

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26340100

研究課題名(和文)嫌気性菌による難分解性バイオマスからの水素ガス生産システムの開発

研究課題名(英文) Development of hydrogen gas production system from cellulosic biomass by anaerobic bacteria

研究代表者

木村 哲哉 (Kimura, Tetsuya)

三重大学・生物資源学研究所・教授

研究者番号：00281080

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)：海浜土壌より分離された水素ガス生産菌*Clostridium paraputrificum*のピルビン酸代謝関連遺伝子を破壊して代謝経路の解析を行った。乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子、アセチルCoA生成遺伝子、アセトアセチルCoA合成遺伝子、酢酸合成遺伝子、酪酸合成遺伝子の破壊に成功し、嫌気培養瓶で培養して水素ガス生産量を測定したところ、乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を破壊したときに、水素ガスの生産が約1.4倍となった。また、コンポストから単離された植物細胞壁分解能をもつ嫌気性細菌*Ruminiclostridium josui*との共存培養でセルロースから直接水素を高生産できた。

研究成果の概要(英文)： *Clostridium paraputrificum* isolated from seaside soil is an anaerobic bacterium that produces a large amount of hydrogen gas. Genes encoding lactate dehydrogenase, pyruvate-ferredoxin oxidoreductase, thiolase, phospho-trans-acetylase and phospho-trans-butylase were inactivated by CloStron method. Each transformant was cultivated anaerobically in 100mL of GS-medium containing glucose as a sole carbon source and hydrogen gas produced during cultivation was analyzed by gas chromatography. The production of the hydrogen gas of the transformant that lacked lactate dehydrogenase became 1.4 times of the wild type strain. Next, we attempted to produce hydrogen gas by *C. paraputrificum* using cellulose as carbon source. *C. paraputrificum* cannot use cellulose as a carbon source. Therefore, *Ruminiclostridium josui* that was isolated from compost was used as cellulose degrader. The mix-culture of both strain was able to produce hydrogen gas from crystalline cellulose.

研究分野：環境技術

キーワード：水素ガス 嫌気性細菌 セルロース 代謝工学 微生物遺伝学

1. 研究開始当初の背景

将来は炭素を含まない水素を主たるエネルギー源とする水素社会も展望されている。水素エネルギーを利用するためのカギとなる燃料電池の技術開発も、国内自動車メーカーが水素ガスを利用する燃料電池車を市販するほど実用化への進歩は加速している。燃料電池の効率はガソリン車よりも2倍以上高いとも考えられ、有害物排出量もほとんどゼロであることから、CO₂排出の大きなウェートを占める自動車からの環境負荷の抑制に大きな効果が期待される。普及の障害となっている水素供給インフラも燃料電池車の普及に伴い発展することは、ガソリン供給インフラが自動車の普及とともに進んだことを考えれば想像に難くない。一方で、水素ガスの工業生産は現在のところ化石燃料系炭化水素の水蒸気改質で製造されるものが多い。化石燃料に対する依存度を下げ、環境への負荷を減らすには、微生物や酵素反応を利用してバイオマスから水素を生産する技術の開発と普及が必須である。

バイオマスは言うまでもなく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ものである。可食性のでんぷんは人間の食料や家畜飼料として高度に利用されているが、途上国の経済発展にともないその不足が危惧されている。穀類からのバイオエタノールの生産が食糧価格の高騰につながったことは記憶に新しい。これに対し、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。そのため稲ワラ、木片などのセルロース性廃棄物はこれまで環境中に放置され、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。これらの分解を行う微生物は、カビなどの好気的微生物と土壤などに生息する嫌気的微生物が知られている。カビ類は早くから研究が行われ、生産される酵素は産業的にも利用されている。一方、嫌気性微生物はこれまで培養が困難とみなされ研究が遅れてきた。しかし、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ある。これらを応用すれば、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ことは想像に難くない。また、バイオマスは地方に多く存在することからエネルギーの地産地消にもつながる。しかし、微生物による分解は、現代の工業社会を支えてきた工学的な視点からすれば速度が遅いことがネックとなる。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良く分解し、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究極の目的とした。具体的には、水素ガス生産性の高い高機能嫌気性菌を育種し、植物セルロース繊維を効率的に分解する嫌気性細菌の培養工学的な検討を行い、それらを

組み合わせてセルロースから水素ガスを生産するシステムの構築を企てた。

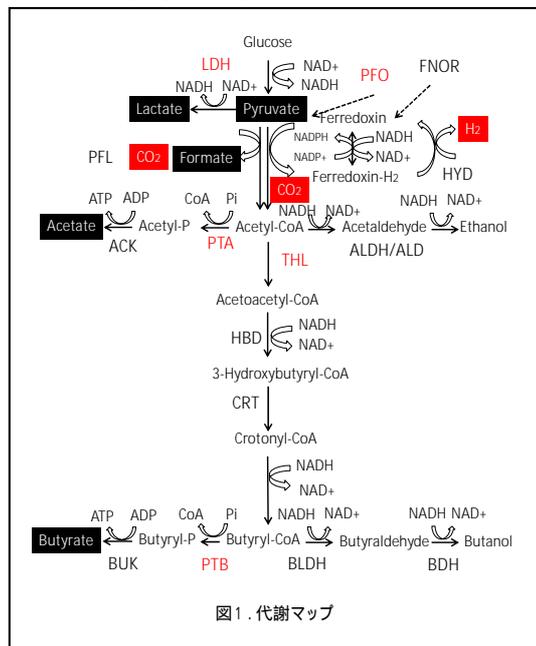
2. 研究の目的

水素ガス生産能を有し、難分解性バイオマスの生分解に寄与する嫌気性細菌の遺伝子を組換え、水素ガス生産性とバイオマス解機能を高めた嫌気性菌を育種して培養を至適化するために(1)水素代謝関連遺伝子の改変技術の開発と培養条件の至適化による水素ガス生産性の向上、(2)バイオマス分解性嫌気性菌と水素ガス高生産菌を組合わせて植物バイオマスからの水素ガス生産を検討した。具体的には、当研究室で分離され長年研究されてきた水素ガス生産菌 *Clostridium paraputrificum* M21 のピルビン酸代謝に関わる遺伝子を改変して水素ガス生産向上を図り、培養条件も至適化した。また、タイ王国のコンポストから単離され、当研究室で長年植物細胞壁分解酵素の解析を行ってきた *Ruminiclostridium josui* と共存培養条件の検討を行い、セルロースからの直接水素生産を行う条件を検討した。

3. 研究の方法

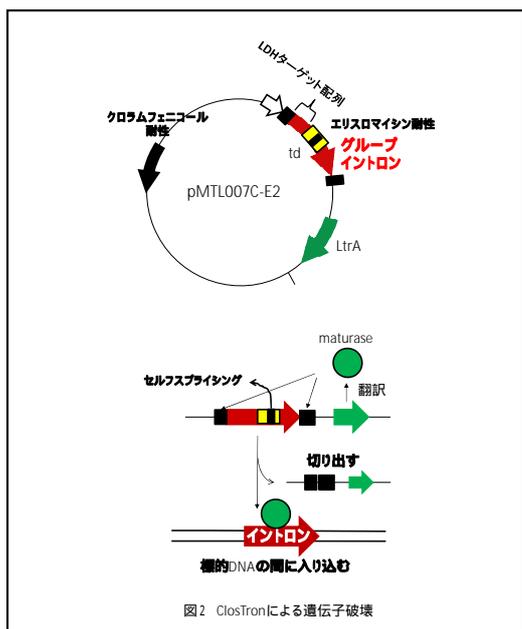
(1) 水素ガス生産性の向上のための分子遺伝学的な手法の確立

研究代表者らによる *C. paraputrificum* M21 の完全長ゲノム情報から、水素ガス生産代謝系の遺伝子は図1のように推定された。水素は、余った還元力 (NADH) を処理するために合成されると考えられ、代謝経路から考えると1モルのグルコースが完全に酢酸に変換された場合、4モルの水素が生産されるが、実際には理論どおりにはならない。過去の研究から、ヒドロゲナーゼを高発現させると水素ガス生産が増加し、乳酸の生産が減少した。酸化還元酵素に必須の鉄イオンを培地中に加えると水素ガス生産が約2倍になり、乳酸が減少し、酢酸と酪酸が増えることも発見し



た。これらのことから、乳酸と酪酸の生成を減少させることが水素生産の向上につながる事が推測されるため、乳酸・酪酸合成系遺伝子の発現を抑制することを計画した。

遺伝子の発現を抑制するには、遺伝子破壊を行うのが最も適している。しかし、通常の遺伝子破壊法を行うには本菌の形質転換効率は低すぎた。そこで、近年 *Clostridium* 属で遺伝子破壊に利用されている細菌のグループ II イントロンを応用した方法を採用した。プラスミド構築 (pMTL007C-E2) と実験方法は英国ノッティンガム大学の Minton 教授



の方法 (www.clostron.com) に従って行った。ClosTron 法の原理は図2の通りである。破壊をする乳酸デヒドロゲナーゼ LDH 遺伝子のターゲット配列を含むグループ II イントロンをリコンビナント PCR 法で合成して pMTL007C-E2 へ連結した。このプラスミド pMTL007C-E2-LDH をエレクトロポレーション法で *C. paraputrificum* へ形質転換した。形質転換体をクロラムフェニコール耐性で選抜したのち、形質転換体をエリスロマイシンを含む培地で選抜を行った。導入されたプラスミドからは、td イントロンを含むエリスロマイシン耐性遺伝子とグループ II イントロン領域が転写される。この RNA からセルフスプライシングによって td イントロンが除かれ、完全なエリスロマイシン耐性を含む RNA が生成する。この RNA と Ltr 蛋白質が合体して RNA はループ構造をとった高次構造をとる。その後、ターゲット配列によって目的の遺伝子 (LDH) 部位へグループ II RNA が挿入され、DNA へ逆転写されて染色体上へグループ II イントロンとエリスロマイシン耐性遺伝子が挿入された構造となる。従ってエリスロマイシン耐性で選抜することで、イントロンが染色体上に組み込まれた形質転換体のみが生育可能となる。その後、形質転換体のゲノムを単離し、PCR 法によって目的の LDH 遺伝子

にイントロンが挿入されているか確認を行った。さらに、クロラムフェニコールを除いた培地で培養を繰り返し、pMTL007C-E2 プラスミドが脱落した形質転換体を得た。

(2) 遺伝子破壊株の培養と代謝産物の分析
得られた遺伝子破壊株を嫌気培養瓶 100mL を用いて GS 改変培地で培養を行った。プチルゴム栓にチューブを刺して水上置換法でガスを回収した。培養が終了し、ガスの生産が停止してから、生産されたガス組成を TCD ガスクロマトグラフィーにて分析した。また、培養液を回収し、その上清中のアルコールと有機酸を FID ガスクロマトグラフィーと HPLC 法で分析した。

(3) *R. josui* と *C. paraputrificum* の混合培養によるセルロースからの水素ガス生産実験

R. josui と *C. paraputrificum* は培養条件が類似していることから、混合培養できる可能性があった。*R. josui* は *C. paraputrificum* に比べてセロピオースで培養した場合、増殖速度が遅いことから、混合培養は *R. josui* に適した GS 改変培地 (ミネラル入り) を使い、培養温度はセルロースの分解に適した 45 にした。マイナス 80 の冷凍庫で凍結保存した両菌株を常温にて融解し、100mL の GS 改変培地へ接種して (2) と同様に静置培養を行った。セルロースを炭素源とした場合は、時々攪拌をおこなって両菌とセルロースが良く混ざるようにして培養した。生産されたガスの回収と、培養液中の代謝産物は (2) と同様の方法で分析した。

4. 研究成果

(1) ClosTron 法による遺伝子の破壊と水素ガス生産の解析

LDH 遺伝子の破壊

C. paraputrificum には 2 つの LDH 遺伝子が存在していたが、RNA-seq と半定量的 RT-qPCR の結果より、主に発現しているのは 1 つであった。この LDH 遺伝子について、ClosTron 用のプライマーをデザインし、リコンビナント PCR によってターゲット配列を含むイントロン RNA 遺伝子を合成して、pMTL007C-E2 へサブクローニングした。得られたプラスミドをエレクトロポレーション法で *C. paraputrificum* へ形質転換したところ、数個のクロラムフェニコール耐性コロニーが得られた。これらを液体培地へ懸濁してからエリスロマイシン耐性寒天培地へ塗抹したところ、多数のエリスロマイシン耐性コロニーが得られた。これらのコロニーを PCR 法によって想定される LDH 遺伝子部位にイントロン配列が挿入されているか調べたところほぼ全てのコロニーでイントロン挿入が想定される大きさの約 2kb にバンドが見られたことから、LDH 遺伝子が破壊されていると判断した。これらのコロニーから 1 つを選んで、抗生物質を含まない培地で培養をした後に、クロラムフェニコール感受性となったものを

選抜し、pMTL007C-E2-LDH プラスミドが脱落した株を得た。この株を使って、嫌気瓶で培養を行ったところ、水素ガスの生産が GS 改変培地（鉄入り）で約 1.4 倍に増加した。一方で、乳酸はほとんど生産されず、酢酸や酪酸、エタノールが増加した。このことから、乳酸デヒドロゲナーゼが機能しなくなることで、この反応で消費される NADH が水素ガス生産へ向くか、あるいは代謝の流れがピルビン酸からアセチル CoA への変換へより多くなるためではないかと推測された。

ピルビン酸代謝を中心とした代謝系遺伝子の破壊株作製

Clostron 法を用いて *ldh* 遺伝子の破壊に成功したので、その他の有機酸代謝系遺伝子の破壊を試みた。ピルビン酸からアセチル CoA を生じる経路に働くピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼ (PFO) 遺伝子破壊株、アセチル CoA からアセトアセチル CoA を生産するチオラーゼ (THL) 遺伝子破壊株、アセチル CoA から酢酸生産に働くリン酸トランスアセチラーゼ (PTA) 遺伝子破壊株、ブチリル CoA から酪酸生産に働くリン酸トランスブチラーゼ (PTB) 遺伝子破壊株の作出に成功した。これら破壊株を嫌気瓶で培養して水素ガス生産を調べたところピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼ遺伝子株のみ水素と二酸化炭素の生産が大きく減少した。

(2) *R. josui* と *C. paraputrificum* の混合培養によるセルロースからの水素ガス生産
C. paraputrificum は豊富に存在する難分解性バイオマスであるセルロース分解能を持たないため、セルロース分解能を持つ菌と共培養することによってセルロースをグルコースに分解し、そのグルコースを炭素源として *C. paraputrificum* が水素生産を行うことができないか検討を行った。タイの堆肥から単離されたグラム陽性嫌気性菌 *R. josui* は、45 °C、GS 改変培地 pH7.4 で生育し、この生育条件は *C. paraputrificum* の生育条件と類似している。そこで *R. josui* を *C. paraputrificum* と共培養することによってセルロースから水素生産を試みた。まずは分解しやすいボールミル処理をしたセルロースを炭素源として培養を行った。*R. josui* の単培養では水素生産量は非常に低かったが、*R. josui* と *C. paraputrificum* を共培養することによって、*R. josui* 単培養に比べて約 5 倍の水素が生産された。さらに、微結晶性セルロースを炭素源として共培養を行っても、*R. josui* 単独よりも共培養のほうが 2 倍の水素ガスが生産された。

本研究により、水素高生産菌 *C. paraputrificum* の分子遺伝学的手法による遺伝子改変が可能となった。これにより代謝工学の可能性が大きく開けた。また、セルロース分解菌の *R. josui* をセルロース分解者

として利用し、*C. paraputrificum* によって水素ガスを生産するシステムを構築する可能性が示された。今後は、*R. josui* についても分子遺伝学的手法を応用できるように展開することで、さらに効率的に植物バイオマスから水素を生産することが出来る可能性が示された。

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 11 件)

関兵馬 國武絵美 栗冠真紀子 木村哲哉 栗冠和郎 *Clostridium paraputrificum* の水素ガス生産に関わる代謝経路の分子遺伝学的解析 日本農芸化学会 2018 年度大会 (名古屋) (2018)

関兵馬、吉田稜、栗冠真紀子、國武絵美、木村哲哉、栗冠和郎 *Clostridium paraputrificum* の水素ガス生産向上をめざした有機酸生産経路の解析 第 69 回日本生物工学会大会 (東京) (2017)

吉田稜、栗冠真紀子、木村哲哉、栗冠和郎 *Clostridium paraputrificum* の乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子破壊による水素ガス生産増強 日本農芸化学会 2017 年度大会 (京都) (2017)

三縄由希子、吉田稜、関兵馬、大島健志郎、服部正平、栗冠真紀子、木村哲哉、栗冠和郎 *Clostridium paraputrificum* M21 株の RNAseq による水素ガス生産に関与する遺伝子の解析 第 37 回日本分子生物学会大会 (横浜) (2016)

関兵馬、吉田稜、三縄由希子、栗冠真紀子、木村哲哉、栗冠和郎 嫌気性細菌 *Clostridium paraputrificum* を基盤とした植物バイオマスからの水素ガス生産方法の検討 第 68 回日本生物工学会大会 (富山) (2016)

吉田稜、関兵馬、三縄由希子、大島健志郎、服部正平、栗冠真紀子、木村哲哉、栗冠和郎 嫌気性細菌 *Clostridium paraputrificum* の乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の解析とバイオ水素ガス生産向上への応用 日本農芸化学会 177 回中部支部例会 (名古屋) (2016)

関兵馬、吉田稜、栗冠真紀子、木村哲哉、栗冠和郎 嫌気性細菌の共存培養によるセルロースからの水素ガス生産 日本農芸化学会 2016 年度大会 (札幌) (2016)

西村仁宏、大島健志郎、服部正平、栗冠真

紀子、木村哲哉、栗冠和郎 キチン資化性嫌気性細菌 *Clostridium paraputrificum* M21 株が生産するキチンオリゴ糖を分解するキチナーゼの解析 第 38 回日本分子生物学会大会 (神戸) (2015)

西村仁宏、大島健志朗、服部正平、栗冠真紀子、木村哲哉、栗冠和郎 *Clostridium paraputrificum* のファミリー-18 キチナーゼ遺伝子の解析 日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山) (2015)

W. Takanashi, K. Morimoto, M. Kawase, H. Taguchi, S. Karita, M. Sakka, K. Ohmiya, T. Kimura and K. Sakka Heterologous expression of xylanase and cellulase genes of Clostridia in hydrogen producing *Mie Bioforum 2014 (Ise-Shima)* (2014)

K. Nishimura, S. Suzuki, E. Funahashi, K. Oshima, M. Hattori, M. Sakka, T. Kimura and K. Sakka Analysis of family 18 chitinases in *Clostridium paraputrificum* M21 by complete genome analysis *Mie*

Bioforum 2014 (Ise-Shima) (2014)

〔図書〕(計 1 件)

K. Sakka, T. Kimura, Y. Tamaru, S. Karita, M. Sakka, S. Jindou Lignocellulose degradation and biorefinery, Unipublishers Co., Ltd (2015) ISBN978-4-946450-36-5 C3061 351 (p339-343)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

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・教授

研究者番号：00281080