

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 29 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21760636

研究課題名（和文）

代謝工学的的手法による木質系バイオマス由来六炭糖・五炭糖同時発酵性酵母の育種

研究課題名（英文）

Breeding of pentose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering

研究代表者

渡邊 誠也（WATANABE SEIYA）

愛媛大学・農学部・准教授

研究者番号：90379032

研究成果の概要（和文）：木質バイオマスに含まれる五炭糖キシロースをサッカロミセス酵母に効率的に発酵させるために、細胞外の糖の取り込みとセンシング機構に注目した。ピキア酵母の推定糖輸送体遺伝子の網羅的解析から、六炭糖・五炭糖輸送能を有する遺伝子の同定に成功した。スクリーニングにより得られた有用野性株を宿主として、ピキア酵母五炭糖輸送体やサッカロミセス酵母糖センサー遺伝子の構成的な発現のキシロース発酵に与える影響を解析した。また、遺伝子組み換え酵母による木質バイオマスからのエタノール実証生産試験を行った。

研究成果の概要（英文）：

To efficiently ferment xylose derived from lignocellulosic biomass by *Saccharomyces cerevisiae*, I focused on extracellular pentose-uptake system of *Pichia stipitis*, and sugar-sensing pathway of *S. cerevisiae*. The identified xylose transporter gene(s) from *P. stipitis* and/or hexose-sensor gene from *S. cerevisiae* were introduced into a novel screened industrial strain(s) of *S. cerevisiae*, and effects on xylose-fermentation were analyzed. Furthermore, bioethanol production from water-plant was largely carried out using the genetic-engineered yeast which was constructed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：バイオマス・バイオエタノール・サッカロミセス酵母・キシロース

1. 研究開始当初の背景

日本は、京都議定書に従って1990年を基準として6%の炭酸ガス発生抑制を2008～2012年の5年間で平均達成しなければならない。石油に替わるエネルギー源として将来的に量が保証されているものはカーボン・ニュートラルであるバイオマスにおいて他にはないが、農作物からの生産には熱帯雨林伐採や食料との競合問題が存在する。リグノセルロ

ース系(木質系)バイオマスは、農業廃棄物・間伐材・建築廃材等から比較的安定な供給が見込めることから我が国にとって魅力的な資源である。穀物と木質系バイオマスで最も異なる点は含まれる糖の構成成分である。前者はほぼ全てが六炭糖グルコースからなり微生物発酵が容易であるのに対し、後者は六炭糖に加え五炭糖（主にキシロース）を含む。サッカロミセス酵母(以下、酵母と略す)は潜

在的に優れた六炭糖エタノール発酵・耐性能に加え、我が国の基幹産業である酒造技術等の転用を考えると、海外で用いられている大腸菌・ザイモナス細菌等よりも優れており、将来的に中心的な発酵性微生物となることは間違いない。残る問題は酵母野生株が資化できないキシロースも六炭糖と同時に発酵できる組み換え酵母の育種だけであり、この解決なしにはバイオエタノールの実用化は不可能である。

2. 研究の目的

他の酵母由来のキシロース還元酵素（以下、XR）とキシリトール脱水素酵素（以下、XDH）遺伝子を導入した組み換え酵母はキシロースからのエタノール発酵能を獲得できるが、その速度はグルコースに比べて非常に遅い。キシロースのゆるやかな代謝の律速の1つは細胞内への取り込みであり、複数の六炭糖輸送体はその役割を担っていることが明らかになった。しかしながら、これらの遺伝子発現を増強させてもキシロース発酵にはほとんど影響が見られない。また、細菌や植物由来の輸送体を導入する試みも細胞内での発現や膜局在性に難があり見るべき成果がない。これに替わり本研究では、他の酵母、具体的には固有のキシロース発酵能を有するピキア酵母 (*Pichia stipitis*) から新たにキシロース輸送体を単離する。またサッカロミセス酵母の糖輸送体そのものではなく、細胞外の糖のセンシングとその下流のシグナル伝達系を増強する。

3. 研究の方法

(1) ピキア酵母糖輸送体の網羅的解析

ピキア酵母のゲノム情報をもとに、ゲノム上に存在する計 37 個の糖輸送体ホモログの糖輸送能の解析を行うこととした。まず、これらの遺伝子をサッカロミセス酵母の構成的発現プロモーターPGK につなぐ形で自律複製型プラスミド YEpPGK にサブクローニングした。これを、主要六炭糖輸送体遺伝子 (HXT1-7・GAL2) が欠損したサッカロミセス酵母 KY73 変異株に形質転換した。こうして作製した遺伝子組み換え KY73 酵母を、KY73 株の唯一の生育可能な炭素源であるマルトースで前培養し、グルコース・マルトース・フルクトース・ガラクトースをそれぞれ炭素源とする最少培地で生育できるかどうかを指標に六炭糖輸送体遺伝子のスクリーニングを行った。一方五炭糖輸送体の同定は、遺伝子組み換え KY73 酵母に取り込ませたキシロース・L-アラビノースを再度細胞外へと排出させその濃度を HPLC で測定することで行った。糖輸送能と生理学的機能の関係を調べるため、種々の六炭糖・五炭糖を炭素源として生育させたピキア酵母細胞より mRNA を単離し、リアルタイム PCR 法により遺伝子発現誘導の有無を調べた。

(2) ピキア酵母五炭糖輸送体の性質の解析

ピキア酵母のキシロース輸送能をより具体的に見るために、サッカロミセス酵母 KY73 変異株に対してキシロース代謝遺伝子群の導入を行った。具体的には、ピキア酵母キシロース還元酵素 XYL1 遺伝子とキシリトール脱水素酵素遺伝子 XYL2、サッカロミセス酵母キシロースキナーゼ遺伝子 XKS を、抗生物質オーレオバシジン耐性遺伝子を染色体組み込みした (KY73X 株)。本株は、キシロースの取り込み能はないが、取り込まれたキシロースは代謝できる能力を持つことになる。KY73X 株に対して (1) で同定したピキア酵母五炭糖輸送体遺伝子を自律複製型プラスミドの形で導入し、キシロース発酵の有無を見た。

(3) 有用野生酵母株の探索

IR-2 株は高キシロース代謝能を有する実用株だが、さらに有用な野生株の探索を以下の2つの手法で行った。まず、サッカロミセス酵母 1200 株は共同研究先である A 社から供与されたものであり、熊本県の球磨焼酎製造に用いられている実用株である。六炭糖の高発酵能は知られているため、今回五炭糖発酵の宿主としての可能性を調べた。次に、(独)製品評価技術基盤機構 (NBRC) に保存されている株のうち、高エタノール発酵に関係しそうなキーワードで検索しヒットした株の高温での発酵能を比較を行った。これにより、NBRC0224 株が 35°C で比較的高い発酵能を示したことから、1200 株・NBRC0224 株に XR-XDH-XK 遺伝子を導入した 1200X 及び 0224X 株を作製した。IR-2 株に同様の操作を施した IR-2X 株と合わせて、30°C 及び 35°C でのキシロース発酵の宿主としての特性を調べた。

(4) ピキア酵母五炭糖輸送体を用いたサッカロミセス酵母のキシロース発酵の向上

同定したピキア酵母五炭糖輸送体遺伝子を野生株へ導入することを試みた。ただ、アミノ酸選択マーカーが使えないことから、抗生物質ジェネティシンを選択マーカーに、URA3 遺伝子への染色体組み込みによって導入し、キシロース発酵能を解析した。

(5) サッカロミセス酵母の糖センサーの増強

(3) において、キシロース代謝遺伝子が入った野生型酵母株にさらに外来遺伝子を導入できる系が確立できたことから、サッカロミセス酵母の六炭糖センサー遺伝子である RGT2 及び SNF3 を PGK プロモーターにつないで染色体組み込みにより導入した。

(6) リグノセルロースバイオマスからのバイオエタノール生産の実証試験

原料として、滋賀県琵琶湖において異常繁茂する水草を用いた。天日干しをして乾燥後、裁断・粉砕を行った後、2%希硫酸でヘミセ

ルコースから五炭糖成分を遊離した。その後、市販のセルラーゼ（洛東化成工業株製のエンチロン）を用いて酵素糖化を行い、IR-2X 株を用いてエタノール発酵を行った。エタノールは蒸留・膜分離により濃縮し、高濃度アルコール製造を行った。なお本研究は平成 21 年度経済産業省低炭素社会に向けた技術シーズ発掘・社会システム実証モデル事業（研究題目：琵琶湖産水草を原料としたバイオエタノールの生産実証プロセスの開発・研究代表者渡辺誠也）の中で行ったものである。

4. 研究成果

(1) ピキア酵母糖輸送体の網羅的解析

主要六炭糖輸送体として SUT1・SUT2・SUT3・HGT2・XUT1・XUT3・RGT2 が（図 1）、主要キシロース輸送体として SUT1・SUT2・SUT3・HGT2

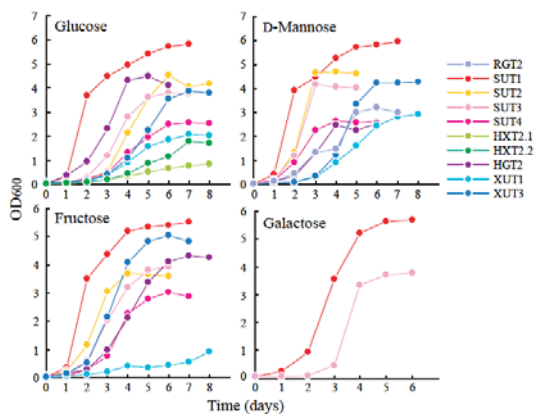


図 1 六炭糖輸送体のスクリーニング

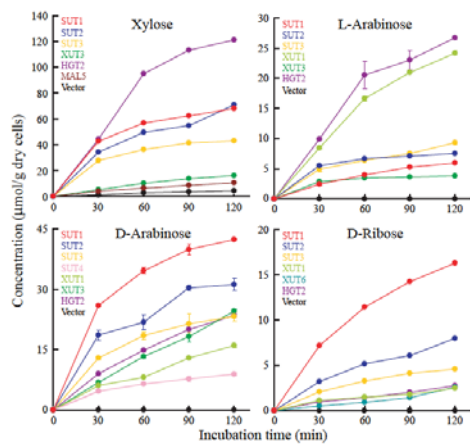


図 2 五炭糖輸送体のスクリーニング

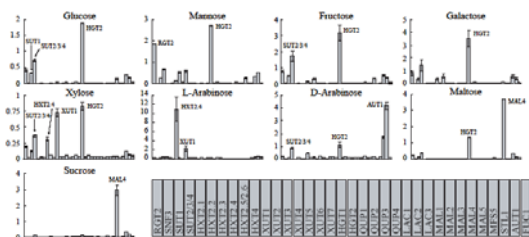


図 3 リアルタイム PCR

が（図 2 左）、主要 L-アラビノース輸送体として HGT2・XUT1 が、それぞれ新たに同定された（図 2 右）。興味深い点としては、①六炭糖・五炭糖輸送システムは相当程度リンクしている可能性がある②HGT2 は解析したほぼ全ての六炭糖・五炭糖を効率的に輸送できる③サッカロミセス酵母の RGT2 には全く糖輸送能が無いが、ピキア酵母の RGT2 は少なくともマルトースは輸送できた。これはピキア酵母の糖センシングがサッカロミセス酵母とは一部異なる可能性を示唆する。分子系統樹では、SUT1-4・RGT2・SNF3 はサッカロミセス酵母の六炭糖輸送体 HXT と同じクラスターに属する。一方で、XUT1・XUT3・HGT2 はこれとは遠く離れた関係にあり、少数見つかっている他の酵母やカビの糖輸送体と比較的近い。リアルタイム PCR 解析では、SUT と HGT2 がどの六炭糖・五炭糖の生育でも高い発現が認められ、主要な糖輸送体であると考えられた。一方、XUT1 はキシロース存在下で高発現が見られた。

(2) ピキア酵母五炭糖輸送体の性質の解析

同定したピキア酵母キシロース輸送体遺伝子のうち、SUT1-3・HGT2 を KY73X 株に導入した遺伝子組み換え酵母は、20g/L キシロースを炭素源とした発酵が確認された。特に SUT1 と HGT2 で顕著な発酵が見られ、前者は 144 時間で約 16g/L が消費され 5.5g/L のエタノールができた。後者の場合、約 11g/L が消費され 5g/L のエタノールができた。この結果より、同定した遺伝子でサッカロミセス酵母のキシロース発酵に利用できることが明らかになった。

(3) 有用野生酵母株の探索

IR-2X・1200X・0224X 株の無細胞抽出液中には顕著な XR・XDH・XK 活性が認められ、導入したキシロース代謝遺伝子の機能的な発現が確認できた。次に、キシロース資化性を見るために、キシロースを含む最小培地で 35°C において好氣的に生育させた。生育が確認できたのは 1200X と 0224X のみであり、前者は後者に比べて 5 倍以上速かった。引き続き

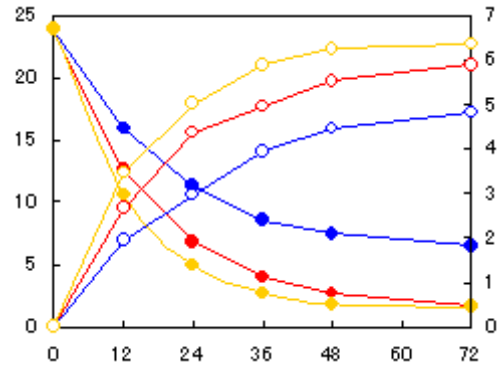


図 4 IR-2X（黄）・1200X（赤）・0224X（青）のキシロース消費（●左軸）とエタノール生産（○右軸）

いて、20g/L キシロースを炭素源として発酵実験を行った(図4)。用いた株いずれにおいてもキシロース発酵が確認されたが、特にIR-2Xと1200X株でよい結果が得られた。1200株は高温発酵について特段スクリーニングを行わなかったわけだが、予想以上に耐熱性(好熱性)があることが分かる。ただ、既に取得していたIR-2X株にはわずかに及ばない結果だった。

(4) ピキア酵母五炭糖輸送体を用いたサッカロミセス酵母のキシロース発酵の向上

サッカロミセス酵母1200X株に対して、ピキア酵母のSUT1・HGT2・SUT1/HGT2(共発現)の3つを導入して、まず20g/L及び50g/Lキシロースを含む最小培地で好氣的に生育させた(図5)。その結果、特にSUT1を単独で導入した場合で顕著な生育の向上が見られた。

引き続き20g/Lキシロースでの発酵を検討したが、現在までのところ目立った向上は確認できていない。しかしこれはYNB最小培地とメディウム瓶を用いた予備的試験であり、今後栄養培地や小型発酵槽を用いた試験で結果が大きく変わることは十分にあると考えている。

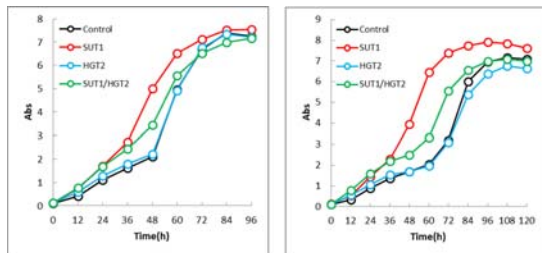


図5 2% (左) 及び5%キシロース (右) での好氣的成育

(5) サッカロミセス酵母の糖センサーの増強

サッカロミセス酵母のRGT2及びSNF3遺伝子を、サッカロミセス酵母1200X株で構成的に発現させたところ、20g/L及び50g/Lキシロースを含む最小培地での好氣的生育が有意に向上した(図6)。

引き続き20g/Lキシロースでの発酵を検討したところ、いずれの場合もコントロールに比べてキシロース消費速度が向上するという

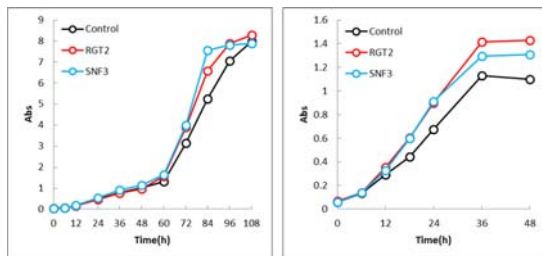


図6 2% (左) 及び5%キシロース (右) での好氣的生育における糖センサー増強の影響

結果を得た。

(6) リグノセルロースバイオマスからのバイオエタノール生産の実証試験

原料3kgを30Lスケールで希硫酸・セルラーゼ併用による水草の糖化試験を行った場合、75%程度の糖化率を達成することができた。糖濃度は、グルコース22.5g/L、キシロース8.1g/L、アラビノース2.9g/Lだった。続いて、IR-2X株によりエタノール発酵を実施したところ、エタノール濃度11.6g/L(100%換算で約350mL)、発酵効率68%だった。XR-XDH-XKを導入していないコントロール株ではキシロースは全く発酵されなかった。このことから、本研究で開発した遺伝子組み換え酵母菌が実証試験に十分耐えうるレベルにあることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① Khattab, S. M. R., Watanabe, S., Saimura, M. and Kodaki, T. A novel strictly NADPH-dependent *Pichia stipitis* xylose reductase constructed by site-directed mutagenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404 (2): 634-637. (2011) (査読有)
- ② 渡辺誠也 真核微生物によるペクチン成分の代謝経路解明と応用展開 バイオサイエンスとインダストリー 69 (4) 294-298 (2011) (査読有)
- ③ Watanabe, S. Generation of *Saccharomyces cerevisiae* capable to ferment hexoses and pentoses derived from lignocellulosic biomass by protein- and metabolic-engineering. Report of the Noda Institute for Scientific Research. No. 54: 55-56. (2010) (査読無)
- ④ 渡辺誠也 タンパク質工学を用いたキシロース発酵性サッカロミセス酵母の育種 日本醸造協会誌 104 (7) 510-515 (2009) (査読有)

[学会発表] (計8件)

- ① 渡辺誠也 タンパク質工学および代謝工学に基づいた木質系バイオマス由来六炭糖・五炭糖発酵性酵母の育種 第1回CSJ化学フェスター2011世界化学年記念大会—新化学技術推進協会(JACI)奨励研究講演会 2011年11月14日 早稲田大学・東京
- ② 渡辺誠也 タンパク質工学および代謝工学に基づいた木質系バイオマス由来六炭糖・五炭糖発酵性酵母の育種 野田産業科学研究所研究助成研究成果報告会 2011年5月31日 東京會館・東京
- ③ Watanabe, S., Sawayama, S. and Makino,

K. Pentose-metabolizing yeast technology for carbon neutral. 2011 AAAS (American Association of the Advancement of Science) Annual Meeting Exhibits. 2011年2月17-21日 ワシントンDC・アメリカ

- ④ 渡辺誠也 水草(カナダモ)からのバイオ燃料(エタノール)の生産と利用 (株)メガセミナー主催 藻類系バイオマスの培養と利用技術 2010年10月27日 機械振興会館・東京
- ⑤ 渡辺誠也 六炭糖・五炭糖同時発酵性サッカロミセス酵母菌の育種戦略 2010年度日本農芸化学会大会 2010年3月30日 東京大学・東京
- ⑥ 渡辺誠也 琵琶湖産水草を原料としたバイオエタノールの生産実証プロセスの開発 経済産業省主催 平成20年度低炭素技術発掘・実証プロジェクト事例報告会 2010年3月2日 エル大阪・大阪
- ⑦ 渡辺誠也 琵琶湖に異常繁茂する水草(カナダモ)からのバイオエタノールの大量精製技術 (株)技術情報センター主催 セミナー「藻類の特性とバイオ燃料生産に関する技術動向」2009年12月10日 総評会館・東京
- ⑧ 渡辺誠也 リグノセルロース系バイオマスからのバイオエタノール生産 JST・京都大学主催 新技術説明会 2009年9月8日 JSTホール・東京

〔図書〕(計2件)

- ① Watanabe, S. and Makino, K. INTECH OPEN ACCESS PUBLISHER Protein Engineering. 2012, 291-306 (総頁344)
- ② 渡辺誠也 シーエムシー出版 産業酵素の応用技術と最新動向 2009, 235-244 (総頁345)

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

- ①名称: 五炭糖輸送体
発明者: 渡辺誠也
権利者: 京都大学
種類: 特許権
番号: PCT/JP2010/064962
出願年月日: 2010年9月1日
国内外の別: 海外
- ②名称: 五炭糖輸送体
発明者: 渡辺誠也
権利者: 京都大学
種類: 特許権
番号: 特願2009-203362
出願年月日: 2009年9月3日
国内外の別: 国内

○取得状況(計1件)

名称: 変異型キシリトールデヒドロゲナーゼ酵素、これを産生する微生物、該酵素または微生物を用いたキシリトールをキシロロースに変換する方法

発明者: 牧野圭祐、小瀧努、渡辺誠也、和田啓男

権利者: 京都大学・信和加工(株)

種類: 特許権

番号: 特許第4453869号

取得年月日: 2010年2月12日

国内外の別: 国内

〔その他〕

○新聞報道

- ①中日新聞 2009年11月14日朝刊18面
- ②中日新聞 2009年11月12日夕刊11面
- ③毎日新聞 2009年10月20日朝刊23面
- ④日本経済新聞 2009年6月12日
- ⑤産経新聞 2009年5月7日夕刊1面
- ⑥読売新聞 2009年4月19日朝刊25面
- ⑦朝日新聞 2009年4月2日夕刊1面

○テレビ報道

- ①NHK2010年2月2日おうみ発610
- ②NHK2009年12月4日おはよう関西
- ③びわ湖放送 2009年11月21日滋賀経済NOW
- ④読売テレビ 2009年9月8日ニュースten
- ⑤関西テレビ 2009年9月8日ニュースアンカー
- ⑥読売テレビ 2009年9月5日ウエークアップ!ぷらす
- ⑦TBS テレビ 2009年6月2日総力報道! THE NEWS
- ⑧テレビ大阪 2009年5月26日ニュースBIZ
- ⑨NHK2009年5月10日朝のニュース
- ⑩NHK2009年4月30日おうみ発610

○その他

- ①月刊ビジネスアスキー2010年1月号掲載
- ②関西ウィンドウ vol. 16 No. 593に掲載

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 誠也 (WATANABE SEIYA)

愛媛大学・農学部・准教授

研究者番号: 90379032