Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-08-13

DEVELOPMENT OF RECOMBINANT YEAST STRAINSFOR EFFICIENT ETHANOL PRODUCTION FROMLIGNOCELLULOSIC BIOMASS

片平, 悟史

(Degree)
博士 (工学)
(Date of Degree)
2006-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲3532
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003532

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

【 291 】

氏　　名・（本　籍）　片平　悟史　　（　奈良県　）

博士の専攻分野の名称　博士（工学）

学　位　記　番　号　博い第389号

学位授与の　要　件　学位規則第５条第１項該当

学位授与の　日　付　平成18年3月25日

【 学位論文題目 】

DEVELOPMENT OF RECOMBINANT YEAST STRAINS
FOR EFFICIENT ETHANOL PRODUCTION FROM
LIGNOCELLULOSIC BIOMASS
(木質系バイオマスからの効率的なエタノール生産を
目的とした酵母菌体触媒の開発)

審　査　委　員

主 査　教　授　福田　秀樹
　　　　教　授　上田　裕清
　　　　教　授　近藤　昭彦

植物バイオマスから微生物の発酵により生産されるバイオエタノールは、ガソリンの代替燃料としての利用が期待されている。これは、バイオエタノールの利用が石油資源の消費を抑え、大気中の二酸化炭素量の増加を抑制すると考えられるためである。現在、世界各国でバイオエタノールをガソリンに混合したエタノール混合ガソリンの導入が進められており、日本においてもエタノール混合ガソリンの導入が検討されるなど、今後バイオエタノールの需要は急激に増大していくものと予想される。

植物バイオマスの中でも、農産廃棄物や建築廃材、古紙などの木質系バイオマスは廃棄物として毎年膨大な量が排出されている。これら未利用の廃棄バイオマスをバイオエタノールの原料とすることで、エネルギー資源の問題や地球環境問題の解決策の一つとなることが期待されており、木質系バイオマスからのバイオエタノール生産の研究が世界規模で取り組まれている。

木質系バイオマスの主要成分はグルコースを構成単糖としたセルロースであり、それに次いで多量に存在するのがキシロースを構成単糖とするヘミセルロースである。木質系バイオマスを原料としたエタノール生産プロセスにおいて、酵母（*Saccharomyces cerevisiae* など）はその扱い易さや使用環境への安全性、高いエタノール生産性と耐性などにより、優れた候補となっている。しかし、酵母をこのプロセスに用いるにはいくつかの問題が存在する。一つは、酵母はセルロースやヘミセルロースを分解することができないこと、もう一つは、ヘミセルロースの構成成分であるキシロースを発酵に利用できないことである。そのため、酵母を用いたバイオエタノール生産プロセスでは、酸や酵素による糖化処理などの複雑な前処理工程が必要であり、また木質系バイオマス中にグルコースの次に多量に含まれるキシロースを利用できないなどの問題がある。これらの問題を解決し、バイオエタノール生産プロセスをより高効率化、低コスト化するためには、エタノール生産で用いる酵母にセルロース分解能力やキシロース利用能力を付与することが必要であると考えられている。

本論文の第一章では、キシランを直接分解・資化する酵母の開発を行った。キシランとは、木質系バイオマスにセルロースに次いで多量に含まれるヘミセルロースの主要な構成成分であり、キシロースがグリコシド結合により連なった高分子多糖である。木質系バイオマスからの効率的なエタノール生産のためには、このキシランを発酵原料として利用することが重要である。本研究では、酵母の性凝集に関わる表層タンパク質であるα-アグルチニンをアンカーとし、キシラン加水分解酵素であるキシラナーゼ及びキシロシダーゼを酵母 *S. cerevisiae* の細胞表層に機能を有した状態で提示することに成功した。またこのキシラナーゼ・キシロシダーゼ共提示酵母を用いてキシランの分解反応を行ったところ、キシランが構成単糖であるキシロースにまで分解されることが明らか

となった。さらに、酵母 *S. cerevisiae* は本来キシロースを代謝することはできないが、キシロース資化性酵母である *Pichia stipitis* 由来のキシロースレダクターゼ（XR）、キシリトールデヒドロゲナーゼ（XDH）、及び *S. cerevisiae* 由来のキシルロキナーゼ（XK）の各遺伝子を発現することで、キシロースの利用が可能となる。そこで、これらの遺伝子を上記のキシラン分解酵母に導入することにより、キシラン分解能力及びキシロース代謝能力を共に有する形質転換酵母を創製した。得られた酵母を用いて、キシランを炭素源とした直接発酵を行ったところ、キシランの分解及びエタノールの生産が確認された。このことから、高分子多糖であるキシランを分解し、直接エタノールを生産することが可能な酵母の開発に成功した。

第二章では、一報目としてセロオリゴ糖分解能力及びキシロース資化能力を有する酵母を開発し、木質系バイオマスの酸加水分解液からの効率的なエタノール生産を行った。木質系バイオマスの前処理として現在最も実現性の高い前処理プロセスは酸による加水分解である。しかし、木質系バイオマスを酸加水分解処理することで得られた酸加水分解液には、セルロースがグルコースにまで分解しきれずに残ったセロオリゴ糖や、ヘミセルロースの主成分であるキシロースが多く含まれている。しかし、これらの糖は野生の酵母では利用することができない。そこで、酵母にセロオリゴ糖分解能力やキシロース資化能力を賦与することを試みた。セロオリゴ糖分解能力を賦与するため、第一章で述べた手法でβ-グルコシダーゼを酵母 *S. cerevisiae* の細胞表層に提示し、また XR、XDH、XK の各遺伝子を導入し、キシロース資化能力の賦与を行った。得られた形質転換酵母はキシロース及びセロオリゴ糖の一つであるセロビオースを炭素源としてエタノールを生産することが明らかとなった。また、この酵母を用いて酸加水分解液からのエタノール発酵を行ったところ、セロオリゴ糖やキシロースを利用できない酵母に比べてそのエタノール生産量が大幅に向上した。このことから、木質系バイオマスの酸糖化液を発行原料とする際、キシロース資化能力及びセロオリゴ糖分解能力を賦与した酵母を用いることで、酸加水分解液中のキシロースやセロオリゴ糖を利用し、エタノール生産をより効率的に行えることが明らかとなった。

二報目では、一報目と同様の手法を用い、実験室酵母及び耐酸性や耐熱性を有する酵母にキシロース資化性を賦与し、キシロース資化能力の比較を行った。実際の木質系バイオマス酸加水分解液からのバイオエタノール生産プロセスでは、一倍体の実験室酵母よりも、耐酸性や耐熱性、さらには酸加水分解液に含まれる阻害物質に対する耐性に優れた、倍数体の産業用酵母の利用が望ましい。そこで、主に遺伝子工学に用いられる実験室酵母、一倍体だが耐熱、耐酸性を有する野生酵母に、一報目と同様に XR、XDH、

（氏名：　片平　悟史　NO.　3　）

XK の各遺伝子を導入し、キシロース資化能力を賦与した。さらには創製したキシロース資化酵母を接合させることで二倍体酵母を創製し、得られた形質転換酵母を用いてキシロースからの発酵を行い、各酵母のキシロース資化能力を比較した。その結果、キシロース消費速度は実験室酵母と野生酵母を接合させた二倍体酵母、1440MT 株が、またエタノール収率では実験室酵母である MT8-1 株が最も優れていることが明らかとなった。一方、キシロース資化能力が高い酵母は XR、XDH、XK 活性がともに高く、資化能力が低い酵母は XR、XDH、XK 活性が低いというように、キシロース資化能力とキシロース代謝酵素の活性にある程度の相関関係があることも明らかとなった。

第三章では、第二章の一報目で開発したキシロース資化性酵母に、野生でもキシロースを資化することができる酵母 *P. stipitis* の糖トランスポーターを導入し、*S. cerevisiae* のキシロース取り込み能力の向上を試みた。*S. cerevisiae* において、キシロースの細胞内への取り込みは、グルコース等のヘキソースを取り込む糖トランスポーター（ヘキソーストランスポーター；HXT）によって行われる。しかし、HXT はヘキソースに対して親和性が高く、キシロースは非特異的に取り込まれるため、その取り込み速度はグルコースなどと比べて非常に遅く、そのためキシロースからのエタノール生産もグルコースなどと比べて遅くなると考えられている。そこで、キシロース代謝酵素を導入したキシロース資化性の *S. cerevisiae* にキシロース資化性酵母 *P. stipitis* 由来の糖トランスポーターを導入し、キシロースやグルコース等からの発酵能力を評価した。結果として、この糖トランスポーターの導入によりキシロース取り込み能力が向上し、エタノール生産速度も向上することが明らかとなった。また、キシロースだけでなく、グルコースやマンノースの取り込み速度、エタノール生産速度も向上することが明らかとなった。さらに、キシロースとグルコースの混合糖液からの発酵を行ったところ、キシロースの取り込みに対するグルコースの阻害は確認されたが、グルコース及びキシロース共に取り込み速度が向上することで、全体のエタノール生産速度が向上することが明らかとなった。

（別紙１）　　論文審査の結果の要旨

氏名	片平　悟史
論文題目	DEVELOPMENT OF RECOMBINANT YEAST STRAINS FOR EFFICIENT ETHANOL PRODUCTION FROM LIGNOCELLULOSIC BIOMASS 木質系バイオマスからの効率的なエタノール生産を目的とした酵母菌体触媒の開発

審査委員	区分	職名	氏名	
	主査	教授	福田　秀樹	
	副査	教授	上田　裕清	
	副査	教授	近藤　昭彦*	
	副査			印
	副査			印

要　旨

本研究では木質系バイオマスを原料とした効率的なバイオエタノール生産プロセス構築のための酵母菌体触媒の開発を目的とした。植物バイオマスから微生物の発酵により生産されるバイオエタノールは、ガソリンの代替燃料としての利用が期待されている。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はエタノール生産性やエタノール耐性、酸耐性、阻害物質耐性などが他のエタノール発酵性微生物より優れているため、木質系バイオマスからのバイオエタノール生産のための有力な候補微生物である。しかし、酵母は木質系バイオマスを直接分解することができず、また代謝できる糖類が限定されているなどの多くの問題があった。
これらの問題を解決し、バイオエタノール生産プロセスにより有効な酵母菌体触媒の開発を検討した。

第一章では、キシランを直接分解・資化する酵母の開発を行った。キシラン分解酵素であるキシラナーゼ及びキシロシダーゼを酵母の細胞表層に機能を有した状態で提示することに成功し、またこのキシラナーゼ・キシロシダーゼ共提示酵母を用いてキシランの分解反応を行ったところ、キシランが構成単糖であるキシロースにまで分解されることが明らかとなった。さらに、このキシラン分解酵母にキシロース代謝能力を賦与し、キシランを炭素源とした直接発酵を行ったところ、キシランの分解及びエタノールの生産が確認されたことから、創製した形質転換酵母がキシランを分解し、エタノールを生産することが可能であることが明らかとなった。

第二章では、一報目としてセロオリゴ糖分解能力及びキシロース資化能力を有する酵母を開発し、木質系バイオマスの酸加水分解液からの効率的なエタノール生産を行った。セロオリゴ糖分解能力を賦与するため、β-グルコシダーゼを酵母の細胞表層に提示し、また XR、XDH、XK の各遺伝子を導入し、キシロース資化能力の賦与を行った。得られた形質転換酵母はキシロース及びセロオリゴ糖の一つであるセロビオースを炭素源としてエタノールを生産することが明らかとなった。また、この酵母を用いて酸加水分解液からのエタノール発酵を行ったところ、セロオリゴ糖やキシロースを利用できない酵母に比べてそのエタノール生産量が大幅に向上した。このことから、創製したキシロース資化・セロオリゴ糖分解酵母は酸加水分解液中のキシロースやセロオリゴ糖を利用することで、エタノール生産をより効率的に行えることが明らかとなった。

二報目では、一報目と同様の手法を用い、遺伝子工学に用いられる実験室酵母、一倍体だが耐熱、耐酸性を有する野生酵母、さらにはエタノール生産プロセスに用いられている産業用酵母にキシロース資化能力を賦与した。得られた形質転換酵母を用いてキシロースからの発酵を行い、各酵母のキシロース資化能力を比較した結果、キシロース消費速度は一倍体の野生酵母である NBRC1445 株が、またエタノール収率では実験室酵母である MT8-1 株が最も優れていることが明らかとなった。

第三章では、第二章の一報目で開発したキシロース資化性 *S. cerevisiae* にキシロース資化性酵母 *P. stipitis* 由来の糖トランスポーターを導入し、キシロースやグルコース等からの発酵能力を評価した結果、糖トランスポーターの導入によりキシロース取り込み能力が向上し、エタノール生産速度も向上することが明らかとなった。また、キシロースだけでなく、グルコースやマンノースの取り込み速度、エタノール生産速度も向上することが明らかとなった。さらに、キシロースとグルコースの混合糖液からの発酵を行ったところ、キシロースの取り込みに対するグルコースの阻害は確認されたが、グルコース及びキシロース共に取り込み速度が向上することで、全体のエタノール生産速度が向上することが明らかとなった。

氏名	片平　悟史

本研究は木質系バイオマスからの効率的なエタノール生産について、その酵母菌体触媒の開発を研究したものであり、新規な酵母菌体触媒について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の片平　悟史は、博士（工学）の学位を得る資格があると認める。