

研究の概要

地球上に膨大に存在し未利用な資源であるセルロース系バイオマスからの原油代替化合物生産（バイオリファイナリー）を実現するために、セルロース系バイオマスの効率的糖化を達成する必要がある。バイオリファイナリー候補細菌 *Clostridium thermocellum* は 130 以上の分解酵素をもち、その生産調節を精密に行うことで、効率的にセルロース系バイオマスを分解する。近年の DNA 解析技術の急激な進歩に伴って、細菌の遺伝子発現制御やそれに伴う酵素生産制御の基盤的機構として、エピジェネティック調節が機能していることが明らかになりつつある。本研究では、バイオリファイナリー候補細菌の DNA 化学修飾状況を網羅的に解析する。加えて、DNA 化学修飾状況を変化させた *C. thermocellum* 株を作製し、そのセルロース系バイオマス分解能力を解析する。解析結果を統合し、酵素生産調節メカニズムを明らかにすることを通して、セルロース系バイオマス糖化機構を説明する。本研究での成果により、カーボンニュートラルに向けたバイオマス利用技術の確立のための知見に加え、細菌のエピジェネティクス研究分野においての新しい基盤的な知見を得ることが可能となる。

研究の要旨

セルロース系バイオマスからの原油代替化合物生産（バイオリファイナリー）を実現するために、セルロース系バイオマスの効率的糖化を達成する必要がある。本研究では、バイオリファイナリーの候補細菌 *Clostridium thermocellum* の分解酵素生産調節機構を DNA 化学修飾の観点から明らかにすることによって、そのセルロース系バイオマス分解メカニズムを解明する。

研究計画の詳細

1. 本研究のニーズ及び目的

合成生物学の発展とともに、糖液から液体燃料・プラスチック原料・化成品など、あらゆる原油の代替化合物が生産できるようになりつつある（バイオリファイナリー）（図1）。カーボンニュートラルの観点より、糖液は、地球上に膨大に存在し再生可能で未利用な資源であるセルロース系バイオマスから得ることが求められている。農林水産省な食料産業局によると、国内の利用可能なセルロース系バイオマスの量は、炭素換算で1,500万トン程度と試算されており、これを最大限活用することで、年間あたり約6,000万トンの二酸化炭素の大気中への排出を抑制できる。申請者は、セルロース系バイオマスからの物質生産プロセスの抜本的簡略化を達成するために、糖化酵素の添加を省き、細菌を培養することでセルロース系バイオマスから糖液を生産する技術（Biological simultaneous enzyme-production and saccharification: BSES）^{1,2)}や、燃料化合物を生産する技術（Consolidated bioprocessing: CBP）^{3,4)}に着目している。土壌細菌 *Clostridium thermocellum* は、セルロース系バイオマス分解活性が高いために、BSESとCBPの候補微生物と位置付けられている¹⁻⁴⁾。本研究では**細菌 *C. thermocellum* のセルロース系バイオマス糖化メカニズムを明らかにする**ことで、効率的なセルロース糖化技術の基盤的知見を獲得することを目的とする。

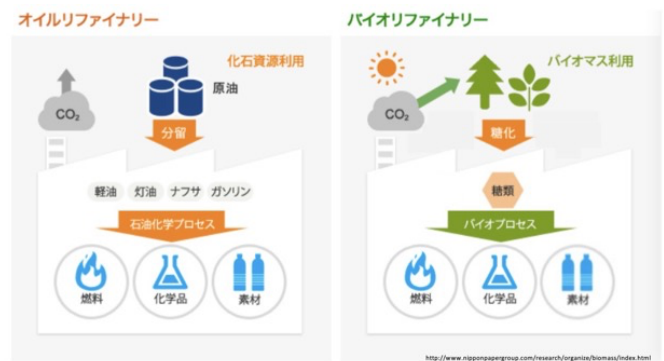


図1：バイオリファイナリーの概念図

2. 本研究の方法及び手段

C. thermocellum は多種の分解酵素の生産調節を精密に行うことで、効率的にセルロース系バイオマスを分解する。分解酵素生産は、遺伝子発現レベルを調節することで制御される。遺伝子の実態であるDNAには、メチル化など化学修飾がされており、細菌においてこのDNA修飾が遺伝子発現に関わることが明らかになりつつある⁵⁾。本研究では**近年の解析技術進歩により可能となったゲノムDNA化学修飾状況の網羅的解析により、*C. thermocellum* の精密な分解酵素生産調節メカニズムを明らかにする**。

3. 本研究の新規性・独自性

非常に強力なセルロース系バイオマス分解細菌 *C. thermocellum* に着目した点に特色がある。この細菌を改変して活用することで、セルロース系バイオマスの産業利用の実現化への道を開くことができると考えている。**細菌の改変を研究対象とする合成生物学分野のほとんどの研究者は、遺伝子導入の成功率の低さから *C. thermocellum* を研究対象にできていなかったが、申請者は国内で唯一この細菌への遺伝子導入の成功事例を報告した⁴⁾**。したがって本研究計画は申請者にしか遂行できず、その点において独自性がある。

4. 本研究成果の適用分野とその効果

市販のセルロース系バイオマス分解酵素は高価でありその分解効率も高くないため、バイオリファイナリーを実現させるための課題になっている。一方で、セルロース系バイオマス分解酵素を添加せずに、セルロース系バイオマス分解能の高い細菌を培養することによるバイオマス糖化（BSES）や原油代替化合物生産（CBP）に関する研究が注目されるようになってきた¹⁻⁴⁾。したがって、**CBPやBSESの候補細菌の細胞レベルでのセルロース系バイオマス分解機構を詳細に解明することが、バイオリファイナリーの達成にむけて世界中から求められている**と判断している。

5. 研究実施計画の詳細

C. thermocellum は 134 種類のセルロース系バイオマス分解酵素をもつ。セルロース系バイオマスの構造や構成成分を認識し、その分解に適した分解酵素を合成・分泌し^{6,7)}、非常に効率的にセルロース系バイオマスを分解する。

環境に合わせた遺伝子発現のメカニズムとして、エピジェネティック調節が近年急速に明らかになっている。具体的なエピジェネティック調節の化学的基盤として、DNA メチル化が挙げられる。特にヒト、動物、植物など真核生物では、細胞の特徴を決定する仕組みとして、エピジェネティック調節が大きな役割をもつことが知られている。細菌ゲノム DNA には、真核生物にはほとんど見られない特有のメチル化 DNA (N6-methyladenosine、N4-methylcytosine) が含まれていることがわかっている。これまで技術的な制約で細菌ゲノム中の N6-methyladenosine や N4-methylcytosine を網羅的に検出することができなかったが、近年の DNA 解析技術の大きな進歩により、これが可能となった。具体的にはたとえば PacBio 社の 1 分子リアルタイム DNA シークエンシング技術により、99.9%以上の高い精度をもって細菌 DNA 特有のメチル化状況の解析ができる (図 2)。細菌 DNA のエピジェネティック調節に関する研究論文が少しずつ報告されるようになってきており、その存在が確実視されつつある状況にある⁵⁾。以上の通り、細菌のエピジェネティック調節の研究は、技術的課題が解決されたまさに現時点で取り組むべきタイミングにあるといえる。

本研究では、**たくみに分解酵素の分泌を調節する細菌 *C. thermocellum* を用いて、その調節メカニズムを、DNA メチル化を介した細菌エピジェネティック調節の観点から理解する。**加えて、DNA メチル化状況を変化させた *C. thermocellum* 株を作成して、生産される分解酵素を解析することによって、セルロース系バイオマス分解活性にとって重要な分解酵素の探索を行うことを目的とする (図 3、4)。

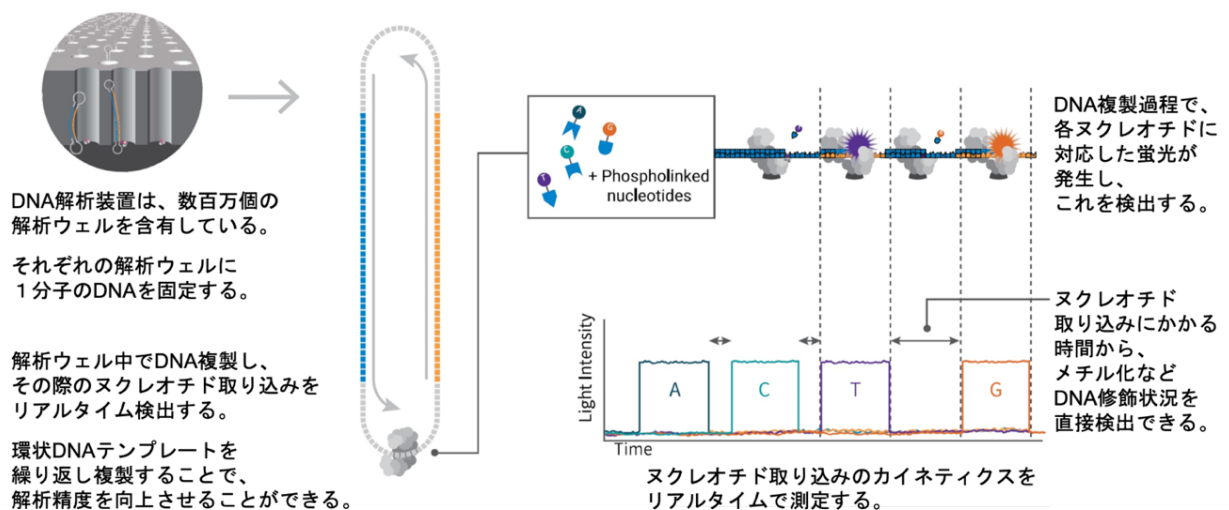


図 2 : PacBio 社 1 分子リアルタイム DNA シークエンシング技術による、DNA メチル化状況の解析 (PacBio 社ホームページより引用・改変)

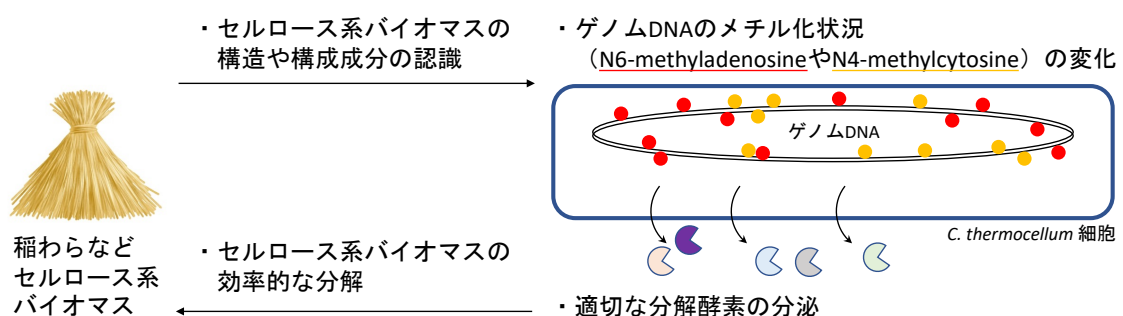


図 3 : 想定されるエピジェネティック調節による細菌の分解酵素分泌メカニズム

各培養条件下で変動するDNAメチル化と遺伝子発現の関係性を評価する

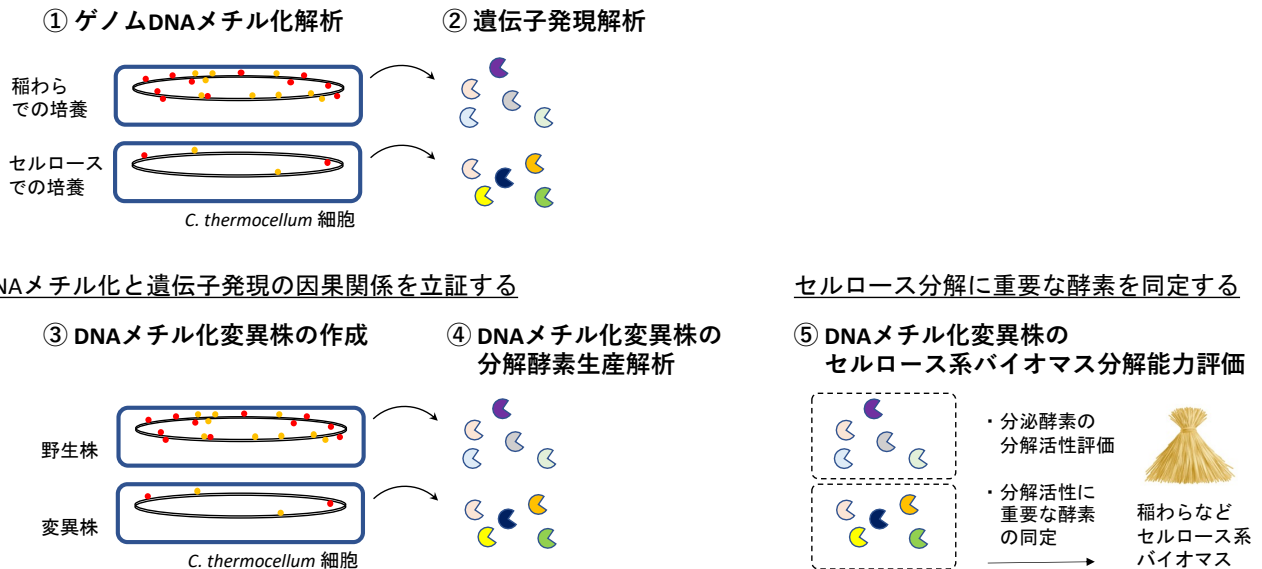


図4：本研究戦略の概要

① *C. thermocellum* ゲノム DNA メチル化解析（1年目 11-6月）

セルロース系バイオマスとしての稲わら、精製セルロース、セルロースの分解物であるセロビオースを用いて、*C. thermocellum* を培養する。*C. thermocellum* 細胞中の ATP 量をモニターして、対数増殖期の細胞を回収する。15kbp 程度の長鎖状況を維持して、ゲノム DNA を抽出する。各培養条件におけるゲノム DNA のメチル化状況を、PacBio Sequel II での解析によって明らかにする（図2）。

② 各培養条件における *C. thermocellum* 遺伝子の発現解析（1年目 7-10月）

上記の事項で明らかになった、DNA メチル化変動のある遺伝子について、その発現レベルを評価する。各培養条件での細胞を回収し、トータル RNA を抽出し、逆転写反応によって cDNA を合成する。着目した遺伝子について、その発現レベルを RT-qPCR によって評価する。DNA メチル化解析結果と照合し、遺伝子発現レベルとの相関関係を明らかにする。

③ *C. thermocellum* DNA メチル化変異株の作成（2年目 11-12月）

ここまでで、DNA メチル化状況と各遺伝子の発現レベルとの相関関係を明らかにしている。続いて、DNA メチル化状況を変化させた *C. thermocellum* 株を作成し、DNA メチル化の遺伝子発現との因果関係を検証する。DNA adenine methylase や DNA cytosine methylase をはじめ、*C. thermocellum* ゲノム中の DNA メチル化酵素遺伝子を推定することができる。本事項では、ゲノム編集技術などにより各 DNA メチル化酵素遺伝子を欠失または強発現した *C. thermocellum* 株を作成する。

C. thermocellum の DNA メチル化酵素遺伝子を PCR で増幅し、発現プラスミド DNA に挿入する⁴⁾。*C. thermocellum* 細胞懸濁液とプラスミド DNA を混合し、ジーンパルサーXcell エレクトロポレーションシステム（Bio-Rad）にて方形波電気パルスを印加する。回収した細胞を抗生物質を含む固体培地上に塗布して培養し、形成されたコロニーを単離する。細胞が DNA メチル化酵素遺伝子を保持していることを、PCR によって確認する。細胞内での DNA メチル化酵素遺伝子の発現をウエスタンブロッティング法によって解析することで⁴⁾、DNA メチル化酵素生産株を選抜する。

④ *C. thermocellum* DNA メチル化変異株の分解酵素生産解析（2年目 1-4月）

事項②と同様に着目した遺伝子について、*C. thermocellum* メチル化変異株での遺伝子発現レベルを RT-qPCR によって評価する。野生株での結果と比較を行うことにより、DNA メチル化による遺伝子発現への寄与を明らかにする。

遺伝子発現レベルに変化があれば、セルロース系バイオマス分解酵素生産も変動しているものと考えられる。メチル化変異株の培養液中のセルロース系バイオマス分解酵素を、限外濾過濃縮して回収する。セルロース系バイオマス分解酵素回収画分を、電気泳動（SDS-PAGE）に供し、活性染色法⁸⁾にて解析することで、その培養液中の酵素構成を明らかにする。

⑤ *C. thermocellum* DNA メチル化変異株のセルロース系バイオマス分解能力評価（2年目 5-10月）

稲わらなどセルロース系バイオマスを用いて、メチル化変異株を培養し、培養後残存しているセルロース系バイオマスを定量する。また、*C. thermocellum* 培養液中から回収した分解酵素のセルロース系バイオマス分解力を評価する。この方法によって、*C. thermocellum* のメチル化変異株のセルロース系バイオマス分解能の変化を検証する⁸⁾。

ここまでの実験結果から着目した分解酵素の特徴づけを行う。分解酵素遺伝子を *C. thermocellum* ゲノム DNA から PCR により増幅し、大腸菌に導入する。大腸菌で生産させた酵素を精製して、酵素溶液を調製する。多糖の分解活性測定の基質として、結晶セルロース、キシラン、粉碎稲わらを、オリゴ糖の分解活性測定の基質として、*p*-nitrophenyl b-D-glucopyranoside、*p*-nitrophenyl b-D-xylopyranoside、*p*-nitrophenyl b-D-arabinofuranoside、coniferin、xyloglucan oligosaccharides を用いる。酵素分解速度を、主に DNS 法によって決定する⁹⁾。これらの実験を通して得られた結果より、*C. thermocellum* のセルロース系バイオマス分解能にとって重要な分解酵素を同定する。

C. thermocellum への遺伝子導入に成功している研究者はほとんどいない。申請者は *C. thermocellum* の改変技術を国内で唯一報告しており⁴⁾、*C. thermocellum* 細胞内でのメチル化酵素遺伝子の機能を解析できる状況にあるため、細菌のセルロース系バイオマス分解機構を解くための絶好の機会を有している。本研究から得られる成果は、*C. thermocellum* のセルロース系バイオマス分解機構を説明するため、また細菌遺伝子発現のエピジェネティック調節機構を説明するための非常に重要な情報になる。

本研究では *C. thermocellum* の分子生物学的・生化学的実験を行う。申請者はこれまでこの細菌を扱っており、本研究計画を遂行するための十分な準備ができています。申請者はこれまでに細菌 *C. thermocellum* によるセルロース系バイオマス分解に関して複数の研究成果を論文として公開してきた。本細菌は好熱嫌気性の細菌であるが、この細菌を培養して扱うための器具装置（ハンゲートチューブや嫌気チャンバーなど）を整備している。研究室にて DNA、タンパク質、化合物などを分析するための試薬や装置備品を整えている。学内には共同利用機器もあり、これも利用して研究を滞りなく進めることができる。これまで研究成果をだしてきたように、必要に応じて学内外の研究者と協力できる体制がある。

特に事項①は、本研究計画の根幹をなすものである。すでに本解析を予備的に実施しており、各培養条件によって *C. thermocellum* ゲノム中の 23/10478 サイトのアデニンのメチル化が、また 315/17129 サイトのシトシンのメチル化が有意に変動することを明らかにしている。したがって、本研究計画によって、各環境条件における細菌 DNA メチル化の変動現象を確実に捉えることができることを確認している。

以上の通り、**飛躍のない論理に基づいた研究計画を立てられており、かつ計画を遂行するのに十分な研究環境を整えており、実行可能性が十分にある。**

進捗の概要

セルロース系バイオマスとしての稲わら、精製セルロース、セルロースの分解物であるセロビオースを用いて、*C. thermocellum* を培養し、ゲノム DNA を抽出してそのメチル化状況を解析することに成功した。*C. thermocellum* ゲノム DNA 中で、N6-methyladenosine (m6A) は 10,478 部位、N4-methylcytosine (m4C) は 17,129 部位で検出された。各培養条件での有意に ($p < 0.05$) 再現よく変動している DNA メチル化部位として、m6A は 23 部位、m4C は 315 部位を特定できた。俯瞰してみた場合、*C. thermocellum* ゲノム DNA 中の m6A と m4C はともに、稲わらで培養した場合に少なくなることが明らかになった。各 DNA メチル化部位に対応する遺伝子のリストを作成することができた。以上、**5. 研究実施計画の詳細**で示している ***C. thermocellum* ゲノム DNA メチル化解析 (2022 年 11 月-2023 年 6 月) を、計画通り実施することができた。**

進捗の詳細

① *C. thermocellum* の培養と増殖評価

セルロース系バイオマスとしての粉碎稲わら粉末、精製セルロース、セルロースの分解物であるセロビオースを用いて、*C. thermocellum* を培養した。セロビオースは水に可溶性化合物である。セロビオースを用いて *C. thermocellum* を培養した場合、増殖した菌体により濁度が上昇するため、これを指標に細菌増殖を評価ができた。一方で、粉碎稲わら粉末や精製セルロースは水に不溶であり、*C. thermocellum* 増殖にかかわらず濁度が大きく算出されてしまうため、これを指標に細菌増殖を評価することができなかった。増殖中の細菌細胞では化合物が活発に代謝されており、エネルギーを ATP という化合物として蓄積する。培養液中の ATP 濃度を測定することによって、粉碎稲わら粉末や精製セルロースを用いて培養した際の *C. thermocellum* の増殖を評価することができた。*C. thermocellum* 培養液中の ATP 濃度は、粉碎稲わら粉末を用いた場合は 24 時間程度、精製セルロースを用いた場合は 36 時間程度でピークに達し、その後急激に減少する様子が観察された (図 5)。本結果を元に、各培養条件での増殖中の細胞 (対数増殖期細胞) を回収することができた。

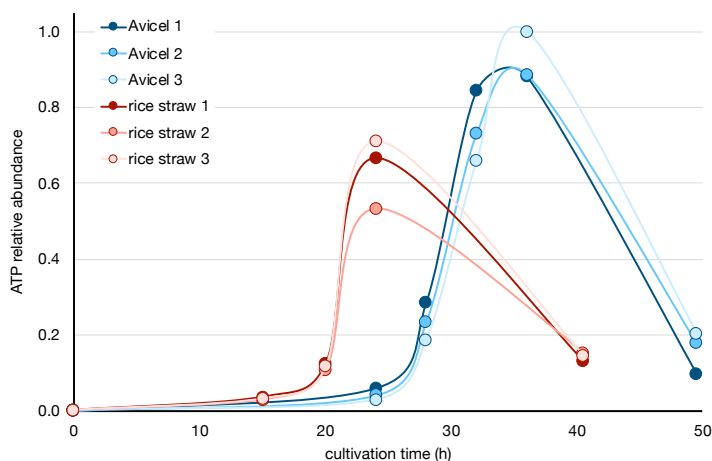


図 5 : ATP 濃度による *C. thermocellum* 増殖評価
粉碎稲わら粉末 (rice straw) で培養した結果を赤色、
精製セルロース (Avicel) で培養した結果を青色で
示す。各実験を独立に 3 回行った。

② *C. thermocellum* からのゲノム DNA 抽出とその DNA メチル化解析

各条件で培養した *C. thermocellum* 細胞から、長鎖状況を維持してゲノム DNA を抽出した。SMRTbell Express Template Prep Kit 2.0 を用いて、ライブラリを調製した。DNA シークエンサー Sequel II (Pacific Biosciences) を用いて、DNA 配列解読と DNA メチル化解析のためのデータ取得を行った (図 2)。解析プログラム SMRT Link v9.0 (Pacific Biosciences) によって、得られたデータから fastq 形式データを作成し、メチル化解析に十分なデータを取得できていることを確認した。SMRT Analysis の Base Modification

Analysis を用いて、メチル化領域を検出した。*C. thermocellum* ゲノム DNA 中で、N6-methyladenosine は 10,478 部位、N4-methylcytosine は 17,129 部位検出された。各培養条件での有意に ($p < 0.05$) 再現よく変動している DNA メチル化部位として、m6A は 23 部位、m4C は 315 部位を特定できた。各 DNA メチル化部位に対応する遺伝子リストを作成することができた (図 6、7)。俯瞰してみた場合、*C. thermocellum* ゲノム DNA 中の m6A と m4C はともに、稲わらで培養した場合に少なくなっていた。DNA メチル化の変動は、セルロース系バイオマス分解に関わると予想される遺伝子 (type 3a cellulose-binding domain protein, cellulosome anchoring protein cohesin region, dockerin, glycosyl transferase, glycoside hydrolase, carbohydrate binding など) をコードする領域でも多数生じており、分解酵素生産調節に機能していることが予想される結果を得ることができた。

position	cellobiose	cellulose	rice_straw	locus_tag	feature key	product
174302	+	-	-	Clo1313_0158	CDS (pseudo)	
271975	+	+	-	Clo1313_R0007	tRNA	tRNA-Met
349631	+	+	-	Clo1313_0318	CDS	translation elongation factor G
463710	+	-	-			
497395	+	+	-	Clo1313_R0013	rRNA	16S ribosomal RNA
501386	+	+	-	Clo1313_R0015	rRNA	23S ribosomal RNA
999765	+	+	-	Clo1313_0862	CDS	hypothetical protein
1791504	+	+	-	Clo1313_1536	CDS	chromosome segregation and condensation protein ScpA
1911387	+	+	-			
1911394	+	+	-			
1915088	+	+	-		repeat_region (CRISPRS)	
1962628	+	+	-	Clo1313_1677	CDS	FAD-dependent pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase
1981018	+	+	-	Clo1313_1690	CDS	periplasmic solute binding protein
1983893	+	+	-			
2125732	+	-	-	Clo1313_1817	CDS	type 3a cellulose-binding domain protein
2305191	+	+	-	Clo1313_1962	CDS	type 3a cellulose-binding domain protein
2453060	+	+	-	Clo1313_2087	CDS	transposase IS200-family protein
2589341	-	+	-			
2691961	+	+	-	Clo1313_2284	CDS	hypothetical protein
2839225	+	+	-			
2984529	+	+	-			
2984597	+	+	-	Clo1313_R0057	tRNA	tRNA-Gly
3213191	+	+	-	Clo1313_2731	CDS	amidohydrolase

図 6 : 各培養条件で変動する *C. thermocellum* ゲノム DNA 中の N6-methyladenosine (m6A) 部位 m6A が検出された部位を+で、検出されなかった部位を-で示す。検出された部位でコードされている遺伝子がリストされている。

position	cellobiose	cellulose	rice_straw	locus_tag	feature key	product
34908	+	-	-	Clo1313_0033	CDS	Peptidoglycan-binding lysin domain
37462	+	-	-	Clo1313_0035	CDS	transcriptional regulator, GntR family
62521	+	-	-	Clo1313_0054	CDS	type 3a cellulose-binding domain protein
103790	-	-	+	Clo1313_0090	CDS	S-layer domain-containing protein
163873	-	+	-	Clo1313_0149	CDS	hypothetical protein
173559	+	+	-	Clo1313_0157	CDS	hypothetical protein
290327	+	-	-	Clo1313_0269	CDS	hypothetical protein
290920	+	+	-	Clo1313_0269	CDS	hypothetical protein
297167	-	+	-	Clo1313_0272	CDS	hypothetical protein
308178	+	+	-	Clo1313_0283	CDS	glycosyl transferase group 1
527931	-	+	-	Clo1313_0482	CDS	regulatory protein DeoR
717213	+	+	-	Clo1313_0630	CDS	cellulosome anchoring protein cohesin region
737212	+	+	-	Clo1313_0648	CDS	glycosyl transferase family 2
769668	+	+	-	Clo1313_0675	CDS	S-layer domain-containing protein
780147	+	+	-	Clo1313_0681	CDS	hypothetical protein
816335	+	+	-	Clo1313_0710	CDS	transcriptional regulator, GntR family
945238	+	+	-	Clo1313_0819	CDS	hypothetical protein
1154712	+	-	-	Clo1313_0991	CDS	two component transcriptional regulator, LuxR family
1238815	+	+	-	Clo1313_1036	CDS	glycosyltransferase 36
1241426	+	+	-	Clo1313_1036	CDS	glycosyltransferase 36
1250043	+	+	-	Clo1313_1045	CDS	hypothetical protein
1398785	+	-	-	Clo1313_1176	CDS	cell wall hydrolase/autolysin
1571328	+	+	-	Clo1313_1326	CDS	hypothetical protein
1571337	+	+	-	Clo1313_1326	CDS	hypothetical protein
1574608	+	+	-	Clo1313_1330	CDS	RNA polymerase, sigma-24 subunit, ECF subfamily
1575483	+	+	-	Clo1313_1331	CDS	hypothetical protein
1596038	+	+	-	Clo1313_1351	CDS	hypothetical protein
1680733	+	+	-	Clo1313_1428	CDS	hypothetical protein
1798325	+	+	-	Clo1313_1541	CDS	hypothetical protein
1925516	+	+	-	Clo1313_1649	CDS	hypothetical protein
1925525	+	+	-	Clo1313_1649	CDS	hypothetical protein
1942359	+	+	-	Clo1313_1659	CDS	glycoside hydrolase family 9
1943492	+	+	-	Clo1313_1659	CDS	glycoside hydrolase family 9
1985162	+	+	-	Clo1313_1694	CDS	glycoside hydrolase family 9
2001103	+	+	-	Clo1313_1706	CDS	hypothetical protein
2002741	+	+	-	Clo1313_1707	CDS	hypothetical protein
2018210	+	+	-	Clo1313_1722	CDS	hypothetical protein
2043549	+	+	-	Clo1313_1750	CDS	hypothetical protein
2286597	+	+	-	Clo1313_1949	CDS	hypothetical protein
2304585	+	+	-	Clo1313_1962	CDS	type 3a cellulose-binding domain protein
2323336	-	+	-	Clo1313_1977	CDS	hypothetical protein
2336079	+	+	-	Clo1313_1983	CDS	Carbohydrate binding family 6
2437506	+	+	-	Clo1313_2070	CDS	hypothetical protein
2547038	+	+	-	Clo1313_2176	CDS	S-layer domain-containing protein
2555140	+	+	-	Clo1313_2176	CDS	S-layer domain-containing protein
2575485	+	+	-	Clo1313_2186	CDS	hypothetical protein
2804693	+	-	-	Clo1313_2388	CDS	hypothetical protein
2874347	+	+	-	Clo1313_2461	CDS	glycosyl transferase family 2
2931291	+	-	-	Clo1313_2506	CDS	hypothetical protein
2952240	+	+	-	Clo1313_2521	CDS	hypothetical protein
3008874	+	+	-	Clo1313_2564	CDS	Dockerin type 1
3103564	-	+	-	Clo1313_2635	CDS	glycoside hydrolase family 10
3154717	+	+	-	Clo1313_2687	CDS	hypothetical protein
3208023	-	+	-	Clo1313_2728	CDS	hypothetical protein
3208487	+	+	-	Clo1313_2728	CDS	hypothetical protein
3361198	+	+	-	Clo1313_2859	CDS	Carbohydrate binding family 6
3367875	+	+	-	Clo1313_2861	CDS	glycoside hydrolase family 2 sugar binding protein
3413075	+	+	-	Clo1313_2905	CDS	polysaccharide biosynthesis protein CapD
3421636	+	-	-	Clo1313_2914	CDS	hypothetical protein
3512483	+	+	-	Clo1313_2998	CDS	polysaccharide biosynthesis protein

図7：各培養条件で変動する *C. thermocellum* ゲノム DNA 中の N4-methylcytosine (m4C) 部位 m4C が検出された部位を+で、検出されなかった部位を-で示す。検出された部位でコードされている遺伝子がリストされている。検出されたもののうち一部を示している。

7. 本研究に関する国内外の状況

地球上に膨大に存在し非可食であるセルロース系バイオマスを活用することが求められている。これまで分解酵素の特徴を調べる研究が盛んに行われてきたが、セルロース系バイオマス分解効率を十分には向上できておらず¹⁰⁾、それゆえに産業利用を達成できていない。申請者は、強力なセルロース分解細菌 *C. thermocellum* の遺伝子操作を得意としており、本技術を活用してこれまで多数の研究成果を挙げてきた。

C. thermocellum のセルロース系バイオマス分解能力やそのメカニズムについて、多くの研究報告が存在する。*C. thermocellum* は 4.4g/L の精製セルロースを 1 日で完全に分解する¹⁶⁾。また、5g/L のスイッチグラスを 5 日で 65%、10g/L のトウモロコシ葉を 7 日で 70% 分解する能力を持つ¹⁷⁾。*C. thermocellum* を含むいくつかのセルロース分解細菌は、セルロソームと呼ばれる分解酵素複合体を形成する¹³⁾。セルロソームは、骨格タンパク質に複数の分解酵素が結合することによって形成される¹³⁾。*C. thermocellum* ゲノムは 130 以上の分解酵素遺伝子をコードしており、そのうち 70 以上の糖質関連酵素 (exo-1,4-glucanase、endo-1,4-glucanase、endo-1,4-xylanase、acetylxylin esterase、xyloglucanase、endo-1,4-mannanase、lichenase、chitinase など) がセルロソームを構成している。*C. thermocellum* は 0.5% の微結晶セルロース (Avicel) を 45 時間で分解するが、骨格タンパク質欠損株では分解に 500 時間近くかかることから、*C. thermocellum* の迅速なセルロース分解能力にはセルロソームが重要であることがわかっている¹⁸⁾。また、精製セルロソームと比較して、*C. thermocellum* を培養した方がセルロース分解が進むこともわかっている¹⁹⁾。したがって、*C. thermocellum* のセルロース分解活性をセルロソームのみでは説明できず、例えば**セルロソームを構成する糖質関連酵素の生産調節などの要素が、*C. thermocellum* のセルロース分解活性に重要であると予想される。**

C. thermocellum の糖質関連酵素遺伝子の発現パターンは、セルロース分解の初期と後期で変化する²⁰⁾。また、培養する際に用いる基質によって、糖質関連酵素遺伝子の発現パターンが異なる^{21,22)}。Kahel-Raifer らは、*C. thermocellum* がセルロース系バイオマス中の多糖類の存在を複数のセンサーで感知し、シグマ因子を介して適切な糖質関連酵素遺伝子の発現を誘導することを報告している⁷⁾。申請者は、**特定のシグマ因子が *C. thermocellum* の多様な分解酵素生産を包括的に促進する**ことを明らかにした¹²⁾。

近年の DNA 解析技術の急激な進歩に伴って、細菌の遺伝子発現制御の基盤的機構としてエピジェネティック調節が機能していることが、明らかになりつつある⁵⁾。本研究で扱うセルロース系バイオマス分解細菌は、遺伝子発現調節をたくみに行うために、細菌のエピジェネティクス研究に適した研究対象である。本研究での成果は、カーボンニュートラルに向けたバイオマス利用技術の確立のための基盤的な知見を得ることができること、加えて細菌のエピジェネティクス研究分野に新しい知見を得ることができる点で、大きな価値があると考えている。

参考文献

- 1) Prawitwong *et al.* *Biotechnol. Biofuels.* 6:184. 2013.
- 2) **Ichikawa** *et al.* *J. Biosci. Bioeng.* 127:340-344. 2018.
- 3) Akinosho *et al.* *Front Chem.* 2:66. 2014.
- 4) **Ichikawa** *et al.* *FEMS Microbiol. Lett.* 362:fnv202. 2015.
- 5) Sánchez-Romero *et al.* *Curr. Opin. Microbiol.* 25:9-16. 2015.
- 6) Nataf *et al.* *PNAS.* 107:18646-18651. 2010.
- 7) Kahel-Raifer *et al.* *FEMS Microbiol. Lett.* 308:84-93. 2010.
- 8) McBEE. *J. Bacteriol.* 67:505-506. 1954.
- 9) Sumner. *J. Biol. Chem.* 47:5. 1921.
- 10) Himmel *et al.* *Science.* 315:804. 2007.
- 11) Schirmer *et al.* *Science.* 329:559-562. 2010.
- 12) **Ichikawa** *et al.* *Enzyme Microb. Technol.* 156:110002. 2022.
- 13) Doi *et al.* *Nat. Rev. Microbiol.* 2:541-551. 2004.
- 14) **Ichikawa** *et al.* *FEMS Microbiol. Lett.* 366:fnz145. 2019.
- 15) **Ichikawa** *et al.* *Microorganisms.* 9:593. 2021.
- 16) Izquierdo *et al.* *Biotechnol. Biofuels.* 7:136. 2014.
- 17) **Ichikawa** *et al.* *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 81:2028-2033. 2017.
- 18) Xu *et al.* *Sci Adv* 2:e1501254. 2016.
- 19) Lu *et al.* *PNAS.* 103:16165. 2006.
- 20) Raman *et al.* *BMC Microbiol.* 11:134. 2011.
- 21) Raman *et al.* *PLoS One.* 4:e5271. 2009.
- 22) Zverlov *et al.* *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125:298. 2008.