

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05554

研究課題名(和文) 未利用キチン系バイオマスからの有用化合物生産プロセスの開発

研究課題名(英文) Development of valuable compound production process from unutilized chitinous wastes

研究代表者

猪熊 健太郎 (Inokuma, Kentaro)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・特命助教

研究者番号：90532606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：キチンの構成単糖であるN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を資化できる酵母 *Scheffersomyces stipitis* の GlcNAc 代謝特性を、安定同位体 ( $^{15}\text{N}$ ) 標識された GlcNAc を用いた動的代謝プロファイリングにより明らかにした。また、この酵母に対する遺伝子改変技術を確認し、代謝改変により有用芳香族化合物レスベラトロールを GlcNAc を含む複数の糖から生産させることに成功した。さらに、微生物細胞の表層に酵素などを固定・集積する細胞表層工学技術を用いて、このレスベラトロール生産株にキチン分解能力を付与し、同時糖化発酵法によりキチンからレスベラトロールを直接生産することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた GlcNAc 資化性酵母の代謝特性に関する情報は、GlcNAc から効率良く物質生産するための合理的な代謝改変戦略の導出に大きく寄与すると考えられる。また、キチンから高付加価値化合物(レスベラトロール)が直接生産できる可能性が示されたことで、現在は産業廃棄物として処分されている甲殻類の殻などの未利用キチン系バイオマスが経済的価値を持つ資源として見直され、その回収・再利用が促進されるなどの社会的波及効果が期待できる。特にエビの養殖産業が盛んな地域では、養殖過程で大量に発生する脱皮殻の放置や埋設処理による深刻な環境問題が発生しており、本研究の成果はそれらの解決にも繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed the metabolic properties of N-acetylglucosamine (GlcNAc), a component monosaccharide of chitin, in the GlcNAc-assimilating yeast *Scheffersomyces stipitis* by dynamic metabolic profiling using stable nitrogen isotope ( $^{15}\text{N}$ )-labeled GlcNAc. We also established a genetic modification techniques for this yeast. The metabolically-engineered *S. stipitis* strain produced a valuable aromatic compound resveratrol from various sugars including GlcNAc. Furthermore, we added the chitin degradation ability to this resveratrol-producing strain by using cell-surface engineering technology. The constructed *S. stipitis* strain successfully produced resveratrol directly from chitin by simultaneous saccharification and fermentation.

研究分野：応用微生物学

キーワード：キチン N-アセチルグルコサミン 酵母 細胞表層工学 動的代謝プロファイリング レスベラトロール

## 1. 研究開始当初の背景

甲殻類の殻の主要成分の一つであるキチンは、アミノ糖の *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が重合した天然多糖であり、自然界で最も存在量の多い窒素含有有機化合物であると考えられている。しかしながら、エビ、カニの殻廃棄物などのキチン系バイオマスを資源として活用する取り組みはほとんど行われておらず、その大部分が未利用のまま産業廃棄物として処分されているのが現状である。特に、日本などへ輸出するためのエビの養殖産業が盛んな東南アジアでは、養殖の過程で大量に発生するエビの脱皮殻の放置や埋設処理により、悪臭や土壌汚染などの深刻な環境問題が発生している。これらの問題を解決するためには、キチンの構成単糖である GlcNAc を利用できる微生物 (GlcNAc 資化性微生物) を用いて GlcNAc およびキチンから付加価値の高い有用化合物を発酵生産する経済性の良いプロセスを構築し、これらの廃棄物の回収・再利用を促すことが急務である。

## 2. 研究の目的

本研究では、甲殻類の殻廃棄物などの未利用キチン系バイオマスの利用促進を目指し、研究代表者が 2016 年に発見・報告した<sup>1)</sup> GlcNAc 資化性酵母 *Scheffersomyces stipitis* (*S. stipitis*) を用いて、GlcNAc およびそのポリマーであるキチンから高付加価値化合物を発酵生産するプロセスの可能性を検討した。

## 3. 研究の方法

まず、GlcNAc 資化性酵母 *S. stipitis* に生産させる標的化合物を選定するために、この酵母の GlcNAc 代謝特性を明らかにするためのメタボローム解析を実施した。解析には、安定同位体標識された基質 (本研究の場合は 15N で標識された GlcNAc) で培養した酵母の細胞を数分~数時間の短い間隔でサンプリングし、その細胞内代謝物の標識状況の経時変化を質量分析装置を用いて追跡することで、その基質の代謝経路と代謝速度を調べる「動的代謝プロファイリング」という手法を用いた。

次に、代謝特性解析の結果を参考に *S. stipitis* に生産させる標的化合物を選定し、その化合物を効率良く生産するための人工代謝経路を設計し、その経路を構成する遺伝子群を *S. stipitis* に導入することで、GlcNAc から有用化合物を生産する組換え酵母株を構築した。

さらに、この酵母株に細胞表層工学技術 (後述) を用いてキチン加水分解能力を付与し、エビ殻由来のキチンフレークを酸処理により膨潤させたもの (コロイダルキチン) を基質とした発酵試験に供することで、キチンからの標的化合物の生産性を評価した。

なお、*S. stipitis* は遺伝子配列をタンパク質へ翻訳するコドン表が多くの生物のそれとは異なることが知られている。そのため、本研究で *S. stipitis* に導入したすべての異種生物由来タンパク質は、コドン *S. stipitis* に最適化したうえで人工合成することにより入手した。

## 4. 研究成果

### (1) *S. stipitis* の GlcNAc 代謝特性の解析と標的化合物の選定

まず、安定同位体標識された基質を用いない通常メタボローム解析を実施し、GlcNAc を炭素源とした場合と、グルコース・キシロースを炭素源とした場合における、*S. stipitis* の細胞内代謝物の蓄積状況を網羅的に解析した。その結果、GlcNAc を炭素源として生育した細胞では、グルコース・キシロースを炭素源として生育した細胞に比べて、芳香族アミノ酸、分岐鎖アミノ酸、含硫アミノ酸、プリン、ピリミジンなど、幅広い種類の窒素含有代謝物の蓄積量が顕著に増大している事が明らかとなり、これらの化合物を前駆体とする物質の発酵生産を行う上で、GlcNAc が有利な基質である可能性が示唆された。次に、GlcNAc 由来の窒素原子の *S. stipitis* における代謝経路と代謝速度を調べるために、15N で標識された GlcNAc を単一窒素源かつ炭素源として用いて動的代謝プロファイリングを実施した。同時に 15N で標識された塩化アンモニウム ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) を窒素源、グルコースを炭素源として用いた動的代謝プロファイリングも実施し、窒素原子の代謝特性を比較した。代表的な窒素含有代謝物であるアミノ酸について、その窒素原子の 15N 標識率の経時変化をまとめたものを図 1 に示す。GlcNAc を窒素源とした菌体では、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  を窒素源とした菌体に比べて、多くのアミノ酸で 15N 標識率がやや低く、GlcNAc として取り込まれた窒素原子がこれらのアミノ酸の生合成に使用されるまでにはやや時間を要することが分かった。一方で、チロシン (Tyr) やロイシン (Leu) など一部のアミノ酸については、窒素源の違いによる 15N 標識率の差がほとんど見られなかったことから、これらのアミノ酸に対しては GlcNAc 由来の窒素原子が比較的スムーズに取り込まれていることが示唆された。

以上の代謝特性解析の結果に基づき、GlcNAc (およびキチン) を基質として生産する標的化合物はチロシンを前駆体とする化合物が有望であると考え、チロシンから 3 段階の反応を経て合成されるスチルベノイドポリフェノールの一種であり、認知症予防、抗癌などの効果が報告されている芳香族化合物レスベラトロール (Resveratrol, 図 2) を本研究の標的化合物に設定し、以降の代謝改変を進めることとした。

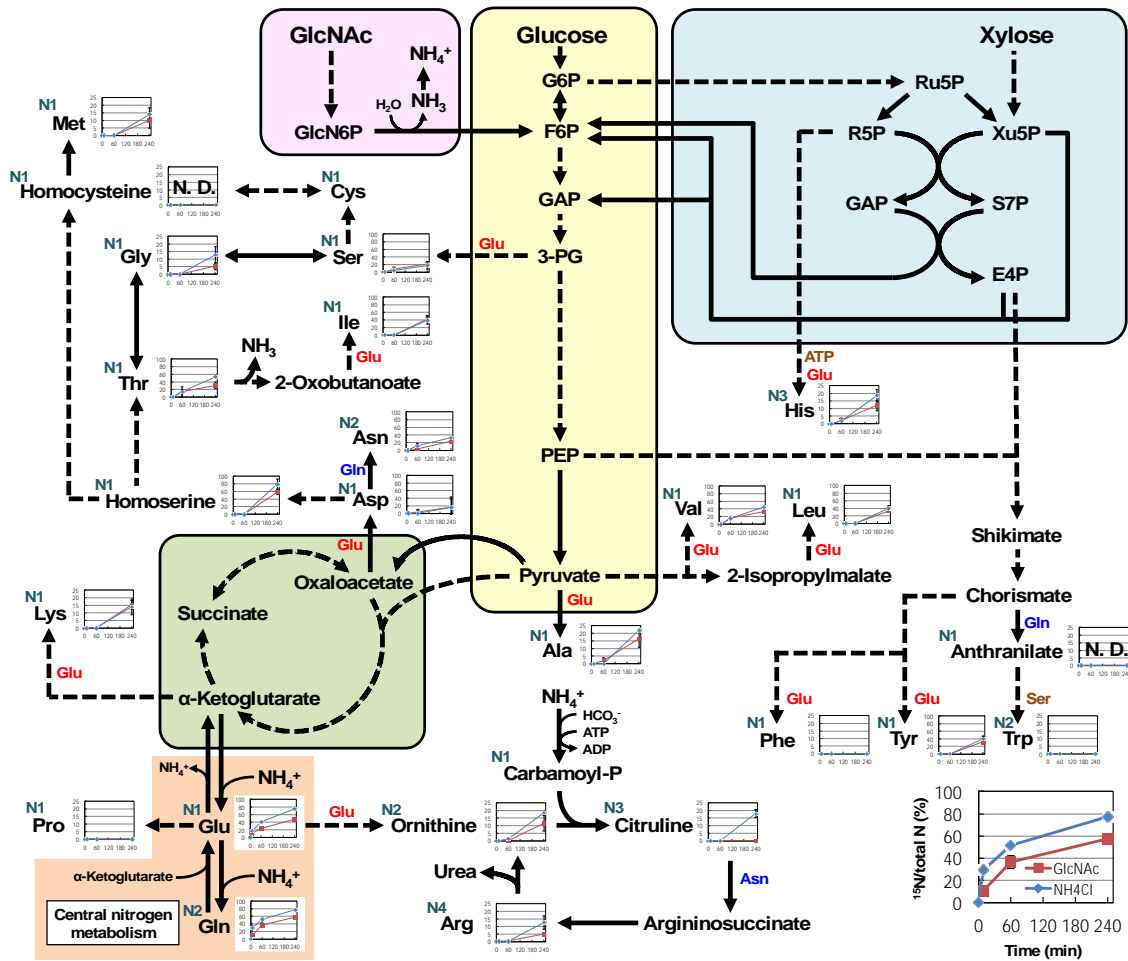


図 1: *S. stipitis* 菌体におけるアミノ酸の 15N 標識率の経時変化 (動的代謝プロファイリング)

(2) 組換え *S. stipitis* 株を用いた GlcNAc からの高付加価値化合物の生産

代謝特性解析の結果に基づいて標的化合物に選定されたレスベラトロールを GlcNAc から発酵生産するために、*S. stipitis* の代謝改変を実施した。初めに、前駆体であるチロシンからレスベラトロールを合成するために必要な 3 つの酵素 [*Herposiphon aurantiacus* 由来 tyrosine ammonia-lyase 1 (HaTAL1)、*Arabidopsis thaliana* 由来 4-coumarate: CoA ligase 2 (At4CL2)、*Vitis vinifera* 由来 stilbene synthase 1 (VvST1)] をコードする遺伝子を、ゲノム DNA に組み込む形で *S. stipitis* に導入し、レスベラトロール生産株 (Ss-T4V 株) を構築した (図 2 の赤で示した部分)。さらに、この株に、チロシンによるフィードバック阻害を受けないように配列を改変した *S. stipitis* 由来 chorismate mutase 変異体 (SsAro7p<sup>G139S</sup>) をコードする遺伝子を導入することで、チロシンへの代謝フローを改善させた株 (Ss-T4V-aro7m 株) を構築した (図 2 の緑で示した部分)。

次に、この Ss-T4V-aro7m 株を用いてレスベラトロール発酵生産試験を実施した。*S. stipitis* は GlcNAc 以外にも様々なバイオマス由来糖を資化できることが知られているため、GlcNAc を基質とした発酵試験に加えて、それらの糖類を基質とした発酵試験も同時に実施した。各糖類 50 g/L を基質とした発酵試験の結果を図 3 に示す。Ss-T4V-aro7m 株は、本研究で使用したすべての糖類 (グルコース、キシロース、フルクトース、ガラクトース、GlcNAc、マルトース、セロビオース、スクロース) からレスベラトロールを生産した。特に、二糖類であるセロビオース、スクロースからの生産量は 529.8 mg/L および 668.6 mg/L と、他の基質に比べて高かった (図 3G および H)。それに対し GlcNAc からの生産量は 13.8 mg/L と、これらの糖類の中で最も低かった (図 3E)。一方で、GlcNAc を基質とした

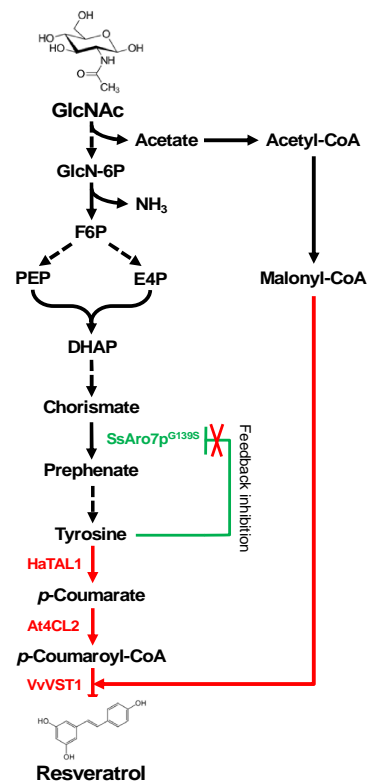


図 2: GlcNAc からのレスベラトロール合成経路

発酵試験においては、レスベラトロール生産経路の中間産物である *p*-クマル酸の蓄積 (116.0 mg/L) が観察されたことから、Ss-T4V-aro7m 株を用いた GlcNAc からのレスベラトロール生産においては、*p*-クマル酸よりも下流の代謝経路にボトルネックとなる反応が存在することが示唆された<sup>2)</sup>。

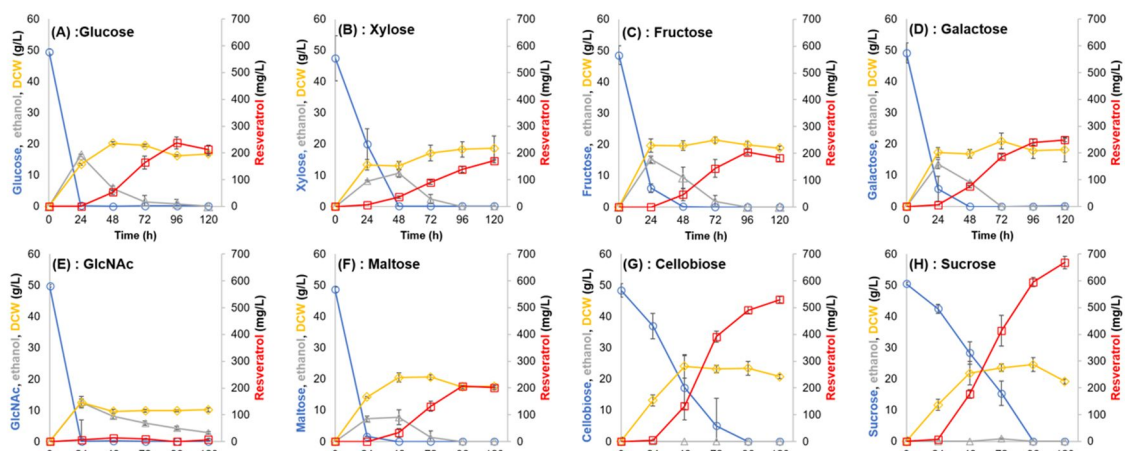


図 3: 組換え *S. stipitis* (Ss-T4V-aro7m 株) を用いた各種糖類からのレスベラトロール生産

### (3) 細胞表面工学技術を用いたキチン分解能力の付与

*S. stipitis* は GlcNAc を基質として利用することはできるが、キチンを GlcNAc に分解する能力は持たない。よって、キチンを基質として直接利用できるようにするためには、*S. stipitis* にキチン加水分解酵素 (キチナーゼ) を発現させ、キチン分解能力を付与する必要がある。本研究では、グリコシルフォスファチジルイノシトール (glycosylphosphatidylinositol; GPI) アンカーと呼ばれる構造を介して酵母の細胞表面に異種酵素を固定・集積する「細胞表面工学技術」を用いてキチナーゼを表面提示することで、*S. stipitis* へのキチン分解能力の付与を試みた。表面提示するキチナーゼとしては、既報のキチナーゼの中でも *S. stipitis* が生育可能な温度・pH において比較的高い活性を示すことが報告されている *Streptomyces coelicolor* 由来 chitinase C (ScChiC)<sup>3)</sup> を選択した。

細胞表面工学技術で酵素を細胞表面に提示するためには、目的酵素の C 末端に GPI アンカーリングドメインと呼ばれる配列を付与する必要がある。通常、GPI アンカーリングドメインには、酵母の GPI アンカー型細胞壁タンパク質の配列が用いられるが、*S. stipitis* をプラットフォームとする細胞表面工学技術はこれまで報告がなく、どの GPI アンカー型細胞壁タンパク質が *S. stipitis* において GPI アンカーリングドメインとして機能するのかについては未知数であった。そこで、本研究では、これまでに他の酵母種をプラットフォームとした細胞表面工学技術において実績のあるいくつかの GPI アンカー型細胞壁タンパク質 (*Pichia pastoris* 由来 GCW14, GCW34, GCW51) およびそれらのタンパク質の *S. stipitis* におけるホモログを GPI アンカーリングドメインの候補として選定し、ScChiC の C 末端に付与した。そして、これらの融合タンパク質をコードする遺伝子を *S. stipitis* に導入することで、細胞表面にキチナーゼを安定的に提示できるかどうかを検証した。その結果、選定したタンパク質はいずれも *S. stipitis* において GPI アンカーリングドメインとして機能することが明らかとなり、中でも *P. pastoris* 由来 GCW51 を用いた株は、エビ殻由来のキチンを酸処理により膨潤させたもの (コロイダルキチン) を基質とした細胞表面キチナーゼ活性測定において最も高い加水分解活性 ( $34.3 \pm 2.6$  U/g dry cell) を示した。これにより、*S. stipitis* をプラットフォームとした細胞表面工学技術の開発に世界で初めて成功するとともに、同技術を用いて酵母細胞にキチン分解能力を付与することにも初めて成功した。

### (4) キチンからの同時糖化発酵法による有用物質生産プロセスの開発

最後に、本研究の最終目標であるキチンからの同時糖化発酵法による有用物質 (レスベラトロール) 生産プロセスの開発を試みた。まず、上記(2)において構築した *S. stipitis* のレスベラトロール生産株 (Ss-T4V-aro7m 株) に、上記(3)において高い細胞表面キチナーゼ活性を示した ScChiC-GCW51 融合タンパク質をコードする遺伝子を導入し、レスベラトロール生産能力とキチン分解能力を併せ持つ酵母株 (T4V-ChiC 株) を構築した。そして、この T4V-ChiC 株と、キチン分解能力を持たないコントロール株 (Ss-T4V-aro7m 株) を用いて、10 g/L のコロイダルキチンを基質とした同時糖化発酵法によるレスベラトロール生産試験を実施した。発酵試験の概要と結果を図 4 に示す。T4V-ChiC 株とコントロール株はいずれもレスベラトロールを生産したが、発酵開始から 96 時間の時点でコントロール株 (Ss-T4V-aro7m 株) の  $39.7 \pm 2.7$  mg/L に対して T4V-ChiC 株は  $61.3 \pm 2.3$  mg/L と、有意に生産量が高くなっており、この株がコロイダルキチンを分解して得られた GlcNAc からレスベラトロールを生産したことが示唆された。

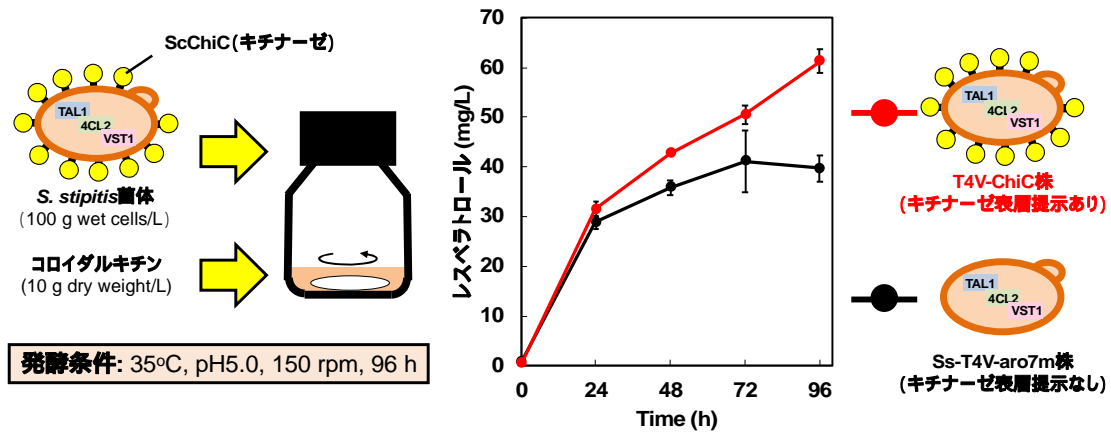


図4: キチナーゼ表面提示酵母株を用いたコロイダルキチンからのレスベラトロール生産

#### (5) まとめと今後の展望

本研究では、GlcNAc 資化性酵母 *S. stipitis* の GlcNAc 代謝特性を解析し、その解析結果に基づいて *S. stipitis* の代謝改変を施すことで、高付加価値化合物であるレスベラトロールを GlcNAc から発酵生産することに成功した。また、細胞表面工学技術を用いて *S. stipitis* の細胞表面に異種タンパク質を提示する技術を世界で初めて開発し、同技術を用いてキチナーゼを表面提示することで、*S. stipitis* の細胞にキチン分解能力を付与することに成功した。さらに、レスベラトロール生産能力とキチン分解能力を併せ持つ酵母株 (T4V-ChiC 株) を構築し、その酵母株を用いることでキチン (コロイダルキチン) から同時糖化発酵法によりレスベラトロールを直接生産することに成功した。本研究によりキチンから高付加価値化合物が直接生産できる可能性が示されたことで、現在は産業廃棄物として処分されている甲殻類の殻などの未利用キチン系バイオマスが経済的価値を持つ資源として見直され、その回収・再利用が促進されるなどの社会的波及効果が期待される。一方で、本研究で開発された T4V-ChiC 株のキチン分解能力、レスベラトロール生産性は未だ低く、この株を用いたキチンからのレスベラトロール生産を経済的に受け入れ可能なプロセスとして実用化するには、さらなる研究開発が必要不可欠である。具体的には、*S. stipitis* をプラットフォームとする細胞表面工学技術の改良によるキチン分解能力の強化、さらなる代謝改変による標的化合物の生産性の向上、キチン系廃棄物の経済的で環境負荷の少ない前処理方法、および生産された化合物の回収プロセスの検討などが必要である。

また、本研究の過程では、組換え *S. stipitis* が GlcNAc 以外の様々なバイオマス由来糖からもレスベラトロールを生産できること、その中でも特にセロピオース、スクロースからのレスベラトロール生産量が高いことなど、研究開始当初は想定していなかった知見も得ることができた<sup>2)</sup>。これらの知見は、*S. stipitis* がキチンだけでなく、セルロースや廃糖蜜などの幅広いバイオマス資源からの芳香族化合物生産に高いポテンシャルを持った微生物であることを示している。実際に、研究代表者らは組換え *S. stipitis* を用いて廃糖蜜から約 1 g/L のレスベラトロールを直接生産することにすでに成功しており<sup>4)</sup>、今後は細胞表面工学技術によるバイオマス分解能力の付与と組み合わせることで、*S. stipitis* を用いた様々なバイオマス資源からの芳香族化合物生産プロセスの開発を進める予定である。

#### <引用文献>

- Inokuma K., Hasunuma T., Kondo A., Ethanol production from *N*-acetyl-D-glucosamine by *Scheffersomyces stipitis* strains., *AMB Express*, 6 巻 83 (2016)
- Kobayashi Y., Inokuma K., Matsuda M., Kondo A., Hasunuma T., Resveratrol production from several types of saccharide sources by a recombinant *Scheffersomyces stipitis* strain., *Metabolic Engineering Communications*, 13 巻 e00188 (2021)
- Nguyen-Thi N., Doucet N., Combining chitinase C and *N*-acetylhexosaminidase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) provides an efficient way to synthesize *N*-acetylglucosamine from crystalline chitin., *Journal of Biotechnology*, 220 巻 25-32 (2016)
- Kobayashi Y., Inokuma K., Matsuda M., Kondo A., Hasunuma T., Resveratrol production of a recombinant *Scheffersomyces stipitis* strain from molasses., *Biotechnology Notes*, 3 巻 1-7 (2022)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kobayashi Yuma, Inokuma Kentaro, Matsuda Mami, Kondo Akihiko, Hasunuma Tomohisa	4. 巻 3
2. 論文標題 Resveratrol production of a recombinant Scheffersomyces stipitis strain from molasses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biotechnology Notes	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biotno.2021.11.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Inokuma Kentaro, Kitada Yuki, Bamba Takahiro, Kobayashi Yuma, Yukawa Takahiro, den Haan Riaan, van Zyl Willem Heber, Kondo Akihiko, Hasunuma Tomohisa	4. 巻 105
2. 論文標題 Improving the functionality of surface-engineered yeast cells by altering the cell wall morphology of the host strain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 5895 ~ 5904
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00253-021-11440-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kobayashi Yuma, Inokuma Kentaro, Matsuda Mami, Kondo Akihiko, Hasunuma Tomohisa	4. 巻 13
2. 論文標題 Resveratrol production from several types of saccharide sources by a recombinant Scheffersomyces stipitis strain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metabolic Engineering Communications	6. 最初と最後の頁 e00188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mec.2021.e00188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Inokuma Kentaro, Kurono Hiroki, den Haan Riaan, van Zyl Willem Heber, Hasunuma Tomohisa, Kondo Akihiko	4. 巻 57
2. 論文標題 Novel strategy for anchorage position control of GPI-attached proteins in the yeast cell wall using different GPI-anchoring domains	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Metabolic Engineering	6. 最初と最後の頁 110 ~ 117
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ymben.2019.11.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kentaro Inokuma, Mami Matsuda, Daisuke Sasaki, Tomohisa Hasunuma, Akihiko Kondo	4. 巻 17
2. 論文標題 Widespread effect of N-acetyl-D-glucosamine assimilation on the metabolisms of amino acids, purines, and pyrimidines in <i>Scheffersomyces stipitis</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbial Cell Factories	6. 最初と最後の頁 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12934-018-0998-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 猪熊健太郎、若井暁、近藤昭彦	4. 巻 63
2. 論文標題 多様な糖を用いた高収率物質生産技術の開発	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ケミカルエンジニアリング	6. 最初と最後の頁 827-835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小林 優真, 猪熊 健太郎, 蓮沼 誠久
2. 発表標題 酵母 <i>Scheffersomyces stipitis</i> を宿主とした新規レスベラトロール生産酵母によるバイオマス由来の多様な糖類からのレスベラトロール生産
3. 学会等名 第73回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 猪熊 健太郎, 北田 雄基, 蓮沼 誠久, 近藤 昭彦
2. 発表標題 細胞表層提示システムに適した宿主酵母の開発
3. 学会等名 第71回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 猪熊健太郎, 小林優真, 蓮沼誠久, 近藤昭彦
2. 発表標題 酵母Scheffersomyces stipitisを宿主とした新規細胞表面提示システムの開発
3. 学会等名 第70回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林優真, 猪熊健太郎, 蓮沼誠久, 近藤昭彦
2. 発表標題 酵母Scheffersomyces stipitisを用いたレスベラトロール生産プロセスの開発
3. 学会等名 第70回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関