

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420832

研究課題名(和文) 合成ガスプラットフォームによるバイオマスリファイナリー微生物触媒の開発

研究課題名(英文) Development of microbial catalyst for biomass refinery based on syngas platform

研究代表者

中島田 豊 (Nakashimada, Yutaka)

広島大学・先端物質科学研究科・教授

研究者番号：10281164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、好熱性偏性嫌気性微生物 *M. thermoacetica* を宿主として、代謝工学による合成ガスを基質とした有用物質生産プラットフォームの有効性を明らかにすることを目的とした。その結果、耐熱性カナマイシン耐性遺伝子を選択マーカーとした遺伝子導入法を開発した。これを用いて、アルコール生産遺伝子を導入するとともに酢酸生成遺伝子を同時に破壊することにより、エタノール高生産菌の育種に成功した。本変異株のH₂-CO₂単独の資化能は消失したが、本変異株は糖を同時に添加することでH₂-CO₂資化能を回復したことから、糖と合成ガスの共発酵によるエタノール生産が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to evaluate the availability of useful metabolite production by means of synthetic biotechnology from syngas by *Moorella thermoacetica* as a host microorganism. After developing novel transformation system of *Moorella* with thermotolerant kanamycin resistant marker gene, we successfully constructed a mutant strain that mainly produced ethanol from fructose by the disruption of acetate synthetic pathway and introduction of alcohol synthetic pathway. Although the mutant lost fermentability of H₂-CO₂, it was recovered by the addition of sugar, suggesting that the mutant is a promising candidate for ethanol production by co-fermentation of carbohydrate and syngas.

研究分野：生物化学工学

キーワード：水素 二酸化炭素 合成ガス エタノール 発酵 ホモ酢酸菌 代謝工学

1. 研究開始当初の背景

現在、エネルギー・マテリアルの大部分は石油、石炭、天然ガスなどの化石資源から製造されている。しかし、化石資源はいずれ枯渇し地球温暖化の原因にもなる。そこで、再生可能資源の利用、その一つに未利用バイオマスを活用したエネルギー、有用物質生産プロセスが研究されている。近年では食糧との競合を避けるために、セルロース系バイオマスである草本類を粉碎・糖化して組換え酵母や大腸菌などを用いて有用物質を発酵生産する糖プラットフォームとするバイオリファイナリープロセスの開発が世界中で展開されている。

しかし、糖化発酵は粉碎・糖化处理コストが未だ高い。また、例えばエタノール生産の場合、酵母野生株はバイオマス多糖であるヘミセルロースから得られるキシロースを炭素源として利用できないので、キシロースを消費できるように遺伝子組み換えが試みられているが、セルロースから得られるグルコースより発酵速度が未だ遅く、生産性の向上は未だ途上である。さらに、糖化発酵では、リグニン、タンパク質、脂質などの糖以外のバイオマス成分を利用できない。

そこで、我々はバイオマスガス化により得られる合成ガスを発酵原料としたバイオスリファイナリープロセスを開発している。合成ガスを発酵原料することで、石炭・天然ガス化学で実用化されている低コストプロセスを利用でき、どのようなバイオマスからでも同じ発酵原料が得られ、バイオマス全てを利用可能など、従来の糖プラットフォームの制限を打破できる。

我々はこれまでに、合成ガスのシフト反応 ($\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$) により得られる H_2 - CO_2 からの有用物質生産菌としてガソリン代替及び化成品原料となるエタノール生産菌を探索、合成ガスも資化できるホモ酢酸菌 *Moorella thermoacetica* と多くの性状が一致するが酢酸の他にエタノールを生産する好熱性細菌 *Moorella* sp. HUC221 株を世界で初めて見いだした (引用文献 1)。そこで、本菌の濃度培養法を開発し、 H_2 - CO_2 からの酢酸・エタノール連続生産法を確立した (引用文献 2)。しかし、本菌のエタノール生産量は酢酸生産量と比較してまだまだ低くエタノール収率の向上が求められた。そこで、分子育種によるエタノール生産能の増強を見据え、NAD(P)H 依存性アルコール脱水素酵素、及びアルデヒド脱水素酵素候補遺伝子を大腸菌内で発現、精製し、候補酵素活性からエタノール生成関連遺伝子と同定した (引用文献 3)。また、代謝工学的解析により、本菌が CO_2 という C1 化合物のみならず、非糖質であり枯れ葉などに含まれるグリオキシリル酸やグリコール酸など C2 化合物をも炭素源とし得ることを報告するなど (引用文献 4)、本菌の培養工学的、遺伝子工学的、代謝工学的解析を行ってきた。そして近年、HUC22-1 株と近縁でありゲノム情報を

公開されている *Moorella thermoacetica* ATCC39073 株のウラシル要求性変異株 (以下 Δ *pyrF* 株) を相同組換えによる遺伝子破壊により作製、*pyrF* 遺伝子相補および外来遺伝子断片の導入試験に世界で初めて成功した (図 1)。さらに、異種遺伝子導入による物質生産例として、*Thermoanaerobacter ethanolicus* 由来乳酸脱水素酵素 (*ldh*) をグルタルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素遺伝子 (G3PDH) プロモーターの制御下、 Δ *pyrF* 株で発現させ、フルクトースを炭素源として本来は生産できない乳酸生産にも成功している (図 2) (引用文献 5)。

2. 研究の目的

本研究では、上記背景から研究成果をさらに発展させ、好熱性偏性嫌気性菌を用いた合成ガスからの有用物質生産プロセスを実現するために、*M. thermoacetica* の遺伝子発現制御法の高度化、エタノールをモデル生産物とした高速生産変異株の分子育種技術の開発、そして変異株による合成ガスを基質とする培養装置・運転技術の獲得を試みた。

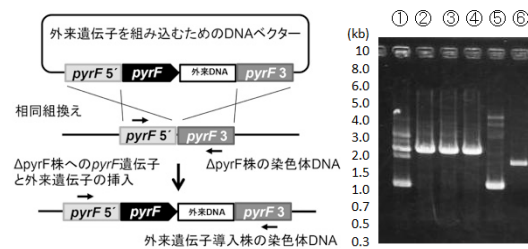


図 1 外来遺伝子導入方法 (左図)、及び PCR による *pyrF* 相補および外来 DNA 挿入の確認 (右図)。右図: レーン ① は DNA の長さを知るためのマーカーであり下にあるバンドは DNA 長が短い。 Δ *pyrF* 株 (レーン⑤) は、*pyrF* 遺伝子を欠損しているのと同じ部位の野生株 DNA (レーン⑥) よりも DNA が短くなっている。*pyrF* 相補+外来遺伝子導入株 (レーン②③④) では、外来遺伝子と元の *pyrF* 遺伝子が組み込まれることで野生株 DNA (レーン⑥) よりも長くなっていることで外来遺伝子の挿入を確認できる。

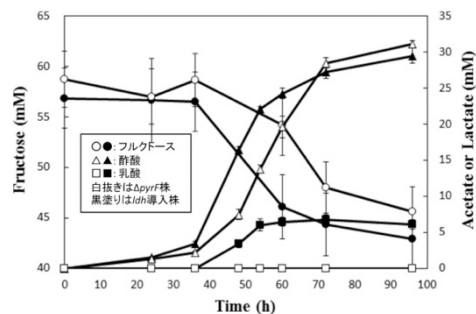


図 2 *ldh* 導入 *M. thermoacetica* による乳酸生成 (非導入株では乳酸は生産されない)

3. 研究の方法

(1) 使用菌株 本研究では *M. thermoacetica* ATCC39073、およびその *pyrF* 破壊株である *M. thermoacetica* Δ *pyrF* (引用

文献5) を宿主として検討した。

(2) 基本培地 本研究では、*C. ljungdahlii* の培養に用いられる ATCC 1754 PETC medium を改変したものを基本培地として用いた (引用文献 5)。改変として、Cysteine·HCl·H₂O の最終濃度を 0.3 g/l に減らし、Na₂S·9H₂O を除いた。培地作製は、Reducing Agent (Cysteine·HCl·H₂O, 60 g/l) と基質 (フルクトース等) を別に調製した。

(3) 培養方法 ブチルゴム栓で密封したバイアル瓶を用い嫌気培養を行った。フルクトースで培養する場合は、N₂/CO₂ (80/20) 混合ガスでヘッドスペースを置換後、前培養液を 5 % (v/v) 植菌した。H₂-CO₂ で培養する場合は、H₂-CO₂ [80:20 (v/v)] 混合ガスでヘッドスペースを置換し、0.25 MPa (約 2.5 atm) になるように充填した。培養は 55°C で、フルクトースで培養時は静置培養、H₂-CO₂ で培養時は 180 rpm で振盪培養を行った。コロニー単離にはロールチューブ法を用いた。ロールチューブの作成は Hungate の方法に従った。

(4) 遺伝子導入法 *M. thermoacetica* への遺伝子の導入はエレクトロポレーションを用いた (引用文献 5)。ロールチューブ法により形質転換体の単離を行い、単離した菌株からゲノム抽出後、PCR により目的の遺伝子がゲノム上に挿入されているかを確認した。

(5) 酵素活性測定 酵素活性測定を目的として、H₂-CO₂ では OD₆₀₀ = 0.1-0.15、フルクトースでは OD₆₀₀ = 0.4-0.8 まで培養した菌体を培養した。遠心分離により上清を取り除いた後、適当な緩衝液で菌体ペレットを洗浄・再懸濁し、超音波破碎機により破碎した。破碎液を遠心し回収した上清を粗酵素液として、その後のタンパク質濃度測定や、酵素活性測定に用いた。

(6) 代謝産物測定

微生物により代謝される生産物濃度の分析は RI 検出器を装備した HPLC を用いた。移動相は 0.1 % (v/v) H₃PO₄ を用い、0.7 ml min⁻¹ の流速で流した。分離カラムには、RSpak KC-811 (Shodex) を用いた。

4. 研究成果

(1) カナマイシン耐性遺伝子マーカーを用いた遺伝子組換え法の確立

遺伝子組換え時の新たな選択マーカー遺伝子として *Moorella* 属細菌で使用可能な抗生物質耐性遺伝子を探索した。選択マーカー遺伝子候補として、*Streptococcus faecalis* JH2-15 由来の耐熱性カナマイシン耐性遺伝子 (*kanR*) を選択し、dpyrF 株に導入した。その結果、プロモーターとして G3PD プロモーターを付加して導入することにより、*kanR* は *Moorella* 内で転写され、宿主はカナマイシン

耐性を有することが分かった (図 3)。さらに、*kanR* をマーカー遺伝子として遺伝子組換えを行った際、形質転換効率の低さが問題になったが、PAM 法を用いることで形質転換効率は 2.55×10^2 CFU/μg まで向上し、*kanR* をマーカー遺伝子とした遺伝子組換えを確立することに成功した。

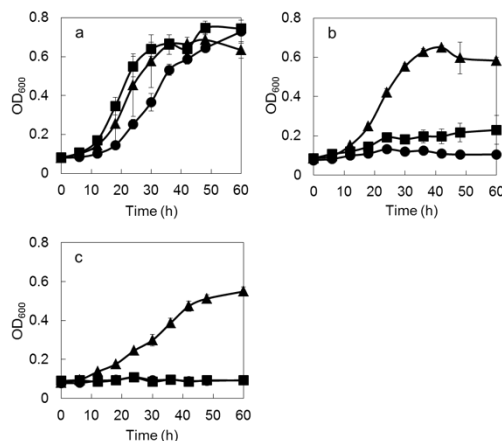


図 3 *kanR* 導入株のカナマイシン耐性. カナマイシン濃度, a: 0 μg/ml, b: 150 μg/ml, c: 300 μg/ml, ■: 野生株, ●: Pnat-*kan* 導入株, ▲: PG3PD-*kan* 導入株

(2) *M. thermoacetica* の酢酸生産経路の解析

M. thermoacetica は、ほぼ唯一の代謝産物として酢酸を生産する。そのため、*M. thermoacetica* を宿主とした物質生産を行う際に、酢酸の生産量を制御、抑制することは非常に重要である。既報により、ゲノム上の 2 遺伝子 (Moth_0864, Moth_1181) が、新規ホストトランスアセチラーゼである PduL をコードしていることが推定されていた (引用文献 6)。

そこで、実際にホストトランスアセチラーゼ活性を有しているのか精製タンパク質を用いて活性測定を行った。その結果、Moth_0864, Moth_1181 がコードしているタンパク質はともにホストトランスアセチラーゼ活性を有しており、Moth_1181 は Moth_0864 と比較して高いホストトランスアセチラーゼ活性を有していたことから、それぞれを *pduL1*, *pduL2* とした。この 2 遺伝子を破壊対象とし、同時に Acetyl-CoA のバイパス回路として *T-1dh* を導入した遺伝子組換え株において、酢酸から乳酸生産に代謝の流れが変化するかどうかにより両遺伝子の酢酸生成への関与を調べた。フルクトースを炭素源として各変異株を回分培養したところ、*pduL1* 単独破壊株 (*1dh Δ pduL1*) では酢酸生成にほとんど変化はなく、乳酸生成もわずかであった。一方、*pduL2* 単独破壊株 (*1dh Δ pduL2*) では酢酸生産量の大幅な減少が見られた。さらに、*pduL1*, *pduL2* 二重破壊株 (*1dh Δ pduL12*) では酢酸生産はほぼ完全に停止し、ホモ乳酸発酵にシフトした (表 1)。以上の結果から、*pduL2* が特に酢酸生産に重要な遺伝子であることが示唆されたが、これは、

pduL2 がアセチル CoA 経路を形成している酵素である methylene-THF reductase をコードしている遺伝子 (Moth_1191) からわずか10 遺伝子下流にあることから推測される。しかし、*pduL2* 単独破壊株における酢酸生成が、2 重破壊株ほど抑圧されないことから、*pduL1* も同時に発現しており、*pduL2* の補助的機能を果たすものと考えられる。

表 1 フルクトースでの各変異株の代謝産物

株	$Y_{P/S}$ -acetate (mol/mol)	$Y_{P/S}$ -lactate (mol/mol)
野生株	2.13	検出せず
<i>ldh</i> Δ <i>pduL1</i>	2.18	0.036
<i>ldh</i> Δ <i>pduL2</i>	0.73	0.77
<i>ldh</i> Δ <i>pduL12</i>	0.02	1.48

(3) エタノール生産変異株の分子育種

上記検討から、*pduL1* 及び *pduL2* の両酵素が、エタノール生産と競合する酢酸生産に直接関係しており、これらを破壊することにより、酢酸生成をほぼ完全に止めることが可能なことを明らかにした。そこで、次に、酢酸生成経路を改変したエタノール生産変異株を製作した。変異株は *dpyrF* 株を宿主として、1) G3PDH プロモーターの制御下で *M. thermoacetica* ATCC39073 株由来のアセトアルデヒド脱水素酵素 (*aldh*) 遺伝子のみを導入した Mt-*aldh* 株、2) *aldh* を導入するとともに *pduL2* を破壊した Mt-*aldh* Δ *pduL2* 株、そして、*pduL1*、*pduL2* の両方を破壊した Mt-*aldh* Δ *pta* 株を作製した。

野生株と上記3種の代謝変異株をフルクトースを基質として培養したところ、野生株ではエタノール生産が見られなかったのに対して、*aldh* を導入した株全てにおいて、エタノール生産が確認できた。また、*pduL* 遺伝子の破壊によって、酢酸収率が減少するとともに、エタノール生産量が増加しており、特に Mt-*aldh* Δ *pta* 株で顕著なエタノール収率の増加が見られた (図 4)。本結果からも、*pduL1* および *pduL2* は酢酸生成に直接関与し、その破壊により、目的産物であるエタノールの生産量を劇的に改善できることが明らかとなった。

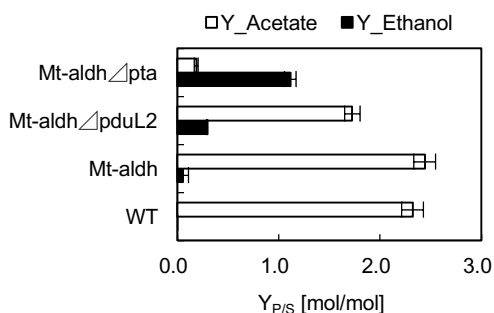


図 4 エタノール生産変異株によるフルクトースからのエタノール発酵. WT: 野生株, $Y_{Acetate}$: 酢酸収率, $Y_{Ethanol}$, エタノール収率

(4) エタノール生産変異株の培養特性および合成ガスを基質とした生産プロセス検討

最もエタノール収率の高かった Mt-*aldh* Δ *pta* 株を、野生株では増殖可能な H_2 - CO_2 ガスを唯一のエネルギー源、および炭素源として培養した場合、増殖せず、エタノールの生産も見られなかった。しかし、フルクトースと H_2 - CO_2 の両方を基質として回分培養を行ったところ、フルクトース単独と比較してエタノール収率の向上が見られたことから、バイオマス由来糖と H_2 または CO との共発酵によるエタノール生産が期待された。そこで、その初段階として、Mt-*aldh* Δ *pta* 株を用いて、模擬バイオマス糖混合物を基質としたエタノール生産試験を行った。

まず、*aldh* Δ *pta* 株をバイオマスの主要糖であるフルクトース、グルコース、またはキシロースで単一糖培養したところ、グルコースでの増殖・エタノール生産は顕著に低かったが、グルコース馴化培養を経ることで改善された。次いで、疑似バイオマス糖化液 (Glucose : Xylose = 2 : 1) で培養を行ったところ、速やかに糖をエタノールに変換したことから、木質バイオマス加水分解糖質からの高温エタノール発酵の可能性が見いだされた。

さらに、バイオリクターを用いた流加培養法によるエタノール発酵を行ったところ、エタノール生産は 200 mM 程度で発酵が停止した。しかし、高温発酵発酵の利点を生かし、エタノール濃度が 200mM 達する前に N_2 ガスの通気し、さらに流加培養を継続したところ、ガス通気開始時点の培養液エタノール濃度が維持されるとともに、エタノールを通気ガスから回収でき、「発酵蒸留」が実現された。今回の成果により、今後、通気ガスとして N_2 ガスの代わりに合成 (H_2 / CO / CO_2) ガスを用いることで、Mt-*aldh* Δ *pta* 株を用いた、「蒸留発酵」と「糖-合成ガス共発酵」を組み合わせた新規バイオリファイナリープロセスの構築が期待できる。

引用文献

- 1) S. Sakai et al. *Biotechnol. Lett.*, **26**, 1607, 2004
- 2) S. Sakai et al. *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 252, 2005
- 3) K. Inokuma et al. *Arch. Microbiol.*, **188**, 37-45, 2007
- 4) S. Sakai et al., *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 1447-1452, 2008
- 5) A. Kita et al., *J. Biosci. Bioeng.*, 347-332, 2013
- 6) E. Pierce et al. *Environ. Microbiol.* **10**, 2550-73, 2008

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Zen-ichiro Kimura, Akihisa Kita, Yuki Iwasaki, Yutaka Nakashimada, Tamotsu Hoshino and Katsuji Murakami, Glycerol acts as an alternative electron sink during syngas fermentation by the thermophilic anaerobe *Moorella thermoacetica*, Journal of Bioscience and Bioengineering, 121, 査読有, 2016, pp. 268-273.
- ② Yuki Iwasaki, Akihisa Kita, Shinsuke Sakai, Kazue, Takaoka, Shinichi Yano, Takahisa, Tajima, Junichi, Kato, Naomichi Nishio, Katsuji, Murakami, Yutaka Nakashimada, Engineering of a functional thermostable kanamycin resistance marker for use in *Moorella thermoacetica* ATCC39073, FEMS Microbiology Letters, 343, 査読有, 2013, pp. 8-12.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 吉田 嵩一郎, 岩崎 祐樹, 三好 佑季, 河合 優人, 喜多 晃久, 酒井 伸介, 庄 智裕, 斉藤 政宏, 村上 克治, 星野 保, 田島 誉久, 中島田 豊, 加藤 純一, 合成ガス資化性好熱性細菌 *Moorella thermoacetica* 代謝変異株によるエタノール生産, 日本生物工学会第 67 回大会, 2015. 10. 26-28, 鹿児島
- ② Yuki Iwasaki, Koichiro Yoshida, Akihisa Kita, Shinsuke Sakai, Tomohiro Sho, Masahiro Saito, Katsuji Murakami, Takahisa Tajima, Junichi Kato, Yutaka Nakashimada, The Production of Ethanol with Metabolism Mutant of Thermophilic Bacteria *Moorella thermoacetica* ATCC39073, The 4th Joint Conference on Renewable Energy and Nanotechnology, 5-7 Dec 2015, Matsuyama, Japan
- ③ Y. Iwasaki, Akihisa Kita, T. Show, M. Saito, T. Hoshino, K. Murakami, T. Tajima, J. Kato, Y. Nakashimada, Modification of Carboxydrotrophic Thermophilic Acetogen *Moorella thermoacetica* for Development of Syngas Fermentation Process, 22nd European Biomass Conference and Exhibition, 23-26 June 2014, Hamburg, Germany
- ④ 中島田 豊, 合成代謝工学による嫌気性微生物を用いた再生可能資源・エネルギー変換技術の開発, 第 1 回 SBJ シンポジウム - 生物学の新たな潮流をつくる, 2014. 5. 22, 東京
- ⑤ 三好佑季, 岩崎祐樹, 酒井伸介, 庄智裕, 斉藤政宏, 村上克治, 田島誉久, 中島田

豊, 加藤純一, 合成ガス資化性好熱性細菌 *Moorella thermoacetica* の外来遺伝子発現強化に関する研究, 日本生物工学会 66 回大会, 2014. 9. 9-11, 札幌

- ⑥ 岩崎祐樹, 喜多晃久, 酒井伸介, 庄智裕, 斉藤政宏, 村上克治, 田島誉久, 加藤純一, 中島田豊, 合成ガス資化性好熱性細菌 *Moorella thermoacetica* における酢酸生合成経路の解析, 日本生物工学会 65 回大会, 2013. 9. 18-20, 広島
- ⑦ 中島田 豊, 合成ガスプラットフォームによるバイオマスリファイナリー技術の開発, 日本生物工学会 65 回大会, 2013. 9. 18-20, 広島 (招待講演)

[図書] (計 1 件)

1. Y. Nakashimada, N. Nishio, Production of biofuels and useful materials by anaerobic organisms in ecosystem of methane fermentation. Microbial Production-From Genome Design to Cell Engineering (H. Anazawa and S. Shimizu ed.), pp283-300, Springer (2014).

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: モレーラ属細菌の酢酸非生産・乳酸生成株

発明者: 酒井伸介、高岡一栄、中島田豊、岩崎祐樹、矢野伸一、村上克治、喜多晃久

権利者: 三井造船株式会社、広島大学、産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特願 2013-157077

出願年月日: 2013 年 7 月 29 日

国内外の別: 国内

名称: 高発現プロモーター遺伝子

発明者: 庄智裕、斉藤政宏、中島田豊、三好佑季、星野保、村上克治

権利者: 三井造船株式会社、広島大学、産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特願 2014-158168

出願年月日: 2014 年 8 月 01 日

国内外の別: 国内

[その他]

http://home.hiroshima-u.ac.jp/nyutaka/Lab_Biotechnol/Biogas_Conversion.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島田 豊 (NAKASHIMADA YUTAKA)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・教授

研究者番号: 10281164