

## ■研究課題名

### 耐熱性発酵微生物の「耐熱性」分子機構の解明と発酵産業への利用

## ■研究の目的

酵母や酢酸菌などの有用発酵微生物は一般に低温（15-25℃）を好むことから、発酵生産においては厳密な温度制御が求められる。好熱性ではなく、より高温（+10-20℃を想定）に適応した耐熱性菌の分離もしくは適応的変異育種がこの問題を解決できる。本研究では、常温性ならびに耐熱性を有する酵母、酢酸菌、大腸菌のゲノムワイドな解析を通じて、「耐熱性」の分子機構を解明し、その成果を利用した高温発酵系の開発に取り組む。

## ■研究項目・実施体制（◎は研究代表者）

- ①酵母の耐熱性機構の解析と高温アルコール発酵酵母の育種  
（星田尚司／山口大学工学部）
- ②大腸菌の熱ショック応答及び耐熱性機構の解析  
（山田 守、高坂智之／山口大学農学部）
- ③耐熱性酢酸菌の耐熱性機構の解明と高温酸化発酵系の開発  
（◎松下一信、薬師寿治、足立収生／山口大学農学部、東 慶直／近畿大学、外山博英／琉球大学）
- ④耐熱性酵母及び酢酸菌の常温菌との比較ゲノム解析  
（東 慶直／近畿大学、◎松下一信／山口大学農学部）
- ⑤耐熱性酵母の耐熱性機構の解析と高温エタノール発酵系の開発  
（山田 守／山口大学農学部、星田尚司／山口大学工学部）



松下一信

## ■研究の内容・主要な成果

- ①遺伝子破壊株セットを用いたゲノムワイド解析と高温感受性株の取得解析から、大腸菌、酵母*S. cerevisiae*、耐熱性酢酸菌、耐熱性*Zymomonas*菌、耐熱性酵母*K. marxianus*の耐熱性遺伝子群を明らかにした。
- ②高温下で酸化ストレスが増加するが、耐熱性分離株や高温適応変異株ではそれが低下していること、また高温感受性変異株の多くが酸化ストレス感受性を示すことを明らかにした。
- ③酢酸菌の易変異性を利用した*Acetobacter*ならびに*Gluconobacter*の高温適応変異株を作出した。
- ④エタノール生産性の耐熱性*Zymomonas*菌を育種し、高速高温エタノール発酵のための基礎を構築した。
- ⑤耐熱性酵母*K. marxianus* DMKU3-1042株が実用的な高温エタノール発酵に最適な株であることを明らかにし、さらにこの株の種々の遺伝子操作系を開発した。
- ⑥高温適応変異株を用いた高温および非温度制御酸化発酵システムを開発した。グルコースから酢酸への高温・並行複発酵に成功した。

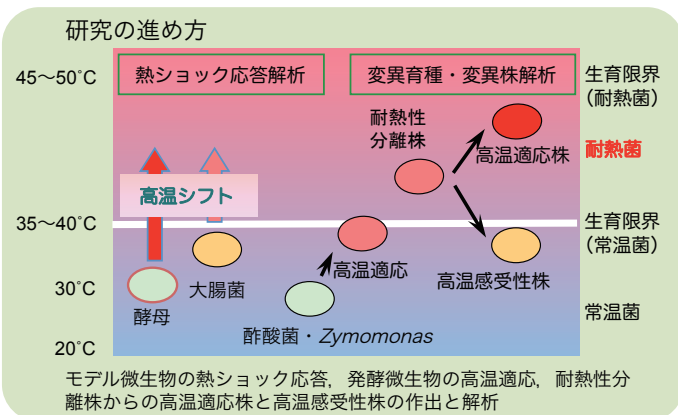
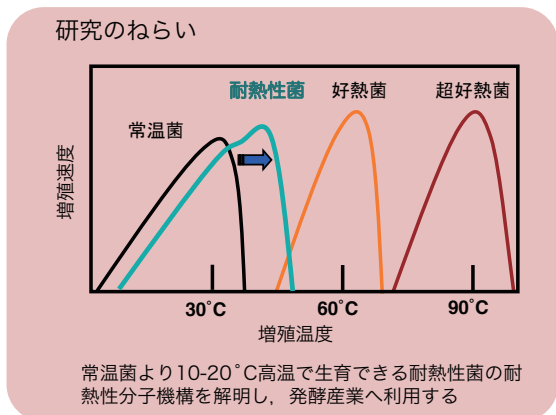
## ■今後の展開方向・見込まれる波及効果

- ①解析した5種類の微生物に共通して、高温増殖に重要な耐熱性遺伝子の機能が見えてきた。これらの機能を強化することで産業微生物の耐熱化が可能になると予測され、冷却コスト等を削減できる環境にやさしい高温発酵の実現を期待できる。
- ②耐熱性酵母*K. marxianus*は多様な糖質資化性も持っており、農産廃棄物等を原料としたエタノール発酵、特に高温発酵の特性を生かした効率的プロセスの構築が期待できる。
- ③ストレス緩和剤や細胞表層安定化剤等の添加が高温発酵を支えることが期待され、耐熱性遺伝子群の機能からも、他の有効な添加剤が推測できる。
- ④適応的変異育種技術をもとに実用的な高温酢酸発酵システムの開発が可能となり、今後、品質的に良好な菌株の育種による実用化が期待できる。
- ⑤地球温暖化による種の絶滅を抑制する「耐熱化」遺伝子・ゲノム情報を提供できる。

## ■公表した主な特許・論文

- ①特願2006-313162（外国出願PCT/JP2007/001270）：耐熱性エタノール生産酵母及びこれを用いたエタノール生産方法：国立大学法人山口大学
- ②特願2008-187206（外国出願PCT/JP2009/001214）：酵母の形質転換法：国立大学法人山口大学
- ③K. Sootsuwan, M. Yamada et al. Thermotolerant *Zymomonas mobilis*: Comparison of ethanol fermentation capability with an efficient type strain. *Open Biotech. J.*, 1: 59-65 (2007)
- ④S. Nonklang, H. Hoshida et al. High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 7514-7521 (2008)
- ⑤Y. Azuma, K. Matsushita et al. Whole-genome analyses reveal genetic instability of *Acetobacter pasteurianus*. *Nucleic Acids Res.* 37: 5768-5783 (2009)
- ⑥I. Saichana, H. Toyama et al. Screening of thermotolerant *Gluconobacter* strains for production of 5-keto D-gluconic acid and disruption of flavin adenine dinucleotide-containing D-gluconate dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 4240-4247 (2009)

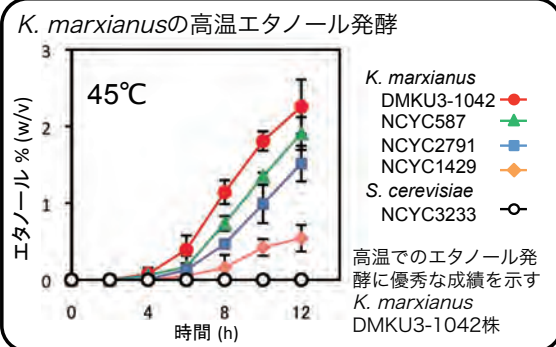
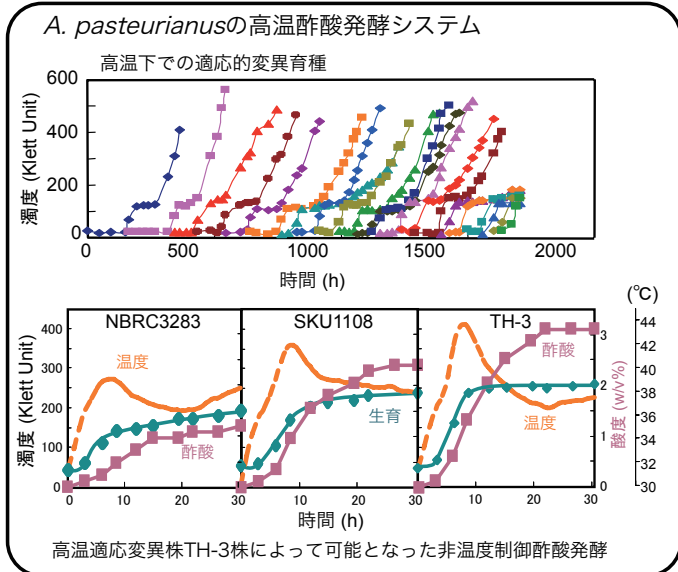
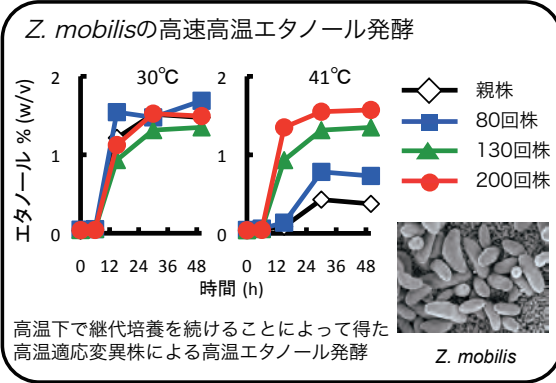
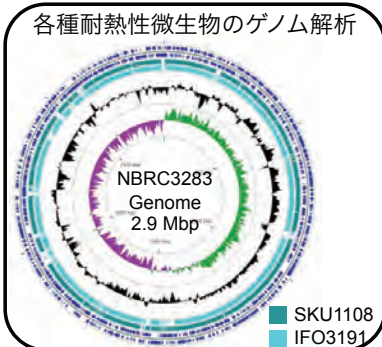
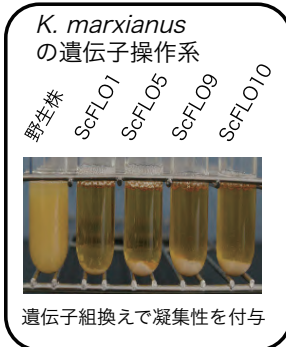
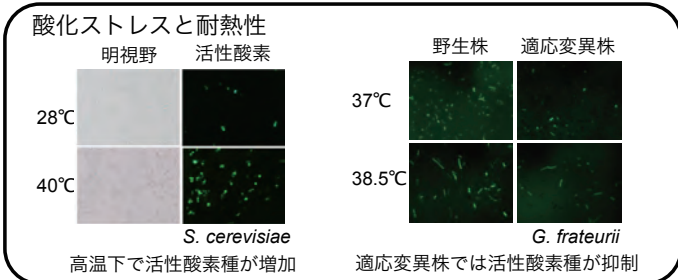
■研究成果の具体的図表



### 高温感受性株の破壊遺伝子の分類

機能 (同定遺伝子数)	Sc (125)	Km (22)	At (24)	Zm (19)	Ec (51)
変性タンパク質処理等 ストレス応答因子	8	1	8	4	4
染色体構造・DNA修復	11	2	1	4	5
細胞周期・細胞分裂	21	1	2	1	3
RNA	18	1	0	1	8
ATP生成・グルコース代謝	1	1	0	0	8
翻訳	1	0	0	0	4
膜構造	0	0	3	3	16
分泌経路・膜輸送系	27	3	2	1	2
ミトコンドリア	6	1	-	-	-
その他	27	3	3	2	0
機能未知	5	9	5	3	1

Sc, *S. cerevisiae*; Km, *K. marxianus*; At, *A. tropicalis*; Zm, *Z. mobilis*; Ec, *E. coli*



波及効果と展開

- 耐熱性微生物の利用**
  - 高温発酵システムによる冷却コストの削減
  - 遺伝子操作による有用菌株の育種
- 耐熱性遺伝子の利用**
  - 機能強化による高度耐熱性菌株の創成
  - 高温発酵を支える添加剤の推測
  - 地球温暖化による種の絶滅を抑制する遺伝子情報
- 適応的変異育種技術の利用**
  - ニーズに応じた変異育種を適応的に実施