



リグノセルロース系バイオマスの糖化に関する酵素
化学的研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2020-06-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 太田, 一良 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10458/5717

リグノセルロース系バイオマスの糖化に関する酵素化学的研究

(宮崎大学農学部) 太田一良

【はじめに】

木質系材料 (木材など)、草本類 (稲わら、スイッチグラスなど) を含むリグノセルロース系バイオマスは自然界に最も多く存在する多糖資源の 1 つであり、短期間で再生可能である。そのため、バイオ燃料 (エタノール、アセトン、ブタノール) や化成品の生産のための原料として期待されており、その有効活用のための技術開発が進められている。植物細胞壁中のリグノセルロースはおおよそ、50%セルロース、30%ヘミセルロース、20%リグニンから構成されている (図 1)。これらの内ヘミセルロースは、ヘキソース (グルコース、ガラクトース、マンノース)、ペントース (キシロース、アラビノース) および糖酸 (グルクロン酸、ガラクトン酸) などからなるヘテロ多糖であり、その主成分はキシランである。

キシランは β -D-キシロースが β -1,4 結合した主鎖を持ち、キシロースの C-2 への 4-O-メチル- α -D-グルクロン酸、C-2 と C-3 へのアセチル基の修飾が見られる。また草本類のキシランは特にアラビノキシランと呼ばれ、 α -L-アラビノフラノースの C-2 がキシロースの C-3 へ結合した構造が多く存在する。さらに α -L-アラビノフラノースの C-5 へのフェルラ酸や *p*-クマロ酸の修飾が見られる。また、フェルロイル残基がその他のフェルロイル残基やリグニンのヒドロキシ基と結合する。これらの構成糖の比率は植物の種類によって異なり、稲わらのアラビノキシランでは、46%キシロース、45%アラビノース、6.1%ガラクトース、1.9%グルコース、1.1%ウロン酸、麦わらのアラビノキシランでは、66%キシロース、34%アラビノース、0.1%マンノース、0.1%ガラクトース、0.3%グルコース、トウモロコシ外皮繊維のアラビノキシランでは、48-54%キシロース、33-35%アラビノース、5-11%ガラクトース、3-6%グルクロン酸である。ヘテロキシランはフェルロイル酸などのフェノール性化合物による架橋によって、セルロースのマイクロフィブリルと結合している。また細胞壁中のタンパク質と架橋することによって、不溶性のネットワークを構築している。

リグノセルロース系バイオマスの利用には、構成する高分子を微生物が利用可能な低分子まで分解する必要がある。上述のような複雑な構造を持つヘテロキシランを加水分解するには、複数の分解酵素の作用が必要となる。そのキシラン分解酵素には、主鎖切断酵素としてキシラン内部の β -1,4-キシロピラノシド結合をランダムに加水分解するエンド-1,4- β -キシラナーゼ (EC 3.2.1.8) と、キシロビオース、キシロトリオースなどのキシロオリゴ糖に作用し、その非還元末端からキシロース単位で遊離するキシラン-1,4- β -キシロシダーゼ (EC 3.2.1.37) がある。側鎖切断酵素には α -グルクロニダーゼ (EC 3.2.1.139)、 α -L-アラビノフラノシダーゼ (EC 3.2.1.55)、アセチルキシランエステラーゼ (EC 3.1.1.72)、フェルロイル酸エステラーゼ (E.C. 3.1.1.73)、*p*-クマロイル酸エステラーゼ (E.C. 3.1.1.-) が存在している。

本研究では、これまで真菌 *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524 株のキシラン分解酵素系について 2 種類のエンドキシラナーゼ (XynI, XynII) 及び 1 種類の β -キシロシダーゼ (XylI) について酵素化学的諸性質と遺伝子構造が明らかにし、糖質加水分解酵素ファミリー (Glycoside hydrolase family; GH family) の分類で XynI は GH family 11 に、XynII は GH family 10 に、 β -キシロシダーゼ (XylI) は family 3 に属することを報告した。昨年度、キシラン側鎖の α -L-アラビノフラノースを切断する酵素 α -L-アラビノフラノシダーゼ遺伝子と同菌株からクローニングし、その構造を解析した。さらに、 α -L-アラビノフラノシダーゼの酵母による異種発現系を構築した。

本年度は、その組み換え酵素を精製し、酵素化学的性質を明らかにした。また、ホモロジー検索で *A. pullulans* ATCC 20524 株のゲノム DNA 上で α -L-アラビノフラノシダーゼ遺伝子の下流に P450 安息香酸-4-水酸化酵素遺伝子が隣接することを発見した。これまで *A. pullulans* の安息香酸-4-水酸化酵素を含むシトクロム P450 酵素についての報告は無い。そ

ここで、その安息香酸-4-水酸化酵素遺伝子についても解析し、キシラン分解過程における機能についても考察した。

Lignocellulose and xylanolytic enzymes

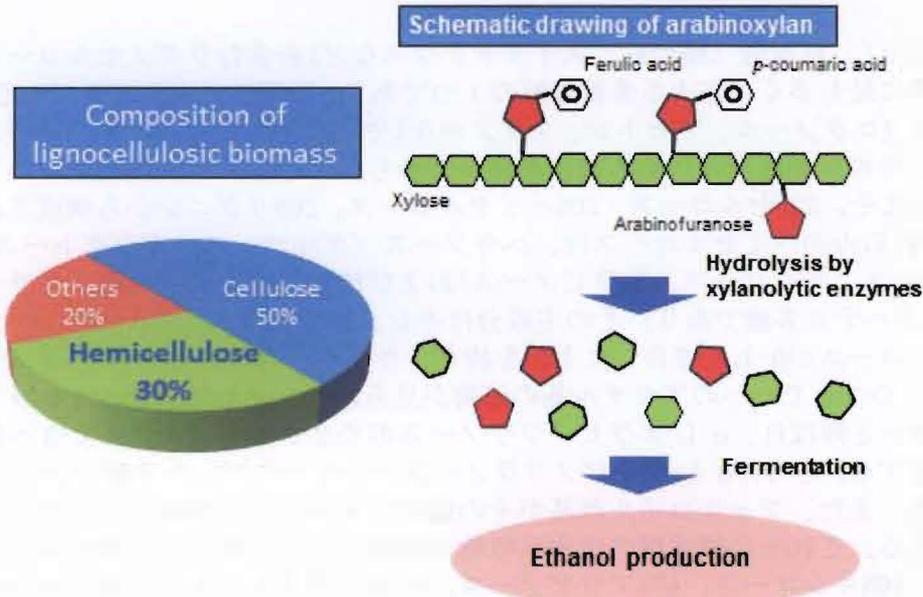


図 1. リグノセルロース系バイオマスの組成とキシラン分解系を構成する酵素群

【研究成果】

1. *A. pullulans* ATCC 20524 株の組換え α -L-アラビノフラノシダーゼの精製と性質

昨年度、酵母 *P. pastoris* を用いた α -L-アラビノフラノシダーゼ異種発現系を構築した。まず作製した形質転換体 *P. pastoris* GS115 (pABF115) を 30℃ で 5 日間、液体培養した。液体培養のろ液から、菌体外に分泌された α -L-アラビノフラノシダーゼをゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。ゲル濾過クロマトグラフィー後の各フラクションにおいて、UV 検出によるタンパク質のピークと α -L-アラビノフラノシダーゼ活性のピークの重なるフラクション 12, 13 を精製酵素として回収した (図 2)。

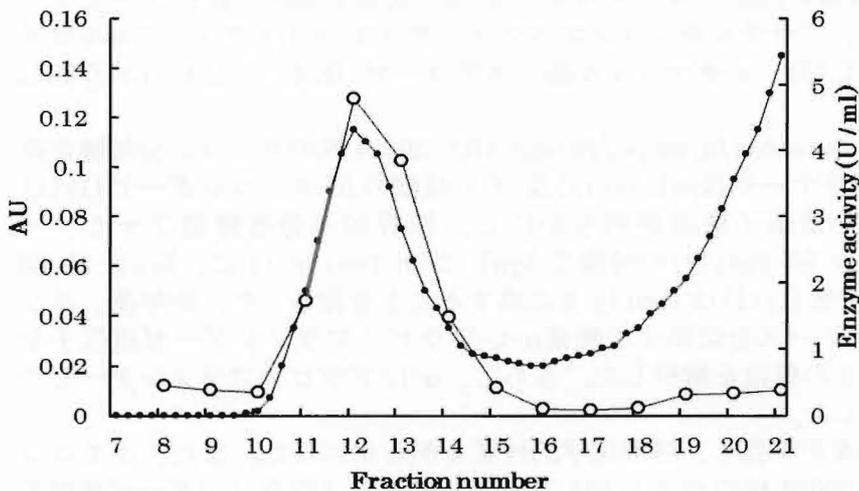
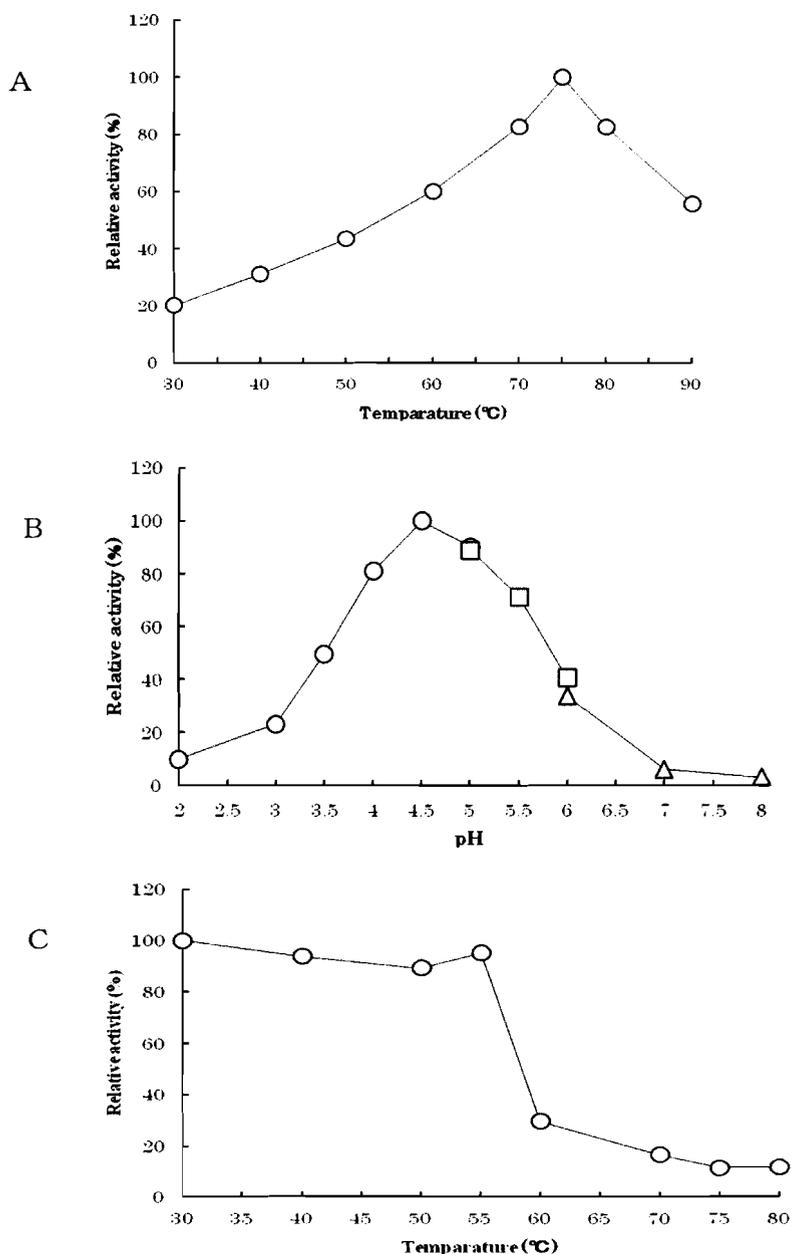


図 2. Sephacryl S-200 HR カラムクロマトグラフィーによる α -L-アラビノフラノシダーゼの溶出パターン シンボル ○、活性；●、タンパク質

表 1. α -L-アラビノフラノシダーゼの精製のまとめ

精製段階	総活性 (U)	総タンパク質量 (mg)	比活性 (U/mg)	回収率 (%)	精製度 (fold)
培養上清	1373	947.6	1.449	100.0	1.000
ゲルろ過	263.3	4.651	56.60	19.17	39.05

次に、精製酵素について活性の最適温度、最適 pH、温度安定性、pH 安定性の測定を行った (図 3)。 α -L-アラビノフラノシダーゼの活性の最適温度は 75°C、最適 pH は 4.5 であった。温度安定性は 55°C 以下では 80%以上あり、60°C 以上で急激に低下した。pH 安定性は pH 4 から pH 9 まで 80%以上あり、pH 10 以上で急激に低下した。本酵素は、既報の他の菌株由来の同酵素に比べて、最適温度が 75°C と高いことが特徴であり、産業上好ましい。



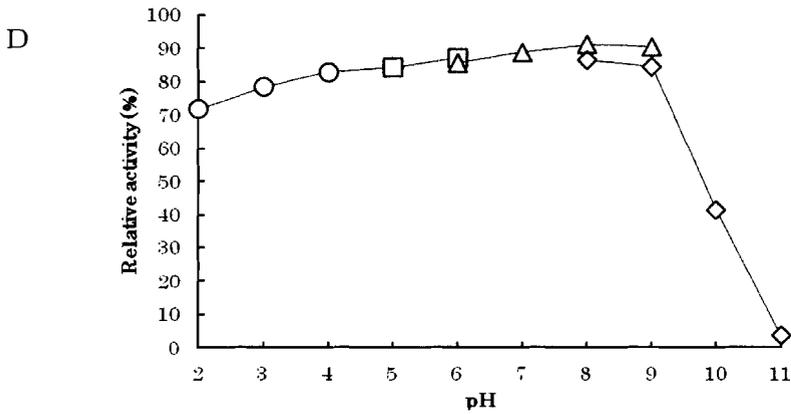


図 3. α -L-アラビノフラノシダーゼ活性に及ぼ温度と pH の影響

2. *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524 株由来安息香酸-4-水酸化酵素遺伝子の解析

昨年度、*A. pullulans* ATCC 20524 株のゲノムから α -L-アラビノフラノシダーゼ遺伝子を含む約 5 kbp の DNA 断片をクローニングした。この DNA 断片の塩基配列をホモロジー検索すると、 α -L-アラビノフラノシダーゼ遺伝子の下流に新たに安息香酸-4-水酸化酵素遺伝子と推測される配列を見出した (図 4)。この安息香酸-4-水酸化酵素遺伝子は α -L-アラビノフラノシダーゼ遺伝子と近接しており、 α -L-アラビノフラノシダーゼと共にキシランの分解に何らかの役割を有することが推測された。緒論にも示したようにキシラン主鎖には α -L-アラビノフラノースが結合しており、そこにさらにフェルラ酸や *p*-クマル酸が結合している。フェルラ酸と *p*-クマル酸は芳香環を有するため、本酵素はこれらに作用することが推測される。本研究では、まず RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法により安息香酸-4-水酸化酵素遺伝子の全 ORF を同定した。

2-1 安息香酸-4-水酸化酵素をコードする遺伝子の構造解析

A. pullulans ATCC 20524 株由来の安息香酸-4-水酸化酵素遺伝子 *bphA* は α -L-アラビノフラノシダーゼ遺伝子の下流 554 bp という非常に近い位置に存在した。本 *bphA* 遺伝子は ORF が 1,512 bp であり、1つのイントロン (54 bp) が介在していた。このイントロン領域の両端は GU/AG の法則に合致するが、特徴としてそのイントロンが本遺伝子の 3'側に存在する。子嚢菌に属する *Aspergillus niger* の CYP53A1、*Aspergillus nidulans* の CYP53A3、*Cochliobolus lunatus* の CYP53A15 はいずれも 1つのイントロンを有するが、このイントロン位置は保存されていない。一方、担子菌酵母 *Rhodotorula minuta* の CYP53B1 にはイントロンが 7つ、木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* の CYP53C2 にはイントロンが 5つ存在し、いずれも担子菌に属する。

本遺伝子から推定される酵素 BphA は 504 アミノ酸残基の酵素領域 (推定分子量 56,729 Da) から構成され、推定 pH は 7.33 であった。また、N 末端の 7-29 アミノ酸残基に transmembrane helices が存在した。*A. nidulans* 由来の BzuA と同様に *A. niger* 由来の BphA は細胞質へ突出した酵素ドメインを持つことから、小胞体に固着することから、本酵素も小胞体膜に結合していることが考えられる。444-453 アミノ酸残基には cytochrome P450 cysteine heme-iron ligand signature が存在した。cytochrome P450 cysteine heme-iron ligand signature を有することから、本酵素は P450 superfamily の CYP53A subfamily に属するとされ CYP53A37 と命名された。既報の *C. lunatus* の CYP53A15 は 3D 分子モデルにより、芳香族基質の特異性に関わると推測されるフェニルアラニンの位置が同定された。この酵素とアライメントした結果、本酵素の 113 番目と 487 番目のフェニルアラニンが芳香族基質の特異性に関与することが考えられる。

図 5. P450 スーパーファミリーに属する CYP53 ファミリーのメンバーのアラインメント

略号 CYP53A37, *A. pullulans* BphA; CYP53A15, filamentous fungus *Cochliobolus lunatus* Bph; CYP53A1, *A. niger* BphA; CYP53A3, *A. nidulans* BzuA; CYP53C2, the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* PcCYP1f; CYP53B1, the basidiomycete yeast *Rhodotorula minuta* P450rm.

BLAST 検索によって *A. pullulans* ATCC 20524 由来の安息香酸-4-水酸化酵素のアミノ酸配列と他菌株由来の安息香酸-4-水酸化酵素のアミノ酸配列との相同性を調査した(図 4)。その結果、*C. lunatus* の Bph (CYP53A15) と 74%、*A. niger* の BphA (CYP53A1) と 65%、*A. nidulans* の BzuA (CYP53A3) と 65%、*R. minuta* の P450rm (CYP53B1) と 52%、*P. chrysosporium* の PcCYP1f (CYP53C2) と 51% の相同性を示した(図 5)。

A. pullulans ATCC 20524 株由来の安息香酸-4-水酸化酵素はシトクロム P450 に属する。シトクロム P450 に属する酵素は数多く存在しているが *A. pullulans* での報告が無く、本酵素が *A. pullulans* で初めてのシトクロム P450 となる。しかしながら、シトクロム P450 は詳細な機能が未解明なものも多く、本酵素についても詳細な機能や存在意義が不明である。キシランの側鎖 α -L-アラビノフラノース残基にエステル結合している芳香族化合物のフェルラ酸、*p*-クマル酸に関与していると考えている。既に黒麹菌 *Aspergillus niger* の安息香酸-4-水酸化酵素が安息香酸の *p*-ヒドロキシル化や 3-メトキシ安息香酸の *O*-脱メチル化を触媒することが報告されている。さらに、*Agrobacterium tumefaciens* はシトクロム P450 ファミリーに似たタンパク質である VirH2 を持つ。VirH2 は *O*-脱メチル化反応により、有毒性の強いフェルラ酸をフェルラ酸より有毒性の低いカフェイン酸に変化させることが報告されている。キシラン分解に関与する α -L-アラビノフラノシダーゼ遺伝子に隣接していることも踏まえると、キシラン分解過程で遊離したフェルラ酸や *p*-クマル酸を水酸化して水溶性を強めることで体外に排出しやすくすること、フェルラ酸を *O*-脱メチル化してカフェイン酸に変化させて毒性を弱めることなどが推察される。

2-2. 遺伝子発現の誘導

α -L-アラビノフラノシダーゼ遺伝子の終止コドンから安息香酸-4-水酸化酵素遺伝子の開始コドンまでは 554 bp と短い(図 4 参照)。この安息香酸-4-水酸化酵素遺伝子の上流領域 554 bp にはカーボン・カタボライト抑制に関わる転写因子 CreA の結合可能部位が 5 ヶ所、pH 応答性転写因子 PacC の結合可能部位が 1 ヶ所見出された。カーボン・カタボライト抑制とは、代謝が容易な炭素源が存在すると、他の炭素源を代謝する酵素の合成が抑制されることである。強い抑制を引き起こすものとしては、グルコースの他にキシロース、スクロース、酢酸が挙げられる。CreA はアミノ酸末端側に Cys 2 His 2 型の 2 つの zinc finger を持つ DNA 結合タンパク質であり、プロモーター上の SYGGRG 配列に結合して転写を抑制する。この CreA の結合の影響を調べるために *A. pullulans* ATCC 20524 株を炭素源としてキシランまたはグルコースを加えた培地で培養し、その後、RT-PCR により安息香酸-4-水酸化酵素遺伝子の発現レベルを比較することで転写因子の影響を調べた(図 6)。その結果、キシランを炭素源として培養した *A. pullulans* ATCC 20524 株の方が、グルコースを炭素源としたものより *bphA* 遺伝子の発現量が高かった。ポジティブ・コントロールとして 18S rRNA 遺伝子の発現量を併せて示す。これにより、安息香酸-4-水酸化酵素遺伝子において CreA が結合し、カーボン・カタボライト抑制が起こっているもの推察される。

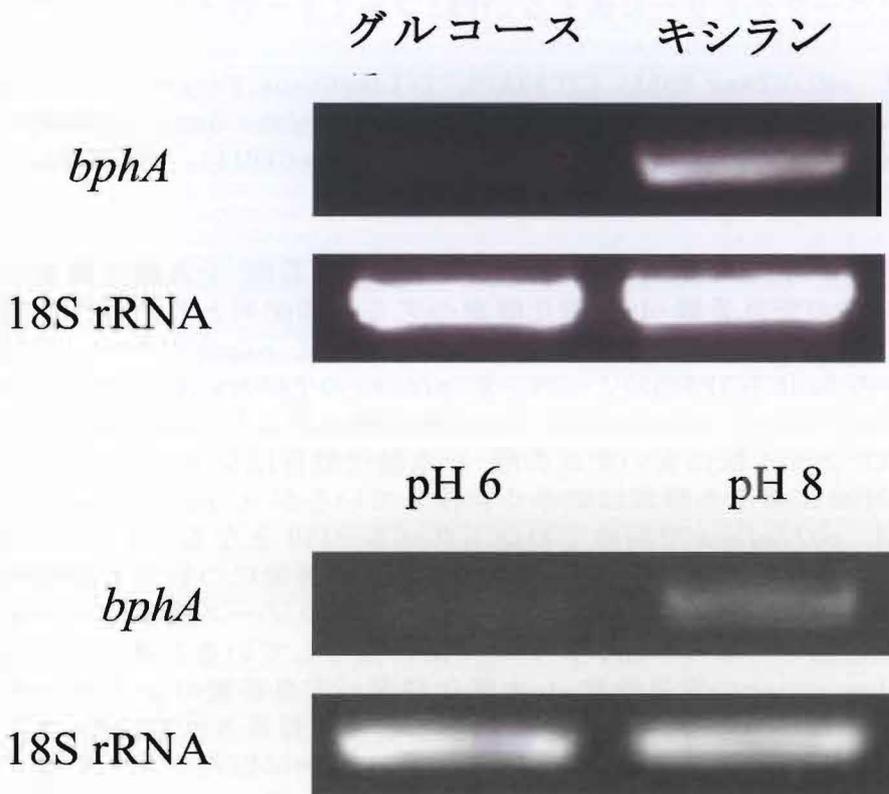


図6. RT-PCRによる *A. pullulans* ATCC 20524 の安息香酸-4-水酸化酵素遺伝子 *bphA* の発現量の比較

また、pH 応答性転写因子の PacC はアミノ酸末端側に Cys 2 His 2 型の 2 つの zinc finger を持つ DNA 結合タンパク質であり、GCCARG をコンセンサスとするプロモーター上の配列に結合する。PacC は酸性環境下では全長を有しているが、アルカリ環境下においてはカルボキシ末端約 400 アミノ酸が切断された形で存在する。カルボキシ末端を 100-400 アミノ酸欠失した全ての変異 PacC が構成的転写活性化を示すことから、PacC はアルカリ環境下において特異的プロテアーゼにより切断され、活性化に変化すると考えられている。本実験では、*A. pullulans* ATCC 20524 株を pH 6 または pH 8 の培地で培養し、その後 RNA 抽出と半定量 RT-PCR を行った。また、pH 8 のアルカリ環境下で培養した方が、pH 6 の酸性環境下で培養したものより *bphA* 遺伝子の発現量が高かったことから PacC も機能していることが考えられる。

【研究計画に照らした達成状況】

本年度の研究では、*A. pullulans* ATCC 20524 株のゲノム上で α -L-アラビノフラノシダーゼ遺伝子と P 4 5 0 酵素である安息香酸-4-水酸化酵素遺伝子が近接していることを明らかにした。今回発見した安息香酸-4-水酸化酵素遺伝子は *A. pullulans* では初めての P 4 5 0 酵素である。安息香酸-4-水酸化酵素については、発現系の構築と詳細な機能解析が必要である。

【今後の展望】

A. pullulans ATCC 20524 株のキシラン分解系酵素については、その他にも α -L-アラビノフラノノースとフェルラ酸や *p*-クマル酸のエステル結合を加水分解するフェルロイル酸エステラーゼや *p*-クマロイル酸エステラーゼ、キシランに側鎖として結合するグルクロン酸を加水分解する α -グルクロニダーゼ等のキシラン分解に関わる酵素の存在が推測される。

今回、キシラン分解に関わると推定される α -L-アラビノフラノシダーゼ遺伝子と安息香酸-4-水酸化酵素遺伝子がクラスターを形成していたことから、その他のキシラン分解に関わる酵素遺伝子も α -L-アラビノフラノシダーゼ遺伝子の上流または安息香酸-4-水酸化酵素遺伝子の下流にクラスターとして存在している可能性がある。

【研究協力者】

修士2年：東田 知洋、修士1年：池原 愛美、岡部 遼、坂本 麻衣子

学部4年：大菌 なつき、河野 エリ、木崎原 篤史、白地 智広、日高 智裕

【発表論文】

- (1) M. Yasuda, K. Takeo, H. Nagai, T. Uto, T. Yui, T. Matsumoto, Y. Ishii, and K. Ohta, Enhancement of ethanol production from Napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumach) by a low-moisture anhydrous ammonia pretreatment, *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, 3, 179–185 (2013).
- (2) K. Ohta, S. Fujii, and C. Higashida, Characterization of a glycoside hydrolase family-51 α -L-arabinofuranosidase gene from *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524 and its encoded product, *J. Biosci. Bioeng.*, 116, 287–292 (2013).
- (3) K. Ohta, C. Higashida, and R. Okabe, Molecular characterization of the cytochrome P450 benzoate para-hydroxylase gene in *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524, *J. Biosci. Bioeng.* (投稿予定)

【口頭発表】

- (1) Kazuyoshi Ohta, Shinya Fujii, and Chihiro Higashida, "Characterization of a glycoside hydrolase family-51 α -L-arabinofuranosidase gene from *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524 and its encoded product", 35th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, April 29–May 2, 2013, Hilton Portland Hotel, Portland, OR, USA.
- (2) 太田一良、田中秀典、今石あずさ、「麹菌の存在によりエタノール耐性が増強した酵母の遺伝子群の網羅的発現解析」、平成25年度第65回日本生物工学会大会、平成25年9月19日、広島市国際国際会議場
- (3) 東田 知洋、太田 一良、「*Aureobasidium pullulans* に由来する 安息香酸-4-ヒドロキシラーゼ遺伝子の解析」、第13回糸状菌分子生物学コンファレンス、平成25年11月21日、文部科学省研究交流センター、つくば市
- (4) 東田 知洋、岡部 遼、太田一良、「*Aureobasidium pullulans* 由来の 安息香酸-4-ヒドロキシラーゼ遺伝子は α -L-アラビノフラノシダーゼ遺伝子の下流に存在する」、第20回日本生物工学会九州支部佐賀大会、平成25年12月7日、佐賀大学農学部
- (5) Kazuyoshi Ohta, Chihiro Higashida, and Ryo Okabe, "Molecular characterization of the cytochrome P450 benzoate para-hydroxylase gene in *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524", 12th European Conference on Fungal Genetics, March 23–27, 2014, Seville, Spain

【5年間の総括】

概要

1. 大腸菌 K011 の改変

遺伝子組み換え *E. coli* である K011 株のグルコース取り込みタンパク質である PtsG をコードする遺伝子 *ptsG* 遺伝子を破壊した株 K011 Δ P を新たに作製したところ、グルコースの取り込みが抑制され、キシロース消費の速度が親株 K011 の約 3.5 倍に増加した。エタノール発酵試験により、K011 Δ P 株は 8 日目に培地中に残存するキシロース濃度は 4.0% から 0.4% まで低下しており、キシロースからのエタノールの対糖収率が約 92% に達した。

K011 株からキシロース代謝関連遺伝子の構成的かつ高発現が可能な大腸菌株を作出することができた。また、*A. pullulans* 由来の α -L-アラビノフラノシダーゼ遺伝子をクローニン

グシ、その cDNA を酵母 *P. pastoris* で発現し、分泌させた。さらに、*TPS1* 及び *TPS2* 遺伝子を *Saccharomyces* 酵母で発現させることで、より高濃度のエタノール生産が可能であることを明らかにした。

キシロース・イソメラーゼ添加発酵試験では、キシロース・イソメラーゼによりグルコースがグルコースとフルクトースへ、キシロースがキシロースとキシルロースへ可逆的に変換されるため、利用できる糖の数が増し有効であると考えられる。その結果、 ΔP 株において、グルコースとキシロースを多く消費させることができ、エタノール生産速度が上昇した。このことから、キシロース・イソメラーゼによって効率的に培地中の糖を利用できることが示唆された。

2. 大腸菌 KO11 と酵母によるバイオマス糖化液の発酵

バイオエタノールの効率的生産を目指し、酵母 *S. cerevisiae* 1200 株と *E. coli* KO11 株、*E. coli* KO11 ΔP 株を用いる発酵試験を行なうことでリグノセルロース系バイオマスの発酵に最も適した菌株を検討した。実験では、イナワラとムギワラの糖化液を用いた発酵試験を行ない、以下に示す結果を得た。イナワラ糖化液、ムギワラ糖化液の培地組成を決定するための増殖試験をおこなった。酵母 *S. cerevisiae* 1200 株では、イナワラ糖化液を 40% 希釈した培地においてコントロールと近似した増殖曲線を示したため、発酵試験で用いるイナワラ糖化液を 40% 希釈したものと設定した。また、KO11 株においてもイナワラ糖化液、ムギワラ糖化液のどちらの増殖実験でも 40% 希釈の培地において増殖が著しかった。よって、大腸菌の培地調製では、イナワラ糖化液、ムギワラ糖化液をそれぞれ 40% 希釈したものを使用した。すべての増殖実験を通して 20% 希釈培地でコントロールの約 50%、0% 希釈培地において 30% 以下の増殖であったことから、糖化液の濃度が高いと菌株の生育が悪くなることが考えられた。酵母 *S. cerevisiae* 1200 株を用い、イナワラ糖化液 80ml を 30°C、静置培養の条件下で、120 時間培養した。発酵実験の結果は、イナワラ培地で 4.9% (v/v)、YPD 培地では 5.6% (v/v) であった。また、この結果をもとにエタノール収率を計算するとイナワラ培地で 67.7% (g/g)、YPD 培地で 73.4% (g/g) となった。コントロールである YPD 培地と比較してイナワラ培地でエタノール濃度およびエタノール収率が低かった。*S. cerevisiae* 1200 株はキシロースを消費できないため、*S. cerevisiae* 1200 株単独でのリグノセルロース系バイオマスからの効率的な発酵は難しいと考えられる。KO11 株によるイナワラ糖化液、ムギワラ糖化液を用いた発酵試験を行った。発酵試験は、150rpm、37°C の条件下で、120 時間培養した。イナワラを糖源とする培地での発酵試験では、エタノール終濃度 5.3% (v/v) を示し、同組成の糖を含む LB 培地のエタノール濃度 5.2% (v/v) と同程度のエタノールを生成した。また、ムギワラ糖化液を糖源とする培地では、エタノール濃度 1.5% (v/v) を示し、同組成の糖を含む LB 培地では 1.6% (v/v) を示した。イナワラ培地、ムギワラ培地ともに LB 培地と同程度のエタノール濃度を示したが、イナワラ培地でムギワラ培地より 3.8% (v/v) 高く、有意な濃度差が見られた。また、各エタノール濃度よりエタノール収率を計算すると、イナワラ培地で 74.5% (g/g) で、コントロールでは 73.1% (g/g) となった。ムギワラ培地での発酵ではエタノール収率 30.7% (g/g) で、コントロールでは 32.8% (g/g) であった。このエタノール収率にも有意な差が確認された。本実験結果より、グルコースの割合がキシロースよりも高い糖組成をもつ培地で効率的にエタノールが生産できると考えた。よって、糖組成がグルコース 13% (w/v)、キシロース 6.5% (w/v) のイナワラが発酵に適していることが示唆された。 ΔP 株を用いることでより効率的なエタノール生産を試みた。第 3 章の結果よりイナワラ培地のみを用いて KO11 株の発酵試験条件と同様の条件で実験を行った。測定の結果、エタノール濃度は、コントロールで 5.8% (v/v)、イナワラ培地で 5.9% (v/v) であった。また、エタノール収率はコントロールで 79.4% (g/g)、イナワラ培地で 80.1% (g/g) であった。 ΔP 株を用いることで本実験では最も高いエタノール濃度を得ることができた。

本研究では、リグノセルロース系バイオマス資源からの効率的エタノール生産を目的として実験を行ってきた。すべての実験を通して、大腸菌 ΔP 株を用いたグルコース含量が高くキシロースの含有量の低い糖組成をもつリグノセルロース系バイオマス資源からのエタノール生産が最も効率的であるという結論に至った。

3. 糸状菌のキシラン分解系酵素

1) *A. pullulans* ATCC 20524 株のキシロース、アラビノース、キシロオリゴ糖、キシランを炭素源とした培地でキシラン分解系酵素であるキシラナーゼ、 β -キシロシダーゼ、 α -L-アラビノフラノシダーゼ活性を経時的に測定し、酵素生産誘導の有無を明らかにした。この

結果は本菌による実際の酵素生産に適用できる重要なデータである。

2) *abfB* 遺伝子の ORF は 2,097 bp から成り、5 個のイントロン (49, 49, 50, 65, 49 bp) が介在していた。これらの内 4 つのイントロン領域の両端は GU/AG の法則に合致したが、開始コドンより 823 nt の位置にあるイントロン領域は GC/AG によるスプライシングを受けていた。GC/AG イントロンは真菌のイントロンにおよそ 1.0% 程度含まれていると言われている。これまでに、*Neurospora crassa* のイントロンにおいて詳細な調査がされており、同菌株の 2,335 個のイントロンのうち、27 個 (1.2%) のイントロンが GC/AG によるスプライシングを受けていた。なお、GH family 51 のアラビノフラノシダーゼ遺伝子において、GC/AG イントロンを初めて見出した。

発表論文

- (1) M. Yasuda, K. Takeo, H. Nagai, T. Uto, T. Yui, T. Matsumoto, Y. Ishii, and K. Ohta, Enhancement of ethanol production from Napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumach) by a low-moisture anhydrous ammonia pretreatment, *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, 3, 179–185 (2013).
- (2) K. Ohta, S. Fujii, and C. Higashida, Characterization of a glycoside hydrolase family-51 α -L-arabinofuranosidase gene from *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524 and its encoded product, *J. Biosci. Bioeng.*, 116, 287–292 (2013).
- (3) M. Yasuda, H. Nagai, K. Takeo, Y. Ishii, and K. Ohta, Simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of a low-moisture anhydrous ammonia (LMAA)-pretreated napiegrass (*Pennisetum purpureum* Schumach), *Biomass and Bioenergy* (投稿中)
- (4) K. Ohta, C. Higashida, and R. Okabe, Molecular characterization of the cytochrome P450 benzoate para-hydroxylase gene in *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524, *J. Biosci. Bioeng.* (投稿予定)
- (5) M. Yasuda, A. Miura, T. Shiragami, J. Matsumoto, I. Kamei, Y. Ishii, and K. Ohta, Ethanol production from non-pretreated napiergrass through a simultaneous saccharification and fermentation process followed by a pentose fermentation with *Escherichia coli* KO11, *J. Biosci. Bioeng.*, 114, 188–192 (2012).
- (6) K. Ohta, H. Hamasuna, J. Tsukamoto, M. Wakiyama, Y. Izumi, and K. Harada, Disruption of *ptsG* gene and *manXYZ* operon of ethanol-producing *Escherichia coli* KO11: Effects on glucose and xylose utilization and ethanol production, *J. Biosci. Bioeng.*, 113, 608–610 (2012).
- (7) K. Ohta, H. Fujimoto, S. Fujii, and M. Wakiyama, Cell-associated β -xylosidase from *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524: Purification, properties, and characterization of the encoding gene, *J. Biosci. Bioeng.*, 110, 152–157 (2010).
- (8) K. Ohta, H. Tanaka, D. Yamakawa, H. Hamasuna, and H. Fujimoto, Signal peptide of *Aureobasidium pullulans* xylanase: use for extracellular production of a fungal xylanase by *Escherichia coli*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 967–973 (2011).
- (9) M. Wakiyama, K. Yoshihara, S. Hayashi, and K. Ohta, An extracellular endo-1,4- β -xylanase from *Aspergillus japonicus*: Purification, properties, and characterization of the encoding gene, *J. Biosci. Bioeng.*, 109, 227–229 (2010).

口頭発表

1. 国内学会・講演会

- (1) 太田一良、田中秀典、今石あずさ、「麹菌の存在によりエタノール耐性が増強した酵母の遺伝子群の網羅的発現解析」、平成 25 年度第 65 回日本生物工学会大会、平成 25 年 9 月 19 日、広島市国際国際会議場
- (2) 東田 知洋、太田 一良、「*Aureobasidium pullulans* に由来する 安息香酸-4-ヒドロキシラーゼ遺伝子の解析」、第 13 回糸状菌分子生物学コンファレンス、平成 25 年 11 月 21 日、文部科学省研究交流センター、つくば市

- (3) 東田 知洋、岡部 遼、太田一良、「*Aureobasidium pullulans* 由来の安息香酸-4-ヒドロキシラーゼ遺伝子は α -L-アラビノフラノシダーゼ遺伝子の下流に存在する」、第 20 回日本生物工学会九州支部佐賀大会、平成 25 年 12 月 7 日、佐賀大学農学部
- (4) 太田一良、「組換え大腸菌によるバイオマスからのエタノール生産」、日伊市民フォーラム、平成 24 年 9 月 22 日、南九州大学 宮崎本館
- (5) 東田 知洋、太田 一良、「*Aureobasidium pullulans* 由来のファミリー 51 α -L-アラビノフラノシダーゼの酵母 *Pichia pastoris* における発現」、平成 24 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 24 年 9 月 29 日、鹿児島大学農学部
- (6) 東田 知洋、太田 一良、「*Aureobasidium pullulans* 由来 α -L-アラビノフラノシダーゼの酵母 *Pichia pastoris* における高発現と酵素化学的諸性質」、第 12 回糸状菌分子生物学コンファレンス、平成 24 年 11 月 12 日、愛知県産業労働センター ウィンクあいち
- (7) 東田 知洋、太田 一良、「*Aureobasidium pullulans* 由来 GH family 51 に属する α -L-アラビノフラノシダーゼの酵母 *Pichia pastoris* における発現と酵素化学的諸性質」、日本農芸化学会 2013 年大会、平成 25 年 3 月 25 日、東北大学
- (8) 菅 龍一郎、塚本淳二、太田一良、「大腸菌 KO11 株によるリグノセルロース系バイオマス糖化液からのエタノール生産」、平成 23 年度日本農芸化学会西日本支部・中四国支部合同大会、平成 23 年 9 月 17 日、宮崎大学木花キャンパス
- (9) 三浦昭晃・保田昌秀・永井駿人・太田一良「酵母と大腸菌 KO11 を用いるネピアグラスからの効率的エタノール生産」、2011 年生物工学会九州支部福岡大会、平成 23 年 12 月 10 日、九州大学伊都キャンパス
- (10) 太田 一良、浜砂 裕則、塚本 淳二、脇山 元気、泉 可也、原田 佳子、「エタノール発酵性大腸菌 KO11 株 *pstG* 遺伝子と *manXYZ* オペロンを破壊した菌株の発酵特性」、日本農芸化学会 2012 年大会、平成 24 年 3 月 25 日、京都女子大学
- (11) 太田一良、田中秀典、山川大輔、浜砂裕則、藤本仁寿、「*Aureobasidium pullulans* 由来キシラナーゼのシグナル・ペプチドは大腸菌による糸状菌キシラナーゼの細胞外生産を可能にする」、日本生物工学会大会、平成 22 年 9 月 29 日、宮崎シーガイア
- (12) 太田一良、田中秀典、山川大輔、浜砂裕則、藤本仁寿、「*Aureobasidium pullulans* 由来キシラナーゼのシグナル・ペプチド：大腸菌による糸状菌キシラナーゼの細胞外生産への応用」、糸状菌分子生物学コンファレンス、平成 22 年 11 月、広島大学
- (13) 藤井信哉、岡田南希、野口拓也、太田一良、「*Aureobasidium pullulans* 由来の糖質加水分解酵素ファミリー-51 に属する α -L-アラビノフラノシダーゼ遺伝子の解析」、日本生物工学会九州支部沖縄大会、平成 22 年 12 月 4 日、琉球大学千原キャンパス
- (14) 太田 一良、谷口 洋平、藤本 仁寿、「エタノール発酵性大腸菌 KO11 株におけるキシロース代謝関連遺伝子の構成的な発現」、日本農芸化学会 2011 年大会、平成 23 年 3 月 26 日、京都女子大学
- (15) 藤本仁寿、藤井信哉、脇山元気、太田一良、「真菌 *Aureobasidium pullulans* が産生する β -キシロシダーゼをコードする遺伝子のクローニング」、平成 21 年度日本生物工学会年次大会、平成 21 年 9 月 24 日、名古屋大学東山キャンパス
- (16) 藤本仁寿、藤井信哉、脇山元気、太田一良、「真菌 *Aureobasidium pullulans* に由来する β -キシロシダーゼの酵母 *Pichia pastoris* における発現と分泌」、日本農芸化学会 3 支部（西日本、中四国、関西）合同大会、平成 21 年 10 月 31 日、琉球大学千原キャンパス
- (17) 藤本仁寿、藤井信哉、脇山元気、太田一良、「*Aureobasidium pullulans* 由来 β -キシロシダーゼ遺伝子の構造解析と異宿主発現」、第 9 回糸状菌分子生物学コンファレンス、平成 21 年 11 月 18、19 日、東京大学弥生講堂
- (18) 太田一良、知花博治、泉 可也、「遺伝子組み換え *E. coli* 及び *C. glabrata* の共培養によるアルコール生産に関する研究」、NEDO「バイオマスエネルギー関連事業成果報告会」、平成 22 年 2 月 11 日、東京ビッグサイト
- (19) 太田一良、「組換え大腸菌による木質バイオマスからの燃料エタノール生産」、日本木材

学会バイオマス変換研究会、平成 22 年 3 月 19 日、宮崎観光ホテル

- (20) 太田一良、今石あずさ、島山 卓也、「エタノール耐性が増強した酵母の遺伝子群の発現解析」、日本農芸化学会 2010 大会、平成 22 年 3 月 28 日、東京大学駒場キャンパス

2. 国際学会・国際シンポジウム

- (1) Kazuyoshi Ohta, Chihiro Higashida, and Ryo Okabe, "Molecular characterization of the cytochrome P450 benzoate para-hydroxylase gene in *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524", 12th European Conference on Fungal Genetics, March 23–27, 2014, Seville, Spain
- (2) Kazuyoshi Ohta, Shinya Fujii, and Chihiro Higashida, "Characterization of a glycoside hydrolase family-51 α -L-arabinofuranosidase gene from *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524 and its encoded product", 35th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, April 29–May 2, 2013, Hilton Portland Hotel, Portland, OR, USA
- (3) Kazuyoshi Ohta, "Fuel ethanol production from lignocellulose-derived sugars by recombinant *Escherichia coli* KO11", 6th Japan-Finland Biotechnology Symposium 2012, June 8, 2012, Tohoku Gakuin University, Sendai, Japan
- (4) Hayato Nagai, Tsutomu Shiragami, Kazuyoshi Ohta, and Masahide Yasuda, "Ethanol production from napiergrass through a SSF and a pentose fermentation with *Escherichia coli* KO11", 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition, September 16–21, 2012, Daegu, Korea
- (5) Kazuyoshi Ohta, "Ethanol production from lignocellulosic biomass by recombinant *Escherichia coli* KO11", 日伊共同シンポジウム, September 21, 2012, Miyazaki, Japan
- (6) Kazuyoshi Ohta and Shinya Fujii, Characterization of α -L-arabinofuranosidase gene from *Aureobasidium pullulans*, 4th Congress of European Microbiologists, June 26–30, 2011, Geneva, Switzerland
- (7) Kazuyoshi Ohta, Yohei Taniguchi, and Hirohisa Fujimoto, "Improvement of ethanol-producing *E. coli* KO11 for xylose utilization by constitutive expression of genes relevant to xylose metabolism", International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September 6–16, 2011, Sapporo, Japan
- (8) Kazuyoshi Ohta, Hirohisa Fujimoto, Shinya Fujii and Motoki Wakiyama, "Molecular characterization of cell-associated β -xylosidase from *Aureobasidium pullulans*", 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition, September 14–18, 2010, Rimini, Italy
- (9) Kazuyoshi Ohta, "Fuel ethanol production from lignocellulose-derived sugars by recombinant *Escherichia coli*", International Symposium on Biomass Conversion –Fundamentals and Applications–, December 1–2, 2010, Miyazaki, Japan

特許

国内特許出願

発明の名称：「キシロース代謝を改善した形質転換大腸菌」

出願日：2011年2月24日

出願番号：特願 2011-38297

出願人：国立大学法人宮崎大学

国際特許出願

発明の名称：「ペントース資化性エタノール生産組換え大腸菌及びこれを用いるエタノールの製造方法」

国際出願日：2010年2月8日

国際出願番号：PCT/JP2010/051779

出願人：国立大学法人宮崎大学

掲載記事

「バイオマス活用プロジェクト」(農学部 応用生物科学科 太田一良)、環境報告書 2012, p. 16-17, 国立大学法人 宮崎大学

【連絡先】 太田一良 宮崎大学農学部応用生物科学科
〒889-2192 宮崎市学園木花台西 1 丁目 1 番地
Phone/ FAX 0985-58-7217, E-mail k.ohta@cc.miyazaki-u.ac.jp