

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24560958

研究課題名(和文) エタノール発酵系状菌の二形性化を利用した単細胞化制御と糖化発酵同時進行への応用

研究課題名(英文) Single Cellularization by Using Dimorphism Change of Ethnaol-prodcuting Fungus and Its Application on Consolidated Bioprocessing

研究代表者

星野 一宏 (HOSHINO, Kazuhiro)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・准教授

研究者番号：20222276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：エタノール発酵系状菌をエタノール生産へ適応させるため際の問題点である形態を制御するために、外部環境の変化による二形性のメカニズムを解明するとこと、単細胞化したエタノール発酵系状菌を活用した糖化発酵進行を検討した。その結果、細胞内のErgosterol合成の阻害とcAMPの蓄積が、単細胞化を促すことを見いだした。さらに、添加剤としてカフェ酸の添加は、エタノール発酵能を低下させず、形態変化を起こさない有効な試薬であることを見いだした。カフェ酸を添加したセルロースの糖化発酵同時進行を行った結果、5.4 g/Lのエタノールを直接生産することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In order to control the morphism change of ethanol-producing fungus for efficient ethanol production, the mechanism of its dimorphism by the change in various external environments was clarified and its single cellularized fungus was applied on the consolidated bioprocessing (CBP) from cellulosic materials. As these results, it was found that control of ergosterol biosynthesis and the accumulation of cAMP were promoted the single cellularization of mold. Further, the addition of coffeic acid to medium was able to achieve the yeast-like cell form through the culture without the decrease in the ethanol fermentation ability. In the CBP with cellulose with its yeast-like cell and a small amount of caffeic acid, 5.4 g/L ethanol was able to directly produce for 72 h cultivation time.

研究分野：生物反応工学

キーワード：エタノール発酵 接合菌 二形性 バイオマス 形態変化 糖化発酵同時進行

1. 研究開始当初の背景

未利用バイオマスからエタノールを生産させることを目的として、我々は数年前よりペントースを高収率で発酵可能で、さらに、多くのリグノセルロース分解酵素を分泌する高性能な野生の糸状菌の育種開発を行ってきた。この糸状菌は、極めて高機能であることからセルロースバイオマスからの直接エタノールを生産する糖化発酵同時進行プロセス(CBP)へ適応できると期待されている。しかし、本菌株は通常的环境下では菌糸状態であることから培養装置内や配管内で目詰まりなどを起こすことから実用化が難しいことが問題視されていた。そこで、この問題を克服するために、本菌株が二形性、すなわち、環境条件により糸状菌から単細胞(酵母化)へ可逆的に変化する性質を有することを見出した。

本研究では、単細胞型のエタノール発酵糸状菌を構築し、この糸状菌を用いた新規なエタノール発酵プロセスを構築することを目的として、本菌株の単細胞化メカニズムの解明、単細胞化変異株の取得、および糖化発酵同時進行への応用について検討し、セルロース系バイオマスからの直接エタノール生産プロセスへの活路を見出すことを検討する。

2. 研究の目的

本研究では、エタノール発酵糸状菌の能力を最大限に発揮させるために、好気条件下で定常的な単細胞化を達成させ、エタノール発酵へ応用させることを目標に、細胞膜中の脂質合成経路及び Ergosterol 合成経路に関する酵素のグラフト情報とプロテオーム解析をとに生化学的に二形性変化に係わる因子を検証する。さらに、この糸状菌のみを用いたセルロース系バイオマスからの糖化発酵同時進行(CBP)プロセスを開発することを目的とする。

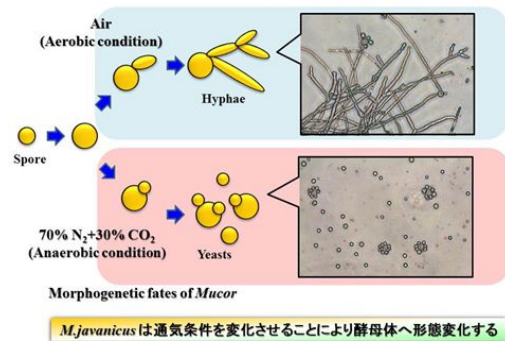
3. 研究の方法

本研究で使用した我々が開発したエタノール発酵糸状菌 *M.javanicus* NBRC4572J を主に用いた。炭素源には Glucose を 50g/L で用いた。メディウム瓶に 70%N₂ と 30%CO₂

の混合ガスを封入した完全嫌気条件下で前培養を行い、本培養は 25mL、28℃ で 8 時間、三角フラスコの好気条件下で櫛培養を行った。cAMP 生合成に關与する 17 種類の薬剤を培地に添加した。菌体濃度は乾燥菌体重量の測定より求め、Glucose および Ethanol 濃度は HPLC を用いて定量した。また、細胞中の Ergosterol 含量は、GC を用いて定量した。菌体の形態は顕鏡した。回収した菌体から RNA 抽出を行い、cAMP 生合成に關わる酵素の発現量を qPCR より定量した。

4. 研究成果

初めに、エタノール発酵糸状菌の単細胞化の現象解明を検討した。我々が発見した *Mucor* 属の菌株は、N₂/CO₂=7/3 の嫌気条件下で確実に単細胞化することを確認した。さらに、糸状体の菌糸および単細胞化した細胞の脂質含量及び Ergosterol 含量などを調べた結果、エタノール発酵糸状菌の単細胞化の現象解明を主に検討した。我々が発見した *Mucor* 属の菌株は、N₂/CO₂=7/3 の嫌気条件下で確実に単細胞化することを実証した。



微生物の細胞膜は主にリン脂質と Ergosterol によって合成されているが、このとき必要な NADPH の供給源の検討を行った結果、炭素源が Glucose および Xylose のどちらの場合でも、ペントースリン酸経路で作用している G6PD と PGDH、また ME で生産されていることが分かった。特に G6PD および PGDH が重要であることがわかった。また、菌体中の補酵素の濃度を培養時間毎に検討するために、NAD⁺ および NADH の割合と NADP⁺ および NADPH の割合を求めた結果、炭素源 Glucose を使用した場合、酵母体のほ

うが糸状体に比べて NADP⁺が多く存在していることがわかる。NADP⁺を多くすることで酵母化が達成できるのではないかと考えた。また、炭素源として Xylose を用いた場合、糸状体の方が NADP⁺は多く存在していることがわかる。つまり、Xylose-Xylitol 間の代謝で糸状体の方が NADPH を消費して NADP⁺が菌体内に貯まる、もしくは FAS の活性のところで NADPH を多く消費していると考えられる。つまり、酵母化を達成するためには NADPH を抑制することで達成できると考えられる。また、細胞膜を構成している脂肪酸と Ergosterol の形態による影響を調べるために、菌体中の脂肪酸と Ergosterol 量を定量した。その結果、炭素源が Glucose および Xylose の場合でも、NADPH の供給が抑制されている嫌気条件では酵母化し、そのとき全脂肪酸含量が減少し、特に不飽和脂肪酸含量が減少することがわかった。また Ergosterol 量を定量した結果、NADPH の供給が抑制されている嫌気条件で、Ergosterol 含量が減少することがわかった。これらのことから、二形性真菌である *Mucor javanicus* J 株を酵母化させるためには、NADPH の供給を抑制すれば、細胞膜の構成成分が変わり、酵母化が達成できると推測される。

次に、細胞の二形性に関わる因子として細胞内の cAMP に注目し、Adenylate cyclase および分解に関わる Phosphodiesterase の促進・抑制剤やその類似物質を添加し、*M. javanicus* の培養を行った。13 種類の薬剤を 0.5mM ずつ添加して 8 時間 *M. javanicus* の培養を行い、細胞の形態を顕鏡した。無添加と比較して、低濃度で効果が確認でき、菌体増殖に影響がなかった Caffeic acid は、0.25mM において発芽管伸長の抑制および酵母体が確認できた。さらに、4 種類の cAMP およびその誘導体を

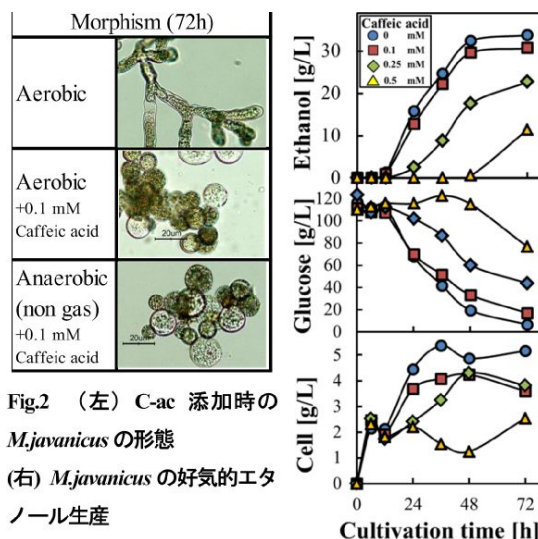
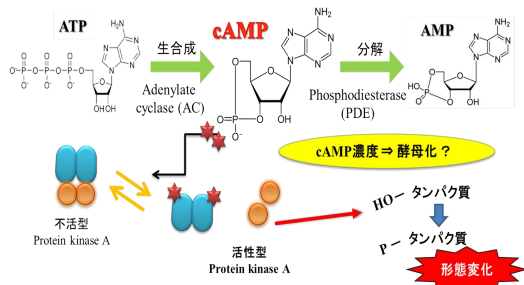


Fig.2 (左) C-ac 添加時の *M. javanicus* の形態 (右) *M. javanicus* の好氣的エタノール生産

0.2rhM 添加して培養を行った。cAMP 添加時のみ好気条件で酵母体を得られた。これより、cAMP が酵母化に影響することがわかった。その結果、Caffeic acid が発芽管伸長を抑制し、酵母体を維持されることを発見した。Caffeic acid は菌体増殖にも影響がなく、かつ一番低濃度で酵母化に効果があった薬剤であることを発見した。この結果を踏まえ、Caffeic acid が細胞内の Adenylate cyclase の発現を促進しているのか、または Phosphodiesterase の発現を抑制しているのか、さらに cAMP 生合成の一連の流れではなく別箇所を促進・抑制しているのかを決定づけるため、Caffeic acid を添加して各種培養を行い、形態変化が顕著な培養時間に菌体を回収し RNA 抽出を行い、RT-qPCR により cAMP 関連酵素の発現量を定量した。これにより Caffeic acid が cAMP の分解に関わる Phosphodiesterase の発現を強く抑制していることがわかった。さらに、Adenylate cyclase においては薬剤無添加と比較して発現量が多くなっていたため、緩やかではあるが Adenylate cyclase の発現を亢進していることもわかった。これより cAMP の緩やかな合成促進および急激な分解阻害によって細胞内 cAMP 濃度が高まっていることが示唆された。さらに、Caffeic acid について、以上であげた発芽管伸長抑制および酵母化作用が *Mucor javanicus* J 株だけでなく、*Mucor* sp.にも同様に示されるか検討した。二形性を示した 8 菌株のうち 7 菌株について、上記効果があると判明した。このことより、Caffeic acid のもつ発芽管伸長抑制および酵母化作用には一般

性があるといえる。以上の結果より、Caffeic acid のもつ Phosphodiesterase の発現抑制効果による cAMP 濃度上昇、それにより引き起こされる菌体の酵母化を活用し、好気条件下での Caffeic acid 添加による *M.javanicus* の培養を試みた。0.1 mM 添加の場合では菌体増殖、Glucose 消費、および Ethanol 生産速度ともに薬剤無添加とほぼ変わらない値を示し、若干発芽管が確認できるものの酵母体も確認できた。Caffeic acid の濃度をあげるにつれて Glucose の消費および Ethanol の生産速度に阻害がかかり、0.5 mM ではすべて酵母体であったが、菌体増殖速度は無添加の 50% 以下にまで減少した。これらのことから結果から、エタノール発酵系状菌 *M.javanicus* J 株を用いて、0.25 mM 以下の Caffeic acid 添加条件下で好気振とう培養を行った結果、高いエタノール生産を達成させることが可能であることを実証した。

最後に、開発した酵母化エタノール発酵系状菌を用いた糖化発酵同時進行により、 α -Cellulose からの直接エタノール生産を 1 L バイオリクターを用いた実施した。培養温度は、28 とし、Caffeic acid を 0.25 mM となるように添加し、酵母化を維持させた。さらに、Air 通気量は、0.2, 0.4VVM とし培養した。120 時間の培養中、糸状菌化した細胞は認められ得られたエタノールは、培養 72 時間で 5.4 g/L を生産できた。

4 . 結言

本研究ではエタノール発酵系状菌 *M.javanicus* の二形性の特徴を生かし、好気条件下で酵母化させ、高いエタノール生産を達成することを目的とし、cAMP 生合成に関わる薬剤の添加による酵母化およびエタノール生産について検討した。その結果、Caffeic acid が cAMP の分解に関わる Phosphodiesterase の発現を抑制していることがわかった。また、Caffeic acid が発芽管伸長を抑制し、酵母体を維持させられることがわかった。さらに好気条件下で高いエタノール生産を達成することができた。さらに、Caffeic acid 添加系の培養において、菌体は酵母状態を維持でき、通常の酵母と同様にエタノール発酵に活用でき

ることがわかった。さらに、本菌株をも一纏ことで、Cellulase 剤を参加せずセルロース物質から直接エタノールを生産できる糖化発酵同時進行(CBP)を実施できることを実証した。

5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計4件)

K.Inokuma, M.Takano, K.Hoshino, Direct Ethanol Production from *N*-Acetylglucosamine and Chitin Substrates by *Mucor* species, *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 72, 2013, pp24-32.

<http://10.1016/j.bej.2012.12.009>

Y. Kato, T. Nomura, S. Ogita, M.Takano, K.Hoshino, Two new β -glucosidases from ethanol-fermenting fungus *Mucor circinelloides* NBRC4572: enzyme purification, functional characterization, and molecular cloning of the gene, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol 97, 2013, pp.10045-10056.

<http://10.1007/s00253-013-5210-5>

S.Y-Yashiki, H. Komeda, K.Hoshino, Y. Asano, Molecular analysis of NAD⁺-dependent xylitol dehydrogenase from zygomycetous fungus, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Vol.78, No.11, 2014, pp.1943-1953.

<http://10.1080/09168451.2014.943646>

H.Komeda, S, Y-Yashiki, K.Hoshino, Y.Asano, Identification and characterization of D-xylitol reductase involved in pentose catabolism of the zygomycetous fungus *Rhizomucor pusillus*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol.119, No.1, pp.57-64.

<http://10.1016/j.jbiosc.201.06.012>

(学会発表)(計16件)

K.Hoshino, M.Takano, Direct Ethanol Production from Paper Sludge by Consolidated Bioprocessing with New Fusion Cell of *Mucor* sp. 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS 2012), Daegu, Republic of Korea, 20120916-20120921.

M.Takano, K.Hoshino, Bioethanol Production from Paper Sludge Using High-performing Fungus, 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS 2012), Daegu, Republic of Korea, 20120916-20120921.

星野一宏, 高野真希, Novel ethanol-producing fungi for SSF of unused biomass, エタノール発酵系状菌の二形性変化とエタノール発酵への応用, 化学工学会 第 78 年会, 大阪大学,

20130317-20130319.

飯田貴大、高野真希、星野一宏, *Absidia* 属糸状菌の酵母化およびエタノール生産への応用, 第 65 回日本生物工学会大会, 広島国際会議場, 20130918-20130920.

喜多彩香、高野真希、星野一宏, 接合菌 *Mucor javanicus* を用いた γ -リノレン酸の効率的生産, 日本生物工学会, 広島国際会議場, 20130918-20130920.

A.Kita, M.Takano, K.Hoshino, Effective Production of Gamma-linolenic Acid by *Mucor javanicus*, 2nd Asian Congress on Biotechnology, New Delhi, India, 20131215-20131219.

T.Iida, M.Takano, K.Hoshino, Construction of Yeast-Like *Abisidia* sp. and Its Application on Ethanol Production 2nd Asian Congress on Biotechnology, New Delhi, India, 20131215-20131219.

M.Takano, K.Hoshino, Development of Efficient Ethanol Production from Paper Sludge by Ethanol-Producing *Mucor* sp. 2nd Asian Congress on Biotechnology, New Delhi, India, 20131215-20131219.

K.Hoshino, M.Takano, Development of Thermotolerant Ethanol-Producing Fungus for Bioethanol Production from Lignocellulose, 2nd Asian Congress on Biotechnology, New Delhi, India, 20131215-20131219.

高野真希、星野一宏, エタノール発酵接合菌を用いたアルカリ-酸処理ペーパースラッジからの効率的バイオエタノール生産, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 明治大学, 20140327-20140330.

高野真希、畑下昌範、星野一宏, エタノール発酵系状菌のイオンビーム変異による高温耐性株の構築, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 明治大学, 20140327-20140330.

高野真希、畑下昌範、星野一宏, エタノール発酵系状菌のイオンビーム変異による高温耐性株の構築, 第 66 回日本生物工学会大会, 札幌国際会議場, 20140909-20140911.

角田貴一、高野真希、星野一宏, Ethanol 発酵系状菌のイオンビーム変異による高温耐性化およびバイオマスの同時糖化発酵への応用, 化学工学会新潟大会 2014, 新潟大, 20141122-20141123

寺山結香、高野真希、星野一宏, 二形性真菌 *Mucor javanicus* の酵母化菌体による好気的エタノール生産, 化学工学会新潟大会 2014, 新潟大, 20141122-20141123

M.Takano, K.Hoshino Bioethanol production from rice straw pretreated with NaOH solution by using a novel pentose-fermenting fungus, The 21st International Symposium on Alcohol Fuels, Gwangju, Korea,

20150310-20150314

高野真希、寺山結香、星野一宏, エタノール発酵系状菌の二形成制御による好気的酵母化, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 岡山大, 20150326-20150328.

〔図書〕(計 1 件)

星野一宏, 新規エタノール発酵系状菌を活用した稲わら等からの同時糖化発酵システムの開発, クリーンエネルギー, Vol.22, No.3, 2013, pp.19-22

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

星野一宏 (Hoshino Kazuhiro)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・
准教授

研究者番号: 20222276