

Ⅳ バイオエタノール生産に適した 五炭糖発酵性酵母の開発

1. はじめに

世界におけるバイオエタノールの生産量は年間 8,000～9,000 万 kL で、そのうちの約 9 割はアメリカとブラジルで生産されている。JETRO の報告書¹⁾によると、世界最大のバイオエタノール生産国であるアメリカの年間生産量（2011 年）は約 5,300 万 kL であり、日本の年間ガソリン消費量（約 6,000 万 kL）にも迫る量である。現在のバイオエタノールの主要な原料は、いわゆる第一世代の原料と称されるトウモロコシやサトウキビ（デンプンやショ糖）であり、国際的な穀物需給に大きな影響を与えていることが問題視されている。現にアメリカでは、生産されたトウモロコシの約 40% がエタノール生産に回っているとされている。

一方、“第二世代”と呼ばれる、稲わらやバガス、廃材などのリグノセルロース系バイオマスを原料としたバイオエタノールの生産は、食料との競合を回避できることから、その実用化が大きく期待されているが、糖類を取り出すプロセスの難しさやコストの問題が解決されておらず、量産化への道程は遠い。2012 年には、米国においてベンチャー企業が中心となり、いくつかの第二世代バイオエタノールの商業プラントが立ち上がっているが、予想される生産量は 3,300 万 L とバイオエタノール生産量全体の 0.1% にも満たない¹⁾。しかしながら、地球温暖化への対策と深刻化が予測される食料問題への対応を両立させるには、“第二世代”への移行を着実に進めて行く必要があることに疑いはない。

本稿では、第二世代バイオエタノールの製造にとって欠かすことのできない五炭糖（キシロースおよび L-アラビノース）発酵について、はじめに世界における五炭糖発酵用酵母の研究開発状況を概説した後、著者らが研究を進めているキシロースの高温発酵について紹介する。

（光学異性体の表記について、本稿では D-キシロースのような D 体の糖類については、必要がない限り“D-”の表記を省略している。）

2. リグノセルロース系バイオマスの特徴

第二世代バイオエタノールの原料となるリグノセルロース系バイオマスを取り扱う上で、第一世代の原料と大きく異なる点として、①酵母などによる発酵の原料になる糖類を取り出すことが困難なこと、②取り出した糖類には複数の種類が含まれ、その中には酵母などがあまり発酵できないものが含まれていること、が挙げられる。リグノセルロースは植物の細胞壁に含まれ、セルロース、ヘミセルロース、リグニンの三つの成分から構成されている。このうち、セルロースとヘミセルロースを分解することにより、発酵の原料となる糖類が得られる。セル

ロースからは専らグルコースが得られるが、ヘミセルロースには多様な糖類が含まれており、六炭糖であるグルコース、マンノース、ガラクトースに加え、五炭糖であるキシロースやL-アラビノースも得られる。Thalagalaらは、濃硫酸抽出により、種々の植物のセルロースおよびヘミセルロースに含まれている糖類の組成を調べ報告している²⁾(図1)。それによると、いずれもグルコースが一番多く、全糖類の5～7割がグルコースである。針葉樹(スギ、ヒノキ)では、キシロースとマンノースが同程度含まれ、それぞれ1～2割に相当する量が含まれている。一方、広葉樹(ナラ、ユーカリ)や草本(サトウキビバガス、稲わら)では、ヘミセルロースにキシロースが多く含まれ、広葉樹では約3割、草本では約4割の糖類がキシロースである。また、針葉樹や草本では、キシロース同様五炭糖であるL-アラビノースも2～5%程度含まれている。これらのことから、リグノセルロース系バイオマスからより多くのエタノールを生産するためには、グルコース以外の糖類も効率良くエタノールに変換することが重要であることは明らかである。特に、稲わらなどの草本植物由来のバイオマスにおいては、キシロースの発酵収率が全体のエタノール収量に大きく影響することが予測される。

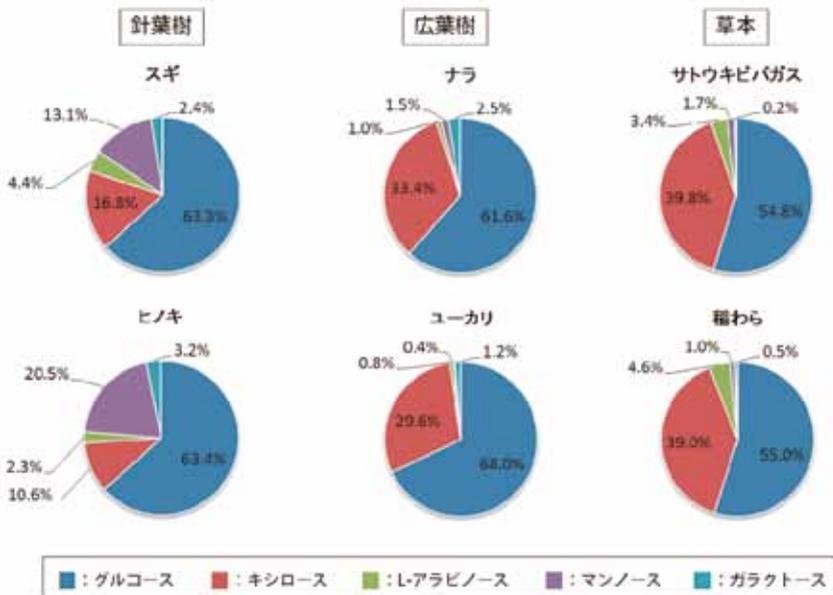


図1 各種リグノセルロース系バイオマスに含まれる糖類組成

セルロースおよびヘミセルロースに含まれる糖類全量を100%としたときの割合で示す。Thalagala²⁾らのデータを基に作成した。

3. 五炭糖発酵の研究開発状況

3.1. 酵母の性質

バイオエタノールの生産に最もよく使われている微生物は、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) である。*S. cerevisiae* は数多ある酵母種の中でも特に高いエタノール発酵能力とエタノール耐性を有しており、古来から醸造などのエタノール生産に利用されてきた。微生物にとっては、発酵はエネルギー (ATP) を生産するための仕組みであり、酸素のない嫌気条件下では呼吸の代わりに発酵を行うことによってエネルギーを獲得している。しかしながら、呼吸に比べると効率が悪く、得られるエネルギー量は格段に少ない。したがって、多くの微生物は、好気条件下では発酵から呼吸に積極的に代謝系を切り替えることで、より多くのエネルギーを獲得しようとする。しかし、*S. cerevisiae* のような一部の酵母では「クラブトリー効果」という現象が観察される。これは好気条件下であってもグルコースを添加すると酸素消費が抑制される現象であり、酸素が十分あっても糖 (グルコース) 濃度が高い時にはエタノール発酵が呼吸に優先して行われていることを示唆している。つまり、*S. cerevisiae* は、代謝経路がエタノール発酵に大きく傾いた例外的な微生物と言える。

S. cerevisiae は、デンプンなどから得られるグルコースを原料とした第一世代バイオエタノールの生産にはとても適している。しかし、前項で見たように、リグノセルロース系バイオマスには、グルコース以外の糖類、特にキシロースが多量に含まれている。残念なことに、*S. cerevisiae* はキシロースを利用することができず、そのまま第二世代バイオエタノールの生産に用いることは難しい。

一方、自然界にはキシロースからエタノールを作る、すなわちキシロース発酵を行う酵母も存在する。*Scheffersomyces stipitis* (*Pichia stipitis*) や *Candida shehatae* といった酵母がキシロース発酵性酵母として知られている。これらの酵母を用いたエタノール生産の研究も進められているが、これらの酵母の特徴として、キシロースを代謝するために酸素を必要とする点が挙げられる。*S. stipitis* や *C. shehatae* は *S. cerevisiae* と異なり、クラブトリー効果を示さない酵母であり、酸素存在下ではエタノール発酵が進みにくくなる。しかも、酸素が十分にある条件下で糖が無くなると、折角作ったエタノールを今度は炭素源として酵母自身が消費してしまう。したがって、これらの酵母を使ってキシロースから無駄なくエタノールを得ようとする、発酵液中の溶存酸素濃度の厳密なコントロールが必要であり、大規模なエタノール製造には不向きである。

3.2. 微生物におけるキシロースの代謝経路

次に、微生物のキシロース代謝経路について見てみたい。自然界には、酵母以外のカビや細菌にもキシロースを栄養源として利用できる (資化できる) ものが存在している。キシロースがエタノールに変換される時の代謝経路は、酵母やカ

びなどの真菌（真核生物）タイプと細菌（原核生物）タイプの2種類に大別することができる（図2）。真核生物の経路では、まず、キシロースがキシロースレダクターゼ（XR）によりキシリトールに還元され、次に、キシリトールデヒドロゲナーゼ（XDH）によりキシルロースに酸化される。生成したキシルロースはキシルロキナーゼ（XK）によりキシルロース5-リン酸となり、ペントースリン酸経路に送られ代謝される。その後、ペントースリン酸経路での反応によりグリセロアルデヒド三リン酸が生成され、解糖系に合流することにより最終的にエタノールになる。

一方、細菌の経路では、キシロースはキシロースイソメラーゼ（XI）により、キシルロースに直接変換される。キシルロースはXKによりリン酸化を受けた後、真菌の代謝系と同様にペントースリン酸経路を経てエタノールになる。なお、この代謝系は、以前は細菌に特有の経路と考えられていたが、近年、嫌気性

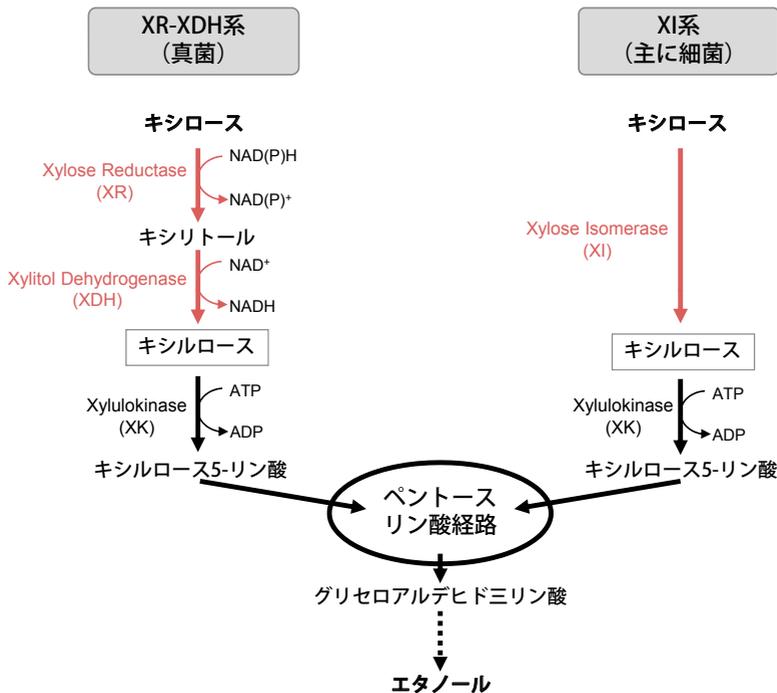


図2 キシロース代謝経路の模式図

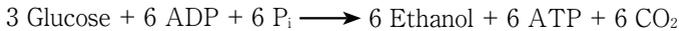
キシロース資化性微生物のみが有する代謝経路は赤で、*S. cerevisiae*にも存在する代謝経路は黒で示す。

真菌の中にキシロースイソメラーゼ酵素を持ち、細菌と同様の系でキシロースを代謝するものも見つかっている³⁾。本稿では、以下、この2種類のキシロース代謝系を「XR-XDH系」、「XI系」とそれぞれ呼ぶこととする。

すでに気付かれていると思うが、XR-XDH系、XI系とも、キシロース以降の代謝経路（図2の黒で示した部分）は共通しており、真核生物、原核生物問わず、さらにはキシロースを資化しない微生物でもこの部分の代謝経路を有している。したがって、キシロースを発酵できない*S. cerevisiae*であっても、キシロースの代謝中間産物であるキシロースはエタノールに発酵することができる。

グルコースおよびキシロースをエタノールに発酵した際の収支式は以下の通りである。

（グルコースの場合）



エタノール理論収率：0.514 g/g glucose

（キシロースの場合）



エタノール理論収率：0.510 g/g xylose

※キシロース発酵の際の補酵素の収支は除く。

※P_i：リン酸

なお、本稿では、エタノールの理論収率を計算する際に、グルコースを基質とした際も、キシロースを基質とした際も、0.51 g/g substrate（1 gの基質から0.51 gのエタノールが生成）を使用している。

3.3. XR-XDH系を利用したキシロース発酵酵母の開発

キシロース発酵能を*S. cerevisiae*に付与しようという取り組みはかなり以前から行われており、すでに1980年代後半には遺伝子組換え技術を用いた研究が始められている。そして、世界で初めてキシロースを発酵する遺伝子組換え酵母が作り出されたのは、1993年のことである⁴⁾。米国Purdue大学のHoらは、キシロース発酵性酵母である*S. stipitis*由来のXR遺伝子とXDH遺伝子を*S. cerevisiae*で異種発現させた。これに加えて、元々*S. cerevisiae*が持っているXKについても、遺伝子組換えにより過剰発現させた。*S. cerevisiae*のXK活性は元々低く、効率的にキシロースを発酵させるためにはXKの活性強化も必要であった。このHoらの方法は、*S. cerevisiae*にキシロース発酵能を付与する手法として、その後、多くの研究で利用されている。

XRやXDHは酸化還元酵素であり、その反応に補酵素を必要とする。XRは補酵素としてNADP⁺やNADPHを、XDHはNAD⁺やNADHを利用する。（XRはNADP（H）だけでなくNAD（H）も利用できるが、NADP（H）の方が好

んで使われる。)したがって、XR-XDH系を利用したキシロース発酵では、XRとXDHの補酵素特異性の違いにより、キシロースの代謝効率が上がらないことが考えられる。キシロースからキシリトールへの反応の際には、NADPHからNADP⁺ができるのに対して、次のキシリトールからキシロースへの反応では、NAD⁺からNADHができ、補酵素のリサイクルが起こらない。特にNADHのNAD⁺への再生は、呼吸に依るところが大きいので、エタノール発酵に適した嫌気条件下ではNAD⁺の再生が不十分となる。このため、キシロース発酵が進むに連れNAD⁺が足りなくなり、その結果、代謝フローがキシリトールでストップしてしまい、発酵液中にキシリトールの蓄積が起こることが観察されている。

この問題を解消するために、代謝工学的な観点から様々なアプローチが試みられている。例えば、XRやXDHのアミノ酸配列を人工的に改変することにより、補酵素特異性が変化したXRやXDHの開発が行われている^{5,6)}。NADPHの代わりにNADHを反応に使うXR、あるいは、NAD⁺の代わりにNADP⁺を反応に使うXDHが作製され、補酵素特異性を揃えたXRとXDHを*S. cerevisiae*で発現させる研究が行われている。この他にも、内在性アルドースレダクターゼの欠損⁷⁾、グルタミン酸デヒドロゲナーゼの欠損や過剰発現⁸⁾、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼの過剰発現やグルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼの欠損⁹⁾、XRとXDHの発現量の最適化などが行われている¹⁰⁻¹²⁾。これらの試みにより、酵母細胞内のキシロース代謝が改善され、エタノール収率が向上しているものの、キシリトールの蓄積を完全に抑制するには至っていない。

3.4. XI系を利用したキシロース発酵酵母の開発

もう一方のキシロース代謝系であるXI系を利用した遺伝子組換え酵母の開発も行われている。XI系ではXR-XDH系のような補酵素の不均衡やそれに由来するキシリトール蓄積の問題が起こらないため、理論上、XI系の方が優れていると考えられてきた。XI系を酵母に導入することによりキシロース発酵能を付与する試みが数多く行われてきたものの、XIが原核生物由来であるため、真核生物である酵母において、十分な機能(活性)をもった形でXIを発現させることが困難であった。

しかし、2003年になって、オランダDelft大学のPronkのグループによって、真菌由来のXI遺伝子を*S. cerevisiae*で発現させることに成功している³⁾。彼らは嫌気性腸内真菌の一種である*Pyromyces* sp. E2が、真菌の一般的なキシロース代謝系であるXR-XDH系ではなく、原核生物と同様のXI系を有していることを見出した。この発見を契機に*Pyromyces*類縁の真菌や他の嫌気性微生物からXI遺伝子の単離が行われ、XI系の研究開発が再び活発化している。日本の豊田中研と理研のグループは、シロアリの腸内原生物のcDNAライブラリーからXI遺伝子を単離し、*S. cerevisiae*に導入することにより、良好なキシロース

発酵能を得ている¹³⁾。

このように *S. cerevisiae* で機能する XI の発見によって、XR-XDH 系の最大の課題であった補酵素不均衡の問題を解消することができた。しかしながら、*S. cerevisiae* で発現させた XI は本来の活性よりも低く、キシロースを効率的にエタノール発酵させるには十分とは言えない。このため、多コピープラスミドを用いる¹⁴⁾、あるいは宿主酵母の染色体上に多コピーの XI 遺伝子を組み込むことによって¹⁵⁾、XI 遺伝子を大量発現させる必要がある。また、組換えを行った直後の酵母細胞ではキシロース発酵能が低いため、組換え体をキシロース培地でしばらく馴化させる工夫も行われている¹⁶⁾。加えて、XI 系の組換え体は XR-XDH 系の組換え体と比べ、エタノール収率は高いものの、生産性が低い（発酵速度が遅い）という問題点も指摘されている。

3.5. L-アラビノース発酵酵母の開発

リグノセルロース系バイオマスの中には、キシロース以外の五炭糖として L-アラビノースも含まれている。キシロースに比べると含有量は少ないものの、稲わらなどの草本系のバイオマスには 3~5% 程度の L-アラビノースが含まれている（図 1）。

キシロースの場合と同様、*S. cerevisiae* は L-アラビノースも利用することができないが、他の真菌や細菌の中には、L-アラビノースを資化できるものが存在している。そして、これもキシロースの場合と同様に、代謝経路は真菌と細菌との間で異なっている（図 3）。

真菌の場合は、まず L-アラビノースが XR によって L-アラビトールに還元される。（XR の基質特異性は広く、L-アラビノースにも反応する。）次に、L-アラビトール 4-デヒドロゲナーゼ（LAD）によって L-キシルロースに酸化される。L-キシルロースは、L-キシルロースレダクターゼ（LXR）によってキシリトールに還元され、キシリトールデヒドロゲナーゼ（XDH）によってキシルロースに酸化され、さらにキシルロース 5-リン酸にリン酸化される。その後、キシロースの場合と同様にペントースリン酸経路を介して代謝される。

一方、細菌の場合は、L-アラビノースは L-アラビノースイソメラーゼ（AI）によって、L-リブロースに変換された後、リブロキナーゼ（RK）によって L-リブロース 5-リン酸にリン酸化される。その後、L-リブロース 5-リン酸 4-エピメラーゼ（RPE）によってキシルロース 5-リン酸に変換され、ペントースリン酸経路に入る。

L-アラビノースをエタノールに変換する酵母を作り出すために、この 2 つの L-アラビノース代謝系の利用が行われている。Richard らは真菌の L-アラビノース代謝系を構成する 4 つの遺伝子（*Trichoderma reesei* 由来の LAD 及び LXR、*S. stipitis* 由来の XR 及び XDH）を *S. cerevisiae* 内で高発現させ、収率は低いもの

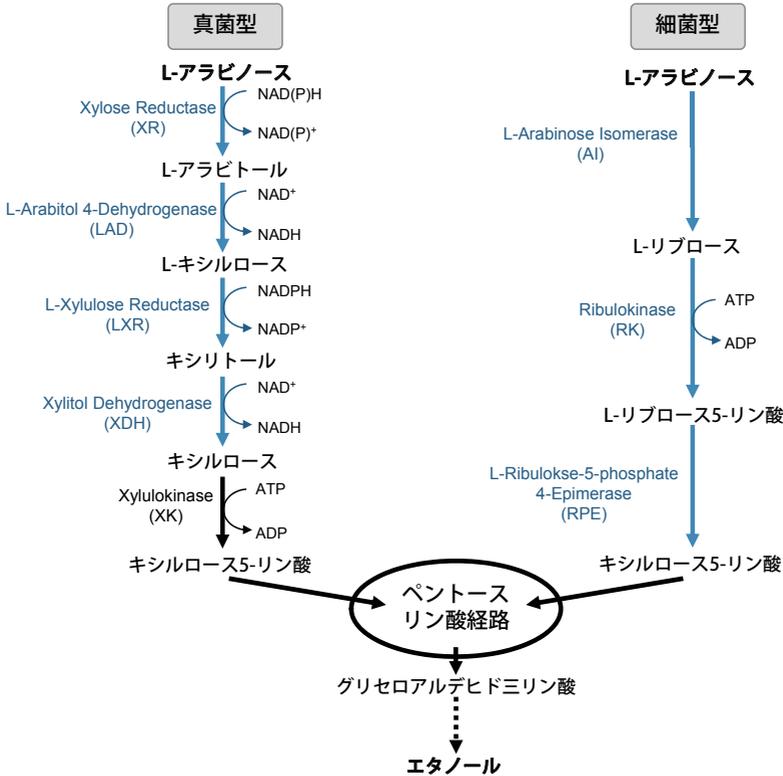


図 3. L- アラビノース代謝経路の模式図

L-アラビノース資化性微生物のみが有する代謝経路は青で、*S. cerevisiae* にも存在する代謝経路は黒で示す。

のL-アラビノースをエタノールに変換することに初めて成功した¹⁷⁾。

一方、Hoの研究グループは、細菌のL-アラビノース代謝系を利用して、大腸菌由来のAI, RK, RPEをコードする3つの遺伝子を*S. cerevisiae*で発現させた¹⁸⁾。組換え酵母内でこれら3つの酵素は活性を示したものの、エタノールは検出されず、細菌の代謝系の利用は困難と思われた。Beckerらは、大腸菌由来のAI遺伝子の代わりに枯草菌(*Bacillus subtilis*)由来のAI遺伝子を、大腸菌由来のRK, RPEと一緒に発現させることにより、L-アラビノースからエタノールを作り出している¹⁹⁾。この時、L-アラビノースの酵母細胞への取込能を増強するために、L-アラビノースに対して輸送活性を示すガラクトース輸送体遺伝子(*GAL2*)を酵母で高発現させる改良も付け加えている。また、遺伝子組換え

株をL-アラビノースを含む培地で馴化培養することによって、最終的にL-アラビノース（基質濃度：20g/L）の発酵収率を理論値の60%にまで高めることに成功している。さらに彼らは、この馴化の過程で、①組み込んだRKの活性が低下することと、②ペントースリン酸経路を構成するトランスアルドラーゼの発現量が増加することを発見しており、この2つの代謝調整がL-アラビノースの発酵能向上に有効であることを示唆している。また、Wisselinkらは、*Lactobacillus plantarum*のAI、RK、RPEを*S. cerevisiae*で発現させることにより、理論値の88%に相当する非常に高い収率のL-アラビノース発酵（基質濃度：20g/L）を達成している²⁰⁾。彼らは、AI遺伝子とRPE遺伝子は多コピープラスミドによって、RK遺伝子は単一コピーでの染色体への組み込みによって発現させることにより、先にBeckerらが示したような遺伝子発現量の調整を行っている。さらに、宿主酵母に対しても、遺伝子組換えによりペントースリン酸経路の高発現、内在性アルドースレダクターゼの欠損といった改良を加えている。

3.6. キシロース／L-アラビノース共発酵酵母の開発

L-アラビノース発酵の成功により、キシロースとL-アラビノースという2種類の五炭糖を同時に発酵する酵母の開発も可能となった。キシロース、L-アラビノース、それぞれに真菌型と細菌型の2種類の代謝系が存在することはこれまでに説明した。両者の組み合わせとして、①真菌型キシロース発酵系+細菌型アラビノース発酵系、②真菌型キシロース発酵系+真菌型アラビノース発酵系、③細菌型キシロース発酵系+細菌型アラビノース発酵系、の3種類がこれまでに行われている。

①の方法では、キシロース代謝系のXRがL-アラビノースに対しても反応し、ほとんどのL-アラビノースはL-アラビトールに還元されてしまい、細菌型のL-アラビノース代謝系では代謝することはできず、この方法で効率的にエタノールを生産することは出来なかった²¹⁾。

これに対して②の方法では、Bettigaらによって両ペントースからエタノールを生産することに成功している²²⁾。彼らは、*S. stipitis*由来のXRとXDHに加え、*T. reesei*由来のLAD、*Ambrosiozyma monospora*由来のLXRを遺伝子組換えにより*S. cerevisiae*に導入している。キシロース発酵の際に問題となったキシリトールの蓄積を抑制するために、導入する酵素の補酵素特異性が揃えられていることが注目される。野生型のXRはNADPHとNADHの両者を補酵素として用いるが、彼らは270番目のリジンがアルギニンに置換したXR(K270R)を用いており、この変異型XRは野生型に比べNADHに対する親和性が増している。さらに、通常のLXRはNADPH依存型であるのに対して、ここで用いられている*A. monospora*由来のLXRはNADH依存型であることが知られている。また、LAD、XDHも元々NAD依存型である。さらに、宿主の内在性アルド-

スレダクターゼ (NADPH/NADH 両依存性) の欠損や宿主細胞のペントースリン酸経路および XK の高発現も遺伝子組換えにより行っている。このような徹底した細胞内補酵素バランスの調整と宿主代謝系の増強により、グルコース、キシロース、L-アラビノースの混合物 (基質濃度: 各 20 g/L) から理論収率の 45% でエタノールを生産している。

③の方法は、Wisselink らによって、*Lactobacillus plantarum* の AI, RK, RPE と *Piromyces sp. strain E2* 由来の XI 遺伝子を導入することにより行われている²³⁾。宿主酵母には XK の高発現、ペントースリン酸経路の高発現、内在性アルドースレダクターゼの欠損をしたものを用いている。この組換え酵母をキシロースやアラビノースを含む培地で馴化培養することより、最終的にグルコース (30 g/L)、キシロース (15 g/L)、L-アラビノース (15 g/L) の混合物から、理論収率の 84-86% でエタノール発酵を行っている。

3.7. セロビオース発酵を利用したキシロース発酵の効率化

リグノセルロース系バイオマスには種類の異なる複数の糖が含まれており、バイオマスから実際にエタノールを製造する際には、複数の糖の混合物を発酵しなければならない。ここで問題となるのが、グルコースが存在すると他の糖の利用が抑制される、いわゆる「グルコースリプレッション」という現象である。これまでに数々の改良がなされてきたが、キシロースの発酵速度はグルコースのそれに比べ数段遅い。さらに、グルコース共存下ではグルコースが消費されるまでキシロースの発酵が妨げられるため、キシロース発酵にさらに時間がかかる。発酵にかかるコストを下げるためには、発酵収率の向上と並んで、発酵時間の短縮が重要な因子である。

リグノセルロース系バイオマスに含まれるグルコースは、最初はその大部分がセルロースの形で存在している。セルロースはエンドグルカナーゼとセロビオヒドラーゼの働きにより 2 分子のグルコースが繋がったセロビオースに分解され、さらに β -グルコシダーゼによりグルコースに分解される。セロビオースはグルコースリプレッションを起こさないため、グルコースまで分解せずに、セロビオースの形でキシロースと同時に発酵させる方法が考案された。この方法では、セロビオースのまま酵母菌体に取り込ませなければならない。Galazka ら²⁴⁾ や Harada ら²⁵⁾ は *Neurospora crassa* がセロデキストリン (セロビオース, セロトリオース, セロテトラオースなどの総称) の輸送体 (CDT-1) を有することを見出した。また、*N. crassa* は分泌型ではない細胞内に局在する β -グルコシダーゼ (GH1-1) を持つこともわかった。彼らは XR-XDH 系の導入によりキシロース発酵能を付与した *S. cerevisiae* に、CDT-1 と GH1-1 を組み込むことにより、セロビオースとキシロースを同時に発酵する酵母を開発した。100 g/L のグルコースと 60 g/L のキシロースの混合液を発酵させた場合は、72 時間経っても 1/3 のキシロ-

スが残存し、エタノール収率は理論値の61%であった。一方、100 g/Lの「セロビオース」と60 g/Lのキシロースの混合液を発酵させた場合には、72時間後にはすべてのキシロースが消費されエタノール収率も理論値の74%であった。

4. 高温キシロース発酵法の開発

本項では、著者らが行った高温でのキシロース発酵の意義と開発内容について紹介する。

4.1. 高温発酵の必要性

稲わらのようなリグノセルロース系バイオマスからエタノールを生産するためには、「前処理」、「糖化」、「発酵」の3つの工程が必要である。糖化と発酵の組み合わせには、糖化を行ってから発酵を行う単行複発酵 (Separate Hydrolysis and Fermentation 以下, SHF と略す)、糖化と発酵を同時に行う並行複発酵 (Simultaneous Saccharification and Fermentation 以下, SSF と略す) がある。

SSFでは糖化によって生成した糖が酵母によって速やかにエタノール発酵に利用されるため、糖化酵素の生成物阻害を回避できるという大きな利点がある。しかし、酵素糖化に最適な温度が50℃程度であるのに対して、*S. cerevisiae*による発酵に最適な温度は30℃程度であり、30℃でSSFを行った場合には、糖化収率（特にキシロースの糖化収率）が低下することがわかっている（図4）。糖化酵素の添加量を増やすことによってこの問題を解決することはできるが、大幅なコスト増に繋がる。したがって、40～45℃といった、より糖化酵素の至適温度に近い温度で発酵可能な酵母を利用した発酵方法の開発が、SSFの実用化に必要不可欠であると考えられている。高温発酵の導入は、SSFだけでなく、SHFにおいても、糖化工程から発酵工程に移る際の冷却エネルギーの節約に繋がることや、雑菌汚染のリスクを低減できることから、そのメリットは大きい。

食総研の徳安らが開発した前処理技術であるCaCCO法²⁶⁾は、洗浄工程を必要としないためキシランの流亡が極めて少なく、希硫酸法等と比べキシロースの回収率が高いことが1つの特徴である。したがって、効率的なキシロースの糖化及び発酵法を組み合わせることにより、CaCCO法の利点を最大限活用することが可能になる。

これまでの酵母を用いた高温発酵の研究では、グルコースの発酵については良好な結果が出ているものの、キシロースについては実用化に結び付くような高いエタノール収率を示す報告は無い。40℃以上の高温でもキシロースを資化できる酵母として、*Kluyveromyces* sp. IIPE453²⁷⁾ や *Hansenula polymorpha*²⁸⁾ が報告されているが、これらの酵母のエタノール発酵能はいずれも10%未満と低かった。

遺伝子組換えによりキシロース発酵能を付与した *S. cerevisiae* について、40℃以上の高温におけるエタノール発酵能を調べた報告が見当たらなかったことか

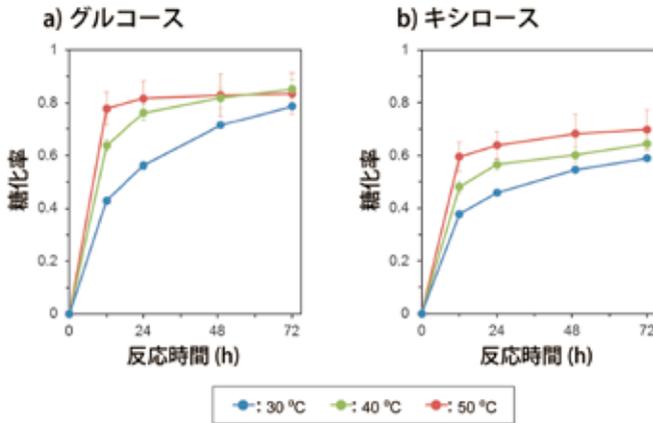


図4 稲わらの酵素糖化に対する温度の影響

CaCCO 法により前処理した稲わらを、30℃、40℃、50℃において、酵素（ノボザイム社 Celluclust 1.5L, Novozyme 188, Ultraflo L）を用いて糖化処理した。稲わら中に含まれる全グルコース量（a）、全キシロース量（b）を1として、糖化処理によって反応液中に遊離したグルコース（a）、キシロース（b）の割合を示した。

ら、著者らは XR-XDH 系を導入した組換え体を作成し、キシロース発酵に対する発酵温度の影響を調べた。宿主には、実験室株よりも温度などのストレスに対する耐性が高い実用株である *S. cerevisiae* NBRC0224 を用いた。その結果、グルコースについては40℃でも問題無く発酵できたのに対して、キシロース発酵能は37℃以上では顕著に低下することが認められた（図5a）。このことから、通常の *S. cerevisiae* を用いてキシロース発酵を高温で行うことは困難であると考えられた。

4.2. 高温同時異性化発酵のための酵母の選抜

キシロースの高温発酵（40℃）に適した酵母株を選抜するにあたって、キシロースの発酵能を指標にスクリーニングを行うこととした。3.2. で述べたように、キシロースを発酵できない *S. cerevisiae* のような酵母でも、キシロースを発酵することはできる。キシロース発酵能の優れた株を取得できれば、あとはキシロースからキシロースへの代謝系を補うことにより、目的とするキシロース発酵が可能であると考えた。

著者らは、食総研が所有する酵母株の中から、40℃でキシロース発酵可能な酵母株として、*Candida glabrata* NFRI3163 を単離した。この酵母はキシロース

ス発酵能が高いだけでなく、40℃において *S. cerevisiae* を上回るエタノール耐性を有していたことから、高温エタノール発酵に適した酵母株であると考えられた (図6)。

C. glabrata はそのゲノム配列の解析により、*S. cerevisiae* に近縁の酵母であることが明らかにされており²⁹⁾、*S. cerevisiae* の遺伝子組換えの手法が転用できることから、遺伝子組換えの宿主として扱いやすい。ただし、*S. cerevisiae* と同様に、キシロースを炭素源として利用することはできなかった。

著者らは、*C. glabrata* NFRI3163 について、*S. cerevisiae* と同様に XR-XDH 系を組み込んだキシロース発酵株を構築した。その結果、図5bに示すように、*S.*

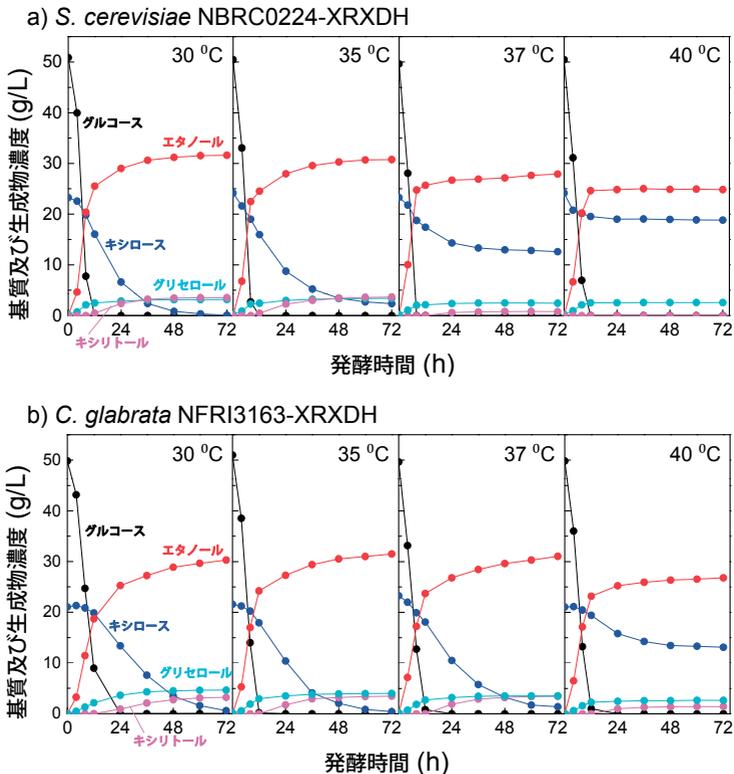


図5 XR-XDH系を導入した遺伝子組換え酵母によるエタノール発酵

50 g/L グルコース及び20 g/L キシロースを含む培地を用いて各酵母を図中に示した温度で培養し、培養液中の糖類やエタノールの濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により定量した。

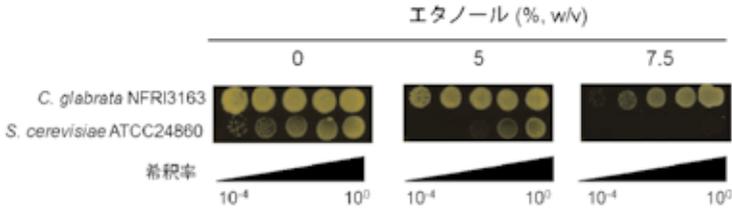


図6 40℃におけるエタノール耐性

5% (w/v), 7.5% (w/v)のエタノールを含む、あるいはエタノールを含まない寒天培地上に菌体濃度を変えて接種し、40℃で3日間静置培養した。

cerevisiae ではキシロース発酵能が低下した 37℃においても、NFRI3163 は高いキシロース発酵能を維持しており、NFRI3163 は *S. cerevisiae* よりも高温でキシロースの発酵ができることが明らかになった。しかし、40℃まで発酵温度を上げるとキシロース消費量の低下が見られた (図 5b)。NFRI3163 が 40℃でもキシロースを発酵できることは確認しており、この 40℃におけるキシロース発酵能の低下は、キシロースからキシルロースに至る経路の阻害に起因するものと考えられた。

そこで、同時異性化発酵法 (Simultaneous Isomerization and Fermentation 以下、SIF と略す) の利用を検討した。SIF におけるキシロース代謝反応は、微生物における XI 系の代謝反応 (図 2) と同じである。ただし、XI 代謝系では、細胞内にキシロースが取り込まれてからキシルロースへ変換されるのに対して、SIF では発酵液中に XI 酵素 (「グルコースイソメラーゼ」の名称で市販、以下 GI と略す) を添加することにより、発酵液中でキシロースがキシルロースに異性化され、生成したキシルロースを酵母が取り込み発酵することによってエタノールが生産される。SIF では、細胞内でのキシロースからキシルロースへの代謝を必要としないため、上で見られた高温におけるキシロースの代謝阻害を回避できるのではないかと考えた。

C. glabrata NFRI3163 を用いた 40℃における SIF によるキシロース発酵の実験結果を図 7b に示す。NFRI3163 は、コントロールとして用いた *S. cerevisiae* ATCC24860 株 (図 7a, キシルロース発酵能が高い *S. cerevisiae* 株³⁰⁾) よりも 2.5 倍高いエタノール収率を示した。しかし、発酵収率は理論値の半分程度にとどまり、NFRI3163 のキシルロース発酵能をさらに高める必要があると考えられた。また、キシリトールの蓄積が *S. cerevisiae* よりも多く見られた。SIF によるキシロース発酵では XR を利用しないことから、キシリトールの蓄積は起こらないと理論上は考えられる。しかし、実際には、*GRE3* 遺伝子によってコードされる基質特異性の広いアルドースレダクターゼが酵母細胞内に存在することが知られ

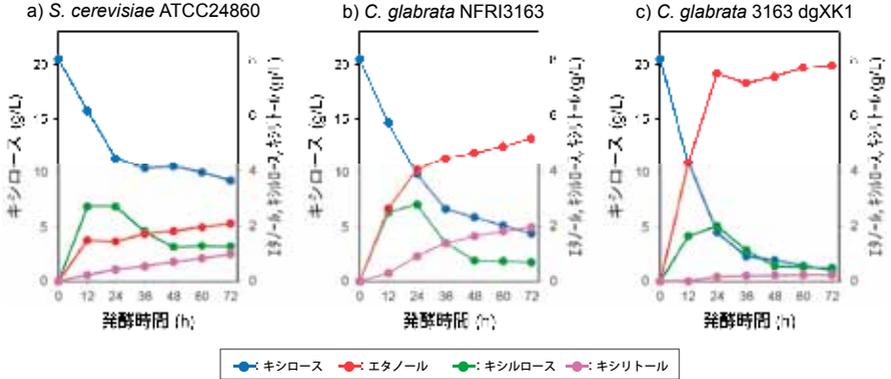


図7 40°Cにおける同時異性化発酵 (SIF) によるキシロース発酵

20 g/Lのキシロースを含む培地に、コントロール株である *S. cerevisiae* (a), NFRI3163 株 (b) NFRI3163 を改良した 3163 dgXK1 株 (c) を植菌し、40°Cで72時間発酵を行った。発酵液中の糖およびエタノール濃度はHPLCで定量した。

しており、この酵素の働きによってキシロースが非特異的に還元されたものと推測された。そこで次に、NFRI3163のキシルロース発酵能の向上とキシリトール生成抑制を目指して、遺伝子組換えによる改良を行った。

4.3. 高温同時異性化発酵のための酵母の改良

キシルロース発酵能の向上のために、*C. glabrata* NFRI3163 からキシルロキナーゼをコードする *XK* 遺伝子をクローニングし、高発現プロモーターであるホスホグリセロキナーゼ (*PGK1*) プロモーターの下流に連結後、NFRI3163 の染色体に組み込んだ。一方、キシリトールの生成を抑えるために、*GRE3* 遺伝子を NFRI3163 からクローニングし、相同組換えによる遺伝子破壊に用いた。

C. glabrata と *S. cerevisiae* とは近縁の酵母であると述べたが、両者の遺伝子組換え機構には大きく異なる点がある。*S. cerevisiae* は相同組換えが高い頻度で起こるため、相同配列を付加することにより、染色体上の目的の位置に外来遺伝子を挿入することが容易にできる。これに対して、*C. glabrata* は相同組換えよりも非相同末端結合と呼ばれる様式の遺伝子組換えが起こりやすく、導入した遺伝子は染色体上のランダムな位置に挿入される。*C. glabrata* NFRI3163 の *GRE3* 遺伝子を破壊するために相同組換えを試みたが、得られた組換え体の96%はランダムな位置に外来のDNA断片が挿入されており、目的とする *GRE3* の位置にDNA断片が挿入されたものは4%に過ぎなかった (図8)。

XKの高発現と *GRE3* の欠損を行った遺伝子組換え株を 3163 dgXK1 と名付け、

40℃におけるキシロースのSIFを行った。その結果、発酵72時間で、20 g/Lのキシロースから7.8 g/Lのエタノールを生産した(図7c)。また、キシリトールの蓄積も極めて低く抑制されていた。エタノール収率は理論値の75%にあたり、40℃という高温において高いエタノール収率を得ることに成功した。

4.4. 高温同時異性化発酵の実用化に向けて

これまでSIFがあまり普及しなかった原因として、GIの至適pHが中性付近であるのに対して、酵母の発酵液のpHは酸性であることから、GIが十分機能できなかったことが考えられる。CaCCO法の特徴として、発酵液のpHが中性付近に維持されることが見出されており、CaCCO法はSIFに適した前処理方法

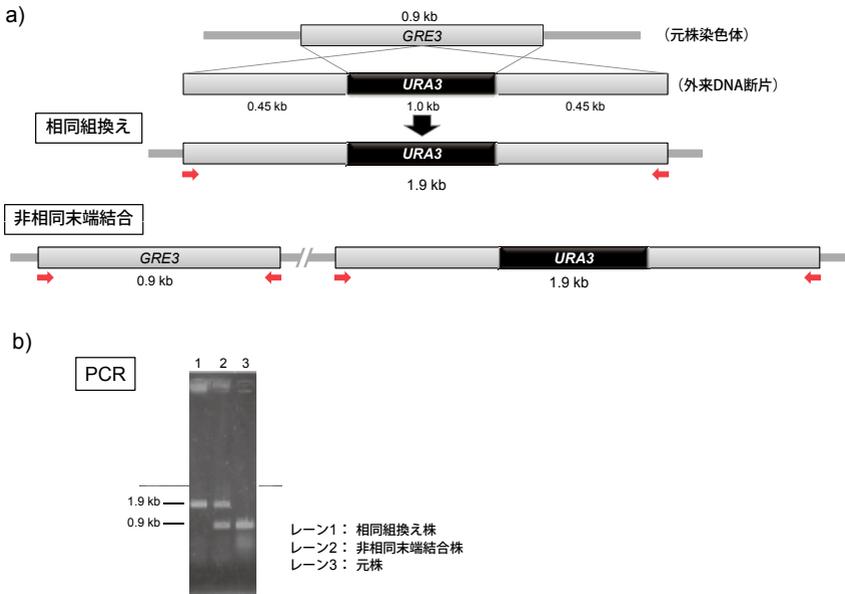


図8 相同組換えによるアルドースレダクターゼ (*GRE3*) 遺伝子の欠損

(a) 相同組換えと非相同末端結合による染色体への外来DNA断片 (*GRE3* 遺伝子の中央に *URA3* 遺伝子を挿入したもの) の挿入様式を模式図で示した。相同組換えが起こった場合のみに染色体上の *GRE3* 遺伝子の欠損が起こる。

(b) コロニーダイレクトPCRによる相同組換えと非相同末端結合の判別を示す。ウラシル要求性の消失を指標に選択した菌体を直接PCRにかけることにより、相同組換えを起こしたものでは1.9 kbのDNA断片のみ(レーン1)が、非相同末端結合を起こしたものでは1.9 kbと0.9 kbの2種類のDNA断片(レーン2)が得られる。用いたPCRプライマーの結合位置は、(a)中に赤矢印で示した。

と言える。実際に、CaCCO法で前処理した稲わらに対して、SSFとSIFとを組み合わせで発酵を行ったところ、40℃でグルコース、キシロースの双方からエタノールを生産できることを確認している³¹⁾。

これまでに報告されている高収率でキシロースを発酵する酵母の殆どは、異種遺伝子を含む遺伝子組換え体である。著者らが開発した高温SIFに適した酵母には異種遺伝子の導入が必須では無いため、将来的にはセルフクロニングや従来育種法によっても同様の性能を発揮することが可能であろう。このことは、リグノセルロース系バイオマス为原料としたバイオエタノール生産の実用化にとって、大きなメリットと言える。なお、本法が適用できる酵母は、今回用いた*C. glabrata* NFRI3163に限らない。高温でキシロース発酵能の優れた酵母であれば、同様の改良を行うことにより、高い収率でエタノール生産を行うことが可能になると考えられる。

5. おわりに

リグノセルロース系バイオマスからエタノールを作るためには、「前処理」、「糖化」、「発酵」の3つの工程が必要である。実際にバイオエタノールを生産する際には、これらの工程を切り分けることはできない。研究段階ではどうしても各論に入りがちだが、たとえ「発酵」の研究であっても、常に他の工程との関係を意識して、プロセス全体を最適化するという観点から研究開発を進めることが肝要であろう。特にバイオマス利用に関わる研究では、その時々々の社会情勢、すなわち経済状況、エネルギーや農産物の需給バランス、あるいは環境問題への人々の関心度、そして、それらを反映した国内外の法規制、ガイドラインや政府の施策、といった様々な外的要因にも大きく影響を受ける。我々の高温発酵の研究も開発途上であるが、着実に実用化に結び付くよう研究を進めていきたい。

謝辞

高温キシロース発酵法の開発については、農林水産省委託研究プロジェクト「地域活性化のためのバイオマス利用技術の開発」によって実施されたものである。

(食品バイオテクノロジー研究領域 機能分子設計ユニット 榊原 祥清)

引用文献

- 1) 日本貿易振興機構農林水産・食品部：「平成23年度米国食糧及びバイオ燃料生産の現状と課題」(2012)。
- 2) Thalagala, T. A. T. P., Kodama, S., Mishima, T., Isono, N., Furujo, A., Kawasaki, Y., and Hisamatsu, M.: Study on ethanol fermentation using D-glucose rich fractions obtained from lignocelluloses by a two-step extraction

- with sulfuric acid and *Issatchenkia orientalis* MF 121, J. Appl. Glycosci., **56**, 7-11 (2009).
- 3) Kuyper, M., Harhangi, H. R., Stave, A. K., Winkler, A. A., Jetten, M. S. M., de Laat, W. T. A. M., den Ridder, J. J. J., Camp, H. J. M. O. d., van Dijken, J. P., and Pronk, J. T.: High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*?, FEMS Yeast Res., **4**, 69-78 (2003).
 - 4) Ho, N. W. Y., Chen, Z., and Brainard, A. P.: Recombinant yeasts for effective fermentation of glucose and xylose, US Patent 5,789,210 (1998)
 - 5) Jeppsson, M., Bengtsson, O., Franke, K., Lee, H., Hahn-Hägerdal, B., and Gorwa-Grauslund, M. F.: The expression of a *Pichia stipitis* xylose reductase mutant with higher K_m for NADPH increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, Biotechnol. Bioeng., **93**: 665-673 (2006).
 - 6) Watanabe, S., Abu Saleh, A., Pack, S. P., Annaluru, N., Kodaki, T., and Makino, K.: Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein engineered NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase, J. Biotechnol., **130**: 316-319 (2007).
 - 7) Träff, K., L., Cordero Otero, R. R., van Zyl, W. H., and Hahn-Hägerdal, B.: Deletion of the *GRE3* aldose reductase gene and its influence on xylose metabolism in recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *xylA* and *XKSI* genes, Appl. Environ. Microbiol., **67**: 5668-5674 (2001).
 - 8) Roca, C. Nielsen, J., and Olsson, L.: Metabolic engineering of ammonium assimilation in xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production, Appl. Environ. Microbiol., **69**: 4732-4736 (2003).
 - 9) Verho, R., Londesborough, J., Penttilä, M., and Richard, P.: Engineering redox cofactor regeneration for improved pentose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Environ. Microbiol., **69**: 5892-5897 (2003).
 - 10) Jin, Y. S. and Jeffries, T. W.: Changing flux of xylose metabolites by altering expression of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Biochem. Biotechnol., **105-108**: 277-286 (2003).
 - 11) Karhumaa, K., Fromanger, R., Hahn-Hägerdal, B., and Gorwa-Grauslund, M. F.: High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Microbiol. Biotechnol., **73**: 1039-1046 (2007).
 - 12) Matsushika, A. and Sawayama, S.: Efficient bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* requires high activity of

- xylose reductase and moderate xylulokinase activity, *J. Biosci. Bioeng.*, **106**: 306-309 (2008).
- 13) 片平悟史, 徳弘健郎: 「キシロースイソメラーゼ及びその利用」, 特開 2011-147445 (2011).
 - 14) Madhavan, A., Tamalampudi, S., Ushida, K., Kanai, D., Katahira, S., Srivastava, A., Fukuda, H., Bisaria, V. S., and Kondo, A.: Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**, 1067-1078 (2009).
 - 15) Tanino, T., Hotta, A., Ito, T., Ishii, J., Yamada, R., Hasunuma, T., Ogino, C., Ohmura, N., Ohshima, T., and Kondo, A.: Construction of a xylose-metabolizing yeast by genome integration of xylose isomerase gene and investigation of the effect of xylitol on fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **88**, 1215-1221 (2010).
 - 16) Madhavan, A., Tamalampudi, S., Srivastava, A., Fukuda, H., Bisaria, V. S., and Kondo, A.: Alcoholic fermentation of xylose and mixed sugars using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose utilization, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**, 1037-1047 (2009).
 - 17) Richard, P., Verho, R., Putkonen, M., Londesborough, J., and Penttilä, M.: Production of ethanol from L-arabinose by *Saccharomyces cerevisiae* containing a fungal L-arabinose pathway, *FEMS Yeast Res.*, **3**, 185-189 (2003).
 - 18) Sedlak, M. and Ho, N. W. Y.: Expression of *E. coli araBAD* operon encoding enzymes for metabolizing L-arabinose in *Saccharomyces cerevisiae*, *Enzyme Microb. Technol.*, **28**, 16-24 (2001).
 - 19) Becker, J. and Boles, E.: A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-arabinose and produces ethanol, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 4144-4150 (2003).
 - 20) Wisselink, H. W., Toirkens, M. J., Berriel, M. d. R. F., Winkler, A. A., van Dijken, J. P., Pronk, J. T., and van Maris, A. J. A.: Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic alcoholic fermentation of L-arabinose, *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4881-4891 (2007).
 - 21) Karhumaa, K., Wiedemann, B., Hahn-Hägerdal, B., Boles, E., and Gorwa-Grauslund, M. F.: Co-utilization of L-arabinose and D-xylose by laboratory and industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains, *Microb. Cell Fact.*, **5**, 18 (2006).
 - 22) Bettiga, M., Bengtsson, O., Hahn-Hägerdal, B., and Gorwa-Grauslund, M. F.: Arabinose and xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing a fungal pentose utilization pathway, *Microb. Cell*

- Fact., **8**, 40 (2009).
- 23) Wisselink, H. W., Toirkens, M. J., Wu, Q., Pronk, J. T., and van Maris, A. J. A.: Novel evolutionary engineering approach for accelerated utilization of glucose, xylose, and arabinose mixtures by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains, *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 907-914 (2009).
 - 24) Galazka, J. M., Tian, C., Beeson, W. T., Martinez, B., Glass, N. L., and Cate, J. H.: Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production, *Science*, **330**, 84-86 (2010).
 - 25) Ha, S. J., Galazka, J. M., Kim, S. R., Choi, J. H., Yang, X., Seo, J. H., Glass, N. L., Cate, J. H., and Jin, Y. S.: Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**, 504-509 (2011).
 - 26) Park, J. Y., Shiroma, R., Al-Haq, M. I., Zhang, Y., Ike, M., Arai-Sanoh, Y., Ida, A., Kondo, M., and Tokuyasu, K.: A novel lime pretreatment for subsequent bioethanol production from rice straw - Calcium capturing by carbonation (CaCCO) process, *Bioresour. Technol.*, **101**, 6805-6811 (2010).
 - 27) Kumar, S., Singh, S. P., Mishra, I. M., and Adhikari, D. K.: Ethanol and xylitol production from glucose and xylose at high temperature by *Kluyveromyces* sp IPE453, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 1483-1489 (2009).
 - 28) Dmytruk, O. V., Voronovsky, A. Y., Abbas, C. A., Dmytruk, K. V., Ishchuk, O. P., and Sibirny, A. A.: Overexpression of bacterial xylose isomerase and yeast host xylulokinase improves xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*, *FEMS Yeast Res.*, **8**, 165-173 (2008).
 - 29) Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., et al.: Genome evolution in yeasts, *Nature*, **430**, 35-44 (2004).
 - 30) Yu, S., Jeppsson, H., and Hahn-Hägerdal, B.: Xylulose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and xylose-fermenting yeast strains, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**, 314-320 (1995).
 - 31) 榎原祥清, 王曉輝, 中村敏英, 徳安健: 「キシロースを高温で発酵する方法」, 特願 2012-135883 (2012).