

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580299

研究課題名(和文) 褐藻糖化海洋酵母の創出による効率的バイオエタノール生産

研究課題名(英文) Efficient bioethanol production by the created yeast with saccharification activity of brown algae

研究代表者

浦野 直人 (Urano, Naoto)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授

研究者番号：90262336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は未利用資源である褐藻廃棄物から効率的にバイオエタノールを生産するため、褐藻糖化酵母を創出することを目的とした。酵母と酵素の活性温度を一致させるため、海洋低温菌由来のラミナラーゼを探索し、相模湾由来の*Pseudoalteromonas haloplanktis* LAを単離した。

LAのラミナラーゼPhLamは活性部位下流にX1, X2, X2の繰返し配列を持つ新奇酵素であり、活性発現にXが必要であった。PhLamを酵母*Saccharomyces cerevisiae*で表層提示したところ、組換え酵母は褐藻ラミナランの分解活性を持ち、ラミナランから直接的にバイオエタノールを生産した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed the creation of a yeast with saccharification activities of brown algae and the production of bioethanol from the disposed unuseful resources. Cold-active laminaranases were screened from coasts in order to be agreed the temperature for yeast cultivation with that for enzyme activity and *Pseudoalteromonas haloplanktis* LA was isolated from The Sagami Bay in Japan. Its laminaranase PhLam was purified and the gene was cloned in *Escherichia coli*. PhLam was the novel enzyme which had repeated sequence; X1, X2, and X3 in the downstream of catalytic domain and X module was essential for expression of the enzyme. Phlam gene was expressed on the cell surface of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The recombinant yeast had laminaranase activity and directly produced bioethanol from laminaran.

研究分野：環境微生物化学

キーワード：褐藻 ラミナラン ラミナラーゼ 糖化 酵母 細胞表層工学 バイオエタノール 未利用資源

1. 研究開始当初の背景

化石燃料の過度な使用がもたらす地球温暖化対策として、代替クリーンエネルギーの開発が叫ばれているが、2011.3.11の原発事故による放射能汚染が、これに追い打ちをかけた。2011.8.26には、再生可能エネルギー特別措置法(太陽光、風力、バイオマス、小型水力等による電気を電力会社が買い取る制度)が成立するなどの社会情勢から、代替クリーンエネルギーの早期開発に大きな期待がかけられている。

すでにアメリカやブラジルでは、トウモロコシ・サトウキビ等を原料とするバイオエタノールの大量生産を行い、エタノール混合ガソリンを実用化している。しかし、原料が食糧供給と競合することや、日本では大規模農業が行われていないことから、上記原料の日本での使用には問題がある。そこで、島国である日本の特産を考慮し、海洋未利用バイオマス(海藻)のバイオエタノール原料化に関する研究が期待されている。文部科学省は東日本大震災で壊滅的な被害を受けた東北・三陸地方沿岸域の早期復旧へ向け、水産業復興の後押しをするために、新しい産業の創出に向けた研究開発を計画しており、それらの研究の一つに海藻からのバイオ燃料生産がある。

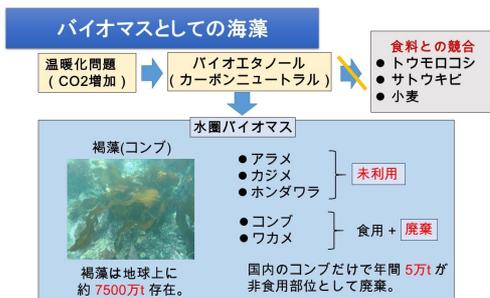


図 1

水産庁では「水産バイオマス資源化技術開発事業」(平成 19~24 年度)を行っており、研究計画 3 本柱の一つが水産バイオマス燃料・エネルギー変換技術開発である。筆者は、計画中の「酵母を利用したエタノール発酵技

術開発」の代表として、成果を挙げてきた(平成 21、23 年度日本水産学会大会発表済)。本開発中に「海藻(褐藻)のカスケード利用(a)(b)(c)」がある。

(a)褐藻からのアルギン酸生産(at 北海道水試)。(b)褐藻アルギン酸抽出残渣からのバイオエタノール生産(at 海洋大)。(c)褐藻エタノール抽出残渣からのメタン生産(at 広島大)。

上記の背景から、バイオエネルギーを再生可能エネルギーの一つとして実用化するためには、エネルギー収率の向上が必須であり、本研究を遂行するに至った。

2. 研究の目的

上記研究で、筆者は天然酵母を用いる褐藻からのバイオエタノール生産では、ほぼ最高収率の条件を確立することができた。ところが天然酵母は海藻中のラミナラン、フコイダンを利用できないため、その発酵収率には限界がある。そこで水産庁の研究とは独立して、本研究ではエタノール生産の効率化を目指し、遺伝子組換え酵母(海藻のラミナラン・フコイダンを分解して発酵する酵母)を創出し、遺伝子組換え酵母を用いる褐藻アルギン酸抽出残渣の効率的な並行複発酵を行うことを目的とする。

ラミナラーゼ遺伝子クローニングに関しては研究が幾つかなされており、酵母宿主では *Pichia* 属を使用した報告(C.Hua et al, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 88, 509-518 (2010))があるが、いずれもカビを遺伝子源としている。本研究の海洋低温菌からの遺伝子クローニングの研究は行われていない。また筆者の調査では、フコイダナーゼ遺伝子を酵母宿主でクローニングした報告例は無い。組換え微生物による海藻原料からのバイオエタノール生産は、大腸菌宿主による研究(H.Takeda et al., *Energy & Environ. Sci.*, in press)

があるが、酵母宿主の研究例は無い。

本研究では、*Pichia* 属より優れた発酵能をもつ *S. cerevisiae* 種で、かつ耐熱性・耐塩性が高い海洋性 *S. cerevisiae* C19 (筆者が単離、上記の日本水産学会大会で発表) を宿主とした異種酵素発現による高機能化酵母の創出と、褐藻からのバイオエタノール生産を行う。

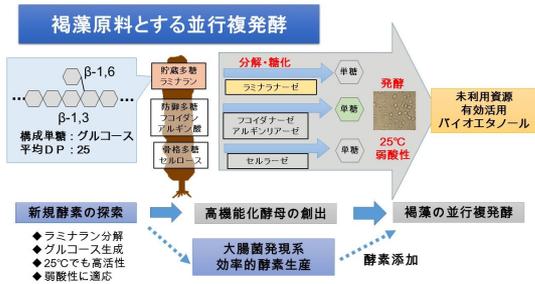


図 2

3. 研究の方法

従来技術では、褐藻の糖化は加水分解酵素の最適温度 (50 前後) で行い、発酵は酵母の最適温度 (30 前後) で行う。本研究ではエネルギー効率化のため、糖化と発酵を同温度で並行複発酵することを目指した。

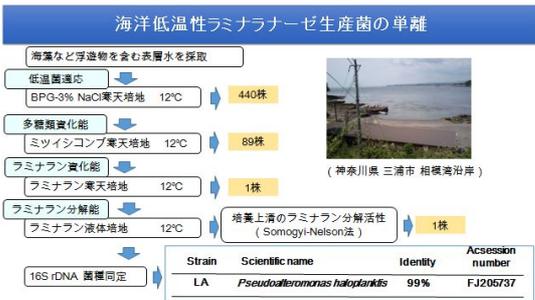
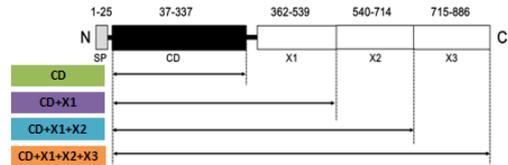


図 3

図 3 に示すように、相模湾沿岸の海水を平板培地上、12 で培養して低温菌 440 株を単離した。さらに、コンブ培地、ラミナラン培地で馴致培養して、ラミナラン資化能を持つ細菌 1 株を単離し、LA とした。LA の培養上清の酵素活性を測定する同時に、16S rDNA 塩基配列解析により、菌種同定を行ったところ、*Pseudoalteromonas haloplanktis* であることがわかった。

図 4

Pseudoalteromonas haloplanktis LA 由来ラミナラーゼ (PhLam)



- > PhLamはSignal peptide (SP), Catalytic domain (CD), Carbohydrate binding module (CBM) X1, X2, X3より構成される。
- > CD, CD+X1, CD+X1+X2, CD+X1+X2+X3の領域をAga2とGFPの間に挿入し、pYES2ベクターで発現を試みた。

P. haloplanktis LA のラミナラーゼの精製・性状解析を行い、さらに酵素遺伝子の塩基配列を解析して、図 4 に示す結果を得た。酵素 1 次構造の詳細は研究成果に示す。

Saccharomyces cerevisiae を利用した PhLam の表層提示

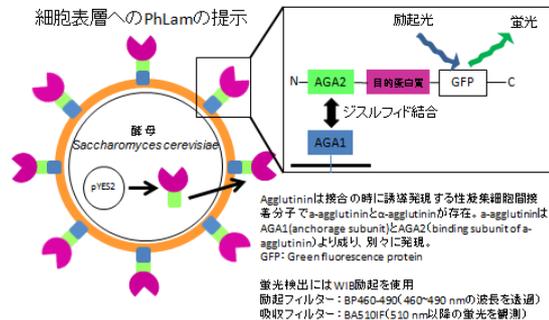


図 5

ラミナラーゼ遺伝子 (図 4 の CD, CD+X1, CD+X1+X2, CD+X1+X2+X3) を実験室酵母の *Saccharomyces cerevisiae* 宿主でクローン化した。図 5 に示すように、ラミナラーゼ PhLam を細胞表層に提示した。酵素タンパク質の蛍光色素 GFP を結合させた。

図 6 に示すベクター pYES2 を使用して、PhLam 遺伝子を結合して酵母へ導入した。形質転換した酵母は、細胞表層にジスルフィド結合により PhLam-GFP を発現した。酵素の発現は、紫外線下で GFP の発色により検出した。各遺伝子をクローン化した酵母の発色状態は研究成果に示す。ラミナラーゼ活性を保持した組換え酵母を作成して、ラミナランからのエタノール発酵を試みた。

pYES2ベクターによる Aga2-PhLam-GFPの発現と活性測定



図 6

4. 研究成果

4-1 ラミナラーゼ酵素の精製・性状

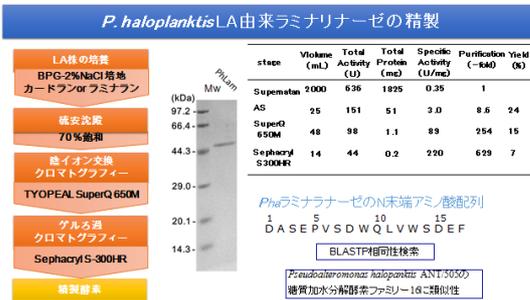


図 7

図 7 に PhLam の精製過程を示す。LA をラミナラン培地で培養して、上清液を硫酸沈殿した。タンパク質をイオン交換クロマト、ゲル濾過クロマトにかけて、酵素タンパク質を精製した。

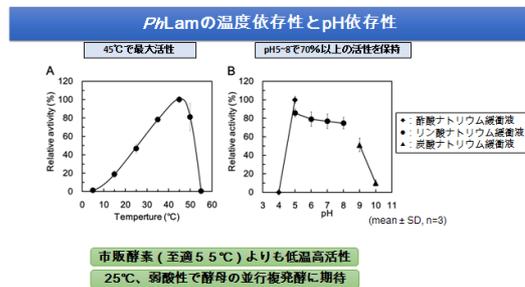


図 8

図 8 に精製 PhLam の性状を示す。最大活性温度は 45 で、市販ラミナラーゼよりも 10 低温側にあった。さらに、酵母の培養温

度 30 でも高活性を維持していた。最適 pH は 5-6 付近で、酵母の最適 pH と一致していた。これらの条件から PhLam は並行複発酵に適した酵素であると判断された。

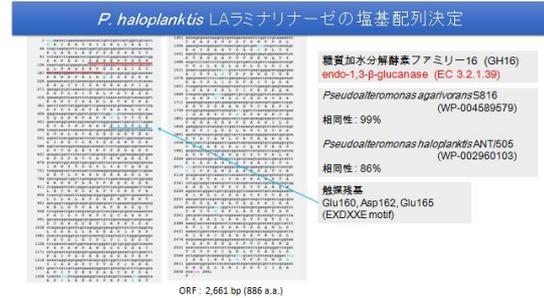


図 9

図 9 に PhLam 遺伝子の塩基配列を示す。本塩基配列は *P. agarivorans* S816 との相同性 99% であるが、*P. haloplanktis* ANT/505 との相同性が 86% と低く、本菌種では報告されていない新奇酵素の可能性が高かった。

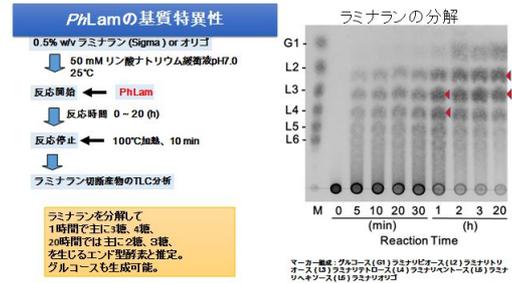


図 10

図 10 に PhLam の基質特異性を示す。ラミナランに PhLam を添加して反応させて、生成オリゴ糖を解析した。反応時間 5, 10, 20, 30, 1 時間、2 時間と経るにつれて、当初は 6 糖、5 糖の比率が高く、後へ行くにつれて 3 糖、2 糖、単糖 (グルコース) の比率が高くなっていった。本結果から、PhLam はラミナランに対して、endo 型、exo 型の両活性を持つことがわかった。

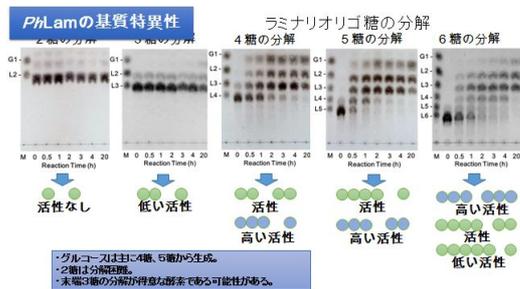


図 11

図 11 に基質変化 (2 糖 ~ 6 糖) が PhLam 活性に及ぼす影響を示す。基質 6 糖にすると 3 糖 2 個を生成する活性が高かった。基質 5 糖では、3 糖と 2 糖を生成する活性が高かった。基質 4 糖では、3 糖と単糖を生成する活性が高かった。基質 3 糖の場合には、2 糖と単糖を生成する活性はあまり高く無かった。基質 2 糖の場合には、分解活性は無かった。従って、基質全般 (2 糖 ~ ラミナラン) に渡り、単糖 (グルコース) を生成する活性があまり高く無かった。

本酵素の基質特異性を、タンパク工学を利用して、改変することが望ましいと判断された。

図 12 に PhLam の大腸菌宿主での発現を示す。図 4 と図 13 に示す PhLam の活性部位 (Catalytic Domain=CD) をベクター-pCold1 でクローニングして、大腸菌で大量発現することができた。本酵素は並行複発酵時に添加することが可能であると判断された。

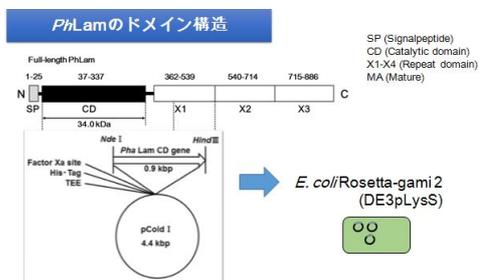


図 12

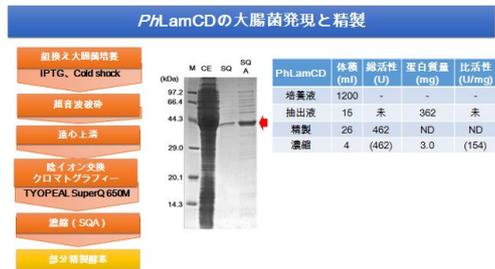


図 13

4-2 ラミナラーゼ遺伝子の酵母宿主での発現

表層提示したPhLamのGFPによる検出

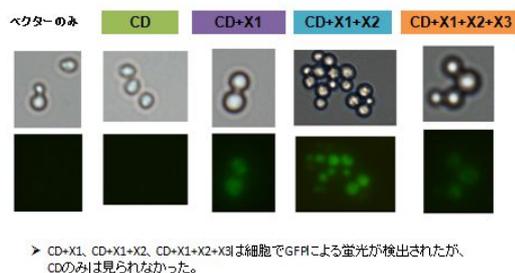


図 14

図 14 に PhLam 遺伝子を酵母でクローニングした結果を示す。酵母にベクターのみ、ベクターに CD, CD+X1, CD+X1+X2, CD+X1+X2+X3 の各遺伝子を組込んだプラスミドを形質転換した。組換え酵母において、酵素を表層提示させて、発現活性を蛍光解析したところ、酵母 (CD+X1), 酵母 (CD+X1+X2), 酵母 (CD+X1+X2+X3) の細胞表面は蛍光発色が認められた。一方、酵母(ベクター)、酵母(CD) は蛍光発色が無かった。よって、酵素タンパク質は CD のみでは発現しないことがわかった。上記結果を踏まえて、X1, X2, X3 は類似の配列部位を持ち、Carbohydrate binding module(CBM) であると考えられ、本ラミナラーゼの構造遺伝子は、SP(signal peptide), CD, CBM より構成されていることがわかった。

表層提示したPhLamによるラミナラン分解

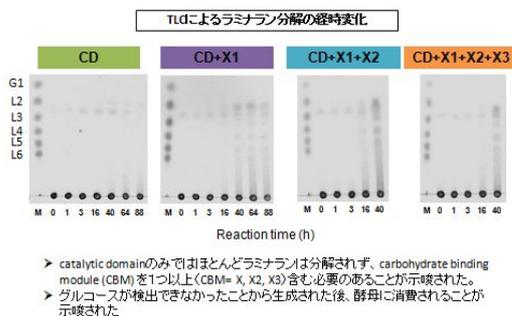


図 15

PhLamを表層提示した酵母によるエタノール発酵

- ①バイアル瓶にYPL培地(2% Bacto peptone, 1% Yeast extract, 1% Laminaran) 10 mlを入れ、OD₆₀₀=5になるように酵母を添加。
- ②アナロバック・ケンキで1 hr静置後、バイアル瓶を密閉し、スターラーによる攪拌(25度)。
- ③60 hr後にバイアル瓶から溶液を回収。10000g, 10 min, 4度で遠心し、上清を回収。
- ④F-kitでエタノール量を測定。



図 15 にラミナラーゼを表層提示した酵母によるラミナランの分解を示す。CD をクローン化した酵母では、ラミナランの分解は無かった。一方、CD+X1, CD+X1+X2, CD+X1+X2+X3 をクローン化した酵母は、ラミナランをオリゴ糖に分解していることがわかった。図 14 に示すように、ラミナラーゼを表層提示して、タンパク質の発現が認められた組換え酵母は、図 15 に示すようにラミナラン分解活性を持っていることがわかった。

天然酵母がラミナランを資化分解して、エタノールを生成した報告は無い。そこで、本研究の最大の課題である本組換え酵母がラミナランからのエタノール生成を試みた。

図 16

図 16 に PhLam を表層提示した組換え酵母によるラミナランからのエタノール発酵を示す。各酵母をラミナラン含有培地にて、25 で嫌気培養した。酵母(CD)によるエタノール生成量 0.034 g/L であった。酵母(CD+X1)、酵母(CD+X1+X2)、酵母(CD+X1+X2+X3)によるエタノール生成量は 0.061-0.084 g/L と高く

なった。以上の結果から、創出した遺伝子組換え酵母はラミナランを資化分解してエタノール発酵をすることがわかった。

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 0 件)

投稿準備中

[学会発表](計 4 件)

1. 三矢太亮、岡井公彦、石田真巳、浦野直人 (2015.5.30) 海洋低温菌 *Pseudoalteromonas haloplanktis* LA 株が分泌するラミナラーゼの基質分解特異性とクローニング, 第 17 回マリンバイオテクノロジー学会講演要旨集, p104 (東京海洋大学、港区).
2. 山本仁、三矢太亮、岡井公彦、石田真巳、浦野直人 (2015.3.29) 褐藻ラミナラン分解バイオリクターの検討, 平成 27 年度日本水産学会春季大会, p193 (東京海洋大学、港区).
3. 三矢太亮、岡井公彦、石田真巳、浦野直人 (2014.5.30) 海洋細菌 *Pseudoalteromonas haloplanktis* LA 株が分泌するラミナラーゼの性状とドメイン構造, 第 16 回マリンバイオテクノロジー学会講演要旨集, p77 (三重大学、津市).
4. Shuo Zhang, Yo Takeuchi, Naoto Urano, and Masami Ishida (2012.6.13) Purification and nucleotide sequence of laminaranase from the marine psychrophiles *Pseudoalteromonas haloplanktis* LA. The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, P-068 (高知大学、高知).

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浦野直人 (東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科・教授)

研究者番号: 90262336

(2) 研究分担者

石田真巳 (東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科・准教授)

研究者番号: 202118150

(3) 連携研究者

西沢正文 (慶應大学医学部・専任講師)

研究者番号: 80223006