

セルロース系バイオエタノール研究

— 自前糖化酵素の構築 —

Research on Production of Cellulosic Ethanol
– Creation of Novel Saccharifying Enzyme –

光 澤 茂 信*

Shigenobu MITSUZAWA

福 浦 麻衣子**

Maiko FUKUURA

新 川 智**

Satoru SHINKAWA

要 旨

セルロース系バイオエタノール実用化にとってボトルネックの一つである糖化酵素のコスト課題の解決に向けて、使用量と生産コストの低減に向けた取組みを平行して行い、自前糖化酵素を構築した。

使用量低減取組みでは、無駄な酵素を含まないオリジナル糖化酵素ミックスを構築し、さらにその主構成成分である酵素を遺伝子工学的にアミノ酸置換することで活性向上を実現した。

生産コスト低減取組みでは、エタノール生産プロセスで使うバイオマスを炭素源として利用し、高効率な生産方法である固体培養を特徴としたオンサイト生産プロセスを利用し、それを実現できるオリジナル酵素生産麹菌株の構築に成功した。

以上二つの成果は、バイオエタノール生産における糖化酵素コストを低減する可能性を持つ新しい知見である。

ABSTRACT

The cost of saccharifying enzymes is one of the factors hindering the practical use of cellulosic bioethanol. In an attempt to address this issue, research has been conducted to create a novel saccharifying enzyme, in parallel with efforts to reduce the quantity of the enzyme used and the cost of production of the enzyme.

Reduction of the quantity of the enzyme used involved the creation of an original saccharifying enzyme mixture that did not include any unnecessary enzymes. In addition, genetic engineering techniques were applied in order to substitute an amino acid sequence in the enzyme that formed the main constituent, increasing enzyme activity.

Reduction of the cost of production of the enzyme involved utilizing the biomass employed in the ethanol production process as a carbon source, and employing an onsite enzyme production process exploiting solid-state fermentation, a high-efficiency production method. An original enzyme-producing strain of *Aspergillus oryzae* was created in order to realize this process.

The two outcomes discussed above represent new findings with the potential to reduce the cost of saccharifying enzymes for bioethanol production.

1. ま え が き

化石資源枯渇の懸念や CO₂ 排出量削減の必要性への対応の一つとして、バイオエタノールがある。可食部を利用するデンプン系バイオエタノール（第一世代）に対して、非可食部を利用するセルロース系バイオエタノール（第二世代）も実用化研究が進んでいる。糖化酵素は、セルロース系バイオマスを分解し、発酵菌がエタノール生産の原料として利用できるグルコースを生成する反応を触媒する酵素（タンパク質触媒）である。セルロースは強固な構造を持っており、分解には多量の酵素が必要である。専門メーカー

が長年研究開発を進めてきたが、従来のデンプン系バイオエタノールで使用される糖化酵素に比べて、10 倍以上のコストがかかる^{(1), (2)}。結果として、糖化酵素のコスト高が、セルロース系バイオエタノール実用化のボトルネックの一つとなっている。

そこで我々は、独自の革新的な低コストを実現しうる糖化酵素の研究開発を推進してきた。

本論文では、研究のねらい、特徴について述べると共に、構築した独自糖化酵素および糖化酵素生産菌の性能、コスト効果について説明し、研究の過程で得られた知見を述べる。

* 基礎技術研究センター

** 四輪 R&D センター

Table 1 Composition of enzyme mixture

Enzyme group	EG: Endoglucanase	CBH1: Cellobiohydrolase 1	BGL: Beta-glucosidase	EX: Endoxylanase	BX: Beta-xylosidase
Function	Cuts the surface of crystalline cellulose to create nicks	Cleaves out cellobiose at reducing end of cellulose chain	Cuts cellobiose into glucose	Cuts hemicellulose into xylooligosaccharide	Cuts xylooligosaccharide into xylose
Original organism	<i>Acremonium</i>			<i>Thermoascus</i>	<i>Thermotoga</i>
Weight percentage (%)	24	47	24	4	1

2. 研究のねらい

糖化酵素コストは、1 Lのエタノールを製造するために使用するコスト C (単位: ¥/L-エタノール) で表現するのが分かりやすい。すると酵素コストは次式のように、展開できる (Fig. 1)。

ここで、A: 酵素使用量 (g/kg-バイオマス)、B: 酵素生産単価 (¥/g-タンパク質)、D: バイオマスの糖含有率 (kg-単糖換算/kg-バイオマス)、E: 糖化率 (kg-回収/kg-元)、F: 発酵効率 (kg-エタノール/kg-糖)、G: エタノールの比重 (kg/L) である。式中、朱色背景開部分は 1 kg バイオマスから生産されるエタノール量であり、バイオマスからグルコースへの変換率 (糖化率) を含めたプロセスの必要要件と物性定数から一定値に定まる。したがって、酵素コストを下げるために可変な部分は、青色背景部分である使用量と生産単価の積であり、酵素コスト低減には、使用量と生産単価を下げる 2 方向があることが分かる。

本研究ではこの両方向に向かって、生化学的研究開発を推進した。具体的には、使用量低減を目的として、糖化酵素の触媒活性を向上させる取組みを、また、生産単価低減を目的として、酵素生産菌の生産性を向上させる取組みを行った。次章以降、それぞれの研究内容と結果を順に説明する。

$$C = \frac{\text{Enzyme cost for 1 kg biomass (¥)}}{\text{Ethanol produced from 1 kg biomass (L)}} = \frac{A \times B \times G}{D \times E \times F}$$

Fig. 1 Breakdown of enzyme cost

3. 使用量低減取組み

3.1. 自前酵素ミックスの作製

糖化酵素は、微生物 (バクテリア、カビ) が、栄養源であるバイオマスを消化するために分泌する。工業的には、こ

れらの微生物を大量培養し、糖化酵素を分離、濃縮して使用する。天然の微生物は約 30 種以上の酵素を同時に分泌しており、これらの酵素は Fig. 2 と Table 1 に示すような異なる五つの機能を持つグループに大きく分けられる。

同一グループには多種類の酵素が属するが、これは、自然界に存在する多様なバイオマス源に対応するためには、少しずつ機能が異なる酵素群が必要となるからである。しかし、工業的にバイオエタノールを生産する場合、その原料となるバイオマス種は一種類に限定することが一般的である。その場合、必要な酵素の種類数は約 30 よりも大幅に少ない可能性がある。つまり、ターゲットとするバイオマス種にとっては必要がない無駄な酵素を省くことで、使用量を低減することを狙った。本研究では、アンモニア水に浸漬することで糖化しやすいように前処理を施した稲わらをバイオマスとして実験に使用した。

無駄な酵素を省くことで、使用量を低減することができるという作業仮説を検証するために、我々はアクレモニウム、サーモアスカス、サーモトガと呼ばれる微生物 3 種が分泌する酵素群から、稲わらに特化して無駄な酵素を排除した酵素ミックスの構築に取組んだ。酵素の選別には、Fig. 3 に示すように、各酵素種分子の表面電荷の差で分離し、その後、稲わら糖化試験で有効な画分を選択する手順を繰り返すこととした。

取組みの結果、Fig. 2 と Table 1 に示す五つのグループからそれぞれ 1 種類ずつ合計 5 種類だけで構成されるミックスを作製し、さらに、構成成分の配合比を変えて稲わら

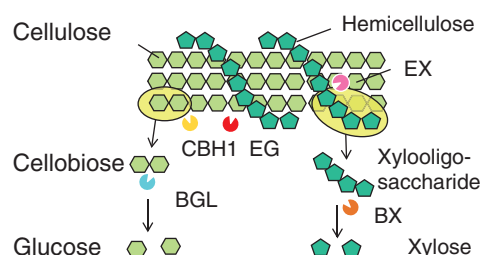


Fig. 2 Functions of components in enzyme mixture

糖化試験を行い、最適比を決定した。Fig. 4 に、実際の糖化活性を示す。バイオマス糖化活性を無駄な酵素が含まれている天然のアクレモニウムの培養液と比較した結果、約 2.5 倍に上昇したことを確認した。

以上の結果から、無駄な酵素を省くことで、使用量を低減することができるという当初の作業仮説が正しいことが証明された。

3.2. 酵素のアミノ酸置換

次に我々は、酵素ミックスを構成する酵素自体の活性を向上させることにした。その手法としてアミノ酸置換法を採用した。酵素分子は Fig. 5 に示すような一定の 3 次元構造をとるポリマからできている。このポリマはタンパク質であり、その構成モノマがアミノ酸である。酵素を構成するアミノ酸には 20 種類が存在し、その並び方で酵素の 3 次元構造や触媒活性が決定される。天然の酵素が持つアミノ酸配列の一部が他の配列に置換されることで、性能低下を及ぼす場合や活性向上に寄与する場合があることが知られている。前節で構築したオリジナル糖化酵素ミックス

スのうち重量構成比 47% と主成分である CBH1 に注目し (Table 1)、実験を行った。Fig. 5 は CBH1 の分子構造である。CBH1 はアミノ酸が 550 個つながったポリマであり、中央にトンネルのような空洞部分を持つ。この空洞部分の表面には極性や大きな疎水性を持つアミノ酸が複数存在し、それらと非共有結合を形成することでセルロース鎖がこの空洞に取り囲まれ、切断される。アミノ酸置換の可能な場合の数は 19 の 550 乗であり、全てをテストすることは実質不可能である。そこで、セルロース鎖と接触する空洞表面部分のアミノ酸 30 箇所をコンピュータモデリングで特定し、各アミノ酸をそれぞれアラニンという別のアミノ酸に置換し、活性の変化を調べた。アラニンは置換前のアミノ酸に対して、極性や大きな疎水性を持たないので、置換前のアミノ酸が活性にとって悪影響だった場合、アラニン置換することで活性が向上すると考えられる。結果として、Fig. 6 に示すように、30 個の置換体のうち置換前の天然型 (Wild Type: WT) と比較して高活性な置換体を 3 種取得できた。Fig. 6 には、活性値の上位六つを示した。置換体の表記は例えば、N062A は端から 62 番目のアスパラギン (N) をアラニン (A) に置換したものを示す。特にもっとも高活性なものは、WT の約 7.8 の活性をもつことが明らかになった。

さらに、セルロース鎖が CBH1 の空洞部分に取り込まれる過程を分子動力学シミュレーションで再現した結果、WT においてセルロース鎖と水素結合していたアミノ酸をアラニンに置換しその水素結合をなくすことで、酵素分子がセルロース鎖を内部に取り込む過程が促進されることが、この活性向上の要因であることを確認した。

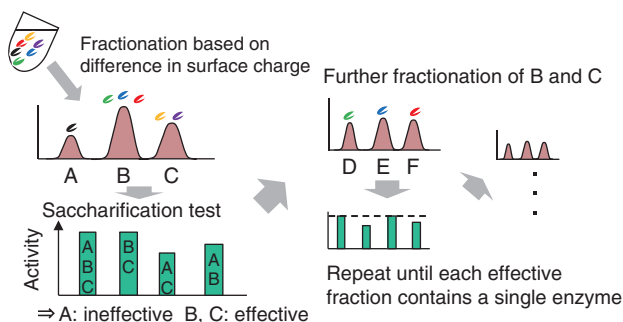


Fig. 3 Scheme of enzyme selection

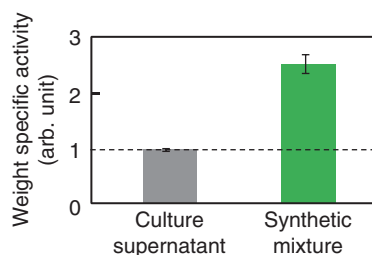


Fig. 4 Specific activity of novel enzyme mixture

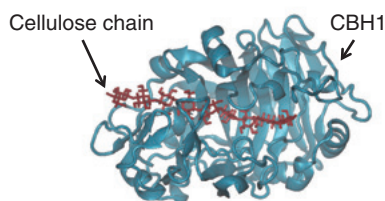


Fig. 5 Molecular structure of CBH1 and cellulose chain

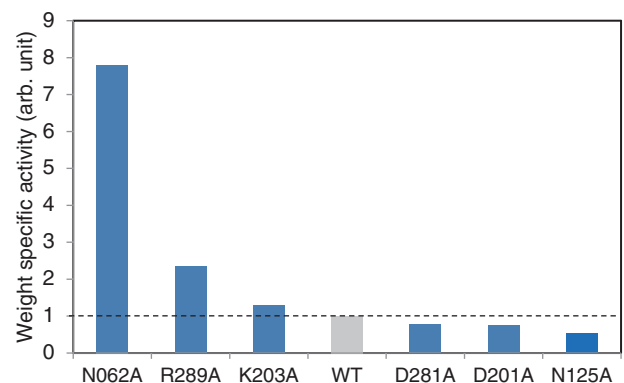


Fig. 6 Specific activity of CBH1 mutants

4. 生産単価低減取組み

4.1. オンサイト生産プロセスの考案

前章で構築したオリジナル酵素を低コストで生産するために、我々は Fig. 7 に示す生産プロセスを選択した。通常のプロセスでは、培養時に生産菌に与える栄養源として均

質糖源を用い、液体状態で培養する。これらは、均一な品質の酵素を大量生産するための技術である。我々の目的はバイオマスからエタノールを生産する途中過程で使用する酵素を生産することであり、酵素生産ラインを主プロセスと併設する（オンサイト生産）ことで、高価な均質糖源の代わりにエタノール原料のバイオマスを糖源として使用することが可能となると考えた。また、バイオマスは固体であることから、オンサイト生産には液体培養よりも、固体バイオマス上に微生物を繁殖させる固体培養が向いている。固体培養は液体培養と比較して液体培地分の培養体積が小さく済むため、装置コストが低減できる。

4.2. オリジナル酵素生産菌の構築

上記のオンサイト生産プロセスを可能にするためには、これに適した微生物が必要である。本研究では麹菌を選定した。日本では酒や味噌などの醸造食品製造において麹菌を用いた固体培養技術が成熟している。また近年、遺伝子組換えによる麹菌のゲノム改変、形質転換技術がほぼ確立され、本来麹菌が分泌しない外来酵素を生産できる⁽³⁾。

麹菌には多くの種類があり、我々はまずそのスクリーニングに着手した。麹菌 15 種類を入手し、稲わら固体培養で酵素分泌量を比較し、最も分泌量が多いものを選抜した。

次に我々は、相同組換えと呼ばれる手法で、前述の CBH1 をこの株のゲノム DNA に導入し、生産させることに成功した (Table 2)。一方、比較のために使用した他の微生物 3 種はいずれも CBH1 を生産しなかった。このことから、オリジナル生産菌として麹菌を選定したことの有効性が示された。

さらには、この麹菌株の全ゲノム配列を解読し、その情報から、酵素分泌を阻害すると考えられる遺伝子 3 種類を人為的に破壊することで、分泌量の向上を図った。結果と

Table 2 Comparison of candidates for enzyme production host

Organism	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. pastoris</i>	<i>A. oryzae</i>
Capable of phenotypic transformation?	Yes	Yes	Yes	Yes
Capable of solid-state fermentation?	No	Yes	No	Yes
Capable of CBH1 production?	No	No	No	Yes

して Fig. 8 に示すように、日本酒づくりで使われる麹菌標準株 RIB40⁽⁴⁾ に比べて 1.5 倍の CBH1 生産能を持つ株を構築することに成功した。

さらにこの株の特性を調べたところ、バイオマス成分であるリグニンから遊離するフルフラールと呼ばれる低分子が持つ微生物の生育阻害効果に対して耐性を持つことが分かった。我々が構築したオリジナル酵素生産菌のフルフラール耐性を CBH1 生産量を指標に、RIB40 と比較した結果が、Fig. 9 である。RIB40 ではフルフラール存在下で生産量が約 40% まで低下した一方、オリジナル生産菌ではほ

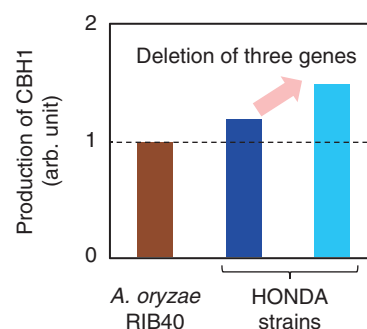


Fig. 8 Production of CBH1 by HONDA strains

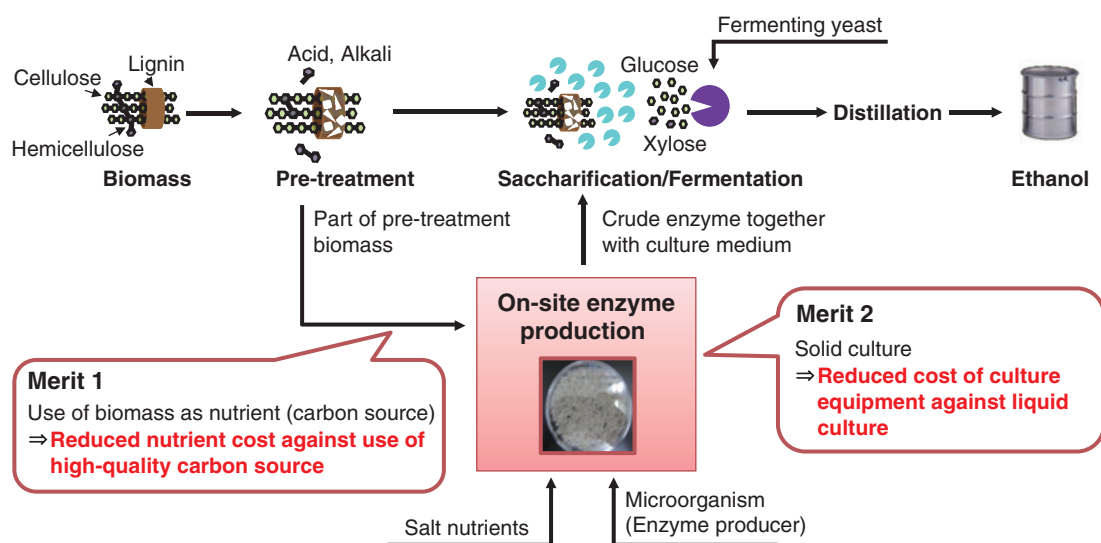


Fig. 7 Scheme of enzyme production

とんどフルフラールの影響がなかった。我々のオリジナル酵素生産菌が持つこの特徴は、バイオマス固体培養をする際にとても大きな利点であると考えられる。

フルフラール耐性の要因をゲノムおよび細胞内物質の網羅的分析 (RNA 解析, メタボローム) に基づき検討した結果, 細胞内の酸化ストレス適応能とタンパク質合成反応速度が変化した可能性があることが明らかになった。これらの結果は, 麹菌の分子生物学の観点からも貴重な知見といえる。

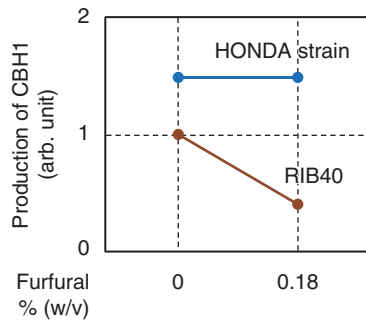


Fig. 9 Tolerance against furfural of original strain

5. コスト効果

以上, 酵素使用量および生産コスト低減の取組み内容を説明した。その中では, 取組みの評価をそれぞれ, 糖化活性と生産量を用いて行った。これらの値は高くなる程, 使用量と生産コストは下がるので, 最終的に酵素コストも下がることになる (Fig. 1)。

我々がセルロース系バイオエタノール用の一般的な市販酵素のタンパク質重量当りの性能を評価したところ, 最も高性能なものは天然のアクレモニウムの培養液とほぼ同等であった。本研究で構築した自前酵素ミックスは天然のアクレモニウムの培養液と比較して 2.5 倍の活性をもっている (Fig. 4), 単純に計算すると, 同じ糖化性能を出すのに必要な使用量は最も高性能な市販品の 1/2.5 で済む。市販品の生産菌であるトリコデルマ菌は自前生産菌と同じ糸状菌 (カビ) であることから, 仮に単価が同じとすると Fig. 1 から, 酵素コストも 1/2.5 となる。

作製した中でもっとも高活性な CBH1 のアミノ酸置換体は, WT の約 7.8 倍の活性をもつことが分かった (Fig. 6)。CBH1 WT は酵素ミックス全重量の 47% を占めるので (Table 1), 計算上は CBH1 に最も高活性なアミノ酸置換体を使うことで, 酵素ミックスの性能を保ちつつ, 必要量を 41% (= $47 - 47/7.8$) 削減でき, 上記と同様に考えるとコストも 41% 削減できるはずである。実際には最も高活性なアミノ酸置換体は麹菌での生産量が低く, 酵素ミックスの必要量低減を確認することはできていない。

オリジナル生産菌のコストに対する効果は, 生産プロセスに依存するので直接的には議論できない。しかし, 同じ生産プロセスを仮定すれば, 我々の構築した生産菌は, 食品産業界で広く使われている標準麹菌株 RIB40 に比べて 1.5 倍の CBH1 生産量を示しており, 単純に計算すると, 生産単価は 1/1.5 倍になるといえる。

以上の考察から, 本研究で構築したオリジナル酵素ミックスおよびオリジナル酵素生産菌は, バイオエタノール生産の糖化酵素のコスト低減に寄与することが期待できる。

6. まとめ

セルロース系バイオエタノールの実用化を可能にし得る革新的な低コスト酵素の実現を目指し研究を行った。結果として以下の成果を得た。

- (1) 天然の生物が生産する酵素ミックスから無駄な酵素を排除して自前ミックスを構築し, 天然のアクレモニウム培養液と比較した結果, 糖化活性が約 2.5 倍に上昇したことを確認した。さらにその主成分である CBH1 のアミノ酸配列を置換することで, 約 7.8 倍の触媒活性向上に成功した。
- (2) オンサイト生産プロセスを実現し得るバイオマス固体培養能を持つオリジナル酵素生産麹菌株を構築した。この株は, 麹菌標準株 RIB40 に比べて 1.5 倍の酵素生産能を持つ。

以上二つの結果から, バイオエタノール生産における糖化酵素コストを低減できる技術が構築できた。

本研究で活用した技術手法は, 1980 年代以降進展が目覚ましい遺伝子工学に依るところが大きい。今後は, 環境やエネルギー以外の分野においても, これらの技術の利用価値の高まりが期待される。

参考文献

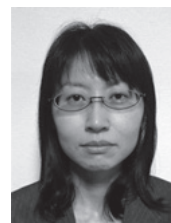
- (1) Humbird, D., Davis, R., Tao, L., Kinchin, C.: Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol, Technical Report NREL/TP-5100-47764, (2011)
- (2) McAloon, A., Taylor, F., Yee, Y.: Determining the Cost of Producing Ethanol from Corn Starch and Lignocellulosic Feedstocks, Technical Report NREL/TP-580-28893, (2000)
- (3) Toda, T., Sano, M., Honda, M., Rimoldi, O.J., Yang, Y., Yamamoto, M., Takase, K., Hirozumi, K., Kitamoto, K., Minetoki, T., Gomi, K., Machida, M.: Deletion analysis of the enolase gene (*enoA*) promoter from the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*, Current Genetics, Vol. 40, p. 260-267, (2001)

- (4) Machida, M., Asai, K., et al.: Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*, Nature, Vol. 438, p. 1157-1161, (2005)

■ 著 者 ■



光澤 茂信



福浦麻衣子



新川 智