

令和元年9月10日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K06881

研究課題名(和文) 並行複発酵に最適なキシロース発酵性酵母創製に向けた基盤研究

研究課題名(英文) Scientific research for development of xylose-fermenting yeast suitable for simultaneous saccharification and fermentation (SSF)

研究代表者

松鹿 昭則 (MATSUSHIKA, Akinori)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・研究グループ長

研究者番号：90443225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* DMB1株を対象として、高温下でのキシロースからのエタノール変換効率を向上させるため、DMB1株の高温耐性遺伝子をスクリーニングにより単離・同定し、また代謝変動の解析によりDMB1株のキシロース発酵時の律速段階を明らかにした。さらに、DMB1株に導入するキシロース代謝酵素の改良(補酵素特異性改変や耐熱化)等を行い、高温下での効率的キシロース発酵法を開発した。以上の結果より、高温で安定に発酵できる耐熱性を備えたキシロース発酵性酵母の育種に成功し、今後のさらなる並行複発酵菌株プラットフォーム開発において貢献することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発酵生産において酵母の耐熱性が高いことは大きなメリットであるが、本研究において、耐熱性酵母 *K. marxianus* DMB1株の耐熱性や糖代謝の分子機構を解明する上でいくつかの興味深い知見が得られたことは、並行複発酵の高温条件下でのキシロース発酵を実用化展開する上で非常に重要な意義がある。また、極めて特色のある研究成果を輩出し、*K. marxianus*のエタノール等物質生産への利用に向けた展望が大きく開けたことは、キシロースから各種の燃料や有用物質を効率的に生産するための新たなプラットフォーム酵母を創出する上で非常に価値が高いと考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to improve the efficiency of xylose conversion to ethanol by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMB1 strain at high temperature, a novel gene required for thermotolerance in DMB1 was isolated and identified, and the rate-limiting step in xylose utilization was determined by metabolome analysis of DMB1. In addition, xylose metabolizing enzymes which would be introduced into DMB1 were improved (modification of coenzyme specificity and thermostabilized), and an efficient method for xylose fermentation at high temperature was newly developed.

Based on the above results, we succeeded in constructing thermotolerant xylose-fermenting *K. marxianus* strains that can be stably fermented at high temperature, and it is expected that our constructed *K. marxianus* strains contribute to further development of yeast platform strains for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) in the future.

研究分野：生物機能・バイオプロセス

キーワード：耐熱性酵母 高温耐性遺伝子 キシロース発酵 補酵素特異性改変 耐熱性酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

持続可能な低炭素社会の実現に向けて、再生可能資源であるバイオマスから燃料や化学製品を高効率かつ低コストに生産する技術の開発が進められている。原料となるバイオマスとしては、食糧生産と競合しない非可食性の木質系・草本系バイオマス（稲わらや廃材等）の活用が切望されている。しかしながら、生産コストなどの問題から原料の前処理工程に加えて、発酵工程の高効率化などが課題となっている。特に発酵工程では、キシロース発酵効率の改善や安定な高温発酵系の構築など、実用化への展開に向けて解決すべき課題が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究では、我々が独自に単離した耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* DMB1 株について、高温耐性に関与する遺伝子の単離・同定やキシロース代謝時のボトルネック反応の同定などの未だ解明されていない基礎的な問題を解決し、さらに DMB1 株を並行複発酵の最適なツールとして展開するために、DMB1 株に導入するキシロース代謝酵素群の改良（補酵素特異性改変等）を行い、高温下での効率的キシロース発酵系の開発を目指した。広葉樹や草本系バイオマスには、グルコースなどの六炭糖に加えて、酵母にとって難発酵性糖である五炭糖キシロースが多く含まれるため、これらバイオマス資源の有効利用には、高いキシロース資化能を有する酵母の開発が必須である。また、低コスト・高収率な発酵生産が期待できる糖化と発酵を同一のタンク内で行う並行複発酵（SSF: Simultaneous saccharification and fermentation）プロセスにおいては、一般的に使用される糖化酵素の至適温度が 50 前後と、通常発酵に使用される出芽酵母の生育至適温度の 30 前後の間で大きな差がある。このため、より糖化酵素の至適温度に近い 40 以上での温度で発酵可能な酵母を利用することは、糖化と発酵の至適温度のギャップを縮小し、冷却コストや糖化酵素の使用コストを低減するのに有益であることから、耐熱性酵母を利用する高温発酵技術の開発がSSFの実用化に極めて重要であると考えられている。さらに、耐熱性の高い酵母を用いることは、SSFのみならず通常の発酵プロセスにおいても、糖化から発酵の工程に移る際の冷却コスト削減につながることや、雑菌汚染のリスクを低減できることから、そのメリットは非常に大きい。以上のことから、本研究ではSSFに最適な実用酵母の開発に向けて、高温条件下でのキシロースからエタノールへの変換効率の改善や安定な高温発酵系の構築などを目的に実施した。

3. 研究の方法

本研究ではまず *K. marxianus* DMB1 株から高温耐性遺伝子の単離を試みるために、DMB1 株から抽出したゲノムDNAを切断後、ゲノム断片をマルチコピー発現ベクターに挿入してゲノムDNAライブラリーを構築した。このゲノムDNAライブラリーを *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 株に形質転換し、DMB1 株は生育できるが BY4742 株は生育が著しく低下する 41 の条件で培養し、生育が良好な高温耐性酵母からプラスミドDNAを単離した。得られたプラスミドDNAに含まれる遺伝子のうち、どの遺伝子が高温耐性の機能に寄与するかをシークエンス解析および推定遺伝子導入株を用いた 41 での培養実験により、高温耐性に寄与する遺伝子を単離・同定した。次に、DMB1 株由来の高温耐性遺伝子を BY4742 株に形質転換した株を用いて、実際の培地に含まれる可能性があり、かつ酵母の増殖に悪影響を与える各種薬剤（過酸化水素、酢酸、塩酸、塩化ナトリウム、フルフラール、エタノール）に対する耐性を調べるため、これら薬剤を含む各寒天培地における生育能を確認した。また、*K. marxianus* のキシロース発酵時の律速段階を特定するために、キャピラリー電気泳動（CE）と飛行時間型質量分析計（TOFMS）を組み合わせた CE-TOFMS を利用し、メタボローム解析を行った。そのために、すでに作成しているキシロース発酵性 *K. marxianus* 株や DMB1 株を用いて 30 および 42 で嫌氣的に培養し、これら培養酵母検体から主要代謝物質の定量値を算出した。さらに、高温域でも安定なキシロース発酵性酵母を作製するため、*K. marxianus* NBRC1777 由来の 3 種類のキシロース代謝系酵素（キシロース還元酵素 *KmXR*、キシリトール脱水素酵素 *KmXDH*、キシリロキナーゼ *KmXK*）を DMB1 株において過剰発現する遺伝子組換え酵母株（DMB5 株）を作製するとともに、*KmXDH* の補酵素結合部位における 4 つのアミノ酸残基（D201, V202, F203, H205）を他のアミノ酸に置換することで、*KmXDH* の補酵素特異性を NAD^+ 要求性から NADP^+ 要求性に改変し、この変異型 *KmXDH* を *KmXR*、*KmXK* とともに DMB1 株において過剰発現する株（DMB13 株）を作製した。DMB5 株および DMB13 株を用いて、30 および 40 で 4%グルコースおよび 2%キシロースを含む培地で嫌氣的に培養し、高温発酵能を評価した。

4. 研究成果

スクリーニングで得られた高温耐性に寄与する遺伝子の推定アミノ酸配列を基に、他の出芽酵母種とのホモロジー検索を実施したところ、30%以上の相同性を示す *S. cerevisiae* 由来のタンパク質は検出されなかった。この高温耐性遺伝子を *S. cerevisiae* BY4742 株に形質転換して高温域（41）での増殖試験を行った結果、高温耐性遺伝子発現株は対照株と比べて、OD（600 nm）値の差が最大で 2.2 倍（30 時間後）増加し、高温条件でも良好に増殖することを確認した（図 1）。また、41 での高温耐性遺伝子発現株と対照株の生存率を蛍光染色法で経時的に調べたところ、24 時間後の生存率が対照株は 70%程度に減少していたのに対し、高温耐性遺伝子発現株の生存率は 90%以上維持されていた。さらに、高温耐性遺伝子を発現することで、41 で

嫌氣的に培養することでエタノール生産性が約1.4倍向上することも確認した。これらの結果は、DMB1由来の高温耐性に寄与する遺伝子を *S. cerevisiae* 株に導入することで、高温(41℃)での生存率の大幅な改善に成功したことを示している。

次に、上記の高温耐性遺伝子が、酵母の増殖に悪影響を与える各種薬剤に対しても耐性を示すかを調べたところ、1.5mM 過酸化水素、0.3%酢酸、0.1%塩酸、2M 塩化ナトリウム、15mM フルフラール、8%エタノールを含む各寒天培地において、高温耐性遺伝子を発現する株は対照株と比較して良好な生育を示した。これらの結果から、DMB1由来の高温耐性遺伝子を *S. cerevisiae* に導入することにより、高温耐性のみならず、これらの薬剤に対する耐性も同時に付与できることが判明した。

続いて、すでに作製しているキシロース発酵性 *K. marxianus* 株や DMB1 株を用いて、CE-TOFMS によるメタボローム解析を実施し、高温キシロース発酵時にこれら *K. marxianus* 株の代謝物がどのように変動するのか調べた。その結果、他の出芽酵母株と比較して、*K. marxianus* 株ではペントースリン酸経路における複数の代謝物が増加していた一方、細胞内のアミノ酸やピルビン酸が著しく減少することが判明した。また、30℃と比べて40℃では、*K. marxianus* 株内のペントースリン酸経路における代謝物(セドヘプロース-7-リン酸やエリトロース-4-リン酸等)が増加した一方、解糖系における代謝物(ホスホエノールピルビン酸やピルビン酸等)はほとんど変化しなかった。これらの結果から、*K. marxianus* 株を用いた高温キシロース発酵の際には、ペントースリン酸経路の代謝物が蓄積して解糖系へのフラックスが低下することが示唆され、このことが高温キシロース発酵を停滞させるボトルネックの一因となっていることを突き止めた。

さらに、DMB1 株に *KmXR*、*KmXDH*、*KmXK* を導入した DMB5 株、および DMB1 株に *KmXR*、変異型 *KmXDH*、*KmXK* を導入した DMB13 株について、30℃および40℃における発酵能を比較した結果、DMB5 株と比較して DMB13 株のキシロース発酵能は顕著に増加した(図2)。DMB13 株の30℃でのキシロース消費速度(0.51 g/L/h)は、DMB5 株と比較して5.1倍増加した一方、DMB13 株の40℃でのキシロース消費速度(0.84 g/L/h)は、DMB5 株と比較して7.6倍増加した。また、DMB13 株において、40℃でのエタノール収率(0.40 g/g)は、30℃と比べて8%増加した一方、40℃でのキシリトール収率(0.16 g/g)は、30℃と比べて50%低下した。これらの結果は、DMB1 株において *K. marxianus* 由来のキシロース代謝系酵素を過剰発現することにより、40℃の高温域でも安定にキシロースを発酵する酵母株の作製に成功したことを示しており、さらに、*KmXDH* の補酵素特異性を改変することで、キシロース消費速度が顕著に向上し、副産物のキシリトール生産量を抑えてエタノール生産性を改善できることが示唆された。

以上、本研究では、高温で安定に発酵できる耐熱性を備えたキシロース発酵性酵母の育種に成功し、今後のさらなる並行複発酵菌株プラットフォーム開発において貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

High-temperature ethanol production by a series of recombinant xylose-fermenting *Kluyveromyces marxianus* strains. Suzuki, T., Hoshino, T., and Matsushika, A. *Enzyme Microb. Technol.* (査読有) 129, 109359 (2019) DOI: 10.1016/j.enzmictec.2019.109359

[学会発表](計5件)

Metabolite analysis using *Kluyveromyces marxianus* during xylose fermentation. Suzuki,

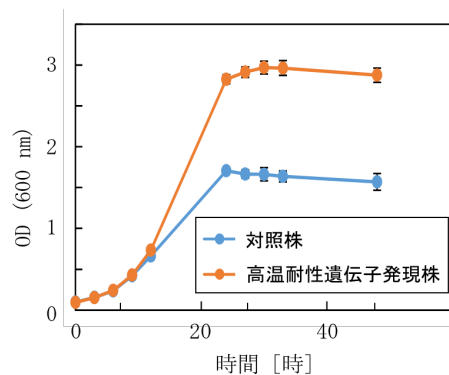


図1 高温耐性遺伝子発現株の41℃における増殖

に対する耐性も同時に付与できることが判明した。

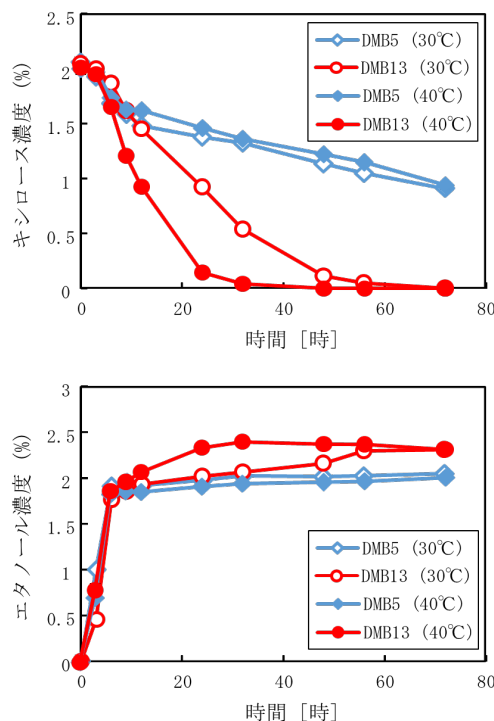


図2 変異型XDH発現株(DMB13)のキシロース発酵

T., Hoshino, T., and Matsushika, A. 第 14 回酵母国際会議 (ICY14) 2016
Kluyveromyces marxianus におけるキシリトール脱水素酵素の補酵素特異性改変による効果、鈴木俊宏、橋本智代、星野保、松鹿昭則、第 68 回日本生物工学会大会、2016
バイオマスからの有用物質発酵生産に向けた酵母の育種開発、松鹿昭則、関西バイオ医療研究会 第 3 回講演会、2017
バイオエタノール、松鹿昭則、シンポジウム「講習会：基礎からわかるバイオ燃料」、2017
Kluyveromyces marxianus DMB1 株由来の NADPH 依存性アルデヒド還元酵素の機能解析、秋田紘長、星野保、松鹿昭則、酵素工学研究会第 80 回講演会、2018

〔図書〕(計 1 件)

松鹿昭則 他、シーエムシー出版、酵母菌・麹菌・乳酸菌の産業応用展開、2018、1

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：新規高温耐性付与遺伝子とその利用法

発明者：松鹿昭則、鈴木俊宏、蒲池沙織、星野保

権利者：産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特許願 2017-201949 号 (特開 2018-078883)

出願年：平成 29 年

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松鹿 昭則 (MATSUSHIKA, akinori)

産業技術総合研究所・機能化学研究部門・研究グループ長

研究者番号：90443225

(2) 連携研究者

連携研究者氏名：鈴木 俊宏

ローマ字氏名：(SUZUKI, toshihiro)

連携研究者氏名：蒲池 沙織

ローマ字氏名：(KAMACHI, saori)

連携研究者氏名：星野 保

ローマ字氏名：(HOSHINO, tamotsu)