

**発酵法による木質系バイオマスからの
高濃度燃料エタノール生産**

(研究課題番号 18580332)

**平成18年度～平成19年度科学研究費補助金
(基盤研究 (C)) 研究成果報告書**

平成20年6月

研究代表者 太田 一 良
宮崎大学農学部教授

は し が き

木質バイオマス資源に含まれるヘミセルロースは、植物の構造多糖としてセルロースに次いで大量に存在し、広葉樹やトウモロコシの芯、稲藁、バガス、パイナップルの芯などの農産廃棄物では、構成糖の30%を占める難分解性の未利用資源である。ヘミセルロースの主体をなすのがキシランであり、その構成糖は5炭糖キシロースである。通常のアルコール発酵酵母は、6炭糖（グルコースなど）は発酵できるが、5炭糖キシロースは利用できない。研究代表者らは20%の高濃度アルコールを生成する*Saccharomyces cerevisiae* No.1200を独自に保有する。一方で、キシランを含むバイオマスの加水分解は硫酸で行われており、その廃液処理が問題となる。研究代表者らは不完全菌の一種である

Aureobasidium pullulans ATCC 20524株がキシランを効率よく分解する好酸性（至適pH2.0）と高熱性の2種のキシラナーゼを大量に分泌することを発見した。このキシラナーゼは、キシラン内部の結合を切断し、キシロオリゴ糖を生成する。研究分担者（林幸男）は、同菌株の菌体内からキシロオリゴ糖の非還元末端からキシロース単位でエキソ型に分解する酵素β-キシロシダーゼを精製し、同様に好酸性であることを明かにした。研究分担者（廣瀬遵）は、放線菌由来の高活性キシロース・イソメラーゼ遺伝子をクローニングしており、またリグニン分解活性を持つラッカーゼを担子菌や*Bacillus*属細菌が生産することを見出した。本研究では、このような宮崎大学農学部と工学部の連携により、*A. pullulans* ATCC 20524株由来のキシラナーゼとβ-キシロシダーゼ、放線菌由来のキシロース・イソメラーゼによるバイオマス、特にキシランからの燃料エタノール生産を目的としたキシラン分解性遺伝子組換え酵母の開発することにより、アルコール耐性に優れた*Saccharomyces* 酵母と5炭糖も発酵できるエタノール発酵性

大腸菌との併用による効率的エタノール発酵システムを構築することを目的とした。

これまでの研究成果を踏まえて、本研究では、次の研究成果を得た。

1) *Penicillium citrinum*の産生する糖質加水分解酵素ファミリー10キシラナーゼの精製と遺伝子クローニング

研究代表者らはすでに、*P. citrinum*は、糖質加水分解酵素ファミリー11に属する分子量20 kDaのキシラナーゼXynAを産生することを報告した。本研究では、*P. citrinum*が産生するXynAとは異なるキシラナーゼXynBの酵素学的諸性質およびそのコードする遺伝子の解明、およびメタノール資化製酵母*Pichia pastoris*による発現系の構築を行った。カンバ材由来キシランを唯一の炭素源とした液体培地で*P. citrinum*を30℃、3日間回転振とう培養した。培養液上清より各種クロマトグラフィーを用いて、分子量31.6 kDaのXynBを電気泳動的に単一に精製した。酵素活性の最適pHおよび温度は、それぞれ6.0および50℃であった。pH安定性は3.0~10.0、温度安定性は40℃まで認められた。また、XynBはキシロビオースには作用せず、それ以上の重合度を持つものに作用したことからエンド-1,4-β-キシラナーゼであることがわかった。遺伝子クローニングの結果、*xynB*のORFは、9箇所のイントロンを含む、アミノ酸25残基からなるプレプロ分泌シグナルと302残基からなる推定分子量32,637 Daの成熟酵素をコードした。XynBの推定アミノ酸配列は、*Penicillium simplicissimum*由来のキシラナーゼXynA (90%)と高い相同性を示し、糖質加水分解酵素ファミリー10に属する事を明らかにした。メタノール資化性酵母*Pichia pastoris*の染色体上に*xynB*遺伝子を導入した結果、形質転換体の5日間培養後の培養上清より、5.74 U/mlのキシラナーゼ活性を検出した。

2) *Aspergillus japonicus*が産生する β -キシロシダーゼXylAの酵素学的諸性質およびそのコードする遺伝子の解明

カラス麦製キシランを炭素源とした*A. japonicus* の培養上清より、各種クロマトグラフィーを用いて分子量113 kDaのXylAを電気泳動的に単一に精製した。N-グリコシダーゼ F処理により、その分子量は、82.0 kDaに低下した。遺伝子クローニングの結果、*xylA*のORFは、イントロンを含まない2412 bpから成り、17アミノ酸残基の分泌シグナルと787アミノ酸残基の成熟酵素 (推定分子量 84,637 Da)をコードした。XylAには17箇所のN型糖鎖付加のためのコンセンサス配列、5' 非コード領域には、5箇所のカタボライト抑制因子CreA結合可能部位や2箇所の転写誘導因子XlnR結合可能部位が存在した。XylAは*Aspergillus fumigatus*由来の β -キシロシダーゼと最も高い相同性 (69%) を示し、糖質加水分解酵素ファミリー3に属することが分かった。メタノール資化性酵母*Pichia pastoris*の染色体上に*xylA*遺伝子を導入した結果、形質転換体の5日間培養後の培養上清に0.333 U/mlの β -キシロシダーゼ活性を検出した。

3) *Aspergillus japonicus* が産生する糖質加水分解酵素ファミリー11キシラナーゼの精製と遺伝子クローニング

カラス麦製キシランを炭素源として*A. japonicus*を培養し、培養上清から、硫酸塩析、各種クロマトグラフィーを用いてキシラナーゼを電気泳動的に単一に精製した。SDS-PAGEにより、精製酵素の分子量は25.1 kDaであった。精製酵素のN末端およびV8プロテアーゼ消化ペプチド断片のアミノ酸配列を決定した結果、それらの配列は糸状菌由来の糖質加水分解酵素ファミリー11 (GH 11)のキシラナーゼと高い相同性を示した。内部アミノ酸配列およびGH 11のコンセンサス配列を基にして縮重プライマーを設計し、染色体DNAを鋳型としてPCRを行っ

た。DIG標識した約200 bpの増幅断片をプローブとして、サザン・ハイブリダイゼーションを行った結果、本酵素をコードする遺伝子は、*A. japonicus*の染色体上に1コピー存在する事が示唆された。染色体DNAからクローニングした4.5 kbpの*Xba*I断片を用いて、本酵素の完全長ORFと周辺の塩基配列を決定した。

研究組織

研究代表者 太田一良 (宮崎大学農学部教授)
研究分担者 林幸男 (宮崎大学工学部教授)
研究分担者 廣瀬遵 (宮崎大学工学部准教授)

交付決定額 (配分額)	(金額単位：千円)		
年度	直接経費	間接経費	合計
平成18年度	2,600	0	2,600
平成19年度	900	270	1,170
計	3,500	270	3,770

研究発表

(1) 研究論文

- 1) Wakiyama, M., Tanaka, H., Yoshihara, K., Hayashi, S., and Ohta, K.:
Purification and properties of family-10 endo-1,4- β -xylanase from *Penicillium citrinum* and structural organization of encoding gene.
Journal of Bioscience and Bioengineering, 81 (6), 564-569 (2008).
- 2) Wakiyama, M., Tanaka, H., Yoshihara, K., Hayashi, S., and Ohta, K.:
Purification and properties of an extracellular β -xylosidase from *Aspergillus japonicus* and Sequence Analysis of the Encoding Gene.
Journal of Bioscience and Bioengineering, 掲載予定(2008).

(2) 学会発表

- 1) 山川大輔、田中秀典、中西彬文、太田一良、*Aureobasidium pullulans* 由来キシラナーゼに存在するシグナル・ペプチドの大腸菌における分泌能、平成18年度日本農芸化学会西日本支部および日本栄養・食糧学会九州沖縄支部合同大会、平成18年9月30日、佐賀大学
- 2) 浜砂裕則、山川大輔、太田一良、エタノール発酵性遺伝子組換え大腸菌KO11株のエタノール耐性の評価、第13回 日本生物工学会九州支部大会、平成18年12月9日、鹿児島大学工学部
- 3) 脇山元気、太田一良、宮武宗利、林幸男、*Penicillium citrinum* MU-4株由来GHファミリー10キシラナーゼ遺伝子のクローニング、日本農芸化学会2007年度大会、平成19年3月25日、東京農業大学
- 4) 吉原浩司、脇山元気、太田一良、林幸男、*Aspergillus japonicus* 由来 β -キシロシダーゼの酵素特性、第44回 化学関連支部合同九州大会、平成19年7

月7日、北九州国際会議場、北九州市小倉区

- 5) 脇山元気、吉原浩司、太田一良、林 幸男、糸状菌由来のキシラン分解酵素に関する研究、第44回 化学関連支部合同九州大会、平成19年7月7日、北九州国際会議場、北九州市小倉区
- 6) 脇山元気、吉原浩司、佐藤香織、太田一良、林 幸男、糸状菌*Aspergillus japonicus*が生産する糖質加水分解酵素ファミリー11キシラナーゼの精製と遺伝子クローニング、日本農芸化学会 2007年度 中四国・西日本支部合同大会、平成19年9月15日、山口大学吉田キャンパス
- 7) 吉原浩司、脇山元気、太田一良、林 幸男、糸状菌*Aspergillus japonicus*が生産する β -キシロシダーゼの精製と遺伝子クローニング、第59回 日本生物工学会大会、平成19年9月27日、広島大学東広島キャンパス
- 8) 吉原浩司、脇山元気、林 幸男、太田一良、*Aspergillus japonicus*が生産する細胞外 β -キシロシダーゼをコードする遺伝子の構造解析、第7回 糸状菌分子生物コンファレンス、平成19年11月15日、東京大学弥生講堂
- 9) 脇山元気、吉原浩司、太田一良、林 幸男、*Aspergillus japonicus*には2種類の糖質加水分解酵素ファミリー11キシラナーゼが存在する、第7回 糸状菌分子生物コンファレンス、平成19年11月15日、東京大学弥生講堂
- 10) 藤本仁寿、浜砂裕則、太田一良、*Aureobasidium pullulans*に由来するキシラナーゼ分泌シグナルの大腸菌における認識部位と分泌能、第14回 日本生物工学会九州支部長崎大会、平成19年12月1日、長崎大学文教キャンパス
- 11) 脇山元気、吉原浩司、太田一良、林 幸男、*Aspergillus japonicus*に由来する2種類の糖質加水分解酵素ファミリー11キシラナーゼ遺伝子のクローニング、日本農芸化学会2008年度大会、平成20年3月27日、名城大学天白キャンパス（名古屋）

(3) 図書

太田一良（分担執筆）：バイオプロセスハンドブック 5編3章3「アルコール発酵遺伝子組換え大腸菌を用いた燃料エタノールの生産」（株式会社エヌ・ティー・エス）、588-592 (2007).