

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23603003

研究課題名(和文) 酵素および生物機能高度化によるバイオエタノール高効率生産酵母の開発

研究課題名(英文) Development of highly efficient bioethanol production yeast by genetic engineering

研究代表者

小瀧 努 (KODAKI, TSUTOMU)

京都大学・エネルギー理工学研究所・准教授

研究者番号：70170264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)： 高効率なキシロースからのエタノール生産を目的として、タンパク質工学的手法によりキシロース代謝関連酵素の補酵素要求性を変換した酵素を種々作製した。これらの機能変換酵素を種々の組み合わせにより酵母内で発現させることにより、エタノール変換効率の更なる効率化が認められる結果を得た。また、キシロース発酵酵母のキシローストランスポーター遺伝子の導入、および五炭糖代謝経路関連酵素遺伝子の導入によりさらなるキシロース消費速度の増大を明らかにした。

研究成果の概要(英文)： Since xylose is one of the major fermentable sugars present in lignocellulosic biomass, the efficient fermentation of xylose is required to develop economically viable processes for producing bioethanol. In this study, construction of the strictly NADPH dependent xylose reductase from *Pichia stipitis* was succeeded by site directed mutagenesis. The more efficient xylose fermentation and the decrease of xylitol excretion was observed by introducing the strictly NADPH dependent XR with the strictly NADP+ dependent XDH. Next, by introducing many putative genes of xylose transporters of *P. stipitis*, the XUT1 and SUT1 genes of *Pichia stipitis* were shown to be the most effective on xylose consumption. Furthermore, Overexpression of the enzymes involved in the pentose phosphate pathway was shown to have positive effects on xylose fermentation.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：バイオマスエネルギー

キーワード：バイオエタノール 酵母 キシロース タンパク質工学

1. 研究開始当初の背景

バイオマスのエネルギー物質としての更なる有効利用が求められており、とりわけ、バイオエタノールの生産・利用拡大が世界的規模で行われている。しかしながら、現在バイオエタノールは主に農産物を原料として生産されているため、食糧価格高騰等の弊害がおきている。この問題を解決するためには、木質バイオマスなどの非食物系バイオマスからのバイオエタノールの生産が必要であるが、そのためには、多くのプロセスにおける高効率化が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、すでに作成しているキシロース-エタノール高効率変換遺伝子組換酵母を出発生物材料として、たんぱく質工学、生物工学などの手法により、タンパク質機能および生物機能高度化を行うことにより、非植物系バイオマス由来の糖をより高効率にエタノール変換できる遺伝子組換酵母の作成を行い、関連研究による糖化プロセスの高効率化の成果と組み合わせることにより非食物系バイオマスからの高効率バイオエタノール生産系の開発を目指した。バイオマス由来の糖として、グルコースなどのヘキソース（六炭糖）と共に、キシロース等のペントース（五炭糖）も生産される。酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）はエタノール生産能は優れているが、ペントースを炭素源として用いる能力がない。しかしながら、他のキシロース代謝酵母 *Pichia stipitis* のキシロース還元酵素（xylose reductase; XR）およびキシリトール脱水素酵素（xylitol dehydrogenase; XDH）遺伝子を導入した遺伝子組換酵母は、キシロース代謝能を獲得する。ところが、この遺伝子組換酵母のエタノール生産能は満足できるものではない。その原因の一つとして、XR と XDH の補酵素依存性の違いによる細胞内酸化還元環境のアンバランスが指摘されてきた。すなわち、前者は両補酵素とも利用できるのに対し後者は NAD^+ 依存性を示す。そこでこの問題を解決するために、

XDH をターゲットとしてタンパク質工学的な手法を用いて NAD^+ 依存型変異体の作成を試み、完全に NAD^+ 依存型となった XDH を世界で始めて作成することに成功した。さらに、これら機能変換 XDH および野生型 XR を酵母 *S. cerevisiae* に形質導入することにより、野生型の両酵素を導入した酵母と比較して変換効率が大幅に向上している遺伝子組換酵母の作成に成功した。また、野生型の両酵素を導入した酵母ではキシリトールの排出が問題となっていたが、本組換酵母ではキシリトールの排出はほとんど認められなかった。本研究では、上記のすでに作成に成功している高効率キシロース-エタノール変換遺伝子組換酵母のエタノール変換効率をたんぱく質工学および生物工学的手法により、さらに効率化することを最重要の目的とした。すでに述べたように、キシロース代謝において鍵となる酵素のうち XDH の補酵素要求性を変換することにより、エタノール変換効率化を達成した。本研究では、まず、もう一つのキ-酵素である XR の補酵素要求性変異酵素の構築をタンパク質工学的な手法により行なった。その後、XDH および XR の補酵素要求性変異酵素を様々な組み合わせで酵母内で発現させることにより、最適な組み合わせを見出し、更なる効率化を目指した。また、キシロース エタノール変換効率の上昇には、キシロースの取り込み速度を高める必要があるといわれている。すなわち、元来 *S. cerevisiae* はキシロースを代謝できないため、キシロース専用のトランスポーターを発現していない。現状の組換酵母ではグルコース用のトランスポーターが使用されている。キシロース代謝酵母 *P. stipitis* の全ゲノム配列が明らかにされた結果、キシローストランスポーターの可能性のある多くの遺伝子が同定された。それらの遺伝子を *S. cerevisiae* で発現させることにより、キシロース取り込み速度を上昇させ、その結果キシロース エタノール変換効率の上昇を目指した。さらに、キシロースからエタノールへの代謝経路に含まれるペントースリン酸

経路に關与する酵素遺伝子を高発現させることにより、キシロース エタノール変換効率の上昇を目指した。

3. 研究の方法

本研究ではまず XR について、他の類似反応を行う酵素との配列比較の結果から、変異部位の候補を探索し、223 番目と 237 番目のグルタミン酸をターゲット部位として変異を導入した。次に、271 番目のセリンをアラニンに変換させる変異も導入し、酵素活性におよぼす影響を評価した。さらに、NADPH 依存 XR とともに、すでに構築に成功している補酵素要求性を変異させた XDH を酵母に形質導入して、補酵素要求性の異なった種々の XR および XDH の組み合わせによるエタノール生産性への効果をたしかめた。また、キシロースの取り込み能の向上を目指して、キシロース発酵酵母である *P. stipitis* のゲノム配列を参考にしてキシローストランスポータ と推測される遺伝子を探索した。それらのトランスポータの候補遺伝子の中から、*XUT1* および *SUT1* を含むいくつかの遺伝子を *S. cerevisiae* 内で発現させ、キシロースの代謝能を測定した。さらに、キシロースからエタノールに至る代謝活性をさらに高めることを目的に、ペントースリン酸経路に關与する 4 つの酵素遺伝子 (*PK11*, *RPE1*, *TAL1*, *TKL1*) を *S. cerevisiae* より単離し、4 つの酵素遺伝子を同時に高発現させることができるプラスミドを構築した。そのプラスミドを上記の機能変換した XR および XDH を発現させた酵母に形質導入することにより、それら 4 つの酵素の高発現の効果を確かめた。

4. 研究成果

XR の 223 番目および 237 番目のグルタミン酸 (E) 残基に関しては、いずれも、アラニン (A)、アスパラギン酸 (D) およびグリシン (G) に置換した変異酵素を作成した。酵素活性を測定した結果 (図 1)、223 番目の残基を変異した酵素 (E223A, E223D, E223G) ではいずれの変異酵素もほぼ

NADH 存在下にはほとんど活性を示さなかったが、NADPH のみに依存した活性を示した。しかしながら、酵素活性は野生型酵素より減少していた。237 番目の残基を変異した酵素 (E237A, E237D, E237G) では NADPH 存在下でも NADH 存在下でも活性を示し、その傾向は野生型酵素とほとんど同様であった。また、271 番目のセリン (S) をアラニン (A) に置換したもの、およびスレオニン (T) に置換したものを作成した。スレオニンに置換した変異酵素 (S271T) の活性は低かったが、アラニンに置換した変異酵素 (S271A) は NADPH および NADH に対する依存性は野生型の酵素と同様の傾向を示し、NADPH 存在下の酵素活性は野生型のものより約 1.4 倍増加していた。以上の結果より、237 番目の残基を変異させた酵素に 271 番目の残基の変異をさらに導入することにより酵素活性の上昇が期待できると考えられるので、E223A, E223D および E223G にさらに 271 番目の残基にアラニンを変異導入した AA, DA および GA を作成した。それらの変異酵素の酵素活性を測定した結果 (図 1)、いずれの変異酵素も E223A, E223D および E223G より酵素活性が上昇しており、特に DA では NADPH 存在下の酵素活性は野生型酵素より高い活性を示した。これらの結果は、タンパク質工学的手法により完全に NADPH 依存型となった変異 XR の構築に成功したことを示している。

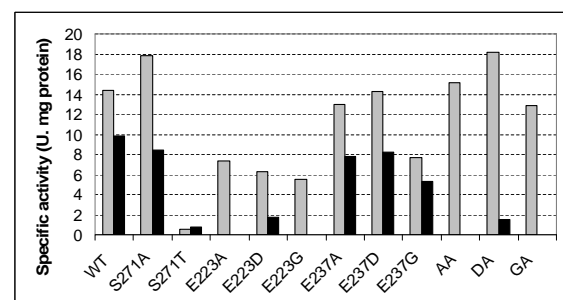


図 1 種々の変異 XR の NADPH および NADH 存在下における活性比較
灰色: NADPH 黒色: NADH

次に、この NADPH 依存 XR とともに、すでに構

築に成功している補酵素要求性を変異させた XDH を酵母に形質導入して、補酵素要求性の異なる種々の XR および XDH の組み合わせによるエタノール生産性への効果をたしかめたところ、AA, DA および GA のいずれの酵素を発現させた場合にも、野生型の XR を発現させた場合よりエタノール発酵効率の上昇が見られたが、それらのうち、DA を発現させた場合が最も効果があることが示された (図 2)。

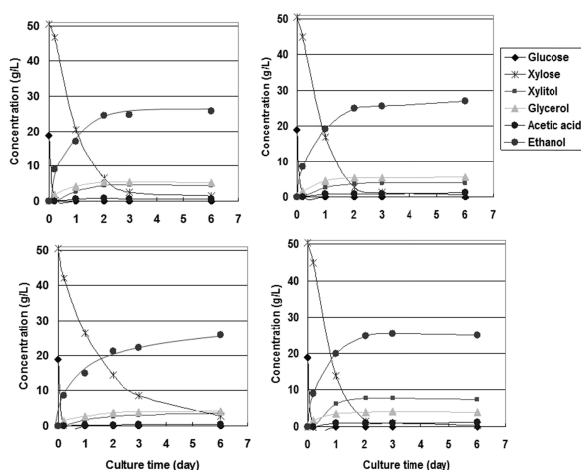


図 2 種々の変異 XR 発現酵母におけるエタノール発酵効率

左上:AA 右上:DA 左下:GA 右下:野生型

また、キシロース発酵酵母である *P. stipitis* のキシローストランスポーターおよびその関連遺伝子と推測した多くの遺伝子を、*S. cerevisiae* に導入してキシロース消費の加速効果を比較したところ、それらのうち *XUT1* および *SUT1* 遺伝子を発現させた場合に、キシロースの代謝速度の促進が顕著に認められ、他の関連遺伝子を発現させた場合より効果のあることが明らかとなった。

さらに、ペントースリン酸経路に關与する 4 つの酵素遺伝子 (*PK11*, *RPE1*, *TAL1*, *TKL1*) を同時に高発現させることにより、機能変換酵素 (XR および XDH) の発現に加えて、ペントースリン酸経路関連酵素遺伝子の高発現によりキシロース発酵速度が大幅に増加することを明らかにした。

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 3 件)

Boost in bioethanol production using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* with mutated strictly NADPH-dependent xylose reductase and NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase. Khattab, S.M.R., Saimura, M., and Kodaki, T. *J. Biotech.* (査読有) 165, 153-156 (2013) DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.03.009

Effects of NADH-preferring xylose reductase expression on ethanol production from xylose in xylose-metabolizing recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. Lee, S-H., Kodaki, T., Park, Y-C., and Seo, J-H. *J.biotech.* (査読有) 158, 184-191 (2012) DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.06.005

A novel strictly NADPH-dependent *Pichia stipitis* xylose reductase constructed by site-directed mutagenesis. Khattab, S.M.R., Watanabe, S., Saimura, M., and Kodaki, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有) 404, 634-637 (2011) DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.12.028

[図書] (計 1 件)

Construction of a novel strictly NADPH-dependent *Pichia stipitis* xylose reductase by site-directed mutagenesis for effective bioethanol production. Khattab, S.M.R., Watanabe, S., Saimura, M., Afifi, M.M., Zohri, A.-N.A., Abdul-Raouf, U.M., and Kodaki, T. *Green Energy and Technology "Zero-Carbon Energy Kyoto 2010"* 117-122 (2011)

6. 研究組織

研究代表者

小瀧 努 (KODAKI TSUTOMU)

京都大学・エネルギー理工学研究所・准教授

研究者番号 : 70170264