

微生物を用いたバイオリファイナリー戦略

バイオマスから燃料・化学品の生産

神戸大学大学院工学研究科

准教授 荻野 千秋

教授 近藤 昭彦

(神戸大学統合バイオリファイナリーセンター長)

1. はじめに –バイオリファイナリー戦略とは?–

平成 14 年度に日本政府の総合戦略「バイオマス・ニッポン」が策定され、バイオマスの有効利用による持続的に発展可能な社会の実現が提言されています。この戦略は、①バイオマスの有効利用に基づく地球温暖化防止や循環型社会形成の達成、②日本独自のバイオマス利用法の開発による戦略的産業の育成を目指すものです。また、地球規模での環境保護の観点から、バイオマス原料は日本のみならず、世界中から安価かつ豊富な資源の積極的な利用が求められています。さらに石油資源枯渇や価格高騰の影響により、これまでの石油資源依存型の「オイルリファイナリー」から、バイオマス資源ベースの「バイオリファイナリー」社会への転換が急務とされ、その潮流が始まりつつあります。このような社会的背景が重なり、近年では、トウモロコシなどのデンプン質から製造されているバイオ燃料（エタノール）やポリ乳酸に代表されるバイオポリマー等の普及が急速に進んでおり、一般市民生活に広く浸透し、その認知度も高くなってきている状況です。

また近年、酵母、乳酸菌、コリネ菌、放線菌などの多種多様な微生物を宿主として使い、バイオマスであるデンプンやセルロースを資化(食べることを)可能にする遺伝子組み換えを施し、バイオ燃料であるバイオエタノールや、様々な化学品の原料とな

る乳酸、アミノ酸、多価アルコール等のビルディングブロックの発酵生産が世界的規模で注目され、試験管レベルからベンチスケールレベルへの発酵試験が始まりつつあります（図1）¹⁾。

本稿では、この「バイオリファイナリー研究戦略」における我々の研究室の研究成果と、今後、バイオ燃料やビルディングブロックなどの製造過程にて必要とされる「生物化学工学」の取り組みに関して御紹介したいと思います。

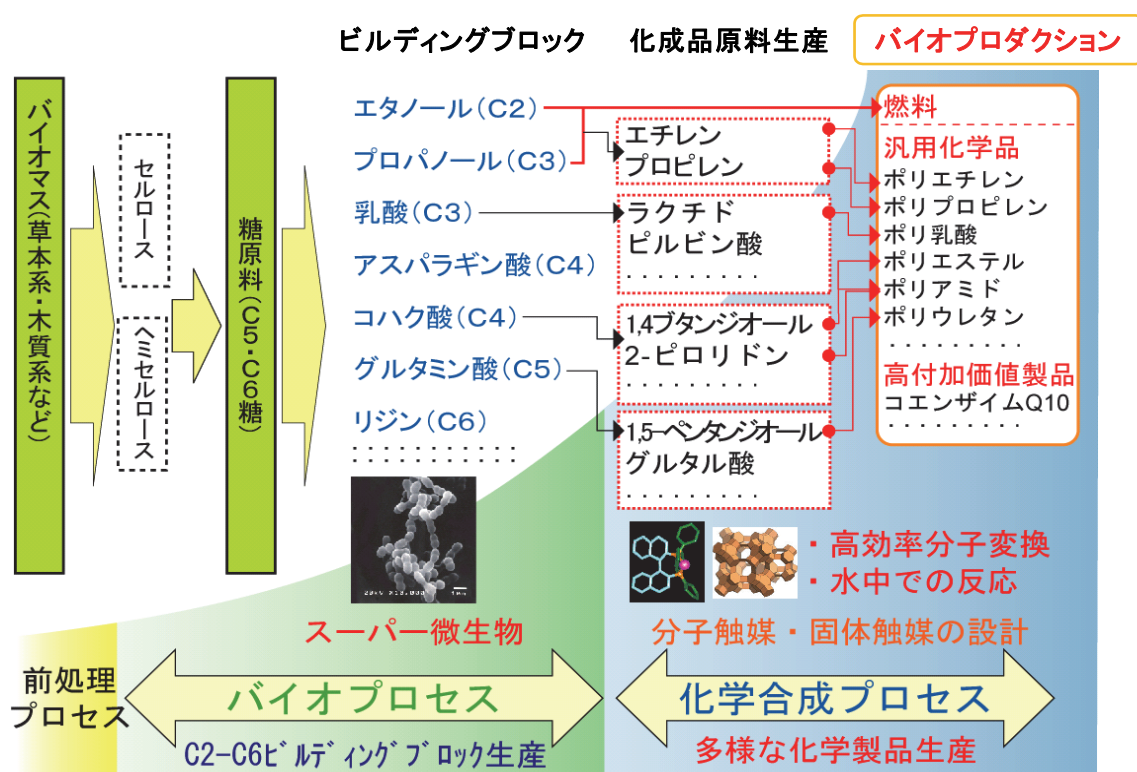


図1 植物系バイオマス資源からのバイオリファイナリー戦略

2. エタノール生産

エタノール発酵を行う微生物としては、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* やグラム陰性菌 *Zymomonas mobilis* が良く知られています。その中で我々は約10年前より酵母 *S. cerevisiae* を用いたバイオマスからのエタノール発酵の研究を始めています。このエタノール発酵の研究において、我々は一貫してバイオマス分解酵素を酵母表層に提示する技術（細胞表層提示技術）をコア技術として利用してきています。まず、こ

の細胞表層提示技術に関して簡単に紹介したいと思います²⁾。

酵母 *S. cerevisiae* には、一番外側の表層に細胞同士の性接合に関与する α -アグルチニンというタンパク質が存在します。この細胞表層外殻に存在する α -アグルチニンに遺伝子工学的な改変を行い、バイオマス分解に関連するアミラーゼやセルラーゼを融合タンパク質として細胞表層にディスプレイする事が可能となっています（図 2）。また、酵母細胞表層の凝集性に関わるタンパク質として FLO1 タンパク質も報告されており、このタンパク質もアミラーゼなどのバイオマス分解酵素と融合することで、細胞表層に目的融合タンパク質を強固に吸着（提示）する事が可能であります。これらの細胞表層提示技術によって、これまでの麴菌と酒酵母による米（デンプン）からのエタノール生産では、麴菌で生産されたデンプン分解酵素（アミラーゼ）によってデンプンをグルコースに分解し、その後、酒酵母によってそのグルコースをエタノールに変換していた多段プロセスを、酵母細胞表層にアミラーゼを表層提示する事で単一プロセスとして行うことが可能となりました。また、細胞表層に分解酵素が局在化（集積化）しているために、分解物（グルコース）を即座に酵母内に取り込める能力があり、結果的に反応系内のグルコース濃度を常に低濃度に維持できる利点もあり、他の微生物による雑菌汚染（コンタミネーション）の問題も回避でき、エタノール発

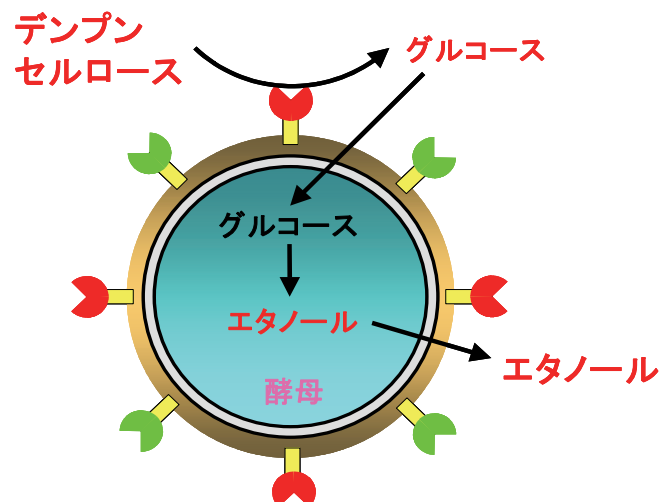


図 2 表層提示酵母によるエタノール生産

酵のプロセスをスケールアップする際の滅菌行程の大幅な簡略化が期待できます。

2-1 デンプンからのエタノール生産

我々は上述の細胞表層提示技術を利用し、酵母表層に各種アミラーゼを提示した酵母の創製を行い、可溶性デンプンや低温蒸煮デンプンを原料としたエタノール発酵を行ってきており、現在は無処理の生デンプンからの直接エタノール発酵にも成功しています³⁾。以下に、アミラーゼ表層提示酵母を用いた無蒸煮デンプン原料からのエタノール生産実施例を御紹介します。

酵母表層に *Rhizopus oryzae* 由来グルコアミラーゼを α -アグルチニンの C 末端側の細胞表層提示に関わる部分と遺伝子工学的に融合し、さらに *Streptococcus bovis* 由来の α -アミラーゼを FLO1 と遺伝子工学的に融合した形で、それぞれ表層提示した形質転換酵母を創製し、培養した結果、培養液の上清には両者の活性は全く確認できませんでしたが、酵母菌体自体にはグルコアミラーゼ活性、 α -アミラーゼ活性を

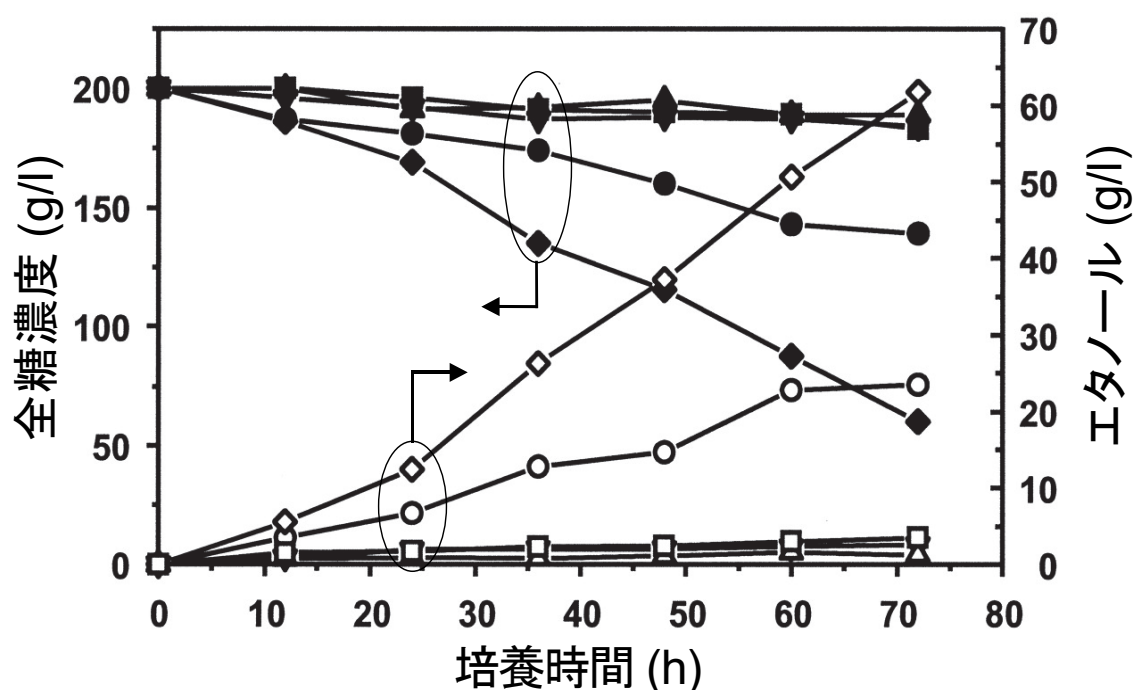


図3 アミラーゼ表層提示酵母による無蒸煮デンプンからのエタノール生産

(●, ○: グルコアミラーゼをアグルチニンで表層提示、▲, △: α -アミラーゼをアグルチニンで表層提示、▼, ▽: α -アミラーゼを FLO1 で表層提示、■, □: グルコアミラーゼおよび α -アミラーゼをアグルチニンにて表層提示、◆, ◇: グルコアミラーゼ/アグルチニンおよび α -アミラーゼ/FLO1 にて表層提示)

確認することが出来ました。この事から、グルコアミラーゼおよび α -アミラーゼの両方を酵母表層に提示できたことを確認しました。さらにこの酵母を用いて、無蒸煮デンプンを直接の炭素源としたエタノール発酵を試みました（図3）。まず、創製した酵母を好氣的条件下にて増殖させた後に回収し、新しい培地成分（炭素源を除く）と無蒸煮デンプンを含む培地に懸濁させて、嫌氣的条件下にてエタノール発酵を行いました。その結果、この細胞表層提示酵母は嫌氣的条件下で効率よくデンプンを分解し、デンプン分解産物（グルコース）を利用してエタノール発酵を行っている事が明らかとなりました。この結果から、アミラーゼ表層提示酵母をエタノール発酵に用いることで、デンプンからのエタノール発酵におけるコスト問題となっているアミラーゼ酵素群の添加やデンプンの前処理問題を省略することが可能となると考えております。今後、更なるエタノール生産性の向上を目指すには、現在はプラスミドの形で遺伝子を組み込んでいるので、プラスミドの欠損などを考慮に入れ染色体組み込み型の創製や、より酵母のエタノール発酵性の向上を目指して酵母の多倍体化等の検討が必要になっていくと考えております。

2-2 セルロースからのエタノール生産

セルロース系バイオマスは木材、草木等の農作廃棄物、古紙などが該当し、地球上にデンプン質よりもはるかに豊富に存在しています。また、デンプン質は食糧として需要が大きいですが、セルロース系バイオマスはこの食糧問題とも競合すること無く、原料を安価に使用する事が可能であるため、将来の石油代替エネルギー源として考えられております。セルロースはグルコースが β 1,4-グリコシド結合して連結した直鎖上の高分子多糖であり、この直鎖上高分子の側鎖同士が水素結合にて強固に相互作用して結晶領域と非結晶領域を有する構造を形成しており、これまでに、このセルロースの酵素分解には次の3種のセルラーゼ類、エンドグルカナーゼ(EG)、セロビオヒドラーゼ(CBH)そして β グルコシダーゼ(BG)が必要である事が明らかとなっております。そこで、本研究室では先のアミラーゼのケースと同様に、*Trichoderma reesei* 由来

EG と CBH 及び、*Aspegillus aculeatus* 由来 BG の 3 種のセルラーゼ遺伝子をそれぞれ α -アグルチニンと遺伝子工学的に融合したプラスミドを構築し、その全てを同一の酵母に形質転換した遺伝子組み換え酵母の創製を行いました⁴⁾。その結果、3つのセルラーゼ酵素がそれぞれ細胞表層に提示されていることを蛍光顕微鏡観察により確認しました。そして、先のデンプンからの発酵と同様に、好氣的条件下にて増殖させたセルラーゼ表層提示酵母をリン酸膨潤セルロースに懸濁させて、嫌氣的条件下にてエタノール発酵試験を行った結果、セルロース分解能力及びエタノール発酵能力が確認できました(図4)。先にも述べましたように、セルロース分解には3種のセルラーゼ酵素が関与する必要がありますが、その存在比(混合比)もセルロース分解における大きな要因となります。従って今後、効率的なセルロース分解システムを構築していくには、表層提示する3種のセルラーゼ酵素の存在比率を調整できる発現量の調整が可能な表層提示システムを確立していく必要があると考えており、その確立はエタノール発酵に対して大きな貢献をすると期待しております。

2—3 ヘミセルロースからのエタノール生産

木質系バイオマスにはセルロース以外にも多様な成分を含んでおり、中でもキシラ

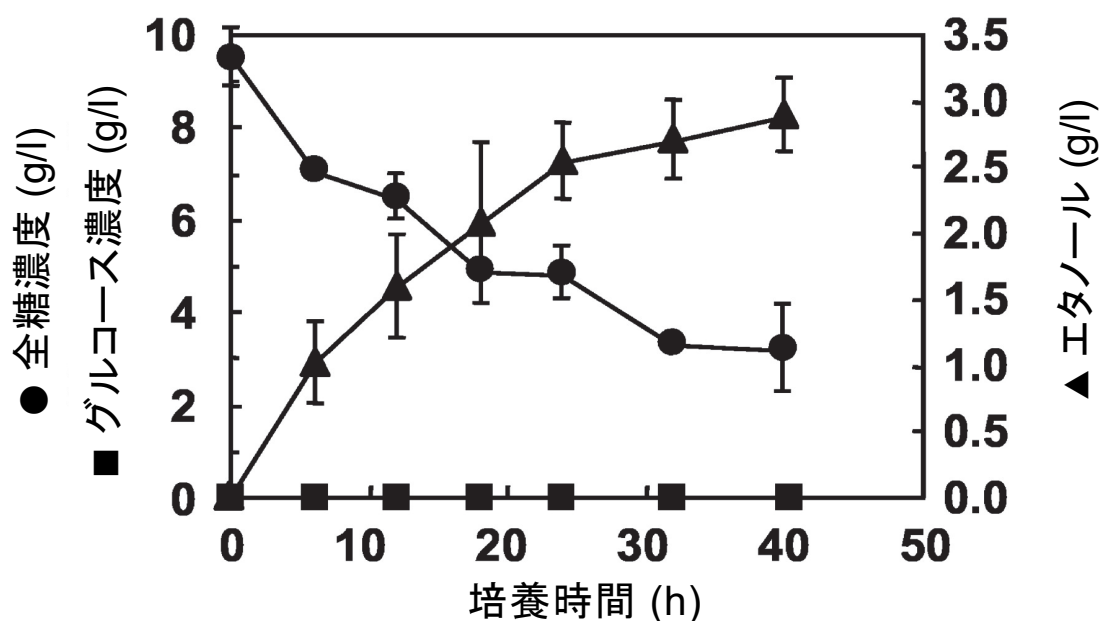


図4 3種のセルラーゼを表層共提示した酵母によるセルロースからのエタノール発酵

ンを主成分とするヘミセルロースはセルロースに次いで多量に存在します。そこで、キシランをターゲットとしたエタノール生産を試みました⁵⁾。先のセルロースと同様に、キシランをキシロースに分解する能力は酵母には存在せず、これらの分解酵素群を表層提示する必要があります。更に、酵母にはグルコース代謝経路は存在するが、キシロース代謝経路は存在しないのです。そこで、キシランをキシロースに分解するのに必要な *T. reesei* 由来キシラナーゼおよび *Aspergillus oryzae* 由来 β キシロシダーゼ遺伝子の両者を α -アグルチニンと遺伝子工学的に融合して、共に酵母に形質転換し、これら両者の機能を賦与した遺伝子組み換え酵母の創製を行いました。更に、キシロースを代謝するために必要な *Pichia stipitis* 由来キシロースレダクターゼとキシリトールデヒドロゲナーゼを菌体内発現させ、*S. cerevisiae* 由来キシルロキナーゼを過剰発現させ、ヘミセルロースを代謝可能な酵母の創製を試みました。その結果、前述のアミラーゼ及びセルラーゼによる発酵と同様に、好氣的条件下にて菌体を増殖さ

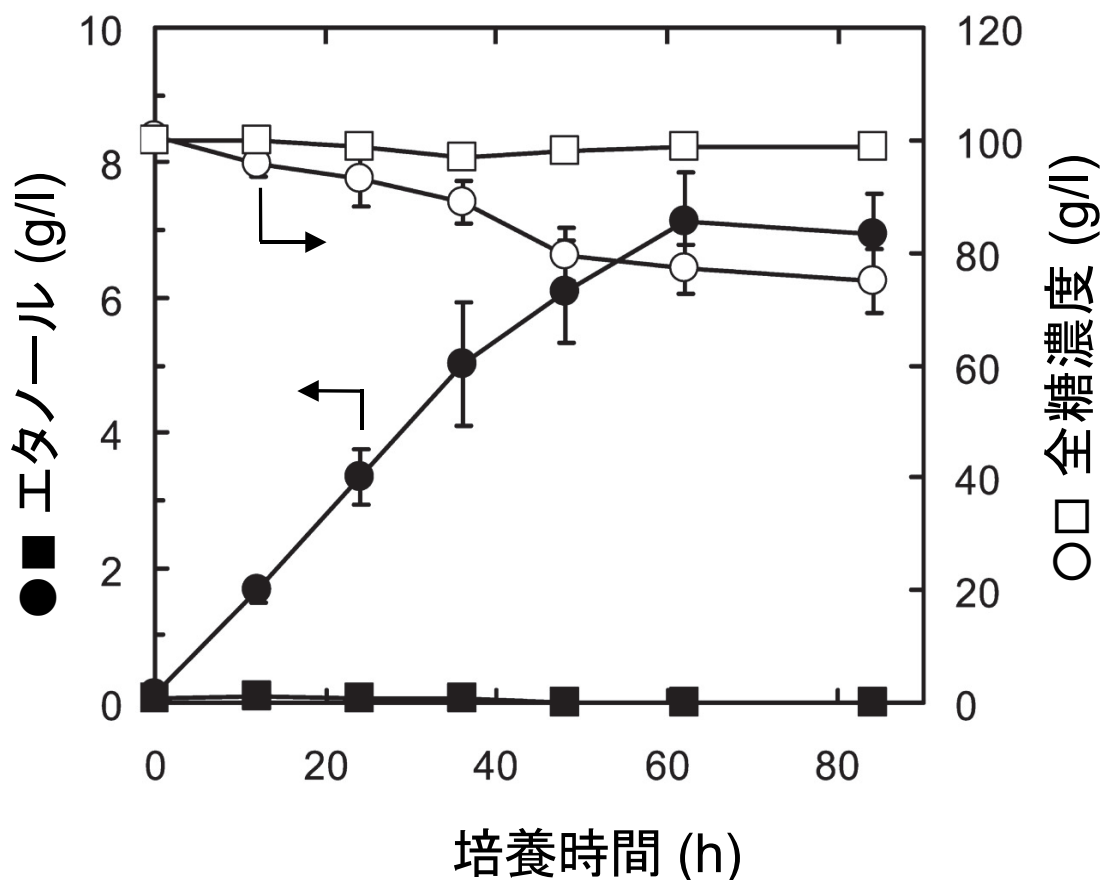


図5 キシラナーゼ表層提示提示及びキシロース代謝系組み込みをした酵母によるキシランからのエタノール生産
(●, ○:キシラナーゼ表層提示+キシロース代謝系組み込み酵母、■, □:対照酵母)

せた後に嫌氣的条件下にて、キシランを炭素源としてエタノール発酵を検証した結果、表層提示した酵素によってキシランを分解し、分解されたキシロースを炭素源として賦与した代謝系にてエタノール発酵を可能にしました（図 5）。

3. 乳酸生産

様々な石油由来の製品が我々の身の回りに存在し、消費されております。プラスチック製品もその主要な製品の一つであります。生分解性がないために環境負荷の大きな廃棄物問題が常に背景に存在している状況です。このような背景から、乳酸の重合体“ポリ乳酸”はバイオマスから生産可能な生分解性プラスチックであり、CO₂の排出削減、廃棄物処理問題への貢献が期待されています。しかしながら、汎用プラスチックの 3～5 倍と非常に高価である問題を有しています。そこで本研究室では、ポリ乳酸の原料となる乳酸の生産に注目して研究を進めています。乳酸菌はグルコースを栄養源として乳酸を生産することが出来るが、現行のデンプンからの乳酸生産においては糖化、分離精製工程はそれぞれ全工程の約 25%ものコストを占めており、乳酸菌において細胞表層提示技術を用いることで、多大な蒸煮・酵素コストを要する糖化工程の低コスト化を試みました⁶⁾。

先の酵母によるエタノール発酵と同様の研究戦略を立て、まず乳酸菌の細胞表層に提示可能なアンカータンパク質として *Bacillus subtilis* 由来 PgsA タンパク質が見出されていたので、この PsaA 遺伝子と *S. bovis* 由来 α -アミラーゼ遺伝子を遺伝子工学的に融合した発現プラスミドを構築しました。このプラスミドを形質転換した *Lactobacillus casei* を可溶性デンプンを唯一の炭素源とする培地にて培養した結果、添加酵素を必要としない直接乳酸発酵に成功しました。また菌体と同時に酵素を回収し、繰り返し利用が可能という細胞表層提示系の有効性も証明しました。本技術の構築により（１）乳酸菌の培養と同時に α -アミラーゼ酵素が生産され、添加酵素が不要になり低コスト化が図れる、（２）デンプンの糖化工程と乳酸発酵工程とのワンステッ

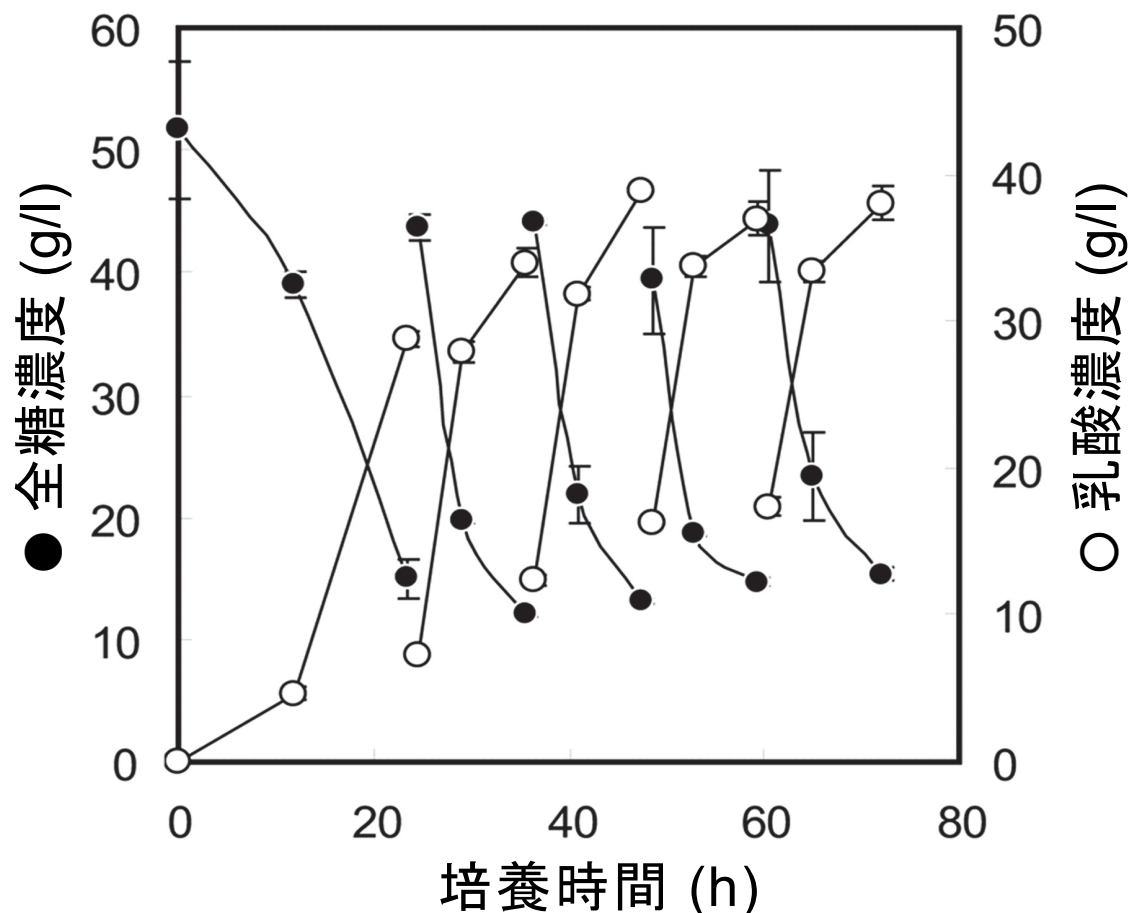


図6 α -アミラーゼ表層提示乳酸菌を用いた可溶性デンプンからの繰り返し乳酸発酵

プ化により糖化工程の省略が可能、(3) 菌体の回収と同時に表層に提示された酵素の回収も可能であり繰り返し発酵生産が可能 (図 6)、といった特徴を有する細胞表層提示乳酸菌を構築できました。しかしながら、得られた乳酸の収率は理論収率の 8 割、L-乳酸の光学純度も 90%程度と改善の余地があります。現在、 α -アミラーゼを分泌生産する乳酸菌も構築し、デンプンからの直接乳酸発酵にも成功しており、今後は代謝経路の改変に基づいた L-および D-乳酸の選択的生産技術の構築や、乳酸菌細胞表層へのアミラーゼ酵素の更なる集積化を目指して新規アンカータンパク質の探索などを行い、さらにはセルロース原料からの乳酸発酵も可能にする、機能性乳酸菌の構築を考えたいと思います。

4. アミノ酸およびその誘導体生産

Corynebacterium glutamicum (コリネ菌) を用いたアミノ酸発酵は日本で開発・熟達した伝統的産業です。アミノ酸の生産量は世界で年間 200 万トン以上であり、グルタミン酸とリジンがその 80%以上を占めております。アミノ酸は栄養補助剤や化学調味料、家畜飼料といった用途以外に、様々な化学製品の出発化合物(ビルディングブロック)としての用途が期待されており、従ってコリネ菌はバイオリファイナリー実現のための高いポテンシャルを有した微生物の一つと考えられております。しかしながら、コリネ菌は酵母や乳酸菌と同様に高分子であるバイオマス資源を分解することができず、発酵プロセスにおいてバイオマス資源は α -アミラーゼやグルコアミラーゼ等の酵素剤を別に添加することによる分解(糖化)工程が必要となります。そこで、これまでの研究戦略と同様に、コリネ菌の細胞表層にバイオマス分解酵素提示した遺伝子組み換えコリネ菌を創製し、バイオマス資源からの効率的なアミノ酸発酵プロセスの開発を目指しました⁷⁾。まず、アンカータンパク質として前述の乳酸菌でタンパク質の細胞表層提示に成功している *Bacillus subtilis* 由来の膜タンパク質 PgsA に着目し、PgsA の C 末端側に *S. bovis* 由来 α -アミラーゼ遺伝子を融合し発現させることでコリネ菌の細胞表層に活性を有した状態で提示することに成功しました。そこで、 α -アミラーゼ表層提示コリネ菌を用い可溶性デンプンを唯一の炭素源として発酵試験を行ったところ、L-リジン生産を成功しました (図 7)。この結果より、デンプン分解に必要な酵素剤及び熱処理にかかるエネルギーコストを大幅に削減することが可能となり、また表層提示技術を用いることで培養液からの糖質分解酵素(アミラーゼ)の除去、目的生産物の精製も効率化することが期待されます。

更に、アミノ酸発酵の結果をベースに、バイオリファイナリー構築に向けた化成品原料生産例として、発酵生産物である L-リジンを基質とした酵素変換によるナイロン原料生産を検討しました。リジンに大腸菌由来リジン脱炭酸酵素を作用させるとジアミンであるカダベリンが得られます。これは既存のナイロンの原料となり得る可能性

を秘めており、石油を原料としたナイロン原料の代替製品となり得えます。そこで、コリネ菌にリジン脱炭酸酵素を菌体内発現させ、デンプンを原料としてカダベリンを生産することにも成功しています。コリネ菌の細胞表提示技術は我々が開発した新しい技術であります、現時点ではまだデンプンからのアミノ酸発酵効率にも改善の余地があり、更なる技術改善を今後発展させれば、バイオマス資源由来を用いた“バイオナイロン”原料の生産も可能になると期待できます。

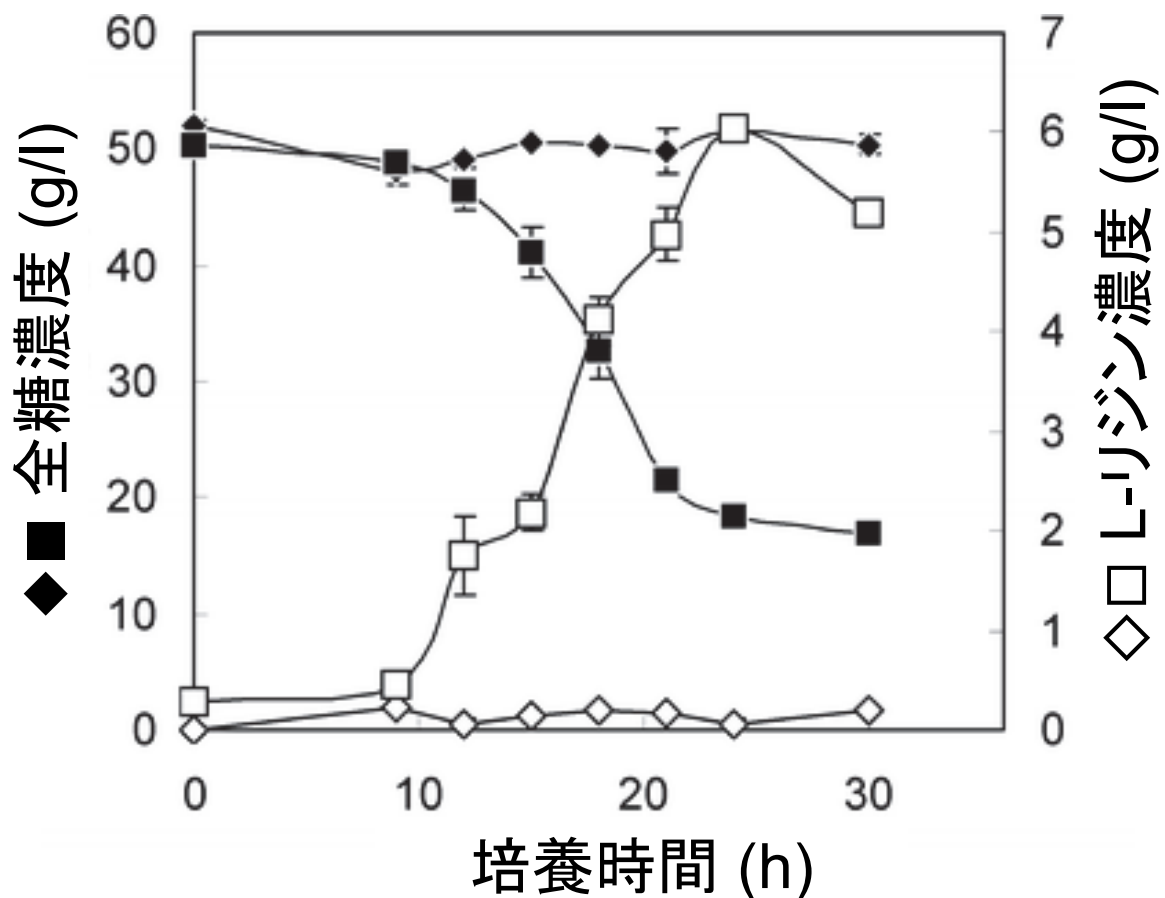


図7 α -アミラーゼ表層提示コリネ菌を用いた可溶性デンプンからのL-リジン生産
(■, □: α -アミラーゼ表層提示コリネ菌、◆, ◇: 対照コリネ菌)

5. おわりに

本研究室では、デンプンやセルロースなどのバイオマスを原料としてエタノール、乳酸、アミノ酸発酵を可能にする様々な微生物宿主の開発を進めてきています。デンプンからの表層提示技術によるバイオリファイナリー基盤技術の開発はかなり成熟

してきており、今後は、試験管レベルからバイオリクターレベルでの発酵特性の解析、そして発酵培養液の分離プロセスなど、化学工学的要素の強いプロセス開発などまでを含めた総合的システム開発が必要になっていくと思われます。また、セルロースの分解に関しては、セルロース分解能が高い *Clostridium thermocellum* に代表されるような複数のセルラーゼ酵素から構成されるセルロソームを模倣した細胞表層提示技術を確立することで、セルロースの効率的分解システムの道が開けていくと期待しています。また、今後は石油資源枯渇問題などの影響を受け、多様なビルディングブロックをバイオマスから生産するニーズが現れてくると推測されますので、今後、放線菌、糸状菌そして枯葉菌などの表層提示技術開発も推し進め、統合的なバイオリファイナリーを構築して行きたいと考えております。

参考文献

- 1) 「バイオリファイナリーの研究・技術動向開発」報告書、平成 16 年度調査報告書、新エネルギー・産業技術総合開発機構、2005 年 7 月
- 2) Kondo, A. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**, 28-40 (2004)
- 3) Shigechi, H. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 5037-5040 (2004)
- 4) Fujita, Y. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 1207-1212 (2004)
- 5) Katahira, S. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 5407-5414 (2004)
- 6) Okano, K. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 1007-1013 (2007)
- 7) Tateno, T. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **74**, 1213-1220 (2007)