様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　５ 月 ３０ 日現在

機関番号：１４５０１
研究種目：基盤研究(B)（特設分野研究）
研究期間：2019～2021
課題番号：１９ＫＴ０００９

研究課題名（和文）植物の資源ポテンシャルを活用した微生物発酵による新しいバイオリファイナリー

研究課題名（英文）New biorefineries: Extended use of plant biomass for microbial fermentation towards sustainability

研究代表者
川口　秀夫（Kawaguchi, Hideo）

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・特命准教授

研究者番号：５０４６３８７３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　14,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、セルロース系バイオマスからの発酵生産を飛躍的に効率化するための、植物本来の有用性を活かした新しい農資源の開発に応用する基盤技術の確立を目指した。
バイオマス植物として注目されるソルガムをモデルに、その搾汁液および搾汁後の残渣の酵素糖化液が、芳香族化合物である3-amino-4-hydroxybenzoic acid (3,4-AHBA) の発酵原料として使用可能であることを明らかにした。また、この植物由来の２つの成分を混合した“再構成バイオマス糖液”を使用することで、各原料を単独で使用する場合よりも、3,4-AHBAの生産性が飛躍的に向上することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究では、持続可能な社会実現のカギを握る脱炭素技術を確立するために、再生可能な植物の資源ポテンシャルを活用した微生物発酵による新しいモノづくりの技術とそのメカニズムを究明した。セルロース糖化液と搾汁液を混合した“再構成バイオマス糖液”の利用により、セルロース残渣利用の問題点である生産性の低下を克服できることを証明し、植物資源からバイオプラスチックを生産する実現可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Biorefinery is an alternative process for petrochemical industry, and uses renewable feedstocks, such as biomass, for the production of fuels and chemicals towards circular economy. To produce value-added aromatic monomers from lignocellulosic biomass, enhanced effects of plant juice on biomonomer fermentation was investigated.
A high-biomass crop, Sorghum (Sorghum bicolor (L.) Moench), was selected as a model lignocellulosic biomass, and both of the juice and lignocellulosic residue of sorghum biomass was used for substrates for microbial production of a value-added aromatic monomer of 3-amino-4-hydroxybenzoic acid (3,4-AHBA). Enhanced production of 3,4-AHBA was observed from “re-constituted biomass sugar solution” composed of juice and enzymatic hydrolysate of lignocellulosic residue of sorghum biomass, and the enhanced mechanism was investigated.

研究分野：応用微生物学

キーワード：コリネ型細菌　発酵　ソルガム　代謝　搾汁液　植物資源　バイオマス

※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

ソルガムの搾汁液を原料とする発酵生産については、酵母によるエタノール発酵の例が多数報告されているが、化成品生産への応用については、申請者らによる 3-amino-4-hydroxybenzoic acid (3,4-AHBA)の実施例以外に報告がほとんどなかった。芳香族化合物の発酵生産に関する研究は、遺伝子組換え大腸菌やコリネ型細菌を用いた報告が 2010 年以降特に増えており、終濃度が 10 g/L を超える高い生産性を示すものもある。しかし、実バイオマスを原料とする実施例は極めて限定的で、とりわけセルロースバイオマスの利用では 10 g/L を超える高い生産性が報告されていなかった。代謝工学や合成生物学が著しく進歩し普及する一方で、バイオマス利用は発酵阻害の問題が依然として未解決であり [(1)]、持続可能な社会の構築に向けて解決すべき課題となっている。

２．研究の目的

バイオプロセスにおいて、生態系の生産者である植物を、その分解者である微生物が効率的に利用できないのは何故か？このバイオリファイナリーにおける核心的な問題点の原因として、成分の分離と個別利用を基本コンセプトとする従来プロセスの変換を着想した。草本バイオマスの搾り汁（搾汁液）成分により、芳香族化合物の微生物発酵生産が５倍以上増加する現象を見出しており [(2)]、本研究では、これまでのバイオリファイナリーの既成概念、すなわち植物主成分の分離と個別利用に代わる、成分変換と再構成により植物の資源のポテンシャルを最大活用する新しい農資源の活用技術の開発を目指した。バイオリファイナリーの長年の課題であるセルロース利用における発酵阻害を克服するため、ソルガムの搾汁液による代謝促進作用メカニズムを解明し、セルロース糖化液からの発酵生産を飛躍的に効率化する、セルロース糖化液と搾汁液を混合した新しいバイオマス資源“再構成バイオマス糖液”を開発し（図１）、搾汁液の代謝促進作用活用により芳香族化合物発酵生産のセルロース利用を飛躍的に効率化することを目指した。

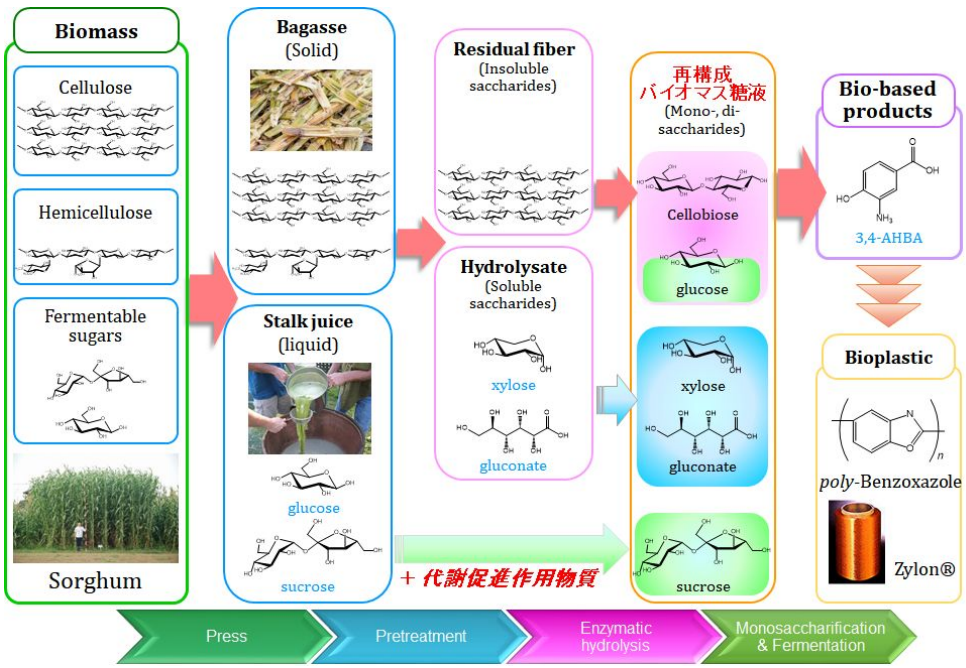

図１　再構成バイオマス糖液を利用した 3,4-AHBA 生産プロセス

３．研究の方法

3.1．バイオマスの調製と成分分析

複数のソルガム品種を対象に、搾汁液に含まれる発酵性糖（ショ糖、グルコース、フルクトース）および代謝促進候補化合物（アミノ酸・ビタミン類）の濃度を測定した。また、ソルガムの（茎部）残渣をセルロースバイオマスとして、希硫酸前処理した固体各分を調製し、セルラーゼを用いた加水分解により酵素糖化液を調製した。調製したセルロース糖化液は、GC-MS を用いて糖（glucose および xylose）および発酵阻害候補化合物の含有を測定した。また、調製した搾汁液とバイオマス糖化液を任意の割合で混合し、発酵原料として使用する“再構成バイオマス糖液”を調製した。

3.2．搾汁液による 3,4-AHBA 生産促進作用の解析

ソルガム搾汁液による 3,4-AHBA 発酵生産の促進作用メカニズムを、RNAseq を用いた網羅的遺伝子発現解析により調べた。ソルガムの搾汁液はショ糖を主要な構成糖とし、その他にグルコースおよびフルクトースを多く含有する。そこで、次の３つの培養条件（A）ショ糖を単一炭素源とする場合、（B）ショ糖とグルコースおよびフルクトースで構成する混合糖を炭素源とする場合、（C）搾汁液を炭素源とする場合、を設定して、3,4-AHBA を発酵生産している細胞から抽出した total RNA の遺伝子発現プロファイルを解析した。この３条件の組合せを比較解析することで、搾汁液に由来する（i）混合糖による作用と（ii）糖以外の成分による作用を個別に解析した。

表１　ソルガム２品種の搾汁液成分

Sorghum		品種A	品種B
糖			
Sucrose	g/L	148.0	112.3
Glucose	g/L	22.2	11.8
Fructose	g/L	12.7	7.9
アミノ酸			
Asp	mg/L	0	0
Thr	mg/L	0	0
Ser	mg/L	0	0
Asn	mg/L	0	0
Glu	mg/L	0	0
Gln	mg/L	0	0
Gly	mg/L	0	0
Ala	mg/L	0	0
Val	mg/L	0	0
Cystine	mg/L	0	0
Met	mg/L	0	0
Ile	mg/L	0	0
Leu	mg/L	0	0
Tyr	mg/L	0	0
Phe	mg/L	0	0
Trp	mg/L	0	0
His	mg/L	0	0
Lys	mg/L	0	0
Arg	mg/L	0	0

Sorghum		品種A	品種B
ミネラル			
Ca	mg/L	355	382
Fe	mg/L	0.90	1.15
Mn	mg/L	0.92	0.55
Cu	mg/L	0.29	0.47
Zn	mg/L	1.49	1.91
Mg	mg/L	159	220
ビタミン			
β-カロテン	μg/L	<46.7	<47.8
ビタミンB1	μg/L	0.187	0.001
ビタミンB2	μg/L	0.187	<0.096
ナイアシン	μg/L	2.801	<0.955
パントテン酸	μg/L	5.322	0.028
ビタミンB6	μg/L	0.747	0.007
ビオチン	μg/L	84.03	0.287
葉酸	μg/L	28.01	<9.55
ビタミンC	μg/L	74.70	0.287
ビタミンD	μg/L	2.33	<2.39
α-トコフェロ	μg/L	<0.934	<0.955
β-トコフェロ	μg/L	<0.934	<0.955
γ-トコフェロ	μg/L	<0.934	<0.955
ビタミンK1	μg/L	<9.34	<9.55
ビタミンK2	μg/L	<9.34	<9.55

3.3．再構成バイオマス糖液からの 3,4-AHBA 生産

セルロース糖化液と搾汁液を混合した“再構成バイオマス糖液”を調製し、これを炭素源とする 3,4-AHBA の発酵生産を、セルロース糖化液または搾汁液を単独炭素源とする条件と比較し、3,4-AHBA 生産促進作用を評価した。

４．研究成果

4.1．バイオマスの調製と成分分析

２品種のソルガム品種を対象に、搾汁液に含まれる発酵性糖（ショ糖、グルコース、フルクトース）および代謝促進候補化合物（アミノ酸・ビタミン類）の濃度を比較した。その結果、いずれの品種も、ショ糖を主成分とする糖類だけでなく、アミノ酸やミネラル、ビタミン類を含むことが明らかとなった（表１）。アミノ酸はアスパラギン（Asn）とアスパラギン酸（Asp）がいずれの品種でも優占しているのが特徴的で、次いでグルタミン酸（Glu）、グルタミン（Gln）が多

かった。ビタミン類では、発酵性細菌であるコリネ型細菌の必須アミノ酸であるビオチンが含まれていた。全体的には、品種Bよりも品種Aの方が栄養価が高い傾向が認められたが、この差異には品種間差に加えて、開花時期が大きく異なる２品種の収穫時期の違い
による気候差の影響も考慮する必要がある。

4.2．搾汁液による3,4-AHBA生産促進作用の解析

ソルガム搾汁液による3,4-AHBA発酵生産の促進作用メカニズムを、RNAseqを用いた網羅的遺伝子発現解析により調べた。(A) ショ糖を単一炭素源とする場合、(B) ショ糖とグルコースおよびフルクトースで構成する混合糖を炭素源とする場合、(C) 搾汁液を炭素源とする場合、の３条件における細胞の遺伝子発現プロファイルを解析し、条件AとBの比較からi）混合糖による作用を、条件BとCの比較から(ii)糖以外の成分による作用を、それぞれ求めた。混合糖（ショ糖とグルコースおよびフルクトース）の影響では、ショ糖単独とくらべて22遺伝子の発現量が特異的に増加しており、85遺伝子の発現量が特異的に低下していた（図２）。混合糖による発現量の増加群には、膜輸送タンパク質をコードする遺伝子に加えて、呼吸鎖などエネルギー合成に関連する遺伝子が含まれていた。一方、糖以外の搾汁液成分による影響では、892遺伝子の発現量が特異的異増加し、541遺伝子の発現量が特異的に低下していた。搾汁液成分による発現量の増加群には、膜輸送タンパク質をコードする遺伝子に加えて、ストレス応答や細胞修復系に関連する遺伝子が含まれていた。また、搾汁液成分による発現量の低下群には、膜輸送タンパク質をコードする遺伝子に加えて、アミノ酸代謝や細胞分裂、呼吸鎖に関連する多様な遺伝子群が含まれていた。混合糖と搾汁液成分に共通した発現変動を示した遺伝子数は限定的であり、今回の解析を通じて、混合糖による作用と糖以外の搾汁液成分による作用のほとんどは、独立した影響因子であることを明らかにした。

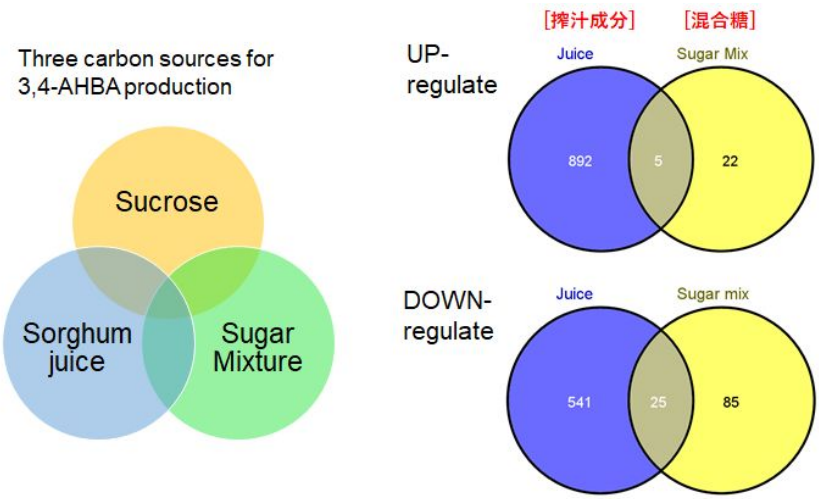

図２　ソルガム搾汁液が3,4-AHBA発酵に与える影響の解析：RNAseqの比較条件（左）と遺伝子発現量のベン図解析（右）

4.3．再構成バイオマス糖液からの3,4-AHBA生産

搾汁液によるセルロース糖化液の発酵阻害緩和効果を検証するために、セルロース糖化液と搾汁液を１対１で混合した“再構成バイオマス糖液”を調製し、搾汁液あるいはセルロース糖化液をそれぞれ炭素源とする培地と3,4-AHBAの生産を比較した。培養条件は、3,4-AHBA生産が最大となる、酸素制限条件（溶存酸素濃度 0 ppm）を採用した[(3)]。その結果、3,4-AHBAの生産は、セルロース糖化液＜搾汁液＜再構成バイオマス糖液の順に高く、再構成バイオマス糖液では、セルロース糖化液の2.7倍、搾汁液の1.6倍に相当する、終濃度5.5 g/Lの3,4-AHBAを得ることが出来た(図3)。細胞の増殖は搾汁液単独が最も良く、セルロース糖化液では初期増殖速度から

阻害的な作用が認められ、再構成バイオマス糖液では両条件の中間的な増殖が認められた。ショ糖、グルコース、フルクトースを合算した total sugar の消費では、消費速度は搾汁液で最も高く、他の条件では同程度の速度を示した。以上の結果より、再構成バイオマス糖液はセルロース糖化液で認めれる発酵阻害の緩和作用を示すだけでなく、搾汁液で認められる過剰な増殖による炭素消費の抑制作用を示すことで、3,4-AHBA の生産を最大化させることが明らかとなった。

以上の結果より、本研究を通じてバイオリファイナリーにおける核心的な問題点である発酵阻害を、搾汁液による促進作用で解消できることを証明した。成分の分離と個別利用を基本コンセプトとする現在のバイオプロセスの問題点を明らかにし、植物本来の組成を再構成することで、植物資源のポテンシャルを最大化する発酵生産方式、すなわち植物成分の変換と再構成による新しい農資源利用法の有効性を証明することができた。

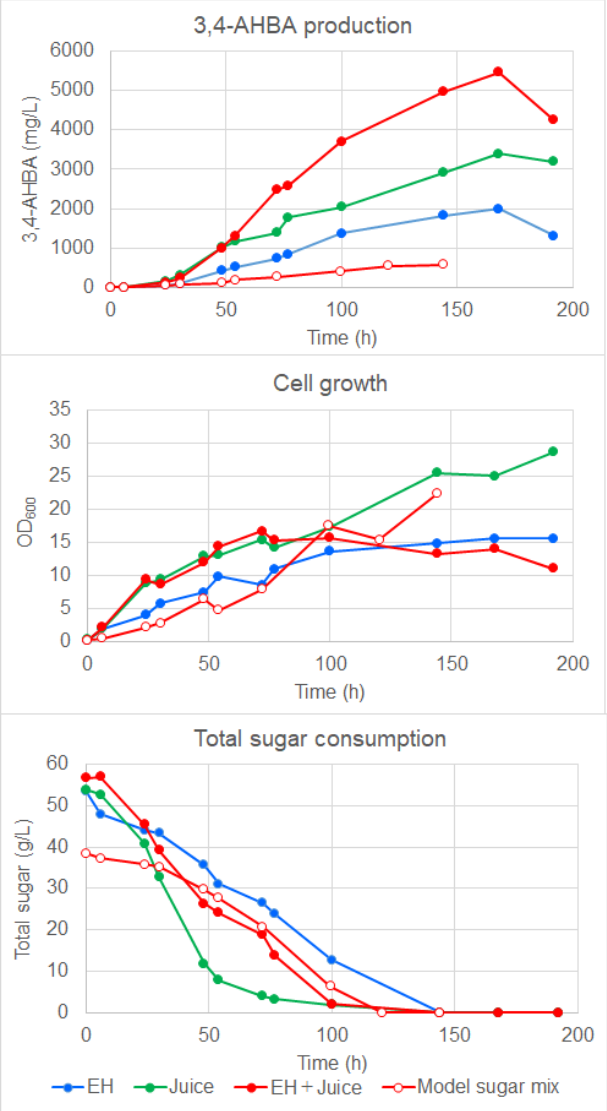

図 3　遺伝子組換えコリネ型細菌によるソルガム由来の再構成バイオマス糖液からの 3,4-AHBA 生産.
炭素源：EH，バイオマス糖化液；Juice，搾汁液；EH+Juice，再構成バイオマス糖液；Model sugar mix，再構成バイオマス糖液の糖組成を模擬したショ糖、グルコース、フルクトース標品の混合糖

＜引用文献＞

1. Kawaguchi H, Hasunuma T, Ogino C, Kondo A. Bioprocessing of bio-based chemicals produced from lignocellulosic feedstocks. *Curr Opin Biotechnol*., 42:30-39 (2016).
2. Kawaguchi H, Sasaki K, Uematsu K, *et al*. 3-Amino-4-hydroxybenzoic acid production from sweet sorghum juice by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Bioresour Technol*., 198:410-417 (2015).
3. Kawaguchi H, Hasunuma T, Ohnishi Y, *et al*. Enhanced production of γ-amino acid 3-amino-4-hydroxybenzoic acid by recombinant *Corynebacterium glutamicum* under oxygen limitation. *Microb Cell Fact*., 20:228 (2021).

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　2件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　2件）

１．著者名 Kawaguchi Hideo、Sazuka Takashi、Kondo Akihiko	４．巻 9
２．論文標題 Complete and Draft Genome Sequences of Amino Acid-Producing Corynebacterium glutamicum Strains ATCC 21799 and ATCC 31831 and Their Genomic Islands	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Microbiology Resource Announcements	６．最初と最後の頁 e00430-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00430-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Kawaguchi Hideo、Hasunuma Tomohisa、Ohnishi Yasuo、Sazuka Takashi、Kondo Akihiko、Ogino Chiaki	４．巻 20
２．論文標題 Enhanced production of γ-amino acid 3-amino-4-hydroxybenzoic acid by recombinant Corynebacterium glutamicum under oxygen limitation	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Microbial Cell Factories	６．最初と最後の頁 228
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12934-021-01714-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計16件（うち招待講演　4件／うち国際学会　4件）

１．発表者名 Hideo Kawaguchi, Tatsuo Kaneko, Takashi Sazuka, Tomohisa Hasunuma, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo
２．発表標題 Microbial production of aromatic compounds applied to synthesize bioplastics from plant biomass
３．学会等名 JAIST World Conference 2020—International Symposium for Innovative Sustainable Materials & The 7th International Symposium for Green-Innovation Polymers (GRIP2020)（招待講演）（国際学会）
４．発表年 2020年～2021年

１．発表者名 川口 秀夫、蓮沼 誠久、大西 康夫、佐塚 隆志、荻野千秋、近藤 昭彦
２．発表標題 溶存酸素濃度が γ-アミノ酸 3-amino-4-hydroxybenzoic acid を生産する組換えコリネ型細菌の代謝プロファイルに与える影響
３．学会等名 第6回デザイン生命工学研究会
４．発表年 2020年～2021年

１．発表者名 川口 秀夫
２．発表標題 微生物を活用したバイオリファイナリー研究：植物からつくるバイオプラスチック
３．学会等名 北勢バイオコミュニティ研究会キックオフセミナー（招待講演）
４．発表年 2020年～2021年

１．発表者名 川口 秀夫、宮崎 翔子、蓮沼 誠久、大西 康夫、佐塚 隆志、荻野 千秋、近藤 昭彦
２．発表標題 溶存酸素濃度の制御による組換えコリネ型細菌を用いたグルコースからの3-amino-4-hydroxybenzoic acid発酵の促進作用機構解析
３．学会等名 2020年度グラム陽性細菌ゲノム機能会議
４．発表年 2020年～2021年

１．発表者名 Hideo Kawaguchi, Shoko Miyazaki, Tomohisa Hasunuma, Yasuo Ohnishi, Takashi Sazuka, Akihiko Kondo, Chiaki Ogino
２．発表標題 Mechanism of enhanced production of the γ-amino acid 3-amino-4-hydroxybenzoic acid under oxygen limitation by recombinant Corynebacterium glutamicum
３．学会等名 The 5th Annual Meeting of Living Systems Design Research
４．発表年 2020年

１．発表者名 川口 秀夫、宮崎 翔子、蓮沼 誠久、荻野 千秋、佐塚 隆志、近藤 昭彦
２．発表標題 メタボローム解析が明らかにする低酸素濃度におけるコリネ型細菌の芳香族化合物代謝促進機構と代謝改変によるソルガム搾汁液からの物質生産
３．学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
４．発表年 2020年

１．発表者名 川口 秀夫、福本 妙子、佐塚 隆志
２．発表標題 ソルガムの酵素糖化効率品種間差を決定する物理化学特性の探索
３．学会等名 第10回 ソルガムワークショップ
４．発表年 2019年

１．発表者名 川口 秀夫、佐々木 大介、福本 妙子、森田 健太、竹中 武蔵、冨田 康平、佐塚隆志、松本 拓也、西野孝、近藤 昭彦
２．発表標題 日本農芸化学会関西・中部支部2019年度合同神戸大会
３．学会等名 微生物を活用してバイオマスからバイオプラッスチックを作る
４．発表年 2019年

１．発表者名 川口 秀夫
２．発表標題 微生物を活用してバイオマスからバイオプラッスチックを作る
３．学会等名 みえバイオリファイナリー研究会公開セミナー（招待講演）
４．発表年 2019年

１．発表者名 Hideo Kawaguchi, Tomohisa Hasunuma, Yasuo Ohnishi, Takashi Sazuka, Akihiko Kondo, Chiaki Ogino
２．発表標題 Amino acid metabolism of Corynebacterium glutamicum under oxygen limitation
３．学会等名 World Microbe Forum 2021（国際学会）
４．発表年 2021年～2022年

１．発表者名 Hideo Kawaguchi, Tomohisa Hasunuma, Yasuo Ohnishi, Takashi Sazuka, Akihiko Kondo, Chiaki Ogino
２．発表標題 Metabolome analysis-based design of a metabolic pathway in Corynebacterium glutamicum for 3-amino-4-hydroxybenzoic acid production under oxygen limitation
３．学会等名 Metabolic Engineering 14（国際学会）
４．発表年 2021年～2022年

１．発表者名 Hideo Kawaguchi, Dao Duy Hanh, Yasuo Ohnishi, Takashi Sazuka, Tatsuo Kaneko, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo
２．発表標題 Microbial monomer production from lignocellulosic biomass for bioplastic synthesis
３．学会等名 The 26th Symposium of Young Asian Biological Engineers’ Community (YABEC 2021)（国際学会）
４．発表年 2021年～2022年

１．発表者名 川口 秀夫、蓮沼 誠久、大西 康夫、佐塚 隆志、荻野 千秋、近藤 昭彦
２．発表標題 酸素制限条件におけるコリネ型細菌のアミノ酸代謝についてのメタボローム解析
３．学会等名 日本農芸化学会2022年度京都大会
４．発表年 2021年～2022年

１．発表者名 川口 秀夫
２．発表標題 微生物を活用した循環型社会の構築：カーボンニュートラルな植物資源からつくる新しいバイオプラスチック
３．学会等名 2021年度 第12回グリーンソサエティーセミナー（招待講演）
４．発表年 2021年～2022年

１．発表者名 川口 秀夫
２．発表標題 微生物発酵によるソルガムバイオマスからのものづくり
３．学会等名 第12回 ソルガムワークショップ
４．発表年 2021年～2022年

１．発表者名 川口 秀夫、蓮沼 誠久、大西 康夫、佐塚 隆志、荻野 千秋、近藤 昭彦
２．発表標題 酸素制限による遺伝子組換えコリネ型細菌を用いた3-amino-4-hydroxybenzoic acid 発酵の促進作用
３．学会等名 第73回日本生物工学会大会
４．発表年 2021年～2022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
研究分担者	蓮沼　誠久 (Hasunuma Tomohisa) (20529606)	神戸大学・先端バイオ工学研究センター・教授 (14501)	

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