

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450100

研究課題名(和文)革新的ゲノムシャフリングによる草本木質系原料からの高効率エタノール生産酵母の開発

研究課題名(英文) Improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production by modified genome shuffling

研究代表者

杉山 峰崇 (Sugiyama, Minetaka)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80379130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：高温条件下でのエタノール生産の改良を目指して、高エタノール生産性を示すが生育限界温度が41℃である*Saccharomyces cerevisiae* TJ14株とC3867株の高温耐性の改良を試みた。49℃でも増殖可能な酵母 *Hansenula polymorpha* のゲノムDNAを用いた改良ゲノムシャフリングを行なったところ、両株から42℃耐性株が得られ、同条件下でエタノール生産が7倍向上した株が得られた。2回目のゲノムシャフリングでは、42.5℃耐性株が得られ、同条件下でエタノール生産が宿主株よりも2倍向上した。これらの株は効率的なバイオエタノール生産に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to improve thermotolerance of *S. cerevisiae* by modified genome shuffling. In the first round of genome shuffling, *S. cerevisiae* TJ14 and C3867 strains showing thermotolerance up to 41℃ with high ethanol productivity were used as recipient strains. Non-conventional yeast *Hansenula polymorpha* showing robust thermotolerance up to 49℃ was chosen as donor strains. After transformation of recipient strains with genomic DNA from donor strain, 3 transformants were isolated at 42℃ and they showed pretty better growth and 7 times higher ethanol production than their recipient strains at 42℃. In the second round of genome shuffling, 2 transformants were isolated at 42.5℃ and they showed significantly better growth and 2 times higher ethanol production than their recipient strains at 42.5℃. These strains will contribute to providing better platforms for further development of thermotolerant yeast for bioethanol production.

研究分野：酵母分子遺伝学

キーワード： *Saccharomyces cerevisiae* Thermotolerance Bioethanol

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年のさまざまな環境・エネルギー問題から、バイオマスを原料にして環境にやさしい微生物の力で代替燃料であるエタノールを製造する取り組みが注目されていた。

(2) バイオエタノール生産の効率化・低コスト化へ向けて、発酵生産宿主の改良が必要とされていた。特に、プロセス全体の冷却コストの低減や低コスト・高収率な発酵生産を可能とする並行複発酵を行うために重要な高温耐性の強化が求められていた。また、6炭糖のグルコースだけでなく、リグノセルロース系バイオマス糖溶液に多く含まれる5炭糖であるキシロースからもエタノールを生産する能力に加えて、原料となるバイオマス由来の糖溶液に含まれる発酵阻害物質(バニリンや乳酸など)への耐性強化も求められていた。

(3) このため、多様な微生物宿主の開発が進められていたが、出芽酵母は遺伝的改変や培養が容易であり、高いエタノール生産能力を示すことから、バイオエタノール生産の宿主として期待されていた。我々は、これまでに自然界から単離された高温耐性出芽酵母とバイオエタノール生産用出芽酵母を交雑することにより、一般的な出芽酵母株では生育できない41°Cの高温でも旺盛な増殖を示し、かつ高いエタノール生産性を示す出芽酵母株 TJ14 を開発してきた。また、41°Cまでの優れた高温耐性に加えてエタノール高生産性を示す C3867 株も取得した。しかし、生産の効率化やコスト低減に寄与するためには、さらなる高温耐性化などが必要であった。

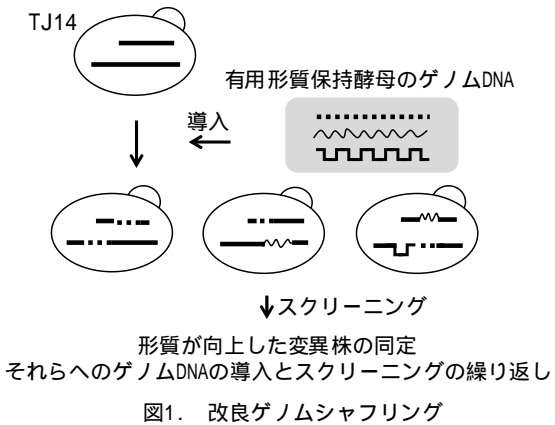
### 2. 研究の目的

独自に開発した優れた特性を持つ出芽酵母 TJ14 株および C3867 株を基盤にして、高温耐性の改良を目指し、高温条件下でのエタノール生産の改良を目指した。また、高温耐性に加えてキシロース発酵性やバニリンなどの発酵阻害物質耐性を備えた酵母株の開発も目指した。

### 3. 研究の方法

(1) 高温耐性の改良については、リグノセルロース系バイオマスを効率よく酵素糖化する際に必要な温度である43-45°C程度の高温耐性の獲得を目指した。そのため、改良ゲノムシャフリング法を適用した(図1)。ゲノムシャフリングは、変異導入と細胞融合により有用変異の組み合わせをゲノムレベルで飛躍的に増やすことによって細胞機能を改良する方法であり、原核生物、真核生物の別を問わず多数の成功例がある。ごく最近報告された改良法は、細胞融合ではなく異なる酵母のゲノム DNA を直接取り込ませることによってゲノムシャフリングを行う方法であり、操作性や変異体作成効率が格段に向上して

いる。そこで、TJ14 株および C3867 株を親株にして、49°Cでも生育可能な高温耐性酵母として知られる *Hansenula polymorpha* のゲノム DNA を複数回導入し、高温耐性を改良することを試みた。



(2) 出芽酵母は5炭糖を資化できず、TJ14 株や C3867 株もキシロースを資化できない。そこで、リグノセルロース系バイオマス糖溶液に多く含まれるキシロースからのエタノール生産能力を両株に付与するために、キシロース発酵性を示す酵母 *Pichia stipitis* のゲノム DNA を用いて改良ゲノムシャフリングを行い、高温条件下でキシロースからエタノールを生産する能力を備えた酵母の開発を試みた。この方法で、キシロース発酵性が付与できない場合は、優れたキシロース発酵性を示すが高温耐性レベルが低い酵母 *Spathaspora passalidarum* の高温耐性を改良ゲノムシャフリングによって改良することを試みた。また、バイオマスの前処理過程で生成する発酵阻害物質であるバニリンに対しても耐性を強化するために、改良ゲノムシャフリングを試みた。

### 4. 研究成果

(1) *H. polymorpha* から全ゲノム DNA を抽出した後、エレクトロポレーション法を用いて TJ14 と C3867 株に導入した。導入後、親株が生育できない42°Cの条件下でスクリーニングを行ったところ、3株が42°Cの高温耐性を示した。次に、42°Cの高温条件下におけるこれら3株のエタノール生産性を調べた。その結果、これら3株は、増殖速度およびグルコース消費速度ともに親株よりはるかに早く、親株はこの高温条件下ではエタノールをほとんど生産できないが、これら3株はほぼ理論収率通りのエタノール生産量を示した。そこで、次に、これら3株を親株にして、*H. polymorpha* のゲノム DNA をエレクトロポレーション法で導入することにより、2回目の改良ゲノムシャフリングを行った。そして、親株が生育できない42.5°Cの条件下でスクリーニングを行ったところ、2株が42.5°Cの

高温耐性を示した。42.5°Cの高温条件下におけるこれら2株のエタノール生産性を調べたところ、増殖およびグルコース消費速度が親株より早く、最終エタノール生産量も親株より約2倍向上し、90%以上の収率でエタノールを生産できることが分かった。ゲノムシャフリングが起こったかどうかの分子的証拠を得るため、ランダムプライマーを用いて、親株、*H. polymorpha* 株および高温耐性ゲノムシャフリング株のゲノムDNAを鋳型にしてRandom Amplified Polymorphic DNA解析を行った。その結果、親株、*H. polymorpha* 株および高温耐性ゲノムシャフリング株において、それぞれ異なる増幅パターンが見られた。このことから、高温耐性ゲノムシャフリング株は親株や*H. polymorpha* 株と異なるゲノム構成を示すことが分かり、ゲノムシャフリングによって高温耐性を獲得したことが強く示唆された。次に、これら2株を親株にして、*H. polymorpha* のゲノムDNAをエレクトロポレーション法で導入し、親株が生育できない43°Cの条件下でスクリーニングを行った。しかし、43°Cの高温耐性株を得ることはできなかった。従って、本研究では、従来の出芽酵母ではほとんど発酵が出来ない42.5°C高温条件下において、収率90%以上でエタノールを生産できる優秀な酵母株を育種することに成功した。今後、これらの株は、高温条件下での効率的なエタノール生産に貢献すると期待される。

(2) 高温耐性出芽酵母 TJ14 および C3867 株にキシロース発酵性酵母 *Pichia stipitis* のゲノムDNAを導入する改良ゲノムシャフリングおよび細胞融合による従来型ゲノムシャフリングを行い、キシロース資化性を付与することを試みた。スクリーニングの結果、キシロース培地で候補株は得られたものの、TJ14 および C3867 株に十分なキシロース発酵性を付与することはできなかった。そこで、優れたキシロース発酵性を示すが高温耐性レベルの低い酵母 *Spathaspora passalidarum* の高温耐性を改良ゲノムシャフリングによって改良することを試みた。*S. passalidarum* に TJ14 株由来の高温耐性出芽酵母のゲノムDNAを導入したところ、*S. passalidarum* が全く生育できない41°C条件下でもキシロース資化性を示す候補株を複数取得した。*S. passalidarum* が生育・発酵できない40°C条件下で発酵試験を行ったところ、グルコースおよびキシロースから収率50%以上でエタノールを生産できる酵母株を育種することに成功した。また、他生物由来のコドン最適化を行ったキシロースイソメラーゼ遺伝子とキシロキナーゼ遺伝子を高温耐性出芽酵母遺伝子に導入し、高温条件下でのキシロース発酵性の改良も進めた。今後、これらの株は、さらなるキシロース発酵性の改良を目指した研究において、優れたプラットフォームを提供すると期待される。

(3) リグノセルロースバイオマスの前処理工程において、副産物として生じるバニリンは、酵母の生育・発酵阻害物質であることから、バニリンへの耐性向上も求められている。*H. polymorpha* は、41°C条件下において、出芽酵母 TJ14 や C3867 株よりも高いバニリン耐性を示す。そこで、得られた高温耐性ゲノムシャフリング株のバニリン耐性について評価を行った。その結果、2つの高温耐性ゲノムシャフリング株が親株より強いバニリン耐性を示すことがわかった。従って、改良ゲノムシャフリングによってバニリン耐性が強化された株を育種することができた。また、遺伝子の過剰発現によって、発酵阻害物質であるバニリンや乳酸および高温に対する耐性を強化することも試みた。*PKC1* 遺伝子の過剰発現によって、C3867 株の高温耐性を42°Cまで向上させ、同条件下でエタノール生産性を70%以上向上させることに成功した。乳酸耐性を向上させる *ESBP6* 遺伝子の過剰発現により、乳酸ストレス存在化でのエタノール生産性を向上させることができた。加えて、プラスチックの原料となる乳酸の生産性も向上させることができた。バニリン耐性を過剰発現で強化する遺伝子として2種を取得し、バニリンストレス条件下でエタノール生産性を2倍以上向上させることに成功した。今後、高温耐性ゲノムシャフリング株とこれらの遺伝子の過剰発現を組み合わせることによって、さらに効率的なバイオエタノール生産のための酵母育種が可能になると期待される。

#### 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1件)

Sugiyama, M., Akase, S., Nakanishi, R., Kaneko, Y., Harashima, S.: Overexpression of *ESBP6* improves lactic acid resistance and production in *Saccharomyces cerevisiae*, J. Biosci. Bioeng., (2016) DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016.03.010.

[学会発表](計11件)

Sugiyama, M. et al., Improvement of thermotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production by genome shuffling, 27<sup>th</sup> Annual meeting of the Thai society for biotechnology and international conference, Nov. 18, 2015, Bangkok (Thailand)

Sugiyama, M. et al., Improvement of thermotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production by genome shuffling, 32<sup>nd</sup> International

specialized symposium on yeasts, Sep. 4, 2015, Perugia (Italy)

杉山 峰崇 他、バイオエタノール生産のためのゲノムシャフリングによる高温耐性酵母の開発、第67回日本生物工学会大会、2015年10月26日、城山観光ホテル(鹿児島)

笹野 佑 他、ゲノムシャフリングによるキシロース発酵性酵母 *Spathaspora passalidarum* の高温耐性、第67回日本生物工学会大会、2015年10月26日、城山観光ホテル(鹿児島)

杉山 峰崇 他、バイオエタノール生産のためのゲノムシャフリングによる高温耐性酵母の開発、酵母遺伝学フォーラム第48回研究報告会、2015年8月31日、広島大学(広島)

杉山 峰崇 他、ゲノムシャフリングによる出芽酵母高温耐性の改良と高温アルコール発酵、第66回日本生物工学会大会、2014年9月9日、札幌コンベンションセンター(札幌)

杉山 峰崇 他、ゲノムシャフリングによる出芽酵母高温耐性の改良と高温アルコール発酵、酵母遺伝学フォーラム第47回研究報告会、2014年9月1日、東京大学弥生講堂(東京)

木村 駿太 他、高温耐性出芽酵母 C3723 株における *CDC19-C* 遺伝子による高温耐性化、酵母遺伝学フォーラム第47回研究報告会、2014年9月1日、東京大学弥生講堂(東京)

中西 良太 他、過剰発現で乳酸耐性を付与する出芽酵母転写活性化因子 Haa1 の機能解析、酵母遺伝学フォーラム第47回研究報告会、2014年9月1日、東京大学弥生講堂(東京)

大原 佑介 他、出芽酵母の *PKC1* と *GAS1* の2重過剰発現による高温・酸ストレス条件下での高効率エタノール生産、第65回日本生物工学会大会、2013年9月18日、広島国際会議場(広島)

杉山 峰崇 他、高温・酸ストレス条件下での *PKC1* *GAS1* 過剰発現出芽酵母による高効率エタノール発酵、酵母遺伝学フォーラム第46回研究報告会、2013年9月8日、東北学院大学押川記念ホール(仙台)

〔図書〕(計2件)

Sugiyama, M., Sasano, Y. and Harashima,

S., Springer Japan, Adaptation mechanism of yeast to weak organic acid. In Kitagaki, H. and Takagi, H. (Eds.), Stress Biology of Yeasts and Fungi: Application for Industrial Brewing and Fermentation, 2015, p.107-121

杉山 峰崇、西沢 正文、原島 俊、化学同人、第12章 pH ストレス(酸・アルカリ)、原島 俊、高木 博史(編)、酵母の生命科学と生物工学、2013、p.183-196

〔その他〕

ホームページ

<http://www.bio.eng.osaka-u.ac.jp/mg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 峰崇 (SUGIYAMA, Minetaka)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 80379130

(2) 研究分担者

原島 俊 (HARASHIMA, Satoshi)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号: 70116086

笹野 佑

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 90640194