

2P-130 Clostridium paraputrificum M21 株の代謝制御による水素ガス生産の効率化条件の検討

大石 拓馬¹, 中西 有斗¹, 黒岩 千智¹, 栗冠 真紀子¹, 大島 健志朗², 服部 正平², 〇木村 哲哉¹, 栗冠 和郎¹
(¹三重大院・生資, ²東大院・新領域)
t-kimura@bio.mie-u.ac.jp

Clostridium paraputrificum M21 株は海浜土壌から単離された嫌気性菌であり、短時間で増殖し水素を生産する。嫌気性細菌における糖代謝経路のなかでピルビン酸から乳酸と酢酸、酪酸への代謝経路は水素ガス生産と密接に関連している。そこで、*C. paraputrificum*M21 による効率的な水素生産を目的として代謝工学的な手法と培養条件の検討による水素ガス生産の効率化を検討した。本菌のヒドロゲナーゼ A 遺伝子 (*hydA*) をマルチコピーベクターに連結して導入することで水素ガスの生産が増加することをすでに報告している。そこで、高発現が予測されるフェレドキシン遺伝子のプロモーターを用いて *hydA* の高発現を行った。形質転換体をジャーファメンターを用いて培養し、リアルタイム PCR で *hydA* の発現量が増加したことを確認した。また、総水素ガス生産量を 29% 向上させることができたが、期待したほど水素ガス生産量が向上しなかった。そこで、培養条件の改良による水素ガス生産の効率化を検討した。その結果、*C. paraputrificum* M21 株の培養時に鉄 (FeSO₄) を添加したところ、水素ガス生産量が 70% 向上した。ヒドロゲナーゼを始めとする水素生産に関わる酵素の多くはその構造内に鉄を必要とするため、従来の GS 改変培地での培養は *C. paraputrificum* M21 株にとって鉄飢餓状態であったと考えられた。また、緩衝液として MOPS を培地へ入れなくとも水素生産に差はなかった。

Metabolic engineering of *Clostridium paraputrificum* M21 for hydrogen gas production

Takuma Ohishi¹, Yuto Nakanishi¹, Chisato Kuroiwa¹, Makiko Sakka¹, Kenshiro Oshima², Masahira Hattori², 〇Tetsuya Kimura¹, Kazuo Sakka¹
(¹Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., ²Grad. Sch. Front. Sci., Univ. Tokyo)

Key words *Clostridium paraputrificum*, hydrogen production, hydrogenase, metabolic pathway modification

2P-132 Trichoderma reesei 変異菌による低温性セルラーゼの産生

〇大久保 成章¹, Kahar Prihardi¹, 多久 和夫¹, 田中 修三
(明星大院・理工・環境システム 水環境・バイオエネルギー研)
lsanonl@yahoo.co.jp

バイオエタノールはその生産工程において、酵素糖化と発酵の適正温度が 55℃ と 30℃ と異なり、これが並行複発酵を難しくしている。本研究は、*Trichoderma reesei* に変異処理を行い、得られた MT97 株を用いて、30℃ で十分な活性を保持するセルラーゼの産生技術を検討するもので、その炭素源として標準セルロースと稲藁を用いた。野生株に対し、UV 処理後、さらに亜硝酸・UV 処理し MT97 株を獲得した。そして、標準セルロースを炭素源とした MT97 株産生酵素は、市販酵素より 30℃ 活性が約 2 倍高いことを確認した。まず、稲藁を洗浄・天日乾燥させた後、ブレンダー、ブレンダーミル、30mm ボールミル、5mm ボールミルの各方法で粉碎し、その粉碎稲藁又は標準セルロースを炭素源として、MT97 株によるセルラーゼ産生を行い、培養液中のタンパク量により酵素の産生量を比較した。その結果、酵素産生量が最も多いのは 30mm ボールミル粉碎稲藁であり、標準セルロースの約 1.2 倍の量を確認した。次に、各酵素の糖化活性を調べるため、 α -cellulose を基質として、E/S = 1/100、50℃ 又は 30℃、pH4.8、反応 1 時間の条件で酵素糖化を行い、比活性 (Unit/mg) を比較した。炭素源として 30mm ボールミル粉碎稲藁を用いた酵素が、いずれの温度でも最も高い活性を示し、標準セルロースに対しては 10 ~ 20% 高い活性であり、30℃ で 50℃ 活性の約 60% の比活性を保持したことにより稲藁が酵素産生の炭素源として利用できる可能性が示された。

Production of low-temperature cellulase by *Trichoderma reesei* mutant

〇Shigeaki Ookubo, Prihardi Kahar, Kazuo Taku, Shuzo Tanaka
(Lab. Water Environ. Bioenergy, Grad. Sch. Sci. Engineer., Meisei Univ.)

Key words low-temperature cellulase, *Trichoderma reesei*, mutation, rice straw

2P-131 シロアリ原生動物由来セルラーゼ活性増幅因子の探索

〇小田切 正人^{1,2}, 岸川 昭太郎^{1,4}, 雪 真弘^{1,5}, 守屋 繁春^{1,2,3}, 大熊 盛也^{1,5}
(¹理研・バイオマス, ²横市大院・生命ナノシステム, ³理研・ASI, ⁴理研・BRC, ⁵理研・BRC-JCM)
masatoo@riken.jp

シロアリは腸内の共生原生動物群の働きによって、高効率に木質バイオマスを資化利用していることが知られている。しかし、共生原生動物群は難培養性であるため、木質バイオマス分解メカニズムの解明は非常に困難であった。そのため、我々はこれまでに培養を介さないメタ EST 解析等の手法により木質分解に関連する因子を網羅的に収集してきた。本研究では、シロアリ共生原生動物群より抽出したこれらの因子群を、セルラーゼ高生産菌である *Trichoderma reesei* 中で発現させることにより、木質バイオマス分解を向上させる因子の取得を目指した。

Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation (AMT) による形質転換系の構築を行った。pBI101 をもとに、誘導のおよび構成的プロモーター (*cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *egl2*, *xyn3*, *gap*)、選択マーカー (*amdS*, *hyg*, *pyrA*, *gfp*) を導入したバイナリーベクターの構築を行った。シロアリ腸内原生動物由来 cDNA ライブラリーを連結後、アグロバクテリウムに形質転換を行った。アグロバクテリウム 3 株、*T. reesei* 3 株の組み合わせによる形質転換効率を検討した結果、2 週間程度で 10⁷ 胞子あたり数百の形質転換体を取得できる最適条件を決定することができた。また、複数のマーカーおよびマーカーリサイクル系による多重遺伝子導入が可能であり、高効率かつ簡便な形質転換系を確立した。現在、形質転換体の生産する酵素を用いて、実バイオマスにおける糖化効率をグルコース生産量を指標として評価を行っている。

Screening of proteins as cellulase enhancing factors from symbiotic protists of termites

〇Masato Otagiri^{1,2}, Shotaro Kishikawa^{1,4}, Masahiro Yuki^{1,5}, Shigeharu Moriya^{1,2,3}, Moriya Ohkuma^{1,5}
(¹BMEP, RIKEN, ²Grad. Sch. Nanobiosci., Yokohama City Univ., ³ASI, RIKEN, ⁴BRC, RIKEN, ⁵BRC-JCM)

Key words cellulase, cellulose degrading enzyme, termite

2P-133 糸状菌の分泌酵素による草本系バイオマス (麦わら) の直接分解糖化

〇鈴木 啓修¹, 青山 晃久¹, 千賀 岳流², 永井 和夫², 倉根 隆一郎²
(¹中部大院・応生, ²中部大・応生)
fr08047@gmail.com

<目的>現在バイオエタノールなどの生産はトウモロコシや、サトウキビといった食料と競合する原料から作られている。しかしこれには食料価格上昇等の問題がある。代替原料としてセルロース系バイオマスが注目されている。セルロースはグルコースのポリマーであるためグルコースに分解することで発酵等に利用可能である。アルカリ処理等のかわりに粉碎処理のみを施した稲わらを基質とした場合、市販最強酵素よりも高い分解率を示す酵素を生産する糸状菌 (*P. oxalicum*SA57-2 株) を取得した。今回、稲わら以外に粉碎処理のみを施した草本系を基質とした場合、高い分解率を示すものがないか検討した。

<方法>世界的に草本系バイオマスの最大量を占める麦わらについて主に検討した。具体的には、麦わらを粉碎したものを基質とした。酵素で、それぞれ (基質濃度 5w/v%) を基質 1g に対して 10mg 酵素量で 45℃、800rpm、96h 処理した遠心清を HPLC にて分析した。酵素は、*P. oxalicum*A592-4B 分泌酵素、*P. oxalicum*SA57-2 株分泌酵素、GC220, *Cellic* CTeC, *Cellic* CTeC2, *Cellic* CTeC2 および *P. oxalicum*SA57-2 株分泌酵素の複合酵素を用いた。

<結果>粉碎麦わらを基質とした場合、基質濃度 5%、45℃、96h の反応では、*P. oxalicum*SA57-2 株分泌酵素が単独で最も高い活性を示し、*Cellic* CTeC2 と混合すると収量が増加した。これは粉碎稲わらを用いた時と同じ結果で、*P. oxalicum*SA57-2 株分泌酵素は麦わらにも強力に働く酵素であることがわかった。この現象は酵素濃度を 1/2、1/4 としたときも同様であった。

Direct decomposition of wheat straw biomass by enzymes from filamentous fungus.

〇Yoshinobu Suzuki¹, Akihisa Aoyama¹, Takeru Senga², Kazuo Nagai², Ryuichiro Kurane²
(¹Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Chubu Univ., ²Coll. Biosci. Biotechnol., Chubu Univ.)

Key words *P. oxalicum*, wheat straw, cellulase, fungus