

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580109

研究課題名(和文) 出芽酵母を用いた多価不飽和脂肪酸の生理機能解析とストレス耐性化への応用

研究課題名(英文) Physiological analysis of polyunsaturated fatty acid (PUFA) in *Saccharomyces cerevisiae* and its application to improving stress tolerance

研究代表者

田中 晃一 (TANAKA, Koichi)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・研究員

研究者番号：90282615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：バイオエタノール原料の製造過程で混入してくる酢酸は、酵母の発酵を阻害してエタノールの生産量を減少させる。本研究では、HAA1という遺伝子の働きを強めると、酵母の酢酸耐性を劇的に強化し、酢酸があっても発酵が効率よく進むことを明らかにした。酢酸は雑菌の増殖を抑えてくれるので、酢酸を含む原料は殺菌せずに使用することができる。従って、この成果はバイオエタノール製造コストの大幅な削減に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Lignocellulose hydrolysates contain aliphatic acids, such as acetic acid, that negatively affects the fermentation ability of *S. cerevisiae*. In this study, we found that the strain overexpressing HAA1 gene acquired a higher level of acetic acid tolerance. The ethanol production ability of HAA1-overexpressing strain was not influenced by acetic acid addition. We believe that this technology has the great potential to reduce bioethanol production costs.

研究分野：応用微生物学

キーワード：出芽酵母 不飽和脂肪酸 ストレス耐性 バイオエタノール 酢酸

1. 研究開始当初の背景

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (以下、酵母と呼ぶ) は古くから酒類醸造や発酵食品の製造等に広く利用されてきた。最近では代表的な再生可能エネルギーであるバイオエタノールの製造においても中心的な役割を果たしており、極めて重要な産業微生物に位置付けられている。バイオエタノールの発酵生産プロセスを効率化してコストダウンを図るためには、より過酷な条件(高温、高浸透圧、低 pH など)においても良好な発酵能を示す酵母、すなわちこれらの物理化学的ストレスに対して強い耐性を有する産業用酵母の育種開発が必要不可欠であった。

2. 研究の目的

(1) 細胞の内と外の境界を形成する細胞膜は外的ストレスに直接晒される最前線である。細胞膜の物性はその脂質組成により大きく変化する。更に、様々な生物種(動物、植物、微生物)において、環境ストレスにตอบสนองして細胞膜の脂質組成が変化することが徐々に明らかになっている。そこで私は、人為的に酵母の膜脂質組成を改変することで、様々な物理化学的ストレスに対する耐性を付与できるのではないかと考え、その可能性について検討することにした。

(2) 稲わらや間伐材などの未利用バイオマスは、食物と競合せず、カーボンニュートラルという特性を有することから、バイオエタノール等の再生可能エネルギーの原料として積極的な利用が推進されている。しかしながら、これらのセルロース系バイオマスの糖化液に混入してくる酢酸は酵母の発酵能を著しく阻害する。この問題を解決するために、「酢酸による発酵阻害を受けない」酢酸耐性酵母の育種技術の開発を試みた。

3. 研究の方法

(1) 酵母細胞膜の脂質組成の改変によるストレス耐性化

多価不飽和脂肪酸導入によるストレス耐性化
酵母には脂肪酸の不飽和化酵素が一つしかないため、細胞内には一価の不飽和脂肪酸(オレイン酸、パルミトレイン酸)しか存在しない。一方、植物や他の微生物の中には二価、三価の不飽和脂肪酸を合成できるものも多数存在する。そこで、様々な不飽和脂肪酸を合成することが知られている油脂産生糸状菌(*Mortierella alpina*)の脂肪酸不飽和化酵素を酵母に導入し、通常酵母には存在しない多価不飽和脂肪酸を合成させることで、膜特性の改変およびストレスに対する耐性化を試みた。

ステロール含量の改変によるストレス耐性化

細胞膜の主要な脂質はリン脂質であるが、ステロールもまた膜の強度や流動性を制御する必須成分である。酵母のステロール合成に関わる酵素を網羅的に過剰発現させ、膜に含まれるステロールの量を変化させることで、膜特性の改変およびストレスに対する耐性化を試みた。

(2) 酢酸耐性酵母の育種技術の開発

酢酸耐性酵母のスクリーニング
酢酸耐性化機構の手がかりを得るため、カルチャーコレクションや自然界・発酵食品由来の分離株より、酢酸に対して耐性を示す酵母をスクリーニングした。

酢酸耐性メカニズムの解析
得られた酢酸耐性株の酢酸耐性メカニズムを明らかにするため、DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析をおこない、野生型株とは発現量の異なる遺伝子を探索し、酢酸耐性に関わる可能性がある候補遺伝子とした。

酵母を酢酸耐性化する新技術の開発
上記の解析で同定した遺伝子を実験室酵母に過剰発現し、実際に酢酸ストレス耐性を示すようになるかどうかを調べた。

4. 研究成果

(1) 酵母細胞膜の脂質組成の改変によるストレス耐性化

多価不飽和脂肪酸導入によるストレス耐性化
酵母における多価不飽和脂肪酸合成の影響について知るため、オレイン酸(一価不飽和脂肪酸) リノール酸(二価不飽和脂肪酸) -リノレン酸(三価不飽和脂肪酸)の合成経路に注目して研究を進めた。オレイン酸 リノール酸の変換は 12 不飽和化酵素、リノール酸 -リノレン酸の変換は 3 不飽和化酵素により触媒される。酵母に油脂生産性糸状菌 *Mortierella alpina* 由来の 12 不飽和化酵素を発現させたところ、通常酵母には検出されないリノール酸の蓄積が確認された。更に、12 不飽和化酵素と 3 不飽和化酵素と一緒に発現させると、予想通り -リノレン酸が検出されるようになった。興味深いことに、3 不飽和化酵素だけを発現させると、パルミトレイン酸由来だと想定される新規の不飽和脂肪酸が検出された。次に、それぞれの株のストレス耐性(アルコール、酸、塩、酸化、凍結、高温)を検討したところ、3 不飽和化酵素だけを発現する株がアルコール、高塩(高浸透圧)、凍結融解に対して耐性を示すことが明らかとなった。

た。この結果は、これまで我々が注目していた鎖長 18 以上の高分子不飽和脂肪酸より、もっと炭素数が少ない (16 以下) 不飽和脂肪酸の方が、ストレス耐性に重要な役割を担っている可能性を示唆するものである。

ステロール含量の改変によるストレス耐性化

細胞膜のステロール量 (酵母の膜に含まれるステロールはエルゴステロール) の変化とストレス耐性との関係について知るため、エルゴステロール合成系に関わる様々な遺伝子 (*ERG1*~*9*, *11*, *12*, *19*, *20*, *24*~*28*, *IDI1*) を過剰発現する株を作成した。それぞれの株の細胞内に含まれるエルゴステロールおよびその合成中間体を調べたが、顕著に増加している分子種は見いだされなかった。各株のストレス耐性についても検討したが、強い耐性を示す株は見いだされなかった。

(2) 酢酸耐性酵母の育種技術の開発

酢酸耐性酵母のスクリーニング

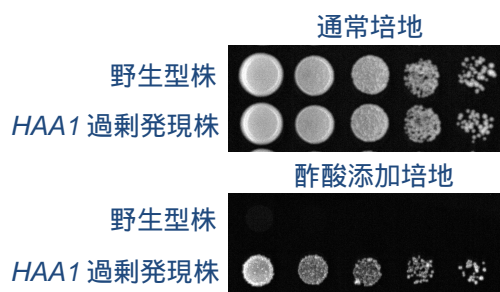
酢酸に耐性を持たせる方法の手がかりを得るため、自然界や発酵食品より分離した約 500 の酵母株の中から、酢酸耐性を示すものをスクリーニングした。その結果、強い酢酸耐性を示す株が一株見いだされた。

酢酸耐性メカニズムの解析

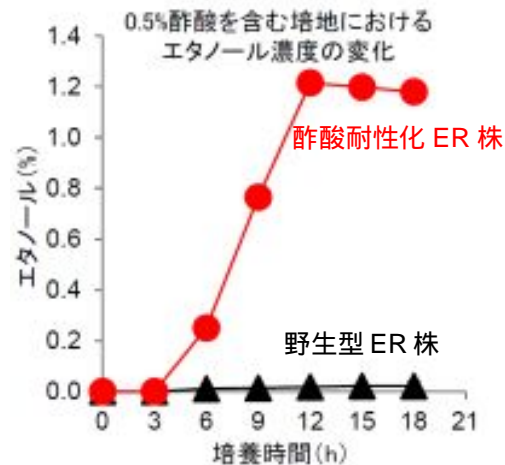
得られた酢酸耐性株の酢酸耐性メカニズムを明らかにするため、DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析をおこない、野生型株とは発現量の異なる遺伝子を探索した。酢酸耐性株において野生型株よりも有意に高い発現量を示す遺伝子がいくつか得られたが、それらの中でも転写活性化因子をコードする *HAA1* 遺伝子及びその標的遺伝子群が顕著に高発現していた。

酵母を酢酸耐性化する技術の開発

実際に *HAA1* 遺伝子の高発現が酢酸耐性に関与しているかどうかを確認するため、実験室酵母株に *HAA1* 遺伝子を過剰発現させた。過剰発現の操作は *HAA1* 遺伝子のみにおこなったが、実際に作成した株では *HAA1* の標的遺伝子群の発現もまた顕著に増加していた。これは前の実験で同定した酢酸耐性株で見られた現象と同じである。さらにスポット法で酢酸耐性について調べたところ、過剰発現株は非常に強い酢酸耐性を示すことが判明した。



次に、世界中でバイオエタノール製造に用いられている産業用酵母 (Ethanol Red (ER) 株) も同じ方法で酢酸耐性化することに成功した。通常の ER 株は酢酸存在下で全く発酵できないのに対し、酢酸耐性化 ER 株は酢酸の有無および雑菌の添加に全く影響されず良好な発酵を示した。



産業利用に供するには更なる実証試験が必要であるが、バイオエタノール製造の低コスト化に向けた大きな一歩であると期待される。

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 11 件)

Yoko Yoshiyama, Koichi Tanaka, Kohei Yoshiyama, Makoto Hibi, Jun Ogawa, and Jun Shima
Trehalose accumulation enhances tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to acetic acid. *J. Biosci. Bioeng.* 119 (2), 172-175. (2015)
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.06.021
査読有り

Anthony M. Poole, Nobuyuki Horinouchi, Ryan J. Catchpole, Dayong Si, Makoto Hibi, Koichi Tanaka, Jun Ogawa
The Case for an Early Biological Origin of DNA
J. Mol. Evol. 79, 204-212. (2014)
DOI: 10.1007/s00239-014-9656-6
査読有り

島純、田中晃一、安藤晃規、小川順
酵母の環境ストレス耐性機構の解析と食品製造への応用
Research Communications 公益財団法人発酵研究所、No. 28、PP. 73-82. (2014)
http://www.ifo.or.jp/public/pu_28.html
査読無し

島純、田中晃一、安藤晃規、小川順
有機酸ストレス耐性機構の解明と新規バイオ燃料生産プロセスの構築
Research Communications 公益財団法人
発酵研究所、No. 28、PP. 83-93. (2014)
http://www.ifo.or.jp/public/pu_28.html
査読無し

島純、田中晃一、安藤晃規、小川順
ノンコンベンショナル酵母の機能探索と油脂等の有用物質生産への応用
Research Communications 公益財団法人
発酵研究所、No. 28、PP. 95-107. (2014)
http://www.ifo.or.jp/public/pu_28.html
査読無し

安藤晃規、田中晃一、島純、小川順
有機栄養液栽培に寄与する微生物群の解析とその応用
Research Communications 公益財団法人
発酵研究所、No. 28、PP. 109-119. (2014)
http://www.ifo.or.jp/public/pu_28.html
査読無し

島純、田中晃一、中村敏英
有機酸ストレス耐性酵母の探索・育種とバイオプロセスへの応用 - 未利用バイオマスの資源化に向けた酵母の機能開拓
化学と生物、第 52 巻、第 6 号、
PP. 351-353. (2014)
DOI:<http://doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu.52.351>
査読無し

Takuya Inaba, Daisuke Watanabe, Yoko Yoshiyama, Koichi Tanaka, Jun Ogawa and Jun Shima
An Organic acid-tolerant *HAA1*-overexpression mutant of industrial bioethanol strain of *Saccharomyces cerevisiae* and its application to production of bioethanol from sugarcane molasses.
AMB express, 3 (1), 74. (2013)
DOI: 10.1186/2191-0855-3-74.
査読有り

Koichi Tanaka, Yukari Ishii, Jun Ogawa and Jun Shima
Enhancement of acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the *HAA1* gene, encoding a transcriptional activator.
Appl. Environ. Microbiol. 78 (22), 8161-8163. (2012)
DOI: 10.1128/AEM.02356-12
査読有り

Sonoko Hasegawa, Tomoo Ogata, Koichi Tanaka, Akira Ando, Hiroshi Takagi and Jun Shima

Overexpression of vacuolar H^+ -ATPase-related genes in bottom-fermenting yeast enhances ethanol tolerance and fermentation rates during high-gravity fermentation.
J. Inst. Brew. 118 (2), 179-185. (2012)
DOI: 10.1002/jib.32
査読有り

Yutaka Haitani*, Koichi Tanaka*, Mami Yamamoto, Toshihide Nakamura, Akira Ando, Jun Ogawa and Jun Shima (*These authors contributed equally to this work)
Identification of an acetate-tolerant strain of *Saccharomyces cerevisiae* and characterization by gene expression analysis.
J. Biosci. Bioeng. 114 (6), 648-651. (2012)
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.07.002.
査読有り

〔学会発表〕(計 9 件)

田中晃一、小川順、島純
出芽酵母の酢酸耐性は Haa1 依存的な細胞内グリセロールの蓄積により増強される
日本農芸化学会 2014 年度大会
2014 年 3 月 29 日、東京

稲葉拓哉、渡辺大輔、吉山洋子、田中晃一、小川順、高木博史、下飯仁、島純
産業用バイオエタノール酵母由来の HAA1 遺伝子過剰発現株と糖蜜を用いたバイオエタノール生産
日本農芸化学会 2014 年度大会
2014 年 3 月 29 日、東京

Takuya Inaba, Daisuke Watanabe, Yoko Yoshiyama, Koichi Tanaka, Jun Ogawa, Hiroshi Takagi, Hitoshi Shimoi and Jun Shima
An Organic acid-tolerant *HAA1*-overexpression strain from industrial bioethanol yeast.
International Conference on Agricultural, Ecological and Medical Science (AEMS-2014)
2014 年 2 月 6 日、バリ (インドネシア)

稲葉拓哉、渡辺大輔、吉山洋子、田中晃一、小川順、高木博史、下飯仁、島純
HAA1 遺伝子過剰発現株を用いたバイオエタノール生産
シンポジウム「微生物科学研究の多様性と新展開」、2013 年 11 月 8 日、京都

田中晃一、小松崎典子、藤原しのぶ、石井由香里、日比慎、小川順、島純
芳香族アミノ酸の代謝調節による酵母の酢酸ストレス耐性化戦略

日本農芸化学会 2013 年度大会
2013 年 03 月 26 日、仙台

田中晃一、灰谷豊、吉山洋子、山本まみ、
中村敏英、安藤聡、小川順、島純
産業プロセスに有用な酢酸ストレス耐性酵
母の同定と耐性メカニズムの解析
日本農芸化学会 2013 年度大会
2013 年 03 月 26 日、仙台

田中晃一、小松崎典子、藤原しのぶ、
石井由香里、日比慎、小川順、島純
出芽酵母のストレス耐性における芳香族ア
ミノ酸の重要性とその応用
第 64 回日本生物工学会大会
2012 年 10 月 26 日、神戸

長谷川園子、尾形智夫、田中晃一、
安藤聡、小川順、高木博史、島純
液胞プロトンポンプ関連遺伝子の過剰発現に
よりビール酵母はエタノールストレス耐性を
獲得する
第 4 回日本醸造学会若手シンポジウム
2012 年 09 月 27 日、東京

田中晃一、小松崎典子、藤原しのぶ、
石井由香里、日比慎、小川順、島純
酵母の有機酸およびエタノールストレス耐性
には芳香族アミノ酸チロシンが重要である
第 4 回日本醸造学会若手シンポジウム
2012 年 09 月 27 日、東京

〔その他〕

報道関連情報

酢酸を使ったバイオエタノールの高効率生
産
日本経済産業新聞、
平成 25 年 (2013 年) 7 月 25 日版

受賞情報

田中晃一
日本農芸化学会 2014 年度大会
トピックス賞
「出芽酵母の酢酸耐性は Haa1 依存的な細
胞内グリセロールの蓄積により増強される」

田中晃一
日本農芸化学会 2013 年度大会
トピックス賞
「産業プロセスに有用な酢酸ストレス耐性
酵母の同定と耐性メカニズムの解析」

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

田中 晃一 (TANAKA, Koichi)
京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・
研究員
研究者番号: 90282615

(2) 研究分担者

島 純 (SHIMA, Jun)
龍谷大学・農学部・教授
研究者番号: 00343822