

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780080

研究課題名（和文） バイオプロセスを適用したリグニン誘導ケミカルからの有用物質生産

研究課題名（英文） Production of value-added chemicals from lignin-related materials using biotechnological process

研究代表者

羽部 浩（HABE HIROSHI）

独立行政法人産業技術総合研究所・環境化学技術研究部門・主任研究員

研究者番号：20313075

研究成果の概要（和文）：微生物が持つ有機硫黄化合物の代謝能を上手く活用し、余剰バイオマスと考えられる黒液中の主成分であるジメチルスルフィド等から有用物質を生産することでバイオマス有効利用技術の開発を行った。細菌が有する硫黄代謝に関与する酵素遺伝子群（硫酸飢餓応答遺伝子と呼ばれる1種のストレス応答遺伝子群）を効率よく発現させるような組換え微生物を創製し、効率的な含硫アミノ酸の生産プロセスの開発を試みた。

研究成果の概要（英文）：Sulfur is an essential element for bacterial growth and is normally acquired through the assimilation of inorganic sulfate. However, in some environments, sulfate may not be freely available because inorganic sulfate constitutes less than 5% of the total sulfur in the environments. Thus, several bacterial species have evolved the ability to use a wide variety of organosulfur compounds such as dimethyl sulfide (DMS), and both the genes and enzymes involved in the use of such compounds have been studied in detail. We tried to develop a method for production of useful chemicals such as sulfur amino acids from biomass-derived DMS using such sulfur-starvation-induced enzymes.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：応用微生物

キーワード：バイオリファイナリー・ジメチルスルフィド・硫酸飢餓応答・含硫アミノ酸・メチオニン

1. 研究開始当初の背景

近年、脱石油資源あるいはCO₂排出削減等の地球環境問題に対応する新たな技術的概念としてバイオマスリファイナリー（以下、バイオリファイナリー）が注目されている。米国やブラジルでは、とうもろこし、さとう

きびなどデンプン系バイオマスを原料としたバイオリファイナリーを展開しているが、日本におけるその生産量や食料との競合を考えると、リグニンのような未利用バイオマスを原料とするほうが望ましい。例えば、日本での木材パルプ生産の8割強を占めてい

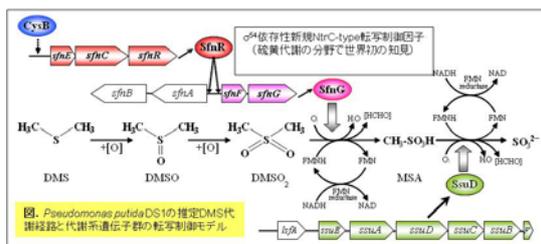
るクラフトパルプ (KP) の製造過程において、 Na_2S 等を用いて高温・高圧でリグニンを分解、可溶化してパルプを取り出すが、その際に有機性廃液 (以下、黒液と呼ぶ) が大量に副生する。黒液は濃縮後、ボイラー中で燃焼されているため、熱エネルギーとして利用されているが、実際にはこの黒液燃焼で得られるエネルギーは KP 製造に必要なエネルギーより大きい。これは地球環境問題から見ると余剰の CO_2 を排出していることになり、余剰黒液の有効利用法の開発が求められている。黒液中には、糖やリグニン由来の芳香族、有機硫黄化合物等が含まれるが、そのうちジメチルスルフィド (DMS) は、1950 年代に濃縮黒液から工業生産が行われたほど含有量が高い。

2. 研究の目的

我々はこれまでに DMS を唯一の“硫黄源”として生育可能な土壌細菌 *Pseudomonas putida* に関して、DMS をどのように代謝して硫黄源を獲得するのか分子レベルで解析を行ってきた。一般に、細菌は他の微生物と同様その生育に硫黄を必要とするが、通常は最も利用しやすい無機硫酸イオン (SO_4^{2-}) を硫黄源とする。しかし自分の周辺環境から自由に SO_4^{2-} を摂取できない、「硫酸飢餓」と呼ばれる一種の硫黄欠乏状態に陥ると、その環境に存在する様々な有機化合物を分解して硫黄源とする能力を持っている。土壌中の硫黄元素はその 98% が有機物の形で存在しているため、土壌細菌にとってはこの硫酸飢餓応答機構が土壌環境中における重要な生存戦略となる。DMS を唯一の“硫黄源”として生育可能な土壌細菌 *Pseudomonas putida* DS1 株を単離し、本菌株が DMS をどのように代謝して硫黄源を獲得するのか解析を行ってきたが (図)、その結果、DS1 株は、DMS をジメチルスルホキシド (DMSO)、ジメチルスルホン (DMSO_2)、メタンスルホン酸 (MSA)、亜硫酸イオンへと順次代謝して硫黄源とするが、これら代謝に関与する遺伝子は全て SO_4^{2-} 濃度が低い「硫酸飢餓状態」でのみ発現することが示されている。基礎研究での重要な成果として、我々は DMSO_2 から MSA への代謝に関与する新規な炭素-硫黄結合開裂酵素遺伝子 *sfnG* を世界で初めて単離したが、それ以上に興味深かった現象は、細菌の硫黄代謝系遺伝子 (この場合 *sfnFG*) の転写調節に、 σ^{54} 依存性 NtrC family の転写制御因子 SfnR が関与していることを世界で初めて明らかにしたことである。というのも、これまで大腸菌や *Pseudomonas* などの細菌で報告されている硫黄代謝に関与する転写制御因子は、全て σ^{70} 依存性の LysR family であったため、現在この新規転写制御因子 SfnR の硫黄代謝における役割に大きな興味を持たれている。また、 DMSO_2 から MSA への代謝系酵素遺伝子を含む

sfnFG オペロンと、MSA から亜硫酸イオンへの代謝系酵素遺伝子を含む *ssuEADCBF* オペロンは、全く異なる転写制御因子によって、それぞれの発現が調節されていることが明らかとなった。すなわち、もし未同定の *ssu* オペロン転写制御因子を発見して、転写調節機構を詳細に解析することができれば、*ssuD* の発現を ON/OFF (または発現量を調節) する方法が考案できるため、DMSO からの MSA 生産を人為的にコントロールできるようになる。例えば、*ssuD* の発現を ON にしている場合は、DS1 株が活性化するのに必要な硫黄源が得られることになるが、あまり SO_4^{2-} 濃度が高くなってしまうと、硫酸飢餓応答性の DMSO 代謝遺伝子の発現が抑制されてしまうことになるため MSA 生産量は減少する。一方、*ssuD* の発現を OFF にしている場合、DS1 株は休止菌体状態となるが、DMSO 代謝系酵素群が働くので MSA 生産量は増加していく。通常、ある化学物質の分解系遺伝子群は同じオペロン上に存在しており、同一の転写制御を受ける場合が多いことから、このように人為的に代謝系の制御を行うことは難しい。

Pseudomonas putida (DS1 株および KT2440 株) は、DMS を図に示すような代謝経路を経て、システインやメチオニン (Met) といった含硫アミノ酸へ変換する。そして我々は、これら代謝に関与する遺伝子を既に取り得もしくは特定しており、これら遺伝子が SO_4^{2-} 濃度が低い「硫酸飢餓状態」でのみ発現することを明らかにしている。基礎研究での重要な成果として、3つの発見をしており、一点目は、*Pseudomonas putida* が黒液中の主要な低分子構成成分である芳香族を炭素源、かつ DMS を硫黄源として含硫アミノ酸を生産可能な点である。二点目は、*Pseudomonas putida* の全ゲノム情報を基に Met 生合成系遺伝子群を解析すると、アミノ酸の醗酵生産等に利用されている大腸菌 W3110 株に存在するような Met 生合成系遺伝子群のリプレッサータンパク (負の転写調節因子; MetJ) が存在していないという発見である。三点目は、大腸菌 W3110 株の Met 生合成系における硫黄源はシステインであり、 α -succinyl homoserine とシステインから cystathionine を経てホモシステインになるが、*Pseudomonas putida* は同じ生合成系に加え、もうひとつ α -succinyl homoserine と S^2 から直接ホモシステインを合成できるため有利な点である。以上のような背景から、黒液中の芳香族化合物等を微生物増殖のための炭素源とし、同じく黒液の主要成分である DMS を硫黄源として、硫酸飢餓応答酵素遺伝子群を効率よく発現させることにより、「廃棄物系バイオマスを原料とした含硫アミノ酸の生産」を行うこととした。



現在国際的に見ても、脂肪族スルフィド (R-S-R') やスルホキシド (R-SO-R')、スルホン (R-SO₂-R') をターゲットとした硫黄代謝に関する研究を行っている研究機関はほとんどない。すなわち本提案のように、微生物が持つDMSから含硫アミノ酸へのSSR酵素・遺伝子を利用し物質生産に生かすというアイデアは、非常に新規性の高い方法であるとも考えられる。有機“硫黄”化合物の微生物生産を行なおうとする場合には、必ず硫酸飢餓応答機構に関する知識が必要になる。大腸菌とは異なるS²⁻の含硫アミノ酸への取り込み経路が遺伝子レベルで確認され、それをMet高効率生産に活用するといった考えは、*Pseudomonas putida*の硫黄代謝を分子レベルで研究しているグループならではと思われる。本提案研究で得られる基礎・応用的知見は、現在、他にcompetitorがほとんどないことから、全て新規な発見や特許出願につながることも目的である。

3. 研究の方法

本研究期間では、「*Pseudomonas putida*におけるメチオニン高生産株の分子育種」および「メチオニン生産のための培養条件検討および黒液利用」の2つの研究課題について実験を遂行した。平成22年度は、*Pseudomonas putida*のメチオニン合成系を強化するため、遺伝子破壊技術を用いて、システイン合成の主流代謝酵素遺伝子である*cysK*、トレオニン合成の*thrB*破壊株および二重破壊株を作製するとともに、薬剤によるランダム変異により*metK*遺伝子内に変異を導入し、フィードバック阻害が弱まった変異株の取得を試みた。

一方平成23年度は、前年度取得した各種変異株を用いて、黒液利用に向けた詳細な培養条件の検討を試みた。

4. 研究成果

遺伝子破壊株作製によるメチオニン合成系の強化において、本期間内では、含硫アミノ酸のうちメチオニンの生産能が増強された*Pseudomonas putida*株 (DS1株およびKT2440株)の育種に注力した。もともと本提案に至った経緯は、*Pseudomonas putida*が*o*-succinyl homoserineとS²⁻から直接ホモシステインを合成できる点である (MetZ)。そ

こでS²⁻がシステイン合成系に直接流れないようにするため、*cysK*遺伝子 (PP4571)を破壊することは必須であった。加えて、Metの前駆であるホモセリンはトレオニンの前駆物質でもあるため、トレオニン合成系遺伝子*thrB*の二重破壊株も作製した。これら破壊株を用いて、黒液中の炭素源およびDMS類からのメチオニン生産量を定量した。遺伝子破壊の方法はdouble cross overによる相同組換えを基本とし、薬剤耐性をコードする遺伝子カセットを利用して行なった。解決すべき点として、*Pseudomonas putida*は*thrB*に関してホモログ遺伝子を二つ有している (PP0121およびPP4154)ため両方それぞれの破壊株を作製し、どちらの遺伝子を破壊した方が、ホモセリンがよりメチオニン側に流れるか代謝フラックスを評価しながら実験を進めた (定量PCRによる合成系遺伝子の発現量の確認とLC-MSによる低濃度代謝物の確認)。

合成されたMetの一部は、*S*-adenosyl methionine synthetase (MetK)により*S*-adenosylmethionine (SAM)に変換される。MetとSAMの組み合わせがフィードバック阻害を引き起こしMetの合成を制御してしまうため、*metK*遺伝子 (PP4967)に変異を導入してMet生産量を上昇させることも必須である。100 μg/ml程度のノルロイシン耐性変異株をスクリーニングし、シーケンズ解析により*metK*への変異部位を特定した上で、Metの分泌量を解析した。

さらに遺伝子破壊技術を用いて作製した、システイン合成の主流代謝酵素遺伝子である*cysK*、トレオニン合成の*thrB*破壊株および二重破壊株について、詳細なcharacterizationを行った。また、薬剤によるランダム変異により*metK*遺伝子内に変異を導入し、フィードバック阻害が弱まった変異株を取得した。

現在、含硫アミノ酸は食品・飼料添加物や医薬品などの工業原料として用途が広いが、例えばシステインは主に毛髪や羽毛の酸加水分解物からの抽出法と、化学合成したシステイン前駆体から酵素変換を行なう化学合成と酵素法の組み合わせにより製造されている。前者は廃棄物からシステインを製造していることは利点だが、加水分解時の濃塩酸廃液処理が問題となる。また後者は、やはり化学プロセスを経るため環境負荷が問題となつている。一方、Metも化学合成した*N*-アセチル-DL-メチオニンから酵素変換を行なう化学合成と酵素法の組み合わせにより製造されているため、化学プロセスでの環境負荷が問題となる。本提案のようにバイオプロセスによって未利用バイオマスからシステインやMetが製造可能となれば、環境負荷が低減され、そのインパクトは大きい。これまでに、大腸菌や*Corynebacterium*

*glutamicum*を用いてシステインやMet生産を試みた基礎研究がいくつか行なわれているが、生産量は0.24 g/L程度と低い。しかしながら我々はもともと有機硫黄化合物代謝系の解析が専門であるため、システイン・Met生合成系の酵素が硫酸飢餓応答性であることを理解しており、より高効率な新規含硫アミノ酸製造バイオプロセスの構築に目処をたてた。

5. 主な発表論文等
該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽部 浩 (HABE HIROSHI)

(独) 産業技術総合研究所・環境化学技術
研究部門・主任研究員

研究者番号：20613075