

【山田守】

[山田 守 \(Mamoru Yamada\) - マイポータル - researchmap](#)



・研究のキーワード

高温発酵, ストレス適応育種, エタノール生産, 2,3-ブタンジオール生産

・研究テーマ

○食品廃棄物等の効率的なグリーンエネルギーへの変換

発熱を伴う発酵は安定な発酵のために冷却が不可欠である。そこで、冷却が不要となる40-42°Cでのエタノール高温発酵の検討およびそのために不可欠な耐熱性酵母や耐熱性ザイモナス菌の開発を行うとともに、国際共同研究事業等で高温発酵のための基礎研究や、高温発酵および温度非制御発酵の実証試験を行い、それらの有用性や実用性を検証した。さらに、40-45°Cでの減圧蒸留と膜分離を組み合わせることによる無水エタノール化や、それらの技術と改質エンジンを組み合わせ、食品残渣をグリーンエネルギーに変換する技術開発を企業との共同研究として進めている。

○2,3-ブタンジオールの高温発酵

2,3-ブタンジオール (2,3-BD) は、化学物質、化粧品、殺虫剤、医薬品に使用される貴重な化合物で、さまざまな微生物によって生成されている。しかし、生産性の高い高温発酵系の開発は報告がない。そこで、耐熱性株の中から高温で2,3-BD生産能力が高い *Cronobacter sakazakii* 株を見出し、検討を進めている。グルコースやキシロースを炭素源とした場合、いずれでも既報と比べて生産速度が顕著に高いことが分かり、デンプン系やセルロース系バイオマスからの2,3-BD生産に適している。このように、本株は重要なプラットフォーム化学物質となる2,3-BDを生成する産業応用の可能性を秘めている。

○高温適応やストレス適応とそのメカニズム

微生物の高温適応の理解やより安定な高温発酵系の構築のために、高温適応育種（耐熱化）を試みたところ、ザイモナス菌や大腸菌からそれぞれ2°C高温で生育できる株を得た。さらに限界を見極めるために、耐熱化株をミューテータに改変し、それを用いて高温適応育種を耐熱化限界まで実施したところ、さらに1°C高温で生育できる株を得た。これらの結果により耐熱化限界が最大3°Cであることが示唆された。また、2種2株をそれぞれ複数並行して高温適応育種を行ったところ、同様な表現型や遺伝型をもつものがそれぞれに得られたことから高温適応において多様性が極めて低いことが分かった。これら

の結果は急激な地球温暖化が進行するとヒトの生活温度領域で棲息する微生物の生存が脅かされる可能性を暗示する。耐熱化変異株の個々の変異を親株ゲノムへ導入することによって耐熱化の原因遺伝子を特定するとともに、活性酸素種 (ROS) 消去酵素や熱ショック蛋白質等の遺伝子発現強化あるいは  $Mg^{2+}$  や  $K^+$  の添加によってもそれぞれ  $1^{\circ}C$  程度耐熱化されることが示された。

*K. marxianus* は代謝フロー切り替えによって高温での生存を可能にすることを見出した。即ち、高温でより多く蓄積する酸化ストレスを解消するために、高温では解糖系の抑制とペントースリン酸経路の促進によって NADPH の生産性を高めるとともに、グルコースが消費されるとエタノールの分解系で NADPH を供給することが判明した。

・共同研究に向けたアピールポイント

国際共同研究や企業との共同研究を積極的に進めており、その成果の一部を以下の論文や特許として報告している。

- 1.H. X. Phong, P. Klanrit, N. T. P. Dung, S. Thanonkeo, M. Yamada and P. Thanonkeo: High-temperature ethanol fermentation from pineapple waste hydrolysate and gene expression analysis of thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 12:13965 doi.org/10.1038/s41598-022-18212-w (2022)
- 2.C. Keo-oudone, K. Phommachan, O. Suliya, M. Nurcholis, S. Bounphanmy, T. Kosaka and M. Yamada: Highly efficient production of 2,3-butanediol from xylose and glucose by newly isolated thermotolerant *Cronobacter sakazakii*. *BMC Microbiology*, 22:164 doi10.1186/s12866-022-02577-z (2022)
- 3.M. Murata, S. Pattanakittivorakul, T. Manabe, S. Limtong and M. Yamada: Mutants with enhanced cellobiose-fermenting ability from thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042, which are beneficial for fermentation with cellulosic biomass. *Fuels*, 3(2), 232-244; doi10.3390/fuels3020015 (2022)
- 4.S. Pattanakittivorakul, T. Tsuzuno, T. Kosaka, M. Murata, Y. Kanesaki, H. Yoshikawa, S. Limtong and M. Yamada: Evolutionary adaptation by repetitive long-term cultivation with gradual increase of temperature for acquiring multi-stress tolerance and high ethanol productivity in *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042. *Microorganisms*, 10(4), 798; doi:10.3390/microorganisms10040798 (2022)
- 5.R. Miah, A. Siddiqa, U. Chakraborty, J. F. Tuli, N. K. Barman, A. Uddin, T. Aziz, N. Sharif, S. K. Dey, M. Yamada and A. A. Talukder :Development of high temperature simultaneous saccharification and fermentation by thermosensitive *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Scientific Reports*, 12:3630 doi10.1038/s41598-022-07589-3 (2022)
- 6.T. Kosaka, T. Tsuzuno, S. Nishida, S. Pattanakittivorakul, M. Murata, I. Miyakawa, N. Lertwattanasakul, S. Limtong and M. Yamada: Distinct metabolic flow in response to temperature in thermotolerant *Kluyveromyces marxianus*. *Applied and Environmental Microbiology*, doi: 10.1128/AEM.02006-21 (2022)
- 7.K. Phommachan, C. Keo-oudone, M. Nurcholis, N. Vongvilaisak, M. Chanhming, V. Savanhnaly, S. Bounphanmy, M. Matsutani, T. Kosaka, S. Limtong and M. Yamada: Adaptive Laboratory Evolution for Multistress Tolerance, including Fermentability at High Glucose Concentrations in Thermotolerant *Candida tropicalis*. *Energies* 2022, 15, 561. doi10.3390/en15020561 (2022)

8. I. Kumakiri, Y. Maruo, R. Kishibe, M. Murata, T. Kosaka and M. Yamada: Application of Zeolite Membranes to Dehydrate a Bio-Ethanol Solution Produced by High-Temperature Fermentation. *Fuels* 2021, 2, 533-545. doi10.3390/fuels2040031 (2021)
9. M. Murata, K. Nakamura, T. Kosaka, N. Ota, A. Osawa, R. Muro, K. Fujiyama, T. Oshima, H. Mori, B. L. Wanner and M. Yamada: Cell Lysis Directed by Sula in Response to DNA Damage in *Escherichia coli*. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 4535. doi10.3390/ijms22094535 (2021)
10. T. Kosaka, A. Nishioka, T. Sakurada, K. Miura, S. Anggarini and M. Yamada: Enhancement of thermal resistance by metal ions in the thermotolerant *Zymomonas mobilis* TISTR 548. *Frontiers in Microbiology*, doi:10.3389/fmicb.2020.00502 (2020)
11. A. Sakunda, M. Masayuki, K. Keisuke, T. Kosaka, S. Kaewta, P. Thanonkeo, and M. Yamada: Improvement of Thermotolerance of *Zymomonas mobilis* by Genes for Reactive Oxygen Species-Scavenging Enzymes and Heat-Shock Proteins. *Frontiers in Microbiology*, doi:10.3389/fmicb.2019.03073 (2020)

特許

1. 発明名称「耐熱性エタノール生産酵母及びこれを用いたエタノール生産方法」発明者：山田守, サビトリー・リムトング, 特許番号：JP 5051727, USP 8, 334, 122
2. 発明名称「耐熱性エタノール生産細菌及び耐熱性エタノール生産細菌を用いたエタノール生産方法」発明者：山田守, 特許番号：JP 5120877
3. 発明名称「耐熱性および培養ストレス耐性を備えたエタノール生産酵母を生産する方法」発明者：山田守, 高坂智之, 特願 2020-37036
4. 発明名称「溶菌耐性細胞及びその作製方法」発明者：山田守 特開：2009-142169: PCT/JP2008/003716
5. 発明名称「自己溶菌耐性細胞及びこれを用いた物質生産方法」発明者：山田守 特許第 5545562 号
6. 発明名称「セルロース原料の分解能を有する微生物、及びこれを用いたセルロース原料の分解処理」発明者：山田守, 藤元奈保子 特許 5769187
7. 発明名称「キシロース資化能及びエタノール生産能を有する酵母」発明者：山田守, スカンヤ ニチョン, ケオーウドネ チャンソム 特許 6443944 米国公開番号：US2017/0051319
8. 発明名称「耐熱性微生物の作製方法」発明者：赤田倫治, 星田尚司, 山田守, 村田正之, 高坂智之, 松下一信, 薬師寿治, ナンタポン ナラワート, 東慶直 特願 2014-159048
9. 発明名称「耐熱性および培養ストレス耐性を備えたエタノール生産酵母を生産する方法」発明者（所属）山田守, 高坂智之 特願 2020-37036
10. 発明名称「セロビオース分解能を有する酵母」発明者（所属）山田守, 村田正之, 眞鍋敏朗, 長武志 特願 2020-199376