

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：23303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580120

研究課題名(和文)セルロース資源からのバイオリファイナリー構築のための酵素基盤研究

研究課題名(英文)Studies on cellulases for the construction of biorefinary from cellulose

研究代表者

熊谷 英彦(KUMAGAI, HIDEHIKO)

石川県立大学・生物資源環境学部・教授

研究者番号：70027192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：組換え耐熱性酵母を使用し、同時糖化発酵回収システムを構築した。この酵母株に耐熱性カビの $\beta$ -グルコシダーゼ遺伝子を導入し、菌体外発現組換え株による同時糖化発酵を行い、高率で発酵エタノールを回収した。当該酵素にランダム変異を導入し、耐熱性の向上した変異酵素を取得。アミノ酸置換と耐熱性の関係を解明、その最適化、集積を行い、 $T_m$ が野生型より約10℃上昇した変異酵素を得た。本最適化酵素を耐熱性酵母において発現させ、添加セルラーゼ存在下、膨潤セルロースの糖化同時発酵を行い、野生型の場合の1.3倍のエタノール生産を得た。最適化変異酵素のX線結晶構造解析を行い、2.7Åの解像度で構造解析に成功した。

研究成果の概要(英文)：We developed ventilation-mediated simultaneous ethanol fermentation and recovery system with a thermo-tolerant yeast strain, *K. marxianus*. Running the system, apparently pure ethanol (28 g) was recovered from cellobiose (100g) by growing recombinant expressing  $\beta$ -glucosidase from a thermo-tolerant fungus. To create much more thermo-stable enzyme, we mutagenized its gene and obtained five mutant enzymes showing higher thermo-stability than the wild type enzyme. These mutations were integrated in one enzyme molecule and the mutant enzyme showed 10℃ higher  $T_m$  value, than that of wild type enzyme. The mutant enzyme showed the same specific activity on its substrates with that of wild type enzyme. The transformant with this mutant enzyme gene showed 1.3times higher productivity of ethanol compared with the strain having wild type  $\beta$ -glucosidase gene. The mutant enzyme was crystallized and the crystalline structure was determined at the 2.7Å resolution.

研究分野：応用微生物学

 キーワード：バイオリファイナリー リニューワブル資源 セルラーゼ  $\beta$ -グルコシダーゼ 耐熱性セルラーゼ 酵素耐熱性向上変異 耐熱性酵素発現耐熱性酵母  $\beta$ -グルコシダーゼX線構造解析

### 1. 研究開始当初の背景

セルロースは、地球上に最も多く存在するリニューワブルな資源である。しかしながら人類はまだこの資源を石油に代わるエネルギー源あるいは化学合成原料として有効に利用できるシステムを手に入れていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、セルロースを原料とし、経済性のある資源循環型システム(バイオリファイナリーシステム)を実現するための基盤研究として、耐熱性カビの耐熱性セルラーゼに着目し、その高活性化、高安定化及びその大量生産システムの構築を行う。さらにこれら耐熱性酵素を発現、生産する耐熱性酵母株を遺伝子組み換えにより作出し、経済性のあるエタノール生産システムを構築する。

酵母によるエタノール生産のための商用プラント運用の際、酵母からの代謝熱によって上昇する発酵槽の温度を、発酵温度にまで低下させるために冷却コストが必要となる。また、セルラーゼの最適温度は発酵温度より高く、発酵温度の低さは、高価なセルラーゼの浪費へとつながっている。このように、高温で発酵槽を運用することの経済的メリットが認識されるにつれ、耐熱性酵母の利用が注目され始めている。高温での発酵が可能になると、雑菌のコンタミネーションリスクの低減と揮発したエタノールの直接回収も期待できる。

### 3. 研究の方法

以下のような順に研究を進めた。

(1) グルコースを原料とし、耐熱性酵母を用いる高温でのエタノールの同時発酵・回収システムの構築

(2) 耐熱性  $\alpha$ -グルコシダーゼ高発現耐熱性酵母株の作出とそれを用いるセロピオースからのエタノールの同時発酵・回収

(3) 耐熱性セルラーゼ類共発現耐熱性酵母を作出し、それを用いるセルロース原料からのバイオエタノールの生産

(4) ランダム変異により耐熱性  $\alpha$ -グルコシダーゼの耐熱性向上変異型酵素の作成。次いで耐熱性向上に寄与する変異を解析し、複数変異を一つの酵素分子に集積、更なる耐熱性向上変異酵素を作出

(5) 高い熱安定性を示す変異型酵素遺伝子で耐熱性酵母を形質転換し、この株でのエタノールの同時発酵・回収

(6) バイオリファイナリー適用のための耐熱性  $\alpha$ -グルコシダーゼの酵素科学的基盤研究として、最も高い熱安定性を示す変異型酵素の結晶構造解析

### 4. 研究成果

(1) エタノールの同時発酵・回収システムの構築

耐熱性酵母 *K. marxianus* を用いたエタノール生産・回収システムを開発し、従来用いられている *S. cerevisiae* と比較して、高温でのエタノール回収能力、システムとしての有用性を評価した。

このエタノール生産・回収システムでは、発酵槽で通気と攪拌により好氣的に菌体を生育させエタノール発酵を行い、通気により気化したエタノールを冷却槽内の水層にトラップする。発酵槽はジャーファーマンター (3 L jar, ABLE, Tokyo, Japan) を用い、培地 1 L を 1 N NaOH で pH 5.0 に制御し、400 rpm にて攪拌、各々の通気条件と温度条件で発酵を行った。冷却槽は 2 L の純水を用い 10 に制御して発酵槽からの排気を冷却した。*K. marxianus* を好気条件下で発酵させ、70.5 g という、嫌気条件下での生成量 (77.4 g) の 90% 以上のエタノール生成量が得られた。この結果より *K. marxianus* も呼吸-発酵代謝をし、嫌気培養した際と比較してもエタノール収量の低下は少ないことが確認できた。また、嫌気条件下での菌体の生育は  $OD_{600}=5.9$  までしか達しなかったのに対し、好気条件下では、24 時間後にはすでに  $OD_{600}=43.5$  に達し、著しい生育を示し、このことが 5 分の 1 以上の発酵時間短縮につながる事が明らかになった。

*S. cerevisiae* 野生株 RIB1004 を、このシステムに適用し、3 L/min の air 通気条件下で 30 における生育、エタノール生成量、グルコース消費量を測定した。30 時間後、*S. cerevisiae* は  $OD_{600}=30.0$ 、エタノール生成量 57.7 g であり、*K. marxianus* と比較して生育、発酵ともに遅かった。*K. marxianus* は *S. cerevisiae* と比較して増殖が速く (2 倍の比増殖速度)、そのことが *K. marxianus* の発酵時間の短縮につながったと考えられる。また *S. cerevisiae* の最大エタノール生成量も、36 時間後 60.0 g であり、明らかに *K. marxianus* (24 時間後、70.5 g) より低かった。

本システムを用いた好気培養 (3 L/min、air 通気) を 45 で行い、*K. marxianus* 野生株と *S. cerevisiae* 野生株の生育、エタノール生成量、グルコース消費量を測定した。その結果 *K. marxianus* 野生株においては 24 時間で 79.6 g のエタノールを生成し、最終的に 66.4 g のエタノールを回収することができた。この発酵温度 45 における 30 より高いエタノール収率は、45 では菌の生育が抑制されており、菌体生合成のために消費されるエネルギーが少なかった結果と考えられた。さらに高温ではエタノールは揮発しやすく、そのため冷却槽への移行も早かった。対して、*S. cerevisiae* 野生株は、45 では菌体は生育できず、よってエタノール生産も行われなかった。この結果より、*S. cerevisiae* では不可能であった高温でのエタノール生産が、*K. marxianus* を用いた本システムによって可能になることが明らかとなった。

このシステムを用いた好気培養では 48 時間後には発酵槽のエタノールはほぼなくなり、代わって冷却槽に 49.4 g のエタノール (生成エタノールの 70%) がトラップされていたことから、本システムは、高収率でエタ

ノールを回収できることが明らかになった。また、30 好気培養した際の発酵槽、冷却槽からの抽出サンプルを HPLC にて分析した結果、発酵槽内は酵母の代謝産物である有機酸が多く検出されたのに対し、冷却槽ではエタノールのピークのみが検出された。

(2)耐熱性  $\alpha$ -グルコシダーゼ高発現耐熱性酵母株の作出とセロピオースからのエタノール発酵。

セルロース系バイオマスからの直接糖化発酵に向けて、セルロース糖化に必要な酵素の一種、 $\alpha$ -グルコシダーゼ発現 *K. marxianus* 形質転換株を作製し、本システムにおいて本酵素が実際に機能し、菌の生育と酵素生産を同時に行い、1段階でエタノール生産・回収が可能かを検証した。その際、耐熱性糸状菌由来  $\alpha$ -グルコシダーゼを用いることとし、遺伝子 (*BGLI*) を *K. marxianus* へ導入することとした。今回導入した BgII は、酵母による発現系で 60 近くまでの耐熱性が報告されており、高温での運用に適している。

宿主 *K. marxianus* 由来イヌリナーゼプロモーターとそのシグナル配列 (2 種) を利用した形質転換株、2 株、また、比較としてグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモーターと  $\alpha$ -factor 分泌シグナルに接続した *BGLI* 発現カセットを導入した形質転換株を作製し、3 株の分泌発現能を酵素活性と発現量で比較した。その結果、イヌリナーゼプロモーターとそのシグナル配列を利用した株が、異種セルラーゼタンパクの高い分泌発現能をもつことを確認した。

本形質転換株および野生株を 1 L の 10% セロピオース培地に  $OD_{600}=0.01$  量植菌し、通気 (3 L/min, air) 攪拌 (400 rpm) 条件下で培養し、セロピオース量、エタノール量、 $OD_{600}$  の経時変化を測定した。30 の培養条件下で、今回作成した BgI1 発現株においては、セロピオースの著しい消費とそれに伴うエタノール生成がみられた。36 時間以降からエタノール生成量は徐々に増加し、72 時間後には 31.6g に達した。理論収率の 41%にあたる 22.1g を冷却槽に回収することができた。一方、野生株はセロピオースを炭素源として生育し、30 の培養条件下で  $OD_{600}=27.7$  に達した。しかし生育が定常に達した後も、エタノールは検出されず、なおかつセロピオースは消費されずに残っていた。次に 45 における発酵を行った結果、30 の結果同様、野生株ではエタノール生成がみられなかったが、BgI1 発現株は 36 時間後に 29.5g のエタノールを生成し、理論収率の 51%にあたる 27.5g を冷却槽に回収することができた。30 の結果と比較してエタノール生成量、回収量ともに劣らず、高温での不利益は見受けられない。うえ、発酵時間は 30 では 72 時間要したのに対し、45 では約半分の 36 時間に短縮されていた。発酵槽内培養液の 45 における  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性を測定した結果、30 と比較して 45 では培地中の  $\alpha$ -グルコ

シダーゼ活性が高く、そのことが発酵時間の短縮につながったと考えられた。このように耐熱性セルラーゼを用いることが時間的な効率化にもつながることが明らかになった。

(3) 耐熱性セルラーゼ類共発現耐熱性酵母の作出とセルロース原料からのバイオエタノールの生産

セルロースを加水分解しグルコースへ変換する際に必要な、3 種の耐熱性セルラーゼ、エンド- $\beta$ -1,4-グルカナーゼ、エキソ型のセロピオヒドロラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼの各遺伝子、*ENG1*、*CBH1*、*BGLI* を、*K. marxianus* へ導入した。まず作製したセルラーゼ共発現株 5 株 (YG1451-1455) についてその  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性、エンドグルカナーゼ活性、セロピオヒドロラーゼ活性を測定したところ、それぞれ 0.64-0.75 U/ml、0.22-0.31 U/ml、1.9-2.2 mU/ml の活性が得られた。野生株において  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性、セロピオヒドロラーゼ活性は認められなかった。セロピオヒドロラーゼ活性はコドン最適化にも関わらず低い活性しか得られなかった。結晶性セルロース分解能活性のある本酵素の発現量が少ない故、結晶性セルロースからのバイオエタノール生産のためには、さらなる分子育種が必要であろう。しかしいずれの活性も膨潤セルロースからのエタノール生産が報告されている文献値と同等もしくは優位であったため、膨潤セルロースからの発酵は可能と考えられた。

膨潤セルロース分解能は、培養上清と膨潤セルロースを 40 で 3 時間反応させ、酵素反応によって膨潤セルロースが分解して生成した還元糖の量を測定し、判定した。セルラーゼ共発現株 5 株 (YG1451-1455) と野生株を供したところ、14.3 mM グルコース当量の膨潤セルロースを基質として野生株の上清からは微量の還元糖しか検出されなかったのに対して (0.09 mM)、セルラーゼ共発現株の上清からは 0.52~1.03 mM の還元糖が生成しており、12 時間後には残存する膨潤セルロース量の減少が確認された。3 種セルラーゼ活性と膨潤セルロース分解能の結果を比較すると、エンドグルカナーゼ活性と膨潤セルロース分解能との間に相関がみられ、どちらも YG1452 株が最も高い値を示した。 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性、セロピオヒドロラーゼ活性はセルラーゼ共発現株の間では有意な差は見られず、膨潤セルロース分解能との相関も認められなかった。

(4) 耐熱性向上変異型  $\alpha$ -グルコシダーゼの作成

*BGLI* の大腸菌 Rosetta-gami B (DE3) での発現を試みたところ、活性のある酵素の発現に成功し、精製によって SDS-PAGE で 90 kDa 付近に単一のバンドが得られた。精製した *E. coli* 発現 BgII を用いて、人工基質および天然オリゴ糖に対する基質特異性を調べた。

次いで、Error-prone PCR 法を用いて BgII の耐熱性変異体の取得を試みた。その結果、

5 か所のアミノ酸置換を導入することで、その耐熱性を大幅に上昇させることに成功した。すなわち、60 における半減期が野生型酵素では1分程度にあるのに対し、変異型酵素では200分近くに増加した。また、熱変性プロセスにおける変性中点 ( $T_m$ ) は、野生型酵素より変異型酵素では10 上昇した。変異型酵素と野生型酵素では、天然基質、セロオリゴ糖に対する特異性や比活性が同等であり、応用面においてすぐれた耐熱性酵素を創出できた。なお、本変異型酵素については、実用的評価を企業に依頼しており、特許出願準備をしている。そのため学会発表や論文発表を控えている。

(5)変異型酵素遺伝子で耐熱性酵母を形質転換し、エタノールの同時発酵・回収を行う。

本変異型酵素の遺伝子を耐熱性酵母において発現し、この形質転換酵母を用いて、添加エンドグルカナーゼの存在下、膨潤セルロースの糖化・発酵を行ったところ、野生型酵素の発現株に比べて、1.3 倍のエタノール生産性を確認できた。

(6)酵素科学的基盤研究としての変異型酵素の結晶構造解析

変異型酵素の X 線結晶構造解析に取り組み、2.7 Å の解像度で構造解析に成功している。すでに明らかにしている野生型酵素との構造比較により、変異による耐熱性向上のメカニズムを構造に基づき解析できる。

## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Matsuzaki C, Nakagawa A, Koyanagi T, Tanaka K, Minami H, Tamaki H, Katayama T, Yamamoto K, Kumagai H. Kluyveromyces marxianus-based platform for direct ethanol fermentation and recovery from cellulosic materials under air-ventilated conditions. J. Biosci. Bioeng. (2012) 113, 604-607 査読有

[産業財産権]

取得状況(計 1 件)

名称：エタノールの製造装置及びそれを用いた製造方法

発明者：田中孝二郎、熊谷英彦

権利者：株式会社アクトリー、熊谷英彦

種類：特許

番号：特許第 5748979

出願年月日：平成 22 年 10 月 12 日

取得年月日：平成 27 年 5 月 22 日

国内外の別：国内

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

熊谷 英彦 (KUMAGAI, hidehiko)  
石川県立大学・生物資源環境学部・教授  
研究者番号：70027192

## (2)研究分担者

山本 憲二 (YAMAMOTO, kenji)  
石川県立大学・生物資源環境学部・教授  
研究者番号：70109049

片山 高嶺 (KATAYAMA, takane)  
石川県立大学・寄附講座教授  
研究者番号：70346104