

# 稲わらを基質とした高ブタノール生産菌への育種

中山 俊一

(東京農業大学 応用生物科学部)

## 研究の目的

嫌気性グラム陽性桿菌である *Clostridium* 属細菌によって生産されるバイオブタノールは、ガソリンと性質が類似しており石油代替バイオ燃料として、また各種化成品の出発原料として利用可能である。そのため、非食料資源を基質としたバイオブタノール生産は循環型社会の形成に大きく貢献することが期待される。我が国で利用可能な代表的な非食料資源である稲わらはセルロース・ヘミセルロース・リグニンからなる複合体を形成しており、発酵によるブタノール生産は世界各国でも達成できていない。本研究では、*Clostridium* 属細菌を育種することで稲わらを基質とした高効率ブタノール生産系の開発を目的とした。

## 方法

ブタノール生産菌としては *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (以下 N1-4) を、混合培養におけるセルロース分解菌としては *Clostridium thermocellum* を用いた。それぞれの培養条件、混合培養条件は先の方法に従った<sup>1)</sup>。基質は稲わらを用い、0.1 N NaOH で 1 時間蒸煮処理したものと未処理のものを使用した。混合培養時におけるセルラーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼの添加はブタノール生産菌 N1-4 の添加時と同時に行った。セルラーゼ活性測定は Chundawat らの方法に従った<sup>2)</sup>。発酵産物は Aminex HPX-87H (Bio-Rad Laboratories K.K., Japan) カラムを用い、HPLC により測定した。

ブタノール生産菌 N1-4 におけるプロモーターは、in silico molecular cloning (インシリコバイオロジー社) を用いて探索した。コンセンサス配列 (TTGACA-N(17)-TATAAT) と相同性を示し、かつ遺伝子の開始コドン上流 200 bp 以内に位置することを条件として 12 種類のプロモーターを探索した。これらのプロモーターをレポーター遺伝子として利用する AcGFP の上流に連結し、大腸菌-N1-4 のシャトルベクター-pNAK1 を用いて N1-4 に導入した。AcGFP 発現量は抗 AcGFP を用いたウエスタンブロット解析により比較した。

## 結果

### アルカリ処理した稲わらからのブタノール生産

アルカリ処理をしていない稲わらを基質に混合培養した場合、ブタノール生産量は 1.1 g/L と極めて低い生産量であった。ブタノール生産可能な結晶性セルロースを炭素源として混合培養した先の研究では、培養時間の経過に伴い OD<sub>600nm</sub> が増加するのに対し、稲わらを基質にした場合、培養 1 日目以降培養液の OD<sub>600nm</sub> は増加せず減少していくのみであった。これは、稲わら中のリグニンにより糖化が阻害されブタノール生産菌が利用可能な糖が遊離してこないためであると推察した。

そこで、糖化効率を向上させブタノール生産性を改善するため、アルカリ処理しリグニン含量が低下した稲わらを基質として用いた。その結果、4%の稲わらから 2.5 g/L までブタノール生産量が増加した (図 1)。しかしながら、結晶性セルロースを基質とした先の研究では4%の基質から 7.9 g/Lのブタノールを生成したのに対して低い生成量を示した。この低い生成量は基質の糖化に関与するセルラーゼ活性が低いことが原因の一つとして考えられる。そこで、*Aspergillus niger* 由来のセルラーゼを混合培養時に添加することで、ブタノール生産量が向上するかどうか検討した。100 U/g・biomass のセルラーゼを添加した場合、ブタノール生成量は顕著に増加し 6.3 g/L ものブタノールを生成可能であった。また、セルラーゼ添加量の増加に伴いブタノール生成量も増加することから、稲わらを基質にした場合の低いブタノール生産性はセルラーゼ活性が不足することが原因であると推察した。

セルラーゼを酵素剤として添加することで稲わらからのブタノール生成は増大するが、より低コストかつ高効率なブタノール生産を実現するには酵素剤の添加ではなく微生物により酵素を生産し補うことが求められる。*Aspergillus niger* 由来の酵素剤には稲わら分解に寄与するエンドグルカナーゼ、エキソグルカナーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、ヘミセルロース分解に関与するキシラナーゼが含まれている。これらの酵素の中で、どの酵素が最もブタノール生産に寄与し、どの酵素を高発現させれば高効率なブタノール生産系を構築できるかを明らかにするために *C. thermocellum* と N1-4 の培養上清、*Aspergillus niger* 由来の酵素剤の酵素活性を比較した (表 1)。その結果、エンドグルカナーゼとキシラナーゼは *C. thermocellum* において活性が高く、これらの酵素がブタノール高生産に寄与しないことが明らかとなった。最も顕著な違いは $\beta$ -グルコシダーゼにみられ、酵

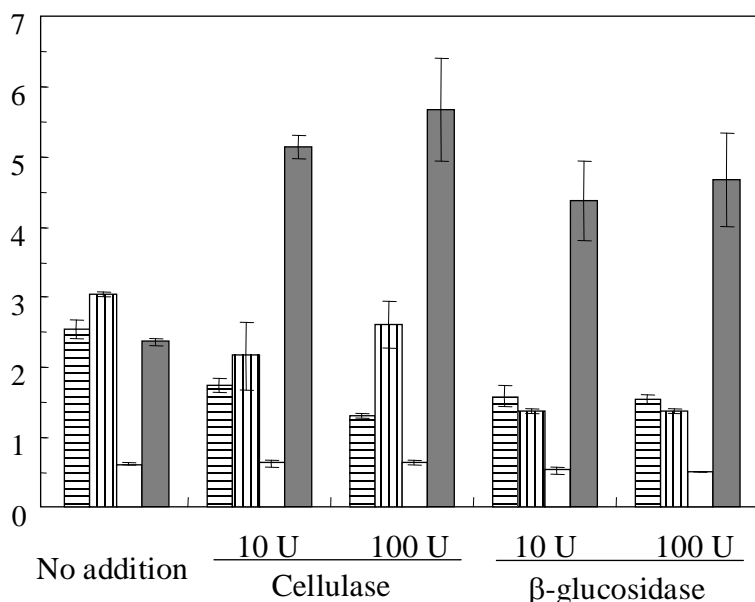


図 1 0.1N NaOH で処理した稲わらを基質とした混合培養における発酵産物量比較。酵素剤を添加するものと、10 U/g・biomass と 100 U/g・biomass になるようセルラーゼおよび $\beta$ -グルコシダーゼを添加した培養上清の発酵産物を測定した。各発酵産物は酢酸 (横線)、酪酸 (縦線)、エタノール (白色)、ブタノール (灰色) である。それぞれ 3 連で培養した平均値と標準偏差を示した。

表1. 稲わら分解に関与する酵素活性比較(U/mg)

	<i>C. thermocellum</i>	N1-4	Cellulase (10U)
エンドグルカナーゼ*	101.15 ± 3.00	1.00 ± 0.28	25.42 ± 2.48
エキソグルカナーゼ*	4.51 ± 0.40	0.47 ± 0.08	10.79 ± 0.24
β-グルコシダーゼ	0.07 ± 0.00	0.35 ± 0.02	17.38 ± 1.94
キシラナーゼ	2.85 ± 0.03	0.38 ± 0.02	0.17 ± 0.01

\*酵素活性の単位は mU/mg。

素剤は *C. thermocellum* と N1-4 株に比べて 50 倍以上高い活性を有していた。β-グルコシダーゼがブタノール生産に寄与するかどうかを確かめるため、混合培養中にβ-グルコシダーゼを添加した (図 1)。その結果、β-グルコシダーゼの添加でもブタノール生産量は 4.7 g/L まで増大した。このように、混合培養においてβ-グルコシダーゼを増強することで稲わらからのブタノール生産が向上することが明らかとなった。

### セルラーゼ発現のためのプロモーターの探索

上述の様に稲わらを基質としたブタノール生産を向上させるには、β-グルコシダーゼ活性の向上が求められる。そこで異種タンパク高発現のためのプロモーターを探索した。*in silico* 解析によりブタノール生産菌 N1-4 のゲノム配列からコンセンサス配列と一致したプロモーターを 12 種類抽出し、蛍光タンパク AcGFP の発現量を指標にプロモーター強度を比較し、高発現用のプロモーターを探索した (図 2)。その結果、heat shock protein *hsp90*、prolyl-tRNA synthase、そして rubrerythrin のプロモーターにおいて AcGFP の高い発現量が確認された。今後、これらのプロモーターを用いたβ-グルコシダーゼの高発現により、高効率な稲わらからのブタノール生産が期待される。

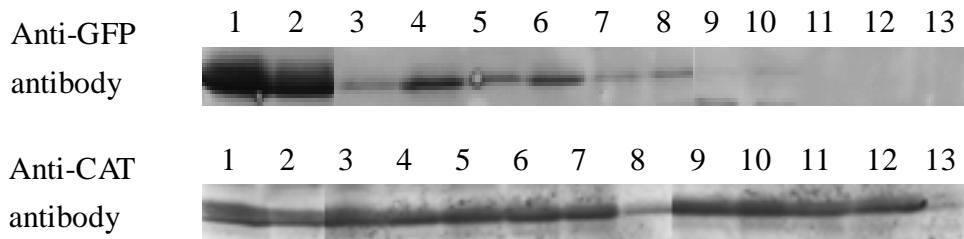


図2 抗 AcGFP、抗 CAT 抗体を用いたウエスタンブロット解析。レーン 1 から 12 はそれぞれ phosphotransferase system IIC component、thiolase、*hsp90*、rubrerythrin、ribosomal protein L13、uncharacterized protein、butanol dehydrogenase、phosphate butyryltransferase、superfamily II DNA and RNA helicases、adenine deaminase、prolyl-tRNA synthetase、Transcriptional antiterminator のプロモーター制御下で AcGFP を発現させた形質転換体から抽出した粗酵素に対してウエスタンブロット解析を行った。レーン 13 は pNAK1 を保持する N1-4 から抽出した粗酵素に対してウエスタンブロット解析を行った。

## 結論

本研究では、セルロース分解菌 *C. thermocellum* とブタノール生産菌 *C. saccharoperbutylacetonicum* の混合培養により稲わらを基質として高効率にブタノールを生産可能であることが示された。特に、脱リグニン処理した稲わらを用い、 $\beta$ -グルコシダーゼ活性の増強により、ブタノール生産効率が向上することを明らかにした。一方、*Clostridium* 属細菌ではプロモーターに関する知見が少なかったが、高発現のためのプロモーター配列も本研究で見出すことができた。今後、探索したプロモーターを用い $\beta$ -グルコシダーゼを高発現するブタノール生産菌へと分子育種することで、稲わらを基質としたブタノール生産のさらなる高効率化につながることを期待される。

## 文献

- 1) Nakayama S., Kiyoshi K., Kadokura T., Nakazato A. (2011) Butanol production from crystalline cellulose by cocultured *Clostridium thermocellum* and *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 6470-6475.
- 2) Chundawat S. P. *et al.* (2011) Proteomics-based compositional analysis of complex cellulase-hemicellulase mixtures. *J. Proteome. Res.* **10**: 4365-4372.
- 3) Nakayama S., Irie R., Kosaka T., Matsuura K., Yoshino S., Furukawa K. (2007) New host-vector system in solvent-producing *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* strain N1-4. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **53**: 53-56.