

「藻類・水圏微生物の機能解明と制御による
バイオエネルギー創成のための基盤技術の創出」
平成23年度採択研究代表者

H24年度 実績報告

植田 充美

京都大学農学研究科・教授

藻類完全利用のための生物工学技術の集約

§1. 研究実施体制

(1)「京都大学」グループ

- ①研究代表者:植田 充美 (京都大学農学研究科、教授)
- ②研究項目
 - 1. 微生物による大型藻類の資化関連酵素の遺伝子の単離
 - 2. インジェクション装置による生育制御関連分子などを導入する操作の習熟

(2)「三重大学」グループ

- ①主たる共同研究者:柴田 敏行(三重大学大学院生物資源学研究科、講師)
- ②研究項目
 - 1. 褐藻類に特徴的な脂溶性フィトケミカルと多糖類の定量分析
 - 2. 褐藻類に対する *Clostridium cellulovorans* の網羅的遺伝子発現解析
 - 3. 褐藻類分解性細菌の探索および分解機能の網羅的解析

(3)「九州大学」グループ

- ①主たる共同研究者:川口 栄男 (九州大学農学研究院、教授)
- ②研究項目
 - 1. アラメ属・カジメ属褐藻類の採取と分類
 - 2. ホンダワラ科褐藻類の分類と資源調査
 - 3. 東アジア・東南アジア地域での未利用大型海藻資源開発

(4)「早稲田大学」グループ

①主たる共同研究者:モリ テツシ (早稲田大学理工学術院、助教)

②研究項目

1. 藻類リファイナリー酵素遺伝子分離源の確保とメタゲノムライブラリーの構築
2. 藻類完全利用に向けた沿岸大型藻類選定および構成成分分析

(5)「大阪大学」グループ

①主たる共同研究者:吉川 裕之 (大阪大学工学研究科、助教)

②研究項目

1. ナノ構造電極の開発
2. 燃料電池作製

§2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

京都大学グループ

(1) 昨年度選定した大型藻類の養殖クロメ(天草産)を微粉碎処理したものを原料として、まず、我々が世界に先駆けてゲノムの完全解析をしたセルロソームをもつ *Clostridium cellulovorans* の陸上植物のソフト・ハードバイオマスのセルロースやヘミセルロースを完全分解・糖化能力^{1,2,4,5,6)}を用いて原料を資化させたところ、生育がみられた。スーパープロテオーム解析により、大型藻類のセルロースやヘミセルロース類の完全分解に必要な酵素群の全遺伝子を明らかにできた。しかし、構成成分の大きな部分であるアルギン酸は資化できなかった。そこで、過去の文献調査の結果、アメリカ・カリフォルニア沖で大型藻類が全滅した記録から、微生物 *Saccharophagus degradans* の関与が判明したので、本微生物から特に、多糖アルギン酸からオリゴ糖への分解を行うエンド型リアーゼと、オリゴ糖から単糖への分解を行うエキソ型リアーゼ、さらに、その後の細胞内への取り込みに関係するトランスポーター hexuronate transporter とピルビン酸に至る4つの酵素をコードする全遺伝子の単離を試み成功した。これらの酵素遺伝子の配列確認を行い、順次、遺伝子発現実験に取り掛かっている。また、最終的にはピルビン酸に至るので、酵母がもつピルビン酸からエタノールへの発酵経路の強化にも取り組んでいる。

(2) インジェクション装置による生育制御関連分子などを導入する操作の習熟

大型藻類細胞の生育制御を研究するために、自動インジェクション装置を設置し、その操作を標準サンプルを用いて、遺伝子、タンパク質や低分子の正確な定量導入を検証し始めた³⁾。

三重大学グループ

ターゲットのバイオマスであるカジメ属褐藻類(天然クロメ、養殖クロメ、カジメ)とアラメ属褐藻類

(アラメ、サガラメ)を構成する糖質と脂溶性フィトケミカルについて定量分析を行った。糖質については、ラミナランとマンニトールの抽出と加水分解処理ならびに HPLC 分析の条件を確立した。細胞壁骨格多糖(セルロース、ヘミセルロース)、細胞間粘質多糖(アルギン酸、フコイダン)、貯蔵多糖(ラミナラン)、糖アルコール(マンニトール)をそれぞれ定量した。アルギン酸については、構成糖であるマンヌロン酸(M)とグルロン酸(G)の比率(M/G 比)も併せて測定した。脂溶性フィトケミカルの解析では、フコキサンチンをターゲットとし、抽出法と HPLC 分析の条件を確立した。さらに当該褐藻類における含量も測定した。解析したすべてのデータを集積し、成分別の用途も含めて結果を全てのグループへ提示した。海藻粉末とフィトケミカル抽出後の残渣は、各グループへ提供した。褐藻類分解性細菌の探索については、海洋環境中から新規な細菌の分離を試みた。前年度に確立した培養条件を用いて、特にアルギン酸分解性を有する細菌の網羅的取得に成功した。また、アルギン酸分解酵素遺伝子の単離を行い、京都・早稲田大学グループへ提供した。

九州大学グループ

(1) アラメ属、カジメ属を含むコンブ目褐藻類の採取と分類

福岡市周辺 2 地点におけるアラメの資源量調査を三重大チームと共同で行った。さらに、九州西岸(特に鹿児島県長島周辺)でのアントクメの資源量調査を研究参加者である鹿児島大・寺田准教授と共同で行った。また、クロメ材料の確保のため、三重大チームが主体となって熊本県天草地域での漁業者と打合せを行い、養殖クロメ材料を確保することに成功した。

(2) ホンダワラ科藻類の分類と資源調査

福岡市周辺に生育するホンダワラ科褐藻類の種数を調べた。その結果、現在 19 種が確実に生育することを確認できた。

(3) 東アジア・東南アジア地域での未利用大型海藻資源開発

研究参加者である鹿児島大・寺田准教授、お茶の水大・瀧田准教授とタイ国アンダマン海南部沿岸域での海藻資源調査をおこなった。

早稲田大学グループ

(1) 藻類リファイナリー酵素遺伝子分離源の確保とメタゲノムライブラリーの構築

① 海藻摂食無脊椎動物の腸内細菌の確保とメタゲノム取得

褐藻類である *Ecklonia cava* (カジメ) を餌に絞り、海藻摂食無脊椎動物、*Turbo cornutus* (サザエ) や *Dolabella auricularia* (タツナミガイ) に 30 日間給餌させた。海藻給餌前後で糞便や腸内物を採取し、メタゲノムを獲得した。作成したライブラリーからアルギン酸分解酵素であるアルギン酸リアーゼの遺伝子を保有するクローン、3 つが確認された。

② 海藻表面に付着している海藻分解共生細菌および遊性従属栄養海洋細菌確保の確保とメタゲノム取得

12 種類の海藻(褐藻、紅藻、緑藻を問わず)から海藻分解細菌の単離培養を試みた。更に、海藻に限らず、サザエやタツナミガイの糞便や腸内物、また、海底の砂や堆積物からも、分解細菌

の資源として用いた。*Rhodobacter*、*Vibrio*および*Alteromonas*属に分類された。今後は、これらの生産菌のアルギン酸分解能を解析し、活性の高い、かつ単糖まで分解可能な酵素の探索を行う予定である。

(2) 藻類完全利用に向けた沿岸大型藻類選定および構成成分分析

三重大学の協力を得て、標的となるリファイナリー酵素を海藻の成分を多く占めているアルギン酸の分解酵素、アルギン酸リアーゼに目標を決定した。

大阪大学グループ

(1) ナノ構造電極の開発

前年度に引き続き、貴金属ナノ粒子を、高密度にカーボンナノ材料表面に固定化することにより、高いエネルギー変換効率や電力密度を実現するナノ構造電極の開発に取り組んだ。酸で表面処理をしたカーボンナノチューブに粒径約 5nm の金ナノ粒子を修飾した電極により、大型褐藻類に主要成分として含まれるアルギン酸を直接電気化学酸化することに成功し、電気化学特性を詳細に解析した。また太陽光照射によるバイオマス燃料電池特性の向上を目指し、酸化チタンナノ粒子と金ナノ粒子をカーボンペーパー上に修飾した新規ナノ構造電極を作製し、光照射による酸化電流の増加を確認した⁷⁾。

(2) 燃料電池作製

電力特性を解析した結果、従来型の金電極に比べて3倍以上の電力密度が得られることが明らかとなった。電極反応によりアルギン酸のポリマー鎖が切断されていることを示した。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Akihito Nakanishi, Kouichi Kuroda, Mitsuyoshi Ueda, “Direct fermentation of newspaper after laccase-treatment using yeast codisplaying endoglucanase, cellobiohydrolase, and beta-glucosidase”, *Renewable Energy*, 44, 199-205 (2012) (DOI: 10.1016/j.renene.2012.01.078)
2. Akihito Nakanishi, Jungu Bae, Koutaro Fukai, Naoki Tokumoto, Kouichi Kuroda, Jun Ogawa, Sakayu Shimizu, Mitsuyoshi Ueda, “Effect of pretreatment of hydrothermally processed rice straw with laccase-displaying yeast on ethanol fermentation”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 94(4), 939-948 (2012) (DOI: 10.1007/s00253-012-3876-8)
3. Kouichi Kuroda, Takashi Nishitani, Mitsuyoshi Ueda, “Specific adsorption of tungstate by cell surface display of the newly designed ModE mutant”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 96(1), 153-159 (2012) (DOI: 10.1007/s00253-012-4069-1)

4. Hironobu Morisaka, Kazuma Matsui, Yohei Tatsukami, Kouichi Kuroda, Hideo Miyake, Yutaka Tamaru, Mitsuyoshi Ueda, "Profile of native cellulosomal proteins of *Clostridium cellulovorans* adapted to various carbon sources", AMB Express, 2, e37, (2012) (DOI: 10.1186/2191-0855-2-37)
5. Akihito Nakanishi, Jungu Bae, Kouichi Kuroda, Mitsuyoshi Ueda, "Construction of a novel selection system for endoglucanases exhibiting carbohydrate-binding modules optimized for biomass using yeast cell-surface engineering". AMB Express, 2, 56 (2012) (DOI: 10.1186/2191-0855-2-56)
6. Miki Ota, Hiroshi Sakuragi, Hironobu Morisaka, Kouichi Kuroda, Hideo Miyake, Yutaka Tamaru, Mitsuyoshi Ueda, "Display of *Clostridium cellulovorans* xylose isomerase on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae* and its direct application to xylose fermentation", Biotechnol. Progress, in press (DOI: 10.1002/btpr.1700)
7. Le Quynh Hoa, Mun'delanji C. Vestergaard, Hiroyuki Yoshikawa, Masato Saito, Eiichi Tamiya, "Enhancing catalytic performance of Pt-based electrodes with a noncovalent interaction-induced functionalized carbon nanotube-grafted matrix", J. Materials Chem., 22, 14705-14714 (2012) (DOI: 10.1039/C2JM32600K)
8. Le Q. Hoa, Hiroyuki Yoshikawa, Masato Saito, Eiichi Tamiya, "Study of co-assembled conducting polymers for enhanced ethanol electro-oxidation reaction". MRS Proceedings, 1446 (2012) (DOI: 10.1557/opl.2012.916)