

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510095

研究課題名(和文)嫌気性菌の遺伝子工学を応用した水素ガス生産技術の開発

研究課題名(英文)Hydrogen gas production from an anaerobic bacterium by genetic engineering

研究代表者

木村 哲哉(KIMURA, Tetsuya)

三重大学・生物資源学研究科・准教授

研究者番号：00281080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：海浜土壌から単離された水素ガスを高生産する嫌気性細菌*Clostridium paraputrificum*を対象として、発現用プロモーターの単離と解析を行い、発現ベクターを構築した。これを用いて*C. josui*のセルラーゼ8A遺伝子と*C. thermocellum*のキシラナーゼ11A遺伝子の発現に成功した。さらに、水素生産を遺伝子レベルで解析するため、全ゲノム配列の解析を完成させた。また、培養条件の検討を行い、培地に微量の鉄を添加すると水素ガスの生産が約2倍に増加した。

研究成果の概要(英文)：*Clostridium paraputrificum* isolated from seaside soil produces a large amount of hydrogen gas. We analyzed several promoter sequences from this bacterium and constructed an expression vector. The cellulase 8A gene from *C. josui* and the xylanase 11A gene from *C. thermocellum* were successfully expressed by this vector in *C. paraputrificum*. To understand the metabolic pathway for hydrogen production, we determined the complete genome sequence of this bacterium. We tested the several components of culture media by jar fermenter. When ferrous ion was added in the culture medium, hydrogen gas production was doubled. Although hydrogen gas production was increased drastically in that medium, expression of genes involving hydrogen gas production was not increased.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：嫌気性細菌 クロストリジウム バイオマス 水素ガス 代謝工学 セルラーゼ キシラナーゼ キチナーゼ

1. 研究開始当初の背景

温室効果ガスの排出による地球温暖化問題が大きく取り上げられ、化石燃料に変わるエネルギー源を開発する動きが大きくなっていった。この中で、原子力、太陽光、バイオマスは大きな注目を浴びていた。しかし、東日本大震災が起き、原子力に対する不安が一気に高まった。その結果、地球温暖化対策よりも、安定的なエネルギー確保へと社会の関心が高まり、再び化石燃料の輸入が増える事態となった。

一方、太陽光やバイオマスには大きな関心が寄せられたが、バイオマスの利用については食料問題にも直結し、デンプンからのバイオエタノールの生産が食料価格の高騰をもたらした。このような背景から、食料と競合しないバイオマスの有効利用が急速に注目を浴びるようになった。具体的には、植物細胞壁繊維(セルロースとヘミセルロース)を加水分解することで、グルコースや単糖類に変換し、これをバイオエネルギーへと変換する研究へとシフトが起こった。このような社会的背景のなかで、申請者の所属する研究グループでは、30年以上にわたり難分解性バイオマスの酵素による分解を研究してきた。これらの酵素は糸状菌を利用する研究が先行しているが、当研究室では嫌気性菌が生産する酵素の応用をめざして研究が進められてきた。これらの中から、申請者が注目したのは、大学のキャンパス土壌から単離され、生育速度の速さと、海洋性バイオマスであるキチンを分解し、多量の水素ガスを生産する *Clostridium paraputrificum* である。この菌は、グルコース 5g を含む 500ml の培地から約 0.4L の水素ガスを約 8 時間で生産する。水素ガスは燃焼しても水しか出さず、燃料電池にも利用できることから、究極のクリーンエネルギーである。これまでの研究から、この菌のキチン分解酵素や水素生産に関与する遺伝子の単離などが行われてきた。そこで、これらの情報を利用しつつ、最近になって発展してきたゲノム解析技術を応用して、本菌を遺伝子工学的に改良する技術を発展させ、より広いバイオマスから水素ガスを高生産することを企てた。

2. 研究の目的

植物が光合成により炭酸ガスと水を固定し、単糖類のポリマーとして太陽エネルギーを多量に蓄積したバイオマスを有効利用することを究極の目的とした。でんぷんは人間の食料として高度に利用されているが、セルロースを主成分とする植物細胞壁は、哺乳類の消化酵素では分解できない。そのためセルロース性廃棄物は自然界で時間をかけて微生物による分解を受け、炭酸ガスや代謝産物と熱に分解されてきた。これらの微生物は、カビと土壌などに生息する嫌気性菌が知られており、カビなどの好気性微生物は早くから研究が行われ、産業的にも利用されている。

一方、嫌気性菌の中にはバイオマスを効率的に分解するものや、水素ガスを生産するなど優れた性質を持つものがいるが、取り扱いの困難さから研究が遅れてきた。しかし、これらの嫌気性菌を応用すれば、環境に負荷をかけることなくバイオマスを分解し、水素エネルギーとして回収できる。そこで、嫌気性菌を用いて、複雑で難分解性の植物性繊維を効率的に分解し、さらに醗酵を制御して水素ガス生産の効率をあげることを目的として以下の研究を計画した。

(1) 植物セルロース繊維を効率的に分解する水素ガス生産菌の育種方法開発：コンポストから単離した *Clostridium josui* はセルラーゼ複合体「セルロソーム」を細胞表層に形成し、その分解効率は非常に高い。残念ながら *C. josui* は生育が遅く水素生産性も低く、また、形質転換方法も確立していない。そこで、本研究では、中温で生育する *C. josui* からセルロース分解に重要なセルラーゼを選び、同じく中温菌で水素生産性の高い嫌気性菌 *C. paraputrificum* M21 株へそれらセルラーゼを遺伝子工学的に発現させて、効率的にセルロースを分解し、水素を生産できる嫌気性菌の育種をはかることにした。

(2) 水素ガス生産性の高い高機能嫌気性菌の育種：*C. paraputrificum* は理論的にグルコース 1 モルから 4 モルの水素と 2 モルの酢酸、2 モルの炭酸ガスを生成する。しかし、実際には乳酸や酪酸等の副産物も生成され、水素の収量は少なくなる。そこで、この菌の代謝をより水素ガス生産に適した流れに制御することで、理論値に近い水素ガス生産へ近づけることを目標にした。そのためゲノム解析によって代謝系を推定し、遺伝子工学を用いて代謝の制御を行った。遺伝子改変のための遺伝子の高発現系や遺伝子発現抑制法など基礎技術の確立をめざした。この遺伝子工学的技術を発展させ、水素ガス生産の代謝制御に関しての基礎的知見を得ることにした。

3. 研究の方法

(1) *C. paraputrificum* におけるセルラーゼ、キシラナーゼの発現

発現ベクターの開発

すでに当研究室では、本菌のヒドロゲナーゼ A 遺伝子 (*hydA*) を単離し、この遺伝子が通常の培養条件では発現することを確認済みであった。本遺伝子は、代謝の中心で働くことが予測されることから、培養条件が変化しても恒常的に発現することが予測された。そこで、発現ベクター作成のためのプロモーターとして第一候補に考え、リアルタイム PCR 法をもちいて異なる炭素源での発現を調べた。さらに 5' RACE 法による転写開始点の決定を行った。RNA の抽出は、液体培養から遠心分離によって菌体を回収し、リゾチーム処理を

行った後、酸性フェノール法で RNA を抽出した。DNaseI 処理で混入したゲノム DNA を除去した後、ランダムプライム法で cDNA を合成し、これを鋳型としてリアルタイム PCR 法で遺伝子の発現を調べた。転写開始点の決定は 5' / 3' RACE kit (ロシユ) を用いて添付されたプロトコルに従って行った。決定された転写開始点を参考にして PCR 法でプロモーター領域約 400bp を増幅し、*C. perfringens* 由来のシャトルベクター-pJIR751 のマルチクローニングサイトにこのプロモーターを連結し pJIR751-Phyd を作成した。

セルラーゼ、キシラナーゼ遺伝子の発現中温菌 *C. josui* のセルラーゼ 8A (*Cjcel8A*) 遺伝子は、すでに詳細に解析がされていることから、*C. paraputrificum* における異種セルラーゼ発現のモデルとして選択した。PCR 法で *Cjcel8A* のタンパク質コード領域を増幅し、pJIR751-Phyd へ連結した。また、ヘミセルラーゼ発現のモデルとして、当研究室で解析されている *C. thermocellum* の *Ctxyn11A* 遺伝子を選択し、同じ発現ベクター pJIR751-Phyd に遺伝子を導入した。これらを、エレクトロポレーション法によって *C. paraputrificum* へ形質転換を行った。得られたエリスロマイシン耐性コロニーを拾い、解析を行った。

(2) 水素ガス生産能を向上させるための遺伝子工学的な方法と培養工学的な方法の検討

ゲノム解析

ロシユ社の GS454 を用いた NGS 法によって全ゲノムの完全長を解析した。解析は、東京大学のオーミックス解析センターとの共同研究で行った。コード領域の解析には MiGAP を用いた。

ヒドロゲナーゼ A 遺伝子の高発現株と発現抑制株の作成およびその解析

すでに *hydA* が水素ガス生産に重要な役割を果たしていることは報告しているが、さらに詳しく調べるために、フェレドキシン遺伝子 (*Fdx*) のプロモーターを使ったより強力な高発現ベクターを構築し、*hydA* の高発現と、アンチセンス法による発現抑制株を作成して、水素ガスの生産について調べた。培養は、図 1 に示すようにジャーファメンターで行った。

培養条件の検討による水素ガス生産の増加検討

C. paraputrificum の培養には GS 改変培地を使ってきた。この培地成分を詳しく検討してみると、pH の変化防止のため高価な MOPS が緩衝液として入れてあったが、より実用性を考え MOPS の影響を調べた。また、培地中には無機塩を入れなくても十分な生育をしていたが、水素生産に関わる酸化還元酵素には Fe イオンを持つものが多いことから、培地に様々な鉄イオンを添加して検討を行っ

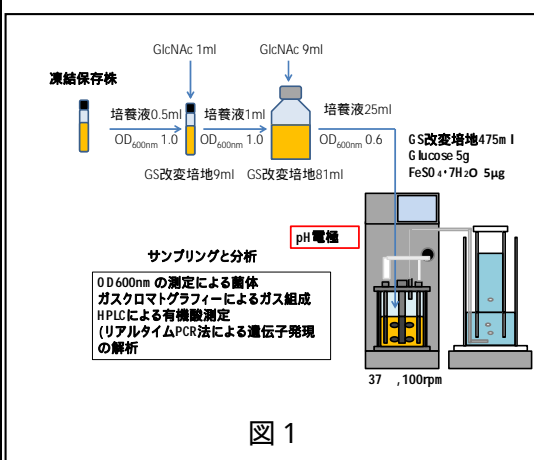


図 1

た。

4. 研究成果

(1) *C. paraputrificum* の発現ベクター構築とセルラーゼ *Cjcel8A*、キシラナーゼ *Ctxyn11A* の発現

hydA の発現をリアルタイム PCR 法で定量したところ、炭素源に N アセチルグルコサミン、グルコース、セロビオース、デンプンを使ってもその発現量に大きな差は見られなかった。このことは、様々な炭素源、特にカタボライト抑制が働くような条件でも *hydA* プロモーターは利用できることが示された。

5' RACE による *hydA* の転写開始点を図 2 に模式的に示したように決定した。遺伝子の配列

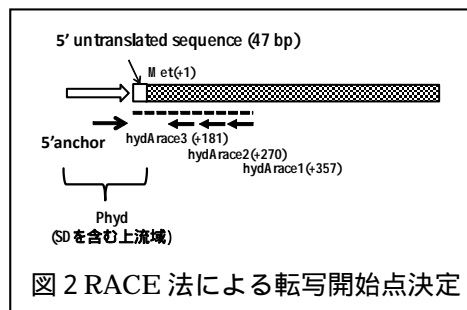


図 2 RACE 法による転写開始点決定

から予測される 2 つの翻訳開始 ATG のうち、2 番目の ATG が翻訳開始点であることが分かった。この配列のすぐ上流には SD 配列があり、また転写開始は ATG の -47 塩基上流であった。この情報をもとに転写開始点を含む上流約 400 塩基を PCR で増幅してプロモーターに用いた。この領域を含んだプラスミドベクター pJIR751-Phyd を図 3 に示した。

この発現ベクターに *Cjcel8A*、*Ctxyn11A* を連結して、*C. paraputrificum* へ形質転換した。エリスロマイシン耐性の形質転換体をガスバック法で平板培養した後、カルボキシメチルセルロース、キシランを含む寒天を重層してから一晩反応させて、翌日コンゴレッドで染色したところ、コロニーの周りが透明になったことから、それぞれ組換えセルラーゼ、キシラナーゼが生産されていることが示された。同じコロニーをハンゲートチューブで液体培養して、PCR で *Cjcel8A*、*Ctxyn11A* がそれぞれ導入されていることを確認した。さらに、RNA を抽出して RT-PCR 法で、それぞ

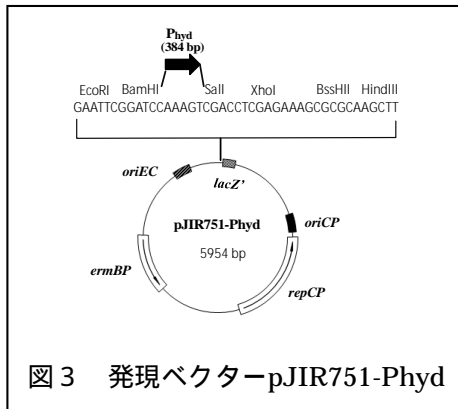


図3 発現ベクター-pJIR751-Phyd

これらの遺伝子が発現していることも確認した。液体培養では組換え酵素は、ほぼすべて培養上清に存在したことから、分泌シグナルが機能していることが分かった。一方で、大腸菌ではこれらの分泌シグナルは十分には機能しておらず、Clostridium 属由来の酵素を分泌するには、同じ属である本菌は適していることが分かった。培養上清を使ってそれぞれ CM セルロースかキシランを入れた SDS-PAGE でタンパク質を分離後、活性染色を行ったところ、CjCel18A はアミノ酸配列から予測されるものとはほぼ同じ単一の分子量を示した。一方、CtXyn11A は複数のバンドが検出されたことから、部分分解されていることが示唆された。

これらの結果は、植物バイオマスを分解できる Clostridium 属の遺伝子を導入することで、本菌をより広範なバイオマスを分解する水素生産菌として育種できる可能性を示している。

(2)水素ガス生産能を向上させるための遺伝子工学的な方法と培養工学的な方法の検討

ゲノム解析の結果、本菌は 3.5Mb の染色体を持つことが分かった。MIGAP の解析結果からは、約 3500 の遺伝子コード領域をもっていた。

他の Clostridium 属の報告で、ferredoxin 遺伝子のプロモーターが高発現ベクターに応用されていることから、本菌でもゲノム情報から ferredoxin 遺伝子を選び、このプロモーターを PCR で増幅して、Bacillus 由来のグラム陽性菌用ベクター-pKNT19 へ連結し、発現ベクターを作成した。予備的な解析で大腸菌 GUS 遺伝子をレポーターとしてプロモーターの強さを hydA と比較したところ、100 倍以上の強さであった。このベクターを使って hydA を高発現させるプラスミドとアンチセンスプラスミドを作成して形質転換を行った。ジャーファメンターによる培養では、高発現プラスミドでは水素ガスが約 30% 増えたが、アンチセンスプラスミドではわずかに水素ガスの生産が減少した。このことは hydA が水素ガス生産に重要な役割を果たしていることを示唆しているが、律速が別にあることも示唆している。

遺伝子工学的な手法による水素ガス生産増加の可能性が示唆されたが、再度培養条件

の最適化が重要と考え、培地成分の検討を行った。その結果、高価な MOPS を培地へ入れなくても菌体の増殖や水素ガス生産には影響がないことが分かった。一方で、微量の鉄イオン添加が水素ガスの生産を 2 倍に増加させた。鉄イオンは 2 価でも 3 価でも効果は同じであった。また、水素生産は鉄イオンの濃度に依存しなかったことや、リアルタイム PCR による各遺伝子の発現に大きな変動が観察されなかったことから、微量の鉄イオンの存在が水素ガス生産に関わる酸化還元酵素の活性を調整している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

中西有斗、大石琢馬、黒岩千智、大島健志郎、服部正平、栗冠真紀子、木村哲哉、栗冠和郎、*Clostridium parapatrificum* による水素ガス生産向上のための培養条件の検討と代謝関連遺伝子の発現解析、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 30 日、明治大学農学部(神奈川県川崎市)

大石琢馬、中西有斗、黒岩千智、栗冠真紀子、大島健志郎、服部正平、木村哲哉、栗冠和郎、*Clostridium parapatrificum* M21 の代謝制御による水素ガス生産の効率化条件の検討、日本生物工学会第 65 回大会、2013 年 9 月 19 日、広島国際会議場(広島市中区)

大石拓馬、黒岩千智、佐伯謙二、栗冠真紀子、木村哲哉、栗冠和郎、嫌気性菌 *Clostridium parapatrificum* の高発現ベクターの開発と代謝工学への応用、日本農芸化学会中部支部例会、2012 年 10 月 27 日、名古屋大学シンポジオン(名古屋市中千種区)

佐藤勇介、中村仁美、中西有斗、黒岩千智、栗冠真紀子、木村哲哉、栗冠和郎、嫌気性細菌 *Clostridium parapatrificum* M21 株のキチナーゼ遺伝子の発現とプロモーター解析、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 23 日、京都女子大学(京都府京都市)

〔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

木村 哲哉 (KIMURA Tetsuya)
三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授
研究者番号：00281080

(2) 研究分担者

なし ()

(3) 連携研究者

なし ()