九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

Studies on the efficient butanol production from mixed sugars and the elucidation of bypass mechanism of carbon catabolite repression

野口, 拓也

https://hdl.handle.net/2324/1654953

出版情報：九州大学, 2015, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏　　名　：野口　拓也

論文題名　：Studies on the efficient butanol production from mixed sugars and the elucidation of bypass mechanism of carbon catabolite repression（混合糖を用いた効率的なブタノール生産およびカーボンカタボライト抑制の回避機構解明に関する研究）

区　　分　：甲

論　文　内　容　の　要　旨

アセトン-ブタノール-エタノール（ABE）発酵の主要生産物であるブタノールは、様々な化成品の中間体や化石燃料を補完する液体燃料としての用途が期待できる。近年の爆発的な人口増加による食糧供給問題の観点から、ABE 発酵に用いられる基質はリグノセルロース系バイオマスがその候補として注目されている。ブタノール生産菌として知られる *Clostridium* 属細菌はリグノセルロース系バイオマスを構成する種々の糖を資化することが可能である。しかしながら、グルコースとその他の糖が共存する場合、多くの微生物はグルコースを優先的に消費することが知られており、これをカーボンカタボライト抑制（CCR）と呼ぶ。CCR の回避はリグノセルロース系バイオマスからの効率的な物質生産に必要不可欠な課題であることから、本研究では CCR を回避した混合糖からのブタノール生産系の構築および転写解析を用いた *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 の CCR 回避機構の解明を目的としている。

グルコース（G）とキシロース（X）で構成された混合糖を用いた場合、CCR が生じることが過去の研究から明らかにされている。我々はグルコースの二糖であるセロビオース（C）に着目し、C と X をそれぞれ 30 g L^{-1} 含む混合糖を用いた回分培養を検討した。その結果、C と X を同時に消費し、すなわち CCR の回避に成功し、72 時間で 16 g L^{-1} のブタノールが生産された。さらに、混合糖中のキシロース濃度の増加（10-30 g L^{-1}）に伴ってブタノール収率が増加（0.38-0.40 C-mol/C-mol）することを明らかにした。次に、CX 混合糖を培養中に添加する流加培養を行った。それぞれ 10 g L^{-1} の C と X から成る混合糖を 2 回添加した結果、CCR を回避した流加培養に成功した。

CCR を生じる G と X などを含む混合糖を連続発酵の基質として用いた場合、CCR によって G 以外の糖が未利用のまま廃棄されることが報告されている。一方、高密度菌体を用いた連続発酵は基質の大量消費、生産性の向上が期待できる。したがって、我々は CX 混合糖と cell recycling による高密度菌体を用いた連続発酵系の構築を検討した。培養 24 時間後に cell-recycling による菌体濃縮を開始し、約 5 倍の菌体濃度を得ることに成功した。さらに、希釈率 0.696 h^{-1} で連続発酵を行った結果、C と X の同時消費（それぞれ 64.4%、60.6%）、さらに、本実験で最大のブタノール生産性を実現した（5.50 g l^{-1} h^{-1}）。

一般的に、グラム陽性細菌の CCR において、糖輸送経路の 1 つである Phosphotransferase system（PTS）、histidine-containing protein (HPr)のリン酸化を担う HPrK、Ser 残基がリン酸化された HPr(Ser)-P、そして多機能調節因子である catabolite control protein A (CcpA)が重要な役割を担うことが *Bacillus* 属、*Clostridium* 属細菌を用いた研究によって報告されている。一方で、我々は CX 混合糖を用いて CCR を回避した発酵系の構築に成功してきたものの、CCR の回避を説明できる知見はこれまで蓄積されていない。したがって、種々の炭素源で培養した菌体内遺伝子発現の転写解析を行い、CCR 回避の要因およびその分子機構の解明を試みた。各炭素源培養時における代謝関連遺伝子の発現量を RT-qPCR で定量、比較した。実験の結果、セロビオースとキシロースで培養した菌体

内では、セロビオース単独培養時と比較して、非 PTS 系の輸送体であるセロビオースパーミアーゼをコードする遺伝子 *celB3* と菌体内に局在するβ-グルコシダーゼ遺伝子 *bglA5* の発現量が有意に増加した。さらに、非 CCR 条件（セロビオースとキシロース）下では CCR 条件（グルコースとキシロース）より HPrK をコードする遺伝子 *hprK* の発現量が有意に低いことが明らかとなった。一方、推定 CcpA 遺伝子 *regA1* の発現量に差は見られなかった。したがって、CX 混合糖を用いた場合に観察される CCR 回避機構では、非 PTS 系輸送体であるパーミアーゼと菌体内β-グルコシダーゼを介したバイパス経路、そして *hprK* の発現抑制が重要な要因であることが示唆された。

結論として、本研究ではセロビオース/キシロース混合糖を用いた回分培養、流加培養、そして連続培養において CCR を回避した効率的なブタノール生産を実現し、かつ、CCR の回避に重要な要因を明らかにすることに成功した。