

氏 名	アブ サレ アフマッド ABU SALEH AHMED
学位(専攻分野)	博 士 (エネルギー科学)
学 位 記 番 号	エ ネ 博 第 154 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	エ ネ ル ギ ー 科 学 研 究 科 エ ネ ル ギ ー 社 会 ・ 環 境 科 学 専 攻
学位論文題目	New Approach of Highly Efficient Fermentation Process for Bio-ethanol from Woody Biomass (木質バイオマスからの高効率バイオエタノール発酵プロセスの開発研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 牧 野 圭 祐 教 授 吉 川 暹 助 教 授 小 瀧 努

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、更なる有効利用が望まれている木質バイオマスのバイオエタノールへの高効率変換に関して行った研究の成果を纏めたものであり、以下の4章からなっている。

第1章は序論で、バイオマスに関する概説、バイオマスを燃料として利用する場合の可能性・課題、バイオマス由来の燃料としてのバイオエタノールに関する研究の現状、さらには発酵によるバイオエタノール生産に関する問題点などに関して詳細を纏めている。

第2章では、木質バイオマス由来の糖のうち、主要五炭糖の一つであるキシロースの高効率エタノール発酵に関する研究の結果を纏めている。エタノール耐性に優れ培養技術の確立されている酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) はエタノール生産能は優れているが、五炭糖を炭素源として用いる能力がない。他のキシロース代謝酵母 *Pichia stipitis* のキシロース還元酵素 (xylose reductase: XR) およびキシリトール脱水素酵素 (xylitol dehydrogenase: XDH) 遺伝子を導入した形質転換酵母は、キシロース代謝能を獲得するが、エタノール生産能は実用化に耐えうるものではない。その原因の一つとして、XR と XDH の補酵素依存性の違いによる細胞内酸化還元環境のアンバランスが指摘されてきた。前者は両補酵素とも利用できるのに対し後者は NAD⁺ 依存性を示す。この問題解決のために、本研究は、タンパク質工学的手法により補酵素依存性を変異させた新規 NADP⁺ 依存型 XDH 変異体を酵母 *S. cerevisiae* に形質導入することにより、高効率キシロース—エタノール変換組換え酵母の創出を試みたものである。12種類の変異 XDH および野生型の XR を形質導入した遺伝子組換え酵母を作成し、それぞれの組換え酵母において、XDH および XR の酵素活性および、キシロース—エタノール変換効率を測定し、XDH および XR とも酵母内で有為に酵素活性を発現していることを明らかにしている。それらの組換え酵母のエタノール発酵能を測定し、ARSdR と名付けた4つのアミノ酸を変異させほぼ完全に NADP⁺ 依存性となった XDH を導入した組換え酵母が、最も高効率にキシロース—エタノール変換を行うことを明らかにしている。ARSdR 酵素を含む酵母は野生型 XDH を含む酵母に比べて、約3倍の変換能を示した。さらに、今まで問題となっていた中間物質であるキシリトールの排出に関しても、キシリトールがほとんど排出されないことを明らかにしている。

第3章では、タンパク質工学的に補酵素依存性を変異させた XR および野生型 XDH を酵母に形質導入し、それぞれの組換え酵母において、XDH および XR の酵素活性およびキシロース—エタノール変換効率を測定し、酵素活性に関しては、XDH および XR とも酵母内で有為に発現していることを明らかにした。キシロース—エタノール変換効率を測定したところ、R276H と名付けたタンパク質工学的にほぼ完全に NADH 依存性となった XR を含む組換え酵母について、野生型の酵素を含む組換え酵母よりエタノール生産効率が若干向上することを明らかにしたが、第2章で明らかにした NADP⁺ 依存性 XDH を用いた場合ほどの高効率化は得られなかった。この現象の原因を考察するために、これらの組換え酵母における NAD⁺, NADH, NADP⁺ および NADPH の細胞内濃度を測定し、これらの組換え酵母のうち最もキシロース—エタノール変換効率のよかった酵母 (ARSdR を含む酵母) では、NAD⁺/NADH の比、NADP⁺/NADPH の比が野生型の酵母とほ

は同様の比に保たれていたのに対し、野生型の XDH および XR を含む酵母および R276H を含む酵母では、これらの補酵素濃度のバランスが異なっていることを明らかにしている。この結果から、XDH および XR の補酵素要求性の違いを解消し、酸化還元バランスの乱れを解消することにより、ARSdR を含む組換え酵母ではキシロースからの効率的エタノール生産が達成されたのではないかと考察している。本研究は、組換え酵母 *S. cerevisiae* によるキシロースからのエタノール生産において、懸案であった低効率と中間物質キシリトールの蓄積とを、タンパク質工学的に補酵素依存性を変異させた酵素を用いることにより同時に解決したものであり、バイオマスからの効率的エタノール生産に大きく貢献すると考えられる。

第4章には、全体の結論が纏められている。

論文審査の結果の要旨

本論文は、木質バイオマスのバイオエタノールへ的高效率変換法開発に関するものであり、得られた主な成果は以下のとおりである。

木質バイオマスを酵母などの生物を用いて高効率にバイオエタノールに変換するためには、木質バイオマス由来の主要炭糖の一つであるキシロースをいかに効率よく変換するかが重要な課題である。酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) に他のキシロース代謝酵母 *Pichia stipitis* のキシロース還元酵素 (xylose reductase; XR) およびキシリトール脱水素酵素 (xylitol dehydrogenase; XDH) 遺伝子を導入した形質転換酵母は、キシロース代謝能を獲得する。しかしながら、XR と XDH の補酵素依存性の違いによる細胞内酸化還元環境のアンバランスにより、エタノール発酵効率は低く、また中間物質キシリトールが排出されるという問題があった。

本論文では、これらの問題を解決するために、タンパク質工学的手法により補酵素要求性を変化させた酵素を用いることにより、キシロース→エタノール高効率変換を達成した。第一に、タンパク質工学的手法により NADP⁺ 要求性にした XDH を野生型 XR とともに酵母に形質導入して作成した遺伝子組換え酵母を用い、キシロース→エタノール変換効率を大幅に改善することに成功した。また、同時に、中間物質キシリトールの排出抑制にも成功した。次に、タンパク質工学により NADH 依存性 XR を作成し、その XR を野生型 XDH とともに酵母に形質導入し、この遺伝子組換え酵母を用いた場合はエタノール変換効率改善は若干であることを明らかにした。この原因究明のために、作出した遺伝子組換え酵母の細胞内 NAD(P)⁺ および NAD(P)H レベルを測定して、高効率にキシロース→エタノール変換を行う酵母では細胞内のヌクレオチドレベルのバランスが野生型の酵母と同じように正常に保たれていることを明らかにし、細胞内の酸化還元バランスがエタノール高効率変換において重要な因子であることを明らかにしている。

以上、本研究は、木質バイオマスのバイオエタノールへの変換に関して、遺伝子工学的・生化学的手法を用いることにより、実用化にとっての重要な点である高効率化に大きな貢献を行ったと評価する。よって、本論文は博士(エネルギー科学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成19年2月15日に実施した論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。