

令和元年6月10日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07673

研究課題名（和文）新規ペントース代謝酵素の解析及び基質特異性の改良とペントース発酵組換え酵母の作製

研究課題名（英文）Characterization of the novel pentose metabolizing enzymes, improvement of their substrate specificity, and prepreparation of pentose-fermenting transgenic yeast

研究代表者

米田 英伸（Komeda, Hidenobu）

富山県立大学・工学部・教授

研究者番号：50285160

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：セルロース系バイオマスからバイオエタノールを生産する方法の開発を目的として、酵母または糸状菌より新規なペントース代謝酵素を探索し、その機能解析を行った。タイのアルコール発酵に用いられているスターターから単離した酵母よりL-アラビトール脱水素酵素活性を併せ持つキシリトール脱水素酵素を見出した。また、接合菌よりL-キシロース還元酵素を見出した。これらの酵素を単一に精製し、その酵素化学的諸性質を明らかにするとともに、遺伝子クローニングを行い、発現系を構築した。それぞれの酵素遺伝子にランダム変異を導入し、変異酵素ライブラリーの中から熱安定性変異酵素を取得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セルロース系バイオマスに含まれるペントースのうち、D-キシロースからのエタノール生産に関しては、数多く検討されている。これに比べると研究例が非常に少ないL-アラビノースからのエタノール生産微生物とその代謝関連酵素に着目し、その構造と機能の一端を明らかにすることができたことに本研究の学術的な意義がある。また、本研究の成果として得られたL-アラビノース代謝酵素を用いてL-アラビノースを有効活用することで、より効率的なエタノール生産システムの開発が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In order to develop the production method of bioethanol from cellulosic biomass, we searched for enzymes involved in pentose metabolism from yeasts and filamentous fungi and characterized them. A xylitol dehydrogenase with L-arabitol dehydrogenase activity was found in a yeast which had been isolated from alcoholic starter from Thailand. An L-xylulose reductase was also found in a zygomycetous fungus. These two enzymes were purified to homogeneity and characterized, and their genes were cloned and used to construct expression system in *E. coli*. Random mutagenesis was introduced into each genes and mutant enzymes with higher thermostability were obtained.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ペントース代謝 バイオエタノール

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

バイオエタノール生産に関して、糖蜜やデンプンを原料とする場合に用いられる *S. cerevisiae* は D-グルコースを発酵できるが、ペントースを代謝する能力を持たない。よって、稲わらやもみ殻など農産廃棄物由来のセルロース系バイオマス为原料とする場合には、ペントースのうち、D-キシロース代謝能をもつ *Candida* などの酵母の利用やこれらの酵母あるいは細菌由来の D-キシロース代謝酵素遺伝子を *S. cerevisiae* に導入した遺伝子組換え酵母を活用した D-キシロースからのエタノール生産が国内外において数多く試みられていた。一方、L-アラビノースはヘミセルロースを構成する糖のなかで、D-キシロースに次いで多く含まれている。例えば、稲わらはヘミセルロース含量が高く、D-キシロースが 14.8% に対して、L-アラビノースが 4.5% 含まれている。このようなバイオマスを原料とする場合、D-キシロースに加えて L-アラビノースも発酵基質となれば、エタノール生産の効率の向上が期待できる。しかし、現在までに L-アラビノースを資化、発酵してエタノール生産可能な酵母の報告は極めて少なく (McMillan, J.D. et al. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 45/46: 569-584 (1994))、糸状菌では *Paecilomyces* sp. の 1 株のみ (Wu, J.F. et al. *Nature*, 321:887-888 (1986)) であった。また、L-アラビノース代謝酵素遺伝子を導入した酵母株の作製が報告されているが、L-アラビノースからのエタノール生産量はごく微量に過ぎない (Richard, P. et al. *FEMS Yeast Res.*, 3: 185-189 (2003))。我々は、NEDO バイオマスエネルギー先導技術研究開発の「新規エタノール発酵糸状菌を活用した稲わら等の同時糖化発酵システムの開発」(H20 年度～H23 年度) や科学研究費補助金基盤研究(C)「エタノール発酵糸状菌の育種および探索とバイオエタノール生産への応用」(H25 年度～H27 年度) において、糸状菌 *Mucor circinelloides* や *Rhizomucor pusillus* が D-グルコースに加えて D-キシロースからもエタノール生産が可能であることや、セルロースやヘミセルロースを加水分解する糖化酵素を分泌することを見出し、糖化のための前処理や酵素添加のコストを低減したうえで、セルロース系バイオマスから高効率でエタノールを生産できることを示した。さらに、本菌株からのペントース代謝酵素の精製、酵素化学的諸性質の解明、cDNA クローニング、そしてドラフトゲノム解析により、D-キシロースや L-アラビノースを D-キシロース-5-リン酸まで代謝していくことを明らかにした (Yamasaki-Yashiki, S. et al. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 78:1943-1953 (2014)、Komeda, H. et al. *FEMS Microbiol. Lett.*, 360:51-61 (2014)、Komeda, H. et al. *J. Biosci. Bioeng.*, 119:57-64 (2015))。

## 2. 研究の目的

これらのペントース代謝酵素のうち、D-Xylose reductase(XR)、Xylitol dehydrogenase(XDH)、および Xylulokinase(XK) については、*M. circinelloides* や *R.pusillus* 由来酵素の諸性質の解明と遺伝子クローニングを終えている。本 XR は L-Arabinose reductase(LAR)活性を併せ持つことから、残りの L-Xylulose reductase(LXR) および L-Arabitol dehydrogenase(LAD) を取得することができれば、遺伝子組換え酵母内で D-キシロース及び L-アラビノース代謝経路を構築することが可能となる。そこで、LXR および LAD を本糸状菌または、新規ペントース代謝微生物より新たに取得し、その酵素化学的諸性質を明らかにしたのち、他の代謝酵素遺伝子とともに酵母へ遺伝子導入することで、ペントース発酵性組換え酵母を開発することを目的とした。一方、これらのペントース代謝酵素のなかには非常に不安定であることから、これらの酵素遺伝子にランダム変異を導入する、または、X 線結晶構造解析により立体構造を決定したうえでタンパク質工学

的に変異を導入し、安定性や触媒活性が向上した変異酵素を取得することも目的とした。

### 3. 研究の方法

糸状菌 *R. pusillus* より LXR を、また、東南アジアのタイでアルコール飲料製造に用いられているスターターから取得したペントース発酵酵母 *Meyerozyma caribbica* より LAD 活性を有する XDH を精製し、その酵素化学的諸性質を明らかにした。また、XDH 遺伝子の cDNA クローニングを行い、大腸菌における発現系を構築した。LXR および XDH について、組換え大腸菌より酵素精製を行い、X線結晶構造解析のための結晶化を行った。さらに、酵素遺伝子にランダム変異を導入し、得られた変異ライブラリーより機能向上した変異酵素を取得した。

### 4. 研究成果

糸状菌 *R. pusillus* 由来の LXR について、酵素化学的諸性質を明らかにした。本酵素は、糸状菌における L-アラビノース代謝において、NADPH を補酵素として用いて L-キシロースをキシリトールに還元する酵素として見出していた酵素であるが、その他の基質としてジヒドロキシアセトンに効率よく作用したため、グリセロール代謝への関与の可能性も考えられた。しかしながら、本酵素遺伝子の糸状菌における発現は、L-アラビノースにより誘導され、D-グルコース、D-キシロース、D-マンニトールにより阻害されることを明らかにすることで、本酵素の L-アラビノース代謝への関与を明確にすることができた。一方、東南アジアのタイでアルコール飲料製造に用いられているスターターから酵母 *M. caribbica* を単離し、XDH を精製して、その酵素化学的諸性質を明らかにした。本酵素は XDH 活性に加えて L-アラビノース代謝にかかわる LAD 活性をも有する新規な酵素であった。ただ、酵素活性自体が比較的低かったため、本酵素が有する LAD 活性をタンパク質工学的に強化することを目的として、本酵素遺伝子を発現する大腸菌を作製し、組換え大腸菌から精製酵素を調製し、X線結晶構造解析のためのタンパク質結晶を調製した。併せて、酵素の安定性と触媒活性が向上した変異酵素を得ることを目的に、酵素遺伝子にランダム変異を導入し、得られた変異酵素ライブラリーから熱処理後も酵素活性を保持している熱安定性向上変異酵素を取得した。熱安定性向上変異酵素の中には、安定性の向上だけでなく、触媒活性が向上している変異酵素も存在していることが期待できる。各変異酵素遺伝子の塩基配列を決定することにより、変異部位と機能向上との関連を検討した。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Sakpetch, P., H-Kittikun, A., Kuwahara, Y., Komeda, H. & Asano, Y., Isolation of indigenous antagonistic microorganism to inhibit *Rigidoporus microporus* and other plant pathogens and analysis of the bioactive compounds, *Biological Control*, 124, 53-60 (2018).

Yamasaki-Yashiki, S., Komeda, H., Hoshino, K., & Asano, Y., Characterization and gene cloning of L-xylulose reductase involved in L-arabinose catabolism from the pentose-fermenting fungus *Rhizomucor pusillus*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 81, 1612-1618 (2017), DOI: 10.1080/09168451.2017.1320518.

Sukpipat, W., Komeda, H., Prasertsan, P. & Asano, Y., Purification and characterization of xylitol dehydrogenase with L-arabitol dehydrogenase activity from the newly isolated pentose-fermenting yeast *Meyerozyma caribbica* 5XY2, *J. Biosci. Bioeng.*, 123, 20-27 (2017), DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016.07.011

〔学会発表〕(計2件)

Yasuhisa Asano, Aem Nuylert, Hidenobu Komeda, Aran H-kittikun and Chartchai Khanongnuch, Diversities and utilization of microorganisms and plants from Thailand -investigation on alcoholic fermentation and enzymes related to plant cyanogenesis-, 2017.8.26 Bangkok, Thailand

北川哲也、米田英伸、高橋裕里香、西田洋巳、Aran H-Kittikun、浅野泰久、タイ由来のアルコール飲料用スターターにおける微生物叢の解析、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017.3.17-20 京都

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。