

木質バイオマスのワンステップバイオエタノール発酵菌の開発

静岡大学 農学部 准教授 平井 浩文

緒言

石油などの化石資源に頼らず、バイオマス資源（再生可能な生物由来の有機性資源で化石資源を除いたもの）から燃料、特にバイオエタノールを生産する動きが世界的に広がっている。これは、バイオマスは再生可能な持続的資源であり、カーボンニュートラルで大気中の二酸化炭素を増加させないエネルギー資源であるためである。ブラジル及びアメリカは燃料用バイオエタノール生産大国であり、それぞれサトウキビ（糖蜜）及びトウモロコシ（デンプン）を原料として生産している。しかしながら、バイオエタノール生産量の増加につれ、原料となるトウモロコシの使用量の急増によるトウモロコシ価格の急騰が起こり、ひいてはトウモロコシを主原料とする家畜飼料の価格が上がり、最終的には食肉価格やハム、ソーセージなどの加工食品の価格が上がる事態を招いている。

増え続けているバイオエタノール需要をまかなうためには、地球上に大量に存在し、食料と競合しない非可食な資源である木質バイオマス（木材）からのバイオエタノール生産が必須である。しかしながら、以下の様な問題点により木質バイオマスから安価で大量にバイオエタノールが生産出来ないのが現状である。

- (1) 木材には難分解性芳香族高分子であるリグニンを含むため、セルラーゼによる糖化を大きく阻害する。
- (2) セルロースは強固な結晶構造を有するためセルラーゼによる糖化反応が非常に遅い。
- (3) 木質バイオマスからのエタノール生産はマルチステップであるため、エタノール生産装置の複雑化は避けられず、大規模な工場・施設の建設が必要である。

現在、上記問題点(1)を解決すべく、化学的処理や物理的処理による脱リグニン法の開発が行われているが、どの方法も特殊な装置を必要として、化石資源（石油）を必要とすることから、高環境付加型処理である。また問題点(2)については、新規セルラーゼの獲得に向けて各種生物より探索が行われているが、決定的なものがない。

自然界において木材は、食材性昆虫（シロアリ、カミキリムシ等）や担子菌（キノコの仲間）といった微生物により腐朽・分解されているが、なかでもリグニンは白色腐朽菌と呼ばれる一群の微生物により分解されており、この白色腐朽菌の有するリグニン分解能を利用した応用研究も盛んに行われてきた。例えば、白色腐朽菌を紙・パルプ産業界における木材のパルプ化もしくはパルプの漂白へ応用しようとする研究などが行われてきたが実用化されたケースは1つもない。これは既存の白色腐朽菌の有するリグニン分解能ではコスト的メリットを与えないからである。これらを解決するためには、産業上利用可能な（コスト的にメリットを与える）リグニン分解能を有する白色腐朽菌の分子育種が必要である。

また一部の担子菌（エノキタケ等）では、現在食用植物からのバイオエタノール生

産に最も利用されている酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) とほぼ同程度のアルコール発酵能 (グルコース エタノール) が認められている。しかしながらこれら担子菌は木質バイオマスから直接アルコールを生産することが出来ないため、現状では利用不可能である。

これまでに我々の研究グループでは、既存の白色腐朽菌 (*Phanerochaete chrysosporium*, カワラタケ) よりリグニン分解力及びリグニン分解選択性に優れた白色腐朽菌 *P. sordida* YK-624株を自然界より分離し、本菌のリグニン分解機構について検討を進めてきており、以下の点を解明した。

- (1) 本菌株はリグニン分解酵素として、マンガンペルオキシダーゼ (MnP) の他、既存のリグニンペルオキシダーゼ (LiP) よりリグニン分解能に優れたLiP (YK-LiP) を産生する。
- (2) 本菌株の形質転換法を確立し、恒常発現プロモーター制御下でYK-LiP遺伝子を恒常発現させることに成功し、本形質転換株は野生株の1.24倍のリグニン分解力を示すとともに、処理木材の酵素糖化性も向上させる。
- (3) プロテオーム解析により、本菌株は木材腐朽時にアルコールデヒドロゲナーゼ (ALD) を高生産していることが判明し、ALD遺伝子プロモーターがリグニン分解酵素過剰生産プロモーターとして利用可能である。
- (4) LiP及びMnPの活性中心であるヘムの生合成において鍵となる5-アミノレブリン酸シンターゼ遺伝子を取得し、本遺伝子を高発現させることで、LiP及びMnP産生量も増加する。

さらに、*P. sordida* YK-624株も担子菌であることから、アルコール発酵に関与する遺伝子群を有している可能性があり、本菌のゲノムを調査したところ、アルコール発酵に関連する遺伝子は有していることを見出した。

つまり、*P. sordida* YK-624株においてアルコール発酵に必要な酵素遺伝子群を恒常発現させることで、木材を腐朽しつつ、エタノールを生産する菌の育種が可能である。そこで本研究では、高活性・高選択性リグニン分解菌である *P. sordida* YK-624株におけるアルコール発酵関連遺伝子群のクローニングを行い、本遺伝子が実際の木材腐朽時に発現しているのかどうか確認するとともに、これら遺伝子の恒常発現プラスミドを構築し、本菌に形質転換 (セルフクローニング) することで、木質バイオマスからワンステップでエタノールを生産する菌の分子育種を試みた。

結果及び考察

- (1) *P. sordida* YK-624株におけるアルコール発酵関連遺伝子のクローニング
同属であり、既に全ゲノム解析が終了し公開されている *P. chrysosporium* のゲノム情報をもとに設計したプライマーを用いて、*P. sordida* YK-624株のゲノムを鋳型としてゲノムPCRを行った。その結果、アルコール発酵関連酵素遺伝子の一つを取得した。本遺伝子から翻訳されるアミノ酸配列は *P. chrysosporium* 由来の同一タンパク質のアミノ酸配列との相同性は89.0%であった。

(2) 木粉培地における *P. sordida* YK-624株由来アルコール発酵関連遺伝子の発現解析

一定期間培養した *P. sordida* YK-624株のブナ木粉培養物を粉碎し、total RNAを抽出し精製した。得られたtotal RNAを鋳型に逆転写反応を行った。その後、逆転写反応液を鋳型にPCRを行った。その結果、A遺伝子の転写が確認されたのに対して、(1)で得られた遺伝子の転写は確認されなかった。つまり、*P. sordida* YK-624株は木材腐朽時に(1)で得られた遺伝子を発現しておらず、よって、木材腐朽時にアルコール発酵を行えないと推測した。よって、次章ではアルコール発酵関連恒常発現プラスミドの構築を行った。

(3) 恒常発現プラスミドの構築

(1)で取得した遺伝子の両端に制限酵素サイトをPCRにより付加した。次いで、プラスミドD及び先に得たPCR産物を共に先に使用した制限酵素で処理し、その後ライゲーション反応を行い、発現プラスミドを得た。

(4) 発現プラスミドの形質転換

我々の研究グループでは既に *P. sordida* YK-624株の形質転換系を構築しており、本法を用いて発現プラスミドの形質転換を行った。通常、復帰変異株として数十～数百クローンが得られるが、本試験では6つのクローンしか得られなかった。また、得られた6クローンにおいて目的遺伝子が導入されていたかどうか、ゲノムPCRで検定を行ったが、どのクローンにも目的遺伝子の導入は認められなかった。原因として、目的遺伝子の恒常発現が同菌の生育（一次代謝系）を著しく阻害するため、遺伝子導入株が得られなかったものと考えられる。今後は目的遺伝子を発現させるに相応しいプロモーターを検索し、再度形質転換を行う予定である。