

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：21301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2022

課題番号：16K16229

研究課題名（和文）組換えBrevibacillus属細菌を用いたセルロースからの直接エタノール生産

研究課題名（英文）Direct production of ethanol from cellulose using recombinant Brevibacillus

研究代表者

柳澤 満則 (YANAGISAWA, Mitsunori)

宮城大学・食産学群・准教授

研究者番号：00647000

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：セルロースからエタノールを生産可能にすることを目的とし、Brevibacillus属細菌にエタノールを生産するための遺伝子とセルロースを分解するための遺伝子を導入して発現させた。エタノール生産遺伝子については2種類のBrevibacillus属細菌に導入し、構築した2種類の組換えBrevibacillusはどちらも低収率ではあるもののピルビン酸からエタノールを生産することができた。セルロース分解遺伝子については、7種類のエンドグルカナーゼ、3種類のセロビオヒドロラーゼ、2種類の α -グルコシダーゼの遺伝子をBrevibacillus属細菌に導入し、分解活性が高くなる遺伝子を選抜した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、セルロース性バイオマスからバイオエタノールを生産するプロセスの開発が注目されており、プロセスの中でもセルロースの加水分解に必要となるセルラーゼが高価であることが課題となっている。本研究成果をさらに発展させ、セルロースから直接エタノールを生産可能にすることにより、セルラーゼにかかるコストを低減させることが可能となる。また、Brevibacillus属細菌の代謝を改変する手法や酵素を大量分泌させる手法を確立することは、導入する遺伝子を分解したい多糖類や生産したい有用物質に応じて変えるだけで、様々な多糖類からの有用物質生産プロセスの開発に応用可能である。

研究成果の概要（英文）：In order to enable the direct production of ethanol from cellulose, genes for producing ethanol from glucose and genes for degrading cellulose to glucose were introduced into Brevibacillus and expressed. As genes for ethanol production, pyruvate decarboxylase gene and alcohol dehydrogenase gene were introduced into two types of Brevibacillus. Both of the constructed two types of recombinant Brevibacillus were able to produce ethanol from pyruvic acid, although the yield of ethanol from pyruvic acid was low. As genes for cellulose hydrolysis, 7 kinds of endoglucanase genes, 3 kinds of cellobiohydrolase genes, and 2 kinds of α -glucosidase genes were introduced into Brevibacillus bacteria. The activities of the secreted recombinant enzymes were compared, and genes with high activity were screened.

研究分野：生物化学工学

キーワード：Brevibacillus セルロース エタノール

1. 研究開始当初の背景

食糧と競合しないバイオマスから石油代替燃料となるバイオエタノールを低コストで生産する方法の開発が求められていたことから、セルロース性バイオマスからのエタノール生産において、セルロースの加水分解に使用する酵素であるセルラーゼのコストを低減させる方法について多くの工夫がなされていた。特に、試薬のセルラーゼを使用せずにセルロースから直接エタノールを生産するための研究が注目され、盛んに進められていた。

既に、セルラーゼの遺伝子を酵母などのエタノール生産微生物に導入して発現させ、セルロースからのエタノール生産を試みる研究が複数報告されていたものの、バイオマスを用いてそこに含まれるセルロースから高い変換率でエタノールを生産することは困難となっていた。この原因としては、エタノール生産微生物が発現するセルラーゼの量が不十分であることが一因として考えられた。

一方、*Brevibacillus* 属細菌は、エタノールを生産しないものの、菌体外に大量のタンパク質を分泌することが知られていた。また、遺伝子組換えの報告もされており、外来遺伝子を大量発現させてその遺伝子由来する異種タンパク質を菌体外に大量分泌させることが可能であった。そのため、*Brevibacillus* 属細菌にエタノールを生産するための遺伝子とセルラーゼの遺伝子を導入することで、バイオマスに含まれるセルロースから高い変換率で直接エタノールが生産可能になると期待された。

2. 研究の目的

本研究では、セルロースから直接エタノールを生産可能な組換え *Brevibacillus* 属細菌を創製することを目的とし、*Brevibacillus* 属細菌が発現、分泌することが可能な遺伝子や必要となるプロモーター領域などの種類を明らかにした。具体的には、エタノールを生産可能にするためには、ピルビン酸をアセトアルデヒドに変換するピルビン酸脱炭酸酵素と、アセトアルデヒドをエタノールに変換するアルコール脱水素酵素の遺伝子をそれぞれ発現させる必要がある。そこで、プロモーター領域とこれらの遺伝子を組み合わせることで、*Brevibacillus* 属細菌がこれらの遺伝子を発現するかどうかを明らかにした。さらに、遺伝子を発現させることができた組換え *Brevibacillus* 属細菌が、ピルビン酸やグルコースからエタノールを生産可能であるかを確認した。

また、セルロースを分解可能にするためには、エンドグルカナーゼ、セロビオヒドロラーゼ、 α -グルコシダーゼの遺伝子を発現させ、組換え酵素を分泌させる必要がある。そこで、*Brevibacillus* 属細菌に組換え酵素を分泌させるために必要なプロモーター領域とシグナルペプチドを検討した。その後、複数種類のエンドグルカナーゼ、セロビオヒドロラーゼ、 α -グルコシダーゼの遺伝子をそれぞれプロモーター領域、シグナルペプチドと組み合わせることで導入し、分泌された組換え酵素の活性が高いものをスクリーニングした。

3. 研究の方法

(1) ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子、アルコール脱水素酵素遺伝子の発現とエタノール生産

Brevibacillus choshinensis が有する *gap* オペロンのプロモーター領域と、*Zymomonas mobilis* 由来のピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子、アルコール脱水素酵素遺伝子を組み合わせることで *pHY300PLK* ベクターに挿入し、*Brevibacillus choshinensis* NBRC 15518 と *Brevibacillus brevis* JCM 8970 それぞれに導入した。得られた組換え体について、菌体内のピルビン酸脱炭酸酵素、アルコール脱水素酵素の活性を測定することで遺伝子の発現を確認した。また、グルコース、ピルビン酸ナトリウムを含む培地を用い、それぞれ振盪培養と静置培養の2通りの方法で培養し、培養後の培地に含まれるエタノール濃度を測定することでエタノール生成能を確認した。

(2) 各種セルロース分解酵素遺伝子の発現と組換え酵素の分泌

セルロース分解酵素の遺伝子を *pHY300PLK* ベクターに挿入して NBRC 15518 株に導入し、分泌させた組換え酵素の活性を比較することで活性が高いものをスクリーニングした。

エンドグルカナーゼ遺伝子としては、*Saccharophagus degradans* 由来の *cel5D*、*cel5H*、*cel9B*、*Clostridium thermocellum* 由来の *celA*、*celB*、*celD*、*cel5L* の7種類を発現させることを試みた。また、*Geobacillus stearothermophilus* が有するアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域、シグナルペプチド、ターミネーター領域と組み合わせることで発現させることにより、それぞれの組換えエンドグルカナーゼが菌体外に分泌するようにした。それぞれの組換え体を AZCL-HE-Cellulose が含まれる寒天培地に穿刺して培養し、コロニー周辺に形成される青色領域の有無によりエンドグルカナーゼの活性の有無を判断した。さらに、活性が確認できた組換え体については、液体培養した培養液の上澄みを CMC に作用させ、生成した還元糖濃度を測定することにより分泌されたエンドグルカナーゼの活性を評価した。

セロビオヒドロラーゼ遺伝子としては、*Saccharophagus degradans* 由来の *cel6A*、*Clostridium thermocellum* 由来の *cel48y*、*celK* の3種類を発現させることを試みた。また、*Bacillus*

licheniformis が有するアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域、シグナルペプチド、ターミネーター領域と組み合わせて発現させることにより、それぞれの組換えセロビオヒドロラーゼが菌体外に分泌するようにした。それぞれの組換え体を液体培養し、培養液の上澄みを CMC、セルロースに作用させ、生成した還元糖濃度を測定することにより分泌されたセロビオヒドロラーゼの活性を評価した。

-グルコシダーゼ遺伝子としては、*Clostridium thermocellum* 由来の *bgIA*、*Thermoanaerobacter brockii* 由来の *cgIT* の 2 種類を発現させることを試みた。どちらも、*Bacillus amyloliquefaciens* が有するアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域、シグナルペプチド、ターミネーター領域と組み合わせて発現させることにより、それぞれの組換え -グルコシダーゼが菌体外に分泌するようにした。*cgIT* については、シグナルペプチドを *Bacillus subtilis* が有するペプチダーゼ由来のものに交換したのもも構築した。それぞれの組換え体を液体培養し、培養液の上澄みを PNP (p-ニトロフェニル-D-グルコシド) に作用させ、発色の有無により分泌された -グルコシダーゼの活性の有無を確認した。

4. 研究成果

(1) ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子、アルコール脱水素酵素遺伝子の発現とエタノール生産

NBRC 15518 株、JCM 8970 株に、それぞれピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子とアルコール脱水素酵素遺伝子を組み合わせて導入したところ、どちらの株も両方の遺伝子が発現することが確認できた。また、組換え体のエタノール生産能を確認したところ、どちらの株もピルビン酸を含む培地で静置培養した場合のみ低収率ではあるもののエタノールを生産可能であることがわかった。ここで、ピルビン酸からのエタノール収率が低かったことから、ピルビン酸がエタノール以外のものに代謝される割合が高いことが考えられた。また、酸素が供給される振盪培養においてエタノールが生成されなかったこと、グルコースを含む培地で静置培養した場合にグルコースが消費されなかったことから、酸素供給の有無に影響される NAD/NADH の補酵素バランスや、ATP と ADP の量が代謝に影響していることが予想された。

今後、組換え体の代謝を詳細に解析し、不足している物質を補ったり、エタノール以外のものへの代謝を抑えたりする工夫により、ピルビン酸やグルコースから高収率でエタノールが生産可能になると期待された。さらに、得られた成果は、エタノールを生産するための遺伝子を交換することで、乳酸などの有機酸類、ブタノールなどのアルコール類をはじめとする様々な有用物質を生産することにも応用することができ、バイオマスからの幅広い有用物質生産に繋がれると考えられた。

(2) エンドグルカナーゼ遺伝子の発現と組換え酵素の分泌

NBRC 15518 株に *ce15H* を導入した組換え体を、AZCL-HE-Cellulose が含まれる寒天培地で培養した様子を図 1 に示す。左側の pHY300PLK (ベクターのみ) を導入した組換え体のコロニー周辺は変化がないのに対し、右側の *ce15H* を導入した組換え体のコロニー周辺は青色領域が形成された。この青色領域は、青色色素が結合している不溶性の基質が分解して可溶性となり、寒天培地中に拡散して形成されるものである。そのため、*ce15H* を導入した組換え体はセルロースを分解可能であると判断され、NBRC 15518 株が *ce15H* を発現すること、その組換え酵素を分泌することが確かめられた。また、*ce19B*、*ce1A*、*ce1D* の 3 種類を導入した組換え体についても、青色領域を形成したことから、それらの遺伝子の発現、組換え酵素の分泌を確認することができた。ただし、それ以外の遺伝子を導入した組換え体については青色領域を形成せず、発現していない、もしくは組換え酵素が分泌されていないことが考えられた。

次に、遺伝子の発現と組換え酵素の分泌が確認できた 4 種類のエンドグルカナーゼ遺伝子を導入した組換え体について、培養液の上澄みを CMC に作用させ、生成した還元糖の濃度により分解活性を比較した。その結果を図 2 に比較する。導入した遺伝子により差が生じ、*ce15H* を導入した組換え体の培養液上澄みが最も高い濃度となった。このことから、本研究で用いたエンドグルカナーゼ遺伝子の中では、*ce15H* がその発現量、組換え酵素の活性、もしくは分泌量が最も高いと考えられた。



図 1 組換え体による AZCL-HE-Cellulose の分解

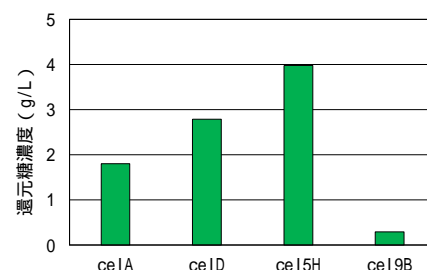


図 2 CMC の分解により生成した還元糖の濃度の比較

(3) セロビオヒドロラーゼ遺伝子の発現と組換え酵素の分泌

3種類のセロビオヒドロラーゼ遺伝子を導入した組換え体について、培養液の上澄みを CMC、セルロースに作用させて生成した還元糖の濃度を図3に比較する。CMC、セルロースどちらを用いた場合も、*celK* を導入した組換え体の培養液上澄みが最も高い濃度となった。また、*cel48y* については、CMC よりもセルロースの方が高い濃度となっており、可溶性基質よりも不溶性基質の方が反応しやすい可能性も示唆された。本研究で用いたセロビオヒドロラーゼ遺伝子の中では、*celK* がその発現量、組換え酵素の活性、もしくは分泌量が最も高いと考えられた。

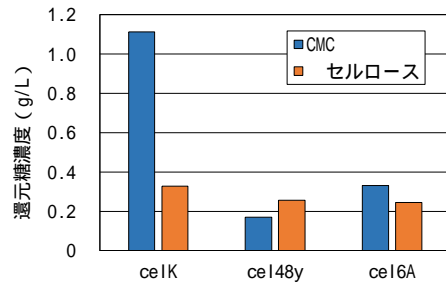


図3 CMC、セルロースの分解により生成した還元糖の濃度の比較

(4) α -グルコシダーゼ遺伝子の発現と組換え酵素の分泌

bgIA、*cgIT*の2種類の α -グルコシダーゼ遺伝子を、*B. amyloliquefaciens*が有するアミラーゼ遺伝子のシグナルペプチドと組み合わせて導入した組換え体について、培養液の上澄みをPNPGに作用させた。その結果、*bgIA*は発色により活性が確認できたものの、*cgIT*は活性が確認できなかった。しかしながら、*cgIT*と組み合わせるシグナルペプチドを、*B. subtilis*が有するペプチダーゼ由来のものに交換したところ、*bgIA*と同等の活性が確認できた。

以上の結果、*Brevibacillus*属細菌に発現させ、組換え酵素を分泌させるのに適したエンドグルカナーゼとセロビオヒドロラーゼの遺伝子をスクリーニングすることができ、 α -グルコシダーゼの遺伝子の発現と組換え酵素の分泌も確認することができた。今後、 α -グルコシダーゼの遺伝子についても活性が高いものを明らかにし、エンドグルカナーゼ、セロビオヒドロラーゼの遺伝子と組み合わせて*Brevibacillus*属細菌に導入することで、セルロースをグルコースに分解可能な組換え*Brevibacillus*を構築できると期待された。また、遺伝子の発現や組換え酵素の分泌が可能となるプロモーター領域とシグナルペプチドも明らかにできたことから、これらの成果はセルロース以外の多糖類の分解にも応用可能であると考えられた。さらに、有用物質を生産するための遺伝子の導入や、高収率で生産するための工夫を組み合わせることにより、多糖類から直接有用物質を生産可能になると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柳澤満則、有賀修、Syazni、中崎清彦
2. 発表標題 組換えBrevibacillusと組換え酵母の2種培養によるアガロースからのエタノール生産
3. 学会等名 化学工学会第48回秋季大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------