

二国間交流事業 共同研究報告書

平成24年 4月10日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

共同研究代表者所属・部局 広島大学大学院先端物質科学研究科

職・氏名 (ふりがな) かとう じゅんいち
教授・加藤純一

1. 事業名 相手国(タイ)との共同研究 振興会対応機関 (NRCT)
2. 研究課題名 バイオマスからの化学品バイオプロダクションのための有機溶媒耐性生体触媒開発

3. 全採用期間

平成21年4月1日 ~ 平成24年3月31日 (3年0ヶ月)

4. 経費総額

(1) 本事業により執行した研究経費総額 7,500,000円

初年度経費 2,500,000円、 2年度経費 2,500,000円、 3年度経費 2,500,000円

(2) 本事業経費以外の国内における研究経費総額 4,500,000円

5. 研究組織

(1) 日本側参加者（代表者は除く）

氏名 <small>(ふりがな)</small>	所属・職名	研究協力テーマ
あき つねひろ 秋庸裕	広島大学・准教授	有用物質生産に関する遺伝子の分離
なかしまだ ゆたか 中島田豊	広島大学・准教授	有用物質生産バイオプロセスの構築
たきぐち のぼる 滝口昇	金沢大学・准教授	有用物質生産バイオプロセスの構築
たじま たかひさ 田島誉久	広島大学・助教	有用菌株のスクリーニングと特性化
きた あきひさ 喜多晃久	広島大学・博士研究員	生体触媒の構築

(2) 相手国側研究代表者

所属・職名・氏名 チュラロンコン大学・准教授・Alisa S. Vangnai

(3) 相手国参加者（代表者は除く）

氏名	所属・職名（国名）	研究協力テーマ
Thunyarat Pongtharankul	マヒドン大学・講師（タイ）	生体触媒の構築
Ajiraporn Kongpol	チュラロンコン大学・博士課程学生（タイ）	有機溶媒耐性細菌のスクリーニングおよび特性化
Supaporn Korntong	チュラロンコン大学・修士課程学生（タイ）	有機溶媒耐性細菌のスクリーニングおよび特性化
Gumpanat Mahipant	チュラロンコン大学・博士課程学生（タイ）	有機溶媒耐性細菌の有機溶媒耐性機構の解析
Wanitcha Rachadech	チュラロンコン大学・修士課程学生（タイ）	有機溶媒耐性細菌が生産する有機溶媒耐性酵素の解析
Mattana Tunchai	マヒドン大学・修士課程学生（タイ）	有機溶媒耐性細菌のスクリーニングおよび特性化

6. 研究実績概要（全期間を通じた研究の目的・研究計画の実施状況・成果等の概要を簡潔に記載してください。）

本事業が始まる以前より我々日本の研究グループと Dr. Alisa S. Vangnai を中心とするタイの研究グループは、タイの環境試料から分離した菌株を活用した有用物質、ことに疎水性ケミカル生産の研究を行っていた。本事業では、その共同研究を発展させるために、

- ①バイオディーゼル生産に由来するグリセロールや、バイオマスに由来する糖質から有用ケミカルを生産することを目的とし、タイ環境試料から優れた有機溶媒耐性能を持つ菌株をスクリーニングする。
- ②分離した菌株を土台に生体触媒を構築するのに必要な、遺伝子組換えツールを確立する。
- ③グリセロール→3-ヒドロキシプロピオアルデヒド(3HPA)、グルコース→1,4-ブタンジオール、ブタノールの変換を行う生体触媒を構築する。
- ④上記のバイオプロダクションシステムを構築する。

ことを目的として研究を行った。

2009年度は有機溶媒耐性細菌のスクリーニングおよび取得菌株の特性化を行った。タイおよびギリシアの土壌や海岸堆積物などの環境試料を多数採取し、トルエンもしくはブタノールを添加した栄養培地で集積培養することにより、有機溶媒耐性微生物のスクリーニングを行った。スクリーニング手法については、前もって日本側からタイ側へ通知しておき、それに基づき実行した。年度なかばの9月、10月に加藤がバンコクに出向いて現地で行った研究討論を行い、微調整を行った。スクリーニングの結果、多数の有機溶媒耐性細菌を取得することができた。バイオマス由来の糖質からのブタノール、3HPA/1,4-ブタンジオール生産を想定し、上記取得菌株についてブタノールおよびプロピオアルデヒド耐性を調べた。取得菌のうち4株は、アセトンプタノール生産菌 *Clostridium acetobutylicum* のブタノール耐性を超える3%のブタノールに対し耐性を示した。また別の4株は3%のプロピオアルデヒドに耐性であった。それぞれの菌株の16S rRNA 遺伝子の部分配列を決定し簡易分類を行い、ブタノール耐性菌は *Bacillus firmus*, *Bacillus cereus*, *Exiguobacterium* spp. と同定した。一方、プロピオアルデヒド耐性菌の2株は *Bacillus subtilis*, もう2株は *B. cereus* と同定した。

2010年度は、まずブタノール耐性菌 *Exiguobacterium* sp. SBH81 株の特性化をさらに行った。一連の有機溶媒について耐性試験を行ったところ、アルコール、アセトン、アセトニトリルなどの親水性有機溶媒に対して強い耐性を示すことを見出した。ことにアセトニトリルに対して強い耐性を示し、6%のアセトニトリル存在下でも増殖可能であった。アセトニトリルは、疎水性基質の水相への懸濁/溶解の補助剤として使用されるので、*Exiguobacterium* sp. SBH81 株は疎水性基質の生物変換の宿主として有用であると考えられる。SBH81 株のアセトニトリル耐性を向上させるために、5%アセトニトリルを含む培地で20回継代培養を行ったところ、アセトニトリル6%存在下での最終到達菌体密度が増加した。このことから、アセトニトリル耐性は馴養/適応により向上させられることが分かった。馴養/適応株が獲得したアセトニトリル耐性の向上は安定で、アセトニトリルを含まない培地で継代培養をした後も、向上したアセトニトリル耐性を示した。SBH81 株のアセトニトリル耐性は排出ポンプ阻害剤 PAβN で阻害された。このことから、SBH81 株のアセトニトリル耐性には MATE 型排出ポンプが関与していることが示唆された。

ついで、グリセロール→3HPA の生体触媒を構築するために、プロピオアルデヒド耐性 *Bacillus* 属細菌の形質転換系の開発を行った。この菌株は Gram 陽性細菌であるので、*Bacillus-E.coli* シャトルベクターである pHY300PLK をプラスミドベクターとし、エレクトロポレーションによる形質転換を行った。種々のエレクトロポレーションバッファーおよびエレクトロポレーション条件を試験したが、いずれの条件でも形質転換株を得ることができなかった。そこで、(1)細胞壁の脆弱化 (Gly 添加した培地での培養) と(2)熱処理による制

限修飾系の失活を加えてエレクトロポレーションを行ったところ、*Bacillus* 属細菌で形質転換株が取得できた。

2011 年度は、グリセロール→3HPA の生体触媒細胞の構築を行った。この反応を触媒するグリセロール脱水酵素の遺伝子は、*Klebsiella pneumoniae* の *dhaB* を用いた。まず、異種遺伝子を高発現させるために、プロピオアルデヒド耐性 *Bacillus* 属細菌で強力に機能するプロモーターの選抜を行った。*B. subtilis* で機能することが報告されているプロモーター (*xyl*, *Spac*, 43, 2L および 2N プロモーター) と *Bacillus* 汎用プラスミドに由来するプロモーター (カナマイシンおよびテトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーター) とプロモーターを欠いた *lacZ* を連結し、プロピオアルデヒド耐性 *Bacillus* 属細菌にプラスミドで導入した。 β -ガラクトシダーゼ活性を指標にプロモーターの強さを評価したところ、*xyl* プロモーターが最も強力であることを見出した。ついで、*dhaB* 遺伝子のリボゾーム結合部位の改変を行った。*dha* 遺伝子のリボゾーム結合部位は *B. subtilis* のコンセンサス配列と差異があるので、このコンセンサス配列にリボゾーム結合部位を改変した。*xyl* プロモーター-*B. subtilis* コンセンサスリボゾーム結合部位-*dhaB* の配列を *Bacillus-E. coli* シャトルベクターに組み込み、プロピオアルデヒド耐性 *Bacillus* 属細菌に導入した。*dhaB* 導入株を用い、グリセロール→3HPA の変換反応を行ったが、3HPA の有意な生成は観測されなかった。これは、*dhaB* の機能発現が適切に行われていないと判断し、転写、翻訳、遺伝子産物 (酵素) の成熟の各段階の最適化を再検討している。