

2Gp01 組換え大腸菌によるイソプロパノール生産の培養条件検討

○猪熊 健太郎, 勝木 裕一朗, 花井 泰三
(九大院・農)

【目的】近年の不安定な原油価格、CO₂排出量削減の観点などからバイオアルコール生産に注目が集まっている。バイオアルコールとしては、現在のところエタノールが広く利用されているが、エタノールよりエネルギー密度が高く、吸水性も少ない等の利点から、より長い鎖長を有するアルコール生産の研究が行われている¹⁾。特に、イソプロパノールは、エタノールより一つ炭素原子が多い2級アルコールで、容易にプロピレンに変換可能であることから、バイオプラスチック材料として有望である。イソプロパノールは *Clostridium* 属細菌によって生産されているが、生産量は十分ではない。我々は、大腸菌が、*Clostridium*属細菌と比較し、増殖速度が速く、遺伝子組換えもしやすいため、より有望なホストと考え、*Clostridium* 属細菌のイソプロパノール生産関連遺伝子を導入した組換え大腸菌を作成し、イソプロパノール生産に成功している²⁾。本研究では、この大腸菌を用いてイソプロパノール生産を向上させるための、培養条件の検討を試みた。

【結果および考察】組換え大腸菌によるイソプロパノール生産においては、培養中にグルコースの枯渇およびpHの著しい低下が見られ、それらに伴いイソプロパノールの減少が観察された。そこで、グルコースの添加とpH調整を逐次に行う培養実験を行った。その結果、従来の結果より、大幅な生産向上に成功した。

- 1) S. Atsumi, T. Hanai, J. C. Liao, *Nature*, 451, 7174, 86-89 (2008)
2) T. Hanai, S. Atsumi, J. C. Liao, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 24, 7814-7818 (2007)

Study on culture condition of isopropanol production by engineered *E. coli*

○Kentaro INOKUMA, Yuichiro KATSUKI, Taizo HANAI
(Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words isopropanol production, *Escherichia coli*, metabolic engineering

2Gp03 新規エタノール発酵細菌・ザイモバクターのセロオリゴ糖・糖化発酵性の改良

○小島 基, 岡本 賢治, 築瀬 英司
(鳥取大・工・生応工)

【目的】セルロース糖化発酵菌の育種を目的として、新規エタノール発酵細菌として単離した *Zymobacter palmarum* へのセルロース部分分解物であるセロオリゴ糖・糖化発酵性の付与を検討している。これまでに、ルーメン細菌由来のβ-グルコシダーゼ(BGL)遺伝子を *Zymomonas mobilis* 由来の強力なプロモーター遺伝子(*Pgap*)の制御下で発現させることでセロオリゴ糖からの糖化発酵性を報告している。今回は、セロオリゴ糖からの安定した糖化発酵性を可能とするために、*Pgap-bgl*融合遺伝子(*gbgl*)の *Zb. palmarum* の染色体DNAへの組み込みを検討した。

【方法と結果】*gbgl*遺伝子の *Zb. palmarum* 内での発現の安定化を図るために、シングルクロスオーバー相同組み換えによる染色体 DNA への組み込みを検討した。そのために、*Zb. palmarum* の染色体DNA上に配座するα-グルコシダーゼ(AGL)遺伝子をターゲットとした。プラスミドpUC118に挿入した*agl*遺伝子の中央に*gbgl*を挿入し、pUC118-*agl::gbgl*を構築した。このプラスミドを *Zb. palmarum* に導入し、染色体DNAへの組み込みを行った。*gbgl*遺伝子を染色体DNAに組み込んだ *Zb. palmarum* は、セロビオースを炭素源とした速やかな生育を示した。そこで、プラスミドを介して *gbgl* 遺伝子を導入した *Zb. palmarum* と BGL活性、セロビオースでの生育の安定性、セロビオースからのエタノール発酵性について比較した。

Improvement of ethanol production from celooligosaccharide by *Zymobacter palmarum* carrying bacterial β-glucosidase gene

○Motoki KOJIMA, Kenji OKAMOTO, Hideshi YANASE
(Dept. Biotech., Tottori Univ.)

Key words ethanol production, cellulose biomass, cellobiose, *Zymobacter palmarum*

2Gp02 改変型酵素を導入したキシロース発酵性実用酵母によるエタノール生産

○松鹿 昭則¹, 井上 宏之¹, 渡邊 誠也², 小瀧 努², 牧野 圭祐², 澤山 茂樹¹
(¹産総研・バイオマスセ, ²京大・エネ研)

【目的】広葉樹や草本系バイオマス糖化液に多く含まれるキシロースの発酵性を酵母に賦与する分子育種の研究が世界的に進められているが、キシロースからのエタノール発酵効率が低いことなどから実用化には至っていない。これを解消するために、既に酵素工学的手法によりNAD⁺要求性からNADP⁺要求性へ補酵素特異性を変換したキシリトール脱水素酵素(改変型 XDH)が開発されている。さらに、複数の実用酵母株の中から、キシロースの中間代謝物キシロースから優れたエタノール発酵性を示す凝集性酵母IR-2株を選定している。今回は、改変型XDHを含む一連のキシロース代謝系遺伝子群をIR-2株に導入することで、キシロースからのエタノール生産効率を向上させることを目的とする。

【方法及び結果】*Pichia stipitis*由来のキシロース還元酵素(XR)及び改変型XDHの遺伝子に加えて、内在性のキシロキナーゼ(XK)遺伝子を構成的に発現させるカセットをIR-2株の染色体に導入した。キシロースからのエタノール生産性に関して、野生型XDH遺伝子を導入したコントロール株と比較したところ、この組み換え酵母はキシロース発酵速度が顕著に速く、エタノール生産効率が増加した。また本組み換え酵母は、グルコース存在下でもキシロースを発酵できる六炭糖・五炭糖同時発酵酵母であった。さらに木質糖化液からのエタノール発酵特性についても併せて解析したので、これらの結果をもとに、キシロースからの効果的なエタノール生産法について考察する。

Improved bioethanol production by xylose-utilizing flocculent yeast expressing NADP⁺-dependent XDH

○Akinori MATSUSHIKA¹, Hiroyuki INOUE¹, Seiya WATANABE², Tsutomu KODAKI², Keisuke MAKINO², Shigeki SAWAYAMA¹
(¹BTRC, AIST, ²Ene. Sci., Kyoto Univ.)

Key words biomass, ethanol production, xylose fermentation, yeast

2Gp04 新規エタノール発酵細菌・ザイモバクターが分泌生産するセルラーゼ遺伝子のクローニング

○奥田 洋, 山本 泰久, 岡本 賢治, 築瀬 英司
(鳥取大・工・生応工)

【目的】*Zymobacter palmarum*は広い糖質化スペクトルを示す新規なエタノール発酵細菌であり、未利用リグノセルロース系バイオマスからのバイオエタノール生産への利用が期待されている。これまでに、*Zb. palmarum* へのセルロース糖化発酵性付与を最終目標として、細菌由来のβ-グルコシダーゼ遺伝子を導入することによりセルロース部分分解物であるセロオリゴ糖の糖化発酵性付与に成功している。その過程で、*Zb. palmarum*がエンドグルカナーゼ(EG)を菌体外に分泌生産することを見出し、その酵素化学的性質を報告した。今回は、*Zb. palmarum*が分泌生産するEG遺伝子のクローニングと大腸菌内での発現を検討した。

【方法と結果】EG遺伝子をクローニングするために、*Zb. palmarum*の培養液から酵素を精製して、そのN末端アミノ酸配列を20残基決定した。決定したアミノ酸配列を、独自に解読した*Zb. palmarum*のゲノムDNA塩基配列データにBLAST検索することにより765 baseからなるORFを見出した。そこで、*Zb. palmarum*のゲノムDNAをテンプレートしてPCRにより約0.8-kbsの断片を大腸菌内にクローニングした。大腸菌形質転換株は0.5% 水溶性セルロース(CMC)を重ねた寒天培地上でCongo-Red染色法によりハローを形成し、EG活性を確認することができた。次に、大腸菌内で発現した組換えEGを精製してその酵素化学的性質を解析した結果、*Zb. palmarum*由来のEGの性質と一致しており、クローニングした遺伝子がEGであることが明らかになった。現在は、セルフクローニングによるEG活性の強化を検討している。

Cloning and expression of endoglucanase gene encoded in chromosomal DNA of ethanologenic bacterium, *Zymobacter palmarum*.

○YO OKUDA, YASUHIISA YAMAMOTO, KENJI OKAMOTO, HIDESHI YANASE
(Dept. Biotech., Tottori Univ.)

Key words bioethanol, Endoglucanase, Cellulose, *Zymobacter*