

# 学位論文の要旨

論文題目 Development of gas fermentation process with metabolically engineered *Moorella thermoacetica*  
(*Moorella thermoacetica* 代謝改変株を用いたガス発酵プロセスの開発)

広島大学大学院統合生命科学研究科  
生物工学プログラム  
氏名 竹村 海生

## 第一章 緒言

本章では、既存技術と比較したガス発酵の利点と、中温菌と比較した好熱菌の利点をまとめ、現状の技術的課題と本研究の意義を述べる。以下、概要を記す。

化石資源は有用化合物の原料である一方、資源の枯渇や二酸化炭素（以下  $\text{CO}_2$ ）の排出など様々な問題がある。そのため、化石資源に依存しないカーボンリサイクル社会の構築が求められている。ガス発酵は、水素（以下  $\text{H}_2$ ）、一酸化炭素（以下  $\text{CO}$ ）、そして  $\text{CO}_2$  などのガス状基質から有用化合物を生産する技術である。ガス発酵における炭素原料は、農業廃棄物などのバイオマス、廃棄プラスチック、そして  $\text{CO}_2$  ガスなど多岐に渡る。また、エネルギー源となる  $\text{H}_2$  は太陽光などの再生可能エネルギーからも供給できるなど、ガス発酵技術はカーボンリサイクル物質生産プロセスとなりうる。

従来、ガス発酵で用いられる微生物の主な生産物は酢酸であったが、中温菌においてエタノール生産菌が発見されるとともに、遺伝子組換え技術を用いた代謝改変により、ガス基質から様々な有用化合物を生産することが可能となった。しかし、中温菌を用いた発酵生産には、他の微生物による汚染のリスクや、発酵システムの冷却にエネルギーを必要とするなどのデメリットが存在する。筆者は、中温菌より高い温度で増殖する好熱菌の利用することで、これら中温菌のデメリットを解消することができると考えた。しかし、これまでに遺伝子組み換え好熱菌によるガス基質からの有用物質生産性の向上、および製作された変異株を活用した生産プロセスに関する研究はない。そこで、本研究では好熱性酢酸生産菌代謝改変株によるガス基質からの有用化合物生産技術の開発を目指した。

## 第二章 好熱性ホモ酢酸菌 *Moorella thermoacetica* 代謝改変株によるガス基質からのエタノール生産

本研究で使用した菌株は、好熱性ホモ酢酸菌 *Moorella thermoacetica*（至適生育温度：50-60 °C）である。本菌株は、Wood-Ljungdhal Pathway（以下 WLP）と呼ばれる  $\text{H}_2$  や  $\text{CO}$ 、 $\text{CO}_2$  を Acetyl-CoA に変換する代謝経路を有している。Acetyl-CoA は 2 種類のホスホトランスアセチラーゼ（以下 PduL1、PduL2）と酢酸キナーゼによって酢酸に変換され、それにともないアデノシン三リン酸（以下 ATP）が基質レベルのリン酸化で合成される。Rahayu らは、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子（*aldh*）の導入と 2 つの *pduL* 遺伝子の段階的な破壊により Acetyl-CoA 代謝経路を改変し、糖からの異なるエタノール生産性を有する 2 種類の *M. thermoacetica* 代謝改変株 Mt- $\Delta$ pduL2::*aldh*、Mt- $\Delta$ pduL1 $\Delta$ pduL2::*aldh* 株を構築した（F. Rahayu, et al., Bioresour. Technol. 245, 1393 (2017)）。しかし、これらの代謝改変株は  $\text{H}_2$ - $\text{CO}_2$  培養においてエタノール生産も菌体増殖も確認できなかったことから、その原因を検討した。 $\text{H}_2$ - $\text{CO}_2$  培養における代謝産物を詳細に調べたところ、WLP の中間代謝産物であるギ酸が検出された。WLP においてギ酸はギ酸テトラヒドロ葉酸リガーゼにより 10-ホルミルテトラヒドロ葉酸として代謝される。この反応は ATP を必要とする。そこで、 $\text{H}_2$ - $\text{CO}_2$  培養における細胞内 ATP 量を調べたところ、糖培養と比較して顕著に低かった。このことから、基質レベルのリン酸化（酢酸合成）の抑制に伴う ATP 供給の低下が原因であると示唆された。そこで、ATP 供給を確保する方策として  $\text{CO}$  添加を検討

した。COはH<sub>2</sub>よりも基質当たりのATP収量が高いため、基質レベルのリン酸化（酢酸合成）の抑制に伴うATP供給の低下がH<sub>2</sub>よりも小さくなる可能性がある。COを含むガス基質条件で、酢酸生成経路を完全に遮断したMt- $\Delta$ pduL1 $\Delta$ pduL2::aldh株を培養したが、菌体増殖も代謝物も確認できなかった。一方、酢酸生成経路を弱くしたMt- $\Delta$ pduL2::aldh株を培養したところ、酢酸およびエタノール生産、そして菌体増殖も確認された。両株の細胞内ATP量には顕著な差がなかった一方、Mt- $\Delta$ pduL1 $\Delta$ pduL2::aldh株のNADH/NAD<sup>+</sup>比はMt- $\Delta$ pduL2::aldh株よりも有意に低かった。このことから、酸化還元バランスに課題があることが示唆された。したがって、本章では、ガス基質からエタノールが生産できることを示しただけでなく、代謝改変株のガス代謝には「ATP供給不足」と「アンバランスな酸化還元状態」という2つの課題があることを見出した。

### 第三章 ガス基質からのアセトン生産とガス発酵へのATP増強の効果

*M. thermoacetica* 代謝改変株のガス代謝には、「ATP供給不足」と「アンバランスな酸化還元状態」という2つの課題があることが示唆されたことから、2つの課題を切り分けるために、Acetyl-CoAからの合成経路で酸化還元反応を必要としないアセトン生産株の構築を目指した。この株の構築は、「ATP供給不足」のみに焦点を当てた検証を可能とするとともに、生産できる化合物多様性を増やすことにもなる。具体的には、アセトン生合成経路を導入するとともに、酢酸合成を抑制する遺伝子操作により、糖基質からアセトンを高生産する株を構築した(pduL2::acetone株)。構築した株はH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>条件においてアセトンを生産した。一方で菌体はほとんど増殖せず、ギ酸が蓄積したことから、「ATP供給不足」な代謝状態になっていることが示唆された。*M. thermoacetica*は、ジメチルスルホキシド(以下DMSO)などの電子受容体を添加することでATP生産が向上することが知られている。そこで、pduL2::acetone株のH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養に*M. thermoacetica*が利用可能な電子受容体を添加し、「ATP供給不足」に対する電子受容体の効果を検証した。その結果、DMSOとチオ硫酸で増殖回復とアセトン生産性の向上が確認された。特にDMSOによる増殖とアセトン生産性への効果が大きかった。DMSO添加時の細胞内ATP量を測定した結果、非添加時と比較して顕著に増加していた。このことから、「ATP供給不足」がガス発酵におけるボトルネックであることが示された。また、H<sub>2</sub>よりも基質当たりのATP収量が高いCOを含むガス条件では、電子受容体が無くとも生育に十分なATPが供給され、菌体が増殖し、アセトンを生産できることが示された。

### 第四章 総括

本研究では、好熱性酢酸生産菌代謝改変株によるガス基質から有用化合物生産技術の開発に成功した。これまでにRahayuらによって糖からエタノールを高生産する2種類の*M. thermoacetica*代謝改変株を構築された。この2種類のエタノール生産株を用いたガス発酵に関しては十分に解析されていなかったため、第2章において、エタノール生産株を用いたガス発酵の解析を行った。その結果、ガス基質からエタノールが生産できることを示しただけでなく、ガス基質からのエタノールの高生産化には「ATP供給不足」と「アンバランスな酸化還元状態」という2つの課題があることを見いだした。そこで第3章では、課題の切り分けが可能な酸化還元バランスが崩れないアセトン生産株を構築した。そして、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養では「ATP供給不足」な代謝状態になっていることが示唆され、「ATP供給不足」のみに焦点を当てつつ、解消に向けた取り組みを評価することが可能となった。ATP生産性が向上する電子受容体をアセトン生産株のH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>培養に添加した結果、増殖とアセトン生産性の向上が確認された。このことから、「ATP供給不足」がガス発酵におけるボトルネックであることが示された。また、COを含むガス条件では、電子受容体が無くとも生育に十分なATPが供給できることが示された。以上のことから、本研究では持続可能な社会において大きな役割を担うことが期待されるガス発酵技術の発展におおいに寄与する成果を得ることができた。