

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870504

研究課題名(和文) 油脂生産酵母による革新的な環境調和型バイオディーゼル燃料生産プロセスの開発

研究課題名(英文) Lipid production by oleaginous yeast and biodiesel fuel production by cell surface displayed lipase

研究代表者

山田 亮祐 (YAMADA, Ryosuke)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40608626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：地球温暖化や化石燃料の枯渇などの問題から、バイオディーゼル燃料の利用が期待されている。本研究では、油脂生産酵母の細胞表層にリパーゼを発現させることにより、高価なリパーゼの添加を必要としない、安価で革新的な環境調和型BDF生産プロセスの実現を目指した。実験の結果、突然変異導入による油脂生産酵母の油脂生産性の向上、コンビナトリアルライブラリーを利用したリパーゼ提示酵母の活性向上、およびリパーゼ提示酵母によるバイオディーゼル燃料の生産に成功した。

研究成果の概要(英文)：Dwindling petroleum supplies and growing environmental concerns over petroleum use have led to increasing interest in using biodiesel fuel for transportation. In this study, we aimed to construct novel biodiesel production strategy comprised lipid production by oleaginous yeast and esterification of produced lipid by lipase expressed on yeast cell surface without addition of lipase. As a result, lipid production was improved by UV-mutagenesis, cell surface lipase activity was improved by combinatorial library strategy, and biodiesel fuel was successfully produced by lipase displayed on yeast cell surface.

研究分野：生物化学工学

キーワード：酵母 バイオディーゼル燃料 リパーゼ 細胞表層提示

### 1. 研究開始当初の背景

地球温暖化や化石燃料の枯渇という問題を解決し、持続的に循環可能な社会を形成するため、バイオマス資源から作られるバイオ燃料が世界中で利用されている。特に、軽油の代替バイオ燃料であるバイオディーゼル燃料 (BioDiesel Fuel, BDF) は、欧州や米国を中心に利用されており、一部の国では、軽油への BDF の混合が義務付けられている。これに対して、日本では BDF の生産量、消費量は非常に少なく、他国と比較して普及が大幅に遅れている。従って、BDF を安価かつ安定的に製造する技術の開発が急務となっている。

BDF とは、主に、油脂とメタノールとのエステル交換反応によって作られる脂肪酸メチルエステルのことを指す (図 1)。米国における大豆からの BDF 生産では、原料である大豆油脂の生産コストが約 80% を占めると報告されている。従って、BDF を安価に製造し、普及させるためには、原料の油脂を安価に調達することが最も重要である。しかしながら、日本は国土が狭く、大豆などの油脂作物を大規模に栽培し、安価に、大量の油脂を、安定的に得ることが非常に困難である。

近年、油脂を安価かつ安定的に生産する方法として、油脂生産酵母から抽出される微生物油脂が注目されている。これまでに、細胞あたりの油脂含率が 50% を越える油脂生産酵母の研究例が報告されている。これは、油脂作物である菜種の約 35%、大豆の約 20% という油脂含率と比較して非常に高い値である。また、油脂生産に要する日数も、油脂作物の 6~12 ヶ月に対して、1~10 日程度と非常に短い。さらに、酵母は高密度に培養できるため、必要な土地面積が小さく、気温、降水量や土壌などの影響も受けない。従って、油脂生産酵母を用いれば、短時間で、安価に、大量の油脂を、安定的に生産することが可能になると期待できる。

油脂を BDF へ変換する方法には、主にアルカリ触媒法と酵素触媒法がある。アルカリ触媒法では NaOH や KOH を触媒として用いる。この方法では、安価な化学触媒を用いることができるが、多量の廃水や副生成物を生じる環境負荷の高い方法である。これに対し、廃水量や副生成物量が少なく、環境付加の低いプロセスである、酵素リパーゼを用いた酵素触媒法による BDF 生産の実用化が期待されている。しかしながら、酵素触媒法の最大の問題点はエステル交換反応に用いる酵素リパーゼが高価であるという点である。従って、現在の BDF の工業的生産では、環境負荷が高いが、安価である、アルカリ触媒法が主流となっている。

そこで、本研究では、油脂生産酵母にリパーゼを発現させることにより、高価なリパーゼの添加を必要としない、安価で革新的な環境調和型 BDF 生産プロセスを提案する (図 2)。

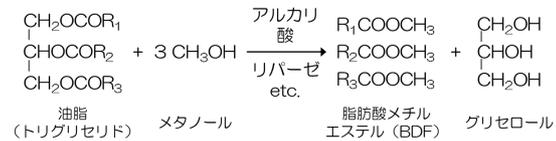


図 1 油脂とメタノールからの BDF 生成反応

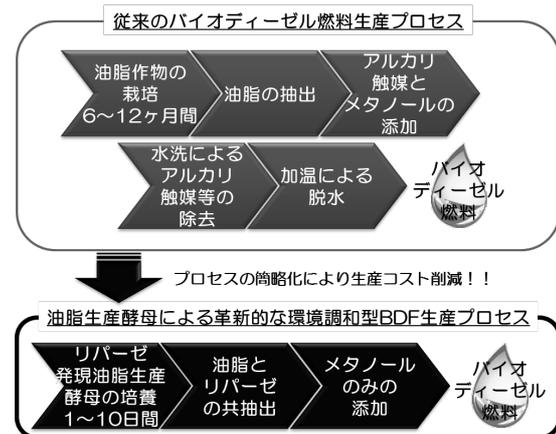


図 2 革新的な BDF 一貫生産プロセス

### 2. 研究の目的

酵母にリパーゼを発現させる方法には、細胞内発現と分泌発現の発現方法が考えられる。しかしながら、細胞内発現では、酵母の培養時に油脂とリパーゼが接触し、油脂が加水分解反応により分解される。また、分泌発現では高価なリパーゼの回収・再利用が困難である。そこで、近年研究が進められている、微生物の細胞表層に足場となるアンカータンパク質を介して酵素を提示する細胞表層提示技術の利用を試みる。この手法を用いて酵母細胞表層にリパーゼを提示出来れば、酵母により油脂とリパーゼを生産することができる。これにより、高価なリパーゼを繰返し利用可能な、酵素触媒法による酵母由来油脂からの BDF 生産の実現が期待できる。

そこで、本研究では、安価で革新的な環境調和型 BDF 生産プロセスを実現するため、以下 3 つの点に関して検討を行う。

- (1) 突然変異導入による油脂生産酵母の油脂生産性の向上
- (2) リパーゼ提示酵母の活性向上
- (3) リパーゼ提示酵母による BDF 生産

### 3. 研究の方法

- (1) 突然変異導入による油脂生産酵母の油脂生産性の向上

油脂生産酵母 *Rhodospiridium toruloides* NBRC 0559 を YPD 液体培地 (10g/L Yeast Extract, 20 g/L Peptone, 20 g/L Glucose) で 16 時間培養し、2 W/m<sup>2</sup> 紫外線を致死率が 99.9% となるように照射することで、突然変異を導入した。突然変異を導入した酵母から、油脂合成阻害剤であるセルレニン (5~160 mM)

に対する耐性を有する変異酵母を取得した。

取得したセルレニン耐性変異酵母を YPD 液体培地で培養し、油脂生産量、乾燥細胞重量 (DCW) の経時変化を測定した。油脂生産量の測定にはリン酸硫酸バニリン法 (Knight et al. Clinical Chemistry, 18, 199, 1972) を用い、DCW の測定には細胞を洗浄、凍結乾燥後に電子天びんを用いた。

#### (2) リパーゼ提示酵母の活性向上

種々の酵母から、15 種類のプロモーター、分泌シグナル、およびアンカータンパク質遺伝子を取得し、酵母 *Pichia pastoris* の細胞表面に *Bacillus thermocatenulatus* 由来リパーゼ (BTL) を発現させるコンビナトリアル DNA ライブラリーを作製した。作製したコンビナトリアル DNA ライブラリーにより *P. pastoris* を形質転換することにより、BTL 細胞表面発現酵母ライブラリーを作製し、そのリパーゼ活性を測定することで、リパーゼを細胞表面に高発現するリパーゼ提示 *P. pastoris* を作製した。

リパーゼ活性の測定には BALB-DTNB 法に基づくリパーゼ測定キット (Dainippon Pharmaceutical) を用い、遺伝子コピー数および転写レベルの測定はリアルタイム PCR 法により行った。

#### (3) リパーゼ提示酵母による BDF 生産

リパーゼ提示酵母を 96 時間培養後に緩衝溶液で洗浄し、凍結乾燥を行うことで、リパーゼを調製した。300 mg 凍結乾燥リパーゼ提示酵母、5 g 大豆油、4.15 mL イソオクタン、0.85 mL *tert*-ブチルアルコール、および 228  $\mu$ L メタノールを混合し、24 時間、50、350 rpm で振盪することでメタノリシス反応を行った。生成した脂肪酸メチルエステル濃度の測定には GC/MS (Shimadzu) を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) 突然変異導入による油脂生産酵母の油脂生産性の向上

突然変異導入によりセルレニン耐性を獲得した変異酵母約 200 株の油脂生産量を測定した所、約 15% の変異株が野生株 NBRC 0559 よりも高い油脂生産量を示すことが確認された。もっとも高い油脂生産量を示したセルレニン耐性変異酵母を NBEC0559 3-35 とした。

野生株および変異株の油脂生産量および DCW の経時変化を図 3 に示す。野生株では培養 144 時間後に最大油脂生産量 1.08 g/L を示したのに対し、変異株では培養 24 時間後に最大油脂生産量 1.24 g/L を示した。従って、油脂生産速度は野生株と変異株でそれぞれ 7.48 mg/L/h および 51.8 mg/L/h となり、変異株において、最大油脂生産量が約 1.1 倍、油脂生産速度が約 7.0 倍向上した。また、DCW については野生株と変異株で顕著な差異は確認されなかった。

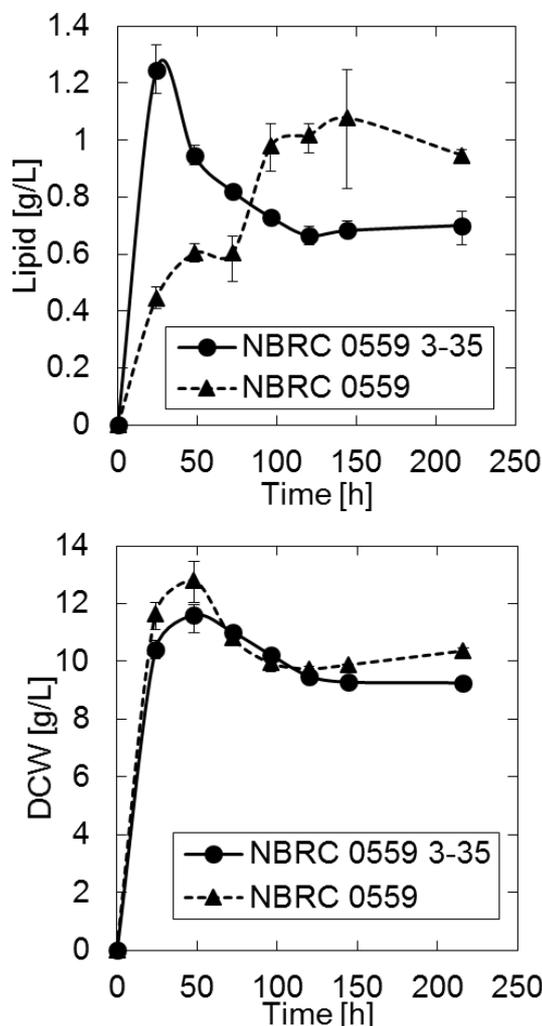


図 3 野生株および変異株の油脂生産量

#### (2) リパーゼ提示酵母の活性向上

細胞表面へのタンパク質提示量はプロモーター配列、分泌シグナル配列、およびアンカータンパク質などによって制御される。また、その組合せによってもタンパク質提示量が大きく変化することが知られている。しかし、目的のタンパク質に対して、最適なプロモーター配列、分泌シグナル配列、およびアンカータンパク質を探索するためには膨大な時間が必要となる。そこで、本研究では、種々のプロモーター配列、分泌シグナル配列、およびアンカータンパク質から成るコンビナトリアル DNA ライブラリーを作製し、*B. thermocatenulatus* 由来リパーゼを酵母 *P. pastoris* の細胞表面に過剰発現させることを試みた。

BTL 発現酵母ライブラリーに含まれる約 500 株の形質転換体のリパーゼ活性を測定した所、約 10 株の形質転換体が、一般的に使用される GAP プロモーター、 $\alpha$ -ファクターシグナル配列、および  $\alpha$ -アグルチニンアンカータンパク質を用いて BTL を発現させた酵母 GS115/pPPE\_GPBTLAG と比較して高いリパーゼ活性を示した (図 4)。

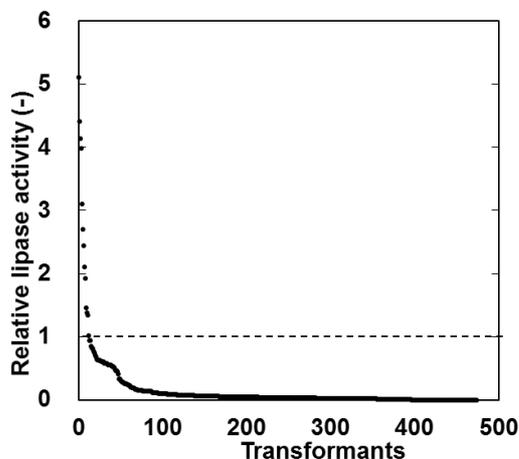


図4 BTL 発現酵母ライブラリーのリパーゼ相対活性

作製した酵母ライブラリーより特に高いリパーゼ活性を示した酵母を GS115/C68、GS115/C86、および GS115/D90 とした。取得した酵母の BTL2 発現カセットの配列、リパーゼ活性、BTL2 遺伝子コピー数、および BTL2 遺伝子転写レベルを表 1 に示す。GS115/D90 が野生株と比較して 5.0 倍と最も高いリパーゼ活性を示した。ライブラリーより取得した 3 つの形質転換体の細胞内 BTL2 コピー数は野生株と比較して差異が確認されなかった。BTL2 遺伝子転写レベルについては、野生株と比較して、GS115/C68 は低く、GS115/C86 は高く、GS115/D90 は同程度であった。ライブラリーより取得した 3 つの形質転換体全てでプロモーターは *P. pastoris* 由来であった。

表 1 BTL2 提示酵母の特性

Strain	Promoter	Secretion signal	Anchoring protein
GS115/pPPE <sub>-</sub> GPBTLAG	Pp-GAP <sup>a</sup>	Sc- <i>Mfal</i> <sup>b</sup>	Sc-SAG1_320 <sup>b</sup>
GS115/C68	Pp-PGK <sup>a</sup>	Sc- <i>FLO1</i> <sup>b</sup>	Pp- <i>GAS1</i> <sup>a</sup>
GS115/C86	Pp- <i>HXT7</i> <sup>a</sup>	Hp- <i>YPS1</i> <sup>c</sup>	Sc- <i>TIP1</i> <sup>b</sup>
GS115/D90	Pp- <i>ENO1</i> <sup>a</sup>	Hp- <i>GAS1</i> <sup>c</sup>	Sc- <i>GAS1</i> <sup>b</sup>

Strain	Relative lipase specific activity (-)	Relative gene copy number (-)	Relative transcriptionlevel (-)
GS115/pPPE <sub>-</sub> GPBTLAG	1	1	1
GS115/C68	1.92 ± 0.20	1.08 ± 0.20	0.21 ± 0.02
GS115/C86	3.89 ± 0.62	0.90 ± 0.23	6.31 ± 0.47
GS115/D90	5.04 ± 0.51	0.85 ± 0.25	0.78 ± 0.05

<sup>a</sup>Derived from *P. pastoris*

<sup>b</sup>Derived from *Saccharomyces cerevisiae*

<sup>c</sup>Derived from *Hansenula polymorpha*

(3) リパーゼ提示酵母による BDF 生産  
リパーゼ提示酵母を用いて大豆油のメチルエステル反応を行った所、メチルエステル転換率は 18.4%となり、理論収率に対して 55.0%となった。

以上より、油脂生産酵母の油脂生産性の向上、リパーゼ提示酵母の活性向上、およびリパーゼ提示酵母による BDF 生産に成功した。リパーゼによる油脂の BDF への変換において、リパーゼ活性が低いことが大きな問題となる。従って本研究で得られた成果であるリパーゼ提示酵母の活性向上は特に安価で革新的な環境調和型 BDF 生産プロセスの実現に向けた大きな成果であると考えられる。今後は、油脂生産酵母の培養コストの削減、リパーゼの安定化に向けたメタノール耐性の向上、リパーゼ提示酵母による BDF 生産条件の更なる最適化などを行うことにより、本研究で提案する安価で革新的な環境調和型 BDF 生産プロセスの実用化が期待される。

## 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)

R. Yamada, Y. Kimoto, H. Ogino, Combinatorial library strategy for strong overexpression of the lipase from *Geobacillus thermocatenulatus* on the cell surface of yeast *Pichia pastoris*. *Biochemical Engineering Journal* (2016). (査読有り) <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2016.05.005>

〔学会発表〕(計 3 件)

柏原朋美, 山田亮祐, 荻野博康, 「バイオディーゼル燃料生産のための油脂高生産酵母の育種」, 化学工学会第 81 年会 2016 年 3 月 13 日, 関西大学千里山キャンパス (大阪府吹田市)

R. Yamada, 「Global metabolic engineering of glycolytic pathway via multi-copy integration in *Saccharomyces cerevisiae*」, The 6th iBioK Asian Workshop, 2015 年 12 月 7 日, 神戸大学六甲台キャンパス (兵庫県神戸市)

山田亮祐, 木本雄介, 荻野博康, 「*Pichia pastoris* 細胞表層へのタンパク質過剰発現技術の開発」, 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 (鹿児島県鹿児島市)

〔図書〕(計 1 件)

山田亮祐, 化学工業社, 月刊「化学工業」, 「油脂生産酵母によるバイオディーゼル燃料用油脂の生産」, 2016 年, 67, 373-379.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 亮祐 (YAMADA Ryosuke)  
大阪府立大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号: 40608626