

(様式 2)

学位論文の概要及び要旨

氏 名 小島 基

題 目 リグノセルロース糖化並行発酵細菌の代謝工学的育種に関する研究

学位論文の概要及び要旨

リグノセルロース系バイオマスから生産される第 2 世代バイオエタノールの普及拡大には、生産コストの大幅な削減と生産工程の高効率化が必須である。そのため、セルロースの糖化と発酵菌によるエタノール発酵を 1 つの反応容器で行う同時糖化発酵(SSF)による低コスト且つ高効率なバイオエタノール製造が注目されている。本研究では SSF に投入するセルロース糖化酵素カクテルの使用量を大幅に低減することによるセルロース糖化工程のコスト削減を達成するために、醸造用酵母や *Zymomonas mobilis* と同等のエタノール生産性を示す共に、幅広い糖質を発酵可能なユニークなエタノール発酵菌である *Zymobacter palmae* にセルロース糖化能を代謝工学的に賦与することにより、世界に先駆けてセルロース同時糖化発酵菌の育種を目標とした。

現在のセルロース糖化工程において使用される市販のセルロース糖化酵素カクテルは含まれるβ-グルコシダーゼ(BGL)活性が十分でなく、前処理パルプ糖化液中にセロオリゴ糖が残存し、エタノール収率の低下の原因となっている。第 2 章では、*Zb. palmae* 内で *Ruminococcus albus* 由来 BGL を高発現化することにより、セロオリゴ糖からのエタノール発酵性を改良した。すなわち、*Zm. mobilis* 由来 *gap* プロモーター制御下で *bgl* 遺伝子を発現させることで、既報の *R. albus* 由来内因性プロモーターによる発現に比べて、BGL 全活性は約 2 倍に上昇し、杉材糖化液を用いた BGL 高発現 *Zb. palmae* 株による発酵では、残存するセロオリゴ糖は同時に糖化発酵され、理論収率でのエタノール生産に成功した。さらなるセルロース糖化酵素カクテル使用量の低減のためには、高分子セルロース分解に関わるエンドグルカナーゼ(EG)やセロビオヒドロラーゼ(CBH)を *Zb. palmae* において分泌発現させることにより、セルロース分解性を賦与することが必要である。第 3 章では、*Cellulomonas fimi* 由来セルロース分解酵素群に着目し、3 種類の EG 遺伝子と 3 種類の CBH 遺伝子をクローニングして *Zb. palmae* へ導入し、セルロース分解性を検証した。その結果、クローン化した酵素の中で、非結晶性セルロース分解に優れた *CenA* を選択した。水溶性セルロースを原料として、*CenA* を分泌発現する *Zb. palmae* と BGL を分泌発現する *Zb. palmae* を連続的に反応させることでセルロースからエタノール生産が可能であることを実証した。得られた成果に基づき、第 4 章では *Pgap* プロモ-

ター制御下で CenA と BGL を共発現するプラスミド pMACD13 を構築し、*Zb. palmae* へ導入し、CenA と BGL の共発現化を行った。*Zb. palmae* (pMACD13) の培養上清において、分泌発現した CenA 活性および BGL 活性が共に認められ、水溶性セルロースから理論収率の約 80% で直接的にエタノールを生産し、セルロース同時糖化発酵菌の育種に成功した。

さらに、セルロース同時糖化発酵性の強化を目指し、導入したセルラーゼ遺伝子の高発現化と発現したセルラーゼの細胞表層への提示を検討した。第 5 章では、*Zb. palmae* におけるセルラーゼ細胞表層提示システムを開発した。植物病原細菌 *Pseudomonas syringae* の細胞外膜に表層提示される氷核タンパク質(Ina)の遺伝子を *P. syringae* ゲノム DNA からクローニングし、その外膜アンカーリングモチーフ(*inaN*)に分泌シグナルを欠損させた *C. uda* 由来 *eg* を連結して細胞表層提示型 EG を構築して *Zb. palmae* に導入し、細胞内局在性を解析した。EG の蛍光抗体を用いた細胞染色を行った結果、蛍光顕微鏡下での EG の表層発現を確認した。この結果から、Ina アンカーリングモチーフは、*Zb. palmae* において機能することが示され、セルラーゼの細胞表層提示系を新たに開発することができた。次に、セルラーゼの高密度細胞表層提示を可能にするため、*Zb. palmae* 由来の強力なプロモーター遺伝子を利用したセルラーゼの大量発現系の開発を検討した。第 6 章では、*Zb. palmae* 内で高発現する遺伝子を網羅的に解析して高発現型のプロモーター遺伝子を選択した。すなわち、DNA マイクロアレイデータから、高い発現を示した膜タンパク質遺伝子(*cr1007*)、グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(*gap*)、エノラーゼ遺伝子(*eno*)を選択し、その発現を制御するプロモーター遺伝子(*Pcr1007*, *Pzbgap*, *Pzbeno*)をクローン化した。次に、これらプロモーター遺伝子の制御下に *ccnA* をレポーターとして連結し、CcnA の発現解析とセルロース分解性を評価した。その結果、*Pzbgap* 制御下で CenA は 3.56 倍に上昇したことから、*Pzbgap* が *Zb. palmae* における異種タンパク質の発現に適したプロモーター遺伝子であることが実証された。

以上のように、本研究では、セルロース糖化工程とエタノール発酵工程の高効率化とコスト削減のために、ユニークなエタノール発酵細菌である *Zb. palmae* をターゲットとして代謝工学的にセルロース糖化能を賦与することによりセルロース同時糖化発酵菌の育種に成功した。