 低栄養生育能を付与することはできなかったが, *aldA*, *mnoA* 導入株で TAG 生産能が向上した。これは, 両遺伝子を用いた様々な微生物生産プロセスを低栄養化できることを示唆するものであり, 現在 DSM 44193 株による TAG 生産のさらなる向上に加え, 別の物質生産プロセスへの適用を試みている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ikegaya R, Shintani M, Kimbara K, Fukuda M, Yoshida N	4. 巻 84
2. 論文標題 Identification of a transcriptional regulator for oligotrophy-responsive promoter in <i>Rhodococcus erythropolis</i> N9T-4	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 865-868
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1709792	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuoka T, Yoshida N	4. 巻 103
2. 論文標題 Functional analysis of putative transporters involved in oligotrophic growth of <i>Rhodococcus erythropolis</i> N9T-4	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 4167 ~ 4175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-019-09714-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 吉田 信行	4. 巻 2
2. 論文標題 極端な低栄養条件下で生育するバクテリア - その産業応用の可能性	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 42-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuoka T, Yoshida N	4. 巻 82
2. 論文標題 Establishment of an effective oligotrophic cultivation system for <i>Rhodococcus erythropolis</i> N9T-4	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1652-1655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2018.1482196	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 吉田 信行	4. 巻 18
2. 論文標題 バクテリアが低栄養条件下で形成するナノ構造体 - オリゴボディ -	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 オレオサイエンス	6. 最初と最後の頁 233-240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岸本 真奈, 新谷 政己, 吉田 信行
2. 発表標題 超低栄養性細菌のメタノール脱水素酵素の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田 信行
2. 発表標題 超低栄養性細菌はどのようにして栄養を得ているのか?
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田 信行
2. 発表標題 微生物の低栄養性に必須なアルデヒド脱水素酵素の工学的利用
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岸本 真奈, 池ヶ谷 凌士, 新谷 政己, 金原 和秀, 吉田 信行
2. 発表標題 超低栄養性細菌Rhodococcus erythropolis N9T-4株のmnoAの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岸本 真奈, 新谷 政己, 吉田 信行
2. 発表標題 超低栄養性細菌のmnoAの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池ヶ谷 凌士, 加藤 弘将, 新谷 政己, 吉田 信行
2. 発表標題 超低栄養性細菌におけるアルデヒド脱水素酵素遺伝子(aldA)の発現制御
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 弘将, 池ヶ谷 凌士, 新谷 政己, 吉田 信行
2. 発表標題 Rhodococcus erythropolis N9T-4株のaldAによる低栄養性の付与
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池ヶ谷 凌士, 加藤 弘将, 新谷 政己, 吉田 信行
2. 発表標題 低栄養性細菌におけるアルデヒド脱水素酵素遺伝子 (aldA) の発現制御
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田 信行
2. 発表標題 微生物の低栄養性に必須なアルデヒド脱水素酵素の工学的利用
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松岡 友洋, 吉田 信行
2. 発表標題 Rhodococcus erythropolis N9T-4 株の低栄養生育に関与する推定トランスポーター遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松岡 友洋, 吉田 信行
2. 発表標題 Rhodococcus erythropolis N9T-4株の低栄養生育に関与する推定トランスポーター遺伝子の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松岡 友洋, 新谷 政己, 金原 和秀, 吉田 信行
2. 発表標題 超低栄養性細菌Rhodococcus erythropolis N9T-4株の効率的培養法の確立
3. 学会等名 日本生物工学会第68回大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 池ヶ谷 凌士, 小林 亮太, 松岡 友洋, 新谷 政己, 吉田 信行
2. 発表標題 超低栄養性細菌Rhodococcus erythropolis N9T-4株の低栄養性条件応答プロモーターの探索
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部第177回例会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 松岡 友洋, 矢野 嵩典, 新谷 政己, 金原 和秀, 吉田 信行
2. 発表標題 超低栄養性細菌Rhodococcus erythropolis N9T-4株のアルデヒド代謝関連酵素の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部第177回例会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yoshida N (Ed. by Alvarez, Hector M.)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 386
3. 書名 Biology of Rhodococcus	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	新谷 政己 (Shintani Masaki) (20572647)	静岡大学・工学部・准教授 (13801)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携 研究者	道羅 英雄 (Dohra Hideo) (10311705)	静岡大学・理学部・准教授 (13801)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関