

2018 年度

博士(工学) 学位論文

バイオエタノール生産に資するバイオマス糖化酵素
の高機能化に関する基礎的研究

長岡技術科学大学
大学院工学研究科
生物統合工学専攻

氏名：河合 哲志

A Dissertation for Doctor of Tetsushi Kawai

A Fundamental Study on advanced functionalization
of biomass saccharification enzymes that contribute
to bioethanol production

Nagaoka University of Technology
Department of Integrated Bioscience and Technology

目次

第一章 緒言	7
1.1 社会的背景	7
1.1.1 エネルギー安全保障	7
1.1.2 持続可能な社会と再生可能エネルギー	11
1.1.3 バイオマスの重要性・有効性	15
1.2 学術的背景	18
1.2.1 バイオエタノールの歴史	18
1.2.2 リグノセルロース由来バイオエタノールの生産課題とその対応策	20
1.3 本研究の意義・目的	23
1.4 本研究の実施方法	24
1.5 本論文の構成	25
第二章 先行研究等の調査	27
2.1 はじめに	27
2.2 セルロース系バイオマスの分解利用に関する基礎理論	28
2.2.1 バイオマスの種類と組織構造	28
2.2.2 セルロース系バイオマスの酵素糖化	29
2.2.3 セルロース系バイオマス由来糖資源の利用方法	33
2.3 セルロース系バイオマスの糖化前処理に関する先行研究の調査	35
2.3.1 酵素糖化に与える糖化前処理法の影響	35
2.3.2 薬剤による糖化前処理法	35
2.3.3 薬剤を使用しない糖化前処理法	37
2.4 酵素生産菌に関する先行研究の調査	38
2.5 糖化酵素開発に関する先行研究の調査	40
2.5.1 <i>Trichoderma</i> 由来糖化酵素の開発	40
2.5.2 成分酵素の強化	40
2.5.3 成分酵素の最適化	42
2.6 本章のまとめ	45
第三章 BGL 活性増強糖化酵素 JN11 の構築と能力評価	46
3.1 はじめに	46
3.2 実験操作	48
3.2.1 菌株と酵素の調製	48
3.2.2 Full-length <i>aabgl1</i> の発現ベクター構築	49
3.2.3 <i>T. reesei</i> PC-3-7 株の形質転換	49

3.2.4	転写解析	50
3.2.5	酵素活性測定とタンパク質測定	51
3.2.6	バイオマスの糖化前処理と組成分析用サンプルの調製	52
3.2.7	糖化反応	53
3.2.8	HPLC 分析	54
3.3	結果および考察	54
3.3.1	<i>xyn3</i> プロモーターを用いた <i>aabg1</i> 遺伝子発現 <i>T. reesei</i> の構築 ...	54
3.3.2	<i>T. reesei</i> X3AB1 株の発現確認および JN11 の活性分析結果	54
3.3.3	<i>T. reesei</i> X3AB1 株のセルラーゼおよびヘミセルラーゼ遺伝子の発現解析	57
3.3.4	JN11 と市販酵素の活性の比較	58
3.3.5	各酵素を用いたバイオマス糖化反応	59
3.3.6	単一成分酵素を添加した糖化反応	64
3.4	本章のまとめ	68
第四章 <i>T. reesei</i> 由来主要成分酵素のバイオマス分解能力の網羅的解析		69
4.1	はじめに	69
4.2	実験操作	70
4.2.1	菌株と酵素の調製	70
4.2.2	酵素活性測定とタンパク質量測定	70
4.2.3	バイオマスの糖化前処理と組成分析	71
4.2.4	糖化反応	71
4.3	結果および考察	71
4.3.1	単一成分欠損セルラーゼの BGL 活性測定	71
4.3.2	NaOH 処理バイオマスの糖化反応	73
4.3.3	硫酸および水熱処理バイオマスの糖化反応	76
4.3.4	水蒸気爆砕処理スギの糖化反応	79
4.4	本章のまとめ	80
第五章 BGL 活性増強糖化酵素 JN12 および JN13 の構築および能力評価		82
5.1	はじめに	82
5.2	実験操作	83
5.2.1	菌株と酵素の調製	83
5.2.2	キシラナーゼ 2 およびキシラナーゼ 3 の発現と精製	83

5.2.3	バイオマスの糖化前処理と組成分析	84
5.2.4	糖化反応	84
5.2.5	<i>Aabg1</i> 遺伝子発現カセットの構築	85
5.2.6	<i>T. reesei</i> PC3-7 株の形質転換	85
5.2.7	酵素活性測定とタンパク質測定	86
5.3	結果および考察	86
5.3.1	NaOH 処理バイオマスの糖化に対するキシラナーゼ 3 の影響	86
5.3.2	新規 AaBG1 高発現株の構築	88
5.3.3	JN シリーズ酵素と市販酵素の酵素活性の比較	91
5.3.4	前処理バイオマスの糖化能評価	94
5.3.5	JN13H を用いたバイオマス糖化におけるキシラナーゼ 3 の影響	95
5.4	本章のまとめ	96
第六章	結言	97
6.1	本研究の結論	97
6.2	展望	98
	参考文献	100
	謝辞	118

第一章 緒言

本章では、セルロース系バイオマスからのバイオエタノール生産の高効率化に資する本論文の意義を明らかにする。1.1 では、エネルギー安全保障や持続可能な社会といった再生エネルギーが必要とされる社会的な背景について説明し、再生エネルギーにおけるバイオマスの重要性について記す。1.2 では、本研究分野の学界の動向および学術的背景について概観する。それらを踏まえて 1.3 では、本研究の目的と意義、効果について明らかにする。1.4 では、本研究の遂行方法、枠組みについて記す。1.5 では、本論文の構成を示す。

1.1 社会的背景

1.1.1 エネルギー安全保障

現代の高度化された社会的インフラを基盤とする文明生活は多大なエネルギーで支えられている。エネルギーは自然界に存在する形態のものを一次エネルギー(脚注:石油、石炭、天然ガス、水の位置エネルギー、ウラン等放射性同位元素、太陽光など)、そしてそれらを利用しやすい形態に変換・加工されたものを二次エネルギー(脚注:電力、ガソリン、コークスなど)に分けられる。一次エネルギー供給動向は世界状況により大きく変動しており、かつての英国産業革命(1800年頃)以後、主要な一次エネルギーであった石炭は石油・天然ガス、そして原子力へと変容してきた。

我が国における石油供給の動向として、太平洋戦争期にピークであった石炭への依存が、1950年代に始まる高度経済成長期に石油への依存に置き換わり、1973年には石油に対する依存率が約73%にまで高まった¹⁾。しかし、1973年に勃発した第四次中東戦争によって石油価格は1バレル3.01ドル(USD)から11.65ドルへ高騰し、さらに1979年に起きたイラン革命により1バレル30ドル台まで上昇した²⁾。このオイルショックを契機とした石油代替政策や省エネルギー政策の推進により減少したが、1980年代後半には原油価格の下落に伴って増加に転じた。1990年代半ば以降は、石油代替エネルギー利用の進展等により減少基調で推移した。

消費動向として、原油のほとんどが蒸留・精製により石油製品に転換されて販売されており、その石油製品は輸入と輸出が行われている。2012 年度に販売された石油製品は燃料油合計で 1 億 9752 万 kL であり、2000 年代に入り減少傾向になった。油種別販売構成をみると、B・C 重油などの販売量が第一次オイルショック以前では 5 割以上を占めていたが、その後、ガソリン、ナフサ、軽油等の消費が増加し、白油化が進んだ。2012 年度の販売構成をみると、B・C 重油販売量の割合は 14.0%まで減少している³⁾。そのため、石油以外、すなわち、原子力、天然ガス、石炭の利用が推進され、2010 年の一次エネルギーの内訳は石油 40%、原子力 11%、天然ガス 19%、石炭 23%となり¹⁾、エネルギー源の多様化が進行した。特に、天然ガスは発電用に約 7 割、都市ガス用に約 3 割が使われた。天然ガスは、一次エネルギーの供給源多様化政策の一環として、その利用が増加した。都市ガスの用途別販売量としては、2000 年頃までは家庭用が最大のシェアを占めていたが、近年は工業用が急増しており、最大のシェアを占めている。しかし、2011 年 3 月 11 日に発生した東日本大震災(以下、3・11 と表記する)により原子力発電が一旦は全面停止され、その代替措置として化石燃料の使用割合が増加した³⁾。二次エネルギーにあたる自動車用の燃料も多様化が進んでおり、従来から使用されているガソリンに加えて、商用電力あるいは水素電池による EV(Electric vehicle)、ガソリンと蓄電池のハイブリッド車、天然ガス車、といった自動車およびエンジンの開発・実用化が推進されている。ただし、それぞれの新規技術には未だ課題が多く、EV では電気スタンドの普及率が低いという問題が山積されており、2015 年度末の国内保有台数も約 8 万台であり⁴⁾、これは乗用車保有台数のうちわずか 0.13%である⁵⁾。水素電池 EV は水素スタンドとその安全管理という課題があり、保有台数はわずか 630 台である⁴⁾。2016 年の世界新車販売に占める EV の比率は 0.5%にすぎず、ハイブリッド車を含めた電動車全体でも 3%弱にとどまる。電池のコストがエンジンに比べてまだまだ高く、一回の充電で走れる距離も短いということも大きな課題であろう。このように、依然として石油由来のガソリンに対する依存度は高い。そもそも、EV 用の水素・電力の製造エネルギー源となっているものは化石燃料由来である。例えば、水素は水の電気分解、あるいはメタン CH₄ の分解が代表的であり、後者では副次的な二酸化炭素(CO₂)の排出というジレンマもある。そのため、それらの製造方法自体の供給源に占める化石燃料の割合が減らない限り、根本的なエネルギーの多様化には繋がらない。また、航空燃料に関しては、エネルギー密度の高さ(単位重量当たりの発熱量が大きいこと)が求められるため、現状は化石燃料由来のパラフィン属やナフテン属のような炭化水素が必須である。

2015 年の世界人口は約 74 億人と推計されており、2050 年までには約 32%増加の約 98 億人となることが予想されている⁶⁾。人口増加は GDP 増加に繋がり⁷⁾、

将来に必要なエネルギー量はますます増加する。一次エネルギー需要は2010年で約12 toe (tonne of oil equivalent(石油換算トン))と推計されているが、2050年には1.8倍の21 toe(そのうち石炭や原油、天然ガスが約14 toeを占める)となることが予想されている⁸⁾(図1-1)。日本の2013年の最終エネルギー消費量は約0.33 toeであり、2000年代前半の単年度ピーク約0.36 toeに比べて減少傾向にある³⁾。これは3・11以降の節電意識の高まりの結果とされており、一時的な現象とも考えられる。しかし、日本はこれらのエネルギーの大部分を諸外国からの輸入に依存しており、例えば、海外からの化石燃料に対する依存度は、現在約88%(2013年度)であり、第一次石油ショック時(約76%)よりも高い数値となっている。また、日本のエネルギー自給率は2013年時点で6.0%と極端に低い値(OECD加盟34か国中、2番目に低い水準)となっているため、節電の効果は限定的であり、現代の生活を維持するための必要最低限のエネルギーを確保すること、すなわちエネルギー安全保障は危機的な状態と言える³⁾。ちなみに、国際エネルギー機関(IEA: International Energy Agency)によると、エネルギー安全保障(Energy Security)とは、「環境への影響を重視しつつ、受容可能な価格によるエネルギー源の使用可能性を中断されることなく維持すること。(筆者邦訳)」(脚注: 原文: The IEA defines energy security, as the uninterrupted availability of energy sources at an affordable price.)と定義されている⁹⁾。また、上記したように現在の一次エネルギーの多くの割合を石油が占めているが、存在が確認されている石油の埋蔵量には限界があり、早くても50年、長くても150-200年程度で枯渇することが予測されている¹⁰⁾(図1-2)。もちろん、油田の探索と開発はこれまで以上に進むとは考えられるものの、いずれは枯渇あるいは需要に供給が追従しない状態に陥ることは十分に予想される。仮に最も長期使用が可能なシナリオを想定した場合も、採掘コストが上昇する可能性は高く、現在と同様の条件で使用し続けることは困難である¹¹⁾。そのため、現在の石油に過度に依存する体制は短期的には成立し得ても、中・長期的には破綻する可能性は極めて高い。以上のように我が国においては、資源の大半の外国依存、中東地域の政情不安、3・11以後の安全・安心の担保、化石資源の枯渇問題、などを背景としてエネルギー安全保障の確保は喫緊の課題である。

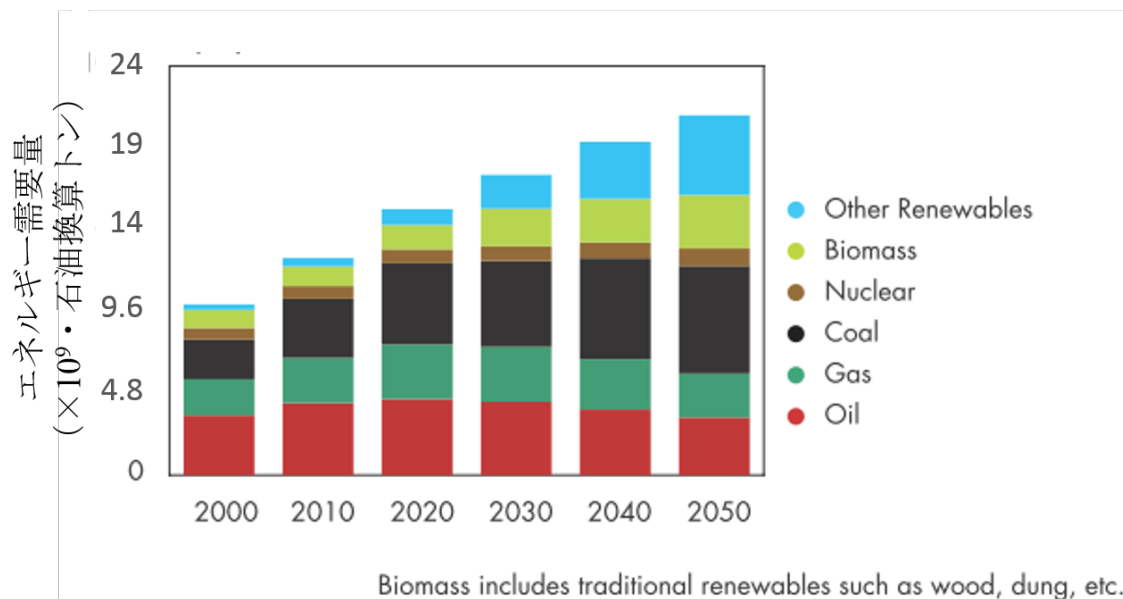


図 1-1:1 次エネルギー需要予測

引用文献 8 より図を引用 (著者により縦軸単位を改変)

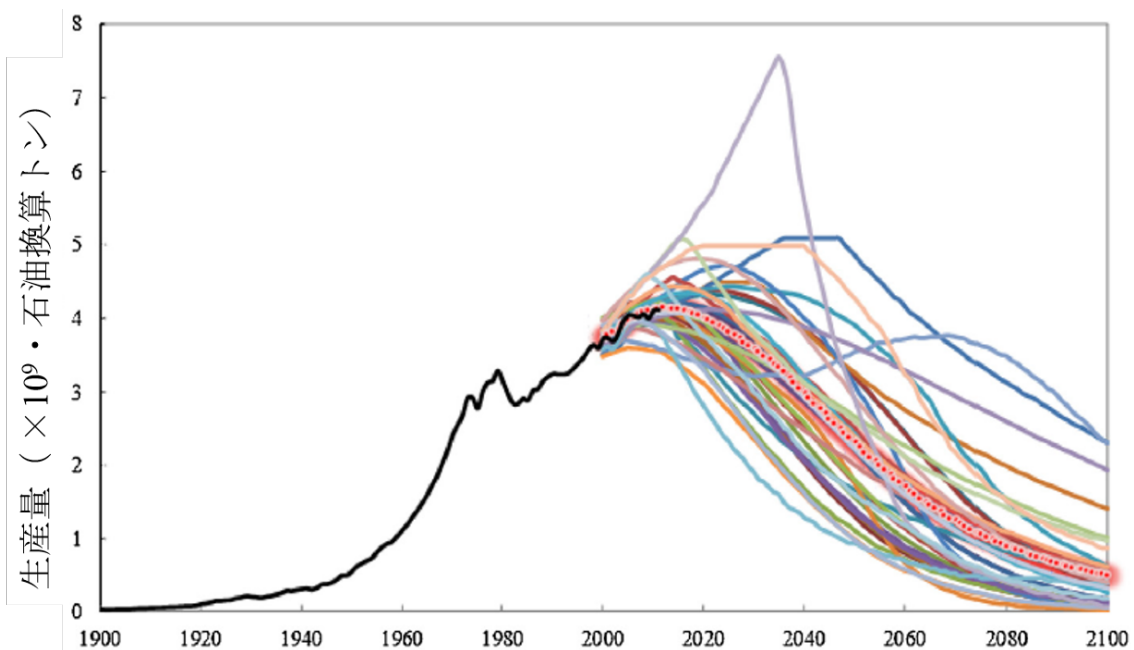


図 1-2: 世界の年間石油生産量の予測図

引用文献 10 より図を引用 (縦軸単位は筆者邦訳)。世界の年間石油生産量に関して、各種のパラメーターに基づいた 36 種類の長期生産シナリオを示した。

1.1.2 持続可能な社会と再生可能エネルギー

一次エネルギーとして化石燃料の依存度の高さに対するエネルギー安全保証問題は、日本のみならず国際的な問題として持続可能な発展という観点からも重要な課題である。持続可能な開発(Sustainable Development)とは、1987年に「環境と開発に関する世界委員会」(World Commission on Environment and Development)が中心的理念として取り上げた概念であり、「将来の世代の欲求を満たしつつ、現在の世代の欲求も満足させるような開発」と定義されている¹²⁾。人類社会の持続的な発展を拒む要素として、前述した化石燃料の枯渇に加えて、化石燃料の大量消費による地球温暖化が挙げられる。地球温暖化によるリスクには、海面上昇や気象災害の増加、水資源や食料資源の不足などが挙げられている。もしこれらのリスクに対する対策を実施しない場合は、世界経済のGDPの20%かそれ以上の損害を被ることが予想されている¹³⁾。効果的な地球温暖化対策を取らなかった場合、例えば、熱中症を避けるための経済的損失は、今世紀末に最大で世界全体の国内総生産(GDP)の4%に上るとの試算が出された。一方、国際的な温暖化対策の枠組み「パリ協定」で掲げる目標の通り、産業革命前からの気温上昇を2度未満に抑えることができれば、損失は0.5%以下で済む¹⁴⁾。このように、気候変動による気温上昇は世界中の経済成長に強い影響がある。例えば、気候変動で日本のGDPは35%減少する一方、ロシアでは419%増加することが論じられている¹⁵⁾。この地球温暖化は地球の温度調節機能が人類の活動により大きく乱れることで引き起こされる。地球は、地面が太陽からの熱を吸収し、大気中の水蒸気や二酸化炭素といった温室効果ガスが地面から放出される熱を吸収することで、温められている。この温室効果ガスの代表である二酸化炭素は化石燃料の燃焼などによって大気中に大量に放出される。これにより地球全体の熱吸収量が増加し、気温が上昇する。現在における大気中の二酸化炭素濃度は平均的には僅か400ppm程度であるが¹⁶⁾、その温室効果は33℃程度と考えられている¹⁷⁾。温室効果ガスの減少は、地球全体が凍結するスノーボールアースの原因になったことが報告されていることから、二酸化炭素は、地球の気温に対して多大な影響を与えている存在である^{18,19)}。大気中の二酸化炭素は、地球全体の炭素循環、すなわち植物等の光合成による二酸化炭素の吸収、炭水化物の合成による貯蔵、植物等の分解や動植物の呼吸による放出によって移動している²⁰⁾。この炭素循環は本来ほぼ平衡状態にあるべきものである。しかし、英国産業革命以後の化石資源への極度の依存によって、平衡は大きく崩れていると考えられる。そして、自然の炭素循環に起因しない人為的な二酸化炭素の放出は、今後も増え続けることが予想されて

いる。その結果、気象変動に関する国際政府間パネル(Intergovernmental Panel On Climate Change: IPCC)第5次評価報告書では、1880年から2012年の間に地球の平均気温は0.85℃上昇したこと、および1950年から2100年までに最大で4.8℃上昇するという予測が報告されている^{20,21)}(図1-3)。このような予測を回避するため、化石燃料由来の二酸化炭素を排出しないゼロ・エミッション社会、二酸化炭素の排出を抑えた低炭素社会、廃棄物の排出抑制・再使用・再利用を促進する循環型社会、それを包括した概念である持続可能な社会を実現することは、全世界共通の喫緊の課題である。

そのような課題に対して期待されている解決策のひとつが再生可能エネルギーの活用である。再生可能エネルギーとは「絶えず補充される自然の作用に由来するもの」と定義されており²²⁾、太陽光、太陽熱、水力、風力、潮力、波力、海流、地熱、バイオマスなど様々な種類が存在する。再生可能エネルギーを用いた発電では、バイオマスなどを除いて二酸化炭素発生量はゼロである。そのバイオマスでは、それが燃焼した際に発生する全ての二酸化炭素は、バイオマス植物の成長過程で大気から吸収したものである。このことから、バイオマス燃焼による二酸化炭素の増加の収支はゼロであり、炭素循環の観点からは排出ゼロとするカーボンニュートラルの考え方が適応される。また、工場の建設といった発電に関わる全ての工程で発生する二酸化炭素を考慮した二酸化炭素排出量も、火力発電の519-975g-CO₂/kWhと比較して、太陽光発電が17-48g-CO₂/kWh、風力発電が25-34g-CO₂/kWh、水力発電が11g-CO₂/kWhと最大で88倍程度の二酸化炭素排出量の削減が見込まれている²³⁾。すなわち、再生エネルギーの利用促進は、日本のエネルギー安全保障対策となるだけでなく、地球温暖化に対しても大きな利点が期待される。太陽光発電で現在最も注目されているのが、大規模太陽光発電(メガソーラー)事業である。しかし、2013年6月時点で稼働しているメガソーラーの認定総出力は約56万kWであり、火力発電の1%程度であるのが現状である²⁴⁾。風力発電は、2012年時点での総出力が265万kWであり太陽光より普及が進んでいる。しかし、騒音や超低周波音、猛禽類の激突(バードストライク)といった温暖化とは異なる環境問題が発生することが問題点である²⁵⁾。また、太陽光・風力の両者の問題点は、気象条件の変化に強く影響されるため、ベース電力のエネルギー源としての役割を果たすことは難しいことである。それに対し、水力発電は気象変化に対して安定した発電が特徴である。水力発電は我が国において歴史が長く既に1920年頃から0.5kWの出力を出す水車型の水力発電が行われおり、立地条件としても水源に恵まれているため開発が進み、10万kW以上の大型の水力発電が利用されるようになったことで、発電量全体の10%程度の割合を占める²⁶⁾。しかし、火力発電と比較して発電単価が高く規模も小さい等の問題点から、これ以上の普及が進んでいないの

が現状である。再生可能エネルギーの発電コストは、設備価格の高さや日照時間等の自然状況に左右されることで利用率が低くなる等の課題があるため、火力発電などの既存のエネルギーと比較すると高くなっている。また、出力が不安定で地形等の条件から設置できる地点も限られていることもデメリットとなる。さらに、再生可能エネルギーが大量に導入された場合、休日など需要の少ない時期に余剰電力が発生することや、天候などの影響で出力が大きく低下することで電気の安定供給に問題が生じる可能性がある。そのため、発電出力の抑制や蓄電池の設置等の対策が必要になると考えられる。このような課題を克服するため、国による様々な支援施策が行われている。2009年11月に家庭や事業所等において太陽光で発電された電気のうち、使い切れずに余った電気の買取りを電力会社に義務づける「太陽光発電の余剰電力買取制度」が開始された。また、2012年7月から再生可能エネルギーの固定価格買取制度を導入し、再生可能エネルギーの大幅な導入拡大が進められている。固定価格買取制度の導入により、投資回収の見込みが安定化したことで企業の参入が相次いでいる。さらに、再生可能エネルギーやこれらで作られた電気を蓄え、安定的に供給するための蓄電池の導入に関するコスト削減や、性能向上等のための研究開発も積極的に推進されている。これらを踏まえて、我が国では2015年に「長期エネルギー需給見通し(エネルギーミックス)」が策定され、各エネルギーをバランスよく組み合わせた電源構成とすることで、2030年の再生エネルギーの割合を10%(2010年)から22-24%に拡大することを見込んでいる²⁷⁾(図1-4)。

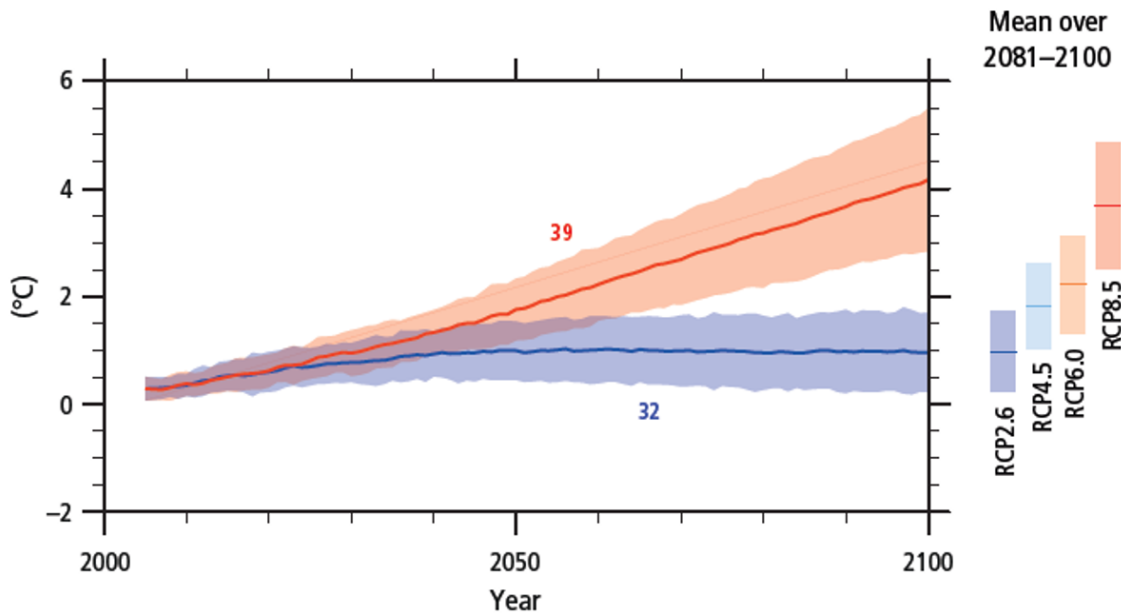


図 1-3: 温度上昇の予測シナリオ

引用文献 21 より図を引用。4 種類の RCP (Representative concentration pathway; 代表濃度経路シナリオ) により予測されている。青線: RCP2.6 (低位安定化シナリオ) は気温上昇を 2°C 以下に抑えることを目標にした排出量の最も低いシナリオ、RCP8.5 (高位参照シナリオ) は 2100 年における最大排出量に相当するシナリオである。その中間が RCP4.5 (中位安定化シナリオ) および RCP6.0 (高位安定化シナリオ) である。

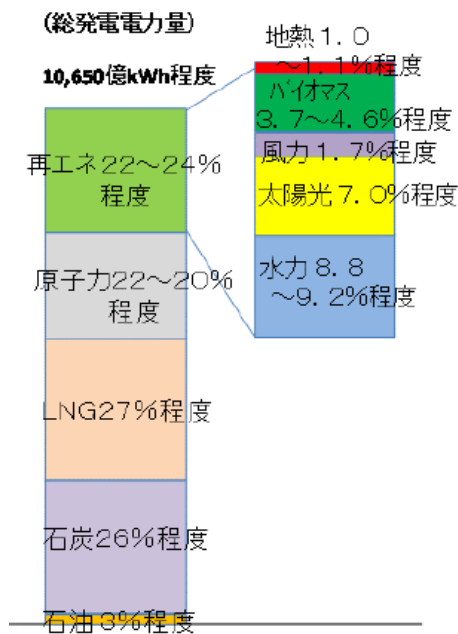


図 1-4: 2030 年度の電力構成見込み

引用文献 27 より図を引用

1.1.3 バイオマスの重要性・有効性

再生可能エネルギーの多くが発電に利用されているのに対して、燃料のような「物」として利用可能な資源がバイオマス(Biomass)である。バイオマスとは生態学では「一定空間内に現存する動植物など生物体の全てを有機物に換算した量」と定義されているが、再生可能エネルギー分野における定義は日本政府によれば「再生可能な、生物由来の有機性資源で化石資源を除いたもの」とされている^{28,29)}。利用可能なバイオマスの種類は、大別すると廃棄物系資源、未利用系資源、生産系資源の3種類に分けられる。廃棄物系資源としては家畜排泄物や食品廃棄物、古紙、下水汚泥、建築廃材、未利用系資源としてはイナワラや林地残材、バガス(サトウキビ搾汁後の残渣)、生産系資源としては木質や草本系バイオマスが挙げられる。代表的な特徴としては以下の4点が挙げられる。

1. 地球温暖化対策

光合成によりCO₂を吸収して成長するバイオマス資源の利用は、「京都議定書」における取扱上、CO₂を排出しないものとされている。

2. 循環型社会の構築

未活用の廃棄物を燃料とするバイオマス発電は、廃棄物の再利用や減少につながり、循環型社会構築に大きく寄与している。

3. 農山漁村の活性化

家畜排泄物、イナワラ、林地残材など、国内の農山漁村に存在するバイオマス資源を利活用することにより、農山漁村の自然循環環境機能を維持増進し、その持続的発展を図ることが可能となる。

4. 地域環境の改善

家畜排泄物や生ゴミなど、捨てていたものを資源として活用することで、地域環境の改善に貢献できる。

これら資源の利活用を促進するため、2002年12月に具体的な取り組みや行動計画が「バイオマス・ニッポン総合戦略」として第1次小泉内閣で閣議決定され、2006年3月には国産バイオ燃料の本格的な導入などを盛り込んだ新たな総合戦略が策定された²⁹⁾。各バイオマス資源のエネルギー利用形態には発電や熱利用もあるが、前述した燃料としての利用が特に期待されている。バイオマスを原料とした燃料の種類にはバイオエタノール、バイオディーゼル、バイオジェット燃料、バイオガスなどがある。バイオ燃料の利用は決して新しいものではなく、バイオエタノール利用の先進国ともいえるブラジルは1930年台初頭において、既にガソリンにエタノールを5%混合したE5燃料の利用が義務付けられていた³⁰⁾。その後、1973年に起きた第

1次オイルショックによる原油価格の高騰や、1975年に制定された「国家アルコール計画」により生産量は急激に伸びている。同様に、アメリカでは1919年に世界で最初に大量生産された自動車であるT型フォードの中に既にエタノールを燃料にするタイプがあるなど、早い段階でバイオ燃料の利用が始まっていた³¹⁾。オイルショックを契機にその利用がさらに後押しされ、1978年にEnergy Tax Actが成立した。これにより、バイオエタノールを10%混合したガソリンであるE10の使用に対する減税処置が取られた。両国はその後もバイオ燃料を増産し続け、2000年には石油換算としてブラジル521万トン・アメリカ299万トンを生産しており、世界で生産されるバイオ燃料の約90%を両国家で占めている³²⁾。さらに、アメリカでは2006年のブッシュ大統領の一般教書において2025年までに中東産石油の依存度を25%以下にする目標が設定され、ブラジルでは2003年以降にガソリンとエタノールを任意の割合で混合可能なフレックス車(flexible-fuel vehicles)が導入された。その結果、2000年代後半に両国の生産量は急激に上昇し、2015年にはブラジル1,764万トン、アメリカ3,098万トンとなっており、アメリカは世界最大の生産国となった³³⁾(図1-5)。ただし、詳細は後述するが、両国のバイオエタノールは可食性資源であるデンプン質を原料として生産されていることは大きな問題である。可食性資源の燃料利用は食料利用との競合に繋がり、食料価格の上昇など別の問題を引き起こす。そのため、非可食性バイオマス資源を原料にしたバイオエタノール生産技術の開発が求められている。

日本ではガソリン代替燃料となるバイオエタノールの導入義務として、2017年に年間50万kL(ガソリン消費量の約1.2%相当)、エネルギー基本計画で定められた政府目標として2020年時のガソリン消費量の3%以上導入することを掲げている。しかし、ガソリンへの混合利用に関しては「揮発油等の品質の確保等に関する法律」によってE3またはE10での利用に限定されているのが現状である。世界的な液体燃料の需要は益々伸び続けている状況において³⁴⁾(図1-6)、バイオマスの利活用は、日本はもちろんのこと、世界的にもエネルギー安全保障およびゼロ・エミッションを志向した持続可能な循環型社会の形成に対して大きく貢献することができる。資源が広い地域に分散しているため、収集・運搬・管理にコストがかかる小規模分散型の設備になりがちという検討事項はあるものの、そのなかでもバイオエタノールの生産性向上と工業的大量生産体制の確立は喫緊の課題である。

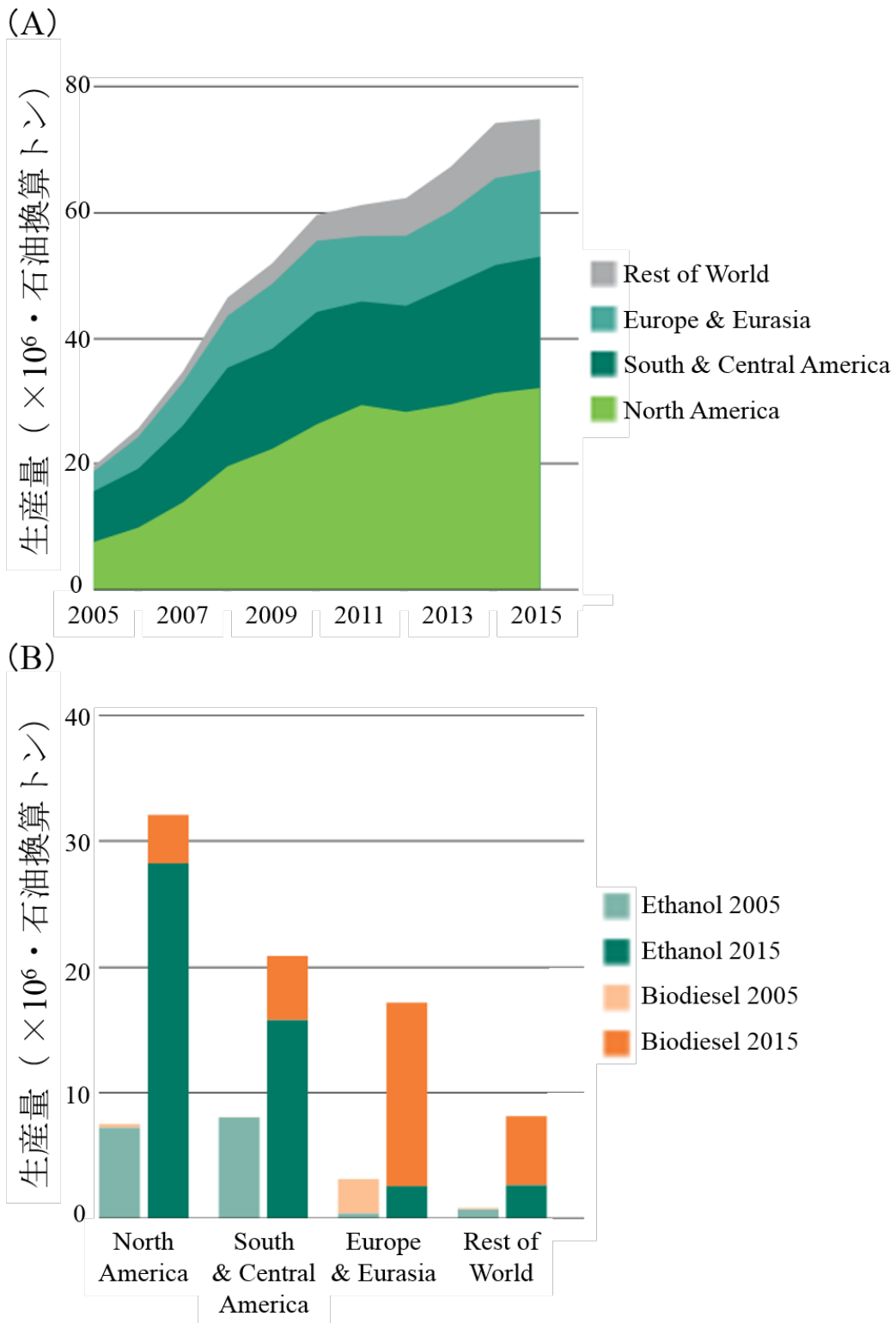


図 1-5: 世界のバイオ燃料生産量

引用文献 33 より図を引用 (筆者により軸表示および凡例表記を改変)。図 A: 地域毎のバイオ燃料生産量、図 B: バイオエタノールとバイオディーゼルの生産量。

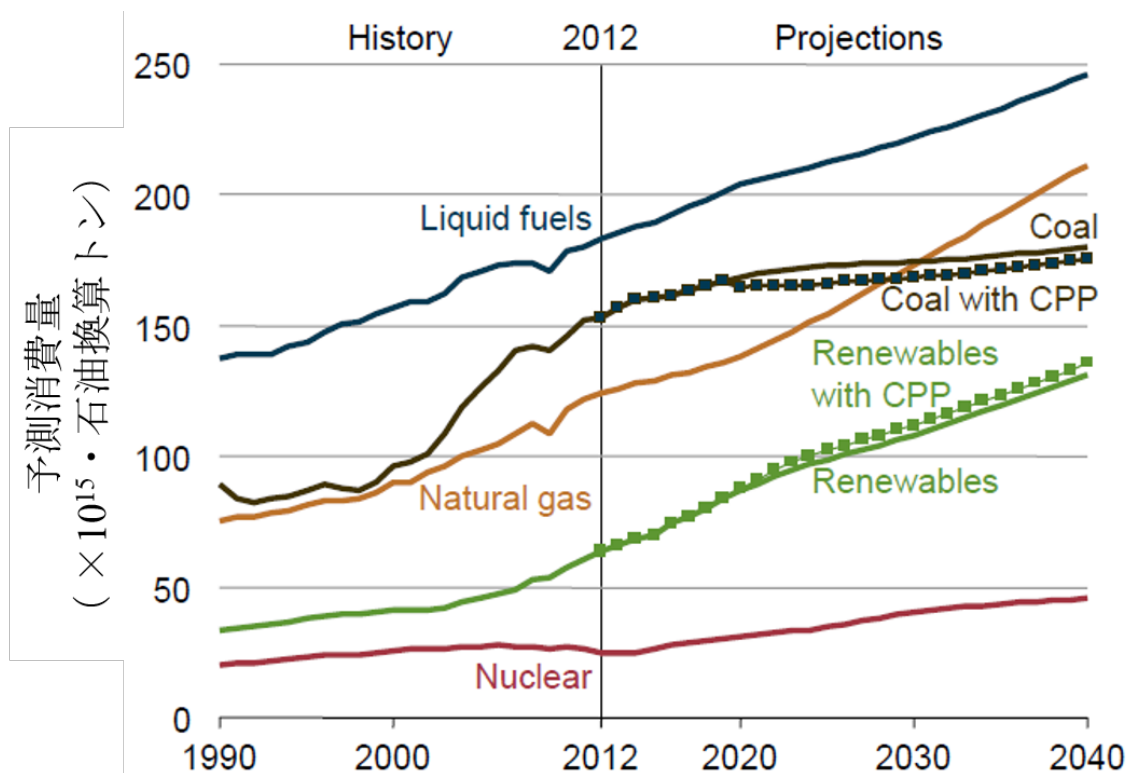


図 1-6: 世界のエネルギー消費量予測

引用文献 34 より図を引用 (筆者により縦軸表記を追加)。CPP (Clean Power Plan) は電力事業者が発生させる二酸化炭素量の削減を目的とした政策であり、点線は CPP が適用された場合の予測である。

1.2 学術的背景

本節ではバイオマスのなかでもバイオエタノールの生産過程、特に微生物由来の酵素によるバイオマスの分解、およびそこで生産される糖を利用したエタノール発酵の学界的動向とその背景について概観する。

1.2.1 バイオエタノールの歴史

「バイオエタノール」とは、サトウキビやトウモロコシなどのバイオマスを発酵させ、蒸留して生産されるエタノールを一般的に表す。近年、バイオエタノールという名称は、エネルギー源としての再生可能性やカーボンニュートラル性を念頭において使われることが多い。しかし、過去にはバイオマス資源であるモラセス(廃糖蜜)から生産されるエタノール、即ち上記の定義におけるバイオエタノールが飲料用にも使われて

いた。そのため、発酵(または醸造)エタノールおよびバイオエタノールという名称に学術的な区別はなされていないが、本論文では近年的な意味合いでバイオエタノールという名称を使用することとする。

バイオエタノールは、再生可能な自然エネルギーであること、およびその燃焼によって大気中のCO₂量を増やさない点から、エネルギー源としての将来性が期待されているのは前述したとおりである。他方、生産過程全体を通してみた場合のCO₂削減効果、エネルギー生産手段としての効率性、食料との競合、といった問題点も指摘されている。飲料用途としてのエタノール生産、すなわちアルコール醸造は、可食性のバイオマス資源である米や葡萄などを原料とし、そこに含まれる糖類に対して微生物を用いて糖化・発酵することでなされる。燃料用途のバイオエタノールも基本原理は同一であり、サトウキビやモラセスなどの糖質原料やトウモロコシやジャガイモなどのデンプン質原料を用いた生産技術は1970年代から行われていた。しかし、デンプン質原料となりうるバイオマスは食料としても利用されるため、燃料利用との競合が起きることが最大の問題となっていた。バイオ燃料としての需要はそれらの価格にも大きな影響を与えており、国際食料政策研究所の報告では穀物の平均価格の上昇のうち30%がバイオ燃料に起因すると見積もられている³⁵⁾。また、食料を燃料に利用するという倫理的な問題も大きい。そこで、これまでに利用されていない非可食性資源であるセルロース系バイオマスが、食料や飼料に競合しない新たな再生可能なエネルギー資源として注目された。セルロース系バイオマスとは、植物の細胞壁を構成するセルロース(Cellulose)・ヘミセルロース(Hemicellulose)といった多糖類ポリマーを主要な構成成分として含むバイオマスであり(図1-7)³⁶⁾、低価格で大量に利用可能なセルロース系バイオマスとしてはトウモロコシの残渣であるコーンストーバーやサトウキビを搾汁した後の残渣であるバガス、米や小麦の藁などが挙げられる。セルロース系バイオマスを効率的に利用するため、以下に記述する新たな技術が開発された。

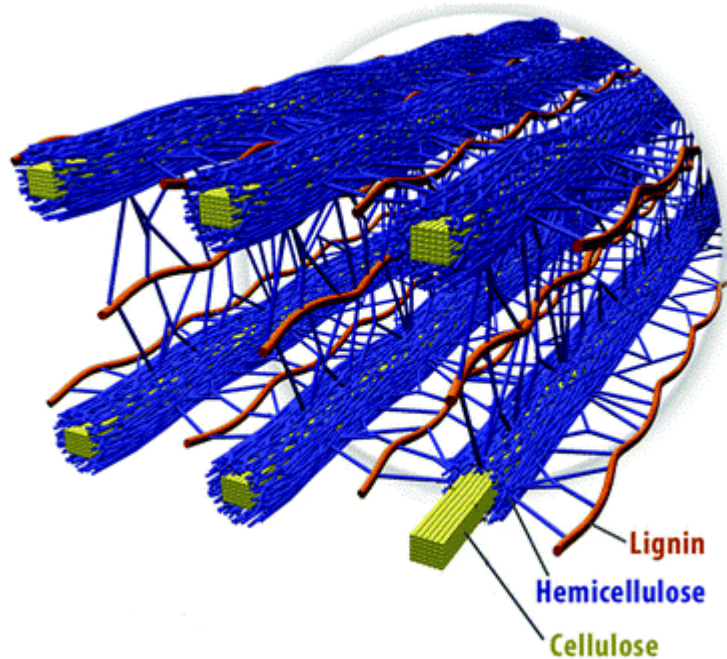


図 1-7:セルロース系バイオマスの細胞壁モデル図

引用文献 36 より図を引用。

1.2.2 リグノセルロース由来バイオエタノールの生産課題とその対応策

バイオエタノール生産において最大の課題はコストである。バイオエタノールをはじめ、バイオディーゼル、バイオジェット燃料などといった普及のためには、既存のガソリン、軽油、ジェット燃料以下にまでコストを下げる必要がある。しかし、セルロース系バイオマスはこれまで利用されてきたデンプン質原料と異なり難分解性物質であるため、エタノールの生産コストが非常に高くなることが大きな課題である。

セルロース系バイオマスの構成成分であるセルロースは、六単糖であるグルコースのポリマーという点ではデンプンと同一である。しかし、その結合様式が異なり、デンプンが α -1, 4-グリコシド結合であるのに対し、セルロースは β -1, 4-グリコシド結合した直鎖状ポリマーであり、高度に結晶化することで安定した構造をとるため非常に分解されにくい(図 1-8)。これを発酵可能なグルコースまで分解しなければ、発酵を通じてエタノールに変換されないため、強力な加水分解力をもつ濃硫酸が用いられた。この方法はセルロースを完全に分解することが可能であるが、糖の過分解、中和時に発生する石膏の処理、薬品耐性プラントの必要性、硫酸回収時の消費エネルギーが大きいことなどが問題になっていた^{37,38)}。そこで新たに酵素分解法が開発された³⁹⁾。本法は濃硫酸法と比較して、反応温度が低く(約 50℃)、大量の化

学薬品を用いない温和な反応を行うことができる。しかし、酵素分解法は酵素コストの高さが問題となった。そのため、1.3 に後述するように酵素低減化のための研究開発がなされてきたが、現状においても工業的に利用可能なレベルまでコストは低下していない。そのため、発酵工程の改善や生産プロセスの最適化など、その他の工程のさらなる効率化・低コスト化のため下記の対応策が実施された。

セルロース系バイオマスはデンプン質原料と異なり多様な糖類が含まれているため⁴⁰⁾、原料に含まれる糖資源を全て利用することは生産コストの低減化のために重要である。セルロース系バイオマスの糖成分には、セルロースの構成成分であるグルコースに加えて、ヘミセルロースの構成成分であるキシロースやアラビノースなどの五単糖が含まれている。これらの含量は、グルコースが全糖類の 50-70%程度であるのに対し、20-40%とその半分程度を占めるため、キシロースを発酵することができれば原料の利用効率が大幅に上昇する³⁸⁾。しかし、工業的にエタノール発酵に用いられている出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、六単糖のみ利用可能であり、五単糖は利用できない。そこで、米国 Purdue 大学の Ho らによりキシロース資化性能を付与した遺伝子組換え酵母が作製された⁴¹⁾。*S. cerevisiae* はキシロース資化に必要なキシロースレダクターゼ (Xylose Reductase。以下 XR と表記する) およびキシリトールデヒドロゲナーゼ (Xylitol Dehydrogenase。以下 XDH と表記する) を有していない。そこで、キシロース資化性酵母 *Pichia stipitis* 由来 XR 遺伝子および XDH 遺伝子を *S. cerevisiae* に異種発現させた。さらに、*S. cerevisiae* はキシロキナーゼ (Xylulokinase) の活性が弱いため、それを補うために遺伝子組換えによる過剰発現がなされた。XR・XDH 遺伝子によるキシロース代謝は真核生物にみられるが、原核生物ではキシロースイソメラーゼ (Xylose Isomerase。以下 XI と表記する) によりキシロースからキシルロースまで一段階で変換する反応が知られている。この反応は XR・XDH 系と比較して補酵素の不均衡を考慮する必要がないため理論上はより効率的であると考えられており、Delft 大学の Pronk らにより真菌由来の XI が見出され、効率的にキシロースを資化する遺伝子組換え酵母が作製された^{42,43)}。このように、セルロース系バイオマスからのエタノール生産についても種々の技術開発が行われている。

バイオエタノールの生産コストを低下させるための技術開発要素として、先述した生産プロセスの最適化は不可欠である。セルロース系バイオマスを用いたバイオエタノール生産の一般的なプロセスは、前処理・糖化・発酵・精製の 4 段階に分けられる。このなかでも、特に糖化の前に行われる前処理とよばれる準備工程が必須であり、本論文では本準備工程を糖化前処理と呼称する。糖化前処理を施していないセルロース系バイオマスは、十分量の糖化酵素で処理したとしてもごくわずかしか糖化されない。その主な理由はヘミセルロースやリグニン成分の存在である。これら

を除去するために必要とされるのが糖化前処理であり、本論文では糖化前処理されたバイオマスを前処理バイオマスと呼称する。この処理が強いとセルロースも失われてしまうが、弱いと効果的な酵素糖化処理を行うことができない。またバイオマス種によって条件は異なり、方法によっては処理可能な規模に制限がある。投入エネルギーや設備コストも含めた微妙なバランスの上での選択が必要となってくる。また、生産プロセスのうち、糖化・発酵プロセスには糖化を行ってから発酵を行う糖化発酵 (Separate Hydrolysis and Fermentation, 以下 SHF と表記する) と糖化と発酵を同時に行う並行複発酵 (Simultaneous Saccharification and Fermentation, 以下 SSF と表記する) がある。SSF は 2 プロセスを 1 つの反応槽で行うため設備費の低減が狙えることや、糖化反応の生成物が速やかに発酵の基質として利用されることで糖化工程に用いられる酵素の生成物阻害が解除されることなどがメリットとして挙げられる。ただし、糖化酵素の活性が最大となる最適温度が約 50℃ であるのに対し、*S. cerevisiae* の最適温度は約 30℃ であるため、発酵の最適温度で反応を行うと糖化効率が大きく低下する^{44,45)}。これを酵素投入量の増加で解決すると生産コストの大幅な増加に繋がる。そこで、耐熱性酵母の開発が進められ、実用酵母の連続培養による自然突然変異により 41℃ における発酵能を向上させた株の取得や⁴⁶⁾、高温耐性酵母 *Kluyveromyces marxianus*⁴⁷⁾ など *S. cerevisiae* 以外の微生物の利用などが報告されている。

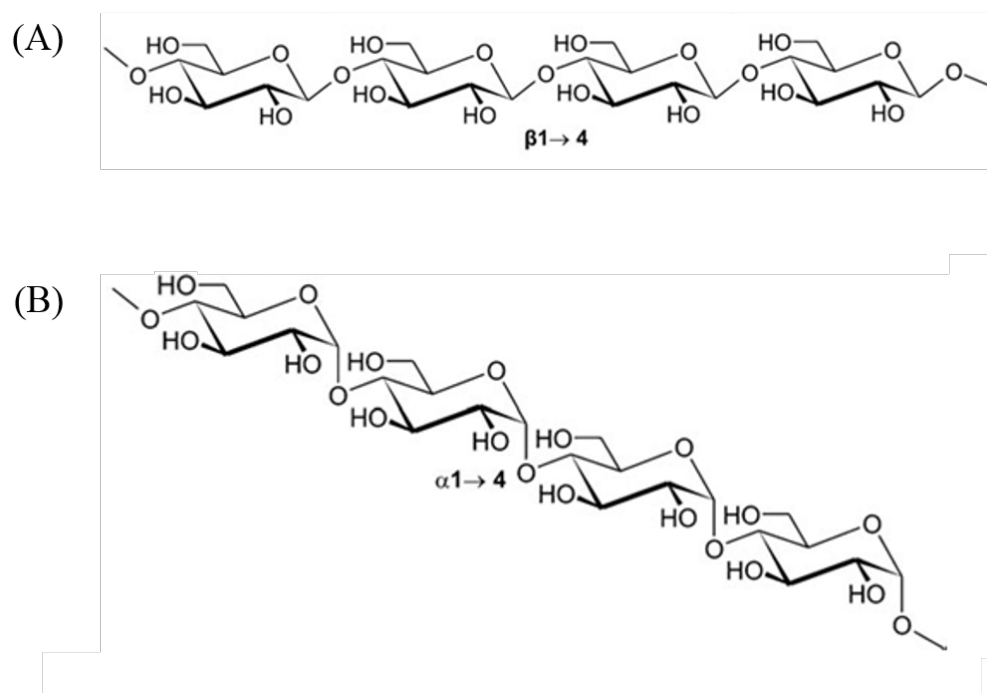


図 1-8: セルロースとデンプンの結合様式の違い
(A)セルロース (B)デンプン

1.3 本研究の意義・目的

本研究の目的は、非可食性資源であるセルロース系バイオマスを高効率で分解する酵素を開発し、バイオエタノールの生産コストを低減させ、バイオマスの工業的な利用を実現することである。セルロース系バイオマスの分解に用いられる糖質加水分解酵素であるセルラーゼやヘミセルラーゼは、既に様々な分野で商業利用されている。例えば、洗剤用途として衣類の繊維を分解することで繊維の奥に入り込んだ汚れを分解することや、繊維の細かい毛羽立ちを分解することで衣類に汚れが付きにくくする作用、食品添加物としてみかん果汁の清澄化やパンの膨らみを向上させる作用がある。これらは様々な酵素メーカーから販売されているが、バイオマス分解用の酵素として求められる機能が異なるため、バイオマス分解に特化した酵素を開発する必要がある。現時点で実用的なバイオマス分解のための酵素は未だ開発途上の段階ではあるが、世界的な酵素開発競争の中で米国 Genencor 社 (現 DowDuPont 社の子会社) およびデンマーク Novozymes 社が他を大きくリードしているのが現状である。2 社の開発により酵素コストはこれまでより大きく低減することに成功したが、現実的なバイオエタノール生産プロセス、すなわち原料輸送費や原料前処理費用、菌体の増殖、酵素生産、下流工程など必要なプロセスを全て含めた試算による経済性分析 (Techno-Economic Analysis) によると、酵素コストのさらなる低減化が求められている⁴⁸⁾。酵素コストを低減するためには、糖化工程に使用される酵素量を減らす必要がある^{49,50,51)}。そのため本研究が目的とする酵素の高機能化、すなわち同一量のバイオマスをより少量の酵素で分解する酵素の開発に成功することは、バイオエタノール生産コストの低減化に大きく寄与するだろう。また、日本のエネルギー安全保障の位置付けで考えると、バイオエタノール製造の重要な技術要素である糖化酵素開発を日本発の技術として進めることは極めて重要である。そのため、本研究では酵素開発のベースとなる菌株として協和発酵社 (現協和発酵キリン社) にて長年育種されてきた酵素生産株 *Trichoderma reesei* PC-3-7 株を用い、日本の技術をベースにした酵素開発を行う。また、バイオマス分解酵素の開発は、バイオエタノールの実用化だけの貢献に止まらず、安価な糖原料の供給によるバイオベースケミカル (Bio-based chemicals) 分野への波及効果が期待される。バイオベースケミカルとは、原料として石油ではなく生物資源を用いて生産された化学品である。その実用化例としては、米 DuPont 社がポリエステル原料となる 1, 3-プロパンジオールをコーンシュガーから遺伝子組換え大腸菌を用いて生

産することに成功した例や⁵²⁾、BioAmber社の酵母によるコハク酸製造⁵³⁾、NatureWorks社のポリ乳酸樹脂 Ingeo⁵⁴⁾などが挙げられ、次々と新たなバイオプロセスが開発されている。それらの開発には、本来微生物が生産できない物質を、遺伝子組換え技術により新たな代謝経路を組込むことで生産を可能にする合成生物学的なアプローチに代表される微生物育種技術が重要であることは間違いない。しかし、さらに重要なことは、開発品目を問わずに共通する重要な要素が安価な糖源へのアクセスである。資源が少ない我が国において、これまで活用できていない非可食性資源であるセルロース系バイオマスを活用可能にする高機能酵素の開発は大きな意義がある。セルロース系バイオマスの活用による石油資源依存からの脱却は、世界的な問題である地球温暖化への解決にも大きく貢献するだろう。また、バイオマス利用・酵素開発の研究を通じて酵素工学や生物資源利用学の発展に期待ができる。

1.4 本研究の実施方法

本研究は *T. reesei* PC-3-7 株が分泌するセルラーゼおよびヘミセルラーゼのバイオマス分解能の向上について実施する。そのためには、*T. reesei* PC-3-7 株由来酵素の機能改善とその評価検討、および改善点を明らかにするための反応解析検討は重要な要素である。そこで本研究では全体をつぎのように大きく三つの研究項目に細分化して実施する。

第一に、本研究でベースとなる高機能化酵素の構築とその評価である。構築には親株として *T. reesei* PC-3-7 株を用いた。本株の欠点は二糖であるセロビオースを単糖であるグルコースに分解する β -グルコシダーゼ(以下、BGL と表記する)活性が弱いことである。これを強化するため、本株由来 BGL(以下、TrBG1 と表記する)と比較して、比活性が 10 倍以上高い *Aspergillus aculeatus* 由来 BGL(以下、AaBG1 と表記する)の異種宿主発現を実施した。酵素発現のプロモーターには、キシラナーゼ遺伝子の発現を司るプロモーターでありながらセルラーゼ遺伝子と同調して機能する *xyn3* プロモーターを利用した。構築した BGL 強化酵素の能力評価として、酵素活性およびバイオマス糖化能力を測定し、その結果を市販酵素と比較した。市販酵素には現時点で入手可能な最新型の市販バイオマス糖化酵素 2 種類を用いた。各活性測定法は公平性を保つためバイオインダストリー協会つくば研究室で標準化された実験手法に従って実施した⁵⁵⁾。

第二に、*T. reesei* が分泌する単一のセルラーゼ(以下、成分酵素と表記する)がバイオマスの糖化に与える影響を明らかにすることである。セルロース系バイオマス

を効率的分解するためには、機能の異なる複数の成分酵素が必要となる。*T. reesei* は数十種類の成分酵素を分泌するが、各成分酵素がバイオマス糖化にどの程度影響しているかは明らかになっていない。そこで、本研究では成分酵素の中でセルロース分解に最も重要と考えられる 2 種類のセロビオヒドロラーゼ(以下、CBH と表記する)と、1 種類のエンドグルカナーゼ(以下、EG と表記する)を対象とした実験を行った。セルラーゼによるセルロース分解の特徴は、複数の成分酵素が相乗的に作用することで、単一の成分酵素では得られない高い分解活性が現れることである。そのため、単独の成分酵素を用いたバイオマス糖化反応では、相乗効果を含めた本来の糖化能を評価することはできない。そこで本研究は、対象とした成分酵素の遺伝子が欠損したセルラーゼ(以下、単一成分欠損セルラーゼと表記する)を使用した。単一成分欠損セルラーゼは、標的とした単一成分以外の成分酵素の相乗効果が保持されている。単一成分欠損セルラーゼを用いたバイオマス糖化反応を実施し、元株由来の全成分を含む酵素と糖化率を比較することで、各成分酵素の影響度を明らかにした。

第三に、先に構築した BGL 強化酵素のキシラナーゼ活性を強化した酵素の構築とその評価である。BGL 強化酵素は AaBG1 の発現のため、その遺伝子を *xyn3* 遺伝子座に相同組換えしており、キシラナーゼ(以下、XYN と表記する)III が欠損している。そこで、XYN III が欠損した BGL 強化酵素のヘミセルロース分解能が充分であるかを確認するため、精製した XYN III を構築した酵素に添加し、ヘミセルロースを多く含むバイオマスの糖化反応を実施した。菌株の構築には、前述と同様に *T. reesei* PC-3-7 株を親株とし、*xyn3* プロモーターよりも発現能が強い *egl1* プロモーターを利用した AaBG1 の遺伝子発現を実施した。これにより、XYN III を保有し、AaBG1 がより多く発現した酵素を構築した。構築した酵素を能力評価するため、バイオマス糖化能を最新の市販酵素との比較を実施した。

1.5 本論文の構成

本論文は全 6 の章で構成される。

第一章では、セルロース系バイオマスからのバイオエタノール生産の高効率化に資する本論文の意義を明らかにする。

第二章では、セルロース系バイオマスからのバイオエタノール生産の高効率化に関する先行研究を概観する。

第三章では、*T. reesei* 由来酵素の弱点である BGL 活性の低さを補強するために AaBG1 の異種宿主発現を試み、構築した菌株を *T. reesei* X3AB1、本株由来

酵素を JN11 とし、その能力評価した結果について記す。

第四章では、*T. reesei* が分泌する主要な成分酵素である CBHI、CBHII、EGI が各種のバイオマスの糖化反応にどの程度影響を与えるかを明らかにした結果について記す。

第五章では、AaBG1 の異種宿主発現に *cbh1* および *egl1* プロモーターを利用して構築した *T. reesei* C1AB1 株および E1AB1 株、および本株由来酵素 JN12 および JN13 の能力評価について記す。

第六章では、本研究のまとめを記す

第二章 先行研究等の調査

本章では、セルロース系バイオマスからのバイオエタノール生産の高効率化に関する先行研究を概観する。2.1 では、セルロース系バイオマスの先行研究調査の目的を述べる。2.2 では、セルロース系バイオマスの基礎理論について記す。2.3 では、セルロース系バイオマスを分解利用する際に用いられる糖化用の前処理法について記す。2.4 では、セルロース系バイオマスを糖化する酵素を生産する菌株について記す。2.5 では、糖化酵素の開発について記す。2.6 では、本章のまとめについて記す。

2.1 はじめに

本研究の目的は、低炭素社会を志向したエネルギー安全保障問題に対する現実解のひとつであるバイオエタノールの生産効率の向上に資する基礎検討を行うことである。バイオエタノールの原料となるバイオマスには、ショ糖やデンプンを多く含む可食性の農作物の廃棄物や、セルロースのように人が消化できない非可食性のエネルギー資源作物が利用されている。農作物由来のバイオマスから生産されるエタノールは第一世代バイオエタノールと呼ばれており、サトウキビやトウモロコシ、小麦、テンサイなどが利用されている。第二世代エタノールは、燃料などのエネルギー資源を得ることのみを目的としたエネルギー資源作物を原料とし、その構成成分であるセルロースは地球上で最も豊富に存在するバイオマスであるため代替エネルギーとしてのポテンシャルを十分に秘めた資源として期待されている⁵⁶⁾。そこで本章では第二世代バイオエタノールに関わる先行研究として、セルロース系バイオマスの利用に関する基礎理論、セルロース系バイオマスの糖化前処理、酵素生産菌、糖化酵素開発について調査・概観して先行研究等に対する本研究の位置付けを明らかにする。

2.2 セルロース系バイオマスの分解利用に関する基礎理論

2.2.1 バイオマスの種類と組織構造

第二世代バイオエタノール用原料として用いられるバイオマスには、農業用廃棄物(コーンストーバー、イナワラ)とエネルギー作物(エリアンサス・ミスカンサス・ネピアグラスなどの多収量草本植物^{57,58})、ポプラ・ユーカリなどの早生広葉樹^{59,60})に大別される。エネルギー作物の多くは生産性が非常に高いことが特徴であり、特にユーカリやエリアンサス等は乾燥重量で年間当たりの生産量が数十トンまたはそれ以上の生産性を示す^{61,62})。

地球上の植物により最も豊富に生産されている有機物、それが糖質である。糖質の多くは、多糖として木、草、微細藻類などのバイオマスにセルロース、ヘミセルロース、デンプンとして存在する。これら多糖を変換して、エネルギーやマテリアルに利用する試みがなされているが、まず原料とするバイオマスの糖組成を調べるのが肝要である。セルロースは植物の細胞壁を構成する成分の1つである。細胞壁には、もう1つの構成成分である高分子のフェノール性化合物リグニンが存在し、セルロースと絡み合っていることから、セルロース系バイオマスはリグノセルロース系バイオマスとも呼ばれる。セルロースは β -グルコースが β -1,4結合で直鎖状に繋がったホモポリマーであり側鎖を持たない(図2-1)⁶³)。ホモポリマーは一定の数が束ねられてマイクロフィブリルと呼ばれる単結晶繊維として存在する。高等植物では一般に数十本の分子鎖が合成されていると言われており、幅3-4 nmのマイクロフィブリルが基本単位になると考えられている^{64,65,66})。ヘミセルロースには、キシロースが β -1,4結合してできたキシランや、マンノースが β -1,4結合してできたマンナンなどが存在する。これらは多くの場合複数の糖類から構成されており、天然ではアラビノキシランやグルコキシラン、グルコマンナン等が存在し、植物種によって多様性がある。

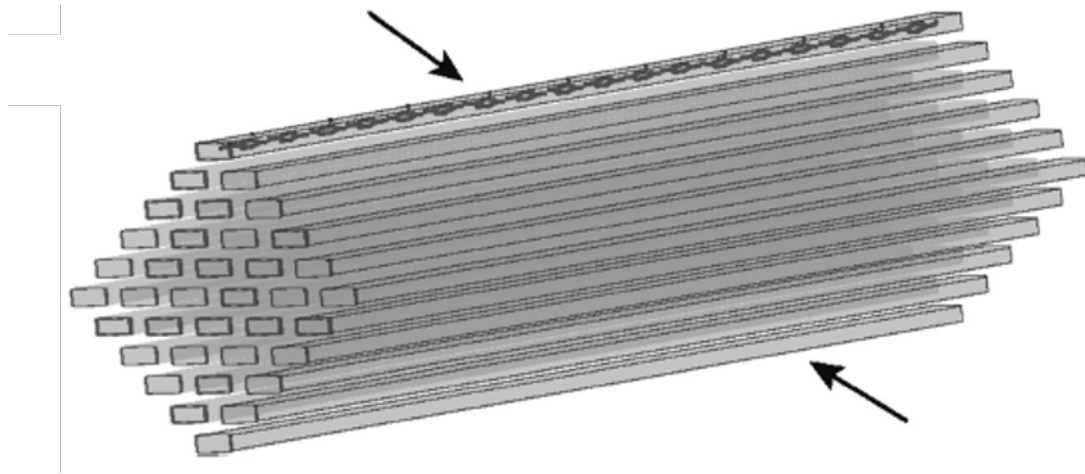


図 2-1:マイクロフィブリルの構造

引用文献 63 より図を引用。セルロースの集合体であるセルロースマイクロフィブリルを示す。矢印はマイクロフィブリルの粗水面であり、セルラーゼが結合する部位となる。

2.2.2 セルロース系バイオマスの酵素糖化

セルロース系バイオマスに含まれるセルロースやヘミセルロースを分解するためには、働きの異なる複数の糖質加水分解酵素 (Glycoside hydrolase) が必要となる。Glycoside hydrolase は 100 を超える family に分類されるが⁶⁷⁾、その中でも代表的な働きをする酵素を挙げる(表 2-1)。まず、セルロース分解を担うセルラーゼの中で最も重要な働きをしている酵素は、セルロースの結晶領域の分解に必要となる 2 種類の CBH である⁴⁴⁾。CBHI は Glycoside hydrolase family (以下、GH family と表記する) 7 に属するセルラーゼであり、セルロースの還元末端から作用する。CBHII は GH family 6 に属し、非還元末端から作用する。CBH はどちらもエキソ型に作用(分子鎖の端から分解)するセルラーゼである。セルロース鎖に対して、トンネル構造をした活性部位に取り込むことで、セルロース鎖を引き剥がしながらセロビオース単位で連続的に切断する⁶⁸⁾。両者とも活性ドメインとセルロース結合ドメインがリンカーで繋がった構造をとり、セルロースに吸着することで連続的な加水分解(プロセッシビティ)が行われる(図 2-2)^{69,70)}。EG は、セルロースの非結晶領域に作用し、セロトリオースなどのセロオリゴ糖単位で切断するセルラーゼである。EG は多種多様な GH family に属しており、その中でも EGI (family 7)、EGII (family 5)、EGIII (family 12)、EGV (family 45)がセルロースの非結晶領域に対して典型的なエンド型の作用(分子鎖の内部から分解)を持つといわれている^{71,72)}。また、EG の中でも EGIV および EGVII は GH family 61 に属するセルラーゼであったが、Quinlan らの報告により

酸化的な分解を行うモノオキシダーゼであることが報告されており、Auxiliary Activity Family 9 に分類された⁷³⁾。EGVI (family 74)はエンドグルカナーゼ活性よりもキシログルカナーゼ活性が強いため、セルラーゼよりもむしろヘミセルラーゼに近い働きをしていると考えられる⁷⁴⁾。これら CBH や EG により可溶性のオリゴ糖へ分解された後に、BGL がセルロースの最小構成単位であるグルコースに分解する⁷⁵⁾。これがセルラーゼによるセルロース分解の一連の流れとなる(図 2-3)⁶³⁾。

前述した直接的な分解を行うセルラーゼとは別に、植物はエクспанシン(Expansin)と呼ばれる細胞壁を緩める酵素を保有する。エクспанシンは細胞の伸長のために細胞壁の多糖間の水素結合を切断する働きを持つ⁷⁶⁾。これと同様の働きを持つエクспанシン様タンパク質(Expansin-like protein)がスオレニン(Swollenin)である。スオレニンはセルロースの加水分解を行わないものの、前述した働きにより他の酵素に対して相乗効果を持つことが報告されている⁷⁷⁾。

ヘミセルロースの分解には、その種類によって必要なヘミセルラーゼが異なる。植物細胞壁に含まれる主要なヘミセルロースであるキシランの分解に対しては、GH family 11 に属する XYNI および II^{78,79)}や GH family 10 に属する XYNIII⁸⁰⁾がキシロオリゴ糖に分解する。GH10 と 11 では基質の側鎖認識が異なっており、GH10 は認識に必要となる側鎖のないキシロース残基が GH11 と比較して少ない(図 2-4)⁸¹⁾。その結果、酵素が認識できる部位が GH11 より多くなるためか、キシランの最大分解量も高まることが報告されている。これらキシラナーゼが生成した可溶性キシロオリゴ糖を、 β -キシロシダーゼ(以下、BXL と表記する)がキシロースに分解する。その他に、キシランの側鎖として結合したアラビノースを切断する α -L-アラビノフラノシダーゼ⁸²⁾や、マンナンを分解するマンナナーゼ⁸³⁾など多種多様なヘミセルラーゼが存在する(図 2-5)。

セルロースとヘミセルロースは、前述したように絡み合った構造をしているため、セルロースの分解のためにはヘミセルロースの分解が、ヘミセルロースの分解のためにはセルロースの分解が必須となる。そのため、両者を含有するセルロース系バイオマスの分解にはセルラーゼとヘミセルラーゼが協奏的に作用することが重要となる⁸⁴⁾。

表 2-1: *T. reesei* が分泌する主な酵素一覧

酵素名	略称	分類	酵素活性
セロビオハイドロラーゼ 1	CBHI	GH7	エキソグルカナーゼ
セロビオハイドロラーゼ 2	CBHII	GH6	
エンドグルカナーゼ 1	EGI	GH7	エンドグルカナーゼ
エンドグルカナーゼ 2	EGII	GH5	
エンドグルカナーゼ 3	EGIII	GH12	
エンドグルカナーゼ 4	EGIV	AA9 (GH61)	
エンドグルカナーゼ 5	EGV	GH45	エンドグルカナーゼ
エンドグルカナーゼ 6	EGVI	GH74	キシログルカナーゼ
エンドグルカナーゼ 7	EGVII	AA9 (GH61)	オキシゲナーゼ
β -グルコシダーゼ 1	BGLI	GH3	セロビアーゼ

* GH: Glycoside hydrolase、AA: Auxiliary Activity

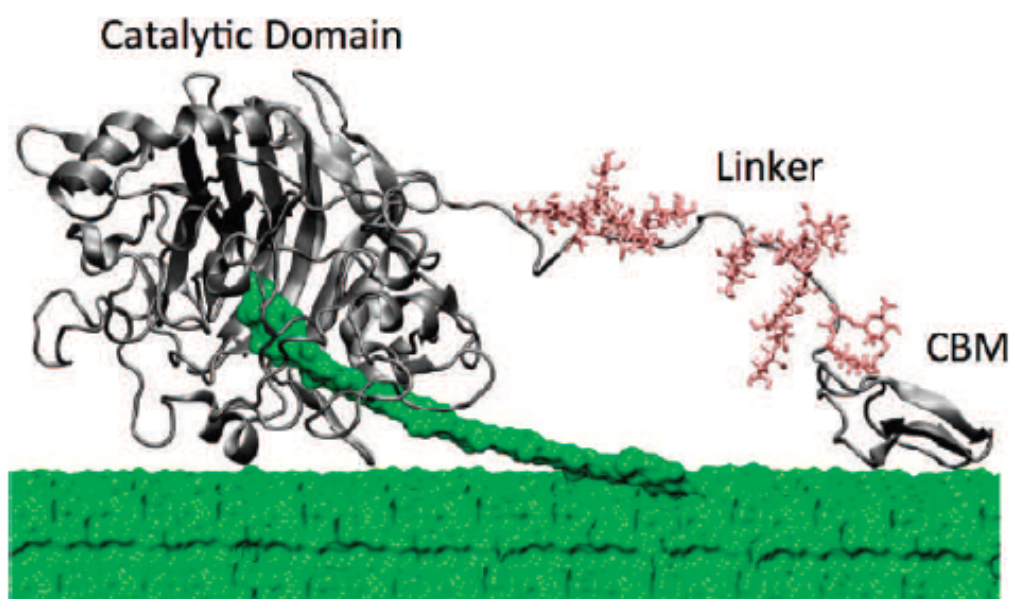


図 2-2: セロビオハイドロラーゼ 1 の構造

引用文献 70 より図を引用。CBHI は触媒ドメイン (Catalytic Domain) とセルロースバインディングモジュール (CBM; Cellulose Binding Module) がリンカー (Linker) によって繋がった構造をとる。

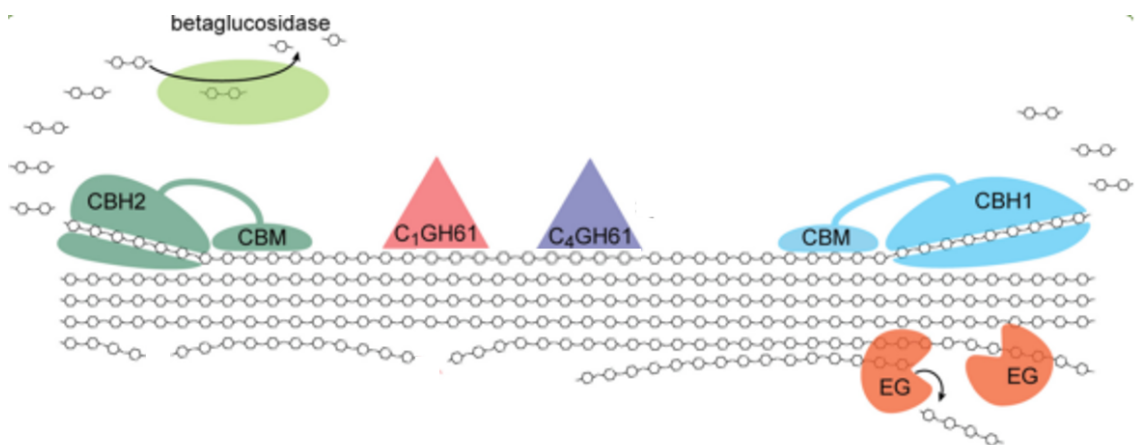


図 2-3: 成分酵素によるセルロース分解

引用文献 63 より図を引用 (著者により一部改変)。各略語は次の通り。CBH1 および 2 はセロビオハイドrolラーゼ 1 および 2、CBM はセルロース結合モジュール、EG はエンドグルカナーゼ、C₁ および C₄GH61 は β -グルコースの 1 位および 4 位を酸化する GH family 61 (現在は Auxiliary Activity Family 9) に分類される酵素を示す。

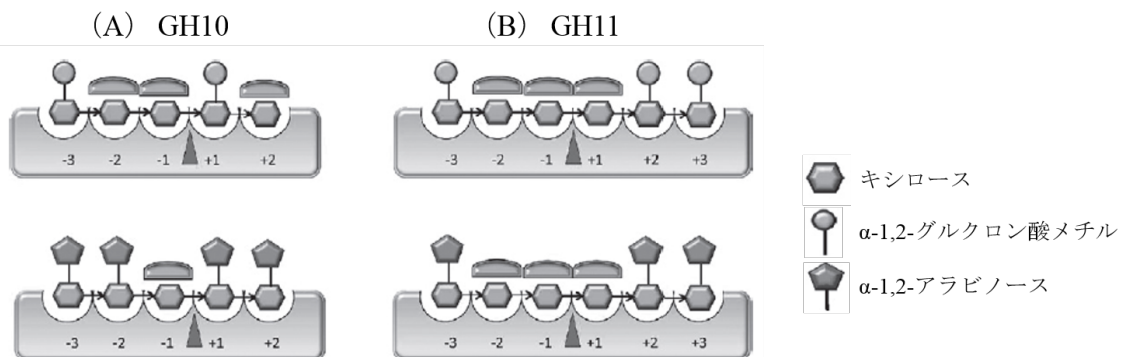
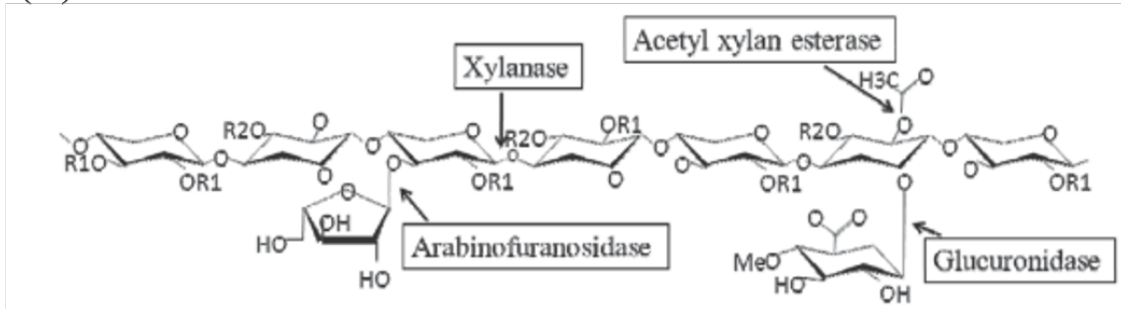


図 2-4: GH ファミリー10 と 11 の基質認識の概略図

引用文献 81 より図を引用 (著者により凡例を改変)。GH10 および GH11 の立体構造上、それぞれの酵素は側鎖を持たないキシロース残基が必要となる。

(A)



(B)

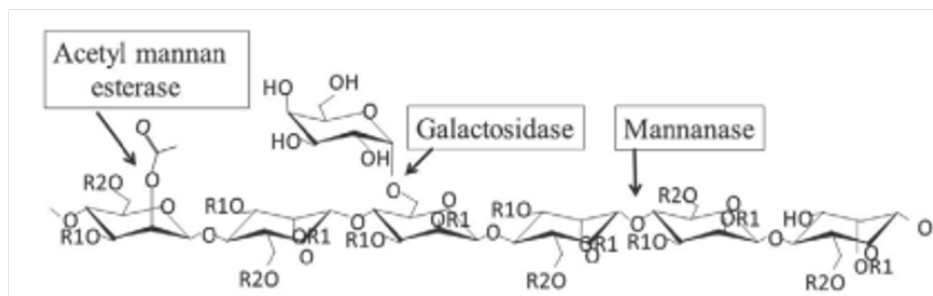


図 2-5:キシラン・マンナンの構造と関与する酵素

引用文献 81 より図を引用。A がキシラン、B がマンナンを示す。キシランにおける R1 は H、 α -グルクロン酸 (4-メチル)、 α -アラビノースまたはアセチル基、R2 は H、 α -アラビノースまたはアセチル基を示す。マンナンにおける R1 は H またはアセチル基、R2 は H または α -ガラクトースを示す。

2.2.3 セルロース系バイオマス由来糖資源の利用方法

酵素分解により得られた糖資源は、発酵を通じて燃料用のエタノールや様々な成品の原料として利用される。燃料用エタノールへの変換は飲料用エタノールの製造方法と基本的に同一であり、酵母である *S. cerevisiae* を用いたエタノール発酵によるグルコースからエタノールへの変換が行われる。*S. cerevisiae* は非常に高効率なエタノール発酵を行うだけでなく⁸⁵⁾、100 g/L を超える高濃度エタノールにも耐性があることが特徴である⁸⁶⁾。

糖化反応およびエタノール発酵の 2 つのプロセスには、糖化と発酵をそれぞれ独立して行われる SHF と糖化と発酵を同時に行う SSF がある(図 2-6)⁸⁷⁾。バイオエタノール生産プロセスの一例として、バイオマス中に含まれるセルロースをヘミセルロースやリグニンから分離する糖化前処理、それに続く酵素糖化、エタノール発酵という 3 つの段階が踏まれる。本プロセスに対し、SHF ではそれぞれの工程に反応器が設

置される。しかしながら、3つの反応器を用いることによって、設備コストも増大し、処理時間も長くなることが問題となる。これに対して、酵素糖化とエタノール発酵を同時に進行させるSSFがある。SSFの利点の1つは、糖化反応の生成物であるグルコースが酵母によって直ちにエタノールへ変換されることで、グルコースによるBGLの生成物阻害が回避される点である⁸⁸⁾。また、生産プロセスが1つ減少することで、必要な設備コストの低下が期待される。実際に、エタノール生産の設備投資費は原料費と同程度の割合を占めているため、全体のコストに与える影響は非常に大きいことがエタノール生産に関する経済性評価により明らかになっている⁸⁹⁾。ただし、同時に糖化と発酵を進行させるために環境条件、特に温度の至適温度の相違が問題点として挙げられる。具体的には、*S. cerevisiae*と酵素の至適温度はそれぞれ30℃付近と50℃付近であり、温度耐性が低い*S. cerevisiae*に条件を合せると酵素反応の効率が大きく損なわれる。そのため、*S. cerevisiae*の高温耐性株の取得に関する研究や高温耐性酵母である*Kluyveromyces*等を利用する研究が多くなされている^{46,47)}。

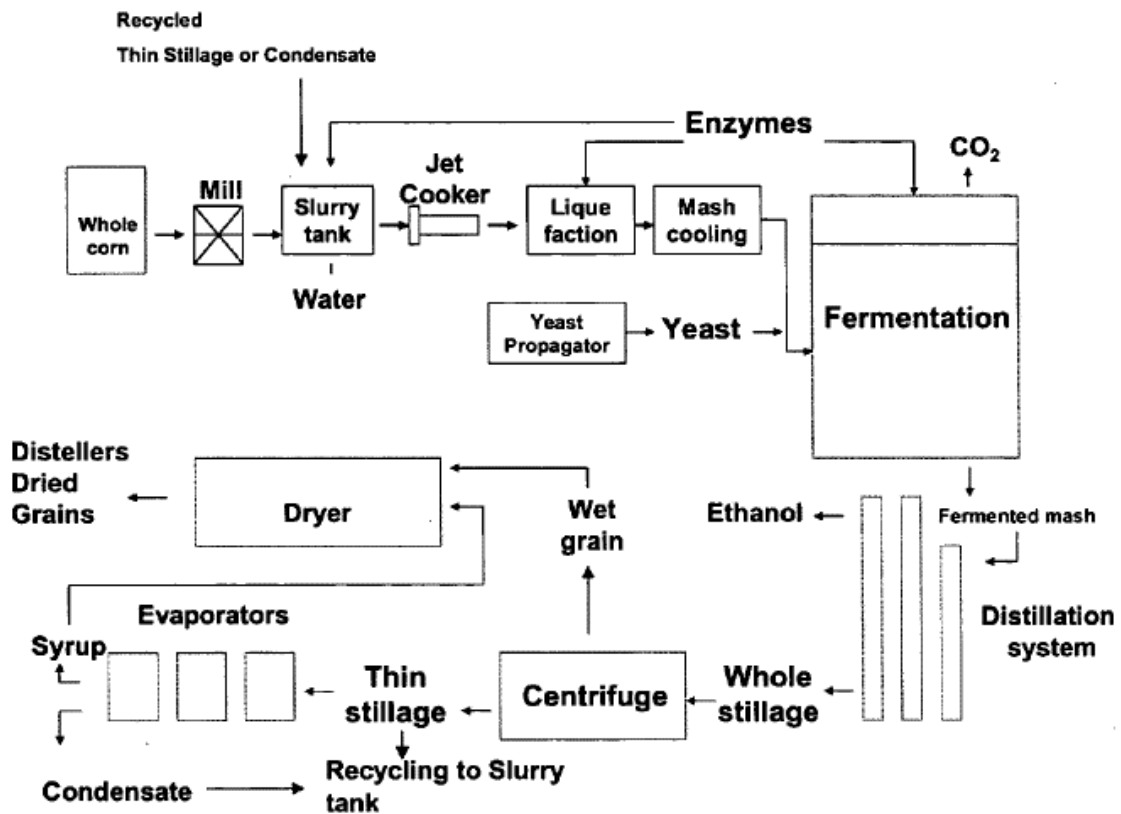


図 2-6: 並行複発酵を利用したエタノール生産プロセス

引用文献 87 より図を引用。酵素 (Enzymes) が発酵タンク (Fermentation) にも添加されることで、糖化と発酵が同時に行われる。

2.3 セルロース系バイオマスの糖化前処理に関する先行研究

の調査

2.3.1 酵素糖化に与える糖化前処理法の影響

セルロース系バイオマスの酵素糖化は、バイオマスの様々な物性によりその効率が大きく変動する。例えばセルロースの結晶性やセルロースの重合度、表面積、リグニン含量等が挙げられる^{90,91,92,93)}。各要素が糖化反応に与える影響の程度に関して、様々な議論がなされている。例えば、Changらはセルロースの結晶性は短時間の反応には大きな影響を与えるが、数日間の反応にはほとんど影響しないことを報告している⁹⁰⁾。また、Caulfieldらは粒子サイズの減少とそれに伴う表面積の増加が、結晶性よりも糖化反応に大きな影響を与えていることを報告している⁹⁴⁾。また、バイオマスに存在するポアサイズも糖化反応の効率に関与しており、酸処理によるポアサイズの増大は被糖化性を向上させることが報告されている⁹⁵⁾。リグニンに関しては、セルロースやヘミセルロースへの酵素の攻撃を阻害することで糖化率そのものを減少させることが報告されている⁹⁰⁾。そこで、これらの阻害要因を排除・緩和するために、酵素糖化の前段階に準備工程を設けることが有効であり、その準備工程として糖化前処理が行われる。

2.3.2 薬剤による糖化前処理法

米国エネルギー省(DOE)の国立再生可能エネルギー研究所(National Renewable energy laboratory、以下、NRELと表記する)は、コーンストーバーやバガスなどを対象に希硫酸処理法を開発した(図 2-7)。その方法は、1時間当たり乾燥重量で 32 kg 処理できるパイロットスケールの設備を用い、コーンストーバーを仕込み濃度 20% (w/w)、温度を 165-195°C、硫酸濃度を 0.5-1.4%、滞留時間 3-12 分間で処理するものである。これにより、ヘミセルロースとして含まれるキシロース成分を最大で 77% 可溶化し、酵素糖化・発酵工程によるセルロース変換率は最大 87% であったと報告されている⁹⁶⁾。このように、希硫酸処理法の特徴はヘミセルロースを可溶化することでバイオマスの被糖化性を向上させることであり、リグニンはバイオマスに残留した状態となる。それに対し、アルカリ処理法の特徴は、リグニンを可溶化することで被糖化性を向上させることである⁹⁷⁾。アルカリ処理に用いられる薬剤として

は水酸化ナトリウム(NaOH)やアンモニア、水酸化カルシウム等が用いられ、それぞれ異なる効果が得られる。最も広く用いられている薬剤が水酸化ナトリウムであり、リグニンと多糖間や、多糖間にある結合を切断することで、脱リグニン効果およびセルロースの重合度や結晶度を低下させることが報告されている⁹⁸⁾。アンモニアを用いた糖化前処理法には超臨界アンモニア処理が開発されており、セルロースの結晶構造をI型からIII型に変化させることで、セルロースの酵素糖化効率が格段に向上することが報告されている⁹⁹⁾。これは、セルロースの結晶構造の変化により、CBHIのセルロースへの吸着量の向上および吸着酵素の比活性の向上に起因する。水酸化カルシウムを用いた方法は、二酸化炭素で容易に中和することができ、生成した炭酸カルシウムは沈殿するため固液分離により回収できることが特徴である。回収された炭酸カルシウムは熱処理により酸化カルシウムとなり再利用が可能となることが利点である。この特性を利用し、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構の徳安らが、日本発の新規糖化前処理法としてCaCCOプロセスを開発した¹⁰⁰⁾。本プロセスは、原料を水酸化カルシウムおよび水と混合した後に95~100℃で加熱することで原料の酵素糖化性を向上させる。その後、二酸化炭素を吹き付けて中和と酵素糖化を行うという、簡素で環境に優しい工程を実現させた。このプロセスは、イナワラ、エリアンサス等の多様な作物の茎葉部のみならず、デンプン・ショ糖などを含む、デンプン精製残渣、サトウキビバガスなどの食品製造残渣にも対応できる。さらに、湿式粉碎技術の導入によって、高い水分量の原料も処理可能になった。まさに、小規模で様々な原料を対象とする地域でも使える、フレキシブルな糖液製造技術である。これらによって得られる糖液は、バイオエタノールや多様な工業製品を製造するための発酵原料として利用できる。地域資源からの糖液製造を通じて、国内でのバイオ新産業を創出するための、多様な研究・技術開発を加速するものと期待されている。

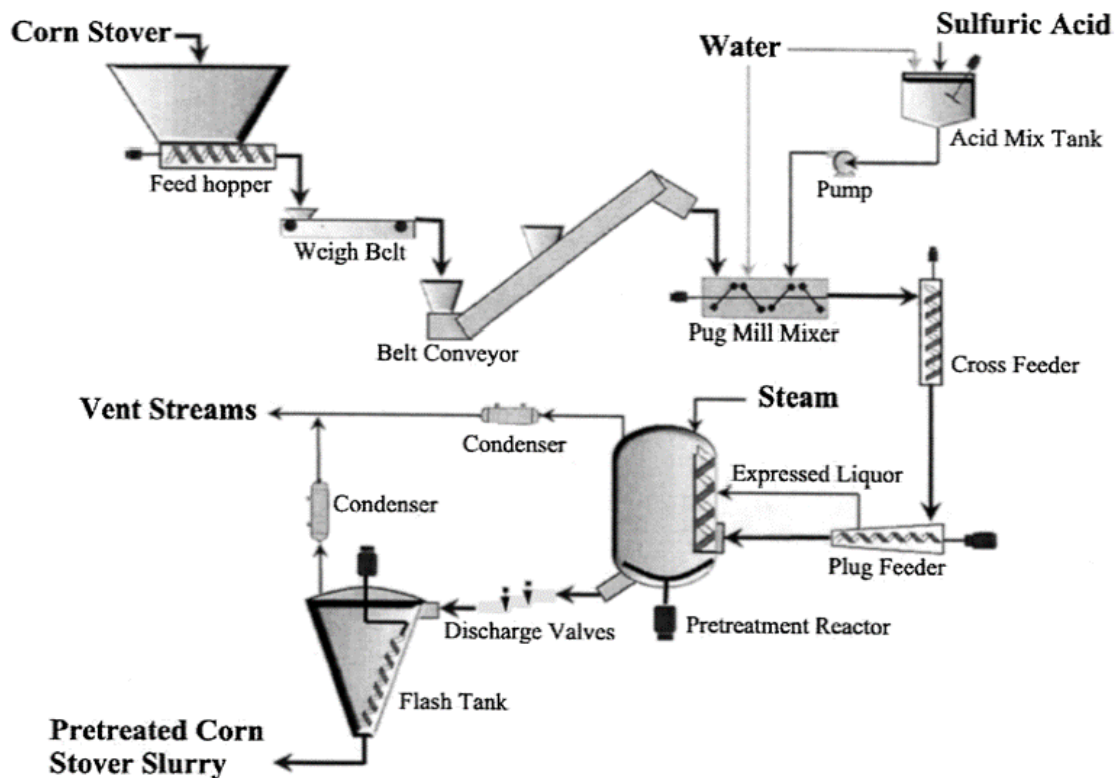


図 2-7: NREL が開発した希硫酸前処理法

引用文献 96 より図を引用。コーンストーバー (Corn Stover) が希硫酸 (Sulfuric Acid) と混合され、糖化前処理反応槽 (Pretreatment Reactor) にて糖化前処理が行われる。

2.3.3 薬剤を使用しない糖化前処理法

セルロース系バイオマスを酵素糖化する際には、バイオマスに対する糖化前処理が不可欠であることは前述したとおりである。そのうち、薬剤を用いない糖化前処理法としては水熱処理法や蒸気爆砕法が挙げられる。水熱処理法はバイオマスを加圧熱水中 (200℃ 前後) で処理することでバイオマスの組織構造を破壊し、その後の糖化処理の反応効率を上げることができる¹⁰¹⁾。その利点として、薬剤を使用しないため環境負荷が非常に低いことや、ヘミセルロースを可溶性のオリゴマーに分解することが挙げられる¹⁰²⁾。蒸気爆砕法は加圧水熱処理に加えて、瞬間的な減圧による機械的作用を加えることで、各組織構造の低分子化を促進することが特徴である¹⁰³⁾。ただし、問題点としては高温処理によりセルロースやヘミセルロースがそれぞれ発酵阻害物質である 5-ヒドロキシメチルフurfural や furfural まで過分解され

ることや、リグニンからバニリン等の発酵阻害物質が生成されること、また蒸気爆砕法は装置のスケールアップが困難であることが挙げられる^{104,105)}。

物理的な破砕処理のみで糖化前処理を行う方法としてはメカノケミカル処理が挙げられる。一般的な糖化前処理法は、薬品使用の有無に関わらずバイオマスを数百 μm に粉砕する工程が含まれる。この粉砕処理は、通常は単に微粉砕化することで表面積の上昇などの効果が狙われるが、メカノケミカル処理は水素結合の切断等の化学反応を引き起こす¹⁰⁶⁾。具体例としては、鋼球やセラミックス球とバイオマスを容器内で回転させることですりつぶしを行うボールミルや、石臼のようにすりつぶすことで粉砕を行うディスクミルなどがある。しかし、その機器の精密さゆえに工業化のためのスケールアップが非常に困難であるため実用化には至っていない¹⁰⁷⁾。様々な課題はあるものの、これらの糖化前処理を行うことによってセルロースを覆うヘミセルロースやリグニンが分解/可溶化することなどにより、酵素による分解効率が上昇し使用する酵素量の低減化につながる成果がある。しかしながら、一方ではこの不可欠なプロセスである糖化前処理が酵素糖化を複雑にしている一因にもなる。その原因は、糖化前処理の種類によってバイオマスの組成や性質が大きく異なるためであるとされている。

2.4 酵素生産菌に関する先行研究の調査

セルラーゼは細菌や真菌など多くの生物が生産することが知られている。真菌としては前述した *T. reesei* 以外に、洗剤用酵素として有用性の高い *Humicola* 属¹⁰⁸⁾をはじめ、*Aspergillus* 属¹⁰⁹⁾や *Rhizopus* 属¹¹⁰⁾など多数報告されている。細菌由来セルラーゼからも洗剤用酵素として利用されている *Bacillus* 属由来のアルカリセルラーゼ¹¹¹⁾や *Clostridium* 属由来の複数の成分酵素が酵素活性を持たないユニットに結合した酵素複合体セルロソーム¹¹²⁾など特徴的なセルラーゼを生産することが報告されている。また、これまではセルロースを栄養源とするウシやシロアリは生体内の微生物がその分解を担うと考えられていたが、シロアリは自身がセルラーゼを生産することが報告されている¹¹³⁾。これらの中でも、セルロース系バイオマスに対する実用的な酵素開発に焦点を絞ると、*T. reesei* が酵素生産菌株の宿主として質的・量的に他を圧倒している。*T. reesei* の研究の始まりは、第二次世界大戦中にパプアニューギニア・ブーゲンビル島で米軍の Natick 研究所のグループが単離したことである。ここで単離された野生株 *T. reesei* QM6a 株が親株となり¹¹⁴⁾、その後世界中で行われる菌株育種の共通の親株となった(図 2-8)¹¹⁵⁾。最初に Natick 研で行われた育種の結果として、線形加速器による変異により、菌体外に分泌されるタンパク質

量が親株の 2-4 倍にまで増強された *T. reesei* QM9414 株が得られた^{116,117)}。国外の取組みとしては QM9414 株を親株としたフィンランド国立技術研究センターにおける育種や¹¹⁸⁾、QM6a 株から直接育種した Rutgers 大学の *T. reesei* RUT-C30¹¹⁹⁾などが挙げられる。そして、日本では 1980 年に設立された「新燃料油開発技術研究組合」(RAPAD)において 7 年に渡る大型国家プロジェクトとして日本型の変異株の開発が実施された。*T. reesei* の育種は協和発酵工業株式会社(現協和発酵キリン株式会社)で実施され、*T. reesei* QM9414 株から単一コロニーの分離、UV 照射、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)処理による育種を経て、外分泌タンパク質の増加、酵素活性の増強、カタボライトリプレッション(異化代謝産物抑制)の低減が行われ、親株の 2 倍以上のタンパク質生産性および酵素活性を有する株が開発された^{120,121,122)}。そこから、さらに NTG 処理が行われ、最終的に L-sorbose によって強力にセルラーゼが誘導される *T. reesei* PC-3-7 株が構築されている¹²³⁾。

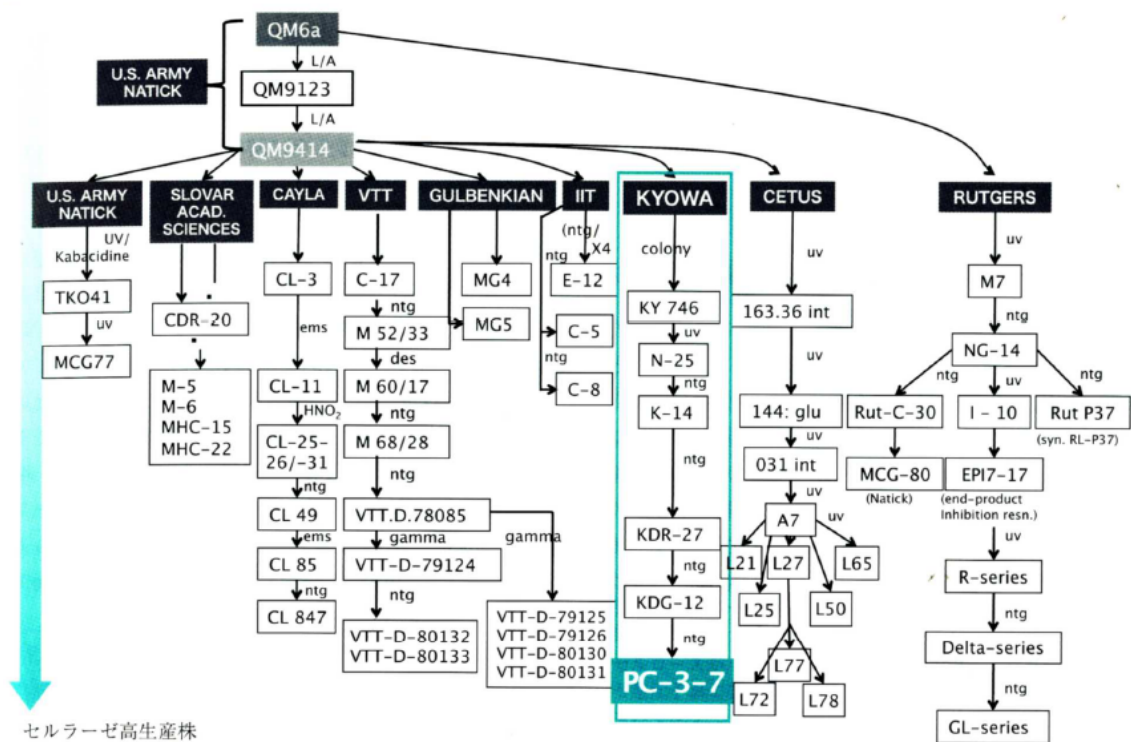


図 2-8: *T. reesei* 菌株育種の系統樹

引用文献 115 より図を引用。*T. reesei* QM6a 株を親株とし、世界中の各機関にて育種開発が行われた。略称の意味は次の通り。L/A: 線形加速器 (Linear accelerator)、colony: コロニー分離、UV: 紫外線照射処理、NTG: N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、EMS: エチルメタンサルホン酸、HNO₂: 亜硝酸、DES: ジエチル硫酸、gamma: ガンマ線。

2.5 糖化酵素開発に関する先行研究の調査

2.5.1 *Trichoderma* 由来糖化酵素の開発

前述したように、セルロース系バイオマスの糖化に現時点で最も実用的な酵素は糸状菌 *Trichoderma* が分泌する糖化酵素である。商用利用を目的とした糖化酵素の開発で最も進んでいるのが、米国 Genencor 社およびデンマーク Novozymes 社である。2000 年に DOE が両社に 4 年間の合計で約 40 億円を提供し、希硫酸処理コーンストーバーを原料としたエタノール生産に必要な酵素コストを約 20 分の 1 から 30 分の 1 まで減少したことが報告されている^{124,125)}。両社は 2008 年にさらに 4 年間で約 35 億円の助成を受け、Genencor 社から Accellerase シリーズ酵素 (Accellerase 1000、1500、DUET、TRIO 等)、Novozymes 社から Cellic シリーズ酵素 (Cellic CTec、CTec2、CTec3 等) が開発された。これらセルロース系バイオマス変換に最適化された市販のセルラーゼ調製物を使用して、高濃度の前処理バイオマスを酵素糖化することで、セルロース変換率は明らかに改善された。これらの酵素開発の詳細に関しては、民間企業によって開発されているため公表されていないが、開発の方向性は遺伝子組換え等の手法により分泌される成分酵素を強化・改変する方法と、成分酵素の量比を最適化する方法の 2 種類に大別される。

2.5.2 成分酵素の強化

成分酵素の強化方法としては外部からより活性の高い酵素の遺伝子を導入する方法や、内在する酵素を進化工学的に改変する方法が挙げられる。セルラーゼの種類には、非結晶性セルロースに作用してセルロース鎖に切れ目を入れる EG、ならびに結晶性および非結晶性のセルロース鎖の末端から、セロビオース単位で糖を切り出す CBH がある。また、これら酵素の作用により生成したセロビオースを加水分解してグルコースを生成する BGL がある。成分酵素の強化として最も多く報告されているのが、この BGL である。その理由は、*T. reesei* が分泌する BGL はその他の分泌される成分酵素と比較して発現量が少なく、活性も非常に低いためである⁷⁷⁾。BGL 活性が不十分のため糖化反応液中にセロビオースが蓄積し、そのセロビオースが CBHI を阻害することでセルロース全体の分解が抑制される¹²⁶⁾。この BGL 活性の不足を補うために、*T. reesei* 由来の酵素に *A. niger* 由来の BGL を添加する試みが報告されており、NaOH 処理トウモロコシ藁を糖化した時の糖化率は BGL 無

添加条件の 1.2 倍となる 81% に上昇した¹²⁷⁾。しかし、2 種類の酵素を別途作製し混合することは酵素生産工程が 2 倍になるため実用化には不利になることが予想される。そこで、Zhang らは *T. reesei* が保有する BGL のうち *bg11* 遺伝子を高発現することで、BGL 活性の不足を補った¹²⁸⁾。遺伝子発現に用いた *cbh1* プロモーターは *T. reesei* が分泌する全タンパク質の約 60% を占める CBHI を発現する強力な発現プロモーターであり、*cbh1* の mRNA の発現レベルも全酵素遺伝子の中で最も高い (図 2-9)¹²⁹⁾。*cbh1* プロモーターを利用した BGL の高発現により、親株である *T. reesei* RUT-C30 の 1.8~3.7 倍高い BGL 活性を有する変異体の取得に成功し、トウモロコシの穂軸に対する糖化能力は 11~29% 上昇することを報告している。同様に、Wang らは、*T. reesei* の BGL 活性を親株の 106 倍まで高め、トウモロコシ穂軸に対する糖化能力を親株の 70% から 84% に上昇したことを報告している¹³⁰⁾。しかし、BGL 活性が大幅に上昇したにも関わらず、バイオマスに対する糖化能は両報告とも数十% しか上昇していない。その原因は、遺伝子組換えによりセルラーゼ遺伝子のプロモーターが複数コピーゲノム上に組み込まれることで、Xyr1 のような各遺伝子共通の転写活性化因子が不足する、すなわちタイトレーションが生じ、CBHI の発現量が低減することで、分泌される酵素全体の活性が低下するためと考えられる¹³¹⁾。それらの問題点を回避するために、Rahman らは酵素発現への影響が比較的小さいことが確認された *egl3* プロモーターおよび *xyn3* プロモーターを用いた *bg11* 遺伝子の高発現を行った¹³²⁾。それにより、酵素全体の活性を低減させることなく、BGL 活性はそれぞれ 4.0 倍および 7.5 倍に上昇した。この *T. reesei* 由来の BGLI (以下、TrBG1 と表記する) を用いた強化には TrBG1 の活性の低さのため限界がある。そこで、他の微生物が有するより強力な BGL を *T. reesei* で異種宿主発現させることで糖化能を強化させる試みがなされている。Ma らは *T. reesei* 由来 BGL よりも活性が高い *Penicillium decumbens* 由来 BGL を異種宿主発現させることで、親株と比較して BGL 活性を 6-8 倍、セルラーゼ活性を 30% 以上増加させ、トウモロコシの茎の糖化反応で生成されるグルコース量を約 1.6 倍に上昇させた¹³³⁾。ただし、同報告では上記と同様に *cbh1* プロモーターを用いて BGL の異種宿主発現が行われているため、酵素の発現バランスが崩れる等の問題点が生じている可能性は否定できない。*T. reesei* における異種宿主発現は一般的に難しいため、各課題を解決した成分酵素の強化がなされていないのが現状の課題と言える。

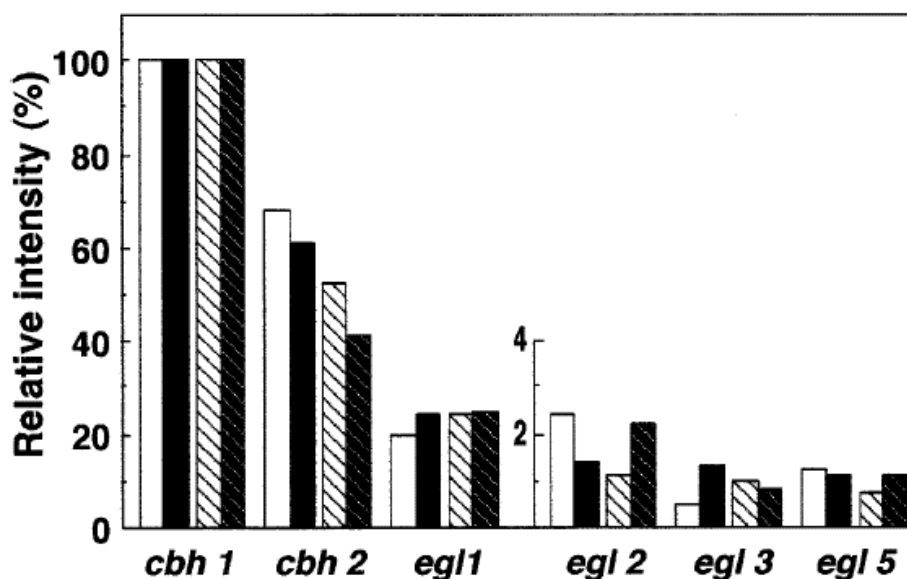


図 2-9: *T. reesei* PC-3-7 株と QM9414 株の発現解析

引用文献 129 より図を引用。棒グラフは菌株と酵素の誘導物質の違いを示す。PC-3-7 株は白色がソホコース、斜線が L-ソルボース、QM9414 株は白色斜線がソホコース、黒色斜線が L-ソルボースを示す。

2.5.3 成分酵素の最適化

セルロース系バイオマスを効率的に分解するためには、多種多様なセルラーゼ・ヘミセルラーゼが必要となる。その原因の 1 つは、基質であるセルロース系バイオマスがグルコースやキシロース、アラビノースなど複数の糖類から成るためである。それらの糖類から構成されるセルロースやキシラン・マンナンなどの各種ヘミセルロースの分解に対して、異なる酵素が必要となることは当然と言える。また、セルロースという 1 種類の基質中でも、結晶性部位と非結晶性部位が混在するなど、その状態は一様ではない。もう 1 つの原因としては、セルラーゼの相乗作用が挙げられる。セルロースの分解に対して、1 種類のセルラーゼが単独で働いた際の分解活性は非常に限られたものである。しかし、複数の機能の異なる成分酵素が同時に働くことで、その分解活性はそれぞれの活性を足したものの数倍以上に高くなる。例えば、エキソ作用をもつ CBH はエンド作用をもつ EG がセルロース鎖に切れ目を入れることでアタックできる還元末端が増えることや障害を取り除くことで単独で働くよりも数倍高い酵素活性を表す(図 2-10)¹³⁴⁾。

この相乗効果は、成分酵素の比率最適化と強い相関があることが多く報告されている。そのため、分泌された酵素群の中で各成分酵素がどの程度機能しているかを

調べることは、酵素改良のための重要な情報となる^{135,136,137)}。しかし、各成分酵素が酵素群中でバイオマスの分解活性にどの程度寄与するかを明らかにすることは、非常に困難である。その原因は、各成分酵素の触媒機能が異なるにも関わらず、成分酵素の活性を独立して測定できないためである。例えば、セルラーゼの酵素活性測定法として一般的に用いられるフィルターペーパー分解活性(以下、FPU活性と表記する)は、セルロース分解に関与する全ての成分酵素¹³⁸⁾の総合活性を表す。カルボキシメチルセルロース分解活性(以下、CMC活性と表記する)はEGのようなエンド活性を有する成分酵素全ての活性が検出される¹³⁹⁾。また、セルロース分解活性を有しないBGLのような酵素も、他の成分酵素が生成したオリゴ糖を分解することで前述した2種の測定方法に強く影響する¹³²⁾。さらに、*p*-nitrophenyl- β -D-Glucopyranoside や *p*-nitrophenyl- β -D-lactopyranoside(以下、pNPLと表記する)などの非天然物由来の人工基質を用いた際も、同様に複数の成分酵素が作用する¹⁴⁰⁾。これらに加えて、スオレニンのような成分酵素自身には分解活性を持たない酵素も、他の酵素と相乗効果を表す補助的な役割をすることで、酵素活性に関与する⁷⁷⁾。このような理由のため、複合酵素系における特定成分酵素の影響を明らかにすることは、非常に困難である。

成分酵素の比率を最適化する手段として、*T. reesei* が分泌する酵素をそのまま用いずに、成分酵素を別途調製し、任意の比率で酵素を混合したカクテル酵素が用いられる場合がある。Banerjeeらは、基質の種類に合わせた最適化を行うため、5種のバイオマス(コーンストーパー、スイッチグラス、ミスカンサス、蒸留乾燥穀物、ポプラ)に3種のアルカリ処理(AFEX、NaOH、アルカリ過酸化)を組み合わせた合計15種類の前処理バイオマスに対し、6種の主要な成分酵素(CBHI、CBHII、EGI、BGL、XYN、BXL)に加えて10種の補助的な役割を担う成分酵素の比率の最適化を試みた¹⁴¹⁾。それにより、市販酵素よりも高効率な分解を行う最適酵素成分の調製方法を明らかにした(図2-11)。しかし、*T. reesei* は数十種類の成分酵素を分泌していることが報告されている¹⁴²⁾。このセルラーゼの多様性は、ほとんどすべてのセルロース分解菌に共通しており、天然セルロースの酵素分解過程においては、それぞれのセルラーゼ成分の役割分担が存在するものと思われる。このように、酵素の種類が限定されたカクテル酵素を用いて各成分酵素の機能を明らかにすることは非現実的であると考えられ、糖化酵素がもつ高度な相乗作用が高機能な酵素の開発の大きな壁となっている。

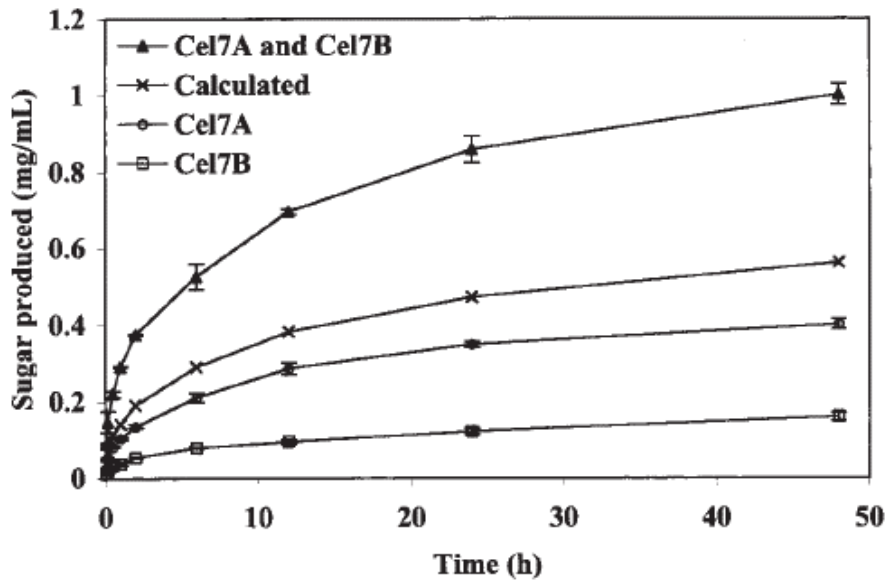


図 2-10: セルロース分解における CBHI と EGI の相乗効果

引用文献 134 より図を引用。蒸気処理したトウヒ(針葉樹)を CBHI(Cel7A)と EGI (Cel7B)を用いて糖化した。丸型の CBHI と四角形の EGI を加算するとバツ印になるが、2 酵素を同時に作用させると相乗効果が表れて三角形のシンボルまで生成糖量が向上する。

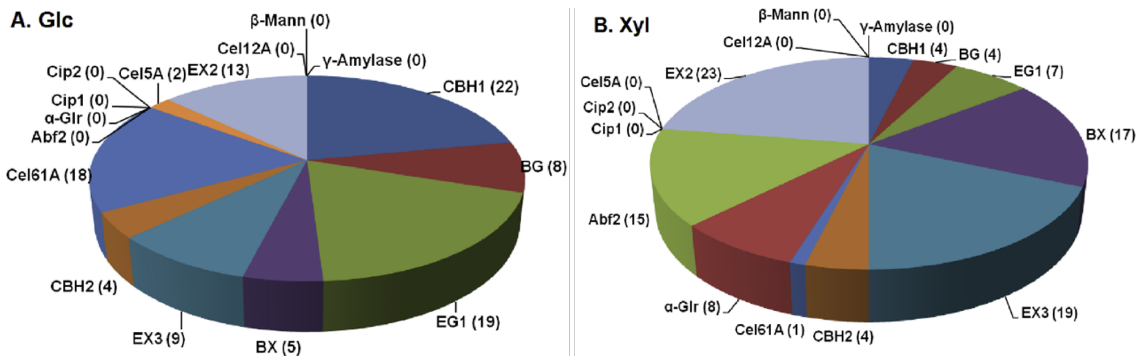


図 2-11: AFEX 処理コーンストローバーの糖化に最適化した 16 成分酵素の比率
引用文献 141 より図を引用。A はグルコース、B はキシロースの収率を最大化した比率。数字は全体に占める割合を示す。各略語は次の通り。CBH1 および 2: セロビオハイドロラーゼ 1 および 2、EG1: エンドグルカナーゼ 1、Cel5A: エンドグルカナーゼ 2、Cel12A: エンドグルカナーゼ 3、Cel61A: エンドグルカナーゼ 4、BG: β-グルコシダーゼ、EX2 および 3: β-キシラナーゼ 2 および 3、BX: β-キシロシダーゼ、Abf2: アラビノフラノシダーゼ、α-Glr: α-グルクロニダーゼ、β-Mann: β-マンナナーゼ、γ-Amylase: アミログルコシダーゼ、Cip1 および 2: セルロース誘導タンパク質 (Cellulose induced protein)。

2.6 本章のまとめ

セルロース系バイオマスを燃料用エタノールや化成品に変換するためには、主要な構成成分であるセルロースやヘミセルロースを、グルコースなどの発酵可能な糖源に変換しなければならない。そこで、バイオマスを利用するための技術として、様々な糖化前処理手法や酵素糖化技術が研究開発されてきた。特に高コストの原因となる糖化酵素に対する研究は数十年に及ぶ菌株の育種開発がなされ、近年の多大な研究開発投資により糖化に必要となる酵素の量は従来の数十分の1にまで減少してきている。しかし、工業的な利用のためにはさらなるコストの低下が必要とされており、現在でも様々な企業や大学がより強力な酵素の開発を行っている。それにも関わらず、糖化酵素の生産菌として広く利用されている *T. reesei* の遺伝子組換え技術の困難さのため、分泌される酵素バランスを崩すことなく高いバイオマス糖化能を示す酵素を開発することは非常に困難である。多くの報告では対象とした酵素活性が大幅に上昇する一方で、バイオマス糖化能の大幅な向上はなされていない。そのため、最適なバランスを維持し、かつ比活性が高いなどの高機能な成分酵素を発現する手法が望まれている。また、セルラーゼは相乗効果を有するために、混合酵素系における単独酵素の役割は測定することが不可能である。しかし、セルロース系バイオマスの分解に対する各成分酵素の影響が分かれば、成分酵素比率の最適化に繋がられる可能性があるだろう。現状は、成分酵素のカクテルにより評価されているが、分泌酵素の複雑さを考慮すると多くの問題点を抱えている。そのため、新規評価手法で得られた結果を *T. reesei* の遺伝子組換えに応用することで、少量の酵素で十分なバイオマス分解能を有する高機能な酵素の開発が期待できるだろう。

第三章 BGL 活性増強糖化酵素 JN11 の構築と能力評価

本章では、*T. reesei* 由来酵素の弱点である BGL 活性の低さを補強するために *A. aculeatus* 由来 BGL の異種宿主発現を試み、構築した菌株 *T. reesei* X3AB1 株由来酵素 JN11 の能力評価した結果について記す。3.1 では、*T. reesei* PC-3-7 株の BGL 活性の強化および構築した酵素の能力評価の方法論について記す。3.2 では、実験操作について説明する。3.3 では、JN11 の酵素活性およびバイオマス糖化能を市販酵素と比較した結果を記す。3.4 では、本章のまとめについて記す。

3.1 はじめに

エネルギー作物を対象とした実用的なバイオマス糖化酵素に求められる特性は、セルロース・ヘミセルロースに対する高い分解能力を低コストで達成することである。例えば、糖化が困難な木質成分からセルロースを分解してグルコースを取り出すために、かつては硫酸などの強酸を用いた酸加水分解法が主流であった。この方法はセルロースの分解速度の制御が難しく、生成したグルコースが過剰に分解されて収率が低下してしまうこと、また反応液中に次の工程であるエタノール発酵を阻害する物質が生成してしまうことが課題である。さらに、使用する溶媒が強酸であることから、反応容器が腐食されてしまうことや、回収した硫酸の処理は環境負荷が高く、処理コストも高くなってしまふことなどが大きな阻害要因であった。そこで、現在では環境負荷の少ない酵素糖化法が研究開発の主流となっており、セルロースを分解するセルラーゼという複合酵素を使用する。セルロース系バイオマスは、セルロースが結晶構造を持つことや、リグニンやヘミセルロースと複雑な構造をしているために、酵素分解にも強い抵抗性を有する。そのため、粉碎をして表面積を増やすなど、セルラーゼが働きやすい状態にするための糖化前処理が必要になる。この技術として、粉碎処理、オゾン処理、水熱処理、爆砕処理および超臨界水処理など様々が研究されている。ただし、これらは酸加水分解法と比較して、さらに処理コストが高くなってしまふことから、現在のエタノール生産に関わる研究では、できるだけコストのかからない効果的な糖質分解技術の構築が研究開発の最重要ポイントになっている。

実用的なセルロース系バイオマス分解酵素の開発には、*T. reesei* が酵素生産菌として広く用いられている。*T. reesei* はセルロース系バイオマスの分解に必要な多種多様な酵素を菌体外へ分泌し、その生産量がきわめて高い(～100 g/L)など、他の菌株を圧倒するメリットを有する。しかし、BGL 活性の弱さが実用化を阻む大きな問題となっている。そのため、強力な遺伝子発現能を有する *T. reesei* の *cbh1* プロモーターを用いて *bgl* 遺伝子を発現することで、BGL 活性を大幅に向上させるなど、BGL 活性を強化した事例が多数報告されている^{128,130})。先行研究では CBH と BGL が共通のプロモーターを利用したことでタイトレーションが発生し、その改良効果は数十パーセントに留まる。そのため、酵素発現にはバイオマス分解に関わる酵素発現に影響を与えないプロモーターを用いることが求められる。*T. reesei* PC-3-7 株に特異的に発現する *xyn3* のプロモーター発現能は *cbh1* プロモーターの 10% と弱いため、タイトレーションの回避が期待された¹⁴³)。BGL の発現に *xyn3* プロモーターを用いたところ、BGL 活性は親株の 7.5 倍、FPU 活性を 1.3 倍上昇させることに成功している¹³²)。さらなる強化のためには発現させる BGL の種類そのものを変えることが考えられる。TrBG1 と他菌株の BGL を比較した例としては、*A. japonicus* および *P. verruculosum* 由来 BGL との比較が報告されており、セロビオースに対する動力学的パラメーター K_{cat}/K_m は TrBG1 の 56 に対して、それぞれ 368 および 74 であった¹⁴⁴)。本研究では、*A. aculeatus* 由来 BGL である AaBG1 を利用した。AaBG1 は、*T. reesei* の BGL である TrBG1 と比較して 10 倍以上比活性が高いことが特徴である^{145,146})。さらに、グルコースを BGL のインヒビターとして用いた場合、AaBG1 の阻害定数 K_i 値は TrBG1 よりも 1.8 倍高い。そこで、本章では AaBG1 の遺伝子組換えに *xyn3* プロモーターを用いることで、酵素の高機能化を試みる。

構築した酵素の能力評価は酵素活性測定に加えて、先述してきたように、本研究において重要と考える前処理バイオマスを用いた糖化試験を実施した。従来の多くの研究では、試薬として市販されている微結晶セルロースを用いた糖化能評価が行われていた。しかし、微結晶セルロースと実際のバイオマスではヘミセルロースとリグニンの存在の有無や、セルロースの存在状態の違いなどその性状は全く異なっている。本研究は工業的に使用可能な酵素の構築を目指すため、バイオマスを用いなければその能力評価は不可能であると考えた。さらに、バイオマスの種類によってもその性状は大きく異なると考え、草本としてイナワラ・エリアンサス、木本としてユーカリ・スギの 4 種類を試験した。また、糖化前処理の条件も工業化を想定したものであることが望ましい。そこで、糖化前処理条件を決定する評価基準として糖化率と回収率を掛け合わせた値(利用率)が最大となるような温度・処理時間・酸/アルカリ濃度条件で作製された標準前処理標品を用いた⁵⁵)。比較対象となる酵素として親株はもちろんのこと、市販されている酵素の中でもより商業的に利用される可能性が高

いと考えられる Novozymes 社の Cellic CTec と Genencor 社の Accellerase 1500 との比較を実施した。

3.2 実験操作

3.2.1 菌株と酵素の調製

糖化酵素生産菌株として、培地にポテトデキストロース寒天(以下、PDA とする)プレートまたはスラント上に増殖させた *T. reesei* PC-3-7 株を用いた。*T. reesei* PC-3-7 株の胞子 (10^7 個) を 1% の Avicel を炭素源として含む basal 培地¹²³⁾ 50 mL に接種し、振盪条件 220 rpm、温度 28°C にて 7 日間培養した。培養後、培養液を遠心分離で菌体を取り除いた上清を糖化酵素として用いた。TrBG1 を高発現させた菌株名を X3TB1 とし、同様に酵素を調製した。

市販酵素 Accellerase 1500 および Cellic CTec はそれぞれ Genencor 社(アメリカ)および Novozymes 社(デンマーク)から購入した。

T. reesei の成分酵素は、それらの遺伝子を *A. oryzae* および *Schizosaccharomyce pombe* を宿主として発現させることで調製した。CBHI と EGI については、各遺伝子を組換えた *A. oryzae* を大関社から購入した。保存菌株を 4% グルコース培地 100 mL (4 % glucose、1 % peptone、0.1 % Tween 80、0.5 % KH_2PO_4 、0.1 % NH_4Cl 、0.05 % MgSO_4) に接種し、30°C・200 rpm で 3 日間前培養した。前培養液のうち 12 mL を 1.2 L の 4% グルコース培地を加えた 2 L ジャーファーマンターに接種し、30°C・400 rpm で 3 日間培養した。培養液を Miracloth (Calbiochem) を用いてフィルターろ過し、ろ液に 80% となるよう硫酸アンモニウムを添加した。遠心分離 (30 分、9000 rpm) によって上清を回収し、その上清にリン酸膨潤セルロース (PSC) を 10 g 添加した¹⁴⁸⁾。PSC を添加した上清を氷上で 1 時間静置し、10 分・4000 rpm で遠心分離し、これを 5 回繰り返した。沈殿した PSC を 1 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 20 mL に懸濁し、37°C・150 rpm で振盪しながら保温した。保温後、懸濁液を遠心分離 (10 分・4000 rpm) して上清を回収し、この操作を 3 回繰り返した。得られた上清を精製酵素として用いた。CBHII については、*cbh2* 遺伝子を組換えた *S. pombe* の培養液を旭硝子社から購入した。培養液を 80% 飽和硫酸分画により精製し、沈殿を 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.5) に溶解した。溶解液をカラムクロマトグラフィー (DEAE-toyopearl 650 S、HiTrap Phenyl HP、Mono Q columns) により精製し、活性画分を回収し、濃縮することで精製酵素として用いた。

3.2.2 Full-length *aabgl1* の発現ベクター構築

aabgl1 の全長 cDNA 配列は pABG7¹⁴⁸⁾をテンプレートに用い、表 3-1 に示したプライマーを用いて PCR によって増幅させた。発現カセットフラグメントの調製のため pBxyn3aq-D0¹⁴⁹⁾をテンプレートに用い、表 3-1 に示したプライマーを用いてインバーズ PCR を行った。*Aabgl1* 発現カセット pBxyn3aab11 を構築するため、増幅した *aabgl1* インサートとカセットフラグメントの融合を In-fusion PCR advanced kit (タカラバイオ)を取扱説明書に従って行った。*Aabl1* と *xyn3* プロモーター、*amdS* マーカーの塩基配列は、GenomeLabTM Dye Terminator Cycle Sequencing Quick Start kit および CEQTM 2000XL DNA sequencer (Beckman Coulter)を使用し、PCR エラーが生じていないことを確認した。形質転換を行う前にバックグラウンドベクターの影響を最小限に抑えるため、フラグメントは EcoRI-SalI を用いてプラスミドより切り出した。

表 3-1: *Aabgl1* 発現ベクター構築用プライマー配列

用途	プライマー配列
<i>Aabgl1</i> の全長増幅用	5'-tgagtttcaattgaggcggacaatATGAAGCTCAGTTGGCTTGAG-3'
	5'-ctgccatacccatgtagcagagcatTCATTGCACCTTCGGGAGCG-3'
発現カセットフラグメント	5'-ATGCTCTGCTACATGGGTATGGCAGGGTCGG-3'
増幅用	5'-ATTGTCCGCCTCAATTGAAACTCAGTGGAAGATGGTAG-3'

* 小文字は In-fusion クローニング用の相同配列

3.2.3 *T. reesei* PC-3-7 株の形質転換

T. reesei PC-3-7 株の形質転換は、プロトプラスト-PEG 法により実施した¹⁵⁰⁾。発現ベクターにはセレクションマーカーとしてアセトアミダーゼ遺伝子が存在するため、アセトアミドを唯一の窒素源とする培地で生育した株を形質転換体とし、得られた分生子 (conidia) を PDA プレートに植菌した。発現ベクターのコピー数および相同組換えの確認は、AlkPhos Direct kit (GE Healthcare Bio Science)によるサザンブロット法により行った。EcoRI を用いて切断した染色体 DNA を電気泳動したのち、Hybond N+ membrane (GE Healthcare Bio Science) に転写し、アルカリフォスファターゼでラベルした *xyn3* の HincII フラグメント (0.5 kb) をハイブリダイズした。

3.2.4 転写解析

RNA 抽出と cDNA の合成は、古川らの方法に従った¹⁵¹⁾。定量リアルタイム PCR は、LightCycler 480 System (Roche Diagnostics)を用いて行った。増幅反応は最終容量 20 μ L 中に、LightCycler 480 SYBR Green I Master kit (Roche Diagnostics)を用いて 0.5 mM フォワードプライマーとリバースプライマー (表 3-2) および 2 μ L の 100 倍希釈した cDNA を用いて行った。サーマルサイクラーの条件は 95°C 5 分→【95°C 10 秒→60°C 10 秒→72°C 10 秒】×45 で行った。全ての条件で、プライマーを添加しないサンプルをネガティブコントロールとし、それぞれ 3 つの独立したサンプルに対して解析を行った。PCR 増幅の特異性は融解曲線分析にて確認し、さらにアガロースゲル電気泳動によって PCR 産物を確認した。

表 3-2: qRT-PCR に用いたプライマー一覧

名前	配列	目的遺伝子
<i>cbh1</i> F	cttggcaacgagttctctt	<i>cbh1</i>
<i>cbh1</i> R	tgttggtgggatacttgct	
<i>egl1</i> F	cggctacaaaagctactacg	<i>egl1</i>
<i>egl1</i> R	ctggtacttgcgggtgat	
<i>trbg11</i> F	agtgacagcttcagcgag	<i>trbg1</i>
<i>trbg11</i> R	ggagaggcgtgagtagttg	
<i>aabg1</i> F	tcctacaaccagatcaacaacagc	<i>aabg1</i>
<i>aabg1</i> R	gccaaagcagagccaacac	
<i>xyn1</i> F	ggttgacgactggatct	<i>xyn1</i>
<i>xyn1</i> R	ggttgctcctccatgatgtag	
<i>xyn2</i> F	ccgtcaactggtccaact	<i>xyn2</i>
<i>xyn2</i> R	acacggagaggtagctgtt	
<i>xyn3</i> F	gtacaaggcaagattcg	<i>xyn3</i>
<i>xyn3</i> R	aaggcaatcgagacaaact	
<i>xyn4</i> F	gggtggcgagagatactt	<i>xyn4</i>
<i>xyn4</i> R	tgcccactcagtctgtatg	
<i>xyn30B</i> F	gacagtgggcaattatggt	<i>xyn30B</i>
<i>xyn30B</i> R	agtgggtgccacagagataac	
<i>bx11</i> F	acatcaagcctggtcactc	<i>bx11</i>
<i>bx11</i> R	cagactcgtcgggtttca	
<i>bx12</i> F	tggtacggactgcatta	<i>bx12</i>
<i>bx12</i> R	gttgcgaaagttgctaggt	
<i>bx13</i> F	gttgcttgcctcggatgt	<i>bx13</i>
<i>bx13</i> R	ccctccatcgacacacta	

F: フォワードプライマー、R: リバースプライマー

3.2.5 酵素活性測定とタンパク質測定

セルラーゼ活性には、アビセラーゼ活性と pNPL 分解活性の 2 種類の測定法を用いた。アビセラーゼ活性は 0.5 % CEOLUS PH-101 (以下、Avicel と表記する) (旭化成株式会社) を基質とし、50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を用いて、50°C で 60 分間反応させた。生成した還元糖は、ジニトロサリチル酸法 (以下、DNS 法と表記す

る)によって測定した¹⁵²⁾。pNPL 分解活性は 1 mM の pNPL (Sigma-Aldrich) を基質とし、50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を用いて、50°C で 10 分間反応させた。生成した *p*-ニトロフェノール (以下、pNP と表記する) は吸光度 (410 nm) により測定した。CMC 活性の測定は 1.0% CMC (low viscosity, 50-200 cps, Sigma Chemical) を基質とし、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) を用い、50°C で 15 分間酵素反応し、DNS 法により還元糖を測定した。キシラナーゼ活性は、まず基質の調製のため birch wood xylan (Sigma Chemical) を純水に 3.0% (w/v) 加え、沸騰水中で 1 分間加熱した。その後、遠心分離 (23,000 g・10 分間) によって上清を回収した。この上清を 1.5% (v/v) になるように 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) に添加し、50°C で 10 分間反応させ、生成した還元糖を DNS 法により測定した。BGL 活性は 20 mM セロビオースを基質に、50 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.0) を用いて、50°C で 10 分間反応させた。生成したグルコースは、グルコース CII テストワコー (和光純薬株式会社) を用いて測定した。キシロシダーゼ活性は 1 mM 4-Nitrophenyl-D-xylopyranoside (以下、pNPX と表記する) (Sigma Chemical) を基質とし、50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を用いて、50°C で 10 分間反応させた。生成した pNP は吸光度 (410 nm) により測定した。酵素活性 1 ユニットの定義は 1 分間に基質を分解して生成する 1 μ mol の還元糖または pNP 量とした。ただし、BGL 活性は 1 分間に生成する 2 μ mol のグルコース量を 1 ユニットとした。

タンパク質濃度の測定はブラッドフォード法¹⁵³⁾を用い、Quick Start Bradford protein assay kit (Bio-Rad Laboratories) を取扱説明書に従って使用した。検量線に使用する標準タンパク質として、ウシガンマグロブリンを用いた。

タンパク質の電気泳動は 12.5% のポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE を行った¹⁵⁴⁾。染色はクマシーブリリアントブルー R250 (Bio rad) を用いて行った。分子量マーカーは Precision Plus Dual Standard Marker kit for SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories) を用いた。

JN11 に成分酵素を添加したアビセラーゼ活性測定には、成分酵素を 0.2 μ M とするよう使用した。

3.2.6 バイオマスの糖化前処理と組成分析用サンプルの調製

セルロース系バイオマスとしてイナワラ、エリアンサス、ユーカリ、スギを用いた。各バイオマスは粗粉碎機 (オリエント粉碎機株式会社) および微粉碎機 (ホソカワミクロン株式会社) によって粒径約 100-200 μ m に粉碎させた。粉碎したバイオマスのうち、イナワラ・エリアンサス・ユーカリはバッチ式オートクレーブ (株式会社東洋高压) を用

いて酸・アルカリ、水熱処理した。ただし、イナワラのアルカリ処理と水熱処理は flow-through reaction test apparatus (株式会社東洋高压)を用いた。酸処理は 1.0% 硫酸 (w/v)、アルカリ処理は 0.5% NaOH (w/v)を用い、バイオマスの仕込み濃度は 3.0%とした。調製温度と処理時間は、イナワラのアルカリ処理が 120°C・5 分、酸処理が 170°C・5 分、水熱処理が 200°C・10 分であり、エリアンサスのアルカリ処理が 140°C・12 分、酸処理が 170°C・5 分、水熱処理が 200°C・15 分、ユーカリのアルカリ処理が 200°C・10 分、酸処理が 180°C・5 分、水熱処理が 220°C 15 分であった。スギは粉碎物 200 g を水蒸気爆砕装置 (日本電熱株式会社)によって糖化前処理をした。処理時間は 10 分、温度は 240°C、圧力条件は 3.35 MPa とした。各バイオマスは処理後に固形分を回収し、水で洗浄して糖化反応に用いた。

前処理バイオマスの糖組成は硫酸により加水分解し、HPLC にて糖を定量した。まず試料 100 mg に 1 mL の 72% 硫酸を添加して混合し、30°C の恒温槽にて 1 時間反応させた。反応後、28 mL の超純水を添加して混合し、オートクレーブ (121°C・1 時間)した。加水分解液をガラスろ紙でろ過して得たる液を炭酸カルシウムで pH 5-6 に調整し、遠心分離 (10000 rpm・10 分)し、その上清画分を HPLC 分析用サンプルとした。

3.2.7 糖化反応

糖化反応の反応条件は、20 mL プラスチック容器に基質濃度を乾燥重量で 5% (w/v) 加え、100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0)を加えて容量を 2 mL とし、酵素量を 3-10 mg/g-バイオマスとし、温度 50°C、攪拌条件 150 rpm、反応時間を 72 時間とした。JN11 に成分酵素を添加した糖化反応の条件は、1.5 mL マイクロチューブ (Eppendorf)に爆砕処理スギを乾燥重量で 5% (w/v)とし、100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0)を使用し、酵素量は JN11 を 1 mg/g-バイオマス、成分酵素を 0.2 μ M とした。酵素反応は 50°C・1500 rpm で 72 時間反応させた。反応後、酵素反応を停止させるため 95°C で 5 分加熱し、遠心分離 (15000 rpm・5 分)によって上清画分を回収し、生成したグルコースおよびキシロースを HPLC によって測定した。糖化率は、バイオマスに含まれるセルロースおよびキシロースから換算した各糖重量 (g) に対する生成した糖重量 (g) の割合とした。なお、生成した糖は加水分解による水分子の付加を考慮し、グルコースの分子量 180 およびキシロースの分子量 150 に対する水の分子量 18 からそれぞれ 0.90 および 0.88 倍を掛けた値を用いた。

3.2.8 HPLC 分析

糖化反応の上清およびバイオマスの酸加水分解液上清を 0.2 μm フィルターでろ過し、HPLC Prominence (株式会社島津製作所) を用いて分析した。糖化反応で生成したグルコースおよびキシロースは、Shimpak ISA-07/S2504 (株式会社島津ジーエルシー) および ISA-07、OPTI-GUARD DVB (ラボラボカンパニー株式会社) をカラムおよびガードカラムに用いた。分析条件は、温度 70°C、流量 0.5 mL/min とし、移動相は溶液 A (0.15 M ホウ酸、pH 8.0) および溶液 B (0.7 M ホウ酸、pH 9.0) を混合したグラジエント溶離とした。グラジエントは 30 分間に A:B (30:70、v/v) から A:B (20:80、v/v) まで線形変化させた。バイオマスの酸加水分解液に含まれるグルコースとキシロースの分析は、Asahipak NH2P-50 4E (昭和電工株式会社) および Asahipak NH2P-50G 4A (昭和電工株式会社)、OPTI-GUARD DVB をカラムおよびガードカラムを用いた。分析条件は、温度 45°C、流量 0.8 mL/min とし、移動相として 0.3% リン酸:アセトニトリル混合液 (15:85、v/v) を用いた。

3.3 結果および考察

3.3.1 *xyn3* プロモーターを用いた *aabg1* 遺伝子発現 *T. reesei* の構築

T. reesei PC-3-7 株が分泌するセルラーゼの BGL 活性を増強するため、*xyn3* プロモーター制御下において *aabg1* 遺伝子を発現する *T. reesei* X3AB1 株を構築した。*Xyn3* プロモーター制御下に *aabg1* の cDNA を組込んだ発現カセット pBxyn3aabg1 を用いて *T. reesei* PC3-7 株を形質転換した。得られた形質転換体のうち、*xyn3* の座位に *aabg1* をシングルコピーで保有する形質転換体 (X3AB1 株) を得るため、アセトアミドを含む選択培地から得られた 9 つの形質転換株をサザンハイブリダイゼーションした (データ未掲載)。

3.3.2 *T. reesei* X3AB1 株の発現確認および JN11 の活性分析結果

T. reesei X3AB1 株はセルラーゼが発現誘導されるよう 1% の Avicel を含む培地を用いて 7 日間培養させた。その培養液上清を SDS-PAGE に供したところ、JN11 には親株由来酵素 (以下、WT と表記する) には存在しない AaBG1 と考えられる約 130 kDa のバンドが確認できた (図 3-1)。この分子量は AaBG1 のアミノ酸配列から

推計される分子量 91 kDa より大きいのが、*A. aculeatus* で確認された分子量と一致する¹⁴⁵⁾。そのため、*T. reesei* と *A. aculeatus* が類似の糖化付加機構を持つ可能性が示唆された。WT に見られる 32 kDa の XYNIII が JN11 では観察されなかった。これは、*aabg1* 遺伝子が *xyn3* 遺伝子座に組み換えられたことで XYNIII が欠損したことを意味する。タンパク質生産量は JN11 においても維持されており、SDS-PAGE のバンド強度から各成分酵素の分泌パターンにも変化がないことから、親株の特性を維持した異種由来酵素の発現に成功したと考えられる(図 3-1、表 3-3)。

酵素活性は FPU 活性、CMC 活性、BGL 活性、キシラナーゼ活性について測定した(表 3-3)。JN11 の BGL 活性は WT の 63 倍に向上し、キシラナーゼ活性は 70% に低下した。これは、AaBG1 の発現とそれに伴う XYNIII の欠損の影響が現れたと考えられる。さらに、BGL 活性の増強に直接関係がないと思われる FPU 活性および CMC 活性も、それぞれ 1.7 倍および 1.2 倍に向上した。この原因は、活性測定で生成した還元糖を DNS 法で測定したためと考えられる。DNS 法の特徴として、例えば二糖のセロビオースに対する発色度は単糖のグルコースに対して約 1.5 倍高い⁵⁵⁾。そのため、2 mol のグルコースは、2 mol 分のグルコースを有する 1 mol のセロビオースよりも還元等量が多いと判断されてしまう。それにより、セロビオースが BGL によってグルコースに分解されると発色度としては高まるため、見た目の還元糖量は高くなる。JN11 の BGL 活性の向上に伴い分解産物がグルコースに集約し、その結果としてセルロース分解活性が向上したと考えられる。さらにはセロビオースによる CBHI の生成物阻害が無くなったこともセルロース分解能向上の一因であろう¹²⁶⁾。

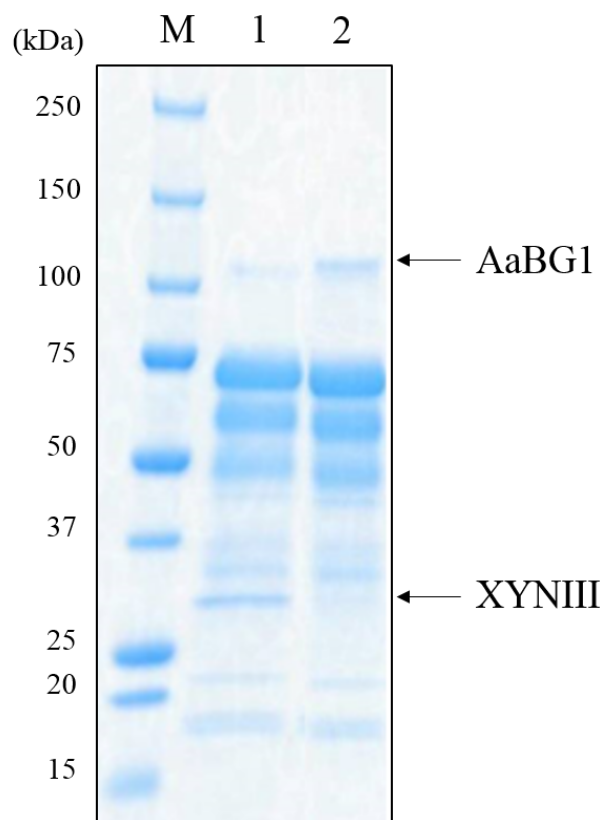


図 3-1. JN11 および WT の SDS-PAGE

レーン M:分子量マーカー、レーン 1: WT、レーン 2: JN11。矢印で示した AaBG1 のバンドが約 130 kDa である。アプライした WT と JN11 のタンパク質量は同量である。

表 3-3: JN11 と WT の各種酵素活性

酵素	タンパク 質濃度 (mg/mL)	比活性 (U/mg-タンパク質)				
		FPU	CMC	BGL	XYN	BXL
WT	1.6±0.1	1.2±0.2	37±0.5	0.14±0.03	99±2.3	-
JN11	1.6±0.1	2.0±0.0	43±2.1	8.8±0.60	71±1.6	0.48±0.03

3.3.3 *T. reesei* X3AB1 株のセルラーゼおよびヘミセルラーゼ遺伝子の発現解析

T. reesei PC3-7 株と X3AB1 株の遺伝子発現を転写レベルを解析するため、定量リアルタイム PCR (qRT-PCR) により測定した (図 3-2)。発現量は恒常的に発現するハウスキーピング遺伝子である β -アクチンをコントロールとしてノーマライゼーションを行い、*cbh1* の発現量に対する相対値として表した。その結果、X3AB1 株の *xyn3* 発現量は全く検出できなかったため、X3AB1 株の *xyn3* は相同組換えにより完全に *aabg1* に置き換わっていることが確認できた。また、*aabg1* の発現量は親株の *xyn3* 発現量の 50~70% であった。TrBG1 を *xyn3* プロモーターで発現させた X3TB1 株の培養にソルボースを用いると、*trbg1* 遺伝子の発現レベルは *xyn3* 遺伝子の約 80% であったことが報告されている¹⁴³⁾。そのため *T. reesei* における異種宿主発現はこれまで多くの問題があることが報告されていたが、本研究の *aabg1* は効率的に転写されていることが明らかとなった^{155,156)}。AaBG1 と TrBG1 の各遺伝子の mRNA 発現量は、AaBG1 が 32 倍高く、各酵素の比活性は AaBG1 が 9.5 倍高いため (未公表データ)、X3AB1 株由来酵素は親株より 300 倍以上高い BGL 活性が期待された。しかし、実測値を比較すると、JN11 の BGL 活性は WT の 60 倍であった。このことは AaBG1 の約 20% のみが活性を有する状態で発現したことを意味し、残りの 80% は非効率な翻訳やタンパク質のフォールディング、糖鎖修飾、分泌等の影響によりその活性が失われた可能性がある。さらに、発現した *xyn3* が全て XYNIII として分泌されていると仮定すると、活性型 AaBG1 は転写、翻訳および分泌の全工程を経た上で XYNIII の 10~14% 効率で産生されたと見積もられた。

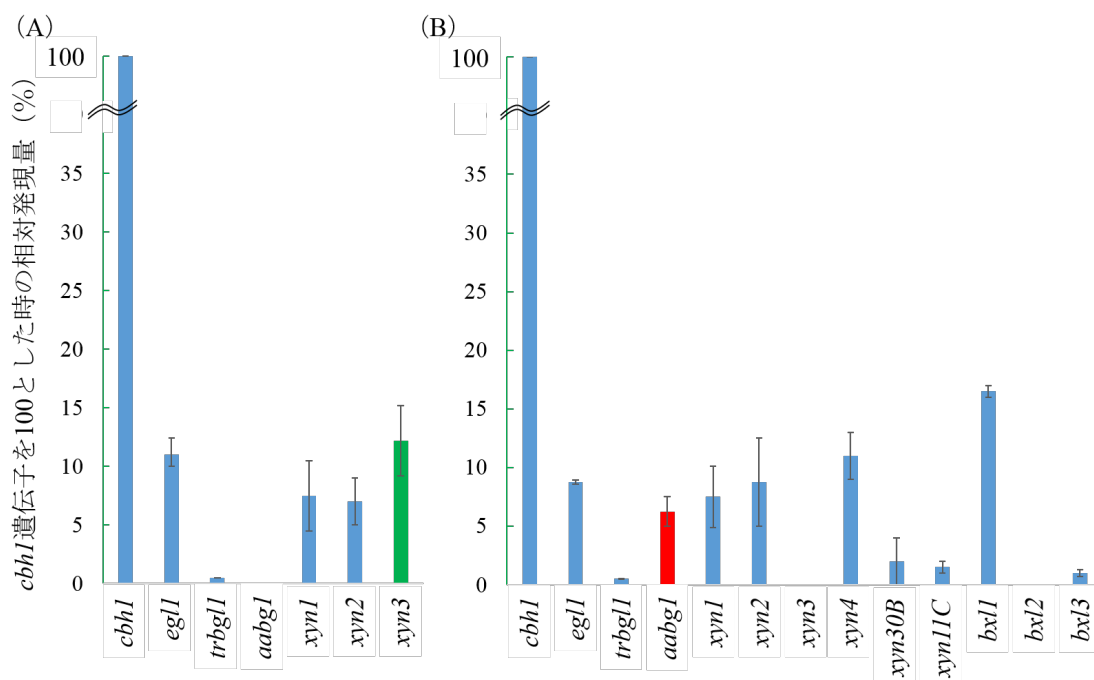


図 3-2: 成分酵素の mRNA 発現量解析

セルラーゼ遺伝子として *cbh1*、*egl1*、*trbg1*、*aabg1*、キシラナーゼ遺伝子として *xyn1*、*xyn2*、*xyn3*、*xyn4*、*xyn30b*、*xyn11c*、*bxl1*、*bxl2*、*bxl3* の発現レベルを調べた。A は *T. reesei* PC-3-7 の 1% Avicel 誘導条件、B は X3AB1 株の 1% Avicel 誘導条件である。*Aabg1* 遺伝子は赤色、*xyn3* 遺伝子は緑色の棒グラフに示した。発現量は *cbh1* に対する相対的な割合として示し、 β -アクチンをコントロールとして標準化したものである。

3.3.4 JN11 と市販酵素の活性の比較

JN11 の特徴を明らかにするため、JN11 の酵素活性を市販酵素である Accellerase 1500、および Cellic CTec と比較した。測定した項目は、アビセラゼ活性、pNPL 分解活性 (以下、pNPLase 活性と表記する)、CMCase 活性、BGL 活性、キシラナーゼ活性および β -キシロシダーゼ活性である (表 3-4)。JN11 の酵素活性の特徴は、アビセラゼ活性および pNPLase 活性が高いことである。この pNPLase 活性には CBHI および EGI が関与するが、pNPL に対する EGI の活性は CBHI より高い¹⁵⁷⁾。EGI の活性をより直接的に表す CMCase 活性も高いことから、JN11 はエンドグルカナーゼ活性が高いと言える。この傾向は Accellerase 1500 でも同様であり、両者の酵素はセルロース分解活性が他の酵素と比較して高いといえ

る。それに対して、Cellic CTec はアビセラーゼ活性および pNPLase 活性が最も低いことが特徴である。

BGL 活性を比較すると、JN11 は WT よりも 65 倍高く、市販酵素 2 種の中の強さであり、BGL 活性が大幅に増強されていた。この BGL 活性の強化が上記のセルロース分解活性の高さに大きく貢献したと考えられる。その原因は前述した DNS 法におけるグルコースとセロオリゴ糖の発色度の違いと考えられる。また、実際に精製した AaBG1 を WT に添加すると、CMCase 活性が増加した(データ未掲載)。つまり、JN11 はセルロース分解に影響を及ぼさない XYNIII を発現するプロモーターを用いて BGL 活性を強化することで、セルロース分解活性全体を増強することに成功したと判断できる。ただし、Cellic CTec は BGL 活性が最も高いが、アビセラーゼ活性が最も低い。そのため、BGL 活性の影響はそれぞれの酵素が持つ成分酵素の種類や成分比によって変化することが示唆された。

JN11 のキシラナーゼ活性は WT より低下していたが、市販酵素のキシラナーゼ活性および β -キシロシダーゼ活性と比較すると、それぞれ 3.2~5.6 倍、1.1~4.5 倍と高いため、JN11 は高いキシラン分解能を有すると判断できる。

以上のことから、JN11 はセルロースおよびキシラン分解活性が全体的に高く、Accellerase 1500 はキシラン分解活性が弱いセルロース分解活性は最も強く、Cellic CTec は最も高い BGL 活性を有するがセルロースおよびキシラン分解活性はともに低いことが明らかとなった。

表 3-4: WT、JN11、市販酵素の酵素比活性 (U/mg-タンパク質)

酵素	酵素活性					
	アビセラーゼ	pNPL	CMC	BGL	XYN	BXL
WT	0.45±0.02	0.33±0.01	35±2.0	0.12±0.0	88±0.0	0.59±0.01
JN11	0.68±0.06	0.38±0.01	53±1.0	7.8±0.5	67±6.0	0.54±0.02
Accellerase 1500	0.77±0.02	0.41±0.00	56±3.0	5.6±0.3	21±1.0	0.12±0.01
Cellic CTec	0.27±0.03	0.30±0.01	41±2.0	14±1.0	12±0.0	0.51±0.03

* 太字は各酵素活性が最も高い酵素を示す

3.3.5 各酵素を用いたバイオマス糖化反応

各酵素のバイオマスに対する糖化能力を比較するために、酸・アルカリ・水熱・水蒸気爆砕等の糖化前処理をしたイナワラ・エリアンサス・ユーカリ・スギを用いたバイ

オマスの糖化反応を行った。それぞれの前処理バイオマスの糖組成は表 3-5 に示した。

NaOH 処理イナワラの糖化反応の結果、JN11 はグルコース・キシロース糖化率がともに市販酵素を上回った(図 3-3)。キシロース糖化率は WT も市販酵素を上回るため、JN11 および WT のキシロース糖化率の高さはキシラナーゼおよび β -キシロシダーゼ活性の高さに起因しているのであろう¹⁵⁸⁾。市販酵素のキシロース糖化率は、Cellic CTec の β -キシロシダーゼが WT・JN11 と同レベルであるにも関わらず JN11 と同程度であった。これは、Cellic CTec のキシラナーゼ活性が低いため、キシランが分解できずにキシロース生成に繋がらなかったことに起因する。また、Accellerase 1500 は β -キシロシダーゼが低いため、キシランを分解して生成したキシロピオース等のキシロオリゴ糖がキシロースに分解されずに蓄積している可能性がある。JN11 のグルコース糖化率は市販酵素と大きな差が生じた。しかし、JN11 のセルラーゼ活性は、Accellerase 1500 と明確な差がない。これは、JN11 の高いグルコース生成能には、上記のキシラン分解活性が大きく貢献していることを示唆している。なぜならば、セルロースとキシランはそれぞれ独立して存在せず、互いに絡み合った高次構造を形成しているため、セルロースに酵素が接近するためにはキシランを分解する必要があるからである。実際に、市販のヘミセルラーゼである Cellic HTec (Novozymes) を Accellerase 1500 に添加して NaOH 処理イナワラの糖化反応を行うと、キシロースと同時にグルコースの糖化率も増加した(データ未掲載)。ただし、Cellic HTec 添加条件においてもグルコース糖化率は JN11 が上回るため、酵素活性では表れなかった差がバイオマスを基質にすることで明らかになった。水熱処理イナワラに対する JN11 と市販酵素のキシロース糖化率の違いは、NaOH 処理イナワラで見られた差よりも小さかった(図 3-4)。この原因は、水熱処理イナワラのヘミセルロース組成が NaOH 処理イナワラの半分程度であるため、糖化におけるヘミセルラーゼ活性の必要性が小さくなったためであろう。

硫酸処理イナワラに対する糖化反応の大きな特徴は、72 時間でのグルコース糖化率が JN11 と Cellic CTec が等しいことである(図 3-5A)。JN11 の高いグルコース糖化率は JN11 の高いセルラーゼ活性に由来するものと考えられるが、Cellic CTec はセルラーゼ活性が最も低い。それにも関わらず Cellic CTec のグルコース糖化率高が JN11 並みに高くなった原因は、高い BGL 活性に由来すると考えられる。JN11 は BGL のみを強化した酵素であるが、硫酸処理イナワラの糖化率は WT の 2.8 倍に高まった。また、WT に AaBG1 を少量 (0.025 mg/g-バイオマス) 添加するだけで NaOH 処理イナワラに対するグルコース糖化率は飽和したが、硫酸処理イナワラの糖化率を飽和させるためには WT に上記した量の倍の量が必要であった(データ未掲載)。これらのことは、BGL 活性は硫酸処理バイオマスの糖化反応に重要な酵素

活性であることを示唆している。BGL はリグニンに吸着することでその酵素活性が失われることが報告されている¹⁵⁹⁾。硫酸処理イナワラのリグニン含量は NaOH 処理イナワラの 5.5 倍高い(表 3-5)。つまり、糖化前処理の違いによるリグニン含量の違いが、糖化に求められる酵素活性の違いに繋がると考えられる。ここで、糖化前処理条件を弱めることでセルロースの被分解性を低下させた前処理バイオマスを作製し、BGL 活性ではなくセルロース分解活性によって差が生じるかを検討した。硫酸濃度を 1.0%から 0.5%、処理温度を 170℃から 150℃にそれぞれ低下させた硫酸処理イナワラを基質に、JN11 と Cellic CTec の糖化能を評価した。その結果、JN11 のグルコース生成量は Cellic CTec に対して 1.2 倍高かった(図 3-5B)。そのため、JN11 のセルロース分解能力は Cellic CTec を上回ると結論付けられる。標準条件の硫酸処理イナワラを用いた際も、JN11 の反応 24 時間後の糖化率が最も高いこともこの結論を支持する。

以上の結果より、JN11 は高いキシロース活性およびキシロビアーゼ活性により NaOH 処理および水熱処理イナワラに対して高い糖化活性を有し、硫酸処理イナワラに対しては Cellic CTec の高い BGL 活性のため Cellic CTec とほぼ同等の能力を持つことが明らかとなった。

エリアンサスを基質に用いた酵素反応の傾向は、NaOH・水熱処理エリアンサスがイナワラと同じであった。それに対して、硫酸処理エリアンサスに対しては、JN11 のグルコース糖化率が Cellic CTec を反応 72 時間後も上回っていた(表 3-6)。使用した酵素量はエリアンサス・イナワラで同量(3 mg/g-バイオマス)だが、糖化率は硫酸処理イナワラが 90%を超えたのに対して硫酸処理エリアンサスが 65%と低かった。つまり、糖化前処理の強度を弱めた硫酸処理イナワラと同様に、エリアンサスはイナワラより分解されにくい基質であるため、セルロース分解活性が糖化能力の差に繋がったと考えられる。この傾向はユーカリに対しても同様であり、JN11 はセルロース分解活性が重要になると考えられるバイオマスに対して、市販酵素を上回る能力を有することが明らかとなった。また、ヘミセルロースを含有する前処理バイオマスに対しては、その能力差はより顕著になっていた(表 3-6)。

表 3-5: バイオマスの成分組成 (%、w/w)

バイオマス	糖化前処理	セルロース	ヘミセルロース	リグニン	灰分
イナワラ	未処理	30.8	17.0	9.50	18.9
	硫酸	49.4	0.33	20.9	23.9
	NaOH	52.6	24.2	3.80	5.40
	水熱	47.6	9.57	14.7	14.8
エリアンサス	未処理	34.3	21.5	18.6	5.26
	硫酸	51.6	2.19	35.4	5.49
	NaOH	56.0	22.2	6.20	1.58
	水熱	50.9	7.20	29.8	2.17
ユーカリ	未処理	40.3	15.8	19.8	0.77
	硫酸	57.8	0.23	36.1	0.76
	NaOH	64.8	12.1	9.70	1.10
	水熱	60.9	0.56	34.1	0.33
スギ	未処理	36.0	13.5	42.7	0.35
	水蒸気爆砕	40.1	0.41	53.4	0.09

表 3-6: エリアンサスとユーカリの糖化反応 (%)

バイオマス	糖化前処理	WT	JN11	Accellerase 1500	Cellic CTec
グルコース糖化率					
エリアンサス	硫酸	20	65	51	49
	NaOH	26	76	40	45
	水熱	35	76	43	52
ユーカリ	硫酸	11	55	35	42
	NaOH	28	73	48	48
	水熱	11	71	40	40
キシロース糖化率					
エリアンサス	硫酸	-	-	-	-
	NaOH	56	62	32	36
	水熱	62	61	38	40
ユーカリ	硫酸	-	-	-	-
	NaOH	69	74	44	56
	水熱	-	-	-	-

* 反応条件: 酵素量 3mg/g-バイオマス、反応 72 時間

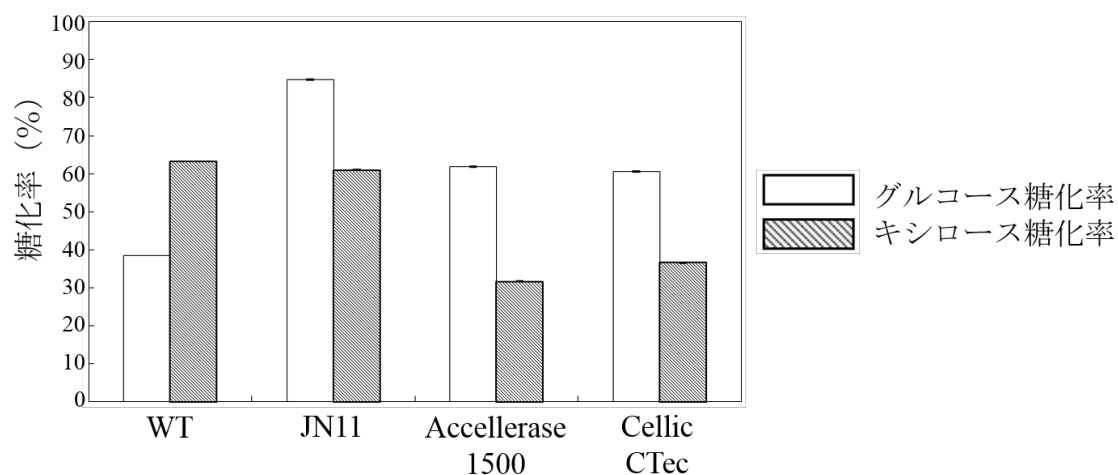


図 3-3: NaOH 処理イナワラの糖化反応

反応条件は酵素量 3 mg/g-バイオマス、反応時間は 72 時間である

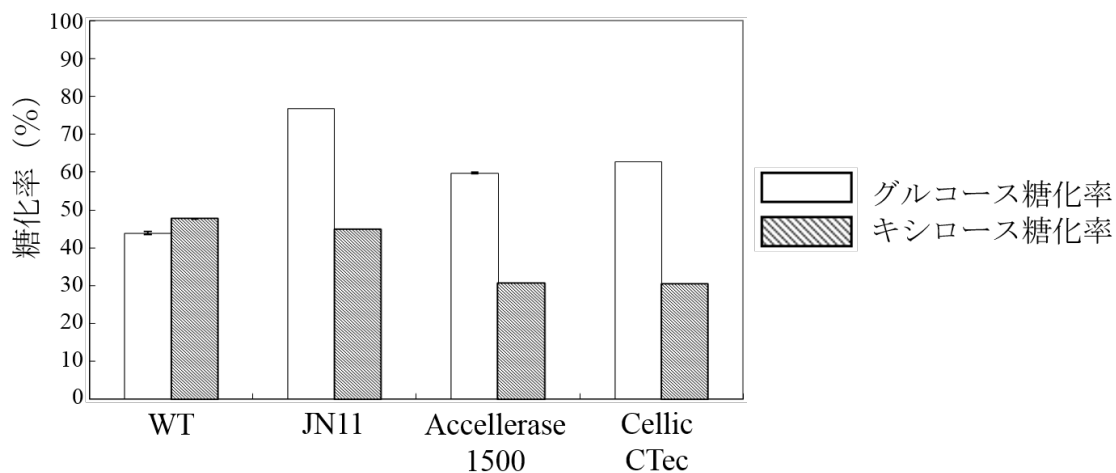


図 3-4:水熱処理イナワラの糖化反応
反応条件は図 3-3 と同様である

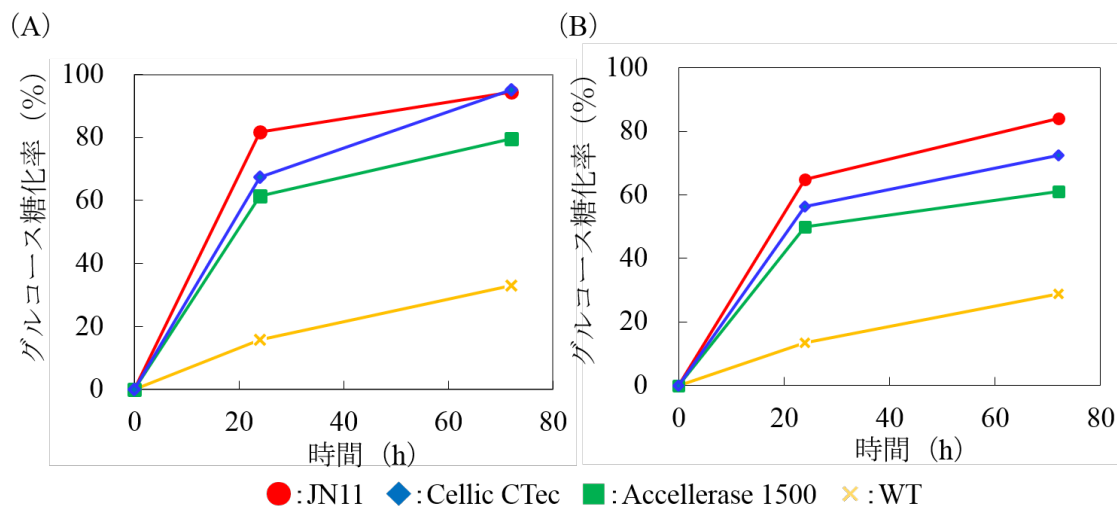


図 3-5:硫酸処理イナワラの糖化反応

反応条件は酵素量 3 mg/g-バイオマス。糖化前処理条件は A が 1 %硫酸・170 °C・5 分、B が 0.5%硫酸・150°C・5 分である。

3.3.6 単一成分酵素を添加した糖化反応

JN11 のバイオマス糖化能は、市販酵素を上回ることが明らかになった。これは、WT の BGL 活性を適切なプロモーターを用いて発現させることで、全体のバランスを崩すことなくセルラーゼ活性を高めることに成功したことを意味する。しかしながら、

Accellerase 1500 のセルラーゼ活性は WT より 47 倍も高く、全酵素の中でも最も高いことを考慮すると、セルラーゼ活性の高さのみでは JN11 の高いバイオマス分解能を説明できない。これまでの結果から、酵素糖化を受けにくいバイオマスを用いることで酵素能力の差がより顕著になる傾向があった。そこで、さらに酵素的な分解を受けにくい水蒸気爆砕処理スギを用いた同様の評価を行った(図 3-6)。72 時間後の Accellerase 1500 の糖化率は WT と同程度であるため、セルラーゼ活性とバイオマス糖化能に相関がないことは明らかである。この原因は、セルラーゼ活性の測定に使用した市販の結晶性セルロースである Avicel とバイオマスとでは、分解に影響する因子が異なるためと予想される。この仮定を検証するため、セルロース分解に対して主要な役割を担うと考えられている 3 種類の成分酵素 (CBHI・CBHII・EGI) を JN11 に添加し、酵素反応を行った。各成分酵素の調製方法として、WT や JN11 から精製すると他の成分酵素が混入する可能性がある。そこで、これらの酵素を発現しない *A. oryzae* および *S. pombe* を宿主として各遺伝子を組換えた菌株を用い、各成分酵素を調製した。Avicel および水蒸気爆砕処理スギを基質に糖化反応を行ったところ、基質の違いによって成分酵素の影響が異なることが明らかになった(図 3-7)。Avicel に対する各成分酵素の影響は、CBHII の添加のみ若干の増強効果が見られ、CBHI と EGI の添加は変化がなかった。それに対し、水蒸気爆砕処理スギに対しては、全ての単一成分酵素が糖化率の上昇効果を示した。そのため、酵素活性とバイオマス糖化の非相関性は、各反応に用いる基質の分解に影響する成分酵素が大きく異なることに起因すると結論付けられる。

Avicel とスギは構造や組成、セルロースの結晶性など多くの異なる性質を有する。加えて、各成分酵素の反応性は糖化前処理やバイオマスの種類によって異なると考えられる。リグニンやヘミセルロースの構造もまた糖化前処理の種類に大きく依存するだろう¹⁶⁰⁾。リグニン含有の有無のような組成の違いも酵素反応性に違いを与える一因となりうる¹⁶¹⁾。また、今回は 3 種類の成分酵素のみ用いたが、*T. reesei* が分泌する他の成分酵素の影響も基質の種類によって異なることは容易に想像ができる⁷²⁾。そのため、バイオマスを効率的に分化する酵素を開発するためには、各前処理バイオマスに最適化された成分酵素の種類・組成を有する酵素を開発する必要があるだろう。

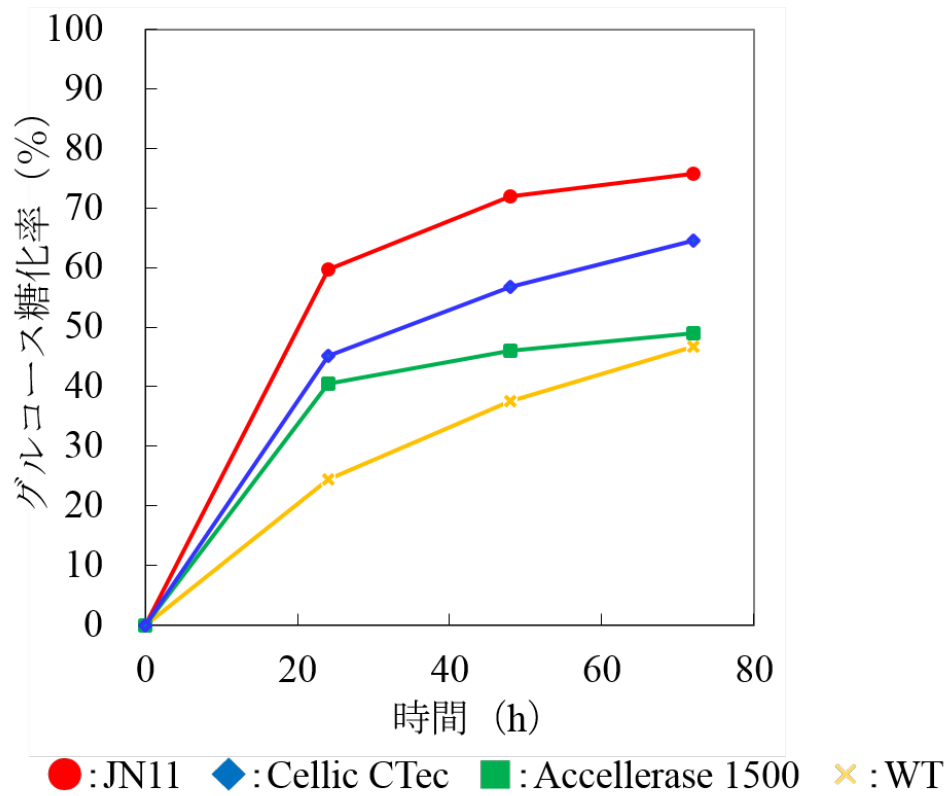


図 3-6:水蒸気爆砕処理すぎの糖化
 反応条件は酵素量 10 mg/g-バイオマス

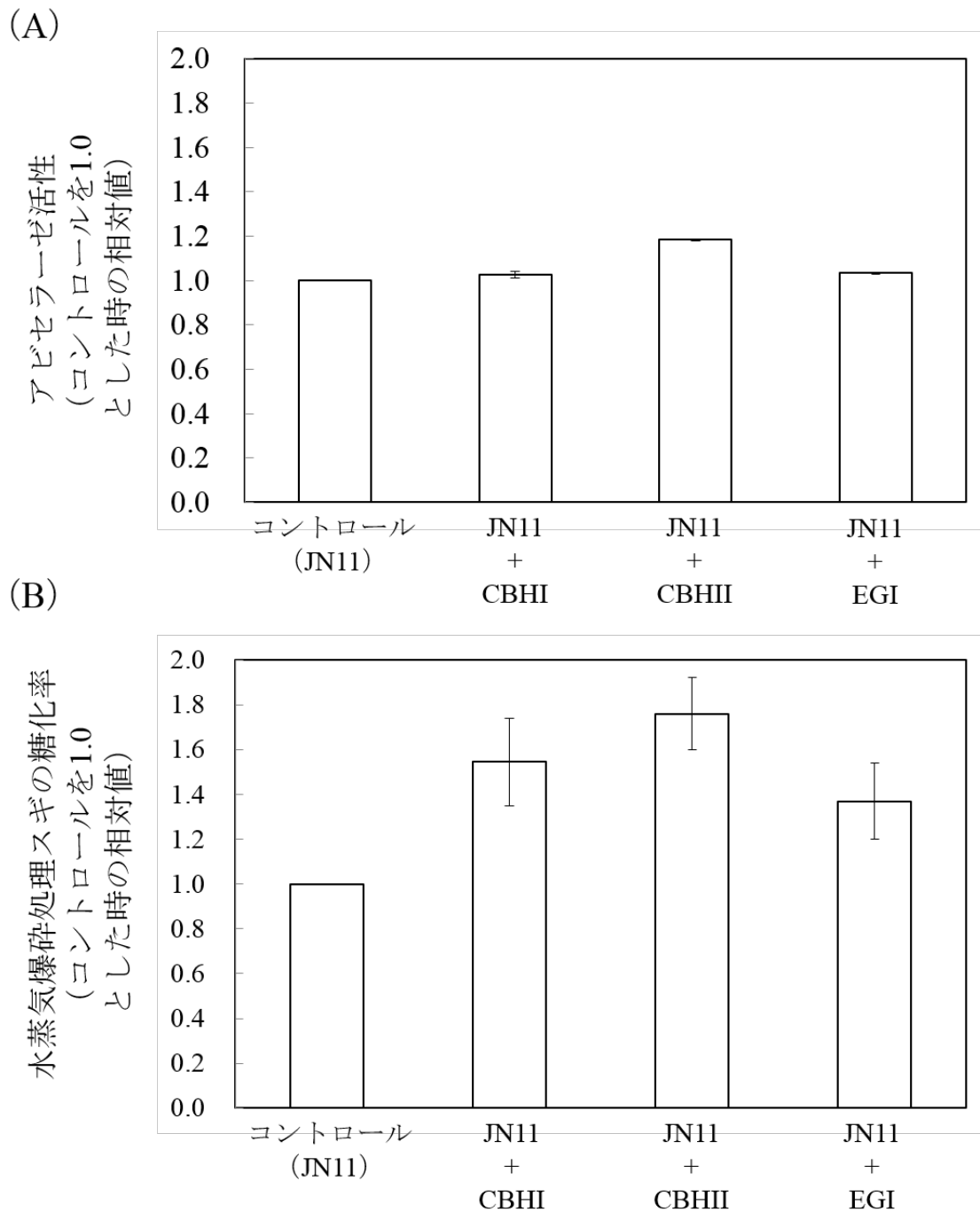


図 3-7: JN11 に成分酵素を添加した糖化

成分酵素は CBHI、CBHII、EGI を使い、それぞれ 0.2 μ M となるように JN11 に添加した。A は Avicel を基質とした酵素活性、B は爆砕処理スギを基質とした糖化反応の結果である。

3.4 本章のまとめ

本章では、リグノセルロースバイオマスの糖化に最適化された酵素を開発するため、*T. reesei* PC-3-7 株の BGL 活性を強化し、BGL 強化酵素と市販酵素のバイオマス糖化能を比較した。BGL 活性の強化のためには、高い BGL 活性を有する *A. aculeatus* 由来 BGL である AaBG1 を用い、*T. reesei* 由来 *xyn3* プロモーターを用いた AaBG1 の発現を行った。こうして得られた酵素 JN11 は BGL 活性が大幅に強化され、それに伴う高いセルラーゼ活性と親株由来の高いキシラナーゼ活性を有した。この高い酵素活性を反映するように、JN11 のイナワラ・エリアンサス・ユーカリの NaOH・硫酸・水熱処理バイオマスおよび水蒸気爆砕処理スギに対する糖化能は、市販酵素を凌駕した。しかしながら、JN11 のセルラーゼ活性は市販酵素である Accellerase 1500 よりも低いため、酵素活性だけでは JN11 の高いバイオマス分解能を説明することはできない。そこで、酵素活性測定の基質である結晶性セルロース Avicel と水蒸気爆砕処理スギに対して、糖化に重要な役割を担うと考えられる 3 種類の成分酵素 (CBHI・CBHII・EGI) がどのように影響するかを検討した。その結果、Avicel に対しては CBHII のみ若干の影響がみられたのに対し、水蒸気爆砕処理スギに対しては全ての成分酵素が糖化に大きな影響を与えることを明らかにした。また、今回検討できなかった *T. reesei* が分泌する他の成分酵素も影響が異なる可能性は大きいと思われる。基質の種類によって成分酵素の影響が異なるならば、成分酵素の種類や比率を基質に合わせて最適化することで、より高いバイオマス分解能を有する酵素を開発できるだろう。

JN11 は現時点で市販酵素を上回る高い糖化能力を有しており、バイオエタノール生産に使用する酵素コストの削減に大きく寄与すると考えられる。また、JN11 の更なる改良のためには、特定の前処理バイオマスに特化した改良を行う必要があるだろう。

第四章 *T. reesei* 由来主要成分酵素のバイオマス分解能力の網

羅的解析

本章では、*T. reesei* が分泌する主要な成分酵素である CBHI、CBHII、EGI が様々な前処理バイオマスの糖化反応にどの程度影響を与えるかを明らかにした結果について記す。4.1 では、バイオマス糖化に成分酵素が与える影響の解析方法について、従来の問題点と本章で用いた手法について記す。4.2 では、実験操作について説明する。4.3 では、結果を記す。4.4 では、本章のまとめについて記す。

4.1 はじめに

T. reesei が分泌する多種多様な成分酵素はそれぞれ多様な酵素活性を有し、各成分酵素が相乗的に機能することでセルロース系バイオマスに対し高い糖化能力を表す¹⁶²⁾。これら多数の成分酵素の中でセルロース分解に重要な役割を担うと考えられているのが、セルロースの結晶部位に対し高い分解活性を有する CBHI や CBHII^{163,164)}、非結晶部位に高い分解活性を示す EGI などである⁷¹⁾。しかしながら、何十種類とある各成分酵素が糖化反応にそれぞれどの程度貢献しているか理解が進んでいないのが現状である。これを明らかにするため、精製した成分酵素を任意の割合で混合したカクテル酵素を用いることで、それぞれの貢献度を明らかにする取り組みなどが行われてきた^{141,165)}。本法の問題点として、*T. reesei* が分泌する成分酵素を全て含んだカクテル酵素を作製することは困難であり、使用する成分酵素の種類が限定されることが挙げられる。例えば、複雑な構造のヘミセルロースを含んだバイオマスを効率的に酵素分解するためには、原料特性に対応させて複数の酵素を混合したカクテルを用いる必要がある。そのような酵素カクテルを安定供給することは極めて困難であり、原料に対応した最適化酵素カクテルの製造コストは極めて高いものとなる。さらに、まだ特定されていない成分酵素がバイオマス糖化反応に影響を与えている可能性は捨てきれない。そのため、*T. reesei* が本来有する糖化能力を正しく評価するためには、不完全なカクテル酵素の利用は適切ではないと考えられる。そこで本章では、CBHI、CBHII、および EGI がバイオマス糖化に

与える影響を明らかにするために、*T. reesei* の *cbh1*、*cbh2*、*egl1* 遺伝子をそれぞれ破壊した株から分泌される単一成分欠損セルラーゼを用いた評価法を開発した¹⁴³⁾。単一成分欠損セルラーゼは破壊した酵素以外の全ての成分酵素が含まれているため *T. reesei* 分泌酵素系の中での評価が可能となり、上記したカクテル酵素でみられる問題は避けることができる。

バイオマスの酵素分解では、酵素の複雑性に加えて基質となるセルロース系バイオマスの複雑性が大きな問題となる¹⁶⁶⁾。セルロースは結晶部位と非結晶部位から成り立ち、その結晶構造はバイオマス種によって大きく異なる¹⁶⁷⁾。その他の主要な構成成分であるヘミセルロースやリグニンも同様に、バイオマス種によってその構造が異なる。さらに、バイオマス組成は糖化前処理の種類によっても大きく変化する。例えば、NaOH 処理ではリグニンが溶解され、希硫酸処理や水熱処理では処理濃度や温度に依存してヘミセルロースが分解される¹⁶⁸⁾。そのため、各成分酵素が糖化反応に与える影響は、バイオマスや糖化前処理の種類に依存することが予想される。そこで本章では、4 種類のバイオマス(イナワラ・エリアンサス・ユーカリ・スギ)と 4 種類の糖化前処理(NaOH・硫酸・水熱・水蒸気爆砕)を組み合わせて調製した前処理バイオマスに対して、単一成分欠損セルラーゼによる糖化試験を実施した。これにより、欠損させた成分酵素の不足がバイオマス糖化反応にどのように影響を与えるかを明らかにし、各成分酵素の影響度を明らかにすることが本章の目的である。

4.2 実験操作

4.2.1 菌株と酵素の調製

T. reesei からの酵素調製法は 3.2.1 に記載した方法に準じた。

4.2.2 酵素活性測定とタンパク質量測定

3.2.5 に記載した方法に準じて、DNS 法による還元糖測定、タンパク質の測定および BGL 活性の測定を行った。

4.2.3 バイオマスの糖化前処理と組成分析

3.2.6 および 3.2.8 に記載した方法に準じた。

4.2.4 糖化反応

糖化反応は、20 mL プラスチック容器に反応液量を 2 mL とし、基質を乾燥重量で 5% (w/v) と 100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) を加えて行った。酵素の添加量は BGL 活性で揃え、1 g の乾燥バイオマス重量当たり 0.6-3.6 U を添加した。反応条件は 50°C、150 rpm とし、0、6、24、48、72 時間にサンプリングした。糖化液の酵素反応を停止させるために 95°C で 5 分間加熱し、遠心分離 (5 分・15000 rpm) で上清画分を回収し、生成した還元糖を DNS 法により測定した。なお、糖化率の算出法は、3.2.7 に記載した方法に準じた。

4.3 結果および考察

4.3.1 単一成分欠損セルラーゼの BGL 活性測定

Rahman らにより、単一成分欠損セルラーゼは遺伝子改変していない親株と同じ割合で成分酵素が含まれていることが報告されている¹⁴³⁾。しかし、タンパク質の絶対量で比較すると、親株由来酵素 WT と単一成分欠損セルラーゼに含まれる各成分酵素の量は異なる。その原因は、CBHI のタンパク質量が全成分酵素の約半分を占めるためである¹⁶⁹⁾。それにより、CBHI を欠損させたセルラーゼ (以下、CBHI 欠損セルラーゼと表記する。同様に CBHII 欠損セルラーゼ、EGI 欠損セルラーゼと表記する。) では、CBHI 以外の成分酵素の含有量が WT と比較して大幅に上昇するためである。成分酵素の量的バランスが崩れた条件では、WT から各成分酵素を欠損させた影響を正しく判断することができない。そのため、本章では酵素使用量の基準として BGL 活性を用いた。BGL 活性は今回欠損対象とした CBHI、CBHII、EGI の影響を全く受けないため、独立した基準として測定することが可能である¹⁷⁰⁾。BGL 活性を基準とすることで、単一成分欠損セルラーゼは全ての成分を同量含有しながら、欠損酵素のみ含有しない状態となった。

表 4-1 に単一成分欠損セルラーゼと WT の BGL 活性を示す。BGL 活性に基づいて算出した各成分酵素の組成比は、CBHI:CBHII:EGI=60:43:9 であった。

Rosgaardらの報告ではCBHIIの割合が最大でも2割であったため、2倍以上の違いが見られた¹⁶⁹⁾。*T. reesei*の酵素の誘導機構については未だ不明な点が多いが、恐らく酵素の誘導条件の相違が原因と思われる¹⁷¹⁾。BGL活性から導いた比率が正しいかを検証するために、電気泳動により各酵素を可視化した。添加するタンパク質量をBGL活性で揃えることで、WTと各単一成分欠損セルラーゼのCBHI、CBHII、EGIのバンド強度がほぼ同等となったため、主要な成分酵素の含有量が同等であることが確認できた(図4-1)。ただし、CBHI欠損セルラーゼのXYNIとXYNIIを含むバンド強度は、他の酵素と比較して僅かに薄くなっている。そのため、各成分酵素の量が完全に一致しているわけではないが、全体としては概ね一致しているため、酵素量をBGL活性基準とすることで、各成分酵素の影響を評価できると判断した。なお、1.0 UのBGL活性をタンパク質量で表すと、WT、CBHI欠損セルラーゼ、CBHII欠損セルラーゼ、EGI欠損セルラーゼはそれぞれ8.3、3.3、4.8、7.7 mgとなる。糖化反応に添加する酵素の量は基質の種類により調整し、それぞれの基質でWT由来セルラーゼが24時間時点で約80%程度になるように設定した。この理由は、全ての基質で同じ酵素量に設定すると、ある基質では過剰量となることで比較ができないほど糖化反応が進み、反対にある基質では過少量となることで糖化反応がほとんど進まず比較できない、ということが起こりうるためである。また、80%という高い値を基準とした理由は、用いた基質の大部分を分解できる条件下で、各成分酵素がどれほど影響しているかを明らかにするためである。

表 4-1: WTと単一成分欠損セルラーゼのBGL活性一覧

酵素	比活性(U/mg)	WTに対する相対値
WT	0.12	1.0
CBHI欠損セルラーゼ	0.30	2.5
CBHII欠損セルラーゼ	0.21	1.8
EGI欠損セルラーゼ	0.13	1.1

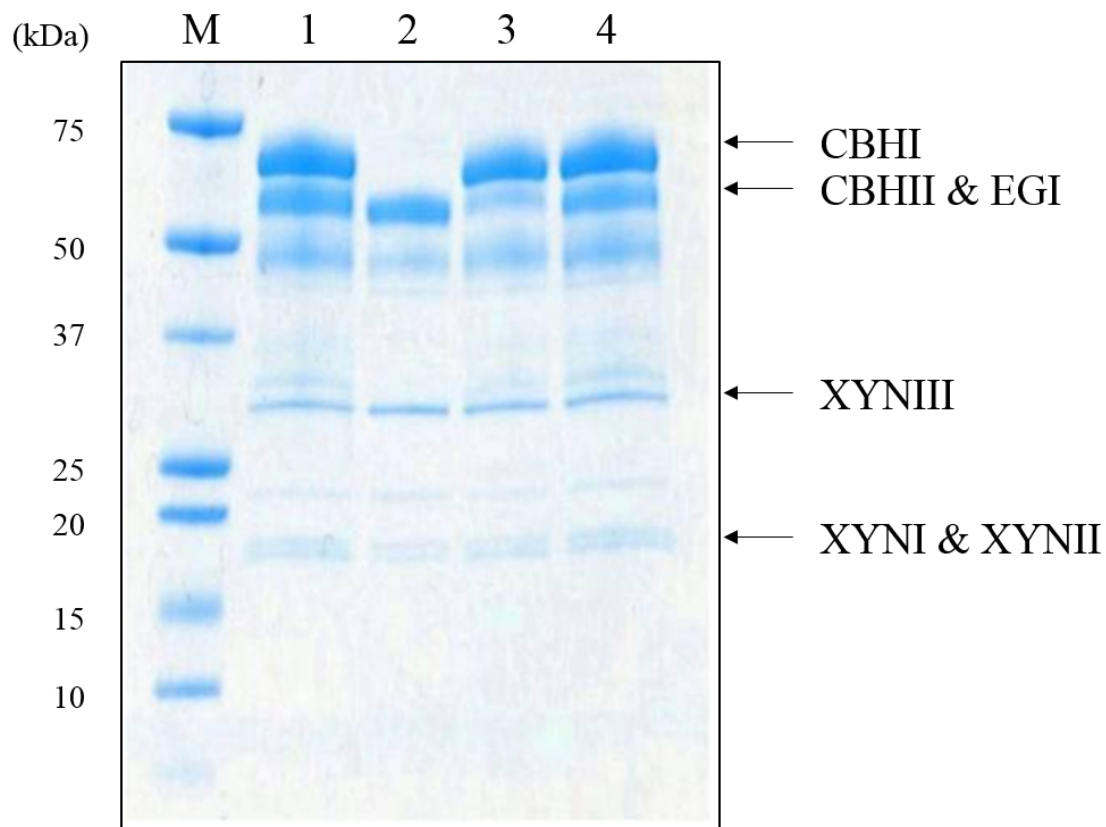


図 4-1: 単一成分欠損セルラーゼの SDS-PAGE

M: 分子量マーカー、レーン 1: WT、レーン 2: CBHI 欠損セルラーゼ、レーン 3: CBHII 欠損セルラーゼ、レーン 4: EGI 欠損セルラーゼ。タンパク質のアプライ量は BGL 活性で揃えた。

4.3.2 NaOH 処理バイオマスの糖化反応

NaOH 処理バイオマスの糖化に対する各成分酵素の影響を明らかにするために、WT および単一成分欠損セルラーゼを用いた NaOH 処理イナワラおよびユーカリの糖化反応を行った(図 4-2)。なお、各バイオマスの組成は第三章に記載した値と同様である(表 3-5)。反応の結果、CBHII 欠損セルラーゼを用いた NaOH 処理イナワラの糖化率が WT の 95% であるため、CBHII が糖化反応に与える影響は非常に小さいことが示唆された(図 4-2A)。CBHII は成分酵素の中でも CBHI に次ぐ重要性があると考えられていたため、予想外の結果であった¹⁷²⁾。この CBHII の影響は反応時間により異なり、糖化反応の初期段階(6・24 時間後)では WT の糖化率との差が 72 時間後より大きいため糖化反応に与える影響は大きいと考えられる。そ

れに対し、後半(48・72時間)ではWTとの差が縮まったため、他の成分酵素がCBHIIの役割を代替していることが考えられる。NaOH処理ユーカリの糖化反応では、CBHII欠損セルラーゼとWTの差は反応時間によらず大きな違いがみられない。反応72時間後もWTより約20%低い糖化率であるため、CBHIIの糖化反応への重要性はNaOH処理ユーカリでより高いことが明らかとなった。(図4-2B)。

CBHIは、両方の前処理バイオマス糖化に対して最も高い影響を与えている。CBHIは結晶性セルロースに対するプロセッシビティのような機能的な観点や、そもそも*T. reesei*が分泌する成分酵素の中で最も多く含まれるという量的な観点から重要と考えられている酵素であるため、本試験でもその重要性が確認できた。それに対し、EGIもバイオマス糖化に対する重要性は多数報告されているが、どちらのバイオマスに対して最も影響が小さかった¹³⁴⁾。これは、EGIの糖化反応に対する貢献度が小さいか、または他の成分酵素でその欠損が代替可能である可能性が考えられる。なお、イナワラと同じ草本類であるエリアンサスのNaOH処理物はイナワラとほぼ同様の糖化パターンのためデータは省略し、以下同様とした。

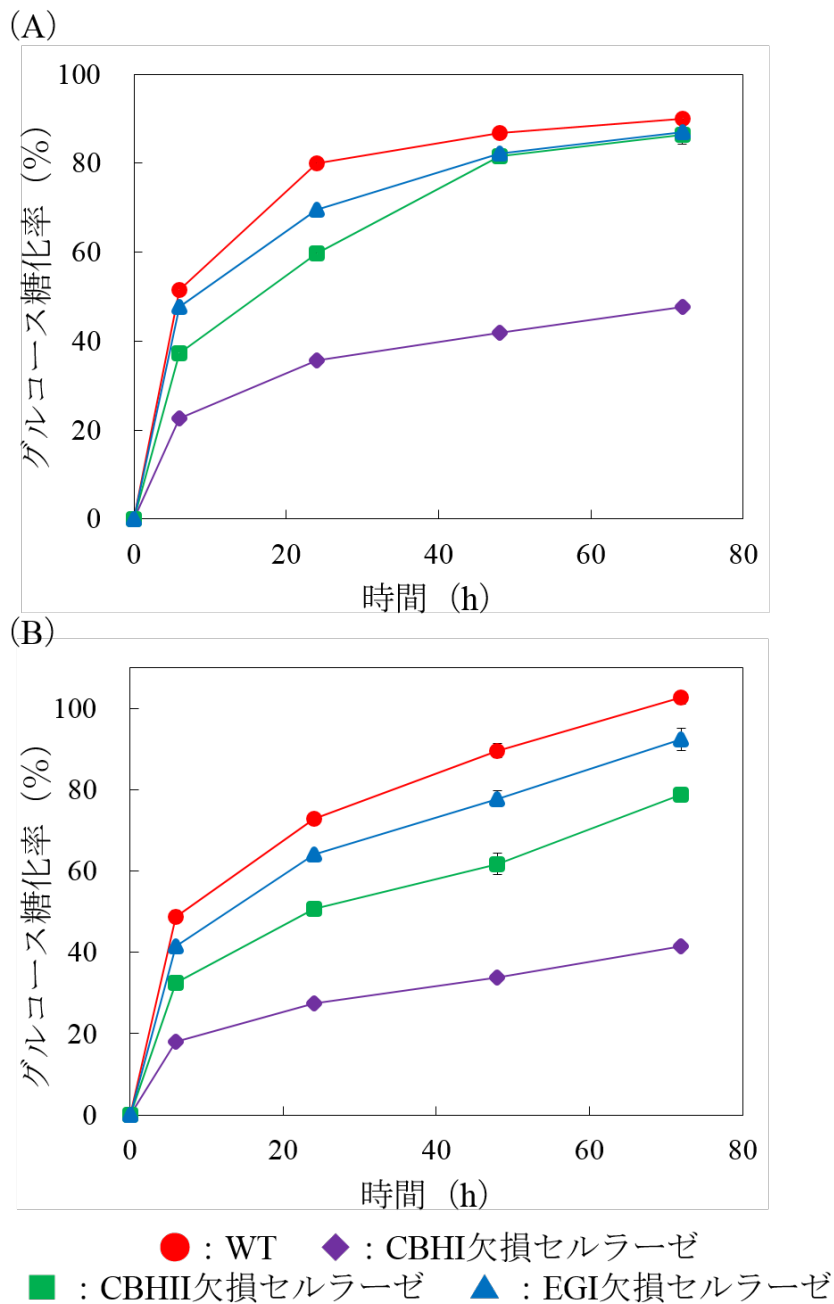


図 4-2: NaOH 処理イナワラおよびユーカリの糖化反応

A が NaOH 処理イナワラ、B が NaOH 処理ユーカリの糖化反応を示す。A の酵素量は 0.6 U-BGL 活性/g-バイオマスであり、そのタンパク質量は WT: 5 mg/g-バイオマス、CBHI 欠損セルラーゼ: 2 mg/g-バイオマス、CBHII 欠損セルラーゼ: 2.8 mg/g-バイオマス、EGI 欠損セルラーゼ: 4.5 mg/g-バイオマスとなる。B の酵素量は 2.4 U-BGL 活性/g-バイオマスであり、そのタンパク質量は WT: 20 mg/g-バイオマス、CBHI 欠損セルラーゼ: 8 mg/g-バイオマス、CBHII 欠損セルラーゼ: 11 mg/g-バイオマス、EGI 欠損セルラーゼ: 18 mg/g-バイオマスとなる。

4.3.3 硫酸および水熱処理バイオマスの糖化反応

硫酸および水熱処理バイオマスの糖化に対する各成分酵素の影響を明らかにするため、WT および単一成分欠損セルラーゼを用いた硫酸および水熱処理イナワラおよびユーカリの糖化反応を行った(図 4-3、4-4)。その結果、CBHI が硫酸および水熱処理イナワラの糖化に与える影響は明らかに小さいことが明らかとなった。その傾向は糖化反応後期で特に顕著であるため、反応後期には他の成分によって CBHI の働きが代替されている可能性が示唆された。CBHII の影響は、硫酸および水熱処理イナワラにおいて小さく、硫酸および水熱処理ユーカリにおいては中程度であり、CBHI と同様に他の成分酵素の働きによる代替作用が示唆された。EGI が硫酸処理イナワラの糖化反応に対して与える影響は、反応初期ですら WT との差が非常に小さい。EGI は他の前処理バイオマスの糖化反応に対しては小さいながらもある程度影響しているため、硫酸処理イナワラの糖化反応には EGI が必要ないことが示唆された。

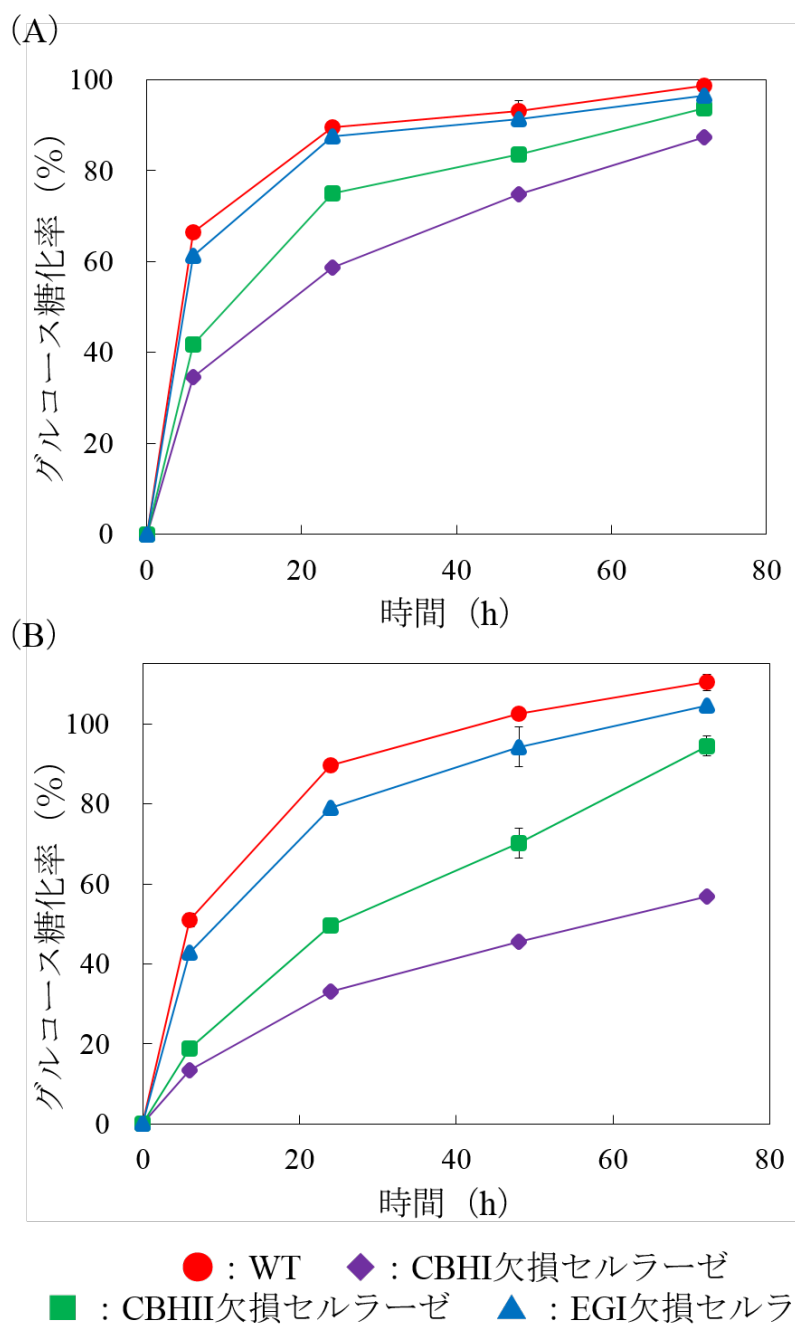


図 4-3: 硫酸処理イナワラおよびユーカリの糖化反応

A が硫酸処理イナワラ、B が硫酸処理ユーカリの糖化反応を示す。A の酵素量は 1.8 U-BGL 活性/g-バイオマスであり、そのタンパク質量は WT: 15 mg/g-バイオマス、CBHI 欠損セルラーゼ: 6 mg/g-バイオマス、CBHII 欠損セルラーゼ: 8.6 mg/g-バイオマス、EGI 欠損セルラーゼ: 14 mg/g-バイオマスとなる。B の酵素量は 3.2 U-BGL 活性/g-バイオマスであり、そのタンパク質量は WT: 27 mg/g-バイオマス、CBHI 欠損セルラーゼ: 11 mg/g-バイオマス、CBHII 欠損セルラーゼ: 15 mg/g-バイオマス、EGI 欠損セルラーゼ: 25 mg/g-バイオマスとなる。

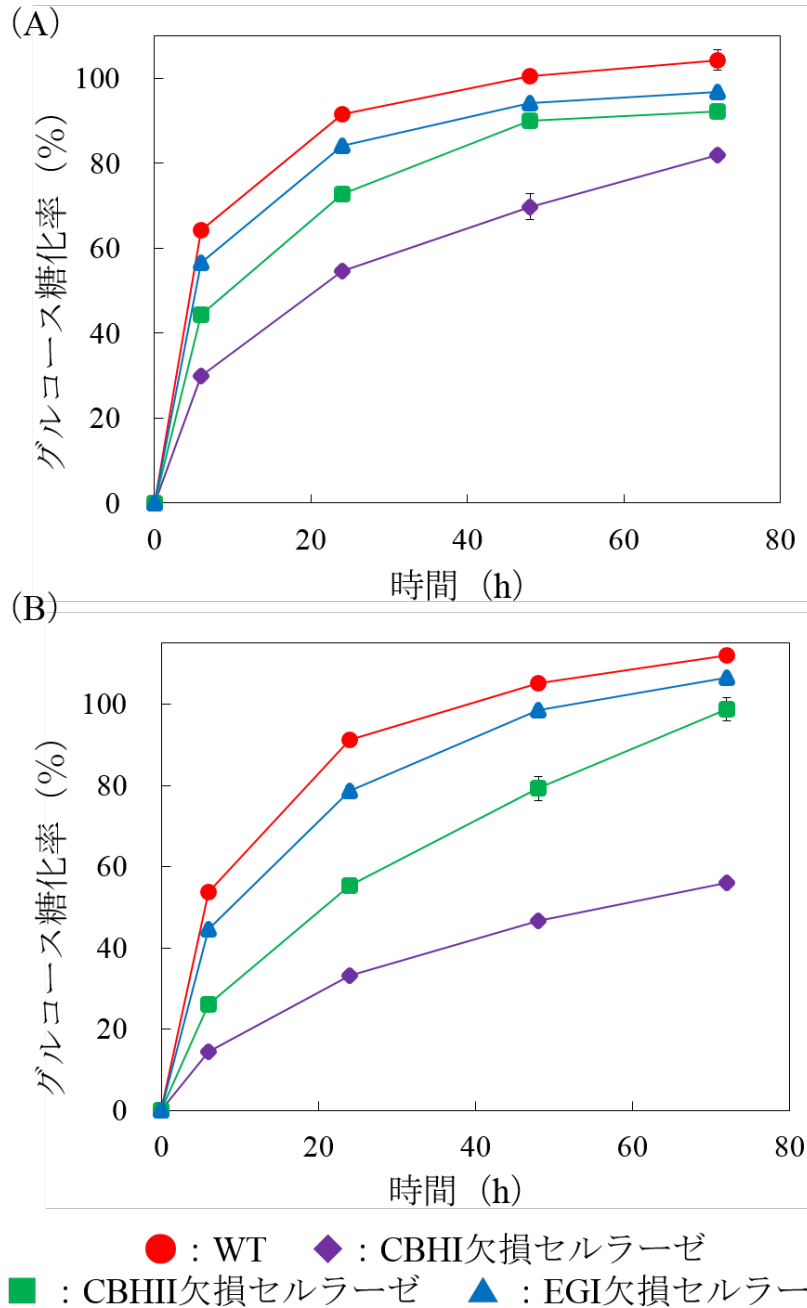


図 4-4: 水熱処理イナワラおよびユーカリの糖化反応

A が水熱処理イナワラ、B が水熱処理ユーカリの糖化反応を示す。A の酵素量は 1.8 U-BGL 活性/g-バイオマスであり、そのタンパク質量は WT: 15 mg/g-バイオマス、CBHI 欠損セルラーゼ: 6 mg/g-バイオマス、CBHII 欠損セルラーゼ: 8.6 mg/g-バイオマス、EGI 欠損セルラーゼ: 14 mg/g-バイオマスとなる。B の酵素量は 2.4 U-BGL 活性/g-バイオマスであり、そのタンパク質量は WT: 20 mg/g-バイオマス、CBHI 欠損セルラーゼ: 8 mg/g-バイオマス、CBHII 欠損セルラーゼ: 11 mg/g-バイオマス、EGI 欠損セルラーゼ: 18 mg/g-バイオマスとなる。

4.3.4 水蒸気爆砕処理スギの糖化反応

本研究で用いるバイオマスの中で最も糖化されにくいスギに対する成分酵素の影響を明らかにするため、WT および単一成分欠損セルラーゼを用いた水蒸気爆砕処理スギの糖化反応を行った(図 4-5)。各成分酵素のうち、CBHI および CBHII 欠損酵素の糖化パターンは前処理ユーカリに対する傾向と同様であるのに対し、EGI は WT と全く差が無いことが特徴的であった。この EGI の傾向は硫酸処理イナワラに類似するが、糖化初期から EGI の影響が全く見られないのは爆砕処理スギのみであった。爆砕処理によって酵素分解に対する感受性は向上すると報告されており、実際に他の糖化前処理に比べて酵素糖化に効果的な手法であった¹⁷³⁾。それにも関わらず、本検討では EGI による影響を全く受けていないため、この EGI の挙動は水蒸気爆砕処理スギが持つ特有の性質である可能性が示唆された。

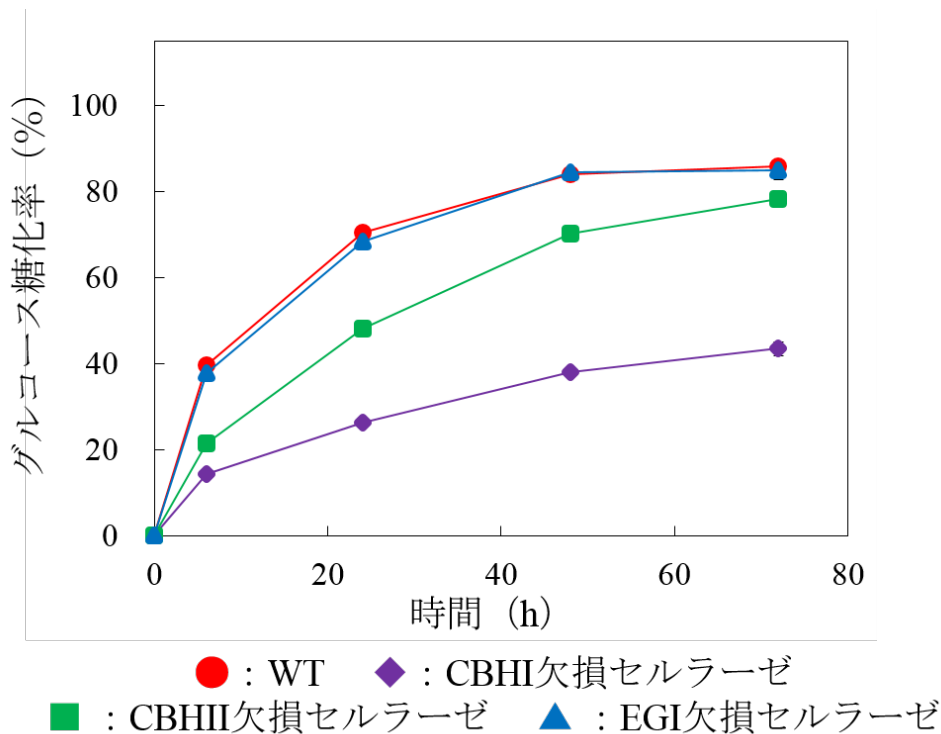


図 4-5: 水蒸気爆砕処理スギの糖化

酵素量は 3.6 U-BGL 活性/g-バイオマスであり、そのタンパク質量は WT: 30 mg/g-バイオマス、CBHI 欠損セルラーゼ: 12 mg/g-バイオマス、CBHII 欠損セルラーゼ: 17 mg/g-バイオマス、EGI 欠損セルラーゼ: 28 mg/g-バイオマスとなる。

4.4 本章のまとめ

本章では *T. reesei* に含まれる成分酵素のうち最もバイオマス糖化反応に貢献していると考えられていた CBHI、CBHII および EGI がバイオマスや糖化前処理の種類によってそれぞれの影響度が大きく異なることを明らかにした(図 4-6)。これらの結果は、第二章において述べた Avicel や CMC 等の基質を用いた酵素活性測定とバイオマスを基質にした糖化反応が相関しない現象の強い根拠となるものでもある¹⁷⁴⁾。そのため、本研究で得られた知見は酵素活性のみに基づいて得た従来の知見と比較して、バイオマス糖化酵素の開発により有用な情報であると考えられる。本章で得られた酵素開発に繋がる知見は、EGI の挙動である。EGI がバイオマス糖化に与える影響は想定よりも限定的であったのに対し、*egl1* 遺伝子の発現量は *cbh1*、*cbh2* に次ぐ高さであるため(図 2-9)、*egl1* プロモーターを BGL やヘミセルラーゼ等の他の有用な成分酵素の発現に有用であり、相同組換えによって *egl1* が破壊されたとしてもその影響は小さい。CBHII は糖化反応初期の糖化率に大きな影響を与えることが示唆されたため、CBHII の強化により反応速度を向上させることで、糖生産性の向上に繋がることが予想される。さらに、本章の結果から新ためてその重要性が明らかとなった CBHI であるが、硫酸処理草本バイオマスの糖化に対しては、その影響度が他の前処理バイオマス種と比較して小さくなることを明らかにした。*cbh1* プロモーターは *T. reesei* のセルラーゼを誘導するプロモーターの中で最も強力であるため、CBHI の影響が小さな前処理バイオマスに対してはプロモーターを利用できると考えられる。以上のように、酵素の高機能化のためには、使用するバイオマスや糖化前処理の種類に対する各成分酵素の影響を見極めることで、有用な成分酵素を発現させるための相同組換えを視野に入れてプロモーターを選択することが重要である。本章で得られた知見を用いることで、第三章で開発したバイオマス糖化用酵素 JN11 のさらなる高機能化を進めることができるだろう。

バイオマス	糖化前処理	CBHI欠損セルラーゼ	CBHII欠損セルラーゼ	EGI欠損セルラーゼ
イナワラ	NaOH	0.50	0.94	0.94
	硫酸	0.89	0.94	0.97
	水熱	0.78	0.87	0.91
ユーカリ	NaOH	0.38	0.74	0.86
	硫酸	0.53	0.85	0.95
	水熱	0.52	0.89	0.95
スギ	水蒸気爆砕	0.53	0.93	1.00

相対値 : 0.85未満 0.85以上、0.90未満 0.90以上、0.95未満 0.95以上

図 4-6: 単一成分欠損セルラーゼを用いた糖化反応のまとめ
各糖化前処理バイオマスに対する WT の 72 時間後の糖化率を 1.0 とした時の各欠損セルラーゼの糖化率を相対値で表した。青色が濃いほど対象となる成分酵素が欠損した時の糖化に与える影響度が大きい、すなわち重要度が高いことを意味する。

第五章 BGL 活性増強糖化酵素 JN12 および JN13 の構築および

能力評価

本章では、AaBG1 の遺伝子組換えに *cbh1* および *egl1* プロモーターを利用して構築した C1AB1 株および E1AB1 株、および本株由来酵素 JN12 および JN13 の能力評価について記す。5.1 では、菌株構築および作製した酵素の能力評価の方法論について記す。5.2 では、実験操作について説明する。5.3 では、JN12 および JN13 の酵素活性およびバイオマス糖化能を市販酵素と比較した結果を記す。5.4 では、本章のまとめについて記す。

5.1 はじめに

本研究において酵素開発の元株として用いた *T. reesei* PC-3-7 株の特徴の 1 つは、キシラナーゼとして XYNI および XYNII に加え、GH ファミリーの異なる XYN III を発現することが挙げられる⁸⁰⁾。PC-3-7 株は QM9414 株からの変異により作成された株であり、両者に *xyn3* がシングルコピーとして存在するが、QM9414 株では mRNA レベルでの発現が認められていない¹²³⁾。キシラナーゼに分類される *xyn3* ではあるが、キシロースやキシロオリゴ糖、キシランでは誘導することができず、Avicel やソホロース、L-ソルボースによって誘導される。この誘導パターンは *xyn1* および *xyn2* とは異なるが、セルラーゼ遺伝子と共通している⁸⁰⁾。ただし、セルラーゼ遺伝子を破壊すると結晶性セルロースに対する分解活性が減少するのに対して、*xyn3* の破壊は活性低減に繋がらない¹³²⁾。そのため、*xyn3* プロモーターはセルロース系バイオマスの分解活性を向上させる他の有用な酵素を発現するために最適であると考えられる。実際に、*xyn3* プロモーターを用いて *A. aculeatus* の AaBG1 を発現させた BGL 強化酵素 JN11 のバイオマス分解能は、市販酵素を大きく上回っていた。

このように BGL 活性の増強およびそれに伴うバイオマス分解活性に成功したが、JN11 は *aabgl1* を *xyn3* と相同組換えすることで XYNIII を欠損し、本来のキシラン分解活性は低下している可能性も考えられる。しかしながら、アルカリ処理イナワラのようなキシランを含むバイオマスに対する *xyn3* 破壊の影響はまだ確認されてい

い。そこで本章では、前処理バイオマスの分解に与える XYNIII の影響を確認し、XYNIII がバイオマス分解に重要な影響を与えることを明らかにした。XYNIII 活性を維持する為に、*A. aculeatus* 由来の *aabg1* 遺伝子を異なるプロモーターを用いて発現させた。1 つは *egl1* プロモーターである。これは、第四章で知見として得られた EGI のバイオマス糖化に与える影響の小ささと、従来の知見であるプロモーターとしての発現量の高さに起因する。ただし、*xyn3* および *egl1* プロモーターの発現量は *cbh1* プロモーターの発現量と比較するとはるかに低いものである¹⁴³⁾。そこで *cbh1* プロモーターも利用して AaBG1 を発現させる 2 つの組換え菌株を構築した。これらの株と第三章で構築した *T. reesei* X3AB1 株および市販酵素を比較し、より高機能なバイオマス分解酵素の構築およびその評価を試みた。

5.2 実験操作

5.2.1 菌株と酵素の調製

T. reesei からの酵素調製法は 3.2.1 に記載した方法に準じた。ただし、菌株の培養に用いる培地には炭素源として 1% Avicel または 1% Avicel および 0.5% キシランを培地として含む basal 培地を用いた。また、市販酵素として新たに Cellic CTec2 を Novozymes 社から購入した。

5.2.2 キシラナーゼ 2 およびキシラナーゼ 3 の発現と精製

XYNII および XYNIII を大腸菌に遺伝子組換えするため、*xyn2* および *xyn3* を発現ベクターにクローニングした。Full-length *xyn2* および *xyn3* は、*T. reesei* QM9414 first strand cDNA library から得られた RT-PCR 産物を pT7Blue T-vector に挿入して得られた^{175,176)}。*xyn2* および *xyn3* の塩基配列の決定を行い、GenBank の accession number はそれぞれ S67387 および AB036796 として登録した。構築した pT7Bluexyn2 を鋳型として PCR 増幅をした cDNA を、pTrc99A 発現ベクターに挿入した。大腸菌発現では *T. reesei* の分泌シグナル配列は機能しない可能性が高いため、シグナル配列をコードする DNA 配列の除去および NcoI/HindIII の制限酵素サイトを付加するよう設計したプライマー(表 5-1)を用いて、PCR を行った。得られた増幅産物を BspHI および HindIII を用いて切断し、NcoI および HindIII で切断した pTrc99A 発現ベクターに挿入することで pTrcmxyn2 を得た。*xyn3* のク

ローニングおよび大腸菌を用いた発現は報告に記載された通りに行った¹⁴⁹⁾。

E. coli Rosetta-gami B (DE3) pLacI に XYNII および XYNIII 発現ベクターを導入し、各形質転換体を一晩前培養した培養液 2.5 mL を 100 µg/mL アンピシリン、15 µg/mL カナマイシン、30 µg/mL クロラムフェニコールを含む 2×YT 培地 (1.6% tryptone、1% yeast extract、and 0.5% sodium chloride) 50 mL/300 mL 三角フラスコに植菌し、20℃、120 rpm で培養した。OD₆₀₀ が 0.4~1.0 の間まで増加した後、終濃度 1 mM になるように IPTG を添加して 24 時間培養後、菌体を回収し、超音波破碎処理を行った。遠心後、10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) および Resource S を用い、平衡化緩衝液の NaCl 濃度を 0~0.5 mM となるようグラジエントを行うことで吸着したタンパク質を溶出させた。回収した画分のうち活性画分を精製標品とした。

表 5-1: プライマーの配列

用途	プライマー配列
発現カセットフラグメント	5'-GGTCATGAACACGATTCAGCCCGGCACGGG-3'
増幅用	5'-GGAAGCTTAGCTGACGGTGATGGAAGCAGA-3'

5.2.3 バイオマスの糖化前処理と組成分析

3.2.6 および 3.2.8 に記載した方法に準じて、NaOH 処理イナワラおよび硫酸処理エリアンサスを調製し、組成分析を行った。

5.2.4 糖化反応

BGL 強化酵素に XYNII または XYNIII を添加する場合は、酵素量をそれぞれ 1 mg/g-バイオマス使用し、DNS 法により生成糖の定量を行った。

BGL 強化酵素のバイオマス糖化性能を評価する場合は、酵素反応を 3.2.7、生成した糖の定量方法を 3.2.8 に記載した方法に準じて実施した。酵素のバイオマス糖化能の評価法として、糖化率が 80%となるような酵素量を求めるため、酵素量は数段階に調節した。糖化率は生成糖を HPLC 法により定量した。糖化率 80%となる酵素量の算出方法は、酵素量を横軸に、糖化率を縦軸にプロットし、そこから得られた近似式を用いた。なお、糖化性能評価にはコントロールとして Avicel を使用した。

5.2.5 *Aabg1* 遺伝子発現カセットの構築

Full-length *aabg1* は高田らにより構築された pABG7 を鋳型として PCR により増幅した¹⁴⁸⁾。*cbh1* および *egl1* プロモーター領域を挿入するために表 5-2 に示したプライマーを用いた。In-fusion PCR advanced kit (TaKaRa) を用いて、Rahman らが作成した発現ベクター pTcbh1gus および pTegl1gus を鋳型として表 5-2 に示したプライマーを用いたインバース PCR により得たフラグメントと連結することで、*aabg1* 発現カセット pTcbh1aabg1 および pTegl1aabg1 を構築した。*cbh1* および *egl1* プロモーター、*aabg1*、*amdS* マーカーの塩基配列の確認は CEQTM2000XL DNA sequencer (Beckman coulter) を用いて GenomeLabTM Dye Terminator Cycle sequencing with Quick Start kit を使用し、取扱説明書に従って行った。形質転換に用いる前に得られた発現カセットは XhoI を用いた制限酵素処理による線状化を行った。

表 5-2: *Aabg1* 遺伝子発現カセットの構築に使用したプライマー一覧

用途	プライマー配列
<i>cbh1</i> プロモーター 挿入用	5'-gtcaaccgeggactgcgcatacATGAAGCTCAGTTGGCTTGAG-3' 5'-ctttegccacggagcactagtTCATTGCACCTTCGGGAGCG-3'
<i>egl1</i> プロモーター 挿入用	5'-cttagtccttcttgtgtcccaaaATGAAGCTCAGTTGGCTTGAG-3' 5'-acagaccagaggcaagtcaacgctTCATTGCACCTTCGGGAGCG-3'
<i>cbh1</i> インバース PCR 用	5'-AGCGTTGACTTGCCCTCTGGTCTGTC-3' 5'-TTTGGGACAACAAGAAGGACTAAGATAGGGG-3'
<i>egl1</i> インバース PCR 用	5'-AGCTCCGTGGCGAAAGCCTGACGCACC-3' 5'-GATGCGCAGTCCGCGGTTGACTATTGG-3'

*小文字は In-fusion クローニング用の相同配列

5.2.6 *T. reesei* PC3-7 株の形質転換

3.2.3 に記載した方法に準じた。*cbh1* または *egl1* 遺伝子を破壊していない非相同組換え体の確認は、CriterionTM TGX Stain-FreeTM Precast Gels 4-20% (Bio-Rad) を用いた SDS-PAGE により、各成分酵素のバンドを確認することで行った。

5.2.7 酵素活性測定とタンパク質測定

3.2.5 に記載した方法に準じて CMC 活性、キシラナーゼ活性、BGL 活性、 β -キシロシダーゼ活性測定およびタンパク質量を行った。ただし、FPU 活性は National Renewable Energy Laboratory から報告されている Laboratory Analytical Procedure に記載された方法に従って行った¹⁷⁷⁾。

5.3 結果および考察

5.3.1 NaOH 処理バイオマスの糖化に対するキシラナーゼ 3 の影響

第三章にて構築した *T. reesei* X3AB1 株が分泌する酵素 JN11 は、*xyn3* プロモーターおよびターミネーター領域も含めた XYN III をコードする DNA 配列と *aabgl* 遺伝子を相同組換えすることで BGL 活性が強化された。JN11 は硫酸処理イナワラを除く全ての前処理バイオマスに対して、市販酵素よりも効率的に糖化した。しかし、JN11 の相同組換えによる XYNIII 欠損のキシラン含有バイオマスに対する影響は確認できていない。そこで、キシランを含有する前処理バイオマスの糖化に対する XYNIII の糖化能を評価した。糖化能評価には、キシラナーゼ活性を最大にした酵素を用いるため、炭素源として 1% Avicel に加えて 0.5% キシランを含む培地を用いて *T. reesei* X3AB1 株を培養した。本培養条件で調製した酵素 JN11H は、XYNI、XYNII および BXL が誘導されることで JN11 よりもキシラン分解に関与する酵素を多く含んでいる。

JN11H の酵素量を 1 mg/g-バイオマスとし、精製した XYNII または XYNIII をそれぞれ 1 mg/g バイオマスとなるように JN11H に添加し、NaOH 処理イナワラの糖化反応を行った(図 5-1)。その結果、XYNII の糖化率は無添加条件と比較して 5% 未満の増加であったのに対し、XYNIII は 20% 以上増加した。すなわち、JN11H に既に含まれている XYNII の酵素活性は既に充分量存在するが、欠損している XYNIII の酵素活性は欠損した XYNIII でしか補えないことが示唆された(図 5-3)。そもそも、XYNII は GH family 11 に属するが、XYNIII は GH family 10 であり、両者は触媒活性の異なる酵素である¹⁷⁸⁾。GH family 11 に属するキシラナーゼはアラビノキシラン主鎖の未置換領域を優先的に切断するが、GH family 10 に属するキシラナーゼは置換領域の切断を行い、キシラン主鎖の置換基である 4-*o*-メチル-D-グルコン酸や酢酸、 α -L-アラビノフラノシル側鎖による障害は小さい¹⁷⁹⁾。GH family

10 に属するキシラナーゼは、GH family 11 に属するキシラナーゼにより遊離されたアラビノキシラン側鎖の切断も行う。そのため、XYNIII 存在下における還元糖量の増加は、GH family 11 に属する XYNI および XYNII では切断できない領域を XYNIII が切断することで、遊離キシロースの増加に繋がったと予想される。また、キシランの分解が進むことによってセルラーゼが接触可能なセルロース表面が新たに現れることより、遊離グルコースが増加した可能性も考えられる。これらの結果より、キシラン含有バイオマスの糖化に対して XYNIII が重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、XYNIII を保有させたまま AaBG1 を発現させることで、キシラン含有バイオマスの糖化に特化した酵素を分泌する *T. reesei* の組換え株が構築できることが示唆された。

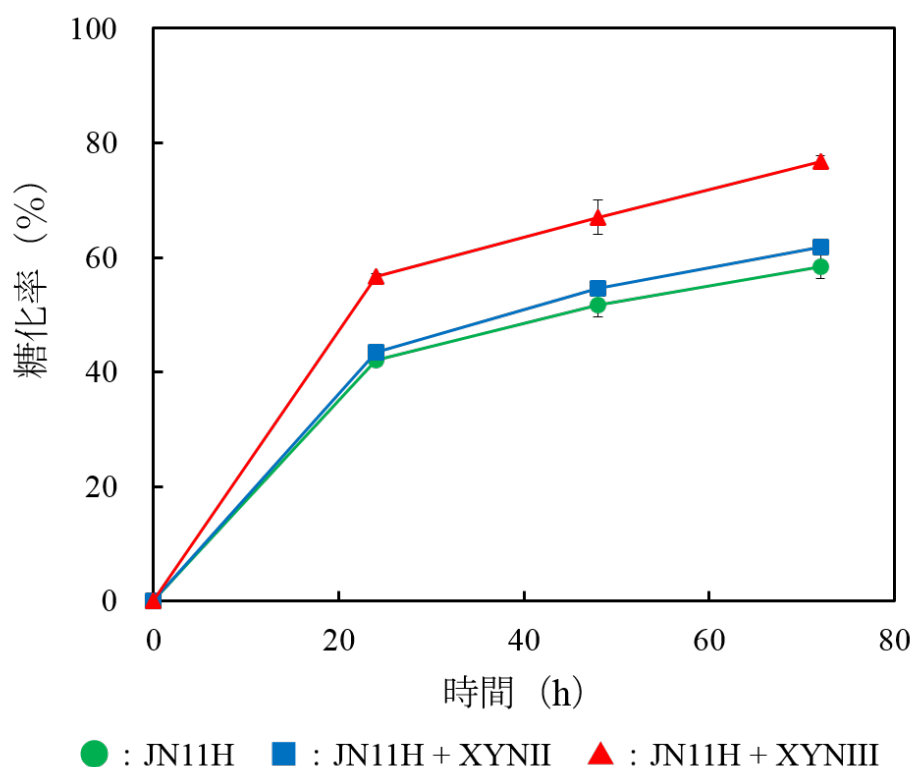


図 5-1: NaOH 処理イナワラの糖化反応に対する XYNII および XYNIII の添加効果

5.3.2 新規 AaBG1 高発現株の構築

T. reesei が分泌する酵素のバイオマス糖化能を JN11 からさらに最適化するため、*T. reesei* C1AB1 株および E1AB1 株を構築した(表 5-3、図 5-2)。それぞれの株は *aabg1* 遺伝子が *cbh1* または *egl1* のプロモーターおよびターミネーターの支配下に挿入された発現カセットを用いて、*cbh1* または *egl1* 遺伝子を破壊することがないよう非相同的に異種宿主発現が行われたものである(図 5-2B、5-2C)。*cbh1* プロモーターは *T. reesei* 由来プロモーターの中で最も強いものであり、*xyn3* プロモーターの約 10 倍強力であることが報告されている¹⁴³⁾。本試験においても、*T. reesei* C1AB1 株が分泌する酵素 JN12 の AaBG1 に相当するバンド強度は、JN11 の AaBG1 バンド強度よりも強いことが SDS-PAGE により確認された(図 5-3)。ただし、キシラナーゼ誘導条件で調製した JN12H は、JN12 よりも AaBG1 の発現が低下していた(図 5-3 のレーン 4 および 5)。*T. reesei* E1AB1 株が分泌する酵素 JN13 と JN11 の AaBG1 バンド強度は同程度であるため、*egl1* プロモーターと *xyn3* プロモーターの誘導能が同程度であり、この結果も過去の報告と一致するものであった(図 5-3 のレーン 2 およびレーン 6)¹³²⁾。上記したように、*T. reesei* C1AB1 株および E1AB1 株はそれぞれ *cbh1* および *egl1* 遺伝子を保持しており、SDS-PAGE より JN12 に CBHI、および JN13 に EGI が確認できた(図 5-3)。XYN III に相当するバンドは、JN11 および JN11H 以外の JN シリーズ酵素全てに確認することが出来た(図 5-3 レーン 4-7)。JN12 と JN12H を比較すると、培地にキシランを添加することで XYNIII が増加したが、本来 *xyn3* 遺伝子はキシランによって誘導されない(図 5-3 レーン 4 および 5)^{80,180)}。このキシラン添加による誘導の原因はまだ明らかになっていないが、非相同組換えが何らかの影響を与えた可能性が考えられる。2 種類の市販酵素のキシラナーゼを確認したところ、XYNIII に相当するバンドはどちらも観察されなかった(図 5-3 レーン 8 および 9)。そのため、第三章に示した市販酵素のキシラン含有前処理バイオマスに対する糖化能の低さは、XYNIII を保持していないことに起因すると考えられる。

表 5-3: 各菌株の遺伝子型と酵素名

菌株	遺伝子型	酵素名
PC-3-7	Wild-type	WT
X3AB1	<i>amdS</i> 、 <i>xyn3p::aabgl</i> 、	JN11
	Δ <i>xyn3::aabgl</i>	JN11H
C1AB1	<i>amdS</i> 、 <i>cbh1p::aabgl</i>	JN12
		JN12H
E1AB1	<i>amdS</i> 、 <i>egl1p::aabgl</i>	JN13
		JN13H

* 各菌株は炭素源として 1%の Avicel を含む培地で培養したものであり、培地に 0.5%キシランを添加した条件で培養した菌株由来の酵素が JN11H、JN12H、JN13H である。

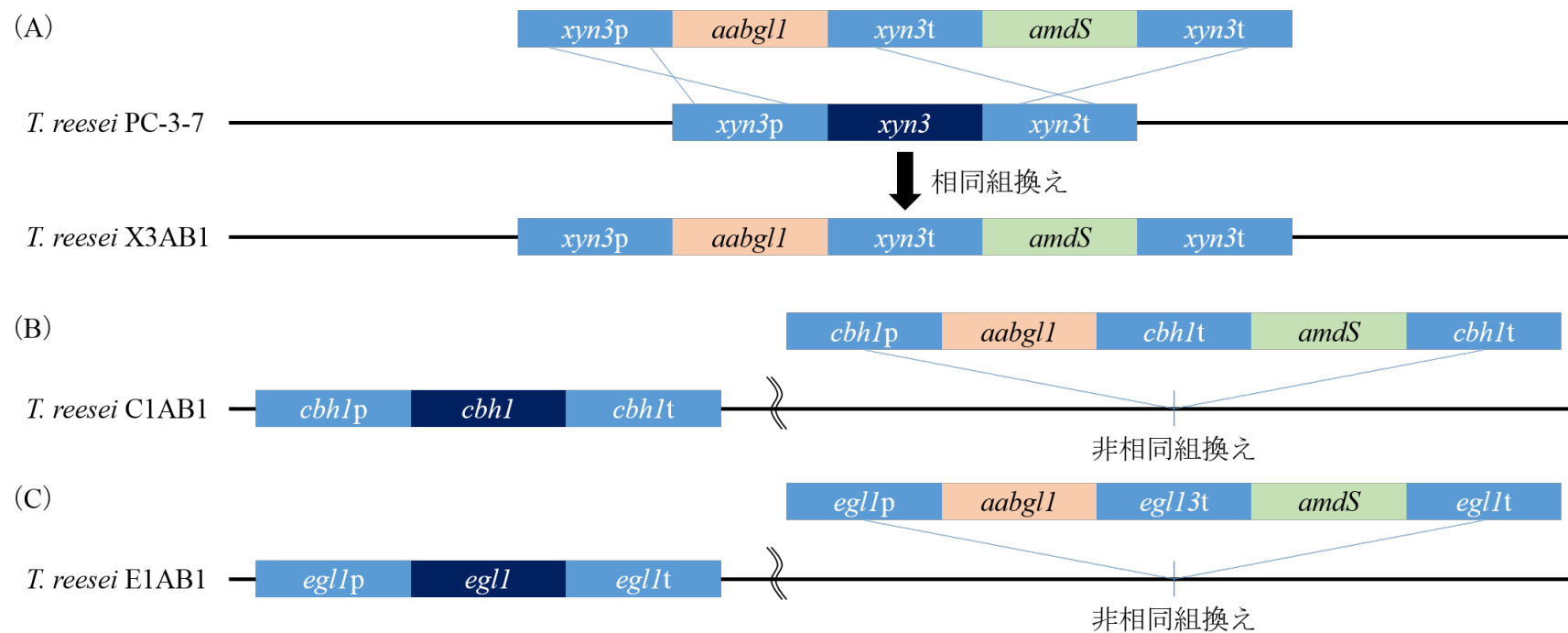


図 5-2: 各遺伝子組換え株の構築

(A)が X3AB1 株、(B)が C1AB1 株、(C)が E1AB1 株を示す。各略語は *xyn3p* が *xyn3* プロモーター、*aabg1* が *A. aculeatus* 由来 BGL 遺伝子、*xyn3t* が *xyn3* ターミネーター、*amdS* がアセトアミドマーカ、*cbh1p* が *cbh1* プロモーター、*cbh1t* が *cbh1* ターミネーター、*egl1p* が *egl1* プロモーター、*egl1t* が *egl1* ターミネーターを示す。波線で示した非相同組換えによる各発現カセットの挿入部位は特定していない。

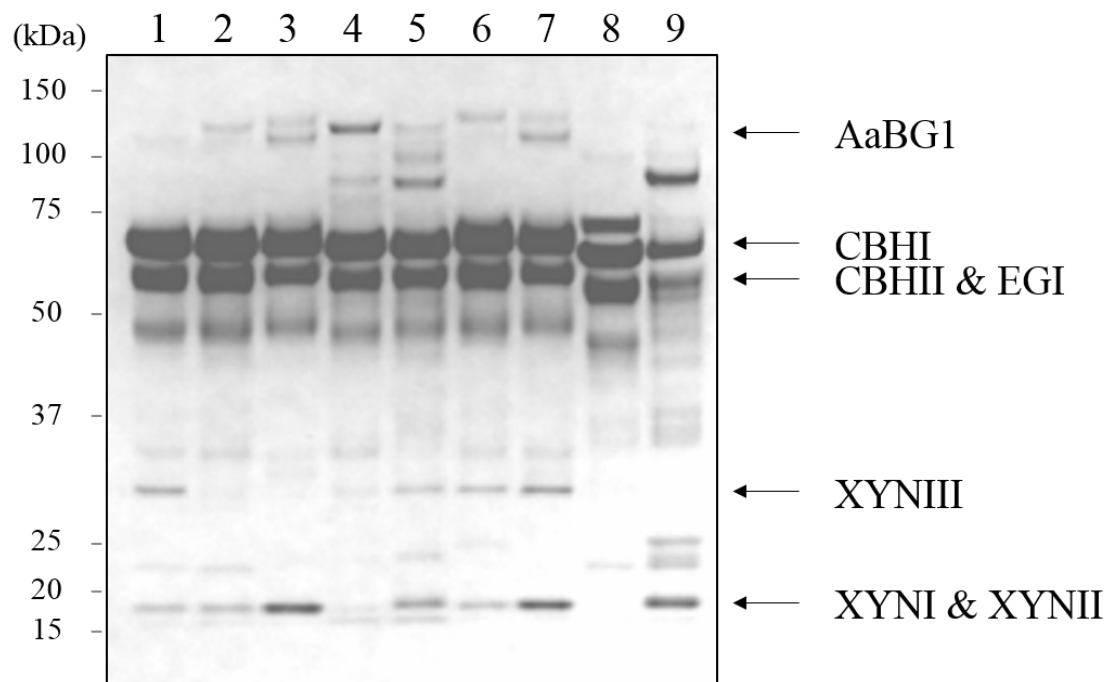


図 5-3:各酵素の SDS-PAGE

レーン 1: WT、レーン 2:JN11、レーン 3:JN11H、レーン 4:JN12、レーン 5:JN12H、レーン 6:JN13、レーン 7:JN13H、レーン 8:Accellerase 1500、レーン 9: Cellic CTec2。各成分酵素を矢印で示した。ただし、市販酵素の成分酵素は不明である。

5.3.3 JN シリーズ酵素と市販酵素の酵素活性の比較

T. reesei C1AB1 株および E1AB1 株が生産する酵素の特性を明らかにするために、BGL 活性を強化した JN シリーズ酵素および親株由来の酵素 WT、2 種類の市販酵素の酵素活性測定を行いそれぞれ比較した(表 5-4)。まず、JN12 および JN13 の BGL 活性は、それぞれ WT の 333 倍および 100 倍以上の大幅な増強がなされていた。JN11 の BGL 活性と比較しても JN12 および JN13 はそれぞれ 5 倍および 1.5 倍であった。市販酵素との比較では、Accellerase 1500 より 2-7 倍高かったが、BGL 活性が最も高いのは JN12 と Cellic CTec2 であり、JN13 は Cellic CTec2 の約 3 分の 1 であった。これに対して、セルロースの分解活性を表す FPU 活性およびエンドグルカナーゼ活性を示す CMC 活性の結果を比較すると、JN シリーズ酵素は BGL 活性に見られた大幅な差は見られず、WT と比較して約 1.5~2.0 倍の違いであり同程度の値であった。また、キシラン分解に関与するキシラナーゼ活性および β -キシロシダーゼ活性を比較すると、JN-H シリーズ酵素は JN シリーズ酵

素と比較して約 2~4 倍に増強されたことを明らかにした。ただし、JN13H のキシラナーゼ活性は、XYNIII を保持しているにも関わらず、JN11H から 20%増加した程度であった。XYNIII のキシラナーゼ活性に対する貢献度の低さの原因は、キシラン添加により両酵素において XYNI および XYNII が大幅に増加したことが考えられる。この増加分により、XYNIII の効果が埋もれてしまったことが予想される。また、JN12H のキシラナーゼ活性は XYNI および XYNII の発現量が低いため、XYNIII を保持していても JN11H より約 15%低い値であった。最もキシラナーゼ活性が高い酵素は Cellic CTec2 であり、キシラナーゼ誘導および XYNIII 保持の効果が得られた JN13H と比較しても 20%以上高いが、 β -キシロシダーゼ活性は JN13H が 6 倍以上高い値であった。

表 5-4: 各酵素の比活性とその相対値 (U/mg-タンパク質)

酵素	FPU 活性		CMC 活性		BGL 活性		キシラナーゼ活性		キシロシダーゼ活性	
	比活性	相対値	比活性	相対値	比活性	相対値	比活性	相対値	比活性	相対値
WT	1.1±0.02	0.58	35±2.0	0.66	0.12±0.0	0.015	88±0.0	1.3	0.59±0.01	1.1
JN11	1.9±0.06	1.0	53±1.0	1.0	7.8±0.5	1.0	67±6.0	1.0	0.54±0.02	1.0
JN11H	1.8±0.06	1.0	46±2.0	0.87	8.8±0.1	1.1	140±6.0	2.1	1.6±0.07	3.0
JN12	1.9±0.03	1.0	57±2.0	1.1	40±0.3	5.1	50±2.0	0.75	0.69±0.03	1.3
JN12H	1.8±0.06	1.0	55±2.0	1.0	22±0.1	2.8	120±5.0	1.8	1.8±0.05	3.3
JN13	1.9±0.05	1.0	52±2.0	1.0	12±0.2	1.5	67±2.0	1.0	0.45±0.02	0.83
JN13H	1.6±0.05	0.84	48±2.0	0.91	7.1±0.1	0.91	170±4.0	2.5	1.7±0.02	3.2
Accellerase 1500	1.8±0.05	1.9	56±1.0	1.1	5.6±0.1	0.72	21±1.0	0.31	0.12±0.01	0.22
Cellic CTec2	1.5±0.02	0.79	66±2.0	1.2	40±1.0	5.1	210±2.0	3.1	0.25±0.04	0.46

*JN11 の比活性を 1.0 とした時の各酵素の相対値を示した

5.3.4 前処理バイオマスの糖化能評価

新規に構築した BGL 強化酵素のバイオマス糖化能を評価するため、NaOH 処理イナワラおよび硫酸処理エリアンサスに対する糖化反応を行った。NaOH 処理イナワラはヘミセルロースの含有量が約 24%、リグニン含量が約 3.8%であり、それぞれ硫酸処理エリアンサスのヘミセルロース含量の約 10 倍高く、リグニン含量の約 10 倍低いという特徴がある(表 5-5)。セルロース単体を糖化するために必要な酵素の特性を明らかにするため、キシラン・リグニンを全く含有しない市販の微結晶セルロースである Avicel も基質として用いた。酵素のバイオマス糖化能の評価基準は、糖化反応 72 時間後に糖化率 80%となる酵素量とした。この評価基準は糖化率が 80%であるため原料の利用率が高く、糖化時間を限定することで生産速度も考慮したものである。

上記した 3 種類の基質に対して糖化反応を行った結果、JN シリーズ酵素は WT および市販酵素と比較して 80%糖化に必要な酵素量はかなり小さいことが明らかとなった(表 5-5)。特に JN13H は、キシラン含有量の高い NaOH 処理イナワラの 80%糖化に必要な酵素量は僅か 3.8 mg/g-バイオマスであり、市販酵素の約 3~22 分の 1 の酵素量であった。また、JN11H に対しても必要な酵素量は 30%低減しているため、既存開発酵素のさらなる高機能化に成功したことが明らかとなった。これは、JN11H に XYNIII の活性が追加された効果が表れたと考えられる。ただし、JN13H の優位性は NaOH 処理バイオマスの糖化に対してのみであり、Avicel および硫酸処理エリアンサスに対しては JN11 が最も少ない酵素量で糖化できた。つまり、JN13H はもとよりキシラン含有バイオマスに特化して機能を向上させたため、狙い通りの酵素の構築に成功したことを意味する。

JN12 および JN12H は Cellic CTec2 に次ぐ BGL 活性の高さを有するが、Avicel の糖化能は JN シリーズ酵素の中で最も低いことが明らかとなった(表 5-5)。この結果より、*cbh1* プロモーターの利用は、*T. reesei* が分泌する酵素の正味のセルラーゼ活性の大幅な低下に繋がることを示唆された。そのため、同様にセルロースが主成分である硫酸処理エリアンサスに対しても有効に働かないと考えられるため、糖化試験は実施していない。JN12 と JN12H を比較すると、JN12H の Avicel 分解に必要な酵素量は JN12 と比較すると 1.5 倍となり、他の JN シリーズ酵素よりも酵素量が顕著に増加した。これらのことは、組換え菌株における酵素の発現制御はそれぞれ異なり、JN12H のような特殊な状態に偏った酵素になりうることを示唆している。

表 5-5: 酵素のバイオマス糖化能評価

成分組成	NaOH 処理イナワラ		Avicel		硫酸処理エリアンサス	
	52.6:24.2:3.8:5.4		100:0:0:0		51.6:2.2:35.4:5.5	
	酵素量 (mg)	相対値	酵素量 (mg)	相対値	酵素量 (mg)	相対値
WT	40±0.1	5.4	270±0.05	48	31±0.03	7.7
JN11	7.4±0.1	1.0	5.6±0.03	1.0	4.0±0.03	1.0
JN11H	5.0±0.1	0.7	6.0±0.01	1.1	5.2±0.03	1.3
JN12	7.8±0.1	1.1	8.2±0.05	1.5	-	-
JN12H	7.2±0.1	1.0	12±0.2	2.1	-	-
JN13	4.6±0.05	0.6	6.0±0.05	1.1	4.5±0.02	1.1
JN13H	3.8±0.05	0.5	7.4±0.1	1.3	5.2±0.07	1.3
Accellerase 1500	83±0.3	11	16±0.2	2.9	10±0.09	2.5
Cellic CTec2	11±0.05	1.5	38±0.1	6.8	8.8±0.08	2.2

* 各基質の成分組成はセルロース:ヘミセルロース:リグニン:灰分として示した

* 相対値は JN11 の酵素量を 1.0 とした時の各酵素の相対値として示した

* 太字は各基質において最も少ない酵素量を示した

5.3.5 JN13H を用いたバイオマス糖化におけるキシラナーゼ 3 の影響

T. reesei X3AB1 株および E1AB1 株が分泌する JN11 と JN13 の比較を通じて、XYNIII がキシランを多く含む NaOH 処理バイオマスの糖化に非常に大きな影響を与えていることを明らかにした。NaOH 処理バイオマスの糖化に最も効果的であった JN13H に含まれる XYNIII の量が充分であるかを確認するために、JN13H に XYNIII を添加した条件で NaOH 処理イナワラの糖化を行った(図 5-4)。その結果、XYNIII の添加効果はほとんど見られないため、JN13H に含まれる XYNIII は NaOH 処理イナワラの糖化に充分量存在していると考えられる。

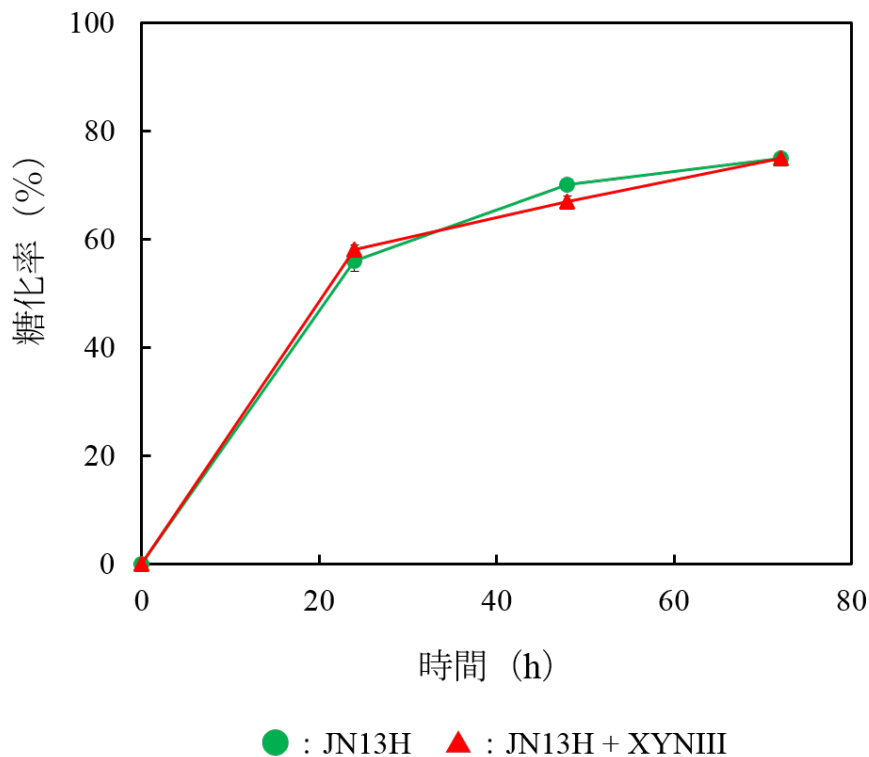


図 5-4: NaOH 処理イナワラの JN13H を用いた糖化反応に対する XYNIII の添加効果

5.4 本章のまとめ

本章では、ヘミセルロースを含有する NaOH 処理バイオマスの糖化に対する XYNIII の重要性を明らかにした。NaOH 処理バイオマスの糖化を行う際に XYNIII を含まない JN11H に XYNIII を添加すると、糖化率は約 20% 向上した。そこで、AaBG1 を発現するためのプロモーターとして *xyn3* プロモーターの代わりに *egl1* プロモーターを用いて非相同的な組換えを行った。そのように構築された *T. reesei* E1AB1 株が分泌する酵素 JN13H を用いて糖化を行ったところ、糖化に必要な酵素量を約 30% 低減させることに成功した。また、市販酵素と比較しても NaOH 処理イナワラの糖化に必要な酵素量は大幅な削減できることが明らかとなった。本章の結果より *egl1* プロモーターの有用性も明らかになったため、今後 AaBG1 と同様に糖化に対して有用な酵素が見出された場合、*egl1* プロモーターを利用してさらなる高機能化が可能になるだろう。

第六章 結言

本章では本研究のまとめを記す。6.1 では、本研究の成果をまとめる。6.2 では、今後の展望を示す。

6.1 本研究の結論

持続可能な社会へ向かうためには再生可能な資源が中心的な役割を果たすことが求められている。そのなかで、バイオマスから液体燃料やバルクケミカルを経済性良く、高効率で生産する技術の開発が期待されている。特に、セルロース系バイオマスは、安定的な供給が可能であり、食糧と競合しない資源として利活用が望まれている。セルロース系バイオマスを利用するためには、構成成分であるセルロースやヘミセルロースをグルコースやキシロースへ分解する必要がある。この分解工程には微生物が生産するセルラーゼおよびヘミセルラーゼといった糖質加水分解酵素が用いられるが、高い酵素コストがセルロース系バイオマスの商業的利用における障壁の 1 つとなっている。そのため、同一量のバイオマスを少量の酵素で分解することが可能な高機能化酵素の開発が求められている。

本研究では、酵素生産菌株として日本で育種開発された *T. reesei* PC-3-7 株を用いた。*T. reesei* は、その生産性の高さやバイオマス分解に必要な多様な酵素を全て分泌可能なことから、実用的な酵素生産菌株として最も有望視された菌株である。*T. reesei* が分泌する酵素は高いセルロース分解能を有するが、BGL 活性が低いことが欠点である。そこで、*T. reesei* が分泌する BGL の数十倍の比活性を有する *A. aculeatus* 由来の BGL である AaBG1 の *T. reesei* における発現を実施した。AaBG1 遺伝子である *aabg1* は *xyn3* プロモーターによって発現するように *xyn3* 遺伝子座に相同組換えした。組換え菌株 *T. reesei* X3AB1 株が生産する酵素 JN11 は、遺伝子組換え菌株に関するこれまでの報告にあったような酵素の発現バランスが崩れることなく、BGL 活性を親株の 65 倍に上昇させることに成功した。さらに、バイオマス糖化能は、最新のバイオエタノール生産用に開発された市販酵素と比較して 1.3-2.0 倍となった。

酵素のさらなる高機能化に必要な情報を得るため、*T. reesei* が保有する主要な成分酵素 CBHI、CBHII、EGI が前処理バイオマスの糖化に与える影響を調べた。標的とした成分酵素以外の全ての酵素を含む単一成分欠損セルラーゼを用いて

バイオマス糖化を行ったところ、CBHI は硫酸処理イナワラを除く全ての前処理バイオマスに対して重要な影響を与えているが、CBHII および EGI はバイオマスや糖化前処理の種類に依存してその影響度が大きく変化することが明らかとなった。特に EGI は、硫酸処理イナワラや蒸気爆砕処理スギの糖化に対して全く影響がなかった。その発現プロモーターである *egl1* プロモーターは *T. reesei* の中で 3 番目に強力であるため、他の遺伝子を利用する際の組換えプロモーターとして有力であることが示唆された。

T. reesei X3AB1 株は AaBG1 と XYNIII を相同組換えしているため、本株のキシラン分解酵素の誘導条件で生産される酵素 JN11H は XYN III を欠損している。しかし、精製した XYN III を JN11H に添加すると、ヘミセルロースを多く含む NaOH 処理イナワラの糖化率が向上することが明らかになった。そこで、バイオマス糖化への影響は小さいが発現能力が高い *egl1* プロモーターを利用して AaBG1 を発現する *T. reesei* E1AB1 株を構築した。本株がキシラン分解酵素の誘導条件で生産する酵素 JN13H は、JN11 の半分の酵素量で同一量の NaOH 処理イナワラを分解し、市販酵素と比較しても必要な酵素量は 3-22 分の 1 と大幅な酵素使用量の削減に成功した。

以上をまとめると、本研究では、これまで困難であった *T. reesei* における異種遺伝子の発現手法を確立した。その結果、セルロースを主体としたバイオマスの分解に特化した JN11、およびヘミセルロースを多く含むバイオマスの分解に特化した JN13H という 2 種類の酵素の開発に成功した。また、単一成分欠損セルラーゼを用いることで、バイオマス糖化に対する成分酵素の影響を明らかにする手法を開発し、本手法から *egl1* プロモーターの活用など、酵素のさらなる高機能化のための知見を得ることに成功した。本研究の成果が、実用的な日本型糖化酵素開発の一助となり、バイオエタノールが商業的に利用可能な代替燃料として普及することを期待する。

6.2 展望

本論文では第 2 世代バイオエタノールの原料であるセルロース系バイオマスの活用を目的とし、その利用の大きな障害となっている酵素コストの低下に繋がる酵素の高機能化を試みた。*T. reesei* PC-3-7 株をベースにした酵素の能力アップに成功したが、今回の改良は酵素のチューニングに徹しており、本質的なセルロース分解能を上げるような改良ではなかった。これは BGL の強化によりセロビオースの蓄積を防ぐことで阻害要因を取り除いたことや、親株の特徴である XYNIII を活かすこと

でキシラン分解能を高め、その結果セルロースが表面に露出することでセルロース分解酵素がよりよく働く環境を作ったことである。このように酵素が適切に働く環境を揃えた上で、さらに酵素の分解能力を高めるためにはセルロース分解そのものをより効率化する必要がある。その方法論として、タンパク質工学的な手法による成分酵素の機能改善や、今回導入した AaBG1 のようなより高活性な酵素の導入などが考えられる。さらに、セルロース分解活性が高いと報告されているバクテリアのセルロソームのような特殊な酵素機構の導入も期待される。近年においては、酵素生産、糖化、発酵の生化学的変換過程をすべて統合化した CBP (Consolidated Bioprocessing) が検討されており、バイオエタノール生産を最も効率化できるプロセスとして期待されている。また、糖やエタノールの生産プロセス全体を考慮すると、改良の対象は菌株そのものも範疇に入り、より効果的な酵素生産法の開発が望まれるだろう。これらは今後の継続的な研究課題として捉えつつも、酵素および菌株を総合的に機能向上することが、実用的なセルロース系バイオマスの活用に繋がると考えられる。

本研究後の実際の進展として、まず使用する原料がバガスに集約された¹⁸¹⁾。これは、農業残渣として発生するバガスを副産物という観点から利用することで、バイオエタノール生産の早期の実用化を狙ったものである。酵素開発の動向としては、成分酵素の改良として *T. reesei* 由来 XYNIII よりも高活性なキシラナーゼが見出された。また、酵素発現に利用するプロモーターの改良として、*xyn3* プロモーターに対するセルロース誘導能の強化およびキシロース誘導能の付与に成功している¹⁸²⁾。さらに、酵素生産菌株をより工業生産に適した菌株とするため、スケールアップや工業用培地を考慮した生産菌株が開発されている。本菌株は高い酵素生産性を達成しながら、アルカリ処理バガスから 1 g の糖を生産するために必要な酵素量を既存酵素の 8.0 mg から 2.3 mg という大幅な低減を達成する酵素を生産することが可能となっている。

参考文献

- 1) 資源エネルギー庁: “エネルギー白書 2015 第2部エネルギーの動向” (2015)
- 2) 東京証券取引所: “石油取引の基礎知識” (2017)
- 3) 資源エネルギー庁: “エネルギー白書 2016 第2部エネルギーの動向” (2016)
- 4) 一般財団法人次世代自動車振興センター、調査・統計、EV等保有台数合計 (2016) <http://www.cev-pc.or.jp/tokei/hanbai.html>
- 5) 一般財団法人自動車検査登録情報協会、統計情報、自動車保有台数 (2015) <http://www.airia.or.jp/publish/file/r5c6pv0000003mvf-att/r5c6pv0000003mvu.pdf>
- 6) United Nations, Population databases, World Population Prospects (2016) <http://www.un.org/en/development/desa/population/publications/database/index.shtml>
- 7) International monetary fund, Data, World Economic and Financial Surveys World Economic Outlook Database (2015) <https://www.imf.org/external/pubs/ft/weo/2015/02/weodata/index.aspx>
- 8) Shell International BV: “Shell energy scenarios to 2050” (2008)
- 9) International Energy Agency, Topics, Energy security (2016) <https://www.iea.org/topics/energysecurity/>
- 10) Wang J, Feng L, Tang X, Bentley Y and Höök M: “The implications of fossil fuel supply constraints on climate change projections: A supply-side analysis”, Futures, Vol. 86, pp. 58-72 (2015)
- 11) Rystad Energy, Global liquids cost curve, (2015) <https://www.rystadenergy.com/NewsEvents/PressReleases/global-liquids-supply-cost-curve>
- 12) United Nations: “Report of the World Commission on Environment and Development”, 96th plenary meeting (1987)
- 13) Nicholas Stern: "The Economics of Climate Change" (2006)
- 14) Takura J, Fujimori S, Takahashi K, Hijioka Y, Hasegawa T, Honda Y and Masui T: "Cost of preventing workplace heat-related illness through

- worker breaks and the benefit of climate-change mitigation”, Environ Res Lett, Vol.12, 064010 (2017)
- 15) Rotman D: “Hotter days will drive global inequality”, MIT Technology Review (2016) <https://www.technologyreview.com/s/603158/hotter-days-will-drive-global-inequality/>
 - 16) Japan meteorological agency in co-operation with world meteorological organization: “WMO WDCGG DATA SUMMARY”, WDCGG No.40 (2016)
 - 17) 田近英一: “凍った地球”、新潮社 (2009)
 - 18) Hoffman PF, Kaufman AJ, Halverson GP and Schrag DP: “A Neoproterozoic Snowball Earth”, Science, Vol. 281, No. 5381, pp. 1342-1346 (1998)
 - 19) ピーター・ウォード、ジョゼフ・カーシュヴィンク: “生物はなぜ誕生したのか 生命の起源と進化の最新科学”、河出書房新社 (2016)
 - 20) Janzen HH: “Carbon cycling in earth systems - a soil science perspective”, Agric Ecosyst Environ, Vol. 104, No. 3, pp. 399-417 (2004)
 - 21) The Intergovernmental Panel on Climate Change: “CLIMATE CHANGE 2014 Synthesis Report” (2014)
 - 22) International Energy Agency: “Renewable Energy Working Party” (2002)
 - 23) 独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構編: “NEDO 再生可能エネルギー技術白書 第1章再生エネルギーの役割” (2014)
 - 24) 山下英俊: “日本におけるメガソーラー事業の現状と課題”、一ツ橋経済大、Vol. 5、No. 2、pp. 125-144 (2014)
 - 25) 環境省総合環境政策局: “風力発電所の環境影響評価のポイントと参考事例” (2013)
 - 26) 井上素行、白石栄一: “再生可能エネルギーとしての新たな時代の水力”、科学技術動向、No. 108、pp. 21-25 (2010)
 - 27) 経済産業省: “長期エネルギー需要見通し” (2015)
 - 28) 越島哲夫、真柄謙吾: “マイクロ波を用いる木質系バイオマスの酵素的変換”、木材研究・資料、Vol. 24、pp. 1-12 (1988)
 - 29) 農林水産省: “バイオマス・ニッポン総合戦略” (2006)
 - 30) 小泉 達治、大賀 圭治: “ブラジルのバイオエタノール政策の効果－砂糖需給へ与える影響－”, フードシステム研究, Vol. 16, No. 3, pp. 1-14 (2009)

- 31) Bixby J: "The 2005 energy policy act: Lessons on getting alternative fuels to the pump from minnesota's ethanol regulations", Wash. UJL & Pol'y, Vol. 26, pp. 353-378 (2008)
- 32) BP: "Statistical Review of World Energy", 60th edition (2011)
- 33) BP: "Statistical Review of World Energy", 65th edition (2016)
- 34) U.S. Energy Information Administration: "International Energy Outlook 2016" (2016)
- 35) Rosegrant MW: "Biofuels and grain prices: Impacts and policy responses", IFPRI (2008)
- 36) U.S Department of Energy Genome Programs image gallery (2011)
<http://genomics.energy.gov>
- 37) Balat M and Balat H: "Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel", Appl Energ, Vol. 86, No. 11, pp. 2273-2282 (2009)
- 38) Sun Y and Cheng J: "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review", Bioresource Technol, Vol. 83, No. 1, pp. 1-11 (2002)
- 39) Huff GF and Yata N: "Enzymatic hydrolysis of cellulose", U.S. Patent, US3990945(A) (1976)
- 40) Hamelinck CN, Hooijdonk G and Faaij APC: "Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term", Biomass Bioenerg, Vol. 20, No. 4, pp. 384-410 (2005)
- 41) Ho NWY, Cehn Z and Brainard AP: "Recombinant yeasts for effective fermentation of glucose and xylose", U.S. Patent, US5789210(A) (1998)
- 42) Kuyper M, Harhangi HR, Stave AK, Winkler AA, Jetten MS, Laat WT, Ridder JJ, Camp HJ, Dijken JP and Pronk JT: "High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*?", FEMS Yeast Res, Vol. 4, No. 1, pp. 69-78 (2003)
- 43) Kuyper M, Winkler AA, Dijken JP and Pronk JT: "Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle", FEMS Yeast Res, Vol. 4, No. 6, pp. 655-664 (2004)

- 44) Boer H, Teeri TT and Koivula A: “Characterization of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A secreted from *Pichia pastoris* using two different promoters”, *Biotechnol Bioeng*, Vol. 69, No. 5, pp. 486-494 (2000)
- 45) Aldiguier AS, Alfenore S, Cameleyre X, Goma G, Uribe Larrea JL, Guillouet SE and Molina-Jouve C: “Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production”, *Bioprocess Biosyst Eng*, Vol. 26, No. 4, pp. 217-222 (2004)
- 46) Mitsumasu K, Liu ZS, Tang YQ, Akamatsu T, Taguchi H and Kida K: “Development of industrial yeast strain with improved acid- and thermo-tolerance through evolution under continuous fermentation conditions followed by haploidization and mating”, *J Biosci Bioeng*, Vol. 118, No. 6, pp. 689-695 (2014)
- 47) Nonklang S, Abdel-Banat BM, Cha-aim K, Moonjai N, Hoshida H, Limtong S, Yamada M and Akada R: “High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042”, *Appl Environ Microbiol*, Vol. 74, No. 24, pp. 7514-7521 (2008)
- 48) Klein-Marcuschamer D, Oleskiewicz-Popiel P, Simmons BA and Blanch HW: “The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels”, *Biotechnol Bioeng*, Vol. 109, No. 4, pp. 1083-1087 (2012)
- 49) Kim Y, Ximenes E, Mosier NS and Ladisch MR: “Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass”, *Enzyme Microb Technol*, Vol. 48, No. 4-5, pp. 408–415 (2011)
- 50) Li C, Cheng G, Balan V, Kent MS, Ong M, Chundawat SPS, Sousa LdaCosta, Melnichenko YB, Dale BE, Simmons BA and Singh S: “Influence of physico-chemical changes on enzymatic digestibility of ionic liquid and AFEX pretreated corn stover”, *Bioresour Technol*, Vol. 102, No. 13, pp. 6928–6936 (2011)
- 51) Yang J, Zhang X, Yong Q and Yu S: “Three-stage hydrolysis to enhance enzymatic saccharification of steam-exploded corn stover”, *Bioresour Technol*, Vol. 101, No. 13, pp. 4930–4935 (2010)

- 52) Emptage M, Haynie SL, Laffend LA, Pucci JP and Whited G: “Process for the biological production of 1, 3-propanediol with high titer”, U.S. Patent, US6514733(B1) (2000)
- 53) Fruchey OS, Manzer LE, Dunuwila D, Keen BT, Albin BA, Clinton NA and Dombek BD: “Processes for the production of hydrogenated products”, U.S. Patent, US8399687(B2) (2013)
- 54) Vink ET, Rábago KR, Glassner DA, Springs B, O'Connor RP, Kolstad J and Gruber PR: “The sustainability of NatureWorks polylactide polymers and Ingeo polylactide fibers: an update of the future”, *Macromol Biosci*, Vol, 4, No. 6, pp. 551-564 (2004)
- 55) 独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構: “酵素糖化・効率的発酵に資する基盤研究 平成 20 年度～平成 24 年度成果報告書” (2013)
- 56) Sims REH, Mabee W, Saddler JN and Taylor M: “An overview of seconde generation biofuel technologies”, *Bioresour Technol*, Vol. 101, No. 6, pp. 1570-1580 (2010)
- 57) Somerville C, Youngs H, Taylor C, Davis SC and Long SP: “Feedstocks for lignocellulosic biofuels”, *Science*, Vol. 329, No. 5993, pp. 790-792 (2010)
- 58) Yamamura M, Noda S, Hattori T, Shino A, Kikuchi J, Takabe K, Tagane S, Gau M, Uwatoko N, Mii M, Suzuki S, Shibata D and Umezawa T: “Characterization of lignocellulose of *Erianthus arundinaceus* in relation to enzymatic saccharification efficiency”, *Plant Biotechnol*, Vol. 30, pp. 25–35 (2013)
- 59) Sannigrahi P, Ragauskas AJ and Tuskan GA: “Poplar as a feedstock for biofuels: A review of compositional characteristics”, *Biofuel Bioprod Biorefin*, Vol. 4, No. 2, pp. 209–226 (2010)
- 60) Romani A, Garrote G, Ballesteros I and Ballesteros M: “Second generation bioethanol from steam exploded *Eucalyptus globulus* wood”, *Fuel*, Vol. 111, pp. 66-74 (2013)
- 61) Mislevy P, Kalmbacher RS, Overman AJ and Martin FG: “Effect of fertilizer and nematicide treatments on crops grown for biomass”, *Biomass*, Vol. 11, No. 4, pp. 243-253 (1986)

- 62) Stape JL, Binkley D, Ryan MG, Fonseca S, Loos RA, Takahashi EN, Silva CR, Silva SR, Hakamada RE, Ferreira JMA, Lima AMN, Gava JL, Leite FP, Andrade HB, Alves JM, Silva GGC and Azevedo MR: “The brazil eucalyptus potential productivity project: Influence of water, nutrients and stand uniformity on wood production”, *Forest Ecol Manag*, Vol. 259, No. 9, pp.1684-1694 (2010)
- 63) Horn SJ, Vaaje-Kolstad G, Westereng B and Eijsink VG: “Novel enzymes for the degradation of cellulose”, *Biotechnol Biofuels*, Vol. 5, No. 1, 45 (2012)
- 64) Herth W: “Arrays of plasma-membrane “rosettes” involved in cellulose microfibril formation of *Spirogyra*”, *Planta*, Vol. 159, No. 4, pp. 347-356 (1983)
- 65) Doblin MS, Kurek I, Jacob-Wilk D and Delmer DP: “Cellulose Biosynthesis in Plants: from Genes to Rosettes”, *Plant Cell Physiol*, Vol. 43, No. 12, pp. 1407-1420 (2002)
- 66) Somerville C: “Cellulose synthesis in higher plants”, *Annu Rev Cell Dev Biol*, Vol. 22, pp. 53-78 (2006)
- 67) Henrissat B: “A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities”, *Biochem J*, Vol. 280, pp. 309-316 (1991)
- 68) Barr BK, Hsieh YL, Ganem B and Wilson DB: “Identification of two functionally different classes of exocellulases”, *Biochemistry-us*, Vol. 35, No. 2, pp. 586-592 (1996)
- 69) Igarashi K, Uchihashi T, Koivula A, Wada M, Kimura S, Okamoto T, Penttilä M, Ando T and Samejima M: “Traffic jams reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface”, *Science*, Vol. 333, No. 6047, pp. 1279-1282 (2011)
- 70) Beckham GT, Matthews JF, Bomble YJ, Bu L, Adney WS, Himmel ME, Nimlos MR and Crowley MF: “Identification of amino acids responsible for processivity in a Family 1 carbohydrate-binding module from a fungal cellulose”, *J Phys Chem B*, Vol. 114, No. 3, pp. 1447-1453 (2010)
- 71) Kleman-Leyer KM, Siika-Aho M, Teeri TT and Kirk TK: “The cellulases endoglucanase I and cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* act synergistically to solubilize native cotton cellulose but not to decrease its

- molecular size”, *Appl Environ Microbiol*, Vol. 62, No. 8, pp. 2883-2887 (1996)
- 72) Karlsson J, Siika-aho M, Tenkanen M and Tjerneld F: “Enzymatic properties of the low molecular mass endoglucanases Cel12A (EG III) and Cel45A (EG V) of *Trichoderma reesei*”, *J Biotechnol*, Vol. 99, No. 1, pp. 63-78 (2002)
- 73) Quinlan RJ, Sweeney MD, Lo Leggio L, Otten H, Poulsen JC, Johansen KS, Krogh KB, Jørgensen CI, Tovborg M, Anthonsen A, Tryfona T, Walter CP, Dupree P, Xu F, Davies GJ and Walton PH: “Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components”, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 108, No. 37, pp. 15079-15084 (2011)
- 74) Desmet T, Cantaert T, Gualfetti P, Nerinckx W, Gross L, Mitchinson C and Piens K: “An investigation of the substrate specificity of the xyloglucanase Cel74A from *Hypocrea jecorina*”, *FEBS J*, Vol. 274, No. 2, pp. 356-363 (2006)
- 75) Chen H, Hayn M and Esterbauer H: “Purification and characterization of two extracellular beta-glucosidases from *Trichoderma reesei*”, *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1121, No. 1-2, pp. 54-60 (1992)
- 76) Cosgrove DJ: “Cell wall loosening by expansins”, *Plant Physiol*, Vol. 118, No. 2, pp. 333-339 (1998)
- 77) Saloheimo M, Paloheimo M, Hakola S, Pere J, Swanson B, Nyssönen E, Bhatia A, Ward M and Penttilä M: “Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials”, *Eur J Biochem*, Vol. 269, No. 17, pp. 4202-4211 (2002)
- 78) Tenkanen M, Puls J, Poutanen K: “Two major xylanases of *Trichoderma reesei*”, *Enzyme Microb Tech*, Vol. 14, No. 7, pp. 566-574 (1992)
- 79) Törrönen A, Mach RL, Messner R, Gonzalez R, Kalkkinen N, Harkki A and Kubicek CP: “The two major xylanases from *Trichoderma reesei*: characterization of both enzymes and genes”, *Biotechnology (NY)*, Vol. 10, No. 11, pp. 1461-1465 (1992)

- 80) Xu J, Takakuwa N, Nogawa M, Okada H and Morikawa Y: "A third xylanase from *Trichoderma reesei* PC-3-7", *Appl Microbiol Biot*, Vol. 49, No. 6, pp. 718-724 (1998)
- 81) 前原智子、金子 哲: “ヘミセルロースの構造と分解酵素 キシラン分解酵素を例としたヘミセルロースの分解機構について”、*応用糖質化学*、Vol. 2, No. 3 (2012)
- 82) Margolles-Clark E, Tenkanen M, Nakari-Setälä T and Penttilä M: “Cloning of genes encoding alpha-L-arabinofuranosidase and beta-xylosidase from *Trichoderma reesei* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Appl Environ Microbiol*, Vol. 62, No. 10, pp. 3840-3846 (1996)
- 83) Stålbrand H, Siika-aho M, Tenkanen M and Viikari L: “Purification and characterization of two β -mannanases from *Trichoderma reesei*”, *J Biotechnol*, Vol. 29, No. 3, pp. 229-242 (1993)
- 84) Qing Q and Wyman CE: “Supplementation with xylanase and β -xylosidase to reduce xylo-oligomer and xylan inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose and pretreated corn stover” *Biotechnol Biofuels*, Vol. 4, No. 1, 18 (2011)
- 85) Verduyn C, Postma E, Scheffers WA and Dijken JP: “Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures”, *J Gen Microbiol*, Vol. 136, No. 3, pp. 395-403 (1990)
- 86) Casey GP and Ingledew WM: “Ethanol tolerance in yeasts”, *Crit Rev Microbiol*, Vol. 13, No. 3, pp. 219-280 (1986)
- 87) Otto E and Escovar-Kousen J: “Ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF)”, U.S. Patent, US20050026261(A1) (2005)
- 88) Philippidis GP, Smith TK and Wyman CE: “Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process” *Biotechnol Bioeng*, Vol. 41, No. 9, pp. 846-853 (1993)
- 89) Wingren A, Galbe M and Zacchi G: “Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks”, *Biotechnol Prog*, Vol. 19, No. 4, pp. 1109-1117 (2003)

- 90) Chang VS and Holtzapple MT: "Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity", *Appl Biochem Biotechnol*, Vol. 84, No. 1-9, pp. 5-37 (2000)
- 91) Koullas DP, Christakopoulos P, Kekos D, Macris BJ and Koukios EG: "Correlating the effect of pretreatment on the enzymatic hydrolysis of straw", *Biotechnol Bioeng*, Vol. 39, No. 1, pp. 113-116 (1992)
- 92) Laureano-Perez L1, Teymouri F, Alizadeh H and Dale BE: "Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass: characterization of pretreated corn stover", *Appl Biochem Biotechnol*, Vol. 124, No. 1-3, pp. 1081-1099 (2005)
- 93) Puri VP: "Effect of crystallinity and degree of polymerization of cellulose on enzymatic saccharification", *Biotechnol Bioeng*, Vol. 26, No. 10, pp. 1219-1222 (1984)
- 94) Caulfield DF and Moore WE: "Effect of varying crystallinity of cellulose on enzyme hydrolysis", *Wood Sci*, Vol. 6, pp. 375-379 (1974)
- 95) Grethlein HE: "The effect of pore size distribution on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose substrates", *Bio/Technol*, Vol. 3, pp. 155-160 (1985)
- 96) Schell DJ, Farmer J, Newman M and McMillan JD: "Dilute-sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor: investigation of yields, kinetics, and enzymatic digestibilities of solids", *Appl Biochem Biotechnol*, Vol. 105 -108, pp. 69-85 (2003)
- 97) Millet MA, Baker AJ and Sattre LD: "Physical and chemical pretreatments for enhancing cellulose saccharification", *Biotech Bioeng Symp*, Vol. 6, pp. 125 - 153 (1976)
- 98) Hsu TA: "Handbook on bioethanol, production and utilization: Pretreatment of biomass", CRC press, pp. 179-195 (1996)
- 99) Igarashi K, Wada M and Samejima M: "Activation of crystalline cellulose to cellulose III(I) results in efficient hydrolysis by cellobiohydrolase", *FEBS*, Vol. 274, No. 7, pp. 1785-1792 (2007)
- 100) Park JY, Shiroma R, Al-Haq MI, Zhang Y, Ike M, Arai-Sanoh Y, Ida A, Kondo M and Tokuyasu K: "A novel lime pretreatment for subsequent bioethanol production from rice straw-calcium capturing by carbonation

- (CaCCO) process”, *Bioresour Technol*, Vol. 101, No. 17, pp. 6805-6811 (2010)
- 101) Negro MJ, Manzanares P, Ballesteros I, Oliva JM, Cabañas A and Ballesteros M: “Hydrothermal pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplar biomass”, *Appl Biochem Biotechnol*, Vol. 105-108, pp. 87-100 (2003)
- 102) Mok WSL and Antal Jr MJ. "Uncatalyzed solvolysis of whole biomass hemicellulose by hot compressed liquid water", *Ind Eng Chem Res*, Vol. 31, No. 4, pp. 1157-1161 (1992)
- 103) Tanahashi M., Takada S, Aoki T, Goto T, Higuchi T and Hanai S: "Characterization of Explosion Wood", *Wood Research*, Vol. 69, pp. 36-51 (1983)
- 104) García-Aparicio MP, Ballesteros I, González A, Oliva JM, Ballesteros M and Negro MJ: “Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis”, *Appl Biochem Biotechnol*, Vol. 129–132, pp. 278–288 (2006)
- 105) Trajano HL, Engle NL, Foston M, Ragauskas AJ, Tschaplinski TJ and Wyman CE: “The fate of lignin during hydrothermal pretreatment”, *Biotechnol Biofuels*, Vol. 6, No. 1, 110 (2013)
- 106) Fujimoto S, Inoue H, Yano S, Sakai T, Minowa T, Endo T, Sawayama S and Sakanishi K: “Bioethanol production from lignocellulosic biomass requiring no sulfuric acid: Mechanochemical pretreatment and enzymic saccharification”, *J Jpn Petrol Inst*, Vol. 51, No. 5, pp. 264-273 (2008)
- 107) 遠藤貴志: “バイオ燃料を木材からナノテクで生産する-セルロースの構造特性を利用した酵素糖化前処理技術-“, *Synthesiology*, Vol. 2, No. 4, pp. 310-320 (2009)
- 108) Schülein M: “Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens*”, *J Biotechnol*, Vol. 57, No. 1-3, pp. 71-81 (1997)
- 109) Ooi T, Shinmyo A, Okada H, Murao S, Kawaguchi T and Arai M: “Complete nucleotide sequence of a gene coding for *Aspergillus aculeatus* cellulase (FI-CMCase)”, *Nucleic Acids Res*, Vol. 18, No. 19, 5884 (1990)

- 110) Amadioha AC: “Production of Cellulolytic Enzymes by *Rhizopus oryzae* in Culture and Rhizopus-Infected Tissues of Potato Tubers”, *Mycologia*, Vol. 85, No. 4, pp. 574-578 (1993)
- 111) Shikata S, Saeki K, Okoshi H, Yoshimatsu T, Ozaki K, Kawai S and Ito S: “Alkaline cellulases for laundry detergents: production by alkalophilic strains of bacillus and some properties of the crude enzymes”, *Agr Biol Chem Tokyo*, Vol. 54, No. 1, pp. 91-96 (1989)
- 112) Mayer F, Coughlan MP, Mori Y and Ljungdahl LG: “Macromolecular Organization of the Cellulolytic Enzyme Complex of *Clostridium thermocellum* as Revealed by Electron Microscopy”, *Appl Environ Microbiol*, Vol. 53, No. 12, pp. 2785-2792 (1987)
- 113) Watanabe H, Noda H, Tokuda G and Lo N: “A cellulase gene of termite origin”, *Nature*, Vol. 394, No. 6691, pp. 330-331 (1998)
- 114) Mandels M and Reese ET: “Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals”, *J Bacteriol*, Vol. 73, No. 2, pp. 269-278 (1957)
- 115) 小笠原 渉、志田 洋介: “比較ゲノム解析によるセルロース分解微生物「トリコデルマ・リーセイ」日本型系統樹進化の謎の解明とさらなる進化”, *化学と生物*, Vol. 50, No. 8, 592-599 (2012)
- 116) Mandels M, Weber J and Parizek R: “Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma viride*”, *Appl Microbiol*, Vol. 21, No. 1, pp. 152-154 (1971)
- 117) Montenecourt BS and Eveleigh DE: “Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production”, *Appl Environ Microbiol*, Vol. 34, No. 6, pp. 777-782 (1977)
- 118) Bailey MJ and Nevalainen KMH: “Induction, isolation and testing of stable *Trichoderma reesei* mutants with improved production of solubilizing cellulose”, *Enzyme Microb Tech*, Vol. 3, No. 2, pp. 153-157 (1981)
- 119) Peterson R and Nevalainen H: “*Trichoderma reesei* RUT-C30--thirty years of strain improvement”, *Microbiology*, Vol. 158, pp. 58-68 (2012)

- 120) Morikawa Y, Ohashi T and Okada H: "Cellulase induction by lactose in *Trichoderma reesei* PC-3-7", Appl Microbiol Biotechnol, Vol. 44, pp. 106-111 (1985)
- 121) Kawamori M, Morikawa Y, Shinsha Y, Takayama K and Takasawa S: "Preparation of Mutants Resistant to Catabolite Repression of *Trichoderma reesei*", Agr Biol Chem Tokyo, Vol 49, No. 10, pp. 2875-2879 (1985)
- 122) Porciuncula JO, Furukawa T, Mori K, Shida Y, Hirakawa H, Tashiro K, Kuhara S, Nakagawa S, Morikawa Y, Ogasawara W: "Single nucleotide polymorphism analysis of a *Trichoderma reesei* hyper-cellulolytic mutant developed in Japan", Biosci Biotechnol Biochem, Vol. 77, No. 3, pp. 534-543 (2013)
- 123) Kawamori M, Morikawa Y and Takasawa S: "Induction and production of cellulases by L-sorbose in *Trichoderma reesei*", Appl Microbiol Biotechnol, Vol. 24, No. 6, pp. 449-453 (1986)
- 124) Aden A and Foust T: "Technoeconomic analysis of the dilute sulfuric acid and enzymatic hydrolysis process for the conversion of corn stover to ethanol", Cellulose, Vol. 16, No. 4, pp. 535-545 (2009)
- 125) Schill SR: "Catalysts of efficiency" Ethanol Producer Magazine, Vol. 15, No. 3, pp. 90-95 (2009)
<http://ethanolproducer.com/articles/5348/catalysts-of-efficiency>
- 126) Du F, Wolger E, Wallace L, Liu A, Kaper T and Kelemen B: "Determination of product inhibition of CBH1, CBH2, and EG1 using a novel cellulase activity assay", Appl Biochem Biotechnol, Vol. 161, No. 1-8, pp. 313-317 (2010)
- 127) Chen M, Zhao J and Xia L: "Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars", Carbohydr Polym, Vol. 71, No. 3, pp. 411-415 (2008)
- 128) Zhang J, Zhong U, Zhao X and Wang T: "Development of the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* strain with enhanced beta-glucosidase and filter paper activity using strong artificial cellobiohydrolase 1 promoter", Bioresour technol, Vol. 101, No. 24, pp. 9815-9818 (2010)

- 129) Nogawa M, Goto M, Okada H and Morikawa Y: "L-Sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*", *Curr Genet*, Vol. 38, No. 6, pp. 329-334 (2001)
- 130) Wang B and Xia L: "High efficient expression of cellobiase gene from *Aspergillus niger* in the cells of *Trichoderma reesei*", *Bioresour technol*, Vol. 102, No. 6, pp. 4568-4572 (2011)
- 131) Stricker AR, Grosstessner-Hain K, Würleitner E and Mach RL: "Xyr1 (xylanase regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xylose metabolism in *Hypocrea jecorina*", *Eukaryot Cell*, Vol. 5, No. 12, pp. 2128-2137 (2006)
- 132) Rahman Z, Shida Y, Furukawa T, Suzuki Y, Okada H, Ogasawara W and Morikawa Y: "Application of *Trichoderma reesei* cellulase and xylanase promoters through homologous recombination for enhanced production of extracellular β -Glucosidase I", *Biosci Biotechnol Biochem*, Vol. 73, No. 5, pp.1083-1089 (2009)
- 133) Ma L, Zhang J, Zou G, Wang C, Zhou Z: "Improvement of cellulase activity in *Trichoderma reesei* by heterologous expression of a beta-glucosidase gene from *Penicillium decumbens*", *Enzyme Microb Technol*, Vol. 49, No. 4, pp. 366-371 (2011)
- 134) Eriksson T, Karlsson J and Tjerneld F: "A Model Explaining Declining Rate in Hydrolysis of Lignocellulose Substrates with Cellobiohydrolase I (Cel7A) and Endoglucanase I (Cel7B) of *Trichoderma reesei*", *Appl Biochem Biotechnol*, Vol. 101, No. 1, pp. 41-60 (2002)
- 135) Irwin DC, Spezio M, Walker LP and Wilson DB: "Activity studies of eight purified cellulases: Specificity, synergism, and binding domain effects", *Biotechnol Bioeng*, Vol. 42, No. 8, pp. 1002-1013 (1993)
- 136) Kim E, Irwin DC, Walker LP and Wilson DB: "Factorial optimization of a six-cellulase mixture", *Biotechnol Bioeng*, Vol. 58, No. 5, pp. 494-501 (1998)
- 137) Gusakov AV, Salanovich TN, Antonov AI, Ustinov BB, Okunev ON, Burlingame R, Emalfarb M, Baez M and Sinitsyn AP: "Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose", *Biotechnol Bioeng*, Vol. 97, No. 5, pp. 1028-1038 (2007)

- 138) Ghose TK: "Measurement of cellulase activities", *Pure Appl Chem*, Vol. 59, pp 257–268 (1987)
- 139) Miller GL, Blum R, Glennon WE and Burton AL: "Measurement of carboxymethylcellulase activity", *Anal Biochem*, Vol. 1, No. 2, pp. 127-132 (1960)
- 140) Deshpande MV, Eriksson KE and Pettersson LG: "An assay for selective determination of exo-1, 4-beta-glucanases in a mixture of cellulolytic enzymes", *Anal Biochem*, Vol. 138, No. 2, pp. 481-487 (1984)
- 141) Banerjee G, Car S, Scott-Craig JS, Borrusch MS and Walton JD: "Rapid optimization of enzyme mixtures for deconstruction of diverse pretreatment/biomass feedstock combinations", *Biotechnol Biofuels*, Vol. 3, No. 22 (2010)
- 142) Herpoël-Gimbert I, Margeot A, Dolla A, Jan G, Mollé D, Lignon S, Mathis H, Sigoillot JC, Monot F and Asther M: "Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains", *Biotechnol Biofuels*, Vol.1, No. 1, 18 (2008)
- 143) Rahman Z, Shida Y, Furukawa T, Suzuki Y, Okada H, Ogasawara W and Morikawa Y: "Evaluation and characterization of *Trichoderma reesei* cellulase and xylanase promoters", *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 82, No. 5, pp. 899-908 (2009)
- 144) Korotkova OG, Semenova MV, Morozova VV, Zorov IN, Sokolova LM, Bubnova TM, Okunev ON and Sinitsyn AP: "Isolation and properties of fungal beta-glucosidases", *Biochemistry (Mosc)*, Vol. 74, No. 5, pp. 569-577 (2009)
- 145) Sakamoto R, Kanamoto J, Arai M and Murao S: "Purification and physicochemical properties of three β -glucosidases from *Aspergillus aculeatus* No. F-50", *Agri Biol Chem*, Vol. 49, No. 5, pp. 1275–1281 (1985)
- 146) Barnett CC, Berka RM and Fowler T: "Cloning and amplification of the gene encoding an extracellular bold beta-glucosidase from *Trichoderma reesei*: Evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates", *Nat Biotechnol*, Vol. 9, pp. 562-567 (1991)

- 147) Walseth CS: "Occurrence of cellulose in enzymes preparations from microorganisms", TAPPI, Vol. 35, pp. 1837-1849 (1952)
- 148) Takada G, Kawaguchi G, Sumitani J and Arai M: "Expression of *Aspergillus aculeatus* No. F-50 cellobiohydrolase I (cbhI) and beta-glucosidase 1 (bgl1) genes by *Saccharomyces cerevisiae*", Biosci Biotech Biochem, Vol.62, No. 8, pp. 1615-1618 (1998)
- 149) Ogasawara W, Shida Y, Furukawa T, Shimada R, Nakagawa S, Kawamura M, Yagyu T, Kosuge A, Xu J, Nogawa M, Okada H and Morikawa Y: "Cloning, functional expression and promoter analysis of xylanase III gene from *Trichoderma reesei*", Appl Microbiol Biotechnol, Vol. 72, No. 5, pp. 995-1003 (2006)
- 150) Penttilä ME, André L, Saloheimo M, Lehtovaara P and Knowles JK.: "Expression of two *Trichoderma reesei* endoglucanases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*", Yeast, Vol.3, No. 3, pp. 175-185 (1987)
- 151) Furukawa T, Shida Y, Kitagami N, Mori K, Kato M, Kobayashi T, Okada H, Ogasawara W and Morikawa Y: "Identification of specific binding sites for XYR1, a transcriptional activator of cellulolytic and xylanolytic genes in *Trichoderma reesei*", Fungal Genet Biol, Vol. 46, No. 8, pp. 564-574 (2009)
- 152) Miller GL: "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar", Anal Chem, Vol. 31, No. 3, pp 426-428 (1956)
- 153) Bradford MM: "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", Anal Biochem, Vol. 72, No. 1-2, pp. 248-254 (1976)
- 154) Laemmli UK: "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", Nature, Vol. 227, pp. 680-685 (1970)
- 155) Harkki A, Mäntylä A, Penttilä M, Mutttilainen S, Bühler R, Suominen P, Knowles J and Nevalainen H: "Genetic engineering of *Trichoderma* to produce strains with novel cellulase profiles". Enzyme Microb Technol, Vol. 13, No. 3, pp. 227-233 (1991)
- 156) Saloheimo M and Niku-Paavola ML: "Heterologous production of a ligninolytic enzyme: Expression of the *Phlebia radiata* laccase gene in *Trichoderma reesei*", Bio/Technol, Vol. 9, pp. 987-990 (1991)

- 157) Henriksson H, Ståhlberg J, Isaksson R and Pettersson G: "The active sites of cellulases are involved in chiral recognition: a comparison of cellobiohydrolase 1 and endoglucanase 1", FEBS Lett, Vol. 390, No. 3, pp. 339-344 (1996)
- 158) Berlin A, Maximenko V, Gilkes N and Saddler J: "Optimization of Enzyme Complexes for Lignocellulose Hydrolysis", Biotechnol Bioeng, Vol. 97, No. 2, pp. 287-296 (Jun. 2007)
- 159) Yang B and Wyman CE: "BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates", Biotechnol Bioeng, Vol. 94, No. 4, pp. 611-617 (2006)
- 160) Samuel R, Foston M, Jiang N, Allison L and Ragauskas AJ: "Structural changes in switchgrass lignin and hemicelluloses during pretreatments by NMR analysis", Polym Degrad Stabil, Vol. 96, No. 11, pp. 2002-2009 (2011)
- 161) Palonen H, Tjerneld F, Zacchi G and Tenkanen M: "Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin", J Biotechnol, Vol. 107, No. 1, pp. 65-72 (2004)
- 162) Adav SS, Chao LT and Sze SK: "Quantitative secretomic analysis of *Trichoderma reesei* strains reveals enzymatic composition for lignocellulosic biomass degradation", Mol Cell Proteomics, Vol. 11, No. 7 (2012)
- 163) Kipper K, Våljamäe P and Johansson G.: "Processive action of cellobiohydrolase Cel7A from *Trichoderma reesei* is revealed as 'burst' kinetics on fluorescent polymeric model substrates", Biochem J, Vol. 385, No. 2, pp. 527-535 (2005)
- 164) Lantz SE, Goedegebuur F, Hommes R, Kaper T, Kelemen BR, Mitchinson C, Wallace L, Ståhlberg J and Larenas EA: "*Hypocrea jecorina* CEL6A protein engineering", Biotechnol Biofuels, Vol. 3, 20 (2010)
- 165) Billard H, Faraj A, Lopes Ferreira N, Menir S and Heiss-Blanquet S: "Optimization of a synthetic mixture composed of major *Trichoderma reesei* enzymes for the hydrolysis of steam-exploded wheat straw", Biotechnol Biofuels, Vol. 5, No. 1, 9 (2012)

- 166) Zhang YH: "Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries", *J Ind Microb Biotechnol*, Vol. 35, No. 5, pp. 367-375 (2008)
- 167) Elazzouzi-Hafraoui S, Nishiyama Y, Putaux JL, Heux L, Dubreuil F and Rochas C: "The shape and size distribution of crystalline nanoparticles prepared by acid hydrolysis of native cellulose", *Biomacromolecules*, Vol 9, No. 1, pp. 57-65 (2008)
- 168) Silverstein RA, Chen Y, Sharma-Shivappa RR, Boyette MD and Osborne J: "A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks", *Bioresour Technol*, Vol. 98, No. 16, pp. 3000-3011 (2006)
- 169) Rosgaard L, Pedersen S, Langston J, Akerhielm D, Cherry JR and Meyer AS: "Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated barley straw substrates", *Biotechnol Prog*, Vol. 23, No. 6, pp. 1270-1276 (2007)
- 170) Zhao Y, Wu B, Yan B and Gao P: "Mechanism of cellobiose inhibition in cellulose hydrolysis by cellobiohydrolase", *Science in China Series C*, Vol. 47, No. 1, pp. 18-24 (Jan. 2004)
- 171) Mach RL and Zeilinger S: "Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*", *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 60, No. 5, pp. 515-522 (2003)
- 172) Boisset C, Fraschini C, Schüle M, Henrissat B and Chanzy H: "Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals the endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A", *Appl Environ Microbiol*, Vol. 66, No. 4, pp. 1444-1452 (2000)
- 173) Donaldson LA, Wong KKY and Mackie KL: "Ultrastructure of steam-exploded wood", *Wood Sci Technol*, Vol. 22, No. 2, pp. 103-114 (1998)
- 174) Kabel MA, Maarel MJ, Klip G, Voragen AG and Schols HA: "Standard assays do not predict the efficiency of commercial cellulase preparations towards plant materials", *Biotechnol Bioeng*, Vol. 93, No. 1, pp. 56-63 (2006)

- 175) Okada H, Sekiya T, Yokoyama K, Tohda H, Kumagai H and Morikawa Y: "Efficient secretion of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II in *Schizosaccharomyces pombe* and characterization of its products", Appl Microbiol Biotechnol, Vol. 49, No. 3, pp. 301-308 (1998)
- 176) Okada H, Wakamatsu M, Takano Y, Nogawa M and Morikawa Y: "Expression of two *Trichoderma reesei* xylanases in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*", J Biosci Bioeng, Vol.88, No. 5, pp. 563-566 (1999)
- 177) Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, and Crocker D: "Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP)", NREL (2008)
- 178) Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V and Henrissat B: "The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics", Nucleic Acids Res, Vol. 37, No. 1, pp. 233-238 (2009)
- 179) Biely P, Vrsanska M, Tenkanen M and Kluepfel D: "Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties, J Biotechnol, Vol. 57, No. 1-3, pp. 151-166 (Sep. 1996)
- 180) Herrmann MC, Vrsanska M, Jurickova M, Hirsch J, Biely P and Kubicek CP: "The β -D-xylosidase of *Trichoderma reesei* is a multifunctional β -D-xylan xylohydrolase", Biochem J, Vol. 15, No. 321, pp. 375-381 (1997)
- 181) 独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構編: "バイオ燃料製造の有用要素技術開発事業 事業原簿" (2017)
- 182) Hirasawa H, Shioya K, Furukawa T, Tani S, Sumitani JI, Kawaguchi T, Morikawa Y, Shida Y and Ogasawara W: "Engineering of the *Trichoderma reesei* xylanase3 promoter for efficient enzyme expression", Appl Microbiol Biotechnol, Vol. 102, No. 6, pp. 2737-2752 (2018)

謝辞

本論文の主査を引き受けていただきました長岡技術科学大学教授 小笠原渉先生に厚くお礼申し上げます。

本研究の遂行にあたりご指導とご鞭撻を賜りました、長岡技術科学大学名誉教授 森川康先生ならびに一般財団法人バイオインダストリー協会つくば研究室室長 小林良則博士に心よりお礼申し上げます。

本研究の共同研究者としてご指導、ご助言、ご協力いただいた産業技術総合研究所・合成生物工学研究グループ長 宮崎健太郎先生、同バイオデザイン研究グループ長 矢迫克郎先生、長岡技術科学大学教授 岡田宏文先生、同研究員 中澤光博士、大阪府立大学教授 川口剛司先生に深く感謝いたします。

本研究に使用したエリアンサスをご提供いただきました、農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業センター上級研究員 我有満先生に感謝いたします。

研究室の皆様には研究遂行にあたり日頃より有益なご討論ご助言を戴し、感謝いたします。

本研究は NEDO の「バイオマスエネルギー先導技術研究開発」加速的先導技術開発プロジェクトにおいて実施したものである。

最後に、本論文の作成にあたり、応援し支えてくれた妻可南子に心から感謝します。

2018年度 博士論文 – 博士 (工学) –
バイオエタノール生産に資するバイオマス糖化酵素の高機能化に関する基礎的研究

長岡技術科学大学
大学院工学研究科生物統合工学専攻

– Dissertation for Doctor of Tetsushi Kawai–

A Fundamental Study on advanced functionalization of biomass saccharification enzymes that contribute to bioethanol production

Nagaoka University of Technology
Department of Integrated Bioscience and Technology