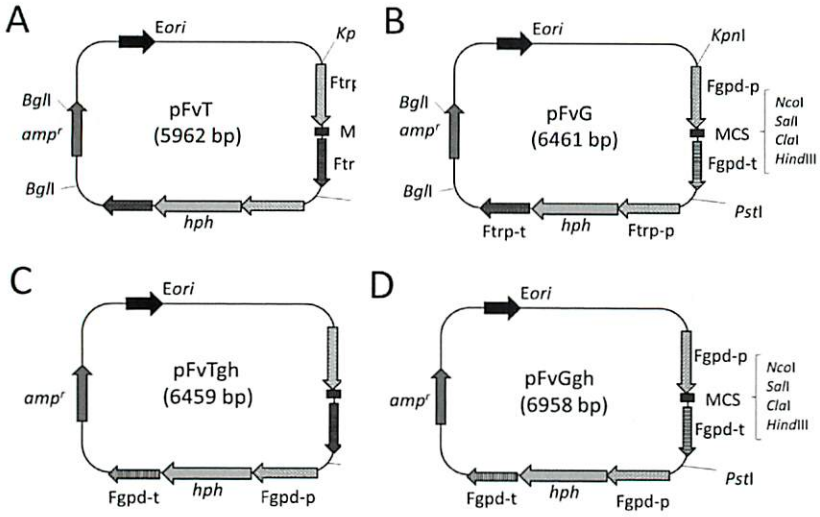
代謝工学による whole crop の直接発酵に適した担子菌の開発

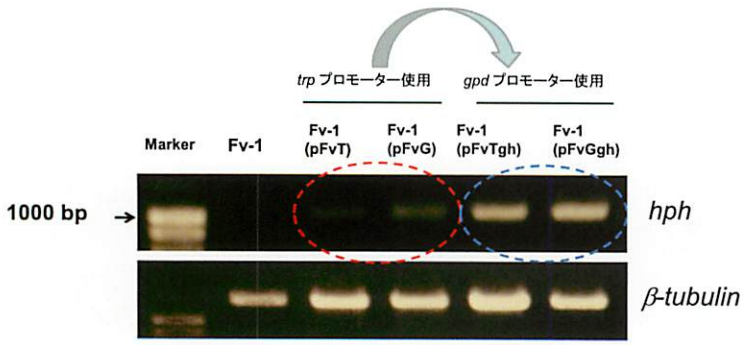
バイオマスから安価に効率よくエタノールを生産するための方法として、糖化酵素の生産、バイオマスの糖化及びエタノール発酵を単独の生物により 1 バッチで行う CBP という方法が知られています。エノキタケ Fv-1 株は糖化酵素とエタノールを共に生産可能であることから、CBP 生物として利用できる可能性があります。エノキタケをより優れた CBP 生物に改良するためには遺伝子組換えを行う必要があります。

そこで Fv-1 株の遺伝子組換え系を構築し、異種遺伝子発現をエノキタケで行うことができるようにしました。この技術を利用し、エノキタケが発酵に利用できなかったペントースからのエタノール変換率を 25 ～ 35% に改善しました。また糖化酵素を強化し、結晶性セルロースからのエタノール変換率 50% の株を作出しました。

1. Fv-1 遺伝子組換え系の構築

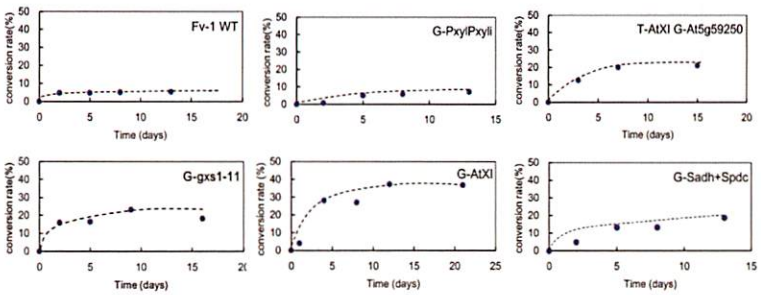


エノキタケを組換えるために必要なベクタープラスミドを作製しました。エノキタケ菌糸からプロトプラストを作製し、制限酵素を用いた方法で、形質転換体を得ることに成功しました。また、遺伝子を発現させるためのプロモーターを新たに取得し、異種遺伝子の発現量を増加させることが出来ました。



2. ペントースからのエタノール発酵能強化

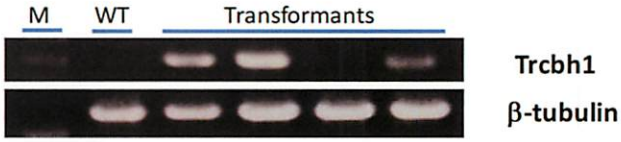
主な導入遺伝子	Description
Pxyl	*P. stipitis* xylose reductase
Pxyli	*P. stipitis* xylitol dehydrogenase
Sg3pd	*S. cerevisiae* glycerol-3-phosphate dehydrogenase
Pxylu	*P. stipitis* xylulokinase
AtXI	*A. thaliana* xylose isomerase
Sadh1	*S. cerevisiae* alcohol dehydrogenase
Spdc	*S. cerevisiae* pyruvate decarboxylase
At5g59250	*A. thaliana* sugar transporter
At5g17010	*A. thaliana* sugar transporter
Gxs1	*C. intermedia* sugar transporter



ペントース代謝関連遺伝子を複数の生物から取得し、ベクターへのクローニング後、Fv-1 株へ導入し、形質転換体を得ることに成功しました。形質転換体を培養し、ペントースからのエタノール生産能を測定した結果、*Saccharomyces*、*Arabidopsis* 等の遺伝子を導入した株で、ペントースからのエタノール変換率が 25 ～ 35% に向上したことを確認しました。

3. セルロース糖化能の強化

主要なセルラーゼ生産菌である *Trichoderma reesei*、*Phanerochaete chrysosporium* のセルラーゼ遺伝子を取得し、Fv-1 株へ導入することで、セルロース糖化能の向上した株を取得しました。これらの遺伝子は異種遺伝子発現が困難でしたが、Fv-1 の宿主 - ベクター系を使用することで、その発現に成功しました。また Fv-1 の遺伝子破壊株を作製したことで、糖化能が強化され、糖化酵素を全く添加していない場合でもエタノール変換率 50% という株を作製することができました。



Maehara T. et al. (2010) Biosci Biotechnol Biochem.74:1126-8
Maehara T. et al. (2010) Biosci Biotechnol Biochem.74:2523-5

■農研機構 食品総合研究所
前原智子、一ノ瀬仁美、金子　哲（食品バイオテクノロジー研究領域 生物機能利用ユニット）
■ C020：代謝工学による whole crop の直接発酵に適した担子菌の開発
金子　哲（食品バイオテクノロジー研究領域　生物機能利用ユニット）
■ TEL：029-838-8022
■ E-mail：sakaneko@affrc.go.jp