

日本農芸化学会中部支部
第 152 回例会

講演要旨集

受賞講演およびシンポジウム
「バイオエタノールと微生物の話」

日時：平成20年6月28日（土）13：00より
場所：三重大学大学院生物資源学研究科
大講義室（218教室）
（〒514-8507 津市栗真町屋町1577）

日本農芸化学会中部支部
〒464-8601 名古屋市千種区不老町
名古屋大学大学院生命農学研究科内

会場への交通案内

- ・ 近鉄「江戸橋駅」から、徒歩で約15分。
- ・ 近鉄・JR「津駅」東口バスのりば「4番」から、三交バス「白塚駅前」「棕本」「豊里ネオポリス」「三重病院」「太陽の街」「サイエンスシティ」「三行」行きで、「大学前」下車。約10分。200円。

三重大学の正門からキャンパス内に入り、メインストリートをしばらく進むと見える7階建ての茶色の建物です。



交通案内 (<http://www.mie-u.ac.jp/map/traffic/>)

日本農芸化学会中部支部第152回例会

受賞講演およびシンポジウム 「バイオエタノールと微生物の話」

日時：平成20年6月28日（土）13：00より

場所：三重大学大学院生物資源学研究科大講義室（218教室）
（〒514-8507 津市栗真町屋町1577）

プログラム

- 13：00 総会
- 13：20 支部長開会の挨拶 前島正義（名古屋大学大学院生命農学研究科）
- 13：25 受賞講演
平成20年度日本農芸化学会奨励賞
「微生物の多様な環境応答とその分子機構」
金丸京子（名古屋大学大学院生命農学研究科）
- 13：55 シンポジウム「バイオエタノールと微生物の話」
- 13：55 開会の辞
- 14：00 「木質系バイオマスからの組換え大腸菌を用いたエタノール生産」
奥田直之（月島機械株式会社）
- 14：40 「酸ストレス耐性酵母のゲノム育種工学」
原島 俊（大阪大学大学院工学研究科）
- 15：20 休憩（10分）
- 15：30 「酸に耐性の酵母でエタノール生産の研究をはじめた動機」
久松 真（三重大学大学院生物資源学研究科）
- 16：10 「リグノセルロース糖化並行発酵細菌のメタボリックエンジニアリング」
築瀬英司（鳥取大学工学部）
- 16：50 閉会の辞
- 17：10 懇親会 三重大学 生協食堂（参加費：無料）

問い合わせ先

栗冠和郎（三重大学大学院生物資源学研究科）

〒514-8507 津市栗真町屋町1577

Tel:059-231-9621, Fax:059-231-9684, E-mail: sakka@bio.mie-u.ac.jp

中部支部庶務幹事

西川俊夫（名古屋大学大学院生命農学研究科）

〒464-8601 名古屋市千種区不老町

Tel:052-789-4115, E-mail: nisikawa@agr.nagoya-u.ac.jp

受 賞 講 演

(受賞講演)

微生物の多様な環境応答とその分子機構

金丸京子 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

微生物は様々な環境に適応して生育している。多細胞の真核生物とは異なり、脂質二重層の膜だけで外界と隔てられている微生物は、環境(変化)に速やかに応答し適応する遺伝子発現調節機構を持つことでどのような環境にも適応することが可能と考えられる。微生物の持つ様々な環境応答機構の中でも、His-Asp リン酸リレー情報伝達機構は、1980年代に次々と報告され、微生物に普遍的に存在する環境応答機構である。膜に局在して環境変化をモニターするセンサータンパク質は環境変化(シグナル)を感知すると自身の His 残基を自己リン酸化し、そのリン酸基を転写調節因子であるレスポンスレギュレーターに転移することによってシグナルを伝達する。リン酸基を受け取ったレスポンスレギュレーターは目的遺伝子の転写を活性化する。全塩基配列の決定した大腸菌には30種類ほどのセンサー/レギュレーターのパairが存在すると推定されており、すなわち、30種類もの環境変化に応答にすることが出来るといえる。

それら His-Asp リン酸リレー情報伝達機構(当時は、センサーとレスポンスレギュレーターの一つの制御因子からなる機構のために二成分制御機構と呼ばれた)の中でも浸透圧センサー EnvZ とレスポンスレギュレーター OmpR の情報伝達メカニズムは、培地浸透圧に応答した大腸菌外膜タンパク質 OmpF、OmpC の発現調節機構として詳細に解析され、His-Asp リン酸転移を介した情報伝達機構のモデルシステムとなった。特に、われわれは転写因子 OmpR が内膜浸透圧センサー EnvZ により N 末端側ドメインがリン酸化されると中央部領域を介した多量体化が促進され、C 末端側 DNA 結合ドメインの DNA 結合能が上昇することを明らかにした。カリウムイオン輸送を行う P 型 ATPase (KdpABC 複合体) をコードするオペロンの浸透圧に応答した誘導を担う KdpD-KdpE に関しては、内膜センサー KdpD の環境シグナル受容様式、KdpD と転写因子 KdpE 間のリン酸転移反応、リン酸化依存的な KdpE の活性化を証明した。中でもリポソームを用いて再構成した KdpD が、*in vitro* で浸透圧に応答して KdpE をリン酸化することを示した結果は、浸透圧という物理的環境シグナルがセンサータンパク質 KdpD の膜領域を介して認識されることを示唆した。

原核生物にしか存在しないと考えられていた His-Asp リン酸リレー情報伝達機構も、現在では酵母、カビ、植物などの真核生物に広く存在し、浸透圧応答や酸化ストレス応答、植物ホルモンに対する応答など重要な環境応答に機能していることが明らかになってきた。しかしながら、真核生物における His-Asp リン酸リレーを構成する因子は、原核生物と構造上大きな相違がある。真核生物型のセンサータンパク質は自己リン酸化するドメインに加え、レスポンスレギュレーターのリン酸基受容ドメインをその C 末端部分にもつハイブリッド型ヒスチジンキナーゼである。さらにセンサータンパク質と、別に存在するレスポンスレギュレーターの間には、リン酸基転移中間因子として Hpt 因子が存在し、結果的に多段階のリン酸リレーを行うことによって情報が伝達される。

このような真核生物の His-Asp リン酸リレー機構は、これまでに、モデル真核微生物である出芽酵母を中心に研究が進められてきた。出芽酵母では、唯一存在するセンサータンパク質 Sln1 が、浸透圧に応答して下流の HPt 因子 (Ypd1) , レスポンスレギュレーター (Ssk1) へとリン酸基シグナルを伝達し、さらに MAPK カスケードを介して下流遺伝子の発現を調節する。一方、われわれが研究対象としている糸状菌 *Aspergillus nidulans* においては、ハイブリッド型ヒスチジンキナーゼが 15 種類存在し、His-Asp リン酸リレー系が環境応答のみならず、*A. nidulans* の栄養増殖、無性生殖、有性生殖など生育や分化にも関与することが考えられている。さらに、センサータンパク質とレスポンスレギュレーターがペアで存在している原核生物やセンサー、HPt、レスポンスレギュレーターがそれぞれ複数存在する他の真核生物と異なり、*A. nidulans* には、センサー15 種類に対して、HPt 因子は 1 種類、レスポンスレギュレーターは 4 種類しかゲノム配列上存在しない。*A. nidulans* の情報伝達機構では、これらリン酸リレー因子が生育段階特異的、器官特異的に発現し機能することによって数のアンバランスさを補い、その結果複雑なリン酸リレーのネットワークを形成して環境に適応すると考えられる。

そこで、それぞれの因子が生育段階に応じどのような発現（様式及び量）を示すかを Real Time PCR を用いて解析し、また各因子のプロモーターと *gfp* との融合遺伝子を野生株に導入し各因子の発現部位を観察した。その結果、15 種類のヒスチジンキナーゼはそれぞれ発現時期および量において様々であり、異なる環境応答に機能することが示唆された。ゲノム配列上 1 種類しか存在しないリン酸基転移中間因子 HPt はどの生育時期においても十分な発現量を示し、15 種類のヒスチジンキナーゼすべてから情報（リン酸基シグナル）を受容することが可能であると推定された。4 つのレスポンスレギュレーターにおいてもそれぞれ異なる発現時期、量を示し、*A. nidulans* においては、リン酸リレー因子の数のアンバランスさが発現レベルで補われていることが明らかになった。現在、発現に特徴の認められた因子について、その破壊株を作成し機能解析を行うとともに、下流情報伝達経路の解明などを目指している。最も解析の進んでいるヒスチジンキナーゼ HK6 (NikA) については、NikA を介した農業に対する応答機構や生育への影響に関して理解を深め、NikA の機能的重要性を明らかにしている。

本研究“微生物の多様な環境応答とその分子機構”は、名古屋大学大学院農学研究科において学位取得のために行われた“大腸菌における浸透圧に応答した情報伝達機構”で始まり、海洋科学技術センターにおける“深海環境（高圧、低温）応答”、Scripps 研究所での“枯草菌胞子形成における情報伝達機構”、東京大学医科学研究所における“腸管出血性大腸菌 O157:H7 の Quorum Sensing 機構”、および現在所属する名古屋大学大学院生命農学研究科での“糸状菌 *Aspergillus nidulans* における His-Asp リン酸リレー情報伝達機構”へと展開された研究を含む。各研究機関において、研究の機会を与えて頂き、ご指導ご鞭撻を賜りました、諸先生ならびに同僚の皆様に深く感謝致します。最後に、本奨励賞にご推薦いただきました日本農芸化学会中部支部長、前島正義先生の細やかなお心遣いならびに学会の諸先生のご支援に厚くお礼申し上げます。

シ ン ポ ジ ウ ム

「バイオエタノールと微生物の話」

(S-1)

木質系バイオマスからの組換え大腸菌を用いたエタノール生産

奥田直之（月島機械株式会社）

1. はじめに

地球温暖化に加え近年の原油価格の高騰でバイオエタノールの生産が世界的に増加している中、国内においても商用設備の建設が数箇所で行われている。これらは食糧由来の原料である糖質およびデンプン質からのエタノール生産であるが、食糧と競合し、農地・用水に制約があることから、世界的には大きな課題となっている。一方、木質系バイオマスは食糧と競合せず（計画的な利用においては）持続的な原料になりえるが、収集および製造コストに課題があり商業的に実用化された例は極めて少ない。その中で年間 400 万トン以上発生する建設廃木材は、循環型社会形成法によってリサイクルを義務付けられており、産業廃棄物として組織的に収集されている。木質系バイオマスからのエタノール生産の課題である収集・運搬を建設廃木材を原料とすることで解決させ、プロセスにも新たな技術を取り込んだバイオエタノール製造設備が商業運転を開始した（バイオエタノール・ジャパン・関西株式会社）。本発表ではプロセス概要ならびにコア技術であるエタノール発酵性大腸菌について紹介する。

2. 建設廃木材からのバイオエタノール製造の商業設備

バイオエタノール・ジャパン・関西株式会社は、世界で初めて廃木材を原料に燃料用アルコールを製造する会社として、大成建設株式会社、大栄環境株式会社、丸紅株式会社、サッポロビール株式会社、東京ボード工業株式会社の 5 社の出資で平成 16 年 3 月に設立された。プラントは、大阪府堺市の大阪エコタウン内に立地し、平成 17 年 8 月から建設工事を行った。

設備では、関西圏で排出される建設廃木材・パレット・剪定枝などの廃木材を年間 4~5 万トン集め原料とし、JASO（自動車技術会）規格に適合する燃料用エタノールを製造している。原料中のヘミセルロースから年間 1,400 kL の製造能力を有しており、将来の酵素法導入によるセルロースからのエタノール製造設備増強を考慮した計画としている。

主な工程は、前処理（破碎）、加水分解・糖液回収、中和、発酵、濃縮・蒸留・脱水、貯蔵・出荷、ボイラー発電、リグニンペレット製造、排水処理である。加水分解には希硫酸法が用いられ 150~170°C でヘミセルロースから糖が抽出される。残渣と分離された糖液は中和され発酵基質に用いられる。発酵では組換え大腸菌 K011 株によって C6 糖（ヘキソース）C5 糖（ペントース）いずれもエタノールに変換する。加水分解の残渣は燃料として用い、排水は処理後に系内で再利用するなど環境に配慮した設備となっている。

3. エタノール発酵性大腸菌組換え大腸菌

木質系バイオマスは主にセルロース、ヘミセルロース、リグニンからなり、セルロースとヘミセルロースの糖を発酵基質として利用する。酸や熱で比較的糖化されやすいヘミセルロースに含まれる C5 糖は通常の酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では発酵されないため、収率を高めるべく C5 糖も

利用できるアルコール発酵微生物の開発が各国で進められてきた。その中で、1980年代に米国フロリダ大学のイングラム博士と太田博士（現宮崎大学教授）らによってエタノール発酵性組換え大腸菌が開発された。元来 C5 糖の代謝能を持つ大腸菌に *Zymomonas mobilis* 由来のピルビン酸デカルボキシラーゼ (*pdc*) とアルコールデヒドロゲナーゼ (*adhB*) の 2 つの遺伝子を導入することにより解糖系を経て生成したピルビン酸がエタノールに変換される経路がつくられた。*Z. mobilis* 由来の PDC と ADH はピルビン酸に対する親和性が大腸菌本来の混合有機酸発酵の代謝酵素よりも高く、形質転換株は C6 糖 C5 糖のいずれからもエタノールを生産した。さらに、これらの遺伝子を染色体に導入して安定性を高めたうえ、ピルビン酸・ギ酸リアーゼを不活性化してエタノール生産力を増強された株が K011 株である¹⁾。その後、イングラム博士らによって様々な木質系バイオマスに適用できることが示され、K011 株は C5 糖変換微生物の候補の一つとして広く認知されている。

当社は、国内の豊富な資源である建設廃木材を酸で加水分解し大腸菌 K011 株によって発酵するプロセスの実用化開発を進めてきた。主な課題は、①建設廃木材に含まれる発酵阻害物質の影響評価 ②C6 糖、C5 糖共存系での C5 糖資化抑制の低減 ③安価な栄養源の探索 であつた。まず、①では、木質系バイオマスに由来する成分と建設廃木材に特有な接着剤、塗料などの成分について個々に発酵への影響を調査した。前者は、よく知られた過剰石灰処理 (overliming) によって発酵への影響は低減されたが、後者については、可溶化した阻害成分の除去は実用的でないと判断されたため、合板を一定割合以下にした廃木材を用いることによって影響を抑えることにした。②は、バガスやコーンストーバーのヘミセルロース加水分解液は C5 糖が 70-80%を占めるのに対し、針葉樹を主成分とする廃木材のそれは C6 糖が 70-80%、C5 糖が約 20-30%と C6 糖の比率が高く、C6 糖を優先的に資化する K011 株の C5 糖資化抑制が顕在化したという問題であつた。対策として酸素供給条件を最適な範囲に設定することで C5 糖の資化が改善された²⁾。③は、K011 株の栄養源として有効なコーンステープリカー (CSL) の国内価格が北米と比べて高くコストへの影響が大きいため、副栄養源としておからを利用することを試みた。各種前処理を試みた結果、酸で加熱処理したおからが有効であることを確認した。これらの結果を基に 1m³、15m³ 規模のスケールアップ試験を経て商業設備の建設に至つた。

謝辞

建設廃木材からのエタノール製造実証試験は新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 実用化開発助成事業 (平成 13~15 年度) において実施しました。

文献

- 1) Ohta et al.: Appl. Environ. Microbiol., 57, 893-900 (1991).
- 2) Okuda et al.: J. Biosci. Bioeng., 103, 350-357 (2007).

(S-2)

Yeast carbon neutral biotechnology

- 酸ストレス耐性酵母のゲノム育種工学 -

原島 俊 (大阪大学・生物工学国際交流センター、
大学院工学研究科・生命先端工学専攻)

1. はじめに

近年の地球温暖化問題によって化石燃料に依存した CO₂ 排出型社会から CO₂ 循環型 (カーボンニュートラル) 社会への転換が強く求められている。中でも発酵によって合成される植物由来の乳酸モノマーから製造されるポリ乳酸等のプラスチックは新たな CO₂ の排出を抑制できることから、その実現に大きく貢献できる材料として期待されている。しかし、その普及には生産コストの低減が不可欠である。ポリ乳酸の原料である乳酸は、これまで乳酸菌による発酵によって生産されてきたが、酵母は乳酸菌に比べて酸耐性であり、乳酸生産においてコストが掛かる培地の中和処理とその後の脱塩化工程を省略できる可能性を持つことから、非中和条件下での酵母を用いた乳酸生産が検討されている。しかし、酵母においても乳酸の蓄積による培地 pH の低下により生産収率の低下が認められており、今後の重要な課題である。

一方、石油代替燃料としてのバイオエタノールの生産も色々な意味で近年の話題である。バイオエタノール生産菌の中心的な微生物は酵母である。酵母によるエタノール発酵では、雑菌汚染の防止、冷却コストの低減、発酵日数の短縮等の面から酸耐性、高温耐性、エタノール耐性などの性質が重要である。しかし、こうした有用性質は遺伝的には、かなりの数の遺伝子によって支配されていることがわかっており、例えば、酵母の増殖上限温度をどのようにして上げることができるか、酸やエタノールに対する耐性を上昇させるにはどのような育種戦略を取ればよいのかなど課題は山積している。私達は、こうした問題を解決するため、ゲノムサイエンスを取り入れたアプローチを行っているが、本講演では、有用形質のうち、乳酸生産菌、バイオエタノール生産菌に共通に求められる酸ストレス耐性形質を持つ有用酵母の分子育種戦略について話題を提供したい。

2. 多コピーで乳酸耐性を付与する出芽酵母遺伝子のスクリーニング

既に、乳酸生産のために使用されている実用酵母株に、直接酸耐性を付与することを想定し、過剰発現で乳酸耐性を与える酵母遺伝子のスクリーニングを多コピーライブラリーを用いて行った。野生型株が生育できない 6% L-乳酸に対して耐性を与える遺伝子をスクリーニングした結果、*HAA1* と *ESBP6* 遺伝子を見出した。*HAA1* は、*SPI1*(GPI 型細胞壁タンパク)、*TPO2* (薬剤排出輸送体)、*YGP1* (細胞壁糖タンパク) など、少なくとも 10 個の遺伝子群を標的とする転写活性化因子である。*ESBP6* についてはモノカルボン酸輸送体様の膜タンパク質をコードするが、モノカルボン酸輸送活性は検出できないと報告されている。*haa1*、*esbp6* 破壊株は乳酸感受性を示すことから、この 2 つの遺伝子は乳酸耐性に重要な働きをしていることが想像される。また、*HAA1* 過剰発現株において、*HAA1* の 10 個の標的遺伝子を、それぞれ破壊したところ、*spi1* 破壊株および *tpo2* 破壊株で、乳酸耐性が低下し

た。従って、*HAA1* 過剰発現による乳酸への耐性化には、*SPI1*、*TP02* が重要な役割を果たしていることが示唆された。*HAA1* と *ESBP6* の過剰発現による乳酸への耐性化が、細胞内で乳酸の代謝が促進され細胞内乳酸濃度が低下することによるものか否かを、乳酸の代謝に必須な L-乳酸脱水素酵素をコードする *CYB2* を破壊した株を作成して調べた。その結果、*cyb2* 破壊株でも *HAA1* および *ESBP6* の過剰発現により乳酸耐性を示したことから、乳酸耐性は乳酸の代謝促進によるものではないことがわかった。次に、GFP 融合をした *Haa1* と *Esbp6p* を過剰発現させたところ、過剰発現時の *Esbp6p* は主に細胞周縁に局在することがわかった。また、*Haa1* は、興味深いことに、乳酸を添加すると5分以内に核に移行することがわかった。現在、*ESBP6* 過剰発現時における乳酸の排出活性の測定などの解析によって、*ESBP6* による乳酸耐性付与機構の解明を行なっている。

3) 破壊により乳酸耐性を付与する遺伝子の網羅的なスクリーニングと機能解析

酵母の分野では、約 5,000 株の非必須遺伝子破壊株ライブラリーが利用可能である。これを利用して、まず、乳酸への耐性化を阻害している細胞機能を同定するため、野生型株が生育できない 6.5% L-乳酸添加培地 (pH2.57) でも生育する破壊株のスクリーニングを行った。その結果、79 種の遺伝子の破壊株が耐性を示すことを見出した。これらの遺伝子は多様な細胞生理に関わっており、様々な機能が乳酸耐性に抑制的に働いていることが示唆されたが、その 43%が機能未知の遺伝子であることもわかった。

4) 破壊により乳酸感受性を引き起こす遺伝子の網羅的なスクリーニングと機能解析

破壊により L-乳酸感受性を引き起こす遺伝子の網羅的同定を行った。遺伝子破壊株ライブラリーから野生型株が生育遅延を起こさない 4%L-乳酸添加培地 (pH2.80) で感受性を示す破壊変異株を取得し、四分分子分析により 107 種の感受性破壊変異を同定した。破壊が感受性を引き起こす遺伝子と同様、多様な細胞生理に関わっている遺伝子が同定されたが、特に、液胞の形成と酸性化、細胞内輸送に関する変異が多く、乳酸耐性には液胞の酸性化が重要であると考えられた。現在、破壊変異株における液胞の形態と酸性化について FM4-64 とキナクリンを用いた蛍光染色法による解析を進めている。

5) おわりに、- バイオエタノール生産菌株分子育種への応用 -

既述のように、バイオエタノール生産菌として、高温や酸性条件下でも高いエタノール生産性を示す菌株が求められている。そうした性質を持つ菌株を育種するため、タイ王国バンコクで、41°C でも旺盛な増殖を示す高温耐性酵母を多数分離した。これらの菌株が、なぜ通常の酵母菌株が増殖できない 41°C で旺盛な増殖を示すかについての解析は進行中であるが、そのうちのひとつであるホモタリック二倍体株 (C3723) とタイ国科学技術研究所保存のエタノール高生産性株 TISTR5606 を交雑し、両者の能力を併せ持つ株を育種することができた。今回、過剰発現で酸耐性を付与できる *HAA1* と *ESBP6* 見いだしたので、今後は、これらの遺伝子をこの株に導入し、酸耐性、高温耐性、高エタノール生産性の3つの有用形質を併せ持つ今までに無い優良酵母菌株を育種したいと思っている。

酸に耐性の酵母でエタノール生産の研究をはじめた動機

久松 眞（三重大学大学院生物資源学研究所）

1. はじめた動機

1-1 バイオエタノールの研究は新規酵母の発見から

農芸化学コースから資源循環学科に活動する場が変わった平成 12 年の学部改組がきっかけとなって、食品廃棄物からバイオエタノールを生産する研究をはじめた。少し調べてみると、先行している研究の多くは醸造用酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の改良株を使用していた。極限に近い酸性条件下で生育する酵母の研究をしていたので、新規のエタノール発酵性酵母を発掘し何か新しい糖化技術を生み出せば独自の研究になる気がした。

1-2 食品廃棄物由来バイオマスに適した糖化方法

麺やパン、煎餅やケーキは、生デンプンに水、油脂、調味料を加えながら加熱しデンプンを糊化させながらつくる。製造中に生ずる半端ものや賞味期限が切れたものは廃棄処分となる。レストランやコンビニなどの残飯も加えれば廃棄物から約 100 万 KL のエタノールを作れると試算することはできる。この場合、いろいろな添加物を含むバイオマス資源を利用することになり、酵素よりも無機酸の糖化の方が有利と判断した。

1-3 硫酸で加水分解

塩酸は糖の過分解を引き起こしやすいので、糖研究者は加水分解に塩酸を使用することはほとんどない。また、濃塩酸は揮発性であり、加水分解中に調味料などと反応して発ガン性の高いトリハロメタンを生成する心配もある理由から硫酸を選択した。

1-4 新規酵母の酸耐性能力の範囲

多糖類の完全加水分解条件は、1 規定の酸で 100–120°C で数時間処理するのが一般的である。中でもデンプンは α グルカンのため比較的加水分解は容易な方である。醸造系の酵母を使用すれば加水分解に使用した硫酸は発酵前に中和や脱塩などの処理をする必要がある。しかし、バイオ燃料の開発には可能な限り生産コストを下げる技術も含まれる。そこで、加水分解後硫酸を除かないでエタノール発酵ができる酵母を探すことにした。群馬県の酸性温泉でサンプリングを行った結果、目的のエタノール生産性酵母は取得可能であることが分かった。最終的に、ベストらしいと判断した新規酵母 MF-121 は *Issatchenkia orientalis* と同定した。

2. 独自のバイオエタノール生産

2-1 *Issatchenkia orientalis* MF-121 の能力

様々な酸濃度と塩濃度の栄養培地 (YPD 培地) で、エタノール発酵能を醸造用酵母と比較した。この結果、2.5% や 5.0% の硫酸ソーダを含む pH2.0 の YPD 培地で醸造用酵母はエタノールを生産しないのに対し、MF-121 株はエタノールを生産することが確かめられた (表-1)。

2-2 木材チップの糖化

木材粉を少量の 72%硫酸に浸漬したのち 30 倍ほどの水を加えて約 1 規定に希釈し、沸騰水中で数時間処理する方法は、硬い多糖や水不溶性の多糖の構造研究で古くから使われてきた。そこで、市販の結晶セルロースを種々の濃度の硫酸溶液に浸漬する実験をしたところ、ある濃度から膨潤をはじめ、その後完全に溶解した。この現象を応用してヘミセルロース部分とセルロース部分を分ける技術を開発することができた。現在は硫酸と糖液を分ける研究を進めている。

3. 期待されるバイオエタノール生産とは

3-1 多様なバイオマスの選択

同じデンプンでも、生デンプン、糊化デンプン、老化デンプンがある。現在のコーンを利用したバイオエタノールは、原料が生デンプンであるため基本的にグルコース生産工場とほぼ同じ方法で酵素糖化したあとエタノール発酵を行っている。食料にも燃料にもどちらにも利用できる生デンプンを原料にしてバイオエタノールを生産することに社会は不安を感じ始めた。バイオ燃料の場合は、衣食住の原料は生活に余裕があるときのみ利用するだけにとどめ、生活に利用しない原料をバイオマス源にすることが可能な技術が生残れると思われる。

3-2 農工商の連携

未利用資源や廃棄物を利用すること、自前でエネルギーを生産することなどこれからの企業活動には環境対応も必要となってくる。「品質の高い安全な農産物を市場にだすと同時に市場に出なかった農産物はバイオ燃料などに利用する」ことや「森の環境保全のために間伐しバイオ燃料などに利用しながら品質の高い木材を育てる」ことを工と商が連携して行なえば、農の位置づけは高いものになり、農林水産業の分野が活気づくと考えられる。バイオ燃料の生産が堅実な生活基盤を作り出していくことの一翼を担えるようになることを期待したい。

表-1 酸塩耐性酵母 (*Issatchenkia orientaris*) MF-121 株と醸造用酵母の比較¹⁾

酵母	エタノール濃度 (%)											
	0% 硫酸ソーダ pH			1% 硫酸ソーダ pH			2.5% 硫酸ソーダ pH			5% 硫酸ソーダ pH		
	3.0	2.5	2.0	3.0	2.5	2.0	3.0	2.5	2.0	3.0	2.5	2.0
MF-121	7.4	8.4	7.1	9.3	9.5	9.1	9.2	8.6	8.5	8.5	8.8	5.2
焼酎	8.4	4.3	1.4	4.2	2.6	0.1	3.1	2.9	0	0.3	0.1	0
酒協会 3	8.6	1.5	0	4.1	0	0	1.6	0	0	0.2	0.1	0
酒協会 7	10.0	6.0	1.4	8.8	2.0	0	4.5	2.3	0	2.8	0.3	0
酒協会 9	8.8	4.1	0.4	6.5	2.6	0	4.4	2.2	0	2.1	0.2	0

1) M. Hisamatsu, T. Furubayashi, S. Karita, T. Mishima and N. Isono: Isolation and identification of a novel yeast fermenting ethanol under acidic conditions. J. Appl. Glycosci., **53**: 111-113 (2006).

(S-4)

リグノセルロース糖化並行発酵細菌のメタボリックエンジニアリング

築瀬 英司 (鳥取大学工学部生物応用工学科)

1. はじめに

エタノール発酵においては、伝統的な醸造菌である酵母の利用が主流である。しかし、酵母以外にもエタノールを生産する微生物は報告されており、木質系や草本系のリグノセルロース系バイオマスを発酵原料とするバイオエタノール製造への利用が注目されている。ザイモナス (*Zymomonas mobilis*) はメキシコの酒 (プルケ) の発酵菌として分離されたグラム陰性・通性嫌気性の細菌であり、グルコースからのエタノール収率は1.9モル以上であり、理論値の96~97%に達し、その発酵速度は酵母に比較して3~5倍優れている。また、ザイモバクター (*Zymobacter palmae*) は、1995年に沖縄の椰子の発酵樹液から単離された新規なグラム陰性のエタノール発酵性細菌であり、酵母と同程度のエタノール発酵性を持つ細菌として、新たに属を得、ATCCに登録されている。*Zb. palmae* は *Zm. mobilis* に比較して糖発酵スペクトルが広く、グルコース以外にも様々な糖を発酵することが可能である。しかしながら、自然界には木質系および草本系バイオマスから直接エタノールを生産する微生物は報告されておらず、廃材や稲藁を原料とするバイオエタノール生産コストの低減を達成するためには、発酵菌に対してセルロースやヘミセルロースの糖化並行発酵の付与が急務とされている。本発表では、優れたエタノール生産性を示す *Zm. mobilis* と *Zb. palmae* のリグノセルロース糖化並行発酵菌への育種の現状を紹介する。

2. C5・C6糖並行発酵

リグノセルロースの主要な構成糖であるグルコースに加え、ヘミセルロースに由来するキシロースやマンノースの並行発酵を付与することにより、エタノール回収率の増加が可能となる。*Zm. mobilis* と *Zb. palmae* はキシロースとマンノースの発酵性を示さない。そこで、キシロースからのエタノール生合成に必要とされる4種の酵素、すなわちキシロースイソメラーゼ (*xyIA*)、キシロキナーゼ (*xyIB*)、トランスアルドラーゼ (*tal*)、およびトランスケトララーゼ (*tktA*) の遺伝子群を大腸菌よりクローン化した後、両菌株に導入した。4種の酵素遺伝子を導入した *Zm. mobilis* や *Zb. palmae* では大腸菌内での発現に比較して高い酵素活性を示し、キシロース代謝系酵素遺伝子がこれら発酵菌内で効率よく発現することを明らかにした。これら *Zm. mobilis* と *Zb. palmae* の育種株はキシロースを炭素源として生育して発酵し、理論収率のエタノールを生産した。また、*Zb. palmae* と *Zm. mobilis* はマンノース発酵性を示さない。そこで、マンノースをエタノール生合成経路へと導入するために、*Zm. mobilis* 由来のフルクトキナーゼ (*frk*) と大腸菌由来マンノースリン酸イソメラーゼ (*manA*) をクローン化した後、両菌株に導入した。育種した *Zm. mobilis* と *Zb. palmae* は新たにマンノースを炭素源として生育して発酵し、理論収率のエタノールを生産した。これらエタノール発酵性細菌のキシロースやマンノースのエタノール発酵で特徴的なことは、キシリトールや

有機酸などの副産物を蓄積せず、理論収率のエタノールを生産することにある。さらに、*Zm. mobilis* の染色体 DNA にマンノース代謝酵素遺伝子を組み込み、キシロース代謝酵素系遺伝子群をプラスミドとして導入した育種株は、グルコースとともにキシロースとマンノースを発酵して理論収率のエタノールを生産することが可能になった。以上のように、木質あるいは稲藁の主要な構成糖である C5・C6 糖の並行発酵菌を育種することに成功し、従来の酵母菌によるエタノール収率に比較して約 40%の増加が可能になった。

3. セルロース糖化発酵

セルロースの酵素糖化には3種類のセルラーゼ（エンドグルカナーゼ：EG、セロビオヒドロラーゼ：CBH、 β -グルコシダーゼ：BGL）が必要とされている。現状の木質系バイオマスの前処理糖化行程には様々な方法（加圧熱水処理、亜臨界水処理、マイクロウエーブ処理、希硫酸処理、濃硫酸処理、アルカリ処理）が検討されているが、将来的には簡単な前処理と酵素糖化の組み合わせが最適とされている。そのためには、セルロースやヘミセルロースを糖化発酵可能な菌株の育種が課題となる。まず、木質系バイオマスの前処理糖化液に混在するとされるセルロース部分分解物であるセロオリゴ糖の糖化発酵性の付与を検討した。セロオリゴ糖の加水分解に働く BGL 遺伝子をルーメン細菌の染色体 DNA よりクローン化した後、*Zm. mobilis* と *Zb. palmae* に導入した。*Zm. mobilis* では、発現した BGL が細胞質内に局在してセロビオース発酵は微弱であったが、*Zm. mobilis* のユニークな分泌シグナルである TAT シグナルを連結したキメラ BGL 遺伝子を構築して導入することにより、セロビオース発酵性を改良することができ、セロビオースから理論収率のエタノール生産を可能にした。一方、BGL 遺伝子を導入した *Zb. palmae* では、発現した BGL の約 50%の活性は細胞膜を透過して分泌され、セロビオースを炭素源として利用して理論収率でのエタノールを生産した。次に、非晶化セルロース分解に働く EG 遺伝子の導入を検討した。クローン化した EG を導入した *Zm. mobilis* では、発現した EG の大部分は細胞質内に局在した。そこで、EG を *Zm. mobilis* 細胞表層で効率よく提示発現させるために、*Pseudomonas* 由来の表層提示タンパク質（氷核タンパク質：INA）遺伝子をクローン化した後、その分泌シグナルとアンカーリング領域をコードする N 末領域を EG に連結したキメラ酵素を構築して *Zm. mobilis* に導入した。その結果、*Zm. mobilis* で発現した EG は細胞外に分泌されるとともに、その一部は表層発現することにより *Zm. mobilis* にセルロース分解性を与えることができた。

4. 今後の課題

リグノセルロース糖化並行発酵菌を育種するためには、セルラーゼやキシラナーゼを効率よく細胞外あるいは細胞表層で発現させることが重要であり、発酵菌に独自の分泌系や表層提示系を開発する必要がある。さらに、リグノセルロース系バイオマスの糖化液中には、リグニンやヘミセルロースの分解に伴い蓄積し、発酵菌の生育や発酵速度を低下させる物質が含まれる場合が多く、これら阻害物質に対する耐性株の育種も重要と考えている。