

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11708

研究課題名(和文) バイオ水素ガス生産の基盤技術となる嫌気性細菌の遺伝子改変技術確立とその応用

研究課題名(英文) Development of gene engineering method for anaerobic bacteria for efficient bio-hydrogen production

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：海洋性バイオマスのキチンを効率的に分解し水素ガスを高生産する嫌気性細菌 *Clostridium paraputrificum* を利用して、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することを究極の目的として、本菌の水素ガス生産経路の解明を分子生物学的な遺伝子破壊方法を応用して解析した。その結果、ピルビン酸からアセチルCoAへの変換経路が水素ガス生産に重要であり、特に嫌気性細菌特有の酵素であるピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼは生育に必須であること、乳酸生産からアセチルCoA生産へ代謝の流れが多くなることで水素ガス生産が増加することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嫌気性細菌の研究は、第二次大戦時代に石油代替え燃料としてアセトン・ブタノール発酵の研究がなされ、エネルギー資源の乏しい我が国が世界に先駆けていたが、その後はあまり研究されてこなかった。近年、地球温暖化対策の観点から、嫌気性菌による発酵は世界的にも再び注目を浴びている。嫌気性菌には難分解性バイオマスを分解し、水素ガスを生産する優れたものが存在するが、水素利用技術で世界をリードする我が国にとっても非常に重要である。本研究で水素を高生産するオリジナルの菌株で水素生産経路を明らかにした意義は、新しいゲノム編集技術を応用したバイオ水素ガスの高生産株育種のための基盤情報として意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：The ultimate goal is to use the anaerobic bacterium *Clostridium paraputrificum* to produce bio-hydrogen gas, which efficiently use the marine biomass chitin as an energy source without the environment load. The hydrogen gas production pathway of this bacterium was analyzed by applying the recent molecular biological gene disruption method, CloStron technology. As a result, the conversion pathway from pyruvate to acetyl-CoA is important for hydrogen gas production, and pyruvate ferredoxin oxidoreductase, which catalyzes this step peculiar to anaerobic bacteria, is essential for growth. It was clarified that inhibition of lactate production pathway increased hydrogen gas production due to the metabolic flow change. When pyruvate to lactate is blocked, flow from pyruvate to acetyl-CoA by pyruvate ferredoxin oxidoreductase would be increased.

研究分野：応用微生物学

キーワード：Clostridium 水素ガス バイオマス 遺伝子工学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

第二次大戦当時、石油に代わる燃料として嫌気性細菌によるアセトン・ブタノール発酵の研究がなされたが、その後はあまり研究されてこなかった。近年、地球温暖化対策の観点から、嫌気性細菌による発酵は再び注目を浴びている。嫌気性細菌には難分解性バイオマスを分解し、水素ガスを生産する優れたものが存在するが、扱いの困難さから分子遺伝学的な解析は著しく遅れてきた。水素社会の実現は、地球の環境を守る観点からも、また水素利用技術で世界をリードする我が国にとっても非常に重要な課題である。そこで、最近開発された新技術によって遺伝子改変が可能となった、「海洋バイオマスから水素ガスを高生産する *Clostridium* 属」と「植物バイオマスを効率的に分解する *Ruminiclostridium* 属」の遺伝子機能を解明し、遺伝子工学を駆使して多様なバイオマスから水素ガスへの変換効率の向上を目標とする。

水素は次世代エネルギーの本命候補のひとつとして期待され、「エネルギー基本計画」にも活用促進が盛り込まれている。電力の貯蔵という点からも、余剰の電力を水素として貯蔵すればエネルギーの地産地消も可能である。我が国は水素関連技術で大きくリードしていると言われており、産業的にも水素社会実現の意義は大きい。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、国内の自然エネルギーを使って水素を作ることが必要になる。自然エネルギーからの水素生産には、太陽光や風力、水力などから電気を起こし水の加水分解によって取り出す方法と、バイオマスからの生産が考えられる。バイオマスは言うまでもなく植物が太陽エネルギーを単糖類のポリマーとして多量に蓄積したものである。また、キチンは食物連鎖によって得たエネルギーから生物が作り出したポリマーである。これらのバイオマスは哺乳類の消化酵素では分解できないことから食糧と競合することはなく、微生物を利用して難分解性バイオマスから水素を直接生産すれば循環型水素社会の構築に貢献できる。

### 2. 研究の目的

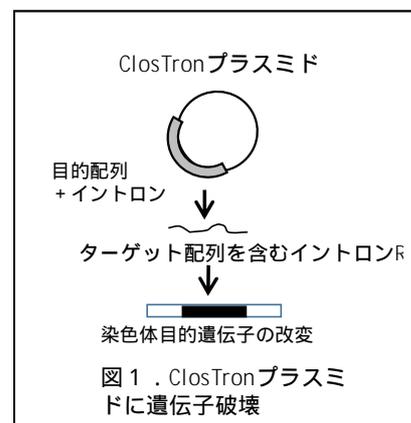
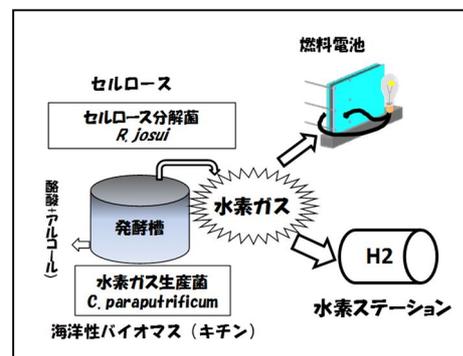
バイオマスの分解を行う微生物では、カビなどの好気性微生物は早くから研究が行われ、生産される酵素は産業的にも利用されてきた。一方、嫌気性微生物はこれまで培養が困難とされ敬遠されてきたが、申請者の研究室ではバイオマスを効率的に分解する *Clostridium* 属（現在で *Ruminiclostridium* 属と *Clostridium* 属に分類）を分離し、バイオマス分解酵素や代謝経路について 30 年以上研究成果を蓄積してきた。これらの中には、海洋性バイオマスのキチンを効率的に分解し水素ガスを高生産する *Clostridium parapatrificum* も含まれる。これら嫌気性細菌を応用すれば、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ことは想像に難くないが、嫌気性細菌の代謝経路は好気性細菌と異なる点も多く、分子遺伝学的な技術も不十分である。嫌気性細菌は、遺伝子工学の成功例が少なく、まず対象の菌株で遺伝子工学の基盤技術を確立することが必要となる。そのため申請者の研究室では、保有する水素高生産菌 *C. parapatrificum* の遺伝子解析と遺伝子改変技術の安定化をめざして研究を行ってきた。また、セルロース分解菌 *Ruminiclostridium josui* についても多様なバイオマス分解酵素の遺伝子解析や遺伝子導入法の開発を行ってきた。これらの研究成果として、嫌気性細菌の遺伝子工学や培養のノウハウについては相当な積み上げができた。

微生物による分解は、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ことから、遺伝子工学技術によって改良した嫌気性菌で、複雑かつ難分解性の植物繊維を効率良く分解し、代謝制御により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、上述した水素ガスを高生産する *C. parapatrificum* の水素ガス生産経路解明と遺伝子改変による水素ガス高生産性株の分子育種、セルロース分解菌 *R. josui* の植物セルロース繊維の分解能向上を目的とした遺伝子の解析を行うことにした。

### 3. 研究の方法

#### (1) *C. parapatrificum* の遺伝子破壊方法

遺伝子の機能を解析するには、目的の遺伝子を破壊して機能を失わせることで現れる表現型を調べることが微生物遺伝学の常道である。しかしながら、古典的な相同組み換えによる遺伝子破壊が可能な嫌気性細菌は限られていた。*Clostridium* 属ではアセトン・ブタノール発酵菌なども、相同組み換え効率が低く遺伝子破壊が困難で、分子遺伝学的な解析が遅れていた。英国ノッティンガム大学の Minton 教授らのグループは、細菌の Group II イントロンを応用する方法で *Clostridium* 属の遺伝子を効率的に破壊する方法を開発し(Heap et al., J. Microbial Method, 2007)、イントロンのデザインを計算する WEB サイト(www.clostron.com)も公開したうえ、プラスミドの



配布も行って広く技術の普及に貢献している。本研究でも Minton 教授から分与された ClosTron プラスミドを利用した。概要は図 1 に示す通りである。遺伝子破壊用のイントロン配列のデザインは Minton 教授が公開しているプログラムにて行った。また、遺伝子破壊用プラスミドの構築は、当初は研究室で通常のリコンビナント PCR 法にて行っていたが、プラスミドの形質転換効率が低くて構築が困難なことも多かったため、作成のコストと効率を上げるため、同 WEB サイトが推奨している米国の ATUM 社に依頼した。*C. paraputrificum* の形質転換は当研究室で報告しているエレクトロポレーション法にて実施した(Sakka et al., J. Biosci. Bioeng., 2003)。

### (2) 培養と生産ガス及び代謝産物の解析

*C. paraputrificum* の培養は、窒素ガスで置換した GS 改変培地にて行った。少量の培養と菌株の保存用には 10mL のハンゲートチューブを使用し、ガスの生産実験には 100mL の嫌気瓶を使用した。嫌気瓶にはブチルゴム栓をアルミキャップで固定し、1mm 径の金属管にブチルゴム管を連結して嫌気瓶のブチルゴム栓に刺して、水上置換法にてガスを回収した。具体的にはクエン酸で弱酸性にしたクエン酸水を水層に入れ、経時的にメスシリンダー内に回収したガス生産量を記録した。培養終了後に、嫌気瓶のヘッドスペースにたまったガスを注射器にて回収し、TCD 検出器を装着したガスクロマトグラフィーにてガス組成を分析した。培養液中のアルコールは FID ガスクロマトグラフィーで、有機酸は HPLC (島津製作所の有機酸分析システム) にて定量した。

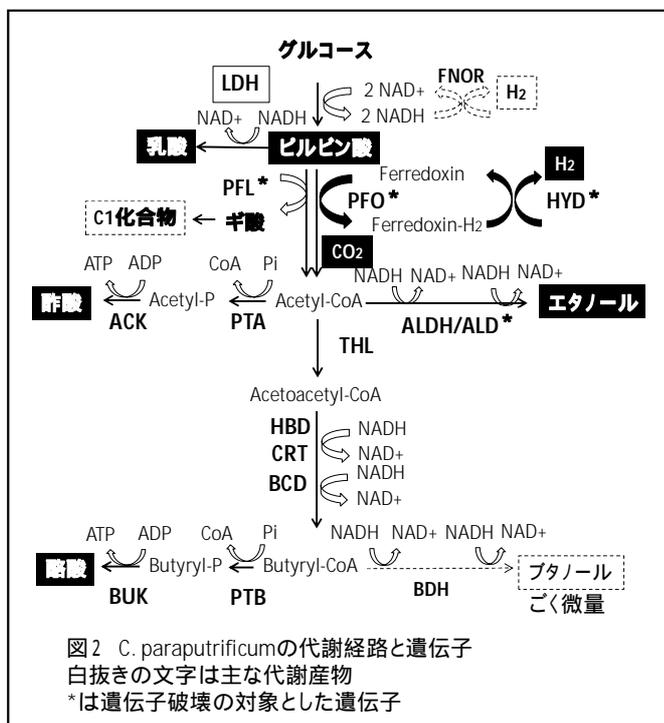
### (3) 遺伝子発現の解析

*C. paraputrificum* の遺伝子発現はリアルタイム PCR 法で行った。培養液を回収後、totalRNA をフェノール法にて回収し、混入した染色体 DNA を市販の DNase で分解した後、RT-PCR にてリアルタイム PCR の鋳型とした。リアルタイム PCR には東洋紡の Thunderbird qPCR キットを使用した。

## 4. 研究成果

### (1) *C. paraputrificum* の遺伝子破壊と代謝産物の解析

水素ガス高生産株である *C. paraputrificum* の基本代謝経路の解明に向けて、ゲノム配列から推測される遺伝子群から代謝予測図を作成した(図 2)。以前の研究成果より、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)遺伝子を破壊したところ、LDH 破壊株ではグルコースを炭素源とした場合は乳酸の生産がほぼなくなり、水素ガスの生産が野生株の 1.4 倍に増加することが分かっていた。これは、LDH が生産されなくなったことで、代謝の流れがピルビン酸からアセチル CoA へ向かい、この経路で生じる還元力が水素ガス生産に向けたためではないかと予測された。*C. paraputrificum* の特徴は、海洋性バイオマスキチンから水素ガスを生産できることがあげられるが、キチンを炭素源としても水素ガスの生産が増加した。そこで、LDH 破壊の影響を解析するため、培養条件とガス生産の関係について解析を行った。まず、ガス生産の経時変化を調べたところ、野生株は細胞増殖に従いガスが生産されて、増殖が停止して溶菌が始まるとガス生産が止まるのに対して、LDH 破壊株では、増殖後期から静止期になったあとも溶菌が抑えられ、しばらくガスの生産が続くことによって野生株よりも多くのガスが生産されることが分かった。細胞増殖度やガス生産速度は野生株と LDH 破壊株でもほとんど差が見られなかった。これらのことから、LDH 破壊によって乳酸の生産が抑制されることで、生産された乳酸が対数増殖期後期に代謝全体に影響を及ぼすことによる水素ガス生産の低下が回避された可能性が予測された。しかし、野生株と LDH 破壊株で乳酸をあらかじめ添加して培養を行ったところ、予想に反してどちらの株でも水素ガスの生産が増加する現象がみられた。このことから、乳酸が代謝される別の経路が存在する可能性が示唆された。



上記の実験から、ピルビン酸からアセチル CoA への代謝が水素ガス生産に重要な働きをしていることが示唆されたため、この経路で働く二つの酵素遺伝子、すなわちピルビン酸フェレドキシノキシドレダクターゼ(PFO)遺伝子とピルビン酸ギ酸リアーゼ(PFL)遺伝子の破壊を試み

た。しかし、どちらの遺伝子も破壊株を単離することができなかったことから、この経路は生育に必須である可能性が示唆された。PF0 破壊からは、偶然 1 株だけ破壊株が得られたが極めて生育が遅く、水素ガス生産は全くおこらなかった。この株は PF0 遺伝子の破壊に加えて、それを抑制する何らかの二次的な変異が起こっている可能性があり、興味深い生育が悪く変異株の維持が難しいことが予測される。一方、PFL は、生産されるギ酸が炭素 1 個の化合物を合成するための供給源であると他の菌で報告されており、*C. paraputrificum* でも生育にとって重要な反応である可能性がある。偶然にも単離できた PF0 破壊株の結果からは、この経路が水素ガス生産の唯一の経路である可能性を示唆している。しかしながら、他の *Clostridium* 属でも水素ガス生産経路として報告されているヒドロゲナーゼ (HYD) 遺伝子を破壊した株では、水素ガス生産がわずかに減少したのみであった。ヒドロゲナーゼの多様性と水素ガス生産については、*Clostridium* 属細菌でも様々な報告があり、本菌でもその多様性が予測されることから、*C. paraputrificum* についても図 2 に示したとおりの経路でない可能性が高い。

LDH 破壊株において水素ガス生産が増加したが、酢酸やエタノール、酪酸の生産も増加した。水素ガス生産の増加は本研究の目的の一つであるが、培養後の培養液から産業上も有用な物質を回収できることは重要である。バイオエネルギー源として、アルコールは水素と並んで注目される。*C. paraputrificum* においても、水素ガス生産と同時にアルコール生産が出来ればより産業的に有利となる。そこで、本菌のアルコール生産経路について調べることにした。細菌におけるアルコール生産は、アルコール酵母の経路と異なり、アセチル CoA からエタノールが生産される。この経路は、アルデヒドデヒドロゲナーゼとアルコールデヒドロゲナーゼの独立した 2 つの酵素ドメインをもつ 1 つのポリペプチドからなる酵素 (ALDH/ADH) が働くことが多くの細菌で報告されている。そこで、*C. paraputrificum* のゲノム配列を調べたところ、ALDH/ADH をコードすると予測される遺伝子が一つ見つかった。この遺伝子がアルコール生産とブタノール生産に働いていることが予測されたため、この遺伝子の破壊株を作出した。ALDH/ADH 破壊株は野生株に比べてエタノールの生産が 20% ほどに低下した。さらに、もともとブタノールの生産は低いが、ブタノールの生産も 20% ほどに低下した。このことは、ALDH/ADH がエタノール生産とブタノール生産の両方を担う酵素であることを示している。一方で、BDH 遺伝子を破壊してもブタノール生産に影響は見られなかった。

## (2) 乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子破壊と遺伝子発現への影響

上記(1)にも述べた通り、LDH が乳酸の生産を担っており、この経路がおそらく解糖系で生じた NADH の再酸化に重要な役割を果たしている可能性が高い。NADH と NAD<sup>+</sup> のバランスは、細胞内の酸化還元電位と密接な関係があり、その結果、水素ガス生産を始め多くの代謝酵素の遺伝子発現にも影響を与える可能性がある。*C. paraputrificum* のゲノム配列上には 2 つの LDH 遺伝子が存在しており、対数増殖期細胞の RNA-seq 発現解析から、少なくとも対数増殖期においては、一方の遺伝子のみが発現していることが分かっていた。そこで、LDH 遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法で調べるとともに、LDH 遺伝子の破壊が代謝系下流遺伝子の発現に与える影響について調べた。RNA の抽出は対数増殖期中期から後期にかけての菌体から行った。また、対数増殖期の終わりでは菌体の溶菌が起こり RNA の分解が起こっているため、完全な RNA 抽出が出来なかった。

ピルビン酸からアセチル CoA への変換に働く PF0 遺伝子、PFL 遺伝子の発現を比較したが、どちらの遺伝子も野生株と LDH 破壊株で発現量の大きな差はみられなかった。このことは、PF0 の担う経路が水素ガス生産に中心的な働きをしていると推測されるが、これは遺伝子発現に差が生じるためではなく、ピルビン酸の濃度が増えることによって酵素反応が進行する結果であることを示唆している。また、LDH 破壊によってアルコールや酢酸が増加する。ALDH/ADH 遺伝子の発現は LDH 破壊株で約 2 倍高くなっていたが、一方、酢酸キナーゼの発現に変化はなかった。LDH の反応では NADH の酸化が行われることと、ALDH/ADH でも NADH の酸化が行われることと関係があるかもしれないが、今後の詳細な解析が必要である。

## (3) *R. josui* の遺伝子解析

*R. josui* の分子遺伝学的な解析には、完全長のゲノム配列情報は欠かせないが、現在 JGI のプロジェクトでは、2 つの大きな Scaffold (3.58Mb と 0.88Mb) になった状態である。そこで、PCR 法を使って JGI の配列をもとにして解析したところ、この 2 つの Scaffold のうち一方の末端同士はつながることが示された。しかし、もう一方の末端同士は PCR 法による断片の増幅は出来たものの、リボソーム RNA 配列の繰り返し配列が存在する可能性があり配列を確定することはできなかった。

*R. josui* のセルロース分解には、骨格タンパク質遺伝子を含むセルラーゼ遺伝子クラスターの中に存在する Cel48 が最も重要な働きをしていることが予測された。すでにこの cel48 遺伝子を発現するプラスミドを構築して形質転換に成功しているが、この遺伝子の機能を明らかにする目的で、Cel48 遺伝子を破壊するための ClosTron プラスミドを構築した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小川莉奈、松田茜、関兵馬、吉田稜、栗冠真紀子、栗冠和朗、木村哲哉
2. 発表標題 嫌気性細菌Clostridium paraputrificumの水素生産経路に関する分子遺伝学的解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------