

戦略的創造研究推進事業(ALCA)  
技術領域(プロジェクト名)「生物資源の制御によるバイオマス・有  
用成分の増産」

課題名「低炭素化に資する発酵微生物のゲノム育種およびゲ  
ノム工学的「耐熱化」」

## 終了報告書

研究開発期間 平成 23年11月～令和 2年 3月

研究開発代表者:松下一信  
(山口大学創成科学研究科、特命教授)

## ○報告書要約（和文）

研究開発代表研究者：山口大学 特命教授 松下 一信

研究開発課題名：低炭素化に資する発酵微生物のゲノム育種およびゲノム工学的「耐熱化」

### 1.研究開発の目的

適応や交配によるゲノム育種的手法を中心に「耐熱化」微生物を育種し、それらのゲノム解析から得られる「耐熱性もしくは耐熱化遺伝子」情報を基にゲノム工学的に「耐熱化」機構を検証・評価することで、各発酵微生物固有の、そしてまた、それらに普遍的な「耐熱化」のための基礎情報を得るとともに、将来的に実用可能な「耐熱化」発酵微生物の創出を目標とする。

「耐熱化」発酵微生物を取得し利用することができれば、冷却のための水利用およびその冷却のエネルギー消費を抑制できるだけでなく、これまでその温度依存的な不安定要因のために多用されている低温培養や発酵生産の不良を克服することで大幅な消費電力・水利用の削減に繋がる。また、高温発酵を普及することで高価な発酵装置を必要としない低コスト発酵システムを構築することも可能になる。このように、「耐熱化」発酵微生物を利用する発酵生産系の確立は、その「安定生産」「省エネルギー」「低コスト」化を通じて、総合的な電力消費の削減を具現化でき、結果的に「低炭素化」へ大きく貢献することに繋がる。

### 2.研究開発の概要

(1)内容：①「耐熱化」育種に基づく「耐熱化・ストレス耐性」機構の解明に向けて、酵母、酢酸菌、*Zymomonas* 菌、コリネ型細菌、大腸菌において、高温(ストレス)培養条件下での個別の、さらに普遍的な、耐熱化機構の提案を目指す。

②酵母・酢酸菌・*Zymomonas* 菌・コリネ型細菌・大腸菌・その他有用細菌の「耐熱化」育種株による個別の高温・ロバスト発酵系を確立するとともに、それらの培地組成・培養条件等の最適化条件を確立する。

さらに、③企業との連携による産業用発酵微生物の耐熱化・ロバスト化を行い、産業微生物種(実用株及びモデル株)を用いた高温発酵系の開発を行う。

(2)成果：私達は、有用発酵微生物(酵母、酢酸菌、*Zymomonas* 菌、コリネ型細菌、*Halomonas* 菌)の耐熱性菌を分離するとともに、大腸菌(モデル微生物)を含め、それら菌株のゲノム育種法に基づく実験室進化「耐熱化」を進め、全ての系で 2-3℃ 生育限界温度の上昇した耐熱化株を取得した。また、得られた耐熱性及び耐熱化株の(比較)ゲノム解析とそれに続く遺伝子工学的解析及び遺伝子発現を含む生理学的解析を通じて、耐熱性(必須)遺伝子及び耐熱化(寄与)遺伝子のリスト化を完了し、個別の菌株の耐熱化機構を推測できるところまで来ている。対象となる全ての微生物種で「酸化ストレス」抑制が「耐熱化」に決定的に重要であることが示されているが、その「酸化ストレス抑制」を導く要因として、「NADPH/NADP 比」の増加(*G. frateurii*)、「緊縮応答的」レスポンス(大腸菌・*Zymomonas* 菌・*K. medellinensis*)、「N 飢餓応答的」レスポンス(*A. pasteurianus*)、「細胞表層・膜輸送系」の安定化・強化(酵母・コリネ型細菌、*Zymomonas* 菌)と微生物種によって多岐に渡っており、それぞれの微生物種及び発酵(実験)条件において表面化する最もクリティカルな熱感受性部が異なるようにも思われる。

一方で、得られた耐熱性および耐熱化株を用いた高温発酵系の開発を並行して進め、全ての発酵系で実験室レベルで「40℃ 高温発酵」及び「非温度制御発酵」に成功した。この成果をもとに、企業との連携による実用的高温発酵系の開発に取り組んでいる。

(3)今後の展開：①耐熱化機構の普遍化を目指して、個々の微生物種の耐熱化因子(遺伝子・培養条件)を他の微生物種において発現・適用する、あるいは他微生物種の元々の因子と組み合わせ

て、それらを発現・適用する解析を進める。

②引き続き、企業との連携で実用的高温発酵系の開発に取り組むとともに、NEDO 等の新たなプロジェクトへの参加を追求する。

## ○Report summary (English)

Principal investigator: Yamaguchi University professor Kazunobu Matsushita

R & D title: Genome adaptation and engineering study to create robust fermentative microbes with hyper thermotolerance aiming at low-carbon society

### 1. Purpose of R & D

Microbial fermentation is important in bio-industry such as not only brewing or food production but also production of medicinal materials, energy, and commodity chemicals. Facing with a global warming and also with an era of defossil fuel or sustainability, it becomes more requested to make the fermentation process less energy consumptive. This could be done by thermotolerant or robust microbes able to perform the stable fermentation with reduced cooling expense, even more without any sophisticated cooling facility. Thus, we are aiming at the low-carbon society by creating such a robust or low-cost fermentation system with thermotolerant microbes able to ferment stably around 40°C or more.

The purpose could be accomplished by acquiring such the robust strains via an adaptive breeding or experimental evolution of fermentative microbes, and by conducting comparative genomics of the adapted strains to find out gene(s) involved in thermotolerance, and then to understand thermotolerance mechanism of the adapted strains.

### 2. Outline of R & D

#### (1) Contents:

- 1) Achievement of thermal adaptation of our target fermentative microbes (Yeast, Acetic acid bacteria, *Zymomonas*, *Corynebacterium*, *Halomonas*, and *E. coli*) and aiming to understand their general or particular mechanisms for the thermotolerance.
- 2) Establishment of individual high-temperature or robust fermentation systems with our all target strains, and of the optimal cultivation conditions for each fermentation systems.
- 3) Development of high-temperature fermentation systems by thermal adaptation of industrial useful microbes, collaborating with private sectors.

#### (2) Achievements:

- 1) We could isolate several thermotolerant and useful strains in our target fermentative microbes, and also accomplished thermal adaption of all our target species, by experimental evolution, showing 2-3°C higher growth temperature than the parental strains.
- 2) Based on comparative genomics followed by genetic engineering approach, we determined a list of thermotolerant genes and also of genes contributing to thermal adaptation.
- 3) As for the thermotolerance mechanism, we have shown that all the thermotolerant or thermally adapted strains have reduced ROS level, and that many adapted strains exhibit stringent-response or nitrogen-starvation-like phenotype, and further that their cell growth at high temperature could be strengthened by stabilizing the cell surface and/or membrane-transport systems.
- 4) We have succeeded to perform high-temperature fermentation at 40°C or more, or even with non-temperature control, in almost all of our target fermentation systems for alcohol, acetic acid, amino acid, and 3-hydroxybutyric acid productions at least at laboratory level.
- 5) Some of the fermentation have been successfully achieved in semi-pilot scale at high temperature (or non-temperature control) by collaboration with some private sectors or companies.

#### (3) Future developments:

- 1) In order to generalize the thermotolerance mechanism or further to expand the usefulness of the thermal adaptation, we are going to try to apply our knowledge or information on thermotolerant genes or factors able to do high temperature fermentation to other fermentative microbes.
- 2) We will continue to develop practical high temperature fermentations by collaboration with private sectors, and also apply to participate another national project like NEDO in future.