

# 飼料稲ロールベールを用いたバイオエタノール生産と発酵液の 健全な作物が育つ土作りへの利用

堀田光生

(国立研究開発法人 農業環境技術研究所 生物生態機能研究領域)

化石資源の大量使用にともなって発生する環境汚染や地球温暖化の防止のため、また、穀物資源を化石燃料の代替物として利用することを抑えるため、我々はこれらと競合しないセルロース系バイオマスバイオ燃料（エタノール）等に効率的に変換する方法として、家畜発酵粗飼料（サイレージ）の生産過程を活用した「固体発酵法」の開発を行ってきた。収穫直後のバイオマスが含む水分と栄養分を利用して、水分が60%程度と少ない状態で、酵素と微生物の働きでバイオマスの分解とエタノール発酵を行い、エタノール回収後の残さは飼料にする方法である。

固体発酵法では、サイレージ調製（乳酸発酵）とエタノール発酵を同時に行うため、どのような形状のものを利用するか検討する必要がある。我々は円筒状に梱包した飼料草をポリエチレンフィルムでラップしてサイレージ化するロールベールラップサイロの利用を検討した。材料として飼料稲を用い、刈り取り直後にバイオマス分解酵素と乳酸菌、酵母を加えてロールベール（>300 kg/個）を作成し、通常のラップサイロと同様に、屋外に置いた状態で固体発酵試験を行った。その結果、品種や外気温に関係なくエタノール発酵が進み、試験1～3ヶ月後に最大168 L/乾物tのエタノールがロール内に蓄積した。調製後1年以上貯蔵した固体発酵産物を、マイクロ波を用いた減圧真空蒸留装置に投入して、エタノールの回収を試みた。その結果、発酵産物244 kg（総エタノール量15.8 L）より13.5 Lのエタノールに相当するエタノール水が回収された。

回収したエタノール溶液を濃縮・精製して車等の燃料に用いる場合、脱水のコストがかかるうえ、ガソリンへの混入量が3%以下に限定される。我々はバイオエタノールの燃料以外の用途として、農耕地の土壤還元消毒（低濃度エタノール土壤還元消毒法）用資材として利用の可能性に着目している。同法は、エタノールを水で2%以下の濃度に薄めて土壤が湛水状態になるまで灌水した後、農業用ポリエチレンフィルム等で土壤表面を覆い、1週間以上そのまま放置するという簡便な技術であり、農耕地の健全な土作りに利用されている。我々は固体発酵法により得られた未精製のエタノール発酵液を用いて、精製エタノールと同様に土壤還元消毒試験を行った結果、精製エタノールと同程度以上の効果が見られることを確認しており、現在、実用化に向けた研究を進めている。

# 石油資源に依存しない化成品原料としてのリシノール酸の 分裂酵母による分泌生産系の開発

植村浩

(産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門)

リシノール酸は水酸基を含む脂肪酸で様々な工業的用途があり、特に最近ではウレタン等の化成品の石油資源に依存しない原料として注目されている。従来、リシノール酸はトウゴマから搾油したひまし油を原料とするが、トウゴマの栽培地は熱帯から亜熱帯地域に限定され安定的供給が難しい、トウゴマには非常に毒性の強いタンパク質であるリシンが含まれているため労働者の作業環境が悪いなど問題点が多く、トウゴマに変わる新たな供給源が求められているが未解決である。そこで我々は学問的蓄積の多いモデル生物でリシノール酸の前駆体であるオレイン酸含量が80%以上と他の生物と比べて格段に高い分裂酵母でのリシノール酸の発酵生産を試みた。

リシノール酸は $\Delta 12$ ヒドロキシラーゼ遺伝子 (*FAH12*) の作用で、オレイン酸の12位に水酸基を導入することで合成されるが、水酸基を持つ脂肪酸は特殊でこれを合成できる生物は非常に限られている。我々はヒドロキシラーゼ遺伝子を分裂酵母に導入し、酵母の全脂肪酸の50%を超えるリシノール酸の合成に成功したが、やはりリシノール酸の生産が宿主に毒性を示し、増殖が大きく阻害された。そこで宿主の増殖阻害の改善を目的に分裂酵母 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、増殖阻害を解除する遺伝子としてフォスホオリパーゼ A2 をコードする *plg7* を見いだした。*plg7* を導入した株ではリシノール酸生産量は減少せずに、増殖はリシノール酸非生産株に近いレベルまで回復した。*plg7* を強発現した株ではリン脂質内のリシノール酸量がコントロール株に比べて減少し、遊離のリシノール酸量が増加していた。この結果より、Fah12p はリン脂質の sn-2 位に結合したオレイン酸を基質として水酸化する事が知られているが、一方 Plg7p はこの位置の脂肪酸をリン脂質から切り離す活性を持つため、この作用でリシノール酸をリン脂質から除去し、生体膜の機能阻害を解除して増殖を回復していると考えた。更にヒドロキシラーゼの活性は低温で強くなる事を見だし、低温でリシノール酸生産量を増加させた条件下で *plg7* を強発現すると遊離型のリシノール酸が高効率で細胞外へ分泌された。*plg7* を強発現させていない場合に比べて全体のリシノール酸生産量も上がり、その約半分量のリシノール酸が分泌されていた。分裂酵母は本来脂肪酸や脂質を細胞外へ分泌できないため分泌生産の発想は今まで無かったが、Plg7p リパーゼの活用により分泌生産という新たなリシノール酸の効率的な生産系開発の可能性が示された。

# 新規の抗真菌剤開発につながる出芽酵母の Mid1/Cch1 Ca<sup>2+</sup> チャネルの基礎研究

飯田秀利

(東京学芸大学 教育学部 生命科学分野)

電位作動性 Ca<sup>2+</sup> チャネルは、動物の興奮性細胞において神経伝達物質の放出、筋収縮、シグナル伝達などに重要な役割を果たしている。この Ca<sup>2+</sup> チャネルは、ポア形成  $\alpha_1$  サブユニット、 $\alpha_2/\delta$  サブユニット、 $\beta$  サブユニット、および  $\gamma$  サブユニットから成る。出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) をはじめ真菌にも、 $\beta$  サブユニットを除き、それらのホモログと推定されるタンパク質が存在する。出芽酵母では、機能上 Cch1 が  $\alpha_1$  サブユニット、Mid1 が  $\alpha_2/\delta$  サブユニット、および Ecm7 が  $\gamma$  サブユニットのホモログであると推測される。ただし、それぞれのサブユニット間で、全長にわたるアミノ酸配列上の相同性はない。

真菌の Ca<sup>2+</sup> チャネル研究は、本演者らによる出芽酵母の Mid1 (mating pheromone-induced death 1) の発見から始まった (Iida *et al.*, *MCB* **14**, 8259–8271, 1994)。それ以来世界中で広く研究がなされ、Mid1 と Cch1 の 2 つのサブユニットから成るチャネル (Mid1/Cch1 チャネル) が Ca<sup>2+</sup> 取込みの中心であること、性フェロモン、小胞体ストレス、アルカリストレス、低温ストレス、アルコールストレスなどの刺激応答に必要なこと、などが明らかにされてきた。

Mid1 は、上述のように  $\alpha_2/\delta$  サブユニットとして機能していると考えられているが、C-末端に Cys-rich 領域をもつこと、N-グリコシレーション部位をもつこと、および Mid1 分子の大部分が細胞外にあることなどの共通性があるものの一次構造上  $\alpha_2/\delta$  と相同性はない。我々は、実際に Mid1 が N-グリコシレーションを受けていること、Cys-rich 領域の 12 個の Cys 残基のうち 3 個の Cys 残基が Mid1 の機能に必要なことを示し、さらにそのうちの 1 つは Cch1 との相互作用に必要なことを示唆した。一方、Cch1 には 10 個の細胞外 Cys 残基が存在する。我々は、そのうちの 8 残基が Cch1 の機能に必要なことを示し、さらにそのうちの 2 残基が Mid1 との相互作用に関与することを示唆した。また、Mid1/Cch1 の機能制御の観点から、我々は、その活性化には polarisome タンパク質の一種である Spa2、細胞膜 H<sup>+</sup>-ATPase である Pma1 が関与することを示唆した。

一方、他の研究グループにより、病原性酵母である *Candida albicans* は MID1 または CCHI の欠失によりマウスへの病原性を失うこと、ムギ類に麦角病を引き起こす子囊菌の一種麦角菌 (*Claviceps purpurea*) は、MIDI を欠失することによりライ麦への病原性を失うことが示された。

Mid1/Cch1 チャネルの基礎研究、およびそれに基づいた Mid1 または Cch1 の活性を阻害する物質のスクリーニングは、新しい作用機序をもつ抗真菌剤の開発につながる。

# 酵母プリオン Sup35 の細胞内伝播とアミロイド線維形成機構

田口英樹

(東京工業大学 大学院生命理工学研究科 生体分子機能工学専攻)

古典的には、蛋白質というものはある特定の立体構造を形成して機能を発揮する。しかし、近年の蛋白質科学の発展により、蛋白質の中には安定な立体構造を複数取りうる場合があることがわかってきた。その典型例はプリオンである。プリオンは蛋白質性の感染因子のことであり、何らかの原因で生じた感染性の凝集蛋白質（プリオン）が自己触媒的に正常な可溶性蛋白質をプリオン状態に転換する。プリオンは規則的に重合したアミロイド様の線維となることが知られているが、プリオン凝集はどのようにできていくのだろうか、また、プリオンの伝播はどのようなメカニズムで起こるのであるだろうか。

プリオンの概念はスクレイピーや狂牛病など哺乳類の感染性神経変性疾患の感染機構を説明するための生まれてきたが、出芽酵母にもプリオンのような挙動をする蛋白質が複数あることがわかり、プリオンの概念はかなり普遍的なものとなっている。

出芽酵母で「プリオン」が見つかって、本家の哺乳類プリオンの研究をしのぐようになったのは、非常にパワフルな酵母の遺伝学を背景にしているのに間違いがない。ただ、遺伝学には分子レベルでの解析に限界があるので、私たちは「1分子」「1細胞」をキーワードとして、プリオン研究に新たな方法論を取り込んで、酵母プリオン蛋白質の伝播機構・アミロイド線維形成機構を調べている。

本発表では、酵母プリオン蛋白質の一つである Sup35 を用いた私たちの取り組みについて紹介して議論したい。

## (1) 組換え Sup35 蛋白質のアミロイド線維成長機構

全反射蛍光顕微鏡や高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）を用いて、アミロイド線維がどのようなメカニズムで形成されていくのか解析をしている。

## (2) 細胞内でのプリオン凝集体の構造と伝播機構

Sup35 がアミロイドとなって引き起こされる [PSI<sup>+</sup>] 表現型は典型的なプリオンである。[PSI<sup>+</sup>] の細胞内で Sup35 の凝集がどのようなダイナミクスで伝播していくのか。また、細胞内で Sup35 はどのような構造状態になっているのか。蛍光相関分光法 (FCS) や光子・電子相関顕微鏡法 (CLEM) などの結果を紹介する。