

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26740037

研究課題名(和文)環境浄化と微生物代謝学の再考：シンプルな代謝設計でCO<sub>2</sub>からの有価物生産に挑む研究課題名(英文)From waste to value: challenge to microbial production of organic compounds from CO<sub>2</sub>

研究代表者

佐藤 由也 (Sato, Yuya)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・環境管理研究部門・研究員

研究者番号：80711291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、微生物を利用したCO<sub>2</sub>からの有価物生産に挑んだ。微生物による物質生産の共通課題は、物質生産をさせることで微生物の生育が阻害されることである。そこで、遺伝子の発現量を調節できる「プロモーター領域」を物質生産遺伝子と融合させ、特定のタイミングで生産を開始できる系の構築を目指した。結果として3種類の物質生産遺伝子を目的微生物に導入することに成功し、様々な条件で物質生産を試みたが、これまでのところごく微量な生産しか確認できていない。一方で、本研究を通して効率的な遺伝子組み換え法を確立することができ、当該微生物の持つユニークな防御遺伝子についても解析を進めることが出来た。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed at microbial production of organic compounds from CO<sub>2</sub>. A common challenge of microbial production system is that microbial growth can be inhibited by starting the matter production. Therefore, I tried to control the timing of the production by fusing a key gene with a particular "promoter region" that can regulate the gene expression. As results, three genes, which are responsible for organic-compound production, fused with the promoter region were successfully introduced to a CO<sub>2</sub>-utilizing bacterium. Although the production test using the genetically modified bacteria was performed under various conditions, significant increase in productivity was not observed. On the other hand, an efficient method for gene introduction into this bacterium was developed through this study; Further, a unique defense enzyme was found and investigated.

研究分野：環境微生物学

キーワード：物質生産 独立栄養性細菌 CO<sub>2</sub>

1. 研究開始当初の背景

- (1) 環境問題への関心が強まる昨今、主要な温室効果ガスとして警戒されるCO<sub>2</sub>の排出量削減は各国の急務となっている。CO<sub>2</sub>量の削減法は、物理・化学的方法（地下貯留など）と生物学的方法の二つに大別できるが、後者は生物がCO<sub>2</sub>を何らかの生産物に変換するという重要な特徴を有する。多くの場合生物は、体細胞を作るために原料であるCO<sub>2</sub>を消費するが、そのCO<sub>2</sub>からの代謝の流れを有用物質生産に向けてことができれば、「不要物」であるCO<sub>2</sub>を原料にした「有価物」の生産が可能になる。
- (2) 低炭素化社会への移行を背景に、CO<sub>2</sub>固定微生物（独立栄養性微生物）によるCO<sub>2</sub>を原料とした物質生産の研究は近年脚光を浴びつつある。しかし、一連の先行研究では目的産物の種類や収量には限りがある。また、独立栄養性微生物は一般的に増殖が遅く、物質生産システムを大規模化する際にはこの増殖速度はデメリットとみなされる。このように、独立栄養性微生物は物質生産システムとしては扱いが難しく、採用されにくいのが現状である。そのため、既存の戦略とは一線を画する、新しい生産モデルの構築が強く望まれている。
- (3) 今日まで、大腸菌などのモデル微生物を使った物質生産技術については多くの研究がなされてきた。しかしながら、産業化にまで結び付いたものはごく僅かである。産業化を妨げる大きな課題は、物質生産系における微生物の「生育」と目的物の「生産」の間に生じるトレードオフといえる。例えば産業化にも成功しているアミノ酸を例に取ると、アミノ酸は微生物にとって必須の栄養素であるため、無計画に生産（生産を優先）させ続けると、微生物は栄養不足で生育できず系が成り立たなくなってしまう。反対に、微生物の生育を優先すると、原料であるCO<sub>2</sub>のほとんどが体細胞合成のために消費されてしまい、物質生産は抑えられてしまう。目的産物を高収量で得るためには多くの細胞が必要だが、細胞数が多いほど目的産物の自己消費量も顕著になるため、厄介なトレードオフが生じている。
- (4) 低炭素化の意識が国民のスタンダードとなりつつある現在、独立栄養性微生物を用いた効率的な物質生産システムを構築することができれば、産業だけでな

く社会的にも大きなインパクトとなるはずである。しかしそのためには、上述の課題を打開する必要がある。

2. 研究の目的

- (1) 本研究のコンセプトは「不要物からの有価物の創出」である。環境浄化・負荷低減技術の在り方として、環境負荷物質をただ低減するのではなく、処理を介して有価物に変換する戦略こそが今後ますます重要になると考える。本研究では、CO<sub>2</sub>を固定する独立栄養性微生物を利用することで、CO<sub>2</sub>を原料とした有価物生産系の構築を目指した。
- (2) 特に上で挙げた課題については、増殖が早く多様な条件で培養可能な独立栄養性微生物を使い、遺伝子発現量を調節する「プロモーター領域」を目的の物質生産遺伝子と融合し、特定のタイミングで生産を開始させることで打開する。なお、効率的な遺伝子導入法を確立し、微生物による物質生産研究を促進させる基礎を築くことも目標にする。さらに、これらの取り組みを通じて科学的・産業的に意義深い遺伝子等を見出した場合、それらについても解析を行い、有用な知見を得る。

3. 研究の方法

- (1) 本研究では遺伝子改変により独立栄養性微生物に物質生産能を付与する。背景(2)に記載した課題を打開するため、独立栄養性微生物の中で極めて高い増殖速度を有する水素資化性細菌 *Hydrngenophilus thermolutelus* 等を研究対象に用いる。本菌は水素をエネルギー源にCO<sub>2</sub>固定を行うが、その増殖速度はモデル微生物である大腸菌と比較しても遜色なく、アミノ酸合成をはじめとする代謝活性は極めて高いことが想定される。また本菌はCO<sub>2</sub>だけでなく一般的な有機物も炭素源として生育可能であり、幅広い温度でも培養可能という重要な特徴を有する。
- (2) 背景(3)に記載した課題については、増殖フェーズの違いと遺伝子発現領域の導入を利用して打開する。ヒトの成長過程に成長期があることと同様に、微生物の生育にも増殖速度の変化が存在する。大腸菌等の一般的な微生物は培養開始から数時間で爆発的に増殖し（対数増殖期）、十数時間後には増殖が止まり菌数は一定になる（定常期）。定常期の微生物

物は増殖を止めてはいるが、エネルギー獲得は続け、細胞の恒常性維持を行いながら細胞死を免れている。つまり定常期は、原料が菌体の合成に消費される割合は低くなり、物質生産をさせるための絶好のタイミングといえる。導入する物質生産遺伝子に、遺伝子発現のタイミングを調整する「プロモーター領域」とよばれる遺伝子領域を融合させることで、菌体が十分に増えたタイミングで物質生産を開始させるという戦略をとる。

- (3) 物質生産遺伝子としては、有機酸等の生産を担うものを複数種類を候補とした。導入遺伝子の発現時期を戦略的に調整することが重要になるため、上記の通り、各物質生産遺伝子と特定のプロモーター領域を融合し、それを目的微生物のゲノムに導入することで物質生産系を構築する。プロモーター領域の選定には、ゲノム情報や遺伝子発現情報を最大限に活用する。

#### 4. 研究成果

- (1) 初めに、独立栄養性微生物のゲノム情報と遺伝子発現情報を精査することで、有力なプロモーターの選定を進めた。本課題では独立栄養条件で下流の遺伝子を高発現させるプロモーターを選定し、培養条件を変えることで物質生産のスイッチを入れる戦略をとった。なお、当該遺伝子領域は使用する微生物自身のゲノムからクローニングすることで、安定した発現量調節を狙った。次に、対象微生物への遺伝子導入法の確立を試み、相同組換えによってゲノム中に目的の遺伝子を導入する方法を構築した。
- (2) 物質生産遺伝子としては有機酸生産遺伝子など4種類の遺伝子を選定し、それぞれを上記のプロモーター領域と融合させ、目的微生物ゲノムへの導入を試みた。その結果、3種についてはゲノム導入に成功したが、残り1種は成功には至らなかった。なお、細胞内の代謝の流れに影響が出るためか、物質生産遺伝子のゲノムへの導入は著しく困難であり、様々な条件での検討が必要で、長い研究期間を要した。遺伝子導入に成功した3種については組み換え微生物の培養試験を行い、CO<sub>2</sub>を原料とした物質生産を試みた。当該試験では前半に栄養培地で培養することで十分な菌体量を確保し、後半には無機培地に切り替え、水素を唯一のエネルギー源、CO<sub>2</sub>を唯一の炭素源、

酸素を最終電子受容体として培養を行うことで、CO<sub>2</sub>を原料とした物質生産に取り組んだ。これまでのところ、ごく微量な目的産物の存在は確認できているが、温度や培地組成などの改良を加えても有意な生産量向上までは確認できていない。これはおそらく、物質生産開始による菌体へのダメージが原因と考えられる。遺伝子発現を促進する遺伝子領域に加えて、目的遺伝子の発現を強く抑制する遺伝子領域の導入が重要であると認識している。

- (3) 一方、本課題を進める中で、様々な条件での遺伝子導入を試みており、これらの条件を精査することで、目的に応じた効率的な遺伝子導入法を構築・整理することができた。対象微生物についてはエレクトロポレーションによる遺伝子導入を行っていたが、セレクトションの際の培地を寒天からゲルライトに変更することで、組み換え微生物の生存確率が著しく上昇することがわかった。また、セレクトションの際の温度も重要であり、湿度を一定に保ちながら50℃等の比較的高温で培養することで微生物の生存率を向上させることが出来た。また、本研究で扱った独立栄養性細菌の酸化ストレス防御酵素がユニークな性質を持つことが分かり、これについても解析を進めることができた。微生物による物質生産系をスケールアップする際、培養液の曝気などに空気が使えることはコストの面で極めて重要であるが、空気の主要成分である酸素は反応性が高く、微生物に対しては危険性も有する。当該防御酵素は突出して高く発現しているわけではないが、常に少量が発現しており、当該微生物が突然酸化ストレスに直面した際に重要な役割を果たすと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1件)

- (1) Autotrophic and heterotrophic accumulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by a moderately thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1, Huu Tri Nguyen, Fumiko Ishizuna, Yuya Sato, Hiroyuki Arai, Masaharu Ishii, 日本農芸化学会 2015 年度大会、岡山、2015 年 3 月 26 日 - 29 日

[その他]

所属研究グループホームページ

<https://unit.aist.go.jp/emri/114envmicrob/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 由也 (SATO, Yuya)

国立研究開発法人産業技術総合研究所

環境管理研究部門

研究員

研究者番号：80711291