

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21760639

研究課題名（和文）効率的バイオエタノール生産を目指した代謝能および糖輸送能の複合的改善技術の開発

研究課題名（英文）Development of the composite improvement technology of metabolic and sugar transport abilities for efficient bioethanol production

研究代表者

谷野 孝徳（TANINO TAKANORI）

群馬大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：50467669

研究成果の概要（和文）：キシロース代謝経路としてキシロースイソメラーゼ経路をキシロースイソメラーゼ遺伝子の染色体組み込みにより酵母へ導入する手法を確立した。キシロースイソメラーゼ経路を導入した酵母ならびに同時に副産物であるキシリトール生産経路を遮断した酵母によるグルコースならびにキシロースからのエタノール発酵能の評価を行った。加えて酵母内への糖取り込み能を司るトランスポーターをこれら酵母に過剰発現させることでグルコースならびにキシロース消費速度の向上を実現した。

研究成果の概要（英文）：An introduction method of the xylose isomerase pathway into the yeast by the genome integration of xylose isomerase encoding gene was constructed. Ethanol fermentation abilities from glucose and xylose of both only xylose isomerase pathway introduced yeast and xylitol, by-product of fermentation from xylose, pathway blocked that yeast were evaluated. And glucose and xylose consumption rates were improved by the overexpression of the transporter that intermediate uptake of the sugars into the yeast.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：微生物工学

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：再生可能エネルギー、二酸化炭素削減、バイオマス、発酵、微生物、バイオエタノール、キシロースイソメラーゼ、トランスポーター

## 1. 研究開始当初の背景

バイオエタノールは石油資源代替燃料・化学原料として有望視され年々生産量が顕著に増加している。現在バイオエタノールの生産には主に穀物系バイオマスが用いられているが、食糧問題との競合が顕在化し始めて

おり、第二世代のバイオエタノール生産技術として食糧問題と競合しない木草系バイオマスからの効率的生産技術の早急な確立が望まれている。木草系バイオマスからのバイオエタノール生産において経済性を確保するためには、木草系バイオマスを分解して得

られるグルコース・キシロースを主成分とする混合糖中のグルコースのみならずキシロースをも発酵原料として利用する必要がある。しかしながらエタノール発酵に広く用いられる酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はキシロースを代謝しエタノールを生産できず、酵母へのキシロース代謝能の付与・強化が広く研究されているが現状ではキシロース代謝能は低く混合糖からの十分なエタノール生産性は得られていない。キシロースからのエタノール生産性の向上には代謝能の付与・強化に加え酵母細胞内へのキシロース輸送能の改変を含む包括的酵母株の育種技術の確立が必須である。

## 2. 研究の目的

本研究では木草系バイオマスからの効率的エタノール生産を目指し、代謝能と糖輸送の強化の両アプローチを融合することで、混合糖からの高いエタノール生産性を有する酵母の創製技術の開発を試みる。キシロース代謝経路として2種の経路が提唱されている。このうち現在広く用いられているキシロースレダクターゼとキシロステヒドロゲナーゼの2種の酵素に触媒される経路では、キシロースの代謝に異なる2種類の補酵素 (NADPH, NAD<sup>+</sup>) を必要とする上、平衡が代謝中間体であるキシリトールに傾いているためキシリトールが蓄積しエタノール生産性が低下してしまうことが問題となっている。また、糖輸送に関しては、酵母が有するトランスポーターはキシロースの細胞内への輸送能が低いなどの基礎研究、異種生物種におけるキシロース特異的トランスポーターの存在が報告されている。これらを踏まえてキシロース代謝経路としてキシロースの変換に補酵素を必要とせず、代謝中間体であるキシリトールを生産しないキシロースイソメラーゼを用いた代謝経路を、工業利用に適したキシロースイソメラーゼ遺伝子の酵母染色体上への安定導入により付与するための手法を確立する。さらにキシロースからのエタノール生産性向上には、キシロースが迅速に酵母細胞内に取り込まれエタノールへと変換される必要があり、キシロース取り込み速度の向上と代謝経路の最適化を行う。

## 3. 研究の方法

遺伝子組み換え酵母宿主として *S. cerevisiae* MT8-1 株を用い以下の手法で研究を遂行した。

(1) キシロースイソメラーゼ遺伝子の酵母染色体組み込みによりキシロースイソメラーゼ経路を酵母に導入するため、組み込み手法として $\delta$ インテグレーション法を用いた。 $\delta$ インテグレーションにてキシロースイソメ

ラーゼ発現遺伝子カセットを染色体上に多コピー導入した酵母のキシロースイソメラーゼ活性を測定し、この酵母を用いたグルコース、キシロースそれぞれ単独と、混合糖を用いた発酵実験を行い発酵能の評価を行った。

(2) キシロースからのエタノール発酵における代謝経路を最適化するため、副生産物であるキシリトール生産経路の遮断を行った。キシロースのキシリトールへの変換を触媒する非特異的アルドース還元酵素をコードする *GRE3* 欠損株を作成し、これにキシロースイソメラーゼ経路を導入後、各種糖を用いた発酵実験を行い発酵性能の評価を行った。

(3) 糖取り込み速度を向上させるため、酵母細胞内への当取り込みを司るトランスポーターの過剰発現を試みた。トランスポーターとして *S. cerevisiae* 由来の糖親和性と糖輸送速度の異なる hexose transporter 2 種 (HXT1, HXT7)、*Candida intermedia* 由来 glucose/xylose facilitator 1 (GXF1)、ならびに Glucose/xylose-H<sup>+</sup> symporter 1 (GXS1) の計 4 種を選択した。これらをコードする遺伝子をキシロースイソメラーゼ経路を導入した酵母染色体上へシングルコピー導入した酵母を用い、各種糖を用いた発酵実験を行い取り込み速度と発酵性能の評価を行った。

## 4. 研究成果

(1)  $\delta$ インテグレーション法によりキシロースイソメラーゼ発現遺伝子カセットを染色体上に多コピー導入した酵母の細胞内画分からキシロースイソメラーゼ活性 ( $0.78 \text{ IU mg-protein}^{-1}$ ) を確認した。本結果は染色体上への組み込みによりキシロースイソメラーゼ活性を発現させた初めての成功例である。本手法によりキシロースイソメラーゼ経路を酵母 MT8-1 株に導入した酵母 MT8-1/XK $\delta$ XI 株を創製した。MT8-1/XK $\delta$ XI 株を用いてキシロースを単一炭素源とした発酵を行った結果、キシロースを炭素源としたエタノール発酵を確認した。発酵 120 時間後のエタノール濃度は  $6.93 \text{ g l}^{-1}$ 、エタノール生産速度は  $0.058 \text{ g l}^{-1}\text{h}^{-1}$ 、エタノール収率は対糖 (キシロース) 収率 61.9%であった。また副生産物であるキシリトールならびにグリセロール濃度はそれぞれ  $2.83 \text{ g l}^{-1}$ 、 $1.56 \text{ g l}^{-1}$ であった。我々以前にキシロースイソメラーゼ発現遺伝子カセットを酵母染色体上に組み込み、酵母にキシロースイソメラーゼ経路によるキシロース代謝能を付加した例は報告されていない。染色体上への目的遺伝子の組み込みは遺伝子組み換えの安定性が高く産業利用に適した手法であり、本研究成果は競争が激化している当該分野において非常に重要性の

高いものである。MT8-1/XK $\delta$ XI 株を用いグルコースを単一炭素源とした場合にもエタノール発酵能に変化が無いことも確認した。さらにグルコースとキシロースの混合糖からもエタノール発酵が可能であることが確認された (図1)。キシロースの消費はグルコースの消費に比べ遅いが、混合等を用いた場合にもキシロースを炭素源として消費しエタノールが生産されることを実証した。発酵120時間後の対糖 (混合糖) 収率は62.2%であった。

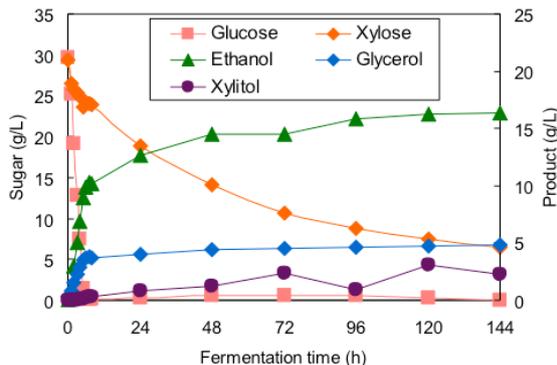


図1 MT8-1/XK $\delta$ XI 株を用いた混合糖からのエタノール発酵

(2)MT8-1 株を元に GRE3 欠損株を作成し、これにキシロースイソメラーゼ経路を導入した MT8-1 $\Delta$ GRE3/XK $\delta$ XI 株を創製しこれを用いキシロースを単一炭素源とした発酵を実施した。発酵72時間後のエタノール濃度は9.36 gL<sup>-1</sup>、エタノール生産速度は0.130 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>、エタノール収率は対糖 (キシロース) 収率67.8%であった。また副生産物であるキシリトールならびにグリセロール濃度はそれぞれ0.51 gL<sup>-1</sup>、2.20 gL<sup>-1</sup>であった。非特異的アルドース還元酵素をコードする GRE3 を欠損させることで予測されたキシリトールの副生産量を低減させることに成功したのみならず、キシロース消費速度ならびにエタノール生産速度は2倍以上に向上することが明らかとなった。混合等を炭素源として用いた場合にもキシロース消費速度ならびにキシロースからのエタノール生産速度の向上は保たれており、発酵72時間後の対糖 (混合糖) 収率は66.0%であった (図2)。キシロースイソメラーゼ活性がキシリトールにより阻害されることはすでに報告されており、発酵培地中にキシリトールを添加した発酵実験の結果からも、キシロースイソメラーゼ経路によるキシロースからのエタノール発酵ではキシリトールが阻害剤として働き、キシリトールの副生産を抑制することが発酵効率の向上において非常に重要であることを明らかとした。

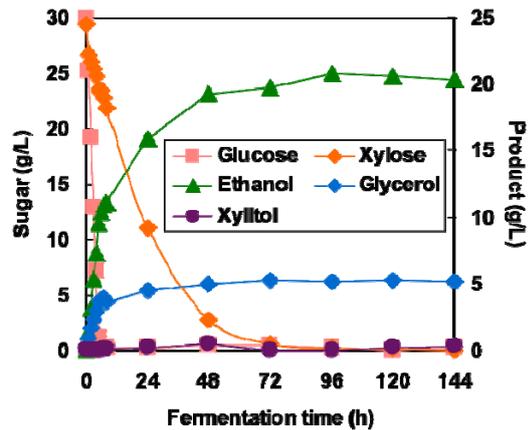


図2 MT8-1 $\Delta$ GRE3/XK $\delta$ XI 株を用いた混合糖からのエタノール発酵

(3)HXT1、HXT7、GXF1、GXS1 計4種のトランスポーターをそれぞれMT8-1/XK $\delta$ XI 株ならびに MT8-1 $\Delta$ GRE3/XK $\delta$ XI 株に導入した酵母株を作成した。それぞれのトランスポーターを導入した酵母全てにおいてグルコース消費速度の向上が確認され、GXF1 を導入した酵母ではグルコース消費速度は2倍以上の向上が確認された。キシロース消費速度についてはMT8-1/XK $\delta$ XI 株にトランスポーターを導入した場合には消費速度の向上は確認されなかった。しかしながらMT8-1 $\Delta$ GRE3/XK $\delta$ XI 株にトランスポーターを導入した場合にはGXS1 を除く全てのトランスポーターで消費速度、特に低濃度域での消費速度が向上しグルコースの場合と同様に GXF1 の導入が最も効果が大きく、キシロースの完全消費に必要な時間が1/3に短縮された。これらの結果より副生産物として多くのキシリトールが生産されてしまう系では、キシロースの代謝が律速となり消費速度の向上が確認されなかったものと考えられる。

以上の結果よりキシロースからのエタノール発酵能を強化するためには、本研究で提案した副生産物のキシリトール生産を抑えることで成し遂げた代謝経路の最適化とトランスポーターによる取り込み能の両手法が必要であることを立証し、両者を複合的に改変する本研究の目的を達成したと考える。さらに本研究では安定性が高く産業利用に適した染色体上への遺伝子導入により、これらのエタノール生産性を向上させる酵母育種が可能であることを立証した。エタノール生産性の向上により、エタノール発酵生産に必要なとなる時間が短縮されることで、実プロセスにおいては発酵一回あたりの発酵プラントの運転時間の短縮によるプラントあたりのエタノール生産性の向上、ならびに単位エタノールの生産に必要なエネルギー消費の抑制が可能となることを見込まれ、産業的

意義は非常に大きいものとする。

#### 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)

- ① Tanino T., Hotta A., Ito T., Ishii J., Yamada R., Hasunuma T., Ogino C., Ohmura N., Ohshima T., Kondo A. “Construction of a xylose-metabolizing yeast by genome integration of xylose isomerase gene and investigation of the effect of xylitol on fermentation”. Applied Microbiology and Biotechnology. 査読有、Vol. 88、No. 5、2010、1215-1221

[学会発表] (計3件)

- ① Tanino T. “Improvement of the metabolic pathway network of the yeast for the efficient ethanol production from mixed sugar”. International Workshop on Process Intensification 2010. 2010.12.2、九州大学 (福岡県)
- ② Tanino T. “Construction of a xylose-metabolic *Saccharomyces cerevisiae* by integration of xylose isomerase gene into the genome and investigation of the effect of xylitol on fermentation”. YABEC2010 (The 16th symposium of Young Asian Biochemical Engineers’ Community) 2010.11.12、Yuan Ze University (台湾)

- ③ Tanino T. “Bioethanol fermentation from mixed sugar by the recombinant yeast with xyloseisomerase pathway”. APBioChEC’ 09 (Asia Pacific Biochemical Engineering Conference 2009). 2009.11.25、神戸国際会議場 (兵庫県)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷野 孝徳 (TANINO TAKANORI)

群馬大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：50467669