

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18760592

研究課題名 (和文) 酵母を用いた L-アラビノースからエタノールへの高効率変換系の確立

研究課題名 (英文) Construction of efficient conversion system from L-arabinose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*

研究代表者

渡邊 誠也 (WATANABE SEIYA)

京都大学・生存基盤科学研究ユニット・特定研究員

研究者番号：90379032

研究成果の概要：

木質系バイオマスに含まれる五炭糖である L-アラビノースのサッカロミセス酵母によるエタノール発酵を目指して、窒素固定細菌の一種から既知のものとは全く異なる L-アラビノース代謝経路の生化学的・分子生物学的・構造生物学的解析を行った。また、リグノセルロースバイオマス成分の 1 つである L-ラムノースにおいても、本経路と類似の新規経路が酵母および細菌の一部に存在することを初めて発見した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,400,000	0	1,400,000
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,600,000	270,000	3,870,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学／生物機能・バイオプロセス

キーワード：バイオマス・バイオマス・エタノール・サッカロミセス酵母・L-アラビノース・生物発酵

1. 研究開始当初の背景

酵母は潜在的な高エタノール発効能とエタノール耐性能を有し、バイオマスの分解で生じる単糖からのエタノール変換プロセスに広く用いられているが、L-アラビノース・D-キシロースなどの五炭糖を代謝できないことが大きな問題である。これを解決するために、他の生物由来の五炭糖代謝遺伝子(群)を導入した組換え酵母を用いたエタノール発酵が世界中で試みられている。しかし、現時点で L-アラビノースからの酵母を用いたエタノール変換は全く達成されておらず、その成功が待たれている。

2. 研究の目的

現在のところ酵母に導入する L-アラビノ

ース代謝経路としては、大腸菌由来に代表される L-アラビノースイソメラーゼ・リブロキナーゼ・リブロースリン酸 4-エピメラーゼの 3 つの遺伝子群か、真菌由来の 4 つの酸化・還元酵素と 1 つのリン酸化酵素からなる 5 つの遺伝子群に限定されており、いずれの経路を導入した組換え酵母はエタノールを(ほとんど)全く産生できない。本研究では、(1)酵母に導入する L-アラビノース代謝遺伝子(群)に関して、これまでほとんど知られていない新規の細菌由来の代謝経路を明らかにし、(2)それらを導入した組換え酵母による L-アラビノースからのエタノール変換を目指す。

3. 研究の方法

既知の L-アラビノース代謝経路とは異なる経路を持つと推定される細菌を材料に、L-アラビノースを炭素源として培養した菌体より酵素活性を指標に各代謝酵素を精製する。精製酵素から決定した部分的アミノ酸配列をもとに細菌ゲノム上から各酵素をコードする遺伝子をクローニングし、大腸菌を用いた組み換えタンパク質発現系を構築する。精製した組み換え酵素を用いて詳細な酵素学的性質を解析する。続いて、酵母の発現系を構築、細胞内発現の有無を確認後、L-アラビノースからのエタノール発酵を行う。

4. 研究成果

新規 L-アラビノース代謝経路には合計 5 つの新規酵素が関与していると推定された。研究初年度ではこれらの酵素をコードする全ての遺伝子の同定に成功した (図 1)。

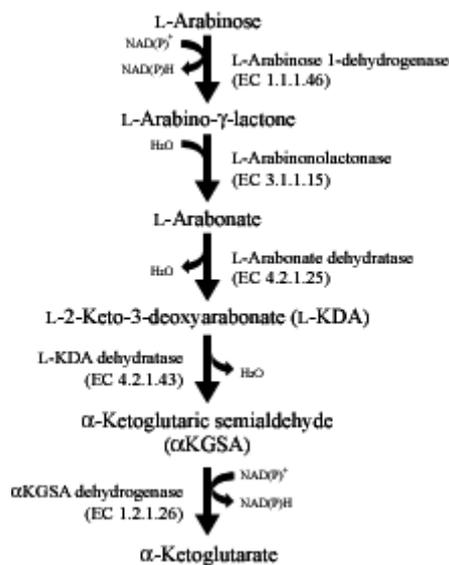
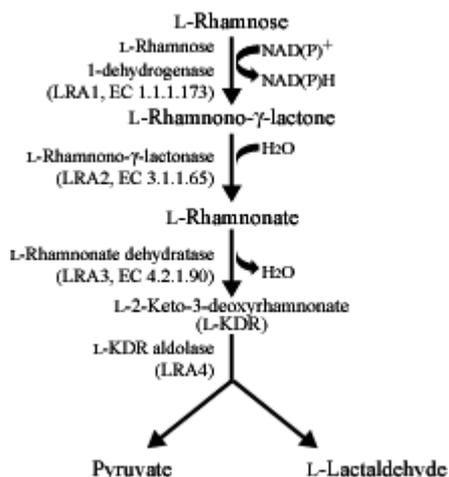


図 1

さらに、全ての遺伝子の大腸菌内での大量発現系構築にも成功、精製酵素を用いた酵素学的性質の解析により多くのユニークな知見が得られた。例えば、L-arabinonate dehydratase は活性部位に 4Fe-4S クラスタを有する金属酵素であり、部位特異的変異体による解析で、本酵素が属するタンパク質ファミリーにおいて初めて活性部位の同定した。一方 L-2-keto-3-deoxyarabonate dehydratase のアミ



ノ酸配列は、既知のアルドラーゼ酵素と類似していた。そこで本酵素の触媒機構を原子レベルで明らかにするため、X 線結晶解析によりネイティブ酵素と阻害剤との複合体の高分解能立体構造を決定。部位特異的変異体の解析結果とあわせて、本酵素のユニークな活性部位を明らかにした。

引き続き 5 つの遺伝子の酵母内での発現を試みたが、残念ながら全ての酵素で発現が確認できなかった。そこで、新規 L-アラビノース代謝経路を再度分子系統進化の面から検討、本経路が通常の Entner-Doudoroff 経路

(ED 経路)、古細菌のリン酸化を伴わない ED 経路 (npED 経路)、および一部の微生物で最近発見された nED 経路と相同な他の糖代謝経路の代謝酵素とモザイク状の相同関係があることが分かった。さらに、これら代謝遺伝子が微生物ゲノム上でしばしばクラスターとして存在することにも着目。これらを利用して微生物ゲノムデータベースを検索した結果、ビキア酵母と細菌の一種に npED 経路と相同な様式の糖代謝に関与すると推定される遺伝子クラスターを発見した。その後、各遺伝子を大腸菌で組み換え酵素として発現・精製し、基質特異性を詳細に解析した結果、本遺伝子クラスターは新規 L-ラムノース代謝経路に関わる 4 つの酵素 (LRA1~4) をコードすることが分かった (図 2)。

興味深いことに、酵母と細菌の LRA1~3 は相同であるが、L-2-keto-3-deoxyrhamnonate (L-KDR) aldolase をコードする LRA4 は全く異なるタンパク質ファミリーに属し、またその触媒機構も類似点がないことが明らかとなった。これは、2 つの L-ラムノース代謝経路が酵母と細菌で一部収斂的に進化したことを示している。

この手法は、微生物の形質が不明な場合でもゲノム情報のみから npED 経路と相同な糖代謝経路の存在を推定できるとともに、もし代謝酵素のタンパク質ファミリーが既知のものとは異なる組み合わせであれば新規な糖が基質である可能性がある。

この仮説を証明するために、LRA1~4 をプローブとして既知の微生物ゲノム配列に対して相同性検索を行い、LRA4 が無い代わりに機能未知の 2 つの遺伝子を含む遺伝子クラスターを細菌の一種に見出した。大腸菌で発現・精製した組み換え酵素を用いた基質特異性解析の結果、本遺伝子クラスターは L-ラムノース代謝経路に関与する一方、中間代謝物である L-KDR はアルドール開裂ではなく NAD⁺ 依存性脱水素酵素と加水分解酵素によって最終的にピルビン酸と乳酸を生じる図 2 とは一部

異なるさらに新規な経路であることが明らかとなった (図3)。

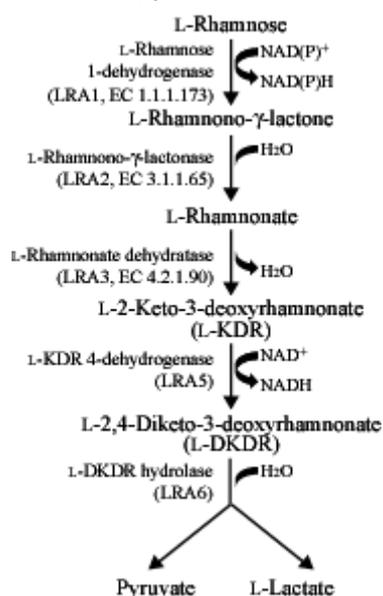


図 3

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件)

- ① Watanabe, S. and Makino, K. (2009) Novel modified version of non-phosphorylated sugar metabolism: an alternative L-rhamnose pathway of *Sphingomonas* sp. *FEBS Journal* **276** (6) 1554-1567.
- ② Watanabe, S., Saimura, M. and Makino, K. (2008) Eukaryotic and bacterial gene clusters related to an alternative pathway of non-phosphorylated L-rhamnose metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **283** (29) 20372-20382.
- ③ Watanabe, S., Piyanart, S. and Makino, K. (2008) Metabolic fate of L-lactaldehyde derived from an alternative L-rhamnose pathway. *FEBS Journal* **275** (20) 5139-5149.
- ④ Sato, Y., Watanabe, S., Yamaoka, N. and Takada, Y. (2008) Gene cloning of cold-adapted isocitrate lyase from a psychrophilic bacterium, *Colwellia psychrerythraea*, and analysis of amino acid residues involved in cold adaptation of this enzyme. *Extremophiles* **12** (1) 107-117.
- ⑤ Matsushika, A., Watanabe, S., Kodaki, T., Makino, K. and Sawayama, S. (2008) Bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing xylose reductase, NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase, and xylulokinase. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **105** (3) 296-299.
- ⑥ Matsushika, A., Watanabe, S., Kodaki, T., Makino, K., Inoue, H., Murakami, K. and Sawayama, S. (2008) Expression of protein engineered NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **81** (2) 243-255.
- ⑦ Watanabe, S., Yamada, M., Ohtsu, I. and Makino, K. (2007) α-Ketoglutaric semialdehyde dehydrogenase isozymes involved in metabolic pathways of D-glucarate, D-galactarate and hydroxy-L-proline: molecular and metabolic convergent evolution. *Journal of Biological Chemistry* **282** (9) 6685-6695.
- ⑧ Watanabe, S., Saleh, A.A., Pack, S.P., Annaluru, N., Kodaki, T. and Makino, K. (2007) Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein engineered NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase. *Journal of Biotechnology* **130** (3) 316-319.
- ⑨ Watanabe, S., Saleh, A.A., Pack, S.P., Annaluru, N., Kodaki, T. and Makino, K. (2007) Protein engineering of xylose reductase from *Pichia stipitis* for improved NADH-specificity and the efficient ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **153** (9) 3045-3055.
- ⑩ Watanabe, S., Pack, S.P., Saleh, A.A., Pack, S.P., Annaluru, N., Kodaki, T. and Makino, K. (2007) The Positive effect of the decreased NADPH-preferring activity of xylose reductase from *Pichia stipitis* on the ethanol production using xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **71** (5) 1365-1369.
- ⑪ Annaluru, N., Watanabe, S., Pack, S.P., Saleh, A.A., Kodaki, T., and Makino, K. (2007) Thermostabilization of *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase by mutation of structural zinc binding loop. *Journal of Biotechnology* **129** (4) 717-722.
- ⑫ Shimada, N., Mikami, B., Watanabe, S., Makino, K. (2007) Preliminary crystallographic analysis of L-2-keto-3-deoxyarabonate dehydratase involved in an alternative bacterial pathway of L-arabinose metabolism. *Acta Crystallographica* **F63** (5) 393-395.
- ⑬ Devarayapalli, K.C., Pack, S.P., Kamisetty, N.K., Nonogawa, M., Watanabe, S., Kodaki, T. and Makino, K. (2007) Base sequence- and T_m-dependent DNA oligomer separation by open tubular capillary columns carrying

- complementary DNA oligomers as probes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **388** (4) 919-928.
- ⑭ Kamisetty, N.K., Pack, S.P., Nonogawa, M., Devarayapalli, K.C., Watanabe, S., Kodaki, T. and Makino, K. (2007) Efficient preparation of amine-modified oligodeoxynucleotide using modified H-phosphonate chemistry for DNA microarray fabrication. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387** (6) 2027-2035.
- ⑮ Watanabe, S., Kodaki, T. and Makino, K. (2006) Cloning, expression and characterization of bacterial L-arabinose 1-dehydrogenase involved in an alternative pathway of L-arabinose metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **281** (5) 2612-2623.
- ⑯ Watanabe, S., Kodaki, T. and Makino, K. (2006) A novel α -ketoglutaric semialdehyde dehydrogenase: evolutionary insight into an alternative pathway of bacterial L-arabinose metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **281** (39) 28876-28888.
- ⑰ Watanabe, S., Shimada, N., Tajima, K., Kodaki, T. and Makino, K. (2006) Identification and characterization of L-arabonate dehydratase, L-2-keto-3-deoxyarabonate dehydratase and L-arabinolactonase involved in an alternative pathway of L-arabinose metabolism: novel evolutionary insight into sugar metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **281** (44) 33521-33536.
- ⑱ Saleh, A.A., Watanabe, S., Annaluru, N., Kodaki, T. and Makino, K. (2006) Construction of various mutants of xylose metabolizing enzymes for efficient conversion of biomass to ethanol. *Nucleic Acids Symposium Series* **50**, 279-280.
- ⑲ Annaluru, N., Watanabe, S., Saleh, A.A., Kodaki, T., and Makino, K. (2006) Site-directed mutagenesis of a yeast gene for improvement of enzyme thermostability. *Nucleic Acids Symposium Series* **50**, 281-282.
- [学会発表] (計 23 件)
- ① 学会名 : 第 60 回日本生物工学会大会
開催地 : 東北学院大学(仙台)
年月日 : 2008 年 8 月 27~29 日
発表者 : 渡辺誠也
題目 : タンパク質工学を用いたキシロース発酵性サッカロミセス酵母の育種
- ② 学会名 : 30th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals
開催地 : ニューオリンズ
年月日 : 2008 年 5 月 4~7 日
- 発表者 : Matsushika, A., Watanabe, S., Kodaki, T., Makino, K. and Sawayama, S.
題目 : Bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing xylose reductase, NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase, and xylulokinase.
- ③ 学会名 : 2008 年度農芸化学会年会
開催地 : 名城大学(名古屋)
年月日 : 2008 年 3 月 26~29 日
発表者 : 松鹿昭則、渡辺誠也、小瀧努、牧野圭祐、井上宏之、村上克治、澤山茂樹
題目 : 改変型キシリトール脱水素酵素を導入した酵母を用いたキシロースからのエタノール生産
- ④ 学会名 : 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会
開催地 : パシフィコ横浜(横浜)
年月日 : 2007 年 12 月 11~15 日
発表者 : 嶋田直子、三上文三、渡辺誠也、小瀧努、牧野圭祐
題目 : 新規アラビノース代謝経路に関する L-2-ケト-3-デオキシアラボネート脱水酵素の結晶構造解析
- ⑤ 学会名 : 日本結晶学会 2007 年度年会
開催地 : 東京
年月日 : 2007 年 12 月 1~2 日
発表者 : 嶋田直子、三上文三、渡辺誠也、小瀧努、牧野圭祐
題目 : 新規 L-アラビノース代謝経路に関する L-2-keto-3-deoxyarabonate 脱水酵素の X 線構造解析
- ⑥ 学会名 : 第 59 回日本生物工学会大会
開催地 : 広島大学(広島)
年月日 : 2007 年 9 月 25~27 日
発表者 : 松鹿昭則、渡辺誠也、小瀧努、牧野圭祐、井上宏之、村上克治、澤山茂樹
題目 : 改変型酵素を導入した酵母によるキシロースからのエタノール生産
- ⑦ 学会名 : 酵素化学ミニシンポジウム
開催地 : 京都大学(京都)
年月日 : 2007 年 9 月 10 日
発表者 : 渡辺誠也、小瀧努、牧野圭祐
題目 : 脱水素酵素の補酵素特異性改変と安定化戦略
- ⑧ 学会名 : Core university program joint seminar between Seoul national university and Kyoto university ~Research and development for environmentally clean renewable energy production system~
開催地 : 京都大学(京都)
年月日 : 2007 年 7 月 20 日
発表者 : Watanabe, S., Kodaki, T. and Makino, K.
題目 : Highly Efficient Bioethanol

- Fermentation from Woody Biomass.
- ⑨ 学会名：第10回真核微生物交流会
開催地：酒類総合研究所(広島)
年月日：2007年6月22日
発表者：渡辺誠也
題目：酵母の糖代謝経路の新展開～バイオエタノール生産への活用から新規代謝経路の発見まで～
- ⑩ 学会名：分子生物学会 第7回春季シンポジウム
開催地：淡路島
年月日：2007年4月22～24日
発表者：渡辺誠也、牧野圭祐
題目：細菌由来の新規なL-アラビノース代謝経路
- ⑪ 学会名：第33回核酸化学シンポジウム
開催地：大阪市
年月日：2006年11月20～22日
発表者：Annaluru, N., Watanabe, S., Saleh, A. A., Kodaki, T. and Makino, K.
題目：Improvement of thermostability of *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase by protein engineering.
- ⑫ 学会名：第33回核酸化学シンポジウム
開催地：大阪市
年月日：2006年11月20～22日
発表者：Saleh, A. A., Watanabe, S., Annaluru, N., Kodaki, T. and Makino, K.
題目：New approach for conversion of biomass to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*.
- ⑬ 学会名：5大学連携21COE合同国際シンポジウム
開催地：東京
年月日：2006年10月5～8日
発表者：Watanabe, S., Saleh, A. A., Annaluru, N., Shimada, N., Kodaki, T. and Makino, K.
題目：Development of highly efficient fermentation process for bioethanol from biomass based on novel protein engineering approach.
- ⑭ 学会名：The 3rd International Symposium on Sustainable Energy System
開催地：京都大学
年月日：2006年9月30日～10月1日
発表者：Watanabe, S., Shimada, N., Kodaki, T. and Makino, K.
題目：A novel bacterial L-arabinose pathway: cloning, expression and characterization of the metabolic genes.
- ⑮ 学会名：The 3rd International Symposium on Sustainable Energy System
開催地：京都大学
年月日：2006年9月30日～10月1日
発表者：Annaluru, N., Watanabe, S., Saleh, A. A., Kodaki, T. and Makino, K.
題目：Construction of thermostable xylitol dehydrogenase, a key enzyme for efficient bioethanol production from xylose.
- ⑯ 学会名：The 3rd International Symposium on Sustainable Energy System
開催地：京都大学
年月日：2006年9月30日～10月1日
発表者：Saleh, A. A., Watanabe, S., Annaluru, N., Kodaki, T. and Makino, K.
題目：New approach for conversion of biomass to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*.
- ⑰ 学会名：The 3rd International Symposium on Sustainable Energy System
開催地：京都大学
年月日：2006年9月30日～10月1日
発表者：Shimada, N., Watanabe, S., Shimada, N., Kodaki, T. and Makino, K.
題目：A novel L-arabinose dehydratase involved in an alternative bacterial pathway of L-arabinose metabolism.
- ⑱ 学会名：The 3rd International Symposium on Sustainable Energy System
開催地：京都大学
年月日：2006年9月30日～10月1日
発表者：Makino, K., Saleh, A. A., Watanabe, S., Annaluru, N., and Kodaki, T.
題目：Bioethanol from woody biomass by supercritical water technology –highly efficient fermentation process for bioethanol from woody biomass–.
- ⑲ 学会名：20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress
開催地：京都
年月日：2006年6月18～23日
発表者：Watanabe, S., Kodaki, T. and Makino, K.
題目：A novel bacterial L-arabinose pathway –cloning, expression and characterization of the metabolic genes–.
- ⑳ 学会名：20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress
開催地：京都
年月日：2006年6月18～23日
発表者：Annaluru, N., Watanabe, S., Saleh, A. A., Kodaki, T. and Makino, K.
題目：Improvement of thermostability of *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase by protein engineering.
- ㉑ 学会名：20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress
開催地：京都
年月日：2006年6月18～23日
発表者：Saleh, A. A., Watanabe, S., Annaluru, N., Kodaki, T. and Makino, K.

題目：New approach for conversion of biomass to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*.

- ② 学会名：20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress

開催地：京都

年月日：2006年6月18~23日

発表者：Matsui, J., Watanabe, S., Kodaki, T. and Makino, K.

題目：Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of xylitol dehydrogenase, a key enzyme for bioethanol production using yeast.

- ③ 学会名：日本化学会第86回春季大会

開催地：千葉

年月日：2006年3月27~30日

発表者：依田香子、渡辺誠也、小瀧努、牧野圭祐

題目：五炭糖代謝に関わる酵素のタンパク質工学による機能改変

〔図書〕(計6件)

- ① 渡辺誠也 (2009) 産業酵素の応用技術と最新動向 (シーエムシー出版) 第24章 サッカロミセス酵母による効率的キシロース発酵を目指したキシリトール脱水素酵素の機能変換
- ② 渡辺誠也 (2008) 木質系バイオマスからのエタノール生産のための微生物育種戦略 化学と教育 **56 (12)** 612-613.
- ③ 渡辺誠也 (2008) ~さまざまな微生物による燃料用エタノール製造法の進展~タンパク質工学を用いたキシロース発酵性サッカロミセス酵母の育種 生物工学会誌 **第11号** p19.
- ④ 渡辺誠也、牧野圭祐 (2007) 微生物の糖代謝経路に見られる新規な進化的関係 生化学 **79 (11)** 1059-1064.
- ⑤ 渡辺誠也、牧野圭祐 (2007) タンパク質工学によるキシロース発酵酵母作出の新

戦略 バイオサイエンスとインダストリー **65 (12)** 18-20.

- ⑥ 渡辺誠也、小瀧努、牧野圭祐 (2006) 化学フロンティア 17 新エネルギー最前線—環境調和型エネルギーシステムの構築を目指して—バイオエタノール—遺伝子工学による発酵技術の改変— p107-114.

〔産業財産権〕

○取得状況 (計2件)

- ① 名称：リンカー化合物、プローブ及びプローブ固定化担体
発明者：牧野圭祐、小瀧努、渡辺誠也、スズビル バック、野々川満、和田啓男、吉田安子、山田和成
権利者：京都大学、日本碍子、信和化工(株)
種類：
番号：PCT/JP2006/304641
出願年月日：2006年3月9日
国内外の別：国際出願
- ② 名称：L-アラビノースを α -ケトグルタル酸に変換する方法、この方法に使用する酵素、該酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換え微生物
発明者：牧野圭祐、小瀧努、渡辺誠也、和田啓男
権利者：京都大学、信和化工(株)
種類：
番号：特願 2005-303253
出願年月日：2005年10月18日
国内外の別：国内出願

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 誠也 (WATANABE SEIYA)

京都大学・生存基盤科学研究ユニット・特定研究員

研究者番号：90379032