

セルロース系バイオマスの酵素糖化の現状と将来

長岡技術科学大学工学部 生物系 森川 康

1. はじめに

セルロース系バイオマスの糖化は、現在注目されている非食糧資源からの燃料エタノール（第2世代バイオマスエタノール）生産の目的のみならず、石油資源枯渇後の地球上最大の食料原料および化学工業や発酵原料としての糖を生産するための重要な技術である。セルロース系バイオマスの糖化には、酸糖化と酵素糖化の2つの方法がある。酸糖化には濃硫酸糖化法と希硫酸糖化法があり、いずれも第2次世界大戦以前から検討され、実用に供されたこともあった。しかしながら、いずれの酸糖化法も成熟した技術で、これ以上の大幅な技術・経済性の改善が困難であり、バイオテクノロジーによる技術改善が期待できる酵素糖化法が今後の期待されるプロセスであると考えられている。酵素糖化法は、酸糖化と比べ、低温（30-50℃）で糖化できること、および過分解が起こらず収率が高いなどの利点がある。

しかし、セルロース系バイオマスの酵素糖化には、デンプン系資源の酵素糖化とは異なり、①セルロースが結晶構造を有している、②結晶セルロースをヘミセルロースやリグニンが取り囲んだ複雑な構造を形成している、③糖化の最終段階まで固液反応である（セロオリゴ糖の溶解度が低い）、④グルコース以外にヘミセルロース由来の種々の糖（キシロース、マンノース、アラビノースなど）が生成する、などの大きな問題点がある。そのため、複雑な構造のバイオマスに酵素を働かせるためには前処理（脱リグニンあるいはヘミセルロースの部分分解を中心とした処理）が必要であること、および結晶セルロースを分解するために酵素（セルラーゼ）が大量に必要であることなどの課題がある。

2. セルラーゼ

セルラーゼとはセルロースを加水分解する酵素の総称で、大きく分けると、1) 結晶セルロースの末端からセロビオースを遊離するエキソ型のセロビオヒドロラーゼ（CBH）、2) 結晶セルロースを分解できないが、非結晶セルロース（アモルファスセルロース）鎖をランダムに切断するエンド型のエンドグルカナーゼ（EG）、および3) セロビオースや短い鎖（セロオリゴ糖）の末端からグルコースを生成するエキソ型のβ-グルコシダーゼ（BGL）の3種が存在する。しかも、それぞれで非常に多種類の酵素があり、糸状菌 *Trichoderma reesei* では総計 23 種類存在することも判明している。結晶セルロースを分解する場合 CBH が活躍するが、この酵素は分解能力が非常に遅く（結晶性のため分解しにくい）、酵素糖化を実現するための最大のネックとなる。EG や BGL の分解能力はデンプン分解のα-アミラーゼやグルコアミラーゼ・α-グルコシダーゼの触媒能力とそれほど変わらない。実際のセルロース系バイオマスは結晶領域とアモルファス領域の両方を持っているため、CBH や EG が協力して分解を加速する（相乗作用を持つ）のが特徴である。しかし、このような効果を加えても、酵素糖化の実現には現状の5-10倍の能力向上が必要だと考えられる。

3. 酵素糖化の現状

セルロース系バイオマスの酵素糖化を考慮した場合は、セルラーゼ生産菌としては現状では糸状菌に限定される。その理由は、バイオマスを完全に糖化できる種々のセルラーゼやヘミセルラーゼを生産すること、およびそれらの分泌生産量が非常に多いことである。その中でも *Trichoderma reesei*（現在は有性世代が見いだされたことから *Hypocrea jecorina* と呼ばれる）は研究の歴史が長く、セルラーゼ高生産変異株が世界で造成され、野生株のゲノム配列も決定され、遺伝子組換え技術を利用した菌株改良も行われつつある。当面は *T. reesei* のセルラーゼを用いた酵素糖化を数年後には実用化していくことを目指して世界中で検討されている。米国では、2000年からDOEがNovozymes社とGenencor社に4年間で合計約40億円を提供して、セルロース系バイオマス（コーンストーバー）の希硫酸前処理物からのバイオマスエタノール生産にかかる *T. reesei* セルラーゼの酵素コストを減少させるプロジェクトを実施し、酵素糖化コストを1/20~1/30に減少させたと言われている。DOEは2008年度から4年間で約35億円の補助金（1/2）を出して、さらに改良を行うプロジェクトを発表し、最近その相手先も決

定した。また、直接的な酵素改良だけではなく、セルラーゼの相手側であるバイオマスの微細構造の解析などの基礎研究への膨大な資金投入も決定している。

4. 我々の取り組み

著者の研究グループでは、セルラーゼ高生産 *T. reesei* 変異株を使用して、セルラーゼの基礎的な研究とともに、遺伝子組換え技術を利用した高機能セルラーゼ高生産変異株の造成を目指している。

1) 個々のセルラーゼ遺伝子の異種宿主での発現

セルラーゼの機能を解明するには、基本的にはセルラーゼを生産しない異種宿主あるいは生産しない条件で、個々のセルラーゼ遺伝子を活性のある形で発現させる必要がある。そのため、*Schizosaccharomyces pombe*、*Aspergillus oryzae* および *E. coli* を用いて発現させ、現在では2種のCBH、5種のEGおよび1種のBGLを取得し、相乗効果等を検討している。

2) セルロース糖化に必要な主要酵素の最適比率

これまでの多数の研究から、CBH I、CBH II および EG I は重要であろうと考えられているが、その最適な比率は不明であり、上記1) の異種宿主発現が可能になったことから、他に必要な酵素の有無やそれぞれのバイオマスでの最適比率を決定していく予定である。

3) 個々のセルラーゼのタンパク質工学的・進化分子工学的改変

最近大腸菌での活性のある形での発現が可能になったことから、EG III の進化分子工学的改変を先行させ興味ある結果を得ているが、現在EG I や BGL を中心に取り組んでいる。

4) セルラーゼ遺伝子の誘導発現機構の解明

T. reesei では、セルラーゼ（一部のキシラナーゼを含む）は同調的に誘導生産され、それぞれの生産比率は大きく異なっている（CBH I が約半分）。最近、Xyr1 と呼ばれる転写活性化因子（*A. niger* XlnR のオルソログ）が上流配列の -GGCTAA- に結合し、全体のセルラーゼ遺伝子の発現に関わることが報告されたが、著者らは個別の転写制御因子があることや Xyr1 の結合コンセンサス配列の許容範囲が広いことなどを実験的に証明した。また、生産比率の制御に関しては未だ不明であり、今後この制御機構を明らかにして、上記の主要遺伝子の最適比率の制御等に適用させたいと考えている。

5) 高機能セルラーゼ高生産 *T. reesei* 変異株の造成

1) ~ 4) の課題を進行させながら、高機能セルラーゼ高生産 *T. reesei* 変異株の構築を試みている。現在は、上記のCBHやEG I 以外の遺伝子座に各種の酵素・タンパク質を相同組換えさせた形質転換体の造成を行っているが、今後は組み合わせや遺伝子上流配列の改変を含めた変異株を構築したいと考えている。

5. セルロース系バイオマスの酵素糖化に必要なこと

酵素糖化を考える場合は必ずセルロース系バイオマスの種類およびその前処理と連動させることが重要である。酵素糖化のための前処理として、従来から良く検討されている蒸煮爆砕法、希硫酸前処理に加えて、最近では加圧熱水やアルカリ処理（消石灰やアンモニアの利用）などが注目されている。対象バイオマスや前処理の方法により酵素糖化の効率や必要酵素が全く異なる場合が起こり、酵素糖化を行う上で、前処理法（および対象バイオマス）を考慮することは非常に重要である。例えば、結晶セルロースをアモルファス化出来れば、アミラーゼによるデンプン分解の同じように、少量の酵素で非常に早い速度で分解可能となる。

今後は①バイオマスの元の植物細胞の構造とセルラーゼの機能との相関（結合・吸着を含めて）、糸状菌のセルラーゼ各成分での比較、③セルロソームやシロアリの糖化システム、④セルラーゼの構造機能相関、⑤新規のセルラーゼ生産菌の探索およびそれらが作る新規セルラーゼの機能、⑥最近見出されている結晶セルロースを膨潤させるあるいは糖化を補助するタンパク質（植物由来のエクспанシン、*T. reesei* のスオレニンあるいはGHF61のEGタンパク質など）、などの研究が特に重要である。しかも、これらの研究をバラバラにやるのではなく、現在大きく開いた米国との差を縮めあるいは追い越すためには、日本の研究者がチームを組んで一体となっていくことが肝要と考えている。