

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 4日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22780092

研究課題名（和文） 動的代謝プロファイリング解析による発酵阻害機構の解明と高ストレス耐性酵母の創製

研究課題名（英文） Elucidation of yeast stress mechanism with dynamic metabolic profiling and development of recombinant yeast strains resistant to stress

研究代表者

蓮沼 誠久 (HASUNUMA TOMOHISA)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環重点研究部・講師

研究者番号：20529606

研究成果の概要（和文）：食料と競合しないセルロース系バイオマスからの効率的なバイオエタノール生産を目指し、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のストレス応答機構を分子レベルで明らかにすることで、合理的な遺伝子改変を施し、発酵阻害物耐性を強化した新規酵母を創製することに成功した。

研究成果の概要（英文）：For the efficient ethanol production from lignocellulosic biomass, recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains that have improved tolerance to fermentation inhibitors were rationally developed based on the newly developed system biological analysis.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2011年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用生物化学

キーワード：代謝工学

1. 研究開始当初の背景

有限な化石資源への依存から脱却し、持続可能な環境調和型社会の実現に向け、セルロース系バイオマスの有効利用が注目され、バイオマスからの液体燃料（エタノール、ブタノール等）や化学品原料（有機酸、アミノ酸等）の生産技術、すなわちバイオリファイナリーの早期確立に対する期待は高い。バイオリファイナリーのターゲット物質をエタノールとする場合、発酵工程に用いる微生物の一つとして用いられるのが酵母 *Saccharomyces cerevisiae* である。*S. cerevisiae* は他の微生物と比べてエタノール生産能力が高く、エタノールに対する耐性が高い。

しかしながら、セルロース系バイオマスの前処理で生じる弱酸やフラン類などの過分解物質が発酵を阻害することが問題となっており、酵母の発酵阻害物耐性を強化することが、効率的なバイオエタノール生産の課題となっている。

2. 研究の目的

バイオマスからのエタノール生産における課題である、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* への弱酸ストレス耐性の付与を目指した。具体的には、従来のメタボローム解析技術を発展させ、細胞内で起こりうる代謝反応を網羅的かつ速度論的に解析することが可能な「動的

代謝プロファイリング技術」を開発することにより、酢酸およびギ酸による発酵阻害機構を分子レベルで明らかにするとともに、酵母のストレス応答機構を解析し、合理的な代謝改変戦略に基づく遺伝子組換え酵母を育種することとした。

3. 研究の方法

- (1) グルコースおよびキシロースからのエタノール生合成経路を中心に、アミノ酸生合成経路ならびに TCA 回路を含む中枢代謝経路に位置する中間代謝物質のターンオーバー観測手法を検討した。
- (2) 代謝解析技術を用いて、キシロース資化性酵母のメタボロミクス解析・代謝ターンオーバー観測を行うことにより、発酵阻害物である弱酸によりエタノール生産が阻害されるメカニズムを解析した。
- (3) 代謝解析結果に基づく合理的な代謝改変戦略を導出し、キシロース資化性酵母への弱酸耐性の付与を施した。

4. 研究成果

細胞内の代謝物情報を俯瞰することが可能な代謝プロファイリング技術を用いて、弱酸が酵母のエタノール代謝に与える影響を調べた。発酵の炭素源には、弱酸添加により資化能力が大きく阻害されるキシロースを用い、30 mM あるいは 60 mM の酢酸を培地に加えた好気発酵を行った。酵母は *S. stipitis* 由来 XR, XDH 遺伝子, *S. cerevisiae* 由来 XK 遺伝子をゲノムに組み込んだ形質転換株を作出し、発酵に用いた。その結果、添加した酢酸の濃度依存的にキシロース資化速度とエタノール生産速度の低下が見られた。発酵中の細胞内代謝物プロファイル解析したところ、非酸化的ペントースリン酸回路の代謝中間体が酢酸濃度依存的に蓄積していることが明らかになった (図 1)。

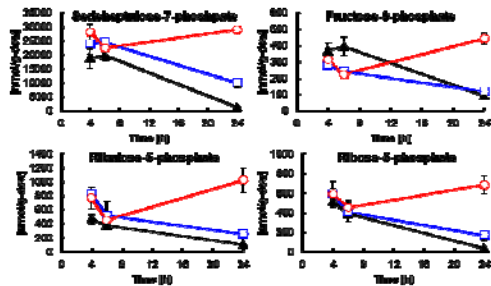


図1 0 mM (▲), 30 mM (□), 60 mM (○) の酢酸存在下でキシロース発酵を行った時のキシロース資化性酵母における細胞内代謝物質の濃度変化。

特に、発酵開始 24 h 後のセドヘプトコース 7 リン酸は、60 mM 酢酸存在下の蓄積量が非存在下の 22 倍以上であった。この結果は、酢酸添加により非酸化的ペントースリン酸回路の代謝フラックスが減速している可能性を示唆している。そこで、非酸化的ペント

ースリン酸回路の律速段階と考えられているトランスアルドラーゼの遺伝子 (*TAL1*) を TDH3 プロモーターの下流に連結して過剰発現させたところ、*TAL1* 遺伝子高発現型キシロース資化性酵母は酢酸存在下で高いエタノール生産性を示し、30 mM 酢酸存在下では 83% の対糖エタノール収率を達成した (図 2)。

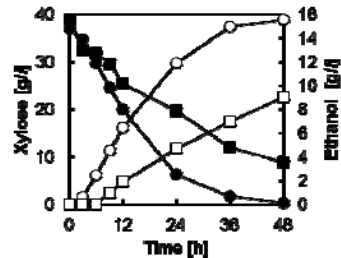


図2 *TAL1* 過剰発現株 (○, ●) とコントロール株 (□, ■) を用いた、30 mM 酢酸存在下 (B) におけるキシロースからのエタノール生産。●, ■; キシロース, ○, □; エタノール。

また、*TAL1* 過剰発現株では非酸化的ペントースリン酸回路に関与する中間代謝物質の蓄積が解消されていることが確認された。ギ酸による発酵阻害の影響を調べるために、5~10 mM のギ酸存在下でキシロース発酵させた酵母 (XR/XDH/XK 導入株) から RNA を抽出し、トランスクリプトミクス解析を行ったところ、ギ酸濃度依存的に *ALD5*, *HXX2*, *VCX1*, *GPD2*, *HXT4* などの転写量が增大していた。中でもギ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 *FDHI* の転写量が顕著に増加していることが明らかとなった。そこで、*FDHI* を *PGK1* プロモーター下流に連結し、構成的に過剰発現するキシロース資化性酵母を作出し、ギ酸存在下でのキシロース (40 g/l) 発酵を行った。その結果、20 mM ギ酸存在下では、*FDHI* を導入していない株のエタノール生産量が半分以下になるのに対し、*FDHI* 過剰発現株はギ酸非存在下と同程度のエタノールを生産することが分かった。これは、*FDHI* 過剰発現株が発酵開始 24 h 後に培地中のギ酸を除去させたためと考えられる。

以上のようにリグノセルロース由来の主要な発酵阻害物である、酢酸あるいはギ酸の存在下でキシロース発酵を向上させる代謝因子が見出された。そこで *TAL1* と *FDHI* を同時に過剰発現するキシロース資化性酵母を創製し、酢酸およびギ酸共存下でのエタノール生産能の向上を目指した。さらに、キシロース資化性酵母の二倍体化が高温耐性や低 pH 耐性を酵母に付与することを明らかとしたため、異なる接合型の *TAL1*/*FDHI* 共発現株を作用いて二倍体 (*MATa/a*) の *TAL1*/*FDHI* 共発現型キシロース資化性酵母を作出した。得られた酵母は、30 mM 酢酸、20 mM ギ酸の共存下での 40 g/l キシロース発酵で、一倍体キシロース資化性株と比べて 12

倍高いエタノール生産速度を示した。次に、実際のバイオマスとして 27 mM 酢酸, 20 mM ギ酸を含む稲わら水熱分解液を糖化处理して得られたヘミセルロース溶液からの繰返し発酵を試みた。発酵後の菌体は遠心分離により回収し、新たな稲わら糖化液と混合して発酵を開始することとし、5 ラウンドの繰返し発酵を実施した。その結果、一倍体のキシロース資化性酵母では、発酵を繰り返す毎にキシロース消費とエタノール生産の低下を見せるのに対し、*TALI/FDHI* 共発現型二倍体キシロース資化性酵母は、5 回の繰返し発酵を行ってもバイオマスからの発酵能を維持し続けていることが確認できた。菌体の繰返し利用は、酵母の増殖プロセスの省略を可能にするため、コスト・エネルギー効率的にみて極めて有効な手段である。従来、発酵液中の阻害物質の存在が繰返し発酵のネックとなっていたが、酵母の耐性を代謝工学的に強化することにより、阻害物濃度が高いヘミセルロース画分からの繰返し発酵に成功した。

本研究ではバイオエタノール生産酵母を材料に、メタボロミクスやトランスクリプトミクスを中心としたマルチオミクス解析に基づいて、キシロース代謝を向上するための代謝改変戦略を立案し、その発酵性能を向上させてきた。特に代謝プロファイリング解析技術は、代謝変動の最終フェノタイプを観測することができるため、物質生産能力を左右する鍵要素の抽出をする上で有効な手段であることが示された。

バイオリファイナリーの構築に向けた目的プロダクトの生産能を向上するためには、行き当たりばったりの形質転換体作出スキームから脱却する必要がある。合理的に微生物の代謝能力を向上させるためには、代謝システムの情報に基づいて代謝改変の戦略を立案することが重要であることを示すことができた。また、作出された微生物の物質生産能や特性を評価し、さらなるボトルネックが発見されれば、その律速を解除するための第二次代謝改変戦略を策定することができるであろう。このサイクルを繰り返すことにより、微生物の代謝機能はファインチューニングされていくはずであり、今後の微生物の高機能化がバイオプロセスの用途を拡大し、バイオリファイナリーの構築を促進することが期待できる。

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 10 件)

①Fujitomi K, Sanda T, Hasunuma T, Kondo A, Deletion of the PHO13 gene in *Sacc*

haromyces cerevisiae improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysate in the presence of acetic and formic acids, and furfural, *Bioresource Technology*, 査読有, Vol. 111, 2012, 161-166

, doi:10.1016/j.biortech.2012.01.161.

②Kato H, Suyama H, Yamada R, Hasunuma T, Kondo A, Improvements in ethanol production from xylose by mating recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 査読有, Vol. 94, 2012, 1585-1592,

doi: 10.1007/s00253-012-3914-6

③Matano Y, Hasunuma T, Kondo A, Display of cellulases on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae* affords high yield ethanol production from high-solid lignocellulosic biomass., *Bioresource Technology*, 査読有, Vol. 108, 2012, 128-133,

doi:10.1016/j.biortech.2011.12.144

④Hasunuma T, Kondo A, Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering, *Biotechnology Advances*, 査読有, 2012, in press,

doi:10.1016/j.biotechadv.2011.10.011

⑤Kato H, Izumi Y., Hasunuma T, Matsuda F, Kondo A, Widely targeted metabolic profiling analysis of yeast central metabolites, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 査読有, Vol. 113, 2012, 665-673,

doi:10.1016/j.jbiosc.2011.12.013

⑥Sakamoto T, Hasunuma T, Hori Y, Yamada R, Kondo A, Direct ethanol production from rice straw hydrolysate by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of hemicellulolytic enzymes on the surface of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* cells, *Journal of Biotechnology*, 査読有, Vol. 158, 2012, 203-210,

doi:10.1016/j.jbiotec.2011.06.025

⑦Sanda T, Hasunuma T, Matsuda F, Kondo A, Repeated-batch fermentation of lignocellulosic hydrolysate to ethanol using a hybrid *Saccharomyces cerevisiae* strain metabolically engineered for tolerance to acetic and formic acids., *Bioresource Technology*, 査読有, Vol. 102, 2011, 7917-7924,

doi:10.1016/j.biortech.2011.06.028
⑧Hasunuma T, Sanda T, Yamada R, Yoshimura K, Ishii J, Kondo A, Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*, Microbial Cell Factories, 査読有, Vol. 10, 2011, 2,
doi: 10.1186/1475-2859-10-2
⑨Hasunuma T, Sung K, Sanda T, Yoshimura K, Matsuda F, Kondo A, Efficient fermentation of xylose to ethanol at high formic acid concentration by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*, Applied Microbiology and Biotechnology, 査読有, Vol. 9, 2011, 997-1004,
doi:10.1007/s00253-011-3085-x
⑩Saito S, Hasunuma T, Tanaka T, Kondo A, Co-fermentation of cellobiose and xylose using beta-glucosidase displaying diploid industrial yeast strain OC-2, Applied Microbiology and Biotechnology, 査読有, Vol. 87, 2011, 1975-1982,
doi: 10.1007/s00253-010-2714-0

[学会発表] (計11件)

①Hasunuma T, Microbial engineering for production of biofuels and biorefinery products, 14th A-IMBN Annual Conference: Life Science and Frontier of Biorefinery Technology, 2012年3月1日, Thailand Science Park (Thailand)
②Hasunuma T, Kondo A, Repeated batch-fermentation of rice straw hydrolysate to ethanol using metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains, SIM Annual Meeting and Exhibition, 2011年7月25日, Sheraton New Orleans (New Orleans)
③Hasunuma T, Matsuda F, Kondo A, Cellulosic ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* through metabolic pathway engineering based on metabolomics, Asian Congress on Biotechnology 2011, 2011年5月12日, Shanghai Everbright Convention & Exhibition (Shanghai)
④蓮沼誠久, CE-TOFMSを用いたバイオエタノール生産酵母の代謝プロファイリング, 第31回キャピラリー電気泳動シンポジウム, 2011年11月10日, 慶應義塾大(山形)
⑤蓮沼誠久, 統合バイオプロセスによるバイオエタノール生産技術の開発, 第5回化学工学イノベーション研究会, 2011年10月21日, 神戸大学(神戸)

⑥蓮沼誠久, 近藤昭彦, 発酵阻害物耐性遺伝子を導入したキシロース資化性二倍体酵母によるリグノセルロース水熱分解液の繰返し発酵, 第63回日本生物工学会大会, 2011年9月27日, 東京農工大(東京)
⑦蓮沼誠久, シンセティックバイオエンジニアリングによるバイオエタノール生産酵母の育種, 日本生物工学会関西支部第99回醗酵学懇話会, 2011年8月4日, キリンビール神戸工場(神戸)
⑧Hasunuma T, Ethanol production from lignocellulosic materials through metabolic pathway engineering based on metabolomics, 6th iBioK Workshop, 2010年12月16日, 神戸大学(兵庫県)
⑨Hasunuma T, Production of bio-ethanol from lignocellulosic materials through the engineering of yeast cell surface and metabolic pathway, 4th Japan-Korea Biomass Symposium, 2010年11月5日, Gekkeikan Conference Hall(京都府)
⑩蓮沼誠久, メタボロームを利用した新規バイオエタノール生産酵母の育種, 第5回メタボロームシンポジウム, 2010年9月9-11日, グランドエル・サン(山形県)
⑪Hasunuma T, Metabolomic approach to identify molecules that are important for acetic acid tolerance in a recombinant xylose-fermenting yeast strain, Engineering Conferences International, Metabolic Engineering VIII, 2010年7月13-17日, ICC (Jeju Island, Korea)

[図書] (計4件)

①蓮沼誠久, 近藤昭彦, シーエムシー出版, バイオマス分解酵素研究の最前線, 序章2, バイオマス分解酵素研究の新たな展開, 2012, 4
②山田亮祐, 蓮沼誠久, 近藤昭彦, シーエムシー出版, バイオマス分解酵素研究の最前線, 第28章, セルラーゼ細胞表層提示酵母を用いたバイオマス変換, 2012,
③蓮沼誠久, 近藤昭彦, 三共出版, 微生物機能学, 第11章, 微生物を利用して有限な化石資源から脱却する, 2012,
④蓮沼誠久, 近藤昭彦, シーエムシー出版, 合成生物学の隆起—有用物質の新たな生産法構築をめざして—のうち「合成生物学によるバイオ燃料生産のための微生物細胞工場の創製」, 2012,

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)
名称: エタノールの新規生産方法
発明者: 近藤昭彦, 蓮沼誠久
権利者: 神戸大学

種類：特許
番号：特願 2011-146931
出願年月日：2011 年 7 月 1 日
国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蓮沼 誠久 (HASUNUMA TOMOHISA)
神戸大学・自然科学系先端融合研究環重点
研究部・講師
研究者番号：20529606