

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450109

研究課題名(和文) エタノール発酵糸状菌の育種および探索とバイオエタノール生産への応用

研究課題名(英文) Screening for ethanol fermenting filamentous fungi and application to bioethanol production

研究代表者

米田 英伸 (Komeda, Hidenobu)

富山県立大学・工学部・准教授

研究者番号：50285160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：エタノール発酵糸状菌を用いて、グルコースに加えてキシロースやアラビノースからもエタノールを高生産できる方法を開発することを目的として、エタノール発酵糸状菌の変異株を取得し、そのエタノール生産性を評価した。また、エタノール発酵中の副生物であるグリセロール生成にかかわるグリセロール3-リン酸ホスファターゼの諸性質を明らかにした。さらに、自然界よりスクリーニングを行い、アラビノースを代謝しエタノール生産可能な酵母株を取得し、その代謝酵素であるL-アラビトール脱水素酵素の諸性質を明らかにし、特徴的な基質特異性を有する酵素であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of developing a method capable of high ethanol production from xylose and arabinose in addition to glucose using a filamentous fungi, mutant library was generated and some candidate mutants were obtained and their ethanol productivity was evaluated. Glycerol 3-phosphate phosphatase which is involved in glycerol production during the ethanol fermentation by the fungal strain were purified and characterized. In addition, microorganisms which can metabolize and ferment arabinose were screened from the nature, and a yeast strain was selected. L-arabitol dehydrogenase involved in the arabinose metabolism was purified to homogeneity from the yeast strain and found to have unique substrate specificity.

研究分野：応用微生物学

キーワード：バイオエタノール 糸状菌 ペントース

1. 研究開始当初の背景

近年、石油代替燃料として食料と競合しないセルロース系バイオマスからのバイオエタノール生産が課題となっている。特に、原料に含まれるセルロースを構成する D-グルコースの他に、ヘミセルロースを構成する D-キシロースや L-アラビノースも発酵基質にできることがエタノール生産の高効率化には必須である。L-アラビノースはヘミセルロースを構成する糖の中で D-キシロースに次いで多く含まれる。糖蜜やデンプンを原料とする場合に用いられる *S. cerevisiae* は D-グルコースを発酵できるが、ペントースを代謝する能力を持たない。よって、稲わらやもみ殻など農産廃棄物由来のセルロース系バイオマスを原料とする場合には、ペントースのうち、D-キシロース代謝能をもつ *Candida* などの酵母の利用やこれらの酵母あるいは細菌由来の D-キシロース代謝酵素遺伝子を *S. cerevisiae* に導入した遺伝子組換え酵母を活用したペントースからのエタノール生産が国内外において数多く試みられている。一方、L-アラビノースはヘミセルロースを構成する糖のなかで、D-キシロースに次いで多く含まれている。例えば、稲わらはヘミセルロース含量が高く、D-キシロースが 14.8%に対して、L-アラビノースが 4.5%含まれている。このようなバイオマスを原料とする場合、D-キシロースに加えて L-アラビノースも発酵基質となれば、エタノール生産の効率の向上が期待できる。しかし、現在までに L-アラビノースを資化、発酵してエタノール生産できる酵母や糸状菌の報告は極めて少なく、糸状菌では *Paecilomyces* sp. の 1 株のみである。また、酵母や糸状菌における L-アラビノース代謝に関する報告は D-キシロース代謝に比べると極めて少ないのが現状であった。

2. 研究の目的

応募者らは、NEDO バイオマスエネルギー先導技術研究開発の「新規エタノール発酵糸状菌を活用した稲わら等の同時糖化発酵システムの開発」(H20 年度～H23 年度)において、糸状菌 *Mucor circinelloides* が D-グルコースに加えて D-キシロースからもエタノール生産が可能であり、かつセルロースやヘミセルロースを加水分解する糖化酵素を分泌することを見出し、糖化のための前処理や酵素添加のコストを低減したうえで、セルロース系バイオマスから高効率でエタノールを生産できることを示した。さらに、応募者は本菌株からのペントース代謝酵素の精製、酵素化学的諸性質の解明、cDNA クローニング、そしてドラフトゲノム解析により、D-キシロースや L-アラビノースをキシロース-5-リン酸まで代謝していくことを明らかにした。この経路は *Aspergillus niger* で報告されている経路と同一であるが、各酵素の相同性は約 35% 程度の低さであり、ペントースの有効利用のための新規な酵素源であると考えている。また、本糸状菌は D-キシロースや L-アラビノースによってペントース代謝酵素系を誘導し、ペントースを代謝するが、その誘導は D-グルコースにより強く抑えられる、いわゆるカタボライト抑制されること、また、L-アラビノースの代謝系を備えているにもかかわらず、その代謝速度が遅いため L-アラビノースからのエタノール生産には至らないことを明らかにしている。実際のセルロース系バイオマスの加水分解物はペントースと D-グルコースの混合物であること、そして効率的なエタノール生産のためには L-アラビノースも発酵基質とすることが有効であることから、本糸状菌への UV 照射などによる変異株の取得、さらにゲノム情報を活用した遺伝子組換えにより、グルコースによる抑制が解除された変異株や

アラビノース代謝活性が向上した変異株を取得することにより、セルロース系バイオマスからの効率的なエタノール生産系を開発しようとする研究を着想したものである。一方、本系状菌はグルコース存在下で培養すると、エタノールの生産に加えてグリセロールを副生することを確認しており、このグリセロール生産を低減することができれば、エタノール生産性を向上できると考えられる。グリセロールの生成には解糖系中間体のジヒドロキシアセトンリン酸を基質とするグリセロール-3-リン酸脱水素酵素(G3PDH)と、グリセロール-3-リン酸ホスファターゼ(G3PP)が関与していることをゲノム解析と酵素化学的解析により明らかにしており、変異株ライブラリーからグリセロール生産抑制株を選択する、あるいはこれらの酵素機能を明らかにしたうえで遺伝子の破壊株を作製することも本研究計画の目的とした。

これまで研究対象としてきた *M. circinelloides* に加えて、新たに自然界より発酵微生物資源を探索し、エタノール生産への応用を検討することも目的とした。特に植食性昆虫類の腸内等には、セルロース系バイオマスの分解や代謝系を有する微生物が共生している可能性が高いことから、これらの共生微生物をターゲットとして、L-アラビノースからバイオエタノール生産可能な発酵微生物資源を探索した。植食性昆虫類としては、例えばヤスデなどの森林内の落葉を餌とする節足動物や、近年、富山県を含む日本海側で発生しているミズナラ等が枯死するナラ枯れに関わる養菌性昆虫カシノナガクイムシからの探索を行った。カシノナガクイムシは、ミズナラの幹に坑道を掘って産卵すると同時に、ナラ菌と呼ばれる糸状菌や酵母を植え付ける。孵化した幼虫は、その材内で増殖したナラ菌を摂食して成長することが明らかとなっ

ている。このナラ菌は木材を栄養源として生育していることから、セルロース系バイオマスの分解や代謝系を備えている可能性が考えられるが、それらの糖類の資化や代謝特性に関する研究は全く行われていないのが現状であった。

3. 研究の方法

エタノール発酵系状菌 *M. javanicus* 株の高機能化を目的として、カタボライト抑制解除株、L-アラビノース代謝向上株、およびグリセロールの生成抑制株等の各種変異株や遺伝子破壊株を取得し、高効率エタノール生産への応用を検討した。グリセロールの生成抑制に関しては、グリセロール生成関連酵素の酵素化学的諸性質の検討も合わせて行った。また、アラビノースからエタノールを生産できる微生物を開発することを目的として、新たに自然界よりアラビノース発酵性微生物を探索し、そのエタノール生産性を評価するとともに、アラビノースからペントースリン酸経路に至る代謝酵素を単離、解析した。

4. 研究成果

エタノール発酵系状菌 *M. circinelloides* の変異株ライブラリーを作製し、各種変異株の取得を行った。*M. circinelloides* の孢子懸濁液に対し、UV照射を行い、生存率1%程度の処理条件を選択し、変異株ライブラリーを作製した。各変異株を糖質源としてD-グルコース+D-キシロース、L-アラビノースのみ、あるいはD-グルコースのみを含む培地で培養後、残存する糖質や生成するグリセロール、L-アラビトール、キシリトール、エタノールをHPLCにより定量することで、目的の変異株を選択した。また、得られた変異株のエタノール高生産のための培養条件の最適化を行った。

さらに、エタノール生産の際の副産物であるグリセロールの生産量の低減を目的として、本菌株におけるグリセロール生成に関与する酵素、グリセロール-3-リン酸ホスファターゼについて、ゲノム情報からの遺伝子クローニングと大腸菌における発現、および組換え酵素の酵素化学的諸性質を明らかにした。本酵素は分子量が約 30,000 の単量体酵素で、Mg²⁺イオン存在下でグリセロール 3-リン酸を良好な基質とするホスファターゼであることが判明した。

L-アラビノースからエタノールを高生産する酵母や糸状菌を探索した。セルロース系バイオマスを著量に含むと考えられる稲わらや落ち葉の堆積した土壌や植食性昆虫の共生微生物を中心に広く自然界より探索した。植食性昆虫の共生微生物として、富山県内の森林よりナラ枯れの原因となるカシノナガキクイムシやその坑道や蛹室に繁殖したナラ菌を対象として探索を行った。さらに、東南アジアの各国でアルコール飲料製造に利用されているスターターをタイの各地より収集し、その中に含まれる各種細菌、酵母、糸状菌もスクリーニングの対象とした。酵母や糸状菌を選択的に探索するため、pH3 の培地を使用し、これに L-アラビノースまたは D-キシロースを加えて生育する微生物を探索した。また、唯一 L-アラビノースからのエタノール生産菌として知られている *Paecilomyces* 属糸状菌の近縁株を多数購入し、スクリーニングの対象とした。得られた菌株について、培地成分、pH、温度、通期量等の培養条件を最適化したうえで、L-アラビノースからのエタノール生産性を評価した。

また、タイのアルコール飲料スターターから L-アラビノース代謝活性の高い酵母として単離した *Meyerozyma caribbica* 株について、それがもつ D-キシロース還元酵素、キシリトール脱水素酵素、L-アラビノース

還元酵素、L-アラビトール脱水素酵素、L-キシリトール還元酵素などのペントース代謝酵素活性を測定し、このうち L-アラビトール脱水素酵素活性を電気泳動的に単一にまで精製した。精製酵素の諸性質を明らかにしたところ、本酵素は L-アラビトールに加えて、キシリトールにも活性を示すユニークな酵素であることが判明した。他のペントース代謝酵素とともに酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の形質転換を行うことで、ペントースからのエタノール発酵が可能な形質転換酵母株の作製に利用が可能と考えられる。

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 3 件)

1. Yamasaki-Yashiki, S., Komeda, H., Hoshino, K. & Asano, Y., Molecular analysis of NAD⁺-dependent xylitol dehydrogenase from zygomycetous fungus *Rhizomucor pusillus* and reversal of the coenzyme preference, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 78, 1943-1953 (2014).
2. Komeda, H., Yamasaki-Yashiki, S., Hoshino, K. & Asano, Y., Identification and characterization of D-xylulokinase from the D-xylose-fermenting fungus, *Mucor circinelloides*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 360, 51-61 (2014).
3. Komeda, H., Yamasaki-Yashiki, S., Hoshino, K. & Asano, Y., Identification and characterization of D-xylose reductase involved in pentose catabolism of the zygomycetous fungus *Rhizomucor*

pusillus, *J. Biosci. Bioeng.*, 119, 57-64 (2015).

[学会発表](計11件)

1. Hidenobu Komeda, Tatsuya Hamada, Kazuhiro Hoshino, Yasuhisa Asano, Enzymes involved in pentose metabolism in zygomycetous fungus *Mucor circinelloides*, *Enzyme Engineering XXII*, 2013 9.22-26 Toyama
2. Miho Murakoshi, Hidenobu Komeda, Aran H-Kittikun, Yasuhisa Asano, Microbial diversity of traditional starters for alcoholic fermentation in Thailand and Laos, The 1st International Symposium on Microbial Technology for Food and Energy Security, 2013.11.25-27 Bangkok, Thailand
3. 村越美穂、米田英伸、Aran H-Kittikun、浅野泰久、タイ及びラオス由来スターター中に含まれる微生物叢の解析、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014.3.28 川崎
4. 村越美穂、米田英伸、Aran H-Kittikun、浅野泰久、タイ及びラオス由来のアルコール発酵用スターターに含まれる微生物叢の解析、2014 年度日本乳酸菌学会泊まり込みセミナー、2014.5.9 栃木
5. Miho Murakoshi, Hidenobu Komeda, Aran H-Kittikun, Yasuhisa Asano, Analysis of microbial community in traditional Thailand and Laos alcohol fermentation starters, New Core to Core Program A. Advanced Research Networks on Establishment of an international research core for new bio-research fields with microbes from tropical areas (World-class research hub of tropical microbial resources and their utilization) The 1st Joint Seminar, 2014.8.10-11 Bangkok, Thailand
6. 村越美穂、米田英伸、浅野泰久、タイ産アルコール飲料スターターの微生物叢の解析、とやま産学官金交流会 2014、2014.12.2 富山
7. Hidenobu Komeda, Shino Yamasaki-Yashiki, Yasuhisa Asano, Identification and characterization of D-xylose reductase involved in pentose catabolism of the zygomycetous fungus *Rhizomucor pusillus*, *Active Enzyme Molecule 2014*, 2014.12.17-19 Toyama, Japan
8. 村越美穂、三澤涼太、米田英伸、Aran H-Kittikun、浅野泰久、タイ由来アルコール飲料用スターター中の微生物叢解析、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015.3.27 岡山
9. Wiphat Sukpipat, Poonsuk Prasertsan, Hidenobu Komeda, Yasuhisa Asano, Purification and characterization of xylitol dehydrogenase with broad substrate specificity from newly isolated pentose fermenting yeast *Meyerozyma caribbica*, 2015 年度日本農芸化学会中部・関西支部合同大会、2015.9.19-20 富山
10. Wiphat Sukpipat, Poonsuk Prasertsan, Hidenobu Komeda, Yasuhisa Asano, Purification and characterization of xylitol dehydrogenase with broad substrate specificity from newly isolated pentose fermenting yeast *Meyerozyma caribbica*, JSPS Core to Core Program. Establishment of an

international research core for new bio-research fields with microbes from tropical areas, The 2nd Satellite Seminar, International Symposium on Microbial Research and Biotechnology for Biomass Utilization, 2015.11.12 Hakata, Fukuoka, Japan

11. 三澤涼太、米田英伸、高橋裕里香、西田洋巳、Aran H-Kittikun、浅野泰久、タイ由来のアルコール飲料用スターターの微生物叢の解析とアルコール生産糸状菌の探索、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016.3.27-30 札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

米田英伸 (KOMEDA, Hidenobu)
富山県立大学・工学部・准教授
研究者番号 : 50285160

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :