

海洋バイオマス为原料とした出芽酵母によるエタノールの生産

河 井 重 幸*

1. はじめに

国土は狭隘だが広大な海域を有するわが国にとって、海洋バイオマス(海藻類)は有望かつ国産可能な未利用資源である。化石燃料資源に乏しいわが国にとって、この未利用国産資源を原料としたガソリン代替燃料や有用化合物の生産系の構築は重要な課題である。再生可能資源の中で、バイオマスのみが液体燃料生産の原料たり得るという事実は特筆に値するだろう。海藻類は、緑藻類、紅藻類、および褐藻類に大別できる。緑藻類はグルカン(グルコースのポリマー；セルロースやデンプンなど)を、紅藻類は寒天(アガロース、アガロペクチン)、カラギーナン、およびグルカンを、褐藻類はマンニトール、アルギン酸、およびグルカン(セルロースやラミナリンなど)を炭水化物成分として含有する。海藻類のグルカン含量(22~25%乾重量；以下同様)は、木質バイオマス(木材、麦わら、トウモロコシ茎葉など)のグルカン含量(30~46%)よりも低い傾向にある¹⁾。グルカンはグルコースのポリマーであるため、グルカンの利用は比較的容易であろう。海藻類のグルカン以外の炭水化物を利用するテクノロジーが必要とされている。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、古くからパン、ビール、ワイン、日本酒などの生

産で利用されてきた伝統的な発酵微生物である。その安全性は人類と共に歩んできた歴史が証明している。さらに出芽酵母は、宿主ベクター系をはじめ大規模生産系などのインフラストラクチャーも整備されている、酸性や各種阻害物質に耐性、ファージ感染の恐れがないなど多くの長所を有する優れたエタノール生産微生物である。近年では、米国やブラジルにおいて、出芽酵母を用いた各々トウモロコシやサトウキビを原料とした大規模なエタノール生産が実施されている。しかし、海洋バイオマス資源利用の観点からは、出芽酵母は褐藻類主要成分であるアルギン酸やマンニトール、さらには紅藻類主要成分である寒天の構成単糖 3,6-アンヒドロガラクトースを資化しないという問題があった。

とはいえ、最近のバイオテクノロジーの進歩により、かかる問題は過去形になりつつある。これら難利用性炭水化物を資化できる特殊な細菌の基礎研究により明らかとなった資化経路を出芽酵母に導入するという手法が、一つの流れになっている。本稿では、アルギン酸とマンニトールの利用に焦点を絞り、筆者の成果も含めた最近の内外の研究動向を紹介する。

2. 出芽酵母を用いたアルギン酸構成単糖からのエタノール生産

2.1 細菌におけるアルギン酸代謝経路

アルギン酸はマンヌロン酸とグルロン酸からなるポリウロン酸であり、Gブロック(G

* Shigeyuki Kawai 京都大学農学研究科食品生物科学専攻
助教 博士(農学)
Production of Ethanol from Marine Biomass by Using a Budding Yeast

ルロン酸残基のみから構成), M ブロック (マンヌロン酸残基のみから構成), および MG ブロック (マンヌロン酸残基とグルロン酸残基が混在) から構成される。酵母や大腸菌など通常の微生物はアルギン酸を資化できない。しかし, Murata らのグループは, アルギン酸資化能をもつ細菌 *Sphingomonas* 属細菌 A1 株を更に改変することによるアルギン酸からのエタノール生産に成功している²⁾。また, 米国のグループによっても, 改変した大腸菌を用いたアルギン酸からのエタノール生産が報告されている³⁾。

次のステップは, 出芽酵母にアルギン酸利用能を賦与するテクノロジーの開発である。まずは, *Sphingomonas* 属細菌 A1 株におけるアルギン酸代謝を例に, アルギン酸代謝の仕組みを概説する (図 1)⁴⁾。細胞内において, アルギン酸は, エンド型およびエキソ型アルギン酸リアーゼの作用によりウロン酸へと分解され, このウロン酸は非酵素的にアルギン酸構成単糖 DEH (4-デオキシ-L-エリスロ-5-ヘキソセウロース ウロン酸) へと変換され, NADPH/NADH 依存レダクターゼ (A1-R/A1-R') により KDG (2-ケト-3-デオキシ-D-グルコン酸) へと還元される^{5,6)}。さらに, キナーゼ (A1-K) によるリン酸化により KDPG (2-ケト-3-デオキシホスホグルコン酸) を経て, KDPG からアルドラーゼ (A1-A) の作用によりピルビン酸とグリセルアルデヒド-3-リン

酸が生成する。グリセルアルデヒド-3-リン酸は解糖系によりピルビン酸へと代謝される。すなわち, 1 分子のウロン酸が 2 分子のピルビン酸へと代謝される。

2. 2 出芽酵母へのアルギン酸構成単糖の利用能付与

出芽酵母にアルギン酸資化能を付与するには, 上記遺伝子をプロモーターとターミネーターの間に挟み込んだ形で出芽酵母に導入する必要がある。さらに問題なのはアルギン酸の取り込みである。*Sphingomonas* 属細菌 A1 株は, ABC トランスポーターシステムを介してアルギン酸を細胞内に取り込むと考えられており⁷⁾, その取り込みに関わる ABC トランスポーターシステムの立体構造も決定されている⁸⁾。しかし, 出芽酵母への ABC トランスポーターの導入は困難と予想された。細胞外でアルギン酸をアルギン酸構成単糖 DEH にまで分解し, その DEH を出芽酵母に取り込ませ, DEH を資化させるという手法が想定された。著者らも本アプローチで研究を進めていたが, 最初に成功したのは米国の Enquist-Newman らだった⁹⁾。Enquist-Newman らは, アルギン酸を資化するカビ *Asteromyces cricatus* に着目し, アルギン酸を含む培地での培養時に特異的に発現する遺伝子を探索するというアプローチと, 同カビ由来の cDNA ライブラリーを用いるというアプローチを併

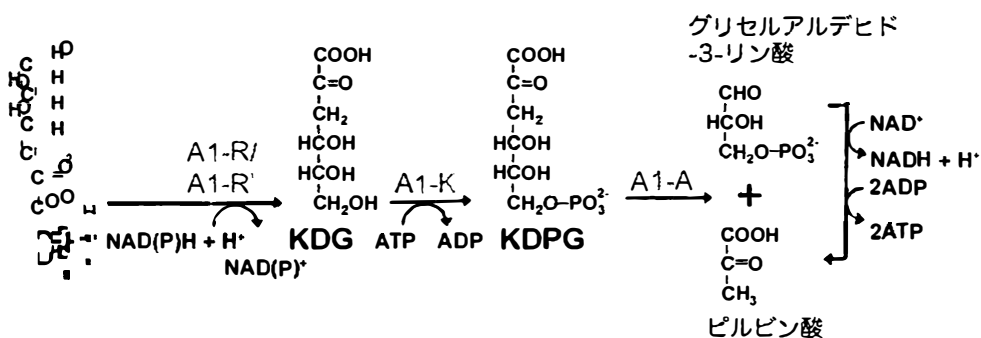


図1 *Sphingomonas*属細菌A1株におけるアルギン酸代謝の鍵反応
A1-RとA1-R'は別々の遺伝子にコードされており, 前者はNADPHに対して, 後者はNADHに対して, それぞれ親和性が高いが^{5,6)}, A1-R'の方がNADPHとNADHの両者に生理的に作用し得ると予想される。

用することにより DEH 取り込み遺伝子を特定した。本遺伝子ならびに NADPH/NADH 依存レダクターゼ(海洋細菌 *Vibrio harvey* 由来), キナーゼ(大腸菌由来), アルドラーゼ(海洋細菌 *Vibrio splendidus* 12B01 由来)各遺伝子のコドンを出芽酵母型に変換した上でプロモーターとターミネーターに挟み込んだ形で出芽酵母のゲノムに挿入した。作成された出芽酵母を4~6ヵ月間かけて DEH を炭素源とする培地で継体培養することにより DEH 資化能を向上させた。この100~150世代の培養過程で、ダブリングタイムが当初の16~64時間から、4~5時間にまで低減した(生育速度が向上した)。さらに、無酸素条件でも生育できる株を選抜し、DEH からエタノールを生産できる出芽酵母の作出に成功した。本株に、後述する方法でマンニトール資化能も付与し BAL3125 株を得た。最終的に得られた BAL3215 株は、98 g/L の糖(DEH とマンニトールをモル比 1:2 の比率で含む)から 36.2 g/L のエタノールを生産した⁹⁾。

3. 出芽酵母を用いたマンニトールからのエタノール生産

3. 1 転写コリプレッサー Tup1-Cyc8 への変異による出芽酵母へのマンニトール利用能の付与

出芽酵母は、マンニトールの代謝に必要なマンニトール-2-デヒドロゲナーゼ遺伝子(*YEL070W*, *YNR073C*)をゲノム上に保有するにも拘わらず、マンニトールを資化しないことが多くの酵母株で示されてきた。他方、他の一部の酵母、すなわち酵母 *Pichia angophorae* や酵母 *Saccharomyces paradoxus* NBRC 0259, *Kuraishia capsulata* NBRC 0721, *Kuraishia capsulata* NBRC 0974, *Ogataea glucozyma* NBRC 1472, *Ogataea minuta* NBRC 1473, および *Debaryomyces hansenii* NBRC 0794 によるマンニトールからのエタノール生産例が知られていた^{10, 11)}。出芽酵母ポリプロイド BB1

株のように、例外的にマンニトール資化性を示す出芽酵母株も知られていた¹²⁾。酵母のマンニトール資化に関して、この BB1 株や *S. paradoxus* NBRC 0259-3 株(同 NBRC 0259 株をマンニトール含有栄養培地で3日間培養した株。親株の同 NBRC 0259 株よりも優れたエタノール生産性を示す¹¹⁾)の研究により、マンニトール資化にはミトコンドリアの呼吸機能と酸素を必要とすることが分かっていた。その理由として、マンニトール資化過程における最初のマンニトール-2-デヒドロゲナーゼ反応により余剰還元力($\text{NADH} + \text{H}^+$)が生じるが、この還元力の処理に呼吸が必要であるためと推察されている^{11, 12)}。

著者らは、出芽酵母 BY4742 株を、マンニトールを唯一の炭素源とする合成液体培地で長時間(6日間)培養し続けると、増殖が見られるようになることを見出した¹³⁾。同様に、約5百万個の出芽酵母 BY4742 株細胞をマンニトールを唯一の炭素源とする合成固体あるいは栄養固体培地に塗布し、長時間(各々7, 14日間)保温することにより十個程度のコロニーが形成されることを見出した。これは、何らかのメカニズムにより、長時間の培養中に出芽酵母がマンニトール資化能を獲得したことを意味した。なお、このマンニトール資化能獲得現象は他の出芽酵母株でも観察された。マンニトール資化能を獲得した株の多くが Ca^{2+} に依存したフロキュレーション(酵母細胞が互いに凝集する現象)を示した。これらのマンニトール資化能獲得株によるマンニトール資化には、やはりミトコンドリアと酸素が必要であることが示された。なお、凝集した酵母細胞によるエタノール生産性が低かったために、マンニトール培地で凝集しない MK3619 株と MK4416 株も選抜した。100 g/L のマンニトールを含む液体培地の中で、両株共に 40 g/L のエタノールを11日間の培養で生産した。ただし、これはグルコースを用いた場合(40 g/L のエタノールを2日間の培養で生産)よりもエタノール生産速度(マン

ニトール利用性)が明らかに低かった¹³⁾. マンニトール利用性をグルコース並みに向上させる必要がある. なお, MK4416 株の方が MK3619 株よりも優れた耐塩性を示した¹³⁾. 海洋バイオマス由来のマンニトールを利用する場合は, 海水由来の塩が混入する恐れもあるので, この耐塩性の高さは海洋バイオマス由来のマンニトールを利用する上で有用と期待された.

得られた株を今後 to 利活用していくためには, どのようなメカニズムでマンニトール資化能を獲得したのかを詳らかにする必要がある. これには, 上述したフロキュレーションがヒントとなった. MK3619 株などのマイクロアレ解析 (全転写物の分析) の結果は, 転写コリプレッサー成分 Tup1 遺伝子の欠損株 (本欠損株もフロキュレーションを示す) における既報の転写パターンと類似していた. Tup1 は Cyc8 と転写コリプレッサー複合体を形成し, 多くの遺伝子の転写制御に関わる. そこで, Tup1 遺伝子への変異によりマンニトール資化能が獲得されたと仮定し, Tup1 遺伝子欠損株のマンニトール資化能を調べたところ, 確かに同欠損株がマンニトール培地で生育することを初めて確認した¹³⁾. 実際, 得られたマンニトール資化能獲得株 14 株のうち, MK3619 株を含む 8 株において Tup1 遺伝子に変異が認められた. この 8 株において, Tup1 遺伝子以外の箇所への変異によりマンニトール資化能が獲得された可能性を排除するために, これら 8 株 (それぞれに特有の表現型 [マンニトール培地で凝集する, しないなど] を示す) から変異をもつ Tup1 遺伝子をクローニングし, Tup1 遺伝子欠損株に再導入して各々に特有の表現型を確認することによって, 確かに Tup1 遺伝子への変異によりマンニトール資化能が獲得されたことを明らかにした¹³⁾. 残りの 6 株のうち, MK4416 株を含む 4 株には Cyc8 遺伝子に変異が見られた. 同様の手法で Cyc8 遺伝子への変異がマンニトール資化能獲得の要因であ

ることも明らかにした. 興味深いことに, 残りの 2 株には Tup1 および Cyc8 両遺伝子に変異が見られず, また継体培養中にマンニトール資化能が失われた. この結果から, 両 2 株がゲノムへの変異ではなくエピジェネティクスな効果によりマンニトール資化能を獲得したと推察された¹³⁾.

3. 2 関連遺伝子の強制発現による出芽酵母へのマンニトール利用能の付与

Enquist-Newman らも, マンニトール資化能を獲得した 3 つの出芽酵母株 (Lalvin*, Pasteur Red*, および SEY/Dip*) を得た (どのような方法でこれらを得たかは不明)⁹⁾. Enquist-Newman らは, これらの獲得株において転写量が向上している遺伝子に着目し, マイクロアレ解析によって, マンニトール-2 デヒドロゲナーゼホモログ (Dsfl/YNR073C), MFS トランスポーターホモログ (Hxt13/Hxt17), アルドラーゼ-1-エピメラーゼホモログ (YNR071c) の各遺伝子を最も転写量が向上している遺伝子として特定した. 本知見に基づき, マンニトール-2-デヒドロゲナーゼホモログ遺伝子 (YNR073C) と MFS トランスポーターホモログ遺伝子 (HXT17) を強制発現させることで出芽酵母にマンニトール利用能を付与できることを示し, 上述した BAL3215 株を構築した⁹⁾.

4. おわりに

液体燃料は「いつか」は枯渇する. 液体燃料の原料たり得るバイオマスを原料とした燃料や有用化合物の生産に関する研究は, やはり重要であり継続および発展させる必要がある. 地球上は広大な海域で覆われており, 特に日本は四方を海に囲まれている. したがって, 海洋バイオマスの利活用研究は大きな可能性を秘めていると期待される. 海洋バイオマスのうち, 褐藻類由来バイオマスの主成分であるアルギン酸やマンニトールに関しては, 最近, 大きな進展が見られ, 更には出芽酵母を宿主として用いた系においても本稿で紹介

した通り見るべき知見が蓄積されつつある。
本稿が当該現状理解の一助となれば幸いである。

参考文献

- 1) Yanagisawa, M., Kawai, S., Murata, K. Strategies for the production of high concentrations of bioethanol from seaweeds: production of high concentrations of bioethanol from seaweeds. *Bioengineered*, **4**, 224-235 (2013).
- 2) Takeda, H., Yoneyama, F., Kawai, S., Hashimoto, W., Murata, K. Bioethanol production from marine biomass alginate by genetically engineered bacteria. *Energy Environ. Sci.*, **4**, 2575-2581 (2011).
- 3) Wargacki, A.J. *et al.* An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae. *Science*, **335**, 308-313 (2012).
- 4) Murata, K., Kawai, S., Mikami, B., Hashimoto, W. Superchannel of bacteria: Biological significance and new horizons. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 265-277 (2008).
- 5) Takase, R., Ochiai, A., Mikami, B., Hashimoto, W., Murata, K. Molecular identification of unsaturated uronate reductase prerequisite for alginate metabolism in *Sphingomonas* sp. A1. *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 1925-1936 (2010).
- 6) Takase, R., Mikami, B., Kawai, S., Murata, K., Hashimoto, W. Structure-based conversion of the coenzyme requirement of a short-chain dehydrogenase/reductase involved in bacterial alginate metabolism. *J. Biol. Chem.*, **289**, 33198-33214 (2014).
- 7) Momma, K. *et al.* A novel bacterial ATP-binding cassette transporter system that allows uptake of macromolecules. *J. Bacteriol.*, **182**, 3998-4004 (2000).
- 8) Maruyama, Y. *et al.* Structure of a bacterial ABC transporter involved in the import of an acidic polysaccharide alginate. *Structure*, **23**, 1643-1654 (2015).
- 9) Enquist-Newman, M. *et al.* Efficient ethanol production from brown macroalgae sugars by a synthetic yeast platform. *Nature*, **505**, 239-243 (2014).
- 10) Horn, S.J., Aasen, I.M., Ostgaard, K. Ethanol production from seaweed extract. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 249-254 (2000).
- 11) Ota, A., Kawai, S., Oda, H., Iohara, K., Murata, K. Production of ethanol from mannitol by the yeast strain *Saccharomyces paradoxus* NBRC 0259. *J. Biosci. Bioeng.*, **116**, 327-332 (2013).
- 12) Quain, D.E., Boulton, C.A. Growth and metabolism of mannitol by strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 1675-1684 (1987).
- 13) Chujo, M., Yoshida, S., Ota, A., Murata, K., Kawai, S. Acquisition of the ability to assimilate mannitol by *Saccharomyces cerevisiae* through dysfunction of the general corepressor Tup1-Cyc8. *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 9-16 (2015).