

1P-212 セルフクローニング酵母株によるキシロース発酵

○榊原 祥清, 中村 敏英, 池 正和, 徳安 健
(農研機構・食総研)
sakaki@affrc.go.jp

【背景と目的】リグノセルロース系バイオマスを原料としたエタノール生産では、キシロースを効率良くエタノールに変換することが課題の一つである。これまでの *Saccharomyces cerevisiae* によるキシロース発酵の研究開発では、遺伝子組換え体の利用が主流であった。本研究では、遺伝子組換えによらないバイオエタノール生産法の確立を目指して、キシロースイソメラーゼ酵素を併用した同時異性化発酵法によるキシロース発酵の効率化を目的とした。

【方法】食総研の保存株の中から、キシロース代謝の中間産物であるキシロース発酵能の高い *S. cerevisiae* 株のスクリーニングを行った。選抜された St10-1-1 株について、キシロース発酵能を、既知の高キシロース発酵株である ATCC 24860 と比較した。次に、自身のゲノムからクローニングしたキシロキナーゼ遺伝子 (*XKS1*) を高発現させたセルフクローニング株を作成し、キシロースを含む培地や稲わらを原料に、同時異性化発酵によりエタノール発酵を行った。

【結果と考察】St10-1-1 は、発酵温度 30℃ では ATCC 24860 より低いものの、発酵温度 40℃ においては ATCC 24860 を大きく上回るキシロース発酵能を示した。キシロースの同時異性化発酵については、セルフクローニングによる *XKS1* の過剰発現のみで、St10-1-1 の発酵収率を顕著に向上させることが可能であった。

【謝辞】本研究は、農水省委託研究「地域資源を活用した再生可能エネルギーの生産・利用のためのプロジェクト」等によるものである。

Xylose fermentation using a self-cloning *Saccharomyces cerevisiae* strain

○Yoshiaki Sakakibara, Toshihide Nakamura, Ike Masakazu, Ken Tokuyasu (NFR)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol fermentation, xylose, xylose isomerase

1P-214 *Saccharophagus degradans* 由来 Exo 型アルギン酸分解酵素提示酵母の育種

○高木 俊幸^{1,2}, 横井 貴大^{1,2}, 柴田 敏行^{2,3,4}, 森坂 裕信^{1,2}, 黒田 浩一^{1,2}, 植田 充美^{1,2}
(¹京大院・農・応用生命, ²JST, CREST, ³三重大院・生資・生物圏生命, ⁴三重大・新産業)
miueda@kais.kyoto-u.ac.jp

【背景・目的】広大な海洋を持つ日本において、大型藻類などの海洋バイオマスは極めて有望な資源である。これらは、生育スピードが速く安価で大量供給可能であるためバイオエタノールの原料として適している。大型藻類の主成分であるアルギン酸のエタノールへの変換のため、本研究では強力なアルギン酸分解能を持つ *Saccharophagus degradans* 由来のアルギン酸分解酵素群に着目し、我々が開発してきた酵母ディスプレイ法によりアルギン酸分解酵素提示酵母の育種を試みた。【方法・結果】*S. degradans* 由来のアルギン酸分解酵素を細胞壁アンカータンパク質である α -アグルチニンと融合して発現させて、酵母細胞表面に提示させた。蛍光抗体染色によりアルギン酸分解酵素の提示を確認後、DNS アッセイによる還元糖の定量や TLC による糖の分離検出により、分解活性を調べた。TLC による分離検出の結果、アルギン酸分解単糖の特異的なスポットを検出した。さらにアルギン酸分解物の質量分析を行った結果、単糖に相当する 176 m/z ピークを検出できたため、本酵素は新規 Exo 型アルギン酸リアーゼであると考えられた。また、既に成功している Endo 型アルギン酸リアーゼとの比較も考慮して、本酵素の基質特異性を検討したのでまとめて報告する [1]。[1] T. Takagi et al. submitted.

Molecular breeding of yeast displaying exo-type alginate lyase from *Saccharophagus degradans*

○Toshiyuki Takagi^{1,2}, Takahiro Yokoi^{1,2}, Toshiyuki Shibata^{2,3,4}, Hironobu Morisaka^{1,2}, Kouichi Kuroda^{1,2}, Mitsuyoshi Ueda^{1,2}
(¹Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ²CREST, JST, ³Dept. Life Sci., Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., ⁴Ind. Technol. Innov. Inst., Mie Univ.)

Key words exo-type alginate lyase, yeast, cell surface engineering, *Saccharophagus degradans*

1P-213 耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* DMB1 のキシロース代謝時のメタボローム解析

○鈴木 俊宏, 星野 保, 松鹿 昭則
(産総研・バイオマスマテリアル・バイオマスマテリアル研セ)
a-matsushika@aist.go.jp

バイオエタノール生産にはヘミセルロース由来のキシロースも発酵基質として利用されることが望ましく、また、同時糖化発酵を行うことがコストの低減につながるため、糖化酵素の反応温度領域で発酵が可能な耐熱性酵母が必要となる。*Kluyveromyces marxianus* は耐熱性とキシロース資化性を有するため、同時糖化発酵に用いる有望な酵母として期待されているが、キシロースからのエタノール生産量は少なく、生産量の向上が求められている。そこで、高効率なキシロース発酵が可能な株を育種するために、*K. marxianus* のキシロース代謝時の特性を調べ、エタノール生産量が低い要因を明らかにすることを目的とした。耐熱性がより優れた株として期待されている *K. marxianus* DMB1 株とキシロース代謝が可能な *Scheffersomyces stipitis* NBRC1687 株の好気および嫌気条件下でのキシロース代謝時のメタボライトを CE-TOFMS を用いて比較解析した。その結果、DMB1 株と NBRC1687 株とではペントースリン酸経路の中間代謝物の挙動に違いが見られた。NBRC1687 株と比較して DMB1 株の方が、好気条件では E4P 量が多いこと、嫌気条件下では S7P 量が多いことが明らかとなった。また、DMB1 株は嫌気条件下での PEP からピルビン酸の生合成量は好気条件下よりも少ないことが示唆された。これらの結果から、NBRC1687 株と比べると DMB1 株はペントースリン酸経路後半およびピルビン酸の生合成の代謝活性が低いことが示唆された。したがって、嫌気条件下でのバイオマスからの高効率なキシロース発酵を実現するためには、これらの経路の代謝活性を増強することが有効な手段であると考えられた。

Metabolomic analysis of *Kluyveromyces marxianus* DMB1 during xylose metabolism

○Toshihiro Suzuki, Tamotsu Hoshino, Akinori Matsushika (BRRC, AIST)

Key words *Kluyveromyces marxianus*, xylose, ethanol, metabolomics

1P-215 *pdu* 遺伝子群を用いた新規 3-ヒドロキシプロピオン酸生産合成代謝経路

○本庄 宏, 鶴野 圭悟, 花井 泰三
(九大院・農)
taizo@brs.kyushu-u.ac.jp

【背景および目的】

現在、再生可能な資源であるバイオマスを基質とし、バイオアルコールや汎用化成品を作るバイオリファインリー研究が盛んに行われている。本研究では、大腸菌に異種生物由来の複数の酵素遺伝子群から構成された合成代謝経路を導入し、C3 の基盤物質である 3-ヒドロキシプロピオン酸 (3-HP) を生産することを目的としている。これまで、グリセロールを基質とした大腸菌での 3-HP 生産は、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド (3-HPA) からアルデヒドデヒドロゲナーゼ (AraE) により 3-HP を生産する「AraE 経路」によって行われてきた。この経路以外に、*Klebsiella pneumoniae* など一部の細菌は PduP, PduL, PduW からなる「Pdu 経路」により 3-HP を生産することが知られているが、これまでに大腸菌でこの経路を使った 3-HP 生産は行われていない。そこで本研究では、Pdu 経路、および Pdu 経路と AraE 経路を大腸菌に導入し、3-HP 生産実験を行った。

【方法】

タンパク質高生産株である大腸菌 B 株 (ATCC11303) に、3-HP 生産酵素の遺伝子をコードしたプラスミドを導入し、3-HP 生産株である TA2142 (AraE 経路 + Pdu 経路)、TA1806 (AraE 経路)、TA2168 (Pdu 経路) を構築した。3-HP 生産実験における培地には、100 mM グリセロールを加えた M9 培地を用い、回分培養を行った。

【結果】

大腸菌に導入した Pdu 経路による 3-HP 生産が初めて確認され、AraE 経路と Pdu 経路を組み合わせることで 3-HP 生産濃度の向上に成功した。また、その最高生産濃度および収率は、これまで報告されている、グリセロールのみを炭素源とした回分培養での大腸菌による 3-HP 生産の中で最も高い値であった。

Production of 3-Hydroxypropionic Acid by synthetic Pathway with *pdu* Genes

○Hiroshi Honjo, Keigo Tsuruno, Taizo Hanai (Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words 3-hydroxypropionic acid, synthetic biology, synthetic pathway, *Escherichia coli*