

微生物遺伝子を利用したバイオマスの有効利用

著者	久保 さつき, 森本 兼司, 田口 秀典, 菊田 琢磨, 木村 哲哉, 粟冠 和郎, 大宮 邦雄
雑誌名	三重大学生物資源学部紀要 = The bulletin of the Faculty of Bioresources, Mie University
巻	30
ページ	115-121
発行年	2003-03-15
その他のタイトル	Application of Microbial Genes for Utilization of Biomass
URL	http://hdl.handle.net/10076/2215

微生物遺伝子を利用したバイオマスの有効利用

久保さつき¹・森本 兼司²・田口 秀典³・菊田 琢磨³・木村 哲哉³
粟冠 和郎³・大宮 邦雄^{3*}

¹鈴鹿国際大学短期大学部・²助科学技術交流財団

³三重大学生物資源学部

Application of Microbial Genes for Utilization of Biomass

Satsuki KUBO¹, Kenji MORIMOTO², Hidenori TAGUCHI³,
Takuma KIKUTA³, Tetsuya KIMURA³, Kazuo SAKKA³
and Kunio OHMIYA^{3*}

¹Suzuka International University, Junior College, 1250 Syouno-cho, Suzuka, Mie 513-8520, Japan

²Aichi Science and Technology Foundation, 2-4-7 Marunouchi, Naka-Ku, Nagoya, Aichi 460-0002, Japan

³Faculty of Bioresources, Mie University, 1515 Kamihama-cho, Tsu, Mie 514-8507, Japan

Abstract

Microbial genes encoding cellulases, xylanase, chitinases and hydrogenase were expressed in plants and anaerobic bacteria for effective degradation and conversion of unutilized fibrous biomass to some nutrients and energy compounds. In this review, it was shown that these transgenic plants and bacteria work to convert unutilized biomass to valuable materials. The discussion will expand the effective ways to utilize biomass.

Key Words: biomass, microbial genes, cellulase, chitinase, forage, hydrogen

はじめに

光合成により太陽エネルギーを蓄積している植物バイオマスは反芻動物に摂取され、それらの乳肉が食糧として人類に摂取されるという食物連鎖によりエネルギーを得て人類は生命活動を続けている。換言すれば、他の生物の「いのち」を犠牲にして人類の「いのち」は保たれていることになる。したがって人類もこの食物連鎖の環の一員であるという意味からも、生物資源を無駄なく有効に利用する必要に迫られている。しかし、利便性を追

求するあまり資源浪費型社会の定着を容認してきた先進国では、食糧を始めとする大量の資源が浪費され廃棄されている。このために、自ら作り出した廃棄物による生活環境の汚染が拡大している。しかし他方では、食料やエネルギーはその流通に偏りが生じ、不足する地域が現れている。地球上の人口がやがては60億を超えるといわれる中で、農耕面積の拡大や生産技術の改良は大きく望めそうもない。そのために、従来の発想に基づいた食糧の大幅な増産は期待しにくい状況にある。エネルギー源にしても、何億年もかけて植物体を凝縮した化石燃料

2003年2月3日受理

1) 〒513-8520 鈴鹿市庄野町1250, 2) 〒460-0002 名古屋市中区丸の内2-4-7, 3) 〒514-8507 津市上浜町1515

* For correspondence (e-mail:ohmiya@bio.mie-u.ac.jp)

は近い将来に枯渇が危惧されている。

ところで、地球上に降り注がれる太陽エネルギーは 2^{14} kw/年 と計算されており、そのわずか 0.02% がバイオマスに蓄積されるに過ぎないが、バイオマスとして地球上に蓄積されている量は 10^{12} トンといわれており、その 10% が光合成により毎年生産されている。この数値は世界中の年間エネルギー消費量の 10 倍以上に相当するといわれている¹⁾。この膨大なバイオマスに含まれるエネルギーのわずか 10% が現在利用されているにすぎない。これをいかに有効利用するかが、第一の課題である食糧やエネルギー不足の解決につながると考える。

もう一つの課題である環境汚染問題はますます深刻になりつつある。いかにゴミの量を削減するか。さらにゴミの中に残留しているエネルギーをいかに回収するかという研究も地味で効率の悪い作業であるが、もはや放置できない重要な課題である²⁾。これらの問題解決に微生物機能を有効利用することが期待されている。さらに、これらの問題解決のために能力の高い微生物を探し、それらの機能を遺伝子組換えでどの程度改良していけるのか、最近の研究成果を踏まえた論議を紹介する。

未利用バイオマスの水素ガスへの微生物変換

水素ガスは重さの割にエネルギーが大きく、かつ燃焼によって炭酸ガスを作らず NOX の発生も少ないので、もっともクリーンなエネルギー物質とみなされており、このエネルギーガスを廃棄物から取り出そうとする試みが盛んになってきた。とくに家庭から出る生ゴミを微生物処理することにより、水素ガスを生産しようとする試みは経済産業省傘下の新エネルギー開発事業団 (NEDO) で国家プロジェクトとして遂行されていた [環境調和型水素製造技術研究開発 (1991-1998) 中間評価調査審議資料 (平成 7 年 4 月) 非公開]。このプロジェクトの中では、イタリアの Eni 社が生ゴミを嫌気発酵して有機酸に換える研究を委託されていた。生ゴミから生成されたこれらの有機酸を炭素源として光合成菌を培養し水素を生産する研究を日本の企業が分担していた。太陽光と廃棄物を利用する微生物とを組合せて環境調和型のエネルギー生産が提案された。この研究において、Ueno³⁾らは、*Clostridium butyricum* を用いた回分培養法で pH を 5.5 に維持した場合は約 2mol の水素が 1mol の

グルコースから生産されることを示した。これとは別に

Taguchi ら⁴⁾は他の *Clostridium* 株ではグルコースやキシロース (45g) から水素 270 mmol と 400 mmol が乾燥菌体 1 g から得られたと報告している。この菌株を使って同じ炭素源で連続培養をした Taguchi ら⁵⁾の結果では、pH 6.0、希釈率を 0.4–1.0/h に維持した場合の水素発生量はおよそ 20 mmol/l culture/h であった。基質を結晶性のアビセルや不溶性のキシランにした場合の水素発生量は上記の値よりも少し低い値 (15 および 19 mmol/g 消費基質) であった。

Evyvernie ら^{6,7)}は、エビ殻の主成分キチンを分解するバクテリアをキャンパス土壌から単離した。本菌は、高度に嫌気条件を要求する孢子形成桿状のバクテリアで、形態観察、発酵試験、16S rRNA 相同解析などの結果に基づき *Clostridium paraputrificum* M-21 と同定された。エビ殻の主成分であるキチンのほかに、キチンを構成するモノマー (N-アセチルグルコサミン) を良く資化するほか、デンプン・グルコースやセルロース性化合物も分解資化できる基質幅が比較的広い特性を持つバクテリアである。*C. paraputrificum* M-21 は 45°C、pH 6.5 で最大の増殖を示し多量のガスを生産する。N-アセチルグルコサミン (GlcNAc, 10g/l) を基質にしたときには、4–5 時間ではほぼ全量を消費し、細胞分裂時間はおよそ 30 分という高い増殖能を持っていた。生成ガスの組成は体積比で水素 : 炭酸ガス = 2 : 1 と水素ガスの含量が高かった。単糖当たりの水素生成量はほぼ 2 mol/mol GlcNAc であった。前述の *C. butyricum* と同程度の生産能力を持っており、現時点ではこれを超える水素生成能を持つ菌株は知られていない。また、以下に述べる新規なホスト・ベクター系の構築の成功により *C. paraputrificum* M-21 でのヒドロゲナーゼ遺伝子の発現強化により、水素生産能をさらに 1.8 倍高めることにも成功している⁸⁻¹⁰⁾。

嫌気性菌の形質転換

セルロースやキチンなどの難分解性バイオマスを分解してエネルギー物質を生産するためには嫌気性菌のバイオマス分解能が律速要因となる。このため嫌気性菌に分解酵素遺伝子を組込み発現量を増すことによりその可溶化速度を高めることができる。このためのホスト・ベクター系の開発が Bannam と Rood¹¹⁾ により行われた。

Rood らは *Clostridium perfringens* をホストとするためにまず pUC18 のクローニングサイトを含む *C. perfringens*-*Escherichia coli* のシャトルベクターを構築し、これを電気穿孔法で *C. perfringens* に導入した¹²⁾。彼らによって構築されたベクター pJIR751 を用いて *C. paraputrificum* M-21 の形質転換が試みられている (Morimoto ら 未発表)。*C. paraputrificum* M-21 はキチン (1%) を資化するのに 5 日間を要するが、N-アセチルグルコサミンの場合は 5 時間で消費することができる。この事実からも、不溶性高分子を低分子化することが本微生物の水素生産の律速になっている。このため、たとえばキチン分解酵素の発現を強化することにより、水素生産を促進できると考えられた。この目的のためキチナーゼ A および B 遺伝子がまず単離された^{13,14)}。両遺伝子はそれぞれ 832 及び 831 アミノ酸をコードしており、染色体上でタンデムに存在していた。キチナーゼ B のプロモーター領域がキチナーゼ A の C-末端上に存在するという圧縮された形でコードされていた。このような遺伝子配列が高い増殖速度に貢献しているのかも知れない。両キチナーゼのアミノ酸配列における相同性は高く、いずれも糖質加水分解酵素のファミリー 18 に属する触媒領域を N-末端側に持つほか、C-末端側にはキチンに吸着できるタンパク領域 (キチン結合ドメイン) を保持していた。このドメインの存在が不溶性のキチン上に触媒ドメインを引き寄せ、見かけ上、基質濃度を高め、酵素反応速度を高めていると考えられている。両酵素の最適反応温度は 45 °C、最適 pH は 6.5 で、野生株の生育最適条件と一致していた。

上記特性を持つキチナーゼ遺伝子を *C. paraputrificum* M-21 に導入するためにまず、*C. paraputrificum* M-21 の薬剤耐性が調べられ、エリスロマイシンとクロラムフェニコールに対し野生株が非耐性であることを確認した。これらに対する耐性遺伝子を持つ大腸菌とのシャトルベクター pJIR751¹²⁾ を Rood から譲り受け、これを電気穿孔法で導入した。10⁻¹⁰ のオーダーで形質転換株が得られ、それらからプラスミドが野生株で増幅していることが確認されている。ついでこの形質転換系の有用性を確認するために、野生株が保有しないキシラナーゼ遺伝子の導入を試みた結果、*C. paraputrificum* M-21 にキシラナーゼ活性の発現が確認され、ベクターの有用性が確かめられた。

このホスト・ベクター系を使って、先にクローニングしたキチナーゼ遺伝子 A および B を同様に電気穿孔法で導入し、形質転換体を得ている¹⁰⁾。これらの形質転換体のうち、活性の高いものは合成基質 4MU-(GluNAc)₂ の分解能が野生株の 4 倍に上がっていた。さらに水素発生の代謝系の末端に位置するヒドロゲナーゼ遺伝子を野生株から単離し野生株に戻して発現させると、水素発生量がおよそ 80% も増大した。遺伝子組換えにより水素生産菌株の能力を著しく高めることに成功している。繊維性バイオマス分解能の高い菌叢として反芻胃 (ルーメン) 微生物が知られている。これらルーメン菌のセルロース分解能を高めることは反芻家畜の肥育を促進するうえで畜産経済の向上につながる。このため畜産国において、ルーメン菌のホスト・ベクター系の開発が試みられている。たとえば Hermanova ら¹⁵⁾ は、ルーメンバクテリアである *Selenomonas ruminantium* からいくつかのプラスミドを検出し、そのうち小型プラスミド pJW1 を用いて *S. ruminantium* の形質転換に成功し、嫌気性菌のホスト・ベクター系の開発に成功している。

これに先立ち、Bechet ら¹⁶⁾ は、*Prevotella ruminicola* 由来の機能不明プラスミド (9.5 kb, pRRI7) に *Bacteroides* 由来のクロラムフェニコールとエリスロマイシン耐性を持つ *E. coli* 由来のベクター (pKC71) を組み込み、新規なシャトルベクター pKBR23-1 と pKBR23-2 を構築した。両プラスミドは *Bacteriodes distasonis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides uniformis* あるいは *P. ruminicola* に接合伝達あるいは電気穿孔法で導入され、これらルーメン菌の形質転換用ホスト・ベクター系が構築された。この系の構築により、ルーメンバクテリアの遺伝子組換え研究は大きく前進した。さらに Gregg ら¹⁷⁾ は、野生の草に含まれるフルオロ酢酸の脱ハロゲン化酵素を *Moraxella* sp. から単離し、これを *Butyrivibrio fibrisolvens* のシャトルベクター pBHerm に組み込み、この構築プラスミド (pBHf) を *B. fibrisolvens* OB156 に電気穿孔法で導入した。その結果このプラスミドは 500 世代の間は 100% ホストの中で保持されていた。脱ハロゲン化活性は 10.6 nmol fluoroacetate/min/mg protein と算出され、十分な解毒作用が組換え体の磨砕抽出液の中に検出された。増殖中の組換え体もほぼこの値に匹敵する解毒活性を示しルーメン菌の形質転換が成功し、家畜生産に貢献する結果が得られていることを示した。

複合微生物によるバイオマスからのエネルギー物質生産

純粋基質と純粋菌株を用いた純粋培養条件下での研究では、*C. paraputrificum* M-21 の組換え株はこれまでの報告に見られる水素生産能に十分勝る能力を有していることが判明した。さらに、*C. paraputrificum* M-21 が資化できる基質種の幅が広いことから、キチン質の多いカニ殻を始め、セルロース質を含む生ゴミなどを炭素源として *C. paraputrificum* M-21 を培養し、水素ガスの生産の試験に着手している。*C. paraputrificum* M-21 を種菌とした場合、これまでのような純粋培養の条件ならば、十分な水素生産性をあげるのに全く問題ない。しかし、排出される生ゴミを炭素源とする場合は多種類の基質が混在しているので、純粋菌だけでは発酵能力が悪い。したがって、生ゴミなどを処理する場合は、水素生産効率のよい新しい菌叢の探索が必要となる。Ueno ら¹⁰⁾ は炭素源としてセルロース粉末を用い、活性汚泥から耐熱性の水素生成菌叢を集積培養した。この菌叢を回分培養あるいは制御培養した場合には 2.0 mol/mol-hexose の水素が生成され、酢酸、エタノールおよび酪酸が生成された。この菌叢を構成している菌株を 16S rDNA の V3 領域を PCR で増幅し変性濃度勾配ゲル電気泳動法で調べ、64 株の菌種を検出し 9 グループに分類できることを明らかにした。単離株の大部分は耐熱性の *Clostridium/Bacillus* subphylum で G+C の低いグラム陽性菌に分類されている。中でも *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* やセルロース分解性の *Clostridium thermocellum* や *Clostridium cellulosi* が検出され、これらがセルロースからの水素生産に寄与していると考えられている。さらに、Haruta ら¹¹⁾ はイネ藁を分解する菌叢を馴養し、50°C 4 日間で前処理をしないイネ藁を 60% も分解できる菌叢を取得した。この菌叢は、-80°C ~ 95°C にわたる極限の温度に 2 年以上さらしても安定な菌叢として維持されていることを確認している。このような結果に基づけば、イネ藁のような農産廃棄物を分解して炭素源とする微生物を用いれば、水素エネルギーを回収できることを示唆している。

上記のような微生物処理により十分量の水素が生産されるようになれば、現在開発が進んでいる燃料電池に供給して電気に変換することができる。

水素の生合成にかかる代謝系を見ると等モルの酢酸が

生成される。この物質は培養液の pH を低下させる上に、水素の収率を低下させる。酢酸をメタン生成菌に資化させてメタンに変換し、エネルギーを回収する試みも真剣に検討されている。

これらの微生物による農産廃棄物や生ゴミを始めとする未利用資源からのエネルギー回収は将来的には、各家庭で行い得るような簡便小型なシステムとする必要がある。そうすれば、処理すべき原材料に輸送のコストをかけることなく、発生する場所で減量しエネルギーを回収する、そんな小型のシステムの開発が期待されている。

微生物遺伝子の導入によるバイオマスの分解促進

植物繊維は、地球上で最も豊富に存在するバイオマスであり、毎年約千億トンもの量が光合成により無機物から有機物に再生産されている。これらに蓄えられている総エネルギー量は 6 億 4 千万トンの石油に相当すると考えられているが、そのうちのほとんどが未利用のまま野ざらしにされている。この難溶性植物繊維を主な栄養源としている反芻家畜は、しかし、これら植物繊維を分解する酵素を自ら生成する能力は備えておらず、反芻家畜の第一胃（ルーメン）に定着している絶対嫌気性ルーメン微生物の植物繊維分解能に依存していることは先にも触れた。したがって、ルーメン内に定着している微生物が植物繊維を分解発酵し反芻家畜への栄養源供給の役目を果たしている。これに対し、反芻家畜はこれら微生物のために栄養源となる植物繊維を供給し微生物増殖の最適温度や高嫌気条件等の微生物増殖環境を提供している。このような共生関係により反芻家畜とルーメン微生物との共存共栄関係が保たれている。このため、反芻家畜へのエネルギー源の供給は、ルーメン微生物によるセルロース分解速度に支配されることになる。したがって、ルーメン微生物による植物繊維の分解を促進すれば、反芻家畜への栄養供給が促進され、植物繊維だけを給餌しても濃厚飼料なみの乳肉生産性を確保できることになる。これが実現すれば、飼料にかかるコストを削減でき、濃厚飼料に含まれる穀類、大豆やトウモロコシなどのデンプン質類を人類の食糧に回すことができ、食糧需給を緩和できる。このような観かたをすれば、近い将来人類が遭遇するであろう食糧問題の解決に植物繊維質の分解研究の成果が大いに貢献するであろう。

ほ乳類には何故か植物繊維分解酵素が備わっていないことは前にも述べた。このため植物繊維の可溶化を促進するには、ルーメン微生物が分解しやすい植物を育種することも一方法と考えられる。そこで、植物体内で微生物遺伝子を発現させ、セルラーゼやキシラナーゼを植物細胞中に生産させれば、細胞が壊された時にこれら酵素が繊維質分解を促進することが予想される。この発想は自己消化能を高めた植物を育てることになり、バイオマスの有効利用につながる。この研究例として、まずタバコにルーメン微生物 *Ruminococcus albus* 由来のセルラーゼ遺伝子をアグロバクテリウム法で導入した Kawazu らの報告²⁰⁾がある。この方法で得られた組換えタバコは活性化状態のセルラーゼを細胞内可溶性タンパク質の約 0.1% 蓄積していた。

この組換えタバコの育種実験例に基づいて、日本で栽培量の多いイネにこれら繊維分解酵素をコードする *Clostridium stercorarium* のキシラナーゼ遺伝子が同様の方法で導入されている(木村ら、未発表)。この研究においてはカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターやアクチンプロモーターが用いられている。いずれのプロモーターも植物体の葉、茎、子実などの部位を選ばずに、発現する特性をもつが、その発現量は 35S プロモーターに比べて、アクチンプロモーターを用いた時の方が高かった。

この組換えイネは、対照区のイネと比較して同程度の速さで生育した。この組換えイネの葉をナイロンメッシュの袋に入れて、ヤギの反芻胃に直接投与して、2日後にこれを取り出し、その重量減少を測定した結果、組換えイネの方がわずかではあったが重量減少が速く、したがって消化されやすくなっていると判定されている(木村ら、未発表)。植物繊維分解酵素の遺伝子導入の結果細胞内に蓄積されたキシラナーゼが、分解可溶化に貢献したことになる。

Saloheimo ら²¹⁾は植物細胞壁に存在する伸長因子(expansin)をセルロース分解性カビである *Trichoderma reesei* から見つけている。この遺伝子がコードするタンパク質 swollenin は細胞壁構成多糖類を加水分解する作用は持たないが、多糖類間に形成されている水素結合を切断し壁に緩みをもたらす細胞の伸長や細胞壁の分解酵素作用を促進する機能を持つ。この遺伝子を *Aspergillus niger* や酵母で発現させ、木綿繊維やろ紙の引っ張り強

度を弱めることを確認している。この遺伝子はバイオマスを酵素分解する際の前処理的機能を持っていることになり、バイオマス利用に貢献すると考えられている。

Abdeev ら²²⁾は *Clostridium thermocellum* のセルラーゼ CelE (endo-beta-1, 4-glucanase) の N-末端を欠失修飾しても酵素特性には変わらないことを報告し、この修飾酵素を植物で発現させ植物内におけるセルラーゼの役割を研究しようとする発想を持っている。また、Dai ら²³⁾は、*Acidothermus cellulolyticus* の endoglucanase E1 遺伝子を葉で特異的に発現するルビスコプロモーター (tomato RbcS-3C) の下でタバコ細胞のクロロプラストに蓄積発現させた。タバコで葉の全可溶性タンパク質の 1.35% 量が E1 という高い発現を示した。この酵素は最適温度は 81°C、pH は 5.25 であった。新鮮な葉の中で EI 活性は安定に認められ、葉の可溶性タンパク質量を著しく増加させたことから、葉の組織の分解にも貢献していると考えている。この組換え植物は光合成速度も野生株と変わらず正常に生育した。クロロプラストは加水分解酵素を蓄積するのによい場所であることも確認している。この成果もバイオマスの利用に役立つと考えている。

Nuutila ら²⁴⁾は、カビの耐熱性セルラーゼ遺伝子 *eglI* を大麦 (Kymppi と Golden Promise) に発現させた。形質転換種子における発現酵素量は可溶性タンパク質の 0.025% であった。この酵素の発現した種子から調製した麦芽汁の粘度は対照試料のそれに比べ著しく低下しており、したがって麦芽汁に含まれる可溶性の β グルカン含量も著しく減少していたことから、耐熱性セルラーゼをビール麦に発現させると、ビールのろ過が容易となり収量も高まり、産業的意味が高まることが示された。

前にも述べたように、植物繊維質の 9 割近くが未利用のまま放置されているので、これらの簡便な利用方法が開発されれば、見かけ上莫大な資源を手に入れたことになる。しかもこのバイオマスは太陽エネルギーと無機物から持続的に生産される魅力的な循環資源である。この資源を効率よく循環させるためには、微生物遺伝子の有効利用が期待される。

引用文献

1. バイオインダストリー協会編 (1991) バイオ・テク便覧 pp.328-329

2. ㈱産業技術会議編 (2003) 地球環境とリサイクル
3. UENO, Y., OTSUKA, S. and MORIMOTO, M (1996) Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflorain chemostat culture. *J. Ferment. Bioeng.* **92**: 194-197
4. TAGUCHI, F., MIZUKAMI, N., HASEGAWA, K., and SAITO-TAKI, K. (1994) Microbial conversion of arabinose and xylose to hydrogen by a newly isolated *Clostridium* sp. No.2. *Can. J. Microbiol.* **40**: 228-233.
5. TAGUCHI, F., MIZUKAMI, N., YAMADA, K., HASEGAWA, K. and SAITO-TAKI, T. (1995) Direct conversion of cellulosic materials to hydrogen by *Clostridium* sp. strain no. 2. *Enzyme Microb. Technol.* **17**: 147-150.
6. EVVYERNIE, D., YAMAZAKI, S., MORIMOTO, K., KARITA, S., KIMURA, T., SAKKA, K. and OHMIYA, K. (2000) Identification and characterization of *Clostridium paraputrificum* M-21, a chitinolytic, mesophilic and hydrogen-producing bacterium. *J. Biosci. Bioeng.* **89** (6) : 596-601.
7. EVVYERNIE, D., MORIMOTO, K., KARITA, S., KIMURA, T., SAKKA, K. and OHMIYA, K. (2001) Conversion of chitinous wastes to hydrogen gas by *Clostridium paraputrificum* M-21. *J. Biosci. Bioeng.* **91** (4) : 339-343
8. 大宮邦雄・粟冠和郎・木村哲哉・森本兼司 (2001) キチン含有廃棄物の処理方法 特願 2001-95008.
9. 大宮邦雄・粟冠和郎・木村哲哉・森本兼司 (2001) 遺伝子導入法及び組換え体 特願 2001-300114.
10. 大宮邦雄・粟冠和郎・木村哲哉・森本兼司 (2001) 遺伝子, タンパク質, 組換え体および水素生産方法 特願 2001-300572.
11. BANNAM, T.L. and ROOD, J.I. (1993) *Clostridium perfringens*-*Escherichia coli* shuttle vectors that carry single antibiotic resistance determinants. *Plasmid* **29** (3), 233-235.
12. SCOTT, P.T. and ROOD, J.I. (1989) Electroporation-mediated transformation of lysostaphin-treated *Clostridium perfringens*. *Gene* **82** (2) : 327-333.
13. MORIMOTO, K., KARITA, S., KIMURA, T., SAKKA, K. and OHMIYA, K. (1997) Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding *Clostridium paraputrificum* chitinase *chiB* and analysis of the functions of novel cadherin-like domains and a chitin-binding domain. *J. Bacteriol.* **179** (23) 7306-7314.
14. MORIMOTO, K., KARITA, S., KIMURA, T., SAKKA, K. and OHMIYA, K. (2001) Characterization of *Clostridium paraputrificum* chitinase A from a recombinant *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.* **92** (5): 466-468.
15. HERMANOVA, A., PRISTAS, P., MOLNAROVA, V., FLIEGEROVA, K., and JAVORSKY, P. (2001) Plasmids of *Selenomonas ruminantium* and development of host-vector system. *Folia Microbiol.* **46** (4) : 289-291.
16. BECHET, M., PHEULPIN, P., FLINT, H.J., MARTIN, J. and DUBOURGUIER, H. C. (1993) Transfer of hybrid plasmids based on the replicon pRR17 from *Escherichia coli* to *Bacteroides* and *Prevotella* strains. *J. Appl. Bacteriol.* **74** (5) : 542-548.
17. GREGG, K., COOPER, C. L., SCHAFER, D. J., SHARPE, H., BEARD, C. E., ALLEN, G. and XU, J. (1994) Detoxification of the plant toxin fluoroacetate by a genetically modified rumen bacterium. *Biotechnology* **12** (13): 1361-1365.
18. UENO, Y., HARUTA, S., ISHII, M. and IGARASHI, Y. (2001) Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57** (4) : 555-562.
19. HARUTA, S., CUI, Z., HUANG, Z., LI, M., ISHII, M. and IGARASHI, Y. (2002) Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59** (4-5): 529-534.
20. KAWAZU, T., SUN, T., SHIBATA, M., KIMURA, T., SAKKA, K. and OHMIYA, K. (1999) Expression of a bacterial endoglucanase gene in tobacco increases digestibility of its cell wall fibers. *J. Biosci. Bioeng.* **88** (4): 421-425
21. SALOHEIMO, M., PALOHEIMO, M., HAKOLA, S., PERE, J., SWANSON, B., NYSSONEN, E., BHATIA, A., WARD, M. and PENTTILA, M. (2002) Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *Eur. J. Biochem.* **269** (17) : 4202-4211.
22. ABDEEV, R.M., GOLDENKOVA, I.V., MUSIYCHUK, K.A. and PIRUZIAN, E.S. (2001) Exploring the properties of thermostable *Clostridium thermocellum* cellulase CelE for the purpose of its expression in plants. *Biochemistry* **66** (7) : 808-813.
23. DAI, Z., HOOKER, B.S., ANDERSON, D.B. and THOMAS, S.R. (2000) Expression of *Acidothermus cellulolyticus* endoglucanase E1 in transgenic tobacco : biochemical characteristics and physiological effects. *Transgenic Res.* **9** (1): 43-54.

24. NUUTILA, A.M., RITALA, A., SKADSEN, R.W., and MANNONEN, L. and KAUPPINEN, V. (1999) Expression of fungal thermotolerant endo-1,4-beta-glucanase in transgenic barley seeds during germination. *Plant Mol. Biol.* **41** (6) : 777-783.

要 約

人類が消化しにくい植物繊維性物質やキチン含有物質を分解して栄養源やエネルギー源物質に効率よく変換するためには、セルラーゼやキシラナーゼあるいはキチナーゼやヒドロゲナーゼなどの微生物酵素やそれらをコードする遺伝子を活用する必要がある。このため、これらの遺伝子の発現を強化した微生物や植物を育種し、これらを用いて未利用バイオマスや廃棄物を分解可溶化して飼料化したり、水素ガスなどのエネルギー物質を生産する可能性について論議した。