

未来社会創造事業 探索加速型  
「地球規模課題である低炭素社会の実現」領域  
終了報告書(探索研究期間)

平成 30 年度採択研究開発代表者

[研究開発代表者名:中島田 豊]

[広島大学大学院統合生命科学研究科・教授]

[研究開発課題名:再生可能エネルギーを活用した有用物質高生産微生物デザイン]

実施期間 : 平成 30 年 11 月 1 日～令和 5 年 3 月 31 日

## §1. 研究実施体制

(1)「広島大学」グループ(国立大学法人広島大学)

① 研究開発代表者: 中島田 豊 (広島大学大学院統合生命科学研究科、教授)

② 研究項目

*Moorella thermoacetica* 有用物質生産株のガス基質代謝デザイン : ATCC 株を用いた検証

- ・代謝酸化還元バランス調整の方策立案と検証
- ・ATP 生産強化の戦略立案と検証
- ・ガス発酵における培養工学的最適化
- ・*M. thermoacetica* 遺伝子工学ツールの整備
- ・多様な物質生産の代謝デザインと株構築
- ・生産株の実用性強化
- ・ガス発酵のフィージビリティスタディ

(2)「産総研」グループ(国立研究開発法人産業技術総合研究所)

① 主たる共同研究者: 村上 克治 (国立研究開発法人産業技術総合研究所 材料・化学領域機能化学研究部門 バイオ変換グループ、主任研究員)

② 研究項目

多様な有用物質生産への応用可能性実証: *M. thermoacetica* 国産株を用いた検証

- ・合成代謝工学による国産株の分子育種
- ・国産株を活用した *M. thermoacetica* 遺伝子工学ツール整備
- ・蛋白質立体構造モデリングとドッキングシミュレーションによる代謝デザイン支援

## §2. 研究開発成果の概要

本研究開発では気体である CO<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>、CO を基質として増殖する好熱性酢酸菌を利用したカーボンリサイクル型バイオプロセスの構築を目的とした。CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> 混合ガス、および合成ガス(CO と H<sub>2</sub> を主成分とする)からエタノールを生産する代謝デザイン・代謝改変株構築を行い、特に難度の高い CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> 混合ガスからの高速生産を目指した。代謝改変株について、様々なガス条件で培養しエタノールの生産および増殖の可否を調べ、細胞内の代謝を測定することで、課題抽出を行った。課題は代謝の酸化還元バランスと ATP 供給の2つであることを見出し、検証に適した物質生産系の構築と解析により確定した。この結果をもとにエタノール生産株代謝の改良を行うことで、本研究開発開始時は不可能であった CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> からのエタノール生産に成功し、さらに嫌気呼吸系を用いた ATP 供給経路の補填により生産物選択性向上と生産高速化に成功した。実用化により近づけるため嫌気呼吸に依存せず H<sub>2</sub> 代謝のみで十分に ATP を供給する代謝をデザインし、H<sub>2</sub> 代謝酵素の *in silico* 構造予測などを活用しながら新たな株の構築と検証を進めた。また、従来の発酵生産とは異なりガス体の基質を用いる培養方法について、特に重要なガス体基質の培地への供給(溶解速度)について培養装置設計・検討を進めた。また高速生産のための高菌体密度培養について、ガス代謝活性が高い菌体を調製する方法を確立した。さらに、エタノールだけでなく市場需要の高い C3 化合物や C4 化合物のガス発酵生産株を構築し生産に成功するとともに、嫌気性菌である宿主の酸素耐性向上や、プロセスのフイージビリティスタディに取り組み実用性を強化した。

### 【代表的な原著論文情報】

1. Kato, J., Takemura, K., Kato, S., Fujii, T., Wada, K., Iwasaki, Y., Aoi, Y., Matsushika, A., Murakami, K., and Nakashimada, Y. (2021). Metabolic engineering of *Moorella thermoacetica* for thermophilic bioconversion of gaseous substrates to a volatile chemical. *AMB Express*, 11, 59. doi:10.1186/s13568-021-01220-w (2023 年時点 Top 10%論文)
2. Takemura, K., Kato, J., Kato, S., Fujii, T., Wada, K., Iwasaki, Y., Aoi, Y., Matsushika, A., Murakami, K., and Nakashimada, Y. (2021). Autotrophic growth and ethanol production enabled by diverting acetate flux in the metabolically engineered *Moorella thermoacetica*. *J. Biosci. Bioeng.*, 132, 569-574. doi:10.1016/j.jbiosc.2021.08.005
3. Kobayashi, S., Kato, J., Wada, K., Takemura, K., Kato, S., Fujii, T., Iwasaki, Y., Aoi, Y., Morita, T., Matsushika, A., Murakami, K., and Nakashimada, Y. (2022) Reversible hydrogenase activity confers flexibility to balance intracellular redox in *Moorella thermoacetica*, *Front. Microbiol.*, 13, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.897066>.