

令和元年度農学部特別研究費研究経過報告書

1. 研究者名 城島 透
2. 研究課題名 好熱・好酸性細菌 TP075 株を用いた非可食バイオマス変換基盤技術の開発
3. 研究目的・内容

近畿大学農学部キャンパスから単離された好熱・好酸性微生物 TP075 株を変換触媒として利用し、リグノセルロースから各種の有用物質を生産するための技術開発を目指している。本年度は、TP075 株の安全性を担保するために、種同定を行った。次に、TP075 株を用いたバイオプロセスの運転条件の基盤情報を得るために、糖利用性、至適培養条件（培地組成、培養温度および pH）を検討した。

4. 研究の経過

【TP075 株の同定】

16S-rDNA 配列の全長を用いた系統解析の結果、TP075 株は *Effusibacillus*、*Tumebacillus* 属細菌と近縁であり、最近縁種として *E. consosiatius* に対して 92.7% の相同性を示した。一般的に、原核生物の場合は、95.0% 未満であれば新属の可能性があるとされている。次に、生理・生化学的分析を行った結果、TP075 株は *Effusibacillus*、*Tumebacillus* 属細菌とは異なる性質（特に、生育温度と脂肪酸組成）を示した。以上の結果より、TP075 株はいかなる有害微生物とも別種の新属の細菌であると結論付けた。現在、新種登録に向けて論文を執筆中である。

【培養条件の検討】

TP075 株の糖利用能を検討したところ、グルコース、スクロースに加えて、ヘミセルロースの構成糖であるキシロースとマンノースをエネルギーおよび炭素源として利用することができた。また、可溶性の高分子であるカルボキシメチルセルロースを利用することも可能であった。こうした性質をもつことは、リグノセルロースを原料としたバイオプロセスへの応用で有利といえる。一方で、ヘミセルロースの構成糖でもあるガラクトースとアラビノースは利用できないことも判明した。これらの糖の利用能は、遺伝子組換えにより付与する必要があるが、その方法論は既に確立されているため、大きな問題とは考えられない。

次に、培養に最適な培地組成の検討を行った。基本の培地として、類縁菌の培養に利用されている B 培地を用いた。その結果、Yeast extract とリン酸 2 水素カリウムを通常の濃度の 2 倍にすることで、通常の B 培地で培養したときと比較して、約 2 倍の菌体を得られるようになった。一方で、Yeast extract は培地成分の中では圧倒的に高価な成分であるため、培地コストも通常の B 培地の約 2 倍となった。つまり、菌体当たりの培地コストは変わらないが、培養 1 回当たりの菌体生産量が増えるため、小型の培養槽での発酵が可能となり、生産コストの低減につながると思われる。現在、今回見出した改変 B 培地を用いて、ジャーフェーマンターによる培養試験を実施しているところである。

リグノセルロースの糖化反応は、およそ 50°C、pH 5.0 の条件で行われる。コスト低減のために生産プロセスを並行複発酵方式で実施する場合、糖化反応と発酵の反応条件が一致していることが望ましい。そこで、TP075 株のグルコース消費における pH と温度の影響を検討した。菌体当たりのグルコース消費速度が最も大きい条件は、55°C、pH 4.0 であったが、糖化酵素の最適反応条件である 50°C、pH 5.0 でも最適条件の 94% の糖消費速度を示した。以上の結果より、TP075 株は、リグノセルロースを原料とした並行複発酵への適用が可能と考えられた。

【TP075 株の形質転換方法の検討】

TP075 株は、グラム陽性の桿菌である。そこで、同じグラム陽性桿菌である枯草菌の形質転換に利用されるプラスミドによる TP075 株の形質転換を試みた。使用したプラスミドにはアンピシリンおよびテトラサイクリン耐性遺伝子がマーカー遺伝子として組み込まれているため、これらの抗生物質に対する TP075 株の感受性を検討した。その結果、TP075 株は両抗生物質に対して感受性を示し、最小発育阻止濃度はどちらも 0.2 μg/ml であった。次にプラスミドの導入方法としてエレクトロポレーションを選択し、遺伝子導入における電圧を 0.5~2.5 kV まで変化させて、

形質転換を試みた。その結果、いずれの条件でも形質転換体は得られなかった。現在、コンピテントセルの調製条件等を検討しているところである。

5. 本研究と関連した今後の研究計画

今回の研究から、TP075 株がリグノセルロース変換反応に適した微生物であることが示された。今後は、TP075 株を変換触媒として用いた、リグノセルロースからバイオ燃料を生産する技術の開発を目指す。そのためには、TP075 株の遺伝子組換えのための基盤技術を確立する必要があり、引き続き形質転換法の開発を進める。枯草菌用のプラスミドでは形質転換できない可能性を考え、別の方法について検討を進める。TP075 株のゲノム解析の結果、TP075 株はプラスミドを保有していることが示唆されている。当該プラスミド (pTP075) は、約 89 kbp とそのまま実験用のベクターとして利用するには大きすぎるプラスミドである。従って、pTP075 の自立複製に必要なコア領域を同定し、その情報を元にして新しいベクターを開発することは、有効な手段と考えられる。