

令和元年5月17日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14890

研究課題名（和文）スマート発酵工学によるバイオブタノールの生産

研究課題名（英文）Production of butanol by smart fermentation engineering

研究代表者

園元 謙二（Sonomoto, Kenji）

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：10154717

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）： 稲わらからブタノールを生産するために微生物学と植物学の研究者による学際的連携を下記の通り行った。

稲わら由来の混合糖をセロビオースとキシロースに設定すると、カタボライト抑制（CCR）を回避したブタノール発酵ができた。次に、実際に稲わらのSemi-hydrolysateを用いるとCCRを回避すると共に、費用対効果の高い適応型発酵プロセスが構築できた。

老化誘導プロモーターを用いて老化期特異的にセルラーゼを発現させることにより、恒常的にセルラーゼを発現させた場合に見られた不稔等の異常を回避しながら、稲わらの酵素糖化性を向上させることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物育種学・分子微生物学・発酵工学研究者が各分野の強みを最大限に活かして互いの技術や知見をフィードバックおよびフィードフォワードして得られた「スマート発酵工学」の研究成果は、(1) リグノセルロース系バイオマスの積極的な利活用に関する研究と産業化の加速度的進歩、(2) 学際的な要素を持つ新規学問分野の創設、(3) 多岐に渡る知見と技術を備えた人材の輩出、などの多方面への貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）： An interdisciplinary collaboration was conducted by microbiologist and botany researcher to produce butanol from rice straw.

When rice straw-derived mixed sugar was set to cellobiose and xylose, butanol fermentation in which catabolite repression (CCR) was avoided was achieved. Second, using rice straw semi-hydrolysate, CCR was avoided and a cost-effective adaptive fermentation process could be constructed.

Senescence-inducible expression of cellulase avoided developmental defects such as sterility observed in the constitutive expression of cellulase, and enhanced enzymatic saccharification yields from rice straws.

研究分野： 農芸化学・応用微生物学

キーワード： デザインドバイオマス 育種イネ セルラーゼ バイオブタノール 混合糖 カタボライト抑制（CCR） 適応型発酵プロセス 糖化性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

デザインバイオマスは「発酵微生物の能力が最大限利用できるようにデザインされた適合物質」と定義している。これまでの具体的な成果として、セルロースの不完全加水分解物や廃棄有機酸類からブタノールや光学活性乳酸の効率的な生産を行ってきた(図1)。

リグノセルロース系バイオマスを用いる発酵生産では、前処理・糖化处理など発酵に適したリグノセルロース系バイオマスの創出と加工など、微生物学の研究者だけで解決できず、リグノセルロース系バイオマスを扱う植物学の研究者との連携が必要不可欠である。特に、混合糖(ヘキソースとペントース)でカタボライト抑制(CCR)を起こさない非CCR発酵プロセスの開発や非CCR微生物の育種、前処理・糖化处理が容易で、発酵プロセスに適した組成を持つ植物の育種、は解決すべき課題である。

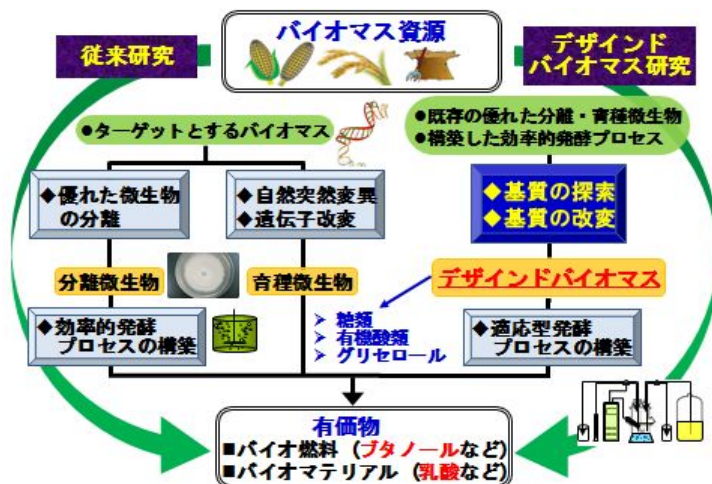


図1. デザインバイオマス研究概念図

### 2. 研究の目的

上述したように、これまでに我々は、既存の微生物の発酵特性を活かした基質の探索や変更を行う適応型発酵プロセスの構築、「デザインバイオマス研究(図1)」を行ってきた。本研究では、この研究をさらに推進し、かつ諸問題を有機的に解決できる「スマート発酵工学(図2)」を提唱した。すなわち、微生物学と植物学の研究者による学際的連携により、リグノセルロース系バイオマスの稲わらを原料として、次世代バイオ燃料であるバイオブタノールを生産することを試みた。具体的には、混合糖を用いたCCRがかからない高効率ブタノール発酵、CCR機構の解明および高収率・非CCR菌株の育種、発酵プロセス適応型イネの育種の研究項目に絞った。本研究の成功は、スマート発酵工学を構成する研究分野間の相互理解と推進、学際的知識を持つ人材の輩出に繋がると期待される。

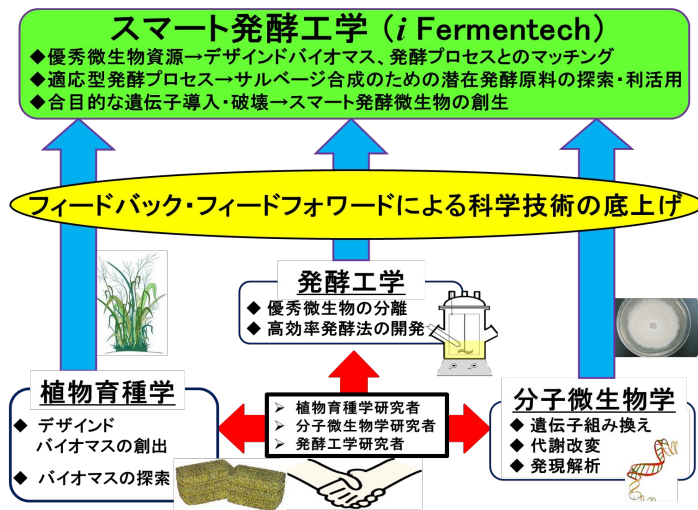


図2. スマート発酵工学の研究概念

### 3. 研究の方法

- (1) 混合糖を用いたCCRがかからない高効率ブタノール発酵
 

酵母によるエタノール発酵の成功事例を基に、グルコースをセロピオースに置換した混合糖(セロピオースとキシロース)による回分発酵法、流加発酵法、連続発酵法を検討して、非CCR発酵プロセスの開発を行った。
- (2) 混合糖を用いたブタノール発酵におけるCCR機構の解明
 

混合糖(グルコースとキシロース)および単糖(キシロース)を用いて、回分発酵においてそれぞれCCRおよび非CCR条件下におけるキシロース取り込み速度の測定、キシロース輸送因子(キシロースオペロン制御因子遺伝子やキシローストランスポーター遺伝子)の転写活性測定を行った。
- (3) 稲わらを用いたCCRがかからない高効率ブタノール発酵
 

先ず、CCRが回避できるような稲わらの前処理・糖化を考案した。そして、その糖化液を使用して回分発酵法、流加発酵法、同時糖化発酵法を検討し、高効率発酵プロセスの開発を行った。さらに、ブタノール生産の新たな評価方法として、前処理・糖化・発酵の複数のプロセスを跨ぐ独自のパラメーターを提示した。

#### (4) 稲わらの酵素糖化性の向上

老化誘導プロモーターを用いて老化期特異的に $\beta$ -glucosidase、cellobiohydrolase、endo-glucanaseを発現するイネを作出し、稲わらの酵素糖化性を測定した。さらに、cellobiohydrolaseとendo-glucanaseの融合タンパク質を発現するイネを作出、糖化性を測定し、その両セルラーゼを融合した効果を調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) 混合糖を用いたCCRがかからない高効率ブタノール発酵

グルコースとキシロースから成る混合糖(GX混合糖)を用いた場合、CCRが生じた。そこで、グルコースの代わりに二糖であるセロビオースとキシロースから成る混合糖(CX混合糖)を用いた回分培養を検討した。その結果、セロビオースとキシロースが同時に消費されると共に、効率よくブタノールが生産され、CCRの回避に成功した。また、CX混合糖を培養中に添加する流加培養にも成功した。一方、連続発酵でCCRが起こると、ブタノール生産性が低下するだけでなく、消費されない糖の廃棄率が高くなる。そこで、CX混合糖を用いてcell recyclingによる高密度菌体の連続発酵系の構築を検討した。その結果、約0.7 h<sup>-1</sup>の高希釈率でも混合糖の高い利用率とブタノール高生産性を達成した。

#### (2) 混合糖を用いたブタノール発酵におけるCCR機構の解明

まず、CCR条件(GX混合糖)と非CCR条件(CX混合糖)のキシロース代謝の初発酵素Xylose isomeraseの活性は、後者が約3倍高いことを見いだした。グラム陽性細菌のCCRでは、GX混合糖の場合、Phosphotransferase system(PTS)がグルコース輸送時にグルコースをリン酸化し、Histidine-containing protein kinase(HPrK)によるHPrのリン酸化を誘起し、リン酸化HPrがCatabolite control protein A(CcpA)と複合体を形成してキシロース代謝に関わる酵素遺伝子の転写調節を行うことが報告されている。また、リン酸化HPrがキシロースの輸送を阻害することもある。本発酵では転写解析の結果、CX混合糖でのCCR回避機構では、セロビオースの非PTS系輸送体であるパーミアーズと菌体内 $\beta$ -グルコシダーゼを介したバイパス経路の利用、そしてCCRのキー酵素遺伝子*hprK*の発現抑制が重要な要因であった。

#### (3) 稲わらを用いたCCRがかからない高効率ブタノール発酵

稲わらを希硫酸で前処理すると成分の一つであるキシランはキシロースに分解されたが、セルロースは残存した。その前処理物をセルラーゼ負荷量が少ないSemi-hydrolysis(セロビオースを多量に生成)あるいは従来の酵素高負荷のGlucose-oriented hydrolysisによってセルロースを加水分解し、それら前処理・糖化液をブタノール発酵に使用した。その結果、前者の加水分解物では、キシロースが存在するにもかかわらずCCRが回避されると共に、新奇の評価パラメーター、酵素負荷量に対するブタノール収率(g/U)が後者の加水分解物に比べて約15倍になった。また、Semi-hydrolysisに適応した糖化・発酵プロセス、Simultaneously Repeated Hydrolysis and Fermentationによって、酵素負荷量に対するブタノール収率がさらに約3倍増加すると共に、糖化と発酵の両プロセスを考慮に入れたブタノール生産性(新奇の評価パラメーター、g/L/h)が約5倍になり、費用対効果の高い適応型発酵プロセスが構築できた。

#### (4) 稲わらの酵素糖化性の向上

老化期特異的に $\beta$ -glucosidase、cellobiohydrolase、endo-glucanaseを発現するイネの稲わらの酵素糖化性を測定した。その結果、いずれのイネも老化前(出穂日)は糖化性の向上が見られなかったが、老化後(出穂40日後)ではcellobiohydrolaseおよびendo-glucanaseを発現するイネの糖化性の向上が見られた。cellobiohydrolaseを恒常的に発現させた場合に見られた不稔等の異常も回避できた。また、老化期特異的にcellobiohydrolaseとendo-glucanaseの融合タンパク質を発現するイネの稲わらの酵素糖化性を測定した。しかし、老化後においても糖化性の向上は見られなかった。endo-glucanaseの働きにより生じた切断部位にcellobiohydrolaseが速やかに作用することにより効率的な糖化が起こると期待したが、融合したことにより酵素活性が大きく低下したことが考えられた。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

Takahiro Kihara, Takuya Noguchi, Yukihiro Tashiro, Kenji Sakai and Kenji Sonomoto, Highly efficient continuous acetone-butanol-ethanol production from mixed sugars without carbon catabolite repression. *Bioresource Technology Reports*, in press (2019) 査読有、DOI: 10.1016/j.biteb.2019.03.017

Tao Zhao, Kento Yasuda, Yukihiro Tashiro, Rizki Fitria Darmayanti, Kenji Sakai and Kenji Sonomoto, Semi-hydrolysate of paper pulp without pretreatment enables a consolidated fermentation system with *in situ* product recovery for the production of butanol. *Bioresource Technology*, **278**, 57-65 (2019) 査読有、DOI: 10.1016/j.biortech.2019.01.043

Rizki Fitria Darmayanti, Yukihiro Tashiro, Takuya Noguchi, Ming Gao, Kenji Sakai and Kenji

Sonomoto, Novel biobutanol fermentation at a large extractant volume ratio using immobilized *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. Journal of Bioscience and Bioengineering, **126**, 750-757 (2018) 査読有、DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.06.006

Tao Zhao, Yukihiko Tashiro, Jin Zheng, Kenji Sakai and Kenji Sonomoto, Semi-hydrolysis with low enzyme loading leads to highly effective butanol fermentation. Bioresource Technology, **264**, 335-342 (2018) 査読有、DOI: 10.1016/j.biortech.2018.05.05

Iiyoshi R, Oguchi T, Furukawa T, Iimura Y, Ito Y, Sonoki T, Expression of a fungal laccase fused with a bacterial cellulose-binding module improves the enzymatic saccharification efficiency of lignocellulose biomass in transgenic *Arabidopsis thaliana*. Transgenic Res **26**, 753-761 (2017) 査読有、DOI: org/10.1007/s11248-017-0043-0

Jin Zheng, Yukihiko Tashiro, Tao Zhao, Qunhui Wang, Kenji Sakai and Kenji Sonomoto, Enhancement of acetone-butanol-ethanol fermentation from eucalyptus hydrolysate with optimized nutrient supplementation through statistical experimental designs. Renewable Energy, **113**, 580-586 (2017) 査読有、DOI: 10.1016/j.renene.2017.05.097

園元謙二、アプローチをデザインするスマート発酵工学の基盤研究、生物工学会誌、**95**, 2-13 (2017) 査読有、[https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9501/9501\\_kogaku.pdf](https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9501/9501_kogaku.pdf)

伊藤幸博、セルラーゼの老化誘導発現による稲わらの糖化性の向上、バイオサイエンスとインダストリー、**74**, 412-413 (2016) 査読有、[https://www.jba.or.jp/bi\\_index/2016/2016\\_vol74\\_no5.php](https://www.jba.or.jp/bi_index/2016/2016_vol74_no5.php)

Abe T, Ito K, Takahashi Y, Sato K, Matsuzaka A, Sonoki T, Ito Y, Difference of saccharification yields between organs and growth stages in rice. Plant Biotechnology, **33**, 105-110 (2016) 査読有、DOI: 10.5511/plantbiotechnology.16.0502a

Ming Gao, Yukihiko Tashiro, Qunhui Wang, Kenji Sakai and Kenji Sonomoto, High acetone-butanol-ethanol production in pH-stat co-feeding of acetate and glucose, Journal of Bioscience and Bioengineering, **122**, 176-182 (2016) 査読有、DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016.01.013

[学会発表](計 19 件)

高畑開理、市川晋、古川佳世子、濁川睦、園木和典、伊藤幸博、セルラーゼ遺伝子を用いた稲わらの糖化性向上、第 13 回東北育種研究集会 (2018)

Yukihiko Tashiro, Takeshi Zendo, Vichien Kitpreechavanich, Kenji Sonomoto and Kenji Sakai, Synergetic fermentative production of a biochemical and biofuel: Efficient n-butanol production processes from renewable resources. The 2nd e-ASIA Joint Research Program Seminar (2018)

Takahata K, Ichikawa S, Furukawa K, Ito Y, Enhancement of saccharification yields from rice straws by senescence-inducible expression of cellulase. International Rice Congress (2018)

園元謙二、培地・基質及びダウンストリームから考える発酵生産、第 70 回日本生物工学会 (2018)

伊藤幸博、食糧・バイオリファイナー共イネの開発を目指した稲わらの糖化性向上、第 70 回日本生物工学会 (2018)

高畑開理、市川晋、伊藤幸博、セルラーゼの老化誘導発現による稲わらの糖化性の向上、第 36 回日本植物細胞分子生物学会大会 (2018)

伊藤叶裕、阿部友美、伊藤幸博：稲わらの糖化性を決める遺伝子のマッピングとその要因の探索、第 12 回東北育種研究集会 (2017)

市川晋、古川佳世子、園木和典、伊藤幸博、老化期特異的セルラーゼ発現による稲わらの糖化性向上、第 12 回東北育種研究集会 (2017)

伊藤叶裕、阿部友美、伊藤幸博、稲わらの糖化性を高める遺伝子の探索、ConBio2017 (2017)

Tao Zhao, Yukihiko Tashiro, Kenji Sakai and Kenji Sonomoto, Repeated Enzymatic Hydrolysis and Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation of Rice Straw Using Free and Immobilized Cells of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. International Symposium on Agricultural, Food, Environmental and Life Sciences in Asia (2017)

Rizki Fitria Darmayanti, Takuya Noguchi, Ming Gao, Yukihiko Tashiro, Kenji Sakai and Kenji Sonomoto, High Butanol Production on Extractive Fermentation with Large Extractant Volume by Immobilized Cells. International Symposium on Agricultural, Food, Environmental and Life Sciences in Asia (2017)

Kento Yasuda, Tao Zhao, Yukihiko Tashiro, Kenji Sakai and Kenji Sonomoto, Butanol Fermentation with Designed Pulp Hydrolysates by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. International Symposium on Agricultural, Food, Environmental and Life Sciences in Asia (2017)

Rizki Fitria Darmayanti, Takuya Noguchi, Gao Ming, Yukihiko Tashiro, Kenji Sakai and Kenji Sonomoto, High butanol production by immobilized extractive fermentation with large extractant volume. 第 69 回日本生物工学会大会 (2017)

Kenji Sonomoto, Biobutanol Production with Designed Biomass on Biorefinery. The 4th Satellite Seminar: International Symposium on Microbial Research and Biotechnology for Biomass Utilization (2017)

市川晋、古川佳世子、伊藤幸博、セルラーゼの老化期特異的発現による稲わらの糖化性の向

上、第 35 回日本植物細胞分子生物学会大会 (2017)

Ito Y, Enhancement of saccharification yields from rice straw、Tohoku Forum for Creativity New Horizons in Food Science via Agricultural Immunology Food safty and functional evaluation (2017)

Kenji Sonomoto, Green Chemical Production with Designed Biomass on Biorefinery. The 3<sup>rd</sup> Satellite Seminar: International Symposium on Microbial Research and Biotechnology for Biomass Utilization (2016)

伊藤叶裕、阿部友美、伊藤幸博、イネ葉鞘の糖化性を高める遺伝子のマッピング、第 11 回東北育種研究集会 (2016)

Zhao Tao, Yukihiro Tashiro, Takuya Noguchi, Jin Zheng, Kenji Sakai and Kenji Sonomoto, Development of bioprocess with designed biomass: Design of rice straw hydrolysate for efficient butanol production without carbon catabolite repression. 第 68 回日本生物工学会大会 (2016)

〔その他〕

ホームページ等

九州大学大学院 農学研究院 生命機能科学部門 システム生物学講座 微生物学分野  
<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/microbt/>

東北大学大学院 農学研究科応用生命科学専攻 環境生命科学講座 環境適応生物工学研究室  
<http://www.agri.tohoku.ac.jp/bioadp/PukiWiki/index.php?FrontPage>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：伊藤 幸博

ローマ字氏名：ITO, Yukihiro

所属研究機関名：東北大学

部局名：農学研究科

職名：准教授

研究者番号 ( 8 桁 ): 70280576