

報告番号	甲 第 13125 号
------	-------------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 微生物固定化プロセスの構築とバイオ燃料
生産に関する研究
(Study on the immobilization process for
bacterial cells and biofuel production)

氏 名 小原 優季

論 文 内 容 の 要 旨

微生物触媒を利用した物質生産は化学的なプロセスよりも温和な条件で、高い選択性を持った物質変換が可能であり、環境への負荷が少ないプロセスとして期待されている。その一方で、微生物触媒は高価なものであり、実際の反応プロセスにおいては触媒を分離・回収し、繰り返し利用するための工夫が求められる。触媒の固定化は最も簡便で一般的な触媒の分離法であり、触媒の安定性を高め、繰り返しあるいは連続的な反応プロセスや触媒の高密度化に寄与する。これらのことから、以前より多くの固定化法が開発されており、吸着性担体へ細胞を固定化する物理吸着法や、高分子ゲルに細胞を包埋するゲル包括法、微生物のバイオフィーム形成能を利用したバイオフィーム固定化法などが利用されている。しかし、これらの方法にも固定化の強度や、包埋ゲル中における基質や生産物の拡散律速、宿主の依存性やスタートアップに長期間を要するなどの技術的課題がそれぞれ残されていた。

2012年に報告された接着性のファイバータンパク質 AtaA (*Acinetobacter* Trimeric Autotransporter Adhesin) は、トルエン資化細菌である *Acinetobacter* sp. Tol 5 より同定され、AtaA を提示した細胞は高い自己凝集性と、付着性を示す。AtaA は三量体型オートトランスポーターアドヘシンファミリーに属するタンパク質であり、その構造はN末端-ヘッド-ストーク-膜アンカー-C末端ドメインからなる全長3630アミノ酸の巨大タンパク質である。以前より、*Acinetobacter* 属細菌に *ataA* 遺伝子を導入することで付着性と自己凝集性を付与できることが示されていた。しかし、AtaA による微生物固定化の特性や条件については、未だに調べられていなかった。これらを踏まえ、本研究の前半では、AtaA を利用

した新規微生物固定化法を確立し、その特性を明らかにした。後半では、固定化可能微生物を利用して、化学品やバイオ燃料をターゲットとした物質生産について研究を行った。

第1章では、微生物触媒の固定化と接着性タンパク質 AtaA に関する背景について述べ、本研究の目的と構成について記した。

第2章では、非付着性のグラム陰性細菌である *Acinetobacter baylyi* ADP1 株に *ataA* の遺伝子を導入し、AtaA を用いた微生物固定化の条件や特性について調べた。AtaA を表層に提示した ADP1 細胞は、生育状態、休止状態、凍結乾燥の後にバッファーに再懸濁した状態のいずれの条件でも担体へと固定化することが可能であった。また、固定化の担体は、ガラスウールや発泡性ポリウレタン、スチールウールにヘチマと、親水、疎水を問わず様々な材料への固定化が可能であった。休止細胞の固定化は、担体の素材や形状によってその密度が異なり、ガラスウールを用いた場合には、最大 110 g/L 乾燥重量の密度で細胞が固定化された。

第3章では、AtaA による微生物固定化の阻害条件に関する研究成果についてまとめた。本章では、AtaA を介した微生物固定化が、Luria Bertani 培地中においては、阻害されることを偶然にも発見し、この阻害効果は AtaA の生産量や提示量に起因するものではないことを示した。次に糖やカゼインの加水分解物、各種アミノ酸による AtaA 提示細胞の付着への阻害効果を検証したところ、アラビノースやグルコースでは、阻害効果が確認されなかった。一方で、カザミノ酸のテクニカルグレード (Casamino acids technical grade; CA-T)、トリプトンなどのカゼイン加水分解物や酵母破碎エキスといった化合物によって効果的に阻害された。また、カゼイン分解物に多く含まれるであろう各種アミノ酸やアミノ酸の混合溶液は阻害効果を示したが、その効果は CA-T に比べて低いものであった。これらの結果から、CA-T に含まれるオリゴペプチドに最も阻害効果の高い化合物が含まれると考えられた。CA-T を用いて AtaA を介した固定化細胞の剥離について試みたところ、1%の CA-T 溶液中で、細胞固定化担体を攪拌することで、簡単に固定化細胞を剥離することが可能であった。さらに、剥離細胞の懸濁溶液を置換し CA-T を取り除くことで、細胞を再び担体へ固定化することも可能であった。剥離の様子を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、CA-T による剥離は、細胞-付着表面よりも細胞-細胞間の相互作用に主に効いていることが確認された。これらの結果から、AtaA を用いた微生物固定化は、カゼイン加水分解物のような基質を用いることができないことが示された。一方で、この剥離特性を利用することで、一度固定化した細胞が簡便に回収可能であることが示された。

第4章では、AtaA を用いた微生物固定化とバイオ燃料の一つである水素の生産を組み合わせることを試みた。微生物を利用した水素生産はエネルギー効率がよく、工業廃水や農業排水などのバイオマスから水素生産が可能なることから、低環境負荷のエネルギー生産プロセスとして注目され、広く研究されてきた。そこで本章では、水素生産細菌の一つである *Enterobacter aerogenes* へ *ataA* 遺伝子を導入し、実験を行った。*E. aerogenes* の形質転換体に対してウェスタンブロットティングとフローサイトメトリーによる解析を行った結

果、AtaA の生産と表層提示が確認された。AtaA を提示した *E. aerogenes* 細胞は、高い付着性と自己凝集性を示し、多孔性のポリウレタン担体への固定化 (約 2.5 mg/cm³) が可能となった。細胞を固定化したポリウレタン担体を用いて、繰り返しの水素生産実験を行ったところ、少なくとも 3 回の繰り返し生産が可能であり、グルコース 1 mol あたり、0.6 mol の水素が生産された。さらに、連続的に培地を供給する連続型のフローリアクターに細胞固定化担体を入れ、水素の連続生産についても試みた。その結果、42 mL · h⁻¹ · L⁻¹ の収量で連続的な水素生産が達成された。AtaA を利用した細菌の固定化法は、*E. aerogenes* を簡便かつ迅速に固定化し、繰り返しや連続的な水素生産を行うことを可能とした。第 4 章の結果は、*Acinetobacter* 属細菌以外で AtaA を表層提示できた初めての報告であり、今後、AtaA がより広い宿主で利用可能となることが期待できる。

第 4 章では水素生産菌である *E. aerogenes* に *ataA* 遺伝子を導入することで、AtaA による微生物触媒の固定化と物質生産が組み合わせて利用可能であることを示した。一方で、AtaA が同定された宿主であり、AtaA を介した固定化が可能な *Acinetobacter* sp. Tol 5 株の代謝を改変し、固定化と物質生産を組み合わせる例については検討されていなかった。そこで、第 5 章では Tol 5 株の有するトルエン資化経路に着目し、トルエン代謝の中間物である 3-メチルカテコールを生産する代謝変異株の構築を試みた。Tol 5 株の有するトルエン分解経路では、トルエンがトルエンジオキシゲナーゼにより水酸基付加され、トルエンジオールを経て、トルエンジオールデヒドロゲナーゼによって 3-メチルカテコールに変換される。3-メチルカテコールはカテコールの代謝酵素によって開環し、いくつかの中間物質を経たのちに TCA サイクルへ取り込まれる。カテコール代謝遺伝子 (*todE*) を任意に抑制可能な代謝変異株を作製するために、*todE* を抑制ターゲットとした CRISPRi (Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats interference) プラスミドを設計し、Tol 5 株に導入した。*todE* に対するノックダウン活性を確認するため、定量 PCR によって形質転換体の mRNA 量を測定した結果、*todE* の mRNA 転写活性は CRISPRi によって抑制されていることが確認された。また、形質転換体を培養後に培地上清を回収し、ガスクロマトグラフィーに供したところ、3-メチルカテコールの蓄積が確認された。

第 6 章では、AtaA を用いた手法以外の固定化法が確立している宿主を対象に、温室効果ガスの一つであるメタンを原料としたメタノール生産を行える微生物触媒の構築を試みた。*Methylococcus capsulatus* Bath はメタンの資化能を有し、ガラスフィルターメンブレンを用いた固定化法が既に報告されている細菌である。Bath の有するメタン資化経路において、メタンはメタンモノオキシゲナーゼによってメタノールに酸化され、メタノールはメタノールデヒドロゲナーゼによってホルムアルデヒドを経て、同化代謝、異化代謝に分岐する。メタン資化経路においてメタノールは同化代謝の上流に位置するため、メタノール蓄積を行うためには、メタノール代謝遺伝子を可逆的に制御し、メタノールを資化する生育モードと蓄積する生産モードを自由にコントロールする必要があった。そのため、RNA interference (RNAi) を用いてメタノール代謝遺伝子を可逆的にスイッチングできるプラ

スミドベクターを構築した。AraC/P_{BAD}プロモーターを用いて、RNAiを制御するプラスミドを構築したところ、メタノール代謝遺伝子に対して十分なノックダウン活性を示さなかった。そのため、強力かつ恒常的に sRNA の転写が行える誘導型のプロモーターP_{JTL}を新たに構築し、RNAi を制御するプラスミドに組み込んだ。その結果、Bath においてメタノール代謝遺伝子を効率的に抑制することができ、メタノールの蓄積と宿主微生物の生育がスイッチング可能な代謝スイッチング株の構築に成功した。メタノールの生産実験では、およそ 24 時間で最大 1.9 mM のメタノールの蓄積が可能であった。本章の結果は、メタン資化細菌の遺伝子制御を行い、代謝工学的なアプローチからメタノール生産を行った初めての例であり、メタン資化細菌を用いた物質生産の発展に大きく寄与しうる結果であった。

第7章では、本文全体の結論と、今後の展望について述べた。本論文の前半では、AtaA による固定化法を確立し、その特性について明らかにした。また、同固定化法が水素生産菌を用いた水素生産とも組み合わせて利用可能であることを示した。これらの知見は、AtaA による微生物固定化を広く利用する際に重要な知見となるであろう。本論の後半では、固定化可能微生物を宿主として、有用物質生産を目的とする代謝改変を行なった。効率的な固定化手法が確立している宿主による有用物質生産系の構築は、実用的な新規バイオプロセスの構築に寄与することが期待される。